

Aus dem
Institut für Arterioskleroseforschung
der westfälischen Wilhelms-Universität Münster
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. G. Assmann-

**Einfluß spezifischer gegen mRNA des basischen
Fibroblastenfaktors gerichteter Antisense-
Oligonukleotide auf Wachstum und Teilung glatter
Muskelzellen des Arterien Gewebes**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur
Erlangung des doctor medicinae

der medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität

vorgelegt von
Karin Höschen
aus Bad Driburg

2004

Gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. H. Jürgens

1. Berichterstatter: PD Dr. rer. nat. A. Schmidt
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. E. Buddecke

Tag der mündlichen Prüfung : 03. Mai 2004

Aus dem
Institut für Arterioskleroseforschung
der westfälischen Wilhelms-Universität Münster
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. G. Assmann-
Referent: PD Dr. A. Schmidt
Koreferent: Prof. Dr. E. Buddecke

ZUSAMMENFASSUNG

Einfluß spezifischer gegen mRNA des basischen Fibroblastenfaktors gerichteter Antisense-Oligonukleotide auf Wachstum und Teilung glatter Muskelzellen des Arterien Gewebes

Karin Höschen

Der basische Fibroblasten Wachstumsfaktor (bFGF)- ein potenter Stimulator vaskulärer Muskelzellen- spielt in der Pathogenese der Arteriosklerose und der Entwicklung einer post-Angioplastie Stenose eine wichtige Rolle. In der vorliegenden experimentellen Studie wurde geprüft, ob Antisenseoligonukleotide, die gegen die mRNA des basischen Fibroblasten Wachstumsfaktors gerichtet sind, die Fähigkeit aufweisen, die bFGF-Synthese zu supprimieren und die Proliferation kultivierter boviner glatter Muskelzellen zu inhibieren. Für die Versuche wurde ein 15-mer Antisenseoligonukleotid (AS-ODN) verwendet, das gegen die Translationsinitiationsregion der bFGF-mRNA gerichtet war. Als Kontrolloligonukleotid wurde eine dem AS-ODN komplementäre Sequenz – ein Senseoligonukleotid (S-ODN) – verwendet. Die Oligonukleotide waren durch partielle Modifikation in die Phosphorothioat-Form gegen den Abbau durch zelleigene Nucleasen geschützt. AS-ODN und S-ODN wurden kultivierten glatten Muskelzellen in einer Konzentration von 0,5 µM und 1,0 µM dreimal im 24-Stunden Intervall zugesetzt. Nach 96 Stunden in Kultur (Versuchsende) wurde das Proliferationsverhalten durch Bestimmung der Zellzahl und der DNA-Synthese ermittelt und die Konzentration des zellulären und perizellulären bFGF-Gehaltes und des zellulären Gesamtproteins bestimmt. Unter dem Einfluß von AS-ODN ergab sich im Vergleich zu unbehandelten Kulturen (100%) eine konzentrationsabhängige, bis auf 6% reduzierte DNA-Synthese sowie eine bis auf 50% herabgesetzte Zellzahl. Gleiche, wenn auch geringer ausgeprägte Effekte, wurden unter dem Einfluss von S-ODN beobachtet, das die DNA-Synthese bis auf 17% und die Zellzahl bis auf 64% inhibierte. Die Proliferationshemmung war in allen Fällen mit einer bis zu 200% betragenden Zunahme des Gesamtproteingehaltes und des Gehaltes an bFGF der Einzelzelle assoziiert. Lichtmikroskopisch zeigten sich unter AS-ODN-/S-ODN-Einfluss intakte glatte Muskelzellen mit den deutlichen Merkmalen eines hypertrophen Wachstumstatus. Die Proliferationsinhibition durch die Oligonukleotide war bei anschließender Kultivierung in ODN freiem Medium reversibel, Apoptosereaktionen wurden nicht beobachtet.

Die vorgelegten Ergebnisse zeigen, dass bFGF-mRNA sequenzdeterminierte Antisense/Sense-Oligonukleotide eine beträchtliche Sensitivität, aber geringe Spezifität bezüglich ihrer zellbiologischen Wirkung aufweisen. Die Ursachen für diese auch in anderen Untersuchungen festgestellten Eigenschaften sowie das Ausbleiben der theoretisch vorausgesagten Hemmung der Synthese von bFGF können – wie anhand der Fachliteratur ausführlich dargelegt – vielfältiger Natur sein und sind in weiteren Studien zu klären.

Tag der mündlichen Prüfung: 03. Mai 2004

Meinen Eltern

Elisabeth und Hermann Höschen

gewidmet

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Fibroblasten Wachstumsfaktoren	1
1.2. Der basische Fibroblastenfaktor (bFGF) oder FGF-2	4
1.3. Rezeptorinteraktion und Signaltransduktion	6
1.4. Expression des bFGF (und anderer Wachstumsfaktoren) in Zellen des arteriellen Gefäßsystems	10
1.4.1. Kompartimentierung des bFGF in glatten Muskelzellen (SMCs)	12
1.4.2. Zellzyklusabhängige Veränderungen der bFGF- Konzentration	15
1.5. Funktion des bFGF bei der Entwicklung der Arteriosklerose und Restenose	16
1.5.1. Proliferation	18
1.5.2. Hypertrophie	19
1.5.3. Apoptose-Prävention	21
1.6. Antisense-Oligonukleotide	22
1.6.1. Prinzip und Funktionsweise	22
1.6.2. Spezifität	26
1.6.3. Aufnahme in die Zelle	27
1.6.4. Strukturmodifizierte Oligonukleotide	28
1.7. Einsatzgebiete der Antisense-Oligonukleotide in der Medizin	33

	Seite
2. Material und Methoden	38
2.1. Oligonukleotide	38
2.1.1. Synthese und Bezug	38
2.1.2. Sequenz und Modifikation	38
2.1.3. Aufbewahrung	39
2.2. Bovine, glatte Muskelzellen	40
2.2.1. Materialien	40
2.2.2. Anlegen von Primärkulturen	41
2.2.3. Subkultivierung	41
2.3. Versuche	42
2.3.1. Standardversuch mit Auswertung nach 96 Stunden	42
2.3.2. Verlaufsversuch über 96 Stunden.	43
2.4. Parameter-Messungen	44
2.4.1. Zellzahlbestimmung	44
2.4.2. [³ H]Thymidin-Inkorporation	45
2.4.3. Proteinbestimmung nach Lowry	46
2.5. bFGF-Bestimmung im intrazellulären und perizellulären Kompartiment	48
2.5.1. bFGF-Kompartiment-Separation	48
2.5.1.1. Gewinnung des perizellulären bFGFs	48
2.5.1.2. Gewinnung des intrazellulären bFGFs	49
2.5.2. bFGF-Bestimmung im ELISA	49
2.6. Apoptose-Nachweis	51
2.6.1. Probenvorbereitung	51
2.6.2. Auswertung	52

	Seite
2.7. Western Blot	53
2.7.1. Probengewinnung	53
2.7.2. Gelherstellung	55
2.7.3. Auftragen der Proben und Elektrophorese	57
2.7.4. Proteintransfer auf Nitrozellulose nach dem Semi-Dry Verfahren	57
2.7.4.1. Pufferherstellung	57
2.7.4.2. Elektrobplot	58
2.7.5. Immunoblot	61
2.8. Mikroskopische Kontrolle mit Photographien	63
3. Ergebnisse	64
3.1. Proliferationskinetik unbehandelter glatter, boviner Muskelzellen	64
3.1.1. Veränderungen der Zellzahl und des Proteingehaltes	64
3.1.2. Verlauf der DNA-Synthese anhand der [³ H]Thymidin- Inkorporationsrate	66
3.1.3. Veränderungen des bFGF-Gehaltes	68
3.2. Proliferationskinetik glatter Muskelzellen unter Antisense- und Sense-Oligonukleotiden	70
3.2.1. Wirkungsvergleich unterschiedlicher AS-ODN- Konzentrationen auf die DNA-Synthese glatter, boviner Muskelzellen	70
3.2.2. Wirkungsdauer der AS- ODN	71

	Seite
3.3. Einfluß wiederholter AS-/S-ODN Zugabe auf die Proliferationskinetik glatter boviner Muskelzellen	73
3.3.1. Einfluß von AS-/S-ODN auf die Zellzahl bei wiederholter Zugabe	74
3.3.2. Einfluß von AS-/S-ODN auf die DNA-Synthese	77
3.3.3. Einfluß von AS-/S-ODN auf den Proteingehalt bei wiederholter Zugabe	80
3.3.4. Einfluß der AS-/S-ODN auf den bFGF-Gehalt über 96 Stunden	84
3.3.5. Veränderungen des bFGF-Gehaltes/ μ g Gesamtprotein unter ODN-Einfluß	87
3.3.6. bFGF-Verteilung im perizellulären-/intrazellulären-Kompartiment unter wiederholter ODN-Zugabe	90
3.3.7. Prüfung auf bFGF-Defektproteine unter Oligonukleotideinfluß	94
3.3.8. Apoptose-Test	96
3.3.9. Reversibilität der ODN-Wirkung	97
3.3.10. Zellmorphologie unter wiederholter AS-/S-ODN-Zugabe über 96 Stunden	101
3.4. Zusammenfassung der Ergebnisse	104
3.4.1. Proliferationsinhibition	104
3.4.2. Reversibilität der ODN-Wirkung	104
3.4.3. Proliferationsinhibition als unspezifische AS-ODN-Wirkung	104
3.4.4. Antisense-ähnliche Effekte der Sense-ODN	105
3.4.5. Zellhypertrophie unter ODN-Wirkung	105

	Seite
4. Diskussion	106
4.1. Wirkung der AS-/S-ODN auf glatte, bovine Muskelzellen in dieser Studie	106
4.2. Wirkung sequenzidentischer Antisense- und Sense-Oligodesoxynukleotide auf glatte Muskel- und Endothelzellen in vergleichbaren Studien	107
4.3. Mögliche Ursachen für die Oligonukleotidwirkung dieser Studie	109
4.3.1. Proliferationsinhibition durch unspezifische Hemmwirkung der Oligonukleotide	110
4.3.1.1. Polyanioncharakter der Oligonukleotide	110
4.3.1.2. Antiproliferative Wirkung einer Sequenzmotiv bedingten Sekundärstruktur	112
4.3.1.3. Zytotoxizität	113
4.3.2. Ausbleibende bFGF-Reduktion durch fehlende Spezifität des Antisense-Oligonukleotids	114
4.3.2.1. Unzureichende Aufnahme in die Zelle	114
4.3.2.2. Unzureichende ODN-Konzentration	119
4.3.2.3. Speziesspezifische Variationen der bFGF-mRNA-Sequenz als Ursache einer unzureichenden Hybridisierungsaffinität des AS-ODN mit der Ziel-mRNA	121
4.3.2.4. Phenotypvariationen und speziessabhängige Heterogenität der glatten Muskelzelle	122
4.3.2.5. Herstellungsbedingte Inkonsistenz der Oligonukleotide	124

	Seite	
4.4.	Hypothese zum Inhibitionsmechanismus der Oligo- desoxynukleotide dieser Studie	125
4.4.1.	Ergebniskonstellation und daraus resultierende weitere Fragestellungen	125
4.4.2.	Phosphorothioate-Oligonukleotide als heparinähnliche Wachstumsfaktorinhibitoren	126
4.4.2.1.	Proliferationsinhibition	126
4.4.2.2.	Reversibilität der Proliferationsinhibition	127
4.4.2.3.	Sequenzabhängigkeit der Wachstumsfaktorinhibition durch Oligonukleotide	128
4.4.2.4.	Hypertrophie unter Heparin und heparinähnlichen Wachstumsfaktorinhibitoren	128
4.4.2.5.	Zunahme des bFGF-und Protein-Gehaltes pro Zelle unter Proliferationsinhibition	130
4.5.	Abschließende Beurteilung	132
5.	Zusammenfassung	134
6.	Anhang	136
6.1.	Abkürzungsverzeichnis	136
6.2.	Literaturverzeichnis	139
6.3.	Abbildungsverzeichnis	167
6.4.	Tabellenverzeichnis	170
6.5.	Danksagung	171
6.6.	Lebenslauf	172

1. Einleitung

1.1. Fibroblasten Wachstumsfaktoren

Als Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (Fibroblast Growth Factors, FGF) wird eine Polypeptidfamilie bezeichnet, die eine signifikante Rolle in der normalen Entwicklung von Organismen, im Wachstum, in der Differenzierung von Geweben und Organen, in der Wundheilung und in der Tumorentstehung und –progression spielt. Fibroblasten-Wachstumsfaktoren induzieren mitogene, chemotaktische und angiogenetische Aktivität in Zellen mesodermalen und neuroektodermalen Ursprungs (1).

Die derzeitige Nomenklatur basiert auf der zuerst entdeckten Eigenschaft der Prototypen, FGF-1 und FGF-2, den [³H]Thymidin-Einbau in Fibroblasten zu stimulieren. FGF-1 und -2 wurden erstmals in den 70er Jahren aus bovinen Hypophysenzellextrakten isoliert und als Mitogene identifiziert (2) (3). Heute umfasst die Wachstumsfaktorfamilie 20 Mitglieder, wobei die einzelnen FGFs chronologisch nach ihrer Entdeckung nummeriert wurden (FGF-1 bis FGF-20). Neben dieser allgemein anerkannten Bezeichnung existieren Synonyme einzelner Faktoren, die aus früheren Nomenklaturen stammen und biologische Funktionen, Herkunft oder chemische Eigenschaften beschreiben (z.B. Keratinozyten-Wachstumsfaktor für FGF-7). Gebräuchlich sind jedoch nur noch die Synonyme der Prototypen, die auch nach ihrem isoelektrischen Punkt benannt wurden. Aufgrund seines sauren isoelektrischen Punktes wird FGF-1 als acidic Fibroblast Growth Factor (aFGF) und FGF-2, dessen isoelektrischer Punkt im basischen pH-Bereich liegt, als basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) bezeichnet. Zu den Merkmalen der FGFs zählen ihre Sequenz-ähnlichkeit und die Eigenschaft, an Heparin und heparinähnliche Moleküle zu binden.

Trotz deutlicher Größenunterschiede von 155 (FGF-1) bis 268 Aminosäuren (FGF-5) besitzen alle Mitglieder der FGF-Familie ein zentrales hochkonserviertes Core von 120 Aminosäuren, das 12 antiparallele beta-Faltblattstränge bildet und eine typische klettblattförmige Tertiärstruktur einnimmt (4).

Die Bindung an heparin- und sulfatreichen Glykosaminoglykanen (HLGAG) wie z.B. das Heparansulfatproteoglykan (HSPG) erfolgt in der extrazellulären Matrix (ECM) oder direkt an der Zelloberfläche, wo FGF mit ihren Tyrosinkinaserzeptoren interagieren und ihr biologisches Signal an den Intrazellärraum weitergeben. Heparin ist ein von Mastzellen produziertes Polysaccharid, bestehend aus sich wiederholenden Iduronsäuren und N-sulfatierten Glukosamin-Disaccharid-Einheiten. Aufgrund seines hohen Schwefelanteils besitzt es einen stark polyanionischen Charakter (5).

Das Heparansulfatproteoglykan ist auf der Zelloberfläche in großer Zahl vertreten. Seine Disaccharidketten gleichen strukturell dem Heparin, obwohl sie aus N-Acetyl-Glukosamin-Disacchariden bestehen und nicht so stark sulfatiert sind. Ferner besitzt das HSPG einen Proteinanteil, der als Verankerung in der Zellmembran dient (5).

Gebunden in der ECM liegen FGF als Depot in einer biologisch inerten Form vor und sind vor Proteasen (6), Hitze und niedrigen pH-Werten geschützt (7). Die ECM dient insbesondere der Regulation von Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren, die sich dort in unmittelbarer Nähe zu ihren hochaffinen Rezeptoren befinden und bei Bedarf durch Heparanasen als FGF-Heparin, beziehungsweise bFGF-HSPG-Komplex herausgelöst werden können (8). Die Rezeptorinteraktion erfolgt unter Bildung eines für die Signaltransduktion essentiellen trimolekularen Komplexes. Dieser besteht aus dem FGF-Rezeptor, dem FGF und einem Heparin oder HSPG (9).

FGF werden nach ihrer Biosynthese in den Extrazellulärraum sezerniert oder in den Nukleus transportiert. Gemäß ihrer Bestimmung sind die meisten FGF mit einer nukleären und/oder Sekretion-Signalsequenz ausgestattet, wobei die Bedeutung der nukleären Translokation noch unklar ist. Durch die Präsenz einer Sekretions-Signalsequenz wird das Peptid auf dem klassischen Weg über das endoplasmatische Retikulum und den Golgi-Apparat aus der Zelle geschleust. FGF-1, FGF-2, FGF-9, FGF-11 bis FGF-14 und FGF-16 besitzen jedoch offensichtlich keine Signalsequenz, die ihre extrazelluläre Sekretion steuert (10). Es wird bei diesen Peptiden ein Golgi-unabhängiger Sekretionsmechanismus angenommen, der möglicherweise dem des Interleukin-1-beta entspricht. Diese Vermutung beruht auf der strukturellen Ähnlichkeit von Interleukin-1-beta und dem hochkonservierten FGF-Core (11).

Fibroblasten-Wachstumsfaktoren vermitteln zahlreiche zelluläre Wachstumsvorgänge in der embryonalen und fetalen Entwicklung von Vertebraten (12).

FGF stimulieren Zellteilungen von embryonalen und extraembryonalen Zellen (13), induzieren und regulieren die Gastrulation als auch die Ausbildung der Keimblätter (14). Ferner sind sie maßgeblich an der Organogenese beteiligt, insbesondere an der Entwicklung des zentralen Nervensystems (15), der Extremitäten (16) und der Lunge (17). Je nach Zell- oder Gewebetyp und dem jeweiligen Entwicklungsstand des Gewebes können FGF Proliferations- oder Differenzierungsprozesse initiieren.

In adulten Organismen fördern FGF die Angiogenese, die Wundheilung und die Erneuerung von Epithelien. Da sie außerdem ausdifferenzierte Zellen vor dem programmierten Zelltod (Apoptose) schützen, werden sie auch als „survival“-Faktoren bezeichnet (18).

Als Regulatoren der Angiogenese stimulieren sie die Proliferation von glatten Muskelzellen (19), Fibroblasten, Endothelzellen und fördern deren Migration durch Beeinflussung ihrer Oberflächen-Adhäsionsmoleküle, die ein Anheften an Matrixstrukturen ermöglichen (20). Sie induzieren somit ubiquitäre Vaskularisierungs- und Revaskularisierungsvorgänge, beispielsweise nach abgelaufenem Myokardinfarkt (21). Auch in Wundheilungsprozessen kommen diese Eigenschaften zum Tragen (22). FGF vermögen Entzündungsvorgänge in Gang zu setzen, indem sie die Produktion von Interleukinen und somit auch die Migration inflammatorischer Zellen anregen (23). Eine weitere Reparaturfunktion nehmen sie in der Erneuerung und Regeneration von Epithelien beispielsweise nach mechanischer oder chemischer Schädigung ein (24).

FGF unterliegen einer differenzierten Expressionsregulation. Die meisten Mitglieder dieser Polypeptidfamilie (FGF-3 bis FGF-20) treten hauptsächlich in der Embryonal- und Fetalzeit auf und zeigen im adulten Organismus ein deutlich eingeschränktes Expressionsmuster. So werden FGF-4 physiologisch im normalen Magengewebe, FGF-5 und FGF-9 im Zentralnervensystem, FGF-6 im adulten Herzgewebe und Skelettmuskel, FGF-7 als Regulator des Keratinozytenwachstums in unterschiedlichen Epithelien und FGF-8 phasenweise in Ovarien und Hoden gefunden (25). Die Faktoren FGF-1 und FGF-2 dagegen werden bereits seit der frühen Embryonalperiode exprimiert und sind auch postnatal in zahlreichen Geweben weiterhin regulär präsent (12).

FGF haben in den letzten Jahren verstärkt Aufmerksamkeit erregt, da durch Entgleisungen ihrer genetischen Aktivität in Form einer pathologischen Überexpression, einer erhöhten Bioverfügbarkeit oder Dysfunktion von FGF-Rezeptoren die Entstehung von Tumoren, deren Progression und Metastasierung begünstigt werden können. Insbesondere Faktoren mit pränatalem Aktionsschwerpunkt aber auch FGF-2 wurden dabei als potentielle Onkogene identifiziert (26) (27).

1.2. Der basische Fibroblastenfaktor (bFGF) oder FGF-2

FGF-2 wird in zahlreichen Geweben wie z.B. Hypophyse, Hypothalamus, Thymus, Niere, Nebenniere, Retina, Gehirn, Gefäßen, Plazenta, Corpus luteum sowie verschiedenen Tumoren gefunden (28) und hat weitreichende Funktionen in der fetalen Entwicklung und Differenzierung, in Wachstums- und Reparaturvorgängen sowie in der Angiogenese und Tumorprogression (1) (29). bFGF ist in zahlreichen Geweben als Anti-Apoptose-Faktor anerkannt, wurde kürzlich jedoch auch als Apoptose-auslösend in einigen Tumorzellreihen beschrieben (30).

Es handelt sich um ein hochkonserviertes Protein mit hohem Selektionsdruck in der Evolution sowie starker Homologie unter den Vertebraten. So besteht eine 99%ige Homologie zwischen humanem und bovinem bFGF, die sich nur in 2 Aminosäuren unterscheiden (28).

Eine dementsprechend große biologische Rolle spielt dieses Peptid als hochpotenter Wachstumsfaktor für zahlreiche Gewebe und auch als Überlebensfaktor vor allem im zentralen und peripheren Nervensystem (18). Bei nur einem identifizierten bFGF-Gen auf dem Chromosom 4 q26-27 wurden 4 bFGF-Isoformen, die sich ihrem Molekulargewicht unterscheiden, gefunden (18). Es handelt sich dabei um das klassische, im Zytoplasma vorkommende, 18 kD-Protein, das aus 146 Aminosäuren besteht, sowie um die später entdeckten höhermolekularen, nukleären Formen von 22kD, 22,5kD und 34kD. Die Isoformen entstehen aufgrund mehrerer Translationsstartkodons auf der bFGF-mRNA. Während die 18kD-Form durch Translationsbeginn am 5'-AUG-Kodon synthetisiert wird, entstehen die

höhermolekularen Formen durch Translationsbeginn an mehreren CUG-Kodons Strang aufwärts. Die dadurch verlängerte Aminosäurekette beinhaltet eine nukleäre Signalsequenz, so dass die höhermolekularen Isoformen demzufolge im Nukleus angetroffen werden (18). Das bFGF-Protein weist eine Heparin- als auch eine Zellrezeptorbindungsdomäne auf (18). Wie bei allen FGF wird auch beim FGF-2 eine autokrin-parakrine Funktionsweise angenommen (31) (32). Das von der Zelle produzierte zytoplasmatische bFGF (18kD) wird intrazellulär als auch extrazellulär gespeichert. bFGF besitzt keine Signalsequenz (33) und wird daher nicht über den klassischen Sekretionsweg der Zelle (dessen wichtigste Stationen das Endoplasmatische Retikulum und der Golgi-Apparat sind) in den Extrazellulärraum abgegeben (31). Zahlreiche Studien haben belegt, dass das zytoplasmatische bFGF durch Zelltraumen freigesetzt wird (34) (35) (36) (37) (38), was seine reparative Funktion in Wundheilungsprozessen hervorhebt. Dabei sind bereits subletale Ereignisse wie Fluß-, Druck-, Zug- oder Scherkräfte ausreichend (39) (38). Vermutet werden Membranrupturen oder Läsionen, die zur bFGF-Freisetzung führen. Der genaue Mechanismus, über den bFGF die Zelle verlässt, ist jedoch noch nicht im Einzelnen geklärt. Die hochmolekularen bFGF-Isoformen sind bislang längst nicht so intensiv untersucht worden wie die cytoplasmatische 18kD Isoform. Für alle hochmolekularen Isoformen, die in den Nukleus transportiert werden, wurde eine proliferationsstimulierende Potenz, wahrscheinlich im Rahmen eines intrakrinen Mechanismus postuliert (40) (41). Beispielsweise halten sie das Zellwachstum unter Nährstoffkarenz aufrecht (41)(42), was die niedermolekulare Form nicht vermag. Sie können in großen Mengen aber auch eine Änderung der Zellmorphologie bis zur Entartung hervorrufen (18). Ein Schutz vor Apoptose wird durch die hochmolekularen Isoformen nicht vermittelt (41).

Im Extrazellulärraum wird bFGF vom Heparin und Heparansulfatproteoglykanen gebunden. bFGF vermag in gewissem Umfang seine eigene Funktion im Sinne eines positiven Loops selbst zu verstärken. Einerseits wird die Produktion extrazellulärer Matrix anregt und ihre Zusammensetzung zugunsten des HSPGs, dem bFGF-Co-Rezeptor, verändert, andererseits wird die HSPG-Molekülstruktur selbst zugunsten längerer Disaccharideinheiten beeinflusst, die über ein größeres Bindungsbestreben zum bFGF-Rezeptor verfügen (43).

1.3. Rezeptor Interaktion und Signaltransduktion

Zur Signaltransduktion interagiert bFGF an der Zelloberfläche sowohl mit seinem hoch-affinen Rezeptor als auch mit seinem Co-Rezeptor, dem HSPG (Abb. 1.1).

Vorraussetzung für eine Rezeptoraktivierung durch bFGF ist die Bildung des trimolekularen Komplexes, bestehend aus bFGF, dem bereits oben erwähnten Heparansulfatproteoglykan (HSPG), und dem bFGF-Rezeptor (Abb. 1.1a) (44). Eine Aktivierung erfolgt über eine Rezeptordimerisierung (Abb. 1.1b), d.h. 2 Rezeptoren mit jeweils gebundenem bFGF-Molekül gehen, überbrückt durch HSPG, eine direkte Bindung ein, so dass die unmittelbare räumliche Nähe ihrer intrazellulären Tyrosinkinasedomänen Tyrosinreste des jeweils anderen Rezeptors phosphorylieren können. Die genauen Interaktionen der einzelnen Komplexpartner sowie deren zahlenmäßiges Verhältnis zueinander sind derzeit noch nicht im Einzelnen geklärt, es existieren aktuell mehrere konkrete Modelle, die auf kristallographische Untersuchungen beruhen (45).

Allgemein akzeptiert ist jedoch die essentielle Bedeutung eines HSPG oder Heparin-Moleküls (9) (46) dessen Kettenlänge idealerweise einem Dodecasaccharids entspricht (47). Die entscheidende Determinante für eine suffiziente bFGF-Bindung ist ein hoher Sulfatierungsgrad, speziell 2-O-Sulfatierungen der Uronsäuren wirken besonders bindungs-fördernd (48). Als bFGF-Bindungsregion des HSPG wurde eine Sequenz aus IdoA(2SO₄)-GlucNSO₃-Einheiten identifiziert (49).

Unter der Bindung an HSPG wird eine Konformationsänderung des bFGF vermutet, die die Vorraussetzung für die Rezeptorinteraktion schaffen soll (46).

Neben der Förderung der bFGF-Rezeptor-Bindung, ist HSPG ferner erforderlich für die Rezeptordimerisierung mit anschließender Komplexinternalisierung in den Intrazellulärraum (50).

An hochaffinen, transmembranen FGF-Rezeptoren wurden allgemein bislang 4 Typen (FGFR1-4) mit Tyrosinkinaseaktivität isoliert (51) (52), die eine 55-77%-ige Homologie ihrer Aminosäuresequenzen (53) aufweisen. bFGF bindet mit hoher Affinität an FGFR1 und FGFR2, weniger an FGFR3 und FGFR4, während aFGF eine höhere Affinität zu den letztgenannten Rezeptoren aufweist (51).

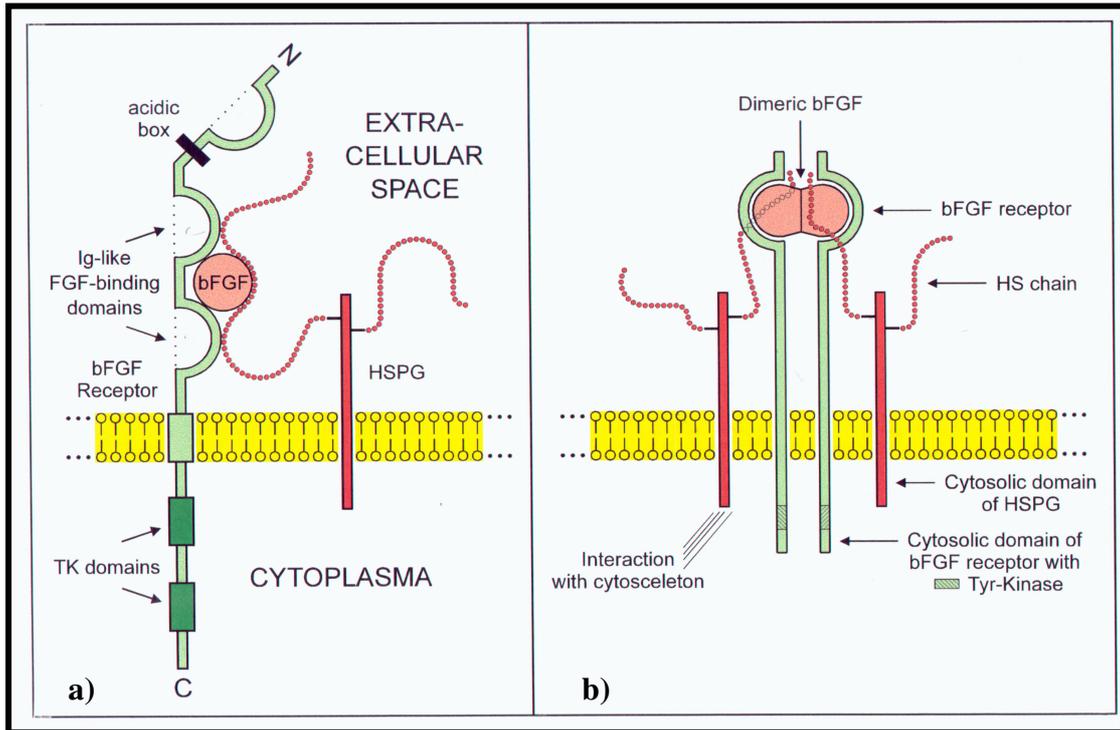


Abb. 1.1a und Abb. 1.1b: Funktionsweise des bFGF-HSPG-Rezeptorsystems:

Die Bildung des trimolekularen Komplexes aus dem bFGF-Rezeptor, einem HSPG und dem bFGF (Abb. 1.1a) ist die Voraussetzung für die Rezeptordimerisierung (Abb. 1.1b) und Signaltransduktion.

Quelle: Graphische Dokumentation der Arbeitsgruppe Molekular-Kardiologie, Institut für Arterioskleroseforschung, Universität Münster (unveröffentlicht).

Ferner benötigen die einzelnen FGF zur Bindung an HSPG unterschiedliche Sulfatierungsmuster ihres Co-Rezeptors (47) (54), so dass dem HSPG zudem eine spezifische Funktion in der FGF-Signaltransduktion zukommt (52). Erst kürzlich wurde von Berry et al. (55) berichtet, dass das HSPG die Stärke des bFGF-Proliferationssignals auf die jeweilige Zielzelle über seinen Sulfatierungsgrad modulieren kann. So wurde gezeigt, dass glatte Muskelzellen, die ein höhersulfatiertes HSPG exprimieren, ein stärkeres Proliferationsstimulus empfangen als Endothelzellen, und dass Endothelzellen unter Zugabe des höhersulfatierten HSPG ebenfalls stärker auf den bFGF-Stimulus reagieren (55).

Im arteriellen Gefäßsystem sind alle vier FGF-Rezeptoren (FGFR1-4) jeweils in der Intima, Neointima, Media und Adventitia vertreten, vorherrschend sind jedoch FGFR1 und FGFR2 (51). Sie werden in normalen als auch arteriosklerotischen Geweben gleich stark exprimiert (51).

Lee et al. (56) isolierten erstmals einen FGF-1-Rezeptor und fanden ein transmembranes Protein, das drei extrazelluläre Immunglobulin-ähnliche Domänen (Ig I-III) aufweist. Es bestand ferner aus einer Region zahlreicher saurer Reste zwischen Ig I und Ig II, einer transmembranären Domäne und einer intrazellulären Tyrosinkinase Domäne. Während die Ig I-Domäne fehlen kann, ohne dass der Rezeptor seine Funktion verliert, ist die Ig II-Domäne in allen Rezeptortypen hochkonserviert. Die Ig II-Domäne bindet zuerst an das bFGF-Peptid und erlaubt dadurch eine Bindung an die Ig III-Domäne, die rezeptorspezifisch ist und durch alternatives Splicing entsteht (52). Die Bindung von bFGF an seinen Rezeptor ist deutlich stärker als an seinen Co-Rezeptor. Die Ermittlung von Bindungskonstanten ergab, dass die bFGF-Dissoziation von seinem hochaffinen Rezeptor 45 min bis 150 min beträgt, während sie beim HSPG etwa bei 6 min liegt, was einer Spontandissoziation gleichkommt (57).

Die weitere Transduktion des bFGF-Signals (Abb. 1.2) erfolgt über Aktivierung diverser intrazellulärer Kaskaden, die die unterschiedlichen bFGF-Funktionen wie z.B. Zytoskelettveränderungen und Zellzyklusprogression vermitteln (25).

Das Signal zur Zellzyklusprogression führt über die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Kaskade (58) zur Initiierung von Transkriptionsprozessen und zur

Aktivierung Zellzyklus-regulierender Proteine (59) (60). Die gleiche Kaskade soll auch das Überlebenssignal des bFGF an die Zelle beeinhalteln (32).

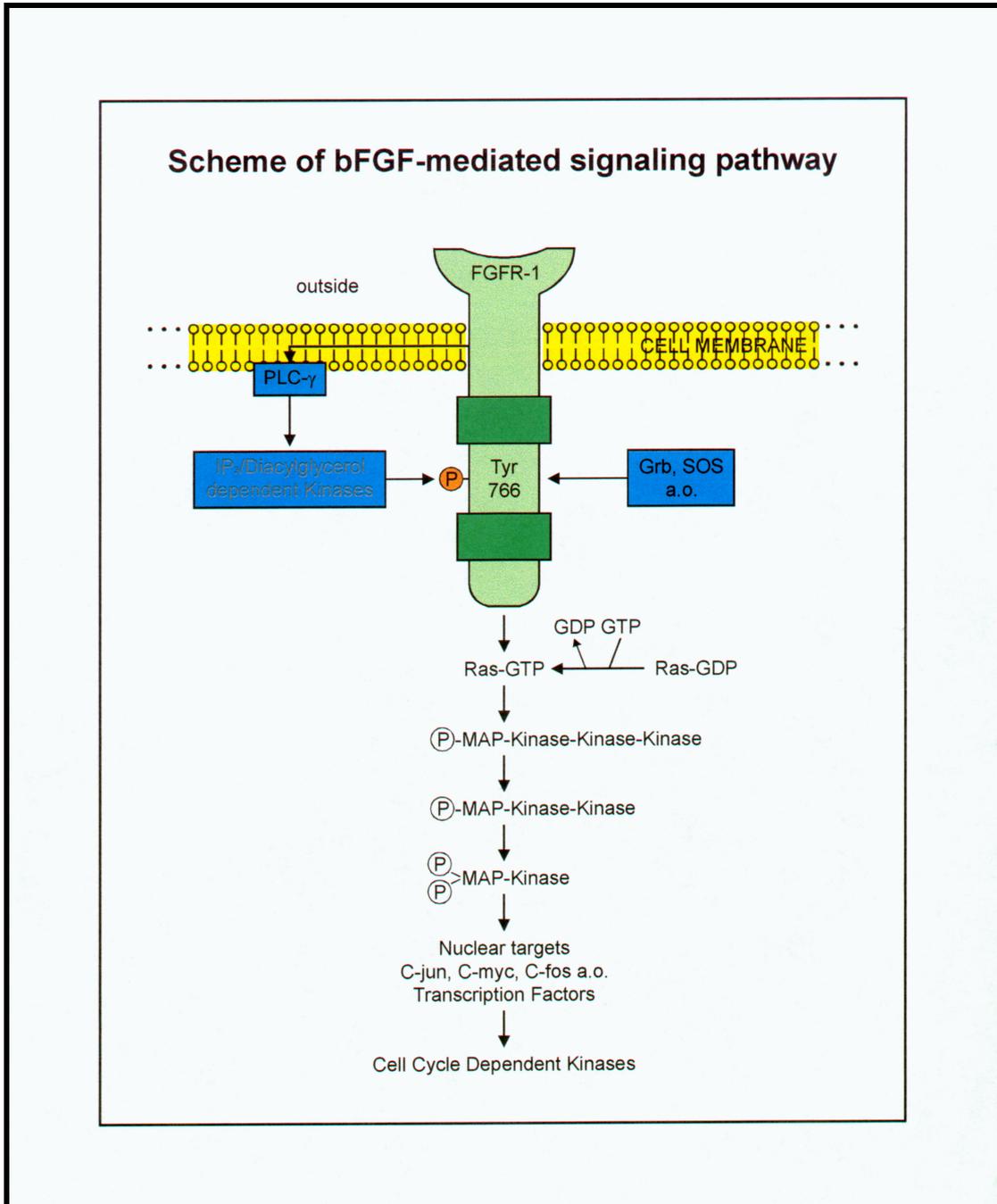


Abb. 1.2: bFGF-Signaltransduktionskaskade.

Quelle: Graphische Dokumentation der Arbeitsgruppe Molekular-Kardiologie, Institut für Arterioskleroseforschung, Universität Münster (unveröffentlicht).

1.4. Expression des bFGF (und anderer Wachstumsfaktoren) in Zellen des arteriellen Gefäßsystems

Im arteriellen Gefäßsystem werden Gewebewachstum, Gewebestruktur und Reaktionen auf äußere Einflüsse und Anforderungen durch ein komplexes Zusammenspiel vielfältiger Wachstumsfaktoren gesteuert. Diese vermitteln ihre biologischen Signale in der Regel über auto- und parakrine Mechanismen und werden von Zellen der arteriellen Gefäßwand wie Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Fibroblasten als auch von zirkulierenden Zellen wie Lymphozyten, Makrophagen und Thrombozyten exprimiert und sezerniert (61). Sie erfüllen proliferationsstimulierende, inhibierende, chemotaktische und transformierende Aufgaben, können Apoptose sowohl induzieren, als auch abwenden. Die meisten Wachstumsfaktoren wurden initial nach der Zelllinie benannt, in der sie entdeckt wurden. Diese Nomenklatur ist auch weiterhin gebräuchlich. Im Laufe weiterer Forschung stellte man jedoch fest, daß die meisten Wachstumsfaktoren nicht nur von mehreren Zelllinien synthetisiert werden, sondern entsprechend ihrer Rezeptorverbreitung auch auf unterschiedliche Zelltypen einwirken können. Da ihr Wirkungsspektrum dabei je nach Zelltyp variiert (62), setzte sich neben einer Expressions- und Zielzell-orientierten Einteilung auch keine Funktions-orientierte Einteilung der Mediatoren durch. Schließlich ist man dazu übergegangen, die Faktoren nach ihrem Rezeptortyp zu unterteilen. Man unterscheidet Tyrosinkinaserzeptoren, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und Serin-/Threoninkinasenrezeptoren.

Die wichtigsten Wachstumsfaktoren mit Tyrosinkinaseaktivität sind Platelet Derived Growth Factor (PDGF), Fibroblast Growth Factors (FGF, insbesondere FGF-1 und FGF-2), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Insulin-like Growth Factor (IGF) und Epidermal Growth Factor (EGF) (63).

Thrombin, Angiotensin II, Endothelin (63) und Thromboxan A₂ (64) vermitteln ihre Signale über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und Transforming Growth Factor-beta (TGF-β) über Serin-/Threoninkinasenrezeptoren (65).

Darüber hinaus sind noch die Cytokine Interleukin-1,-2 und -6 zu erwähnen, die in erster Linie als Mediatoren von Immun- und Entzündungsreaktionen fungieren, jedoch

auch proliferationsstimulierende Eigenschaften auf vaskuläre glatte Muskelzellen und Endothelzellen aufweisen (63).

Die Mediatoren sind neben den interzellulären Kontakten wichtige Kommunikationsmedien, deren Signale über die unmittelbare Umgebung hinaus eine Verständigung zwischen den Gefäßwandzellen gewährleisten. Insbesondere Endothelzellen und glatte Muskelzellen der Media bilden auf diese Weise ein gekoppeltes Signalsystem, um auf Einflüsse aus der Blutbahn reagieren zu können. Zur Regulation des Gefäßtonus synthetisieren Endothelzellen vasoaktive Moleküle und geben diese an die darunterliegende Schicht glatter Muskelzellen ab (66). Vasorelaxierende Moleküle wie Nitrit-Oxid (NO) und Prostazyklin vermitteln einen inhibierenden, vasokonstriktorisches Moleküle wie Endothelin und PDGF einen stimulierenden Effekt auf das Wachstum kultivierter glatter Muskelzellen (SMCs) (67)(68) (69). Das Mediatorexpressionsmuster beider Zelllinien wird durch interzelluläre Kontakte entscheidend mitbeeinflusst. So führt die traumatische Unterbrechung von Zellkontakten zu einer vermehrten Expression proliferationsstimulierender Faktoren (70). Extern zugeführtes bFGF vermag in einer intakten Endothel-Media-Einheit unverletzter Arterien keine Proliferationsprozesse auszulösen, da proliferationsinhibierende Einflüsse überwiegen (71).

Physiologisch erhalten die Faktoren durch ein Gleichgewicht an stimulierenden, Apoptose-regulierenden als auch inhibierenden Signalen die Gefäßintegrität, können jedoch unter pathologischen Bedingungen infolge einer gesteigerten Ausschüttung und Expression erhebliche Dysfunktionen der einzelnen Gefäßschichten induzieren (61), die zu arteriosklerotischen Läsionsbildungen führen. Die Ursache einer Wachstumsfaktordysregulation im arteriellen Gefäßsystem sind schwerwiegende oder chronisch einwirkende Gefäßtraumen.

bFGF wird im arteriellen Gefäßsystem in der Regel von Endothelzellen (72), glatten Muskelzellen (6) (73) und Makrophagen (74) synthetisiert.

In normalen intakten Arterien wird das bFGF-Protein in medialen SMCs und adventitialen Gefäßen gefunden, das luminale Endothel hingegen zeigt keine bFGF-Immunaktivität (51). Während das bFGF-Protein in der Media und Adventitia in großer Menge detektiert werden konnte, ist die Expressionsrate bei kaum im Northern Blot detektierbarer bFGF-mRNA in diesen Schichten sehr gering (73). Intakte

darüberliegende Endothelzellen vermitteln eine Expressionsinhibition über interzelluläre Kontakte (70). bFGF wird in ruhenden glatten Muskelzellen hauptsächlich intrazellulär gespeichert (71). Unabhängig von seiner Eigenschaft als Proliferationsstimulator scheint bFGF dort durch die Anregung der alpha-Aktin-Produktion an der SMC-Differenzierung mitzuwirken (75).

In pathologischen Gefäßprozessen kommt es zu einer deutlichen Expressionszunahme des bFGF als auch anderer Wachstumsfaktoren des arteriellen Gefäßsystems.

Conor et al. (76) führten menschliche Gewebeanalysen durch und verglichen die exprimierten Wachstumsfaktormengen im normalen Gefäßgewebe mit denen im arteriosklerotischen Gewebe und im Gefäßgewebe nach Ballonkatheterintervention. bFGF konnte im arteriosklerotischen Gewebe, ähnlich wie auch andere Wachstumsfaktoren in 20-fach erhöhter Menge, in restenotischem Gewebe sogar in 30-facher Menge nachgewiesen werden. Dabei wurde in der Regel die zytoplasmatische 18-kD-Isoform isoliert (19). Olsen et al. (34) detektierten in restenotischem Gewebe nach Ballonkatheterdilatation neben der 18kD-Form auch die 23-kD-Isoform. Ferner wurde auch eine massive Expression der bFGF-Rezeptoren 1 und 2 in den aktiven Gefäßplaques gefunden (51).

1.4.1. Kompartimentierung des bFGF in glatten Muskelzellen (SMCs)

bFGF kann in unterschiedlichen Kompartimenten der glatten vaskulären Muskelzelle, dem Nukleus, dem Zytoplasma, als auch in der extrazellulären Matrix angetroffen werden. Ruhende glatte Muskelzellen *in vivo* (71) als auch *in vitro* (77) lagern bFGF hauptsächlich das Zytoplasma ein, während die extrazelluläre Matrix nur einen verschwindend kleinen Anteil des Gesamt-bFGFs beherbergt.

Unter traumatischer Stimulation und/oder Lösung des Zellverbandes wird bFGF aus den zytoplasmatischen Speichern in die extrazelluläre Matrix verlagert und teilweise auch in das Zellmedium abgegeben. Die im Medium nachgewiesene bFGF-Menge ist jedoch mit <3% des Gesamt-bFGFs (39) gering.

Die Verlagerung in die ECM ist abhängig vom Ausmaß des Traumas bzw. des mechanischen-chemischen Stimulus (78). Kompression (39), Dehnung (78), Zellabschabung (36), Fluß-Scherkräfte (38), osmotischer Schock (79), aber auch ox-LDL (80), Heparanase und Plättchenfaktor-4 aus aktivierten Thrombozyten (81) können eine bFGF-Verlagerung in den Extrazellulärraum auslösen. Die bFGF-Bindungsfähigkeit der extrazellulären Matrix kann nach Lindner et al. auf das 45-fache ansteigen (71). Dort ist das Peptid seinem hochaffinen Rezeptor durch enzymatische Freisetzung (81) (82) zugänglich und kann über eine Rezeptoraktivierung Proliferationsprozesse initiieren. Matrix-gebundenes bFGF ist daher ein langfristiger Stimulator der DNA-Synthese (37) (83).

Schmidt et al. (77) veranschaulichten in einer in vitro-Proliferationsstudie glatter boviner Muskelzellen die Veränderungen der bFGF-Kompartimentverteilung subkonfluenter, proliferierender Kulturen (Abb. 1.3).

Bovine vaskuläre glatte Muskelzellen exprimieren 3-12 pg bFGF/ μ g Zellprotein (77) (84). In ruhenden SMCs liegen 80% des bFGFs intrazellulär vor, während der Anteil des Matrix-gebundenen bFGFs 20% beträgt. In der Phase des exponentiellen Wachstums, die durch Aussaat der Zellen in geringer Dichte induziert wurde, kommt es innerhalb von 3 Tagen zu einem Anstieg des Matrix-gebundenen bFGF auf 75%, welches dann mit nachlassender Proliferationsaktivität innerhalb von 10 Tagen wieder auf 20% in der Stagnationsphase absinkt. Der intrazelluläre Anteil beträgt dementsprechend nach 3 Tagen 25% und nach 10 Tagen wieder 80% des Gesamt bFGFs (77). Die Mitogenität des intra- und extrazellulären bFGFs ist prinzipiell identisch (77). Ein bestimmter Teil des perizellulären bFGFs kann durch exogenes Heparin aus der Matrix freigesetzt werden.

Baldin et al. (85) fanden in bovinen Aortenendothelzellen, Schmidt et al. (43) in bovinen kornealen Endothelzellen und Hill et al (86) in Chondrozyten ähnliche Verhältnisse mit Zunahme des bFGF-Anteils in der extrazellulären Matrix unter Proliferationsbedingungen. Zudem wurde in bovinen Aortenendothelzellen eine Translokation von 10% des intrazellulären bFGF in den Nukleus beschrieben, die ausschließlich in der G1-Phase stattfindet und in konfluenten ruhenden Zellen nicht

nachgewiesen werden konnte (85). Die Translokation des bFGF in den Nukleus erfolgt nach Rezeptoraktivierung an der Zellmembran und ist Voraussetzung für die Vermittlung des bFGF-Proliferationssignals und Stimulation der DNA-Synthese (54).

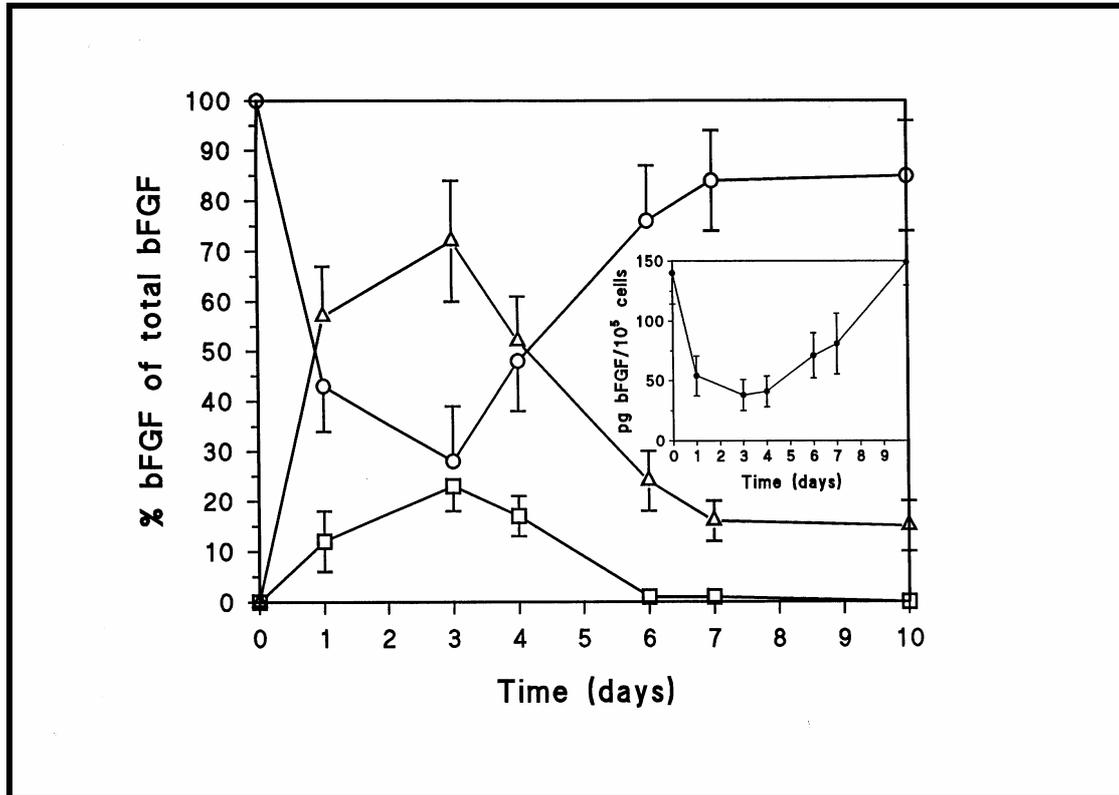


Abb. 1.3: Wachstumsabhängige Veränderungen der bFGF-Kompartimentverteilung.
Quelle: Schmidt et al. (77)

Glatte Muskelzellen wurden in einer geringen Dichte ($2500/\text{cm}^2$) ausgesät und 10 Tage in Kultur belassen. Dabei wurde das intrazelluläre bFGF (\circ), das perizelluläre bFGF (\triangle) und das gesamte bFGF (\bullet) bestimmt, das der Summe des intra- und perizellulären bFGF entspricht. Das durch Heparin freisetzbare bFGF (\square) ist ein Teil des perizellulären bFGFs.

1.4.2. Zellzyklusabhängige Veränderungen der bFGF-Konzentration

Neben der Veränderung der bFGF-Kompartimentverteilung verzeichneten Schmidt et al. (77) in der Phase des exponentiellen Wachstums einen deutlichen Abfall des Gesamt-bFGFs (intra- und perizelluläres bFGF) kultivierter, boviner glatter Muskelzellen. Ein auf minimal 30% des Ausgangswertes gesunkener bFGF-Gehalt wurde nach ca. 3 Tagen in Kultur gemessen, nachdem glatte Muskelzellen in geringer Dichte am Tag 0 ausgesät wurden (77). Unter Zunahme der Zellzahl und abflauender Proliferationsaktivität ist ab dem 4. Kulturtag wieder ein bFGF-Anstieg zu verzeichnen, wobei bFGF jetzt vorwiegend intrazellulär eingelagert wird (77).

Maximale Gesamt-bFGF Mengen werden in postkonfluenten Zellen gefunden, die ihre Speicher wieder aufgefüllt haben. Der rasante bFGF-Abfall in der Phase des exponentiellen Wachstums verläuft parallel zur der Verlagerung des intrazellulären bFGFs in den Extrazellulärraum, so dass eine Abgabe von bFGF in das Medium vermutet werden könnte. Im Medium konnte bFGF hier jedoch nicht nachgewiesen werden. Die Autoren vermuteten daher einen proteolytischen Abbau des intrazellulären bFGFs (77), dessen Bedeutung jedoch noch nicht weiter geklärt werden konnte.

Ein Abfall des bFGF-Gehaltes wurde auch in vivo-Untersuchungen beobachtet. Olsen et al. (34) verzeichneten in Ratten-Carotiden einen bFGF-Protein- und mRNA-Rückgang unmittelbar nach Ballondilatation. Auch in proliferierenden Kaninchen SMCs ist bFGF zwei Tage nach Ballontrauma nicht mehr nachweisbar, während in ruhenden Zellen zuvor noch große bFGF-Mengen detektiert wurden (87). Cheng et al. (39) stellten nach subletaler Kompressionsbehandlung humaner SMCs eine stärker proliferationsstimulierende Wirkung des Mediums im Vergleich zum Kontrollmedium nicht-komprimierter SMCs fest und wies aber nur <3% des Gesamt-bFGF im Medium nach. Eine Erklärung für den Abfall des Gesamt-bFGFs wird dadurch jedoch nicht geliefert.

1.5. Funktion des bFGF bei der Entwicklung der Arteriosklerose und Restenose

Bei der Arteriosklerose und Restenose handelt es sich um pathologische Gefäßprozesse, denen eine gesteigerte Proliferations- und Stoffwechselaktivität glatter vaskulärer Muskelzellen nach Gefäßtraumen zugrunde liegt. Wachstumsprozesse der glatten Muskelzelle können als Hyperplasie (88) mit einer Erhöhung der Zellzahl oder auch als Hypertrophie mit einer Erhöhung der Zellmasse einhergehen (89), wobei beide Wachstumsformen nebeneinander vorkommen und auch ineinander übergehen können. Parallel findet sich zudem eine erhöhte Apoptoserate der SMCs (61).

Die Steuerung von Proliferations- und Apoptoseprozessen wird unter anderem durch eine Reihe von Wachstumsfaktoren übernommen (61).

Im intakten arteriellen Gefäßsystem liegen glatte Muskelzellen in ihrem differenzierten kontraktilem Phänotyp vor. Ihre Hauptaufgabe ist die Kontraktion zur Aufrechterhaltung des Gefäßtonus. Ihre Proliferationsaktivität ist gering. (90)

Gefäßtraumen verändern tiefgreifend die Mikroumgebung der Gefäßwand und führen zu einer Freisetzung zahlreicher Mediatoren aus den Gefäßzellen. Unter diesen Bedingungen geben glatte Muskelzellen in Abhängigkeit von der Intensität der äußerern Einflüsse ihren differenzierten kontraktilem Phänotyp auf, um einen synthetischen Phänotyp anzunehmen. Dies geschieht unter Verlust kontraktilem Elemente wie alpha-Aktin und Myosin-Schwerketten und unter Zunahme der Zellorganellen wie ER, Ribosomen und Golgi (91). Glatte Muskelzellen vom synthetischen Phänotyp können verstärkt in den Zellzyklus eintreten, produzieren große Mengen an ECM und weisen ein verändertes Wachstumsfaktor-expressionsmuster auf (91).

Pathologisch kennzeichnend für die Arteriosklerose und Restenose nach PTCA ist die Ausbildung der sogenannten Neointima, einer vorwiegend aus glatten Muskelzellen und ECM gebildeten dysfunktionellen Gefäßinnenschicht, die im Rahmen eines Reparaturprozesses an die Stelle des traumatisierten Endothels tritt (92). Zur Bildung der Neointima wandern aktivierte mediale glatte Muskelzellen Richtung Gefäßlumen und beginnen dort zu proliferieren und extrazelluläre Matrix zu produzieren.

bFGF fördert im Zusammenspiel mit anderen Wachstumsfaktoren zahlreiche Prozesse der Neointimaentstehung.

Wie bereits oben erwähnt, wird bFGF nach Gefäßtraumatisierung aus den intrazellulären Speichern der glatten Muskelzelle freigesetzt (71).

bFGF steigert durch Veränderung der Integrinexpression die Motilität der glatten Muskelzellen und verstärkt somit ihre Reaktion auf die vom Endothel ausgeschütteten Chemotaxine wie z.B. PDGF (93). Im weiteren Verlauf ist der Mediator maßgeblich an der Phänotypwandlung der SMCs beteiligt (94) (95) (96). Exogenes bFGF reduziert die alpha-Aktin-Expression und fördert über eine Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Kaskade die Annahme des synthetischen Phänotyps. Hayashi et al. (95) vermuten, dass Phänotypänderungen der glatten Muskelzelle durch eine Balance von Stimuli über die Phosphoinositol-3-(Pi3)-kinase und Proteinkinase B einerseits und Stimuli über die MAPK- und die Extrazellulär signal-regulated-kinase (ERK)-Kaskade andererseits gesteuert werden, wobei ERK-Impulse die Entwicklung des synthetischen Phänotyps herbeiführen und PI3-Impulse die Aufrechterhaltung des kontraktiven Phänotyps fördern.

bFGF vermag ferner die Produktion weiterer Wachstumsfaktoren wie z.B. PDGF –ein starkes Chemotaxin und eine Proliferationsstimulans (97)- und VEGF -ein starker Angiogenesfaktor (98)- anzuregen, um somit seine Wirkung zu potenzieren und sein Spektrum indirekt auszuweiten. Desweiteren wird bFGF auch sekundär als Antwort auf zahlreiche andere Mediatoren wie Angiotensin (99), Thromboxan A2 (100), Thrombin (101) und Endothelin (63) exprimiert und scheint daher eine wichtige Steuerfunktion innerhalb des Zusammenspiels verschiedener Wachstumsfaktoren einzunehmen.

Die herausragende Funktion des bFGF in Gefäßerkrankungen ist jedoch die Initiierung von Wachstums- und Proliferationsprozessen, auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll.

1.5.1. Proliferation

bFGF gilt als starkes Mitogen glatter vaskulärer Muskelzellen (37) und, gebunden in der extrazellulären Matrix, als längerfristiger Stimulator der DNA-Synthese (83). Per Signaltransduktion über die MAPK-Kaskade fördert bFGF den Eintritt glatter Muskelzellen von der G0 in die G1-Phase des Zellzyklus (102).

Schmidt et al. zeigten (Abb. 1.4), dass bFGF im Vergleich mit anderen Wachstumsfaktoren des arteriellen Gefäßsystems (PDGFA/B, EGF und IGF-I) den weitaus stärksten mitogenen Stimulus auf bovine glatte Muskelzellen ausübt.

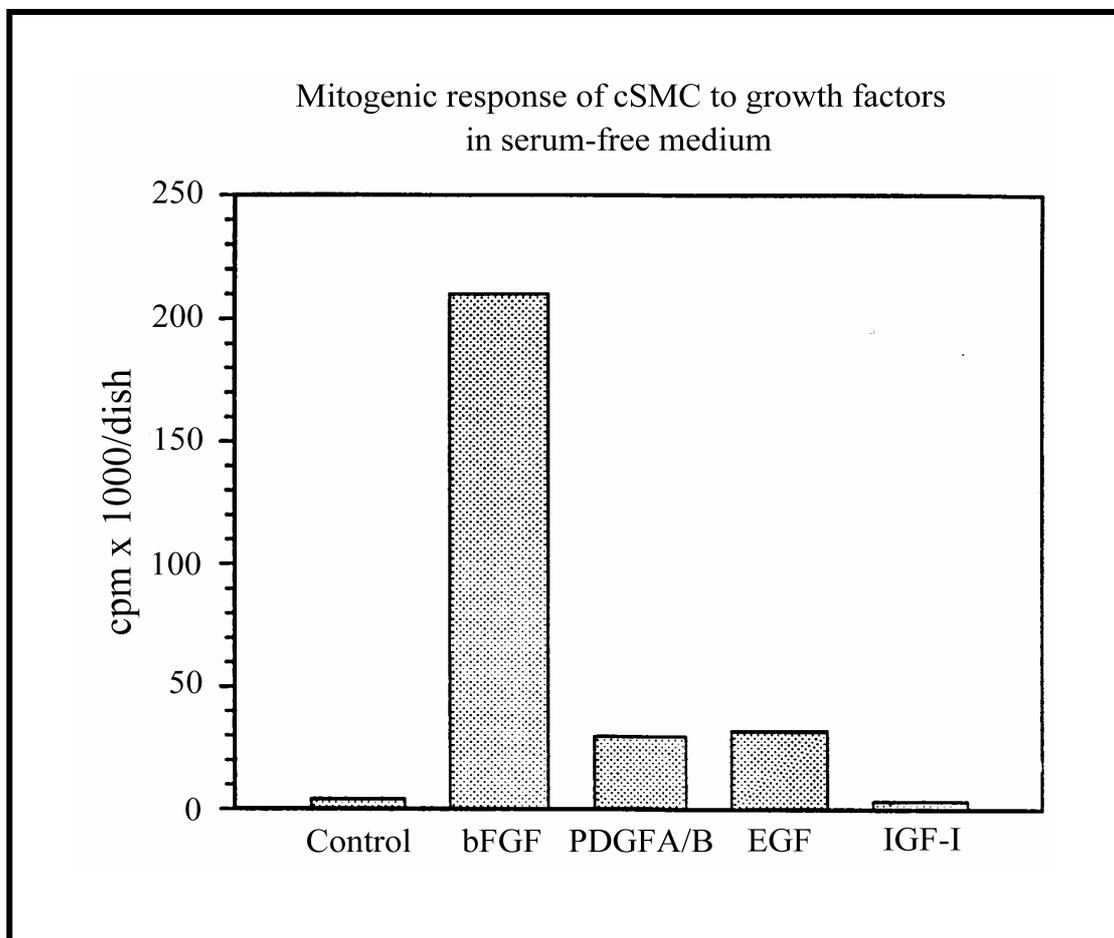


Abb. 1.4: Proliferationsantwort glatter Muskelzellen auf verschiedene Wachstumsfaktoren in serumfreiem Medium.

Quelle: Institut für Arterioskleroseforschung, Westfälische-Wilhelmsuniversität Münster (unveröffentlicht)

Dies wurde von Lindner (37) und Caplice et al. (35) bestätigt, die demonstrierten, dass die mitogene Aktivität nach Gefäßtraumatisierung durch einen AK gegen bFGF stärker antagonisiert werden konnte als durch AK gegen andere Faktoren. Dennoch wird vermutet, dass bFGF als Mitogen nur in den ersten 48 Stunden nach Gefäßtrauma eine Rolle spielt. Olsen et al. (34) zeigten, dass ein AK gegen bFGF chronisch proliferierende SMC nicht zu inhibieren vermochte. Ein Zusammenhang besteht womöglich mit dem bereits oben erwähnten bFGF-Abfall nach Trauma innerhalb von 2-3 Tagen, der nahe legt, dass die weitere Unterhaltung der Proliferationsprozesse von anderen Mediatoren übernommen wird.

Zahlreiche Autoren konnten bFGF und seine Rezeptoren (51) (103) jedoch wieder in fortgeschrittenen Läsionen nachweisen, wo der Faktor andere Funktionen erfüllt und mit einer vermehrten Plaqueneovascularisierung assoziiert ist (103).

1.5.2. Hypertrophie

Definitionsgemäß beschreibt die „Hypertrophie“ eine Wachstumsform, in der das Zellvolumen durch gesteigerte Proteinsynthese vergrößert ist, ohne dass es dabei zu einem DNA-Zuwachs kommt (104). Im postnatalen Wachstum enddifferenzierter Gewebe wie z.B. Herz- oder Skelettmuskel, deren Zellen ihre Teilungsfähigkeit verloren haben, stellt sie die einzige Wachstumsform dar und ist Ausdruck der Anpassungsfähigkeit an gesteigerte Anforderungen. Die morphologischen Veränderungen sind dabei reversibel. Auch die glatte vaskuläre Muskelzelle kann in einen hypertrophen Status übergehen (100) (105). Er wird insbesondere durch Vasokonstriktoren wie z.B. Angiotensin II (105), Endothelin (63) und Vasopressin (106) herbeigeführt und tritt des Weiteren unter chronischem Hypertonus (89) auf. Obwohl die Hypertrophie der vaskulären glatten Muskelzelle in ihrer Bedeutung noch nicht ganz geklärt ist, liegt es daher nahe, auch hier von einem Anpassungsmechanismus an gesteigerte Anforderungen auszugehen.

Im Vergleich zu enddifferenzierten Zell-Linien haben vaskuläre glatte Muskelzellen, die reversibel aus einem ruhenden, kontraktilen Phänotyp in einen proliferationsfreudigen, synthetischen Phänotyp wechseln können, ihre

Proliferationsfähigkeit erhalten (90). Anhand der intrazellulären Signaltransduktion von Angiotensin II konnte beispielhaft gezeigt werden, dass auf ein extrazelluläres Signal eine Reihe proliferationsstimulierender und -inhibierender Wachstumsfaktoren sekundär exprimiert werden, die in ihrer Balance einen hypertrophischen Status herbeiführen (63) (99). Die Suppression von inhibierenden Faktoren z.B. durch einen Antikörper führt zu einer proliferativen Antwort durch Überwiegen der Proliferationsstimuli und somit zu einer SMC-Hyperplasie (99) (107) (108). Die Expression sekundärer Wachstumsfaktoren ist charakteristisch für G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Agonisten (siehe Tab. 1.1), denen die Vasokonstriktoren in der Regel angehören (63).

G-Protein-gekoppelter Rezeptor-Agonist	Sekundär exprimierte proliferationsstimulierende Faktoren	Sekundär exprimierte proliferationsinhibierende Faktoren	Literaturangabe
<i>Angiotensin II</i>	PDGF-AA, bFGF	TGF-beta	(107) (99)
<i>Thromin</i>	PDGF-A, bFGF	TGF-beta	(63) (101)
<i>Thromboxan A2</i>	bFGF	TGF-beta	(100) (108)
<i>Endothelin</i>	PDGF-A, bFGF	TGF-beta	(63)

Tab. 1.1: Vasokonstriktoren und ihre sekundär exprimierten Wachstumsfaktoren

1.5.3. Apoptose-Prävention

Unter programmiertem Zelltod, bezeichnet als Apoptose, versteht man die am häufigsten zu beobachtende Form des Zelltodes, die einen genetisch gesteuerten Selbstzerstörungsprozeß der Zelle beschreibt (109). Apoptose steht im Gleichgewicht mit Zellproliferationsvorgängen adulter normaler Gewebeformen und stellt somit ein wichtiges physiologisches Element der Gewebshomöostase dar (109).

Sowie auch in anderen Geweben möglich können Zellen des kardiovaskulären Systems in die Apoptose übergehen (110). Eine erhöhte Rate an Apoptose findet sich in arteriosklerotischen als auch restenotischen Gefäßabschnitten (111), wobei glatte Muskelzellen als auch Makrophagen betroffen sein können (112). Durch Apoptosevorgänge wird die Zellmasse in einer Plaque reguliert (113).

Apoptose-auslösende Stimuli sind einerseits äußere Einflüsse wie oxidierte Lipoproteine, veränderter hämodynamischer Stress, freie Radikale (112), andererseits Cytokine immunaktiver Zellen wie Interleukin-1, Tumor-Nekrose-Faktor und Interferon-gamma. Sie rufen die Expression proapoptotischer Gene wie Fas, Fas-Liganden, Caspase, bcl-2, p53 und c-myc hervor, deren Proteine in Zellen der Gefäßwand nachgewiesen wurden (111). Abnormale Expression und Dysfunktion dieser Gene können die Apoptoserate vermindern oder steigern und somit die Plaquezusammensetzung und -stabilität beeinflussen (114), denn durch Absterben glatter Muskelzellen, den Produktionsstätten extrazellulärer Fasermoleküle, wird die Ausbildung einer stabilisierenden fibrösen Plaquekappe beeinträchtigt. Ferner führen nicht eliminierte apoptotische Zellen innerhalb der Plaque zur Aktivierung von Thrombin und Auslösung von intravasalen Thrombosierungsprozessen (112). Thrombose und Plaqueruptur gelten als komplizierende Effekte von Apoptose in der Arteriosklerose (112).

Apoptose ist in den prinzipiell zellreicheren restenotischen Läsionen häufiger anzutreffen als in den arteriosklerotischen Plaques, in denen die Fasersubstanz überwiegt (115).

1.6. Antisense-Oligonukleotide

1.6.1. Prinzip und Funktionsweise

Die Antisense-Strategie wurde erstmals im Jahre 1978 von Zamecnik und Stephenson (116) als neue Therapieform menschlicher Erkrankungen auf molekulargenetischer Ebene vorgeschlagen. Ursächlich für viele Krankheiten sind meist fehlerhafte genetische Informationen und deren Ausführung durch die Körperzelle, wie beispielsweise die Überproduktion bestimmter Proteine oder die Herstellung defekter Proteine.

Während die Gentherapie auf die Einfügung zusätzlicher genetischer Information in die Zelle beruht, zielt die Antisense-Strategie auf eine Expressionshemmung spezifischer Gene ab.

Zur Ausschaltung bestimmter Genprodukte werden synthetische einzelsträngige DNA-Oligonukleotide in die Zelle eingeführt. Die Sequenz des DNA-Oligonukleotides wurde dabei so gewählt, dass sie komplementär zur Sequenz der mRNA des auszuschalten Gens ist (Antisense-Oligodesoxynukleotid, AS-ODN). Es kommt daher über Watson-Crick-Basenpaarung zur Bildung eines DNA/mRNA-Doppelstranges (sog. Heteroduplexbildung), wodurch der mRNA-Strang an dieser Stelle für weitere Prozesse der Genexpression blockiert wird. Seit den 80er Jahren weiß man, dass eine Genregulation nach dem Antisense-Prinzip auch in der Natur vorkommt und von Mikro- als auch von höheren Organismen, die selbst Antisense-Nukleinsäureketten produzieren, genutzt wird (117) (118).

Entscheidend für die Effizienz der Antisense-Oligonukleotide ist die Auswahl geeigneter Bindungsregionen. Da DNA und RNA unter physiologischen Bedingungen in einer Sekundär- und Tertiärstruktur vorliegen, sind nicht alle Regionen der Oligonukleotidhybridisierung zugänglich. Entsprechende Computersoftware liefern derzeit noch wenig zuverlässige Sekundärstrukturvorhersagen, so dass bisher vorwiegend Schlüsselsequenzen natürlicher enzymatischer Prozesse gewählt wurden, die allgemein gut zugänglich sind.

Antisense-Oligonukleotide können gegen Sequenzen der DNA als auch der mRNA unterschiedlicher Reifestufen gerichtet sein (Abb. 1.5).

1. Nach Einschleusen in die Zelle können Antisense-Oligonukleotide in den Zellkern gelangen, sich an komplementäre Strukturen der DNA unter Tripelhelixbildung anlagern und somit die Transkription inhibieren.
2. Zu den Zielstrukturen der prä-mRNA zählen insbesondere die Spleißstellen, die 5'-Cap-Struktur und die Poly-A-Sequenz (119). Mit Blockade dieser Sequenzen durch eine Oligonukleotidhybridisierung können wichtige Reifungsprozesse der mRNA und ihr Transport in das Zytoplasma gestört werden.
3. Innerhalb der prozessierten reifen mRNA haben sich Antisense-Oligonukleotide gegen das Translationsstartcodon AUG als besonders effektiv erwiesen (120). Unter Heteroduplexbildung blockieren sie durch sterische Behinderung der Ribosomenuntereinheiten die Bildung des Initiationskomplexes und verhindern die Übersetzung des mRNA-Codes in eine Aminosäuresequenz. Alternativ besteht die Möglichkeit, Antisense-Moleküle direkt gegen kodierende mRNA-Abschnitte einzusetzen.

Um die Expression eines Genproduktes zu inhibieren, ist es nicht erforderlich, die komplette mRNA, die beim Menschen im Mittel bei 1500 Basen lang ist, mit einem Antisense-Oligonukleotid abzudecken. Wie bereits beschrieben sind Signalsequenzen enzymatischer Prozesse beliebte Ziele. Dennoch variiert die Effektivität der Oligonukleotide im Einzelfall sehr stark. Es wird daher empfohlen, im Vorfeld per „Gene walk“ entlang der Ziel-DNA oder -RNA eine größere Zahl an Oligonukleotiden zu synthetisieren und auszutesten (121) (122). Es sollte ferner beachtet werden, dass im Rahmen verschiedener Oligonukleotidmechanismen die unvollständige Blockade der mRNA zur Produktion von Zielprotein-Anteilen führen kann. Diese könnten im ungünstigen Fall Restfunktionen aufweisen oder durch erhaltene Antikörpererkennungsstrukturen irrtümlicherweise als Zielprotein (z.B. im ELISA) verkannt werden (121).

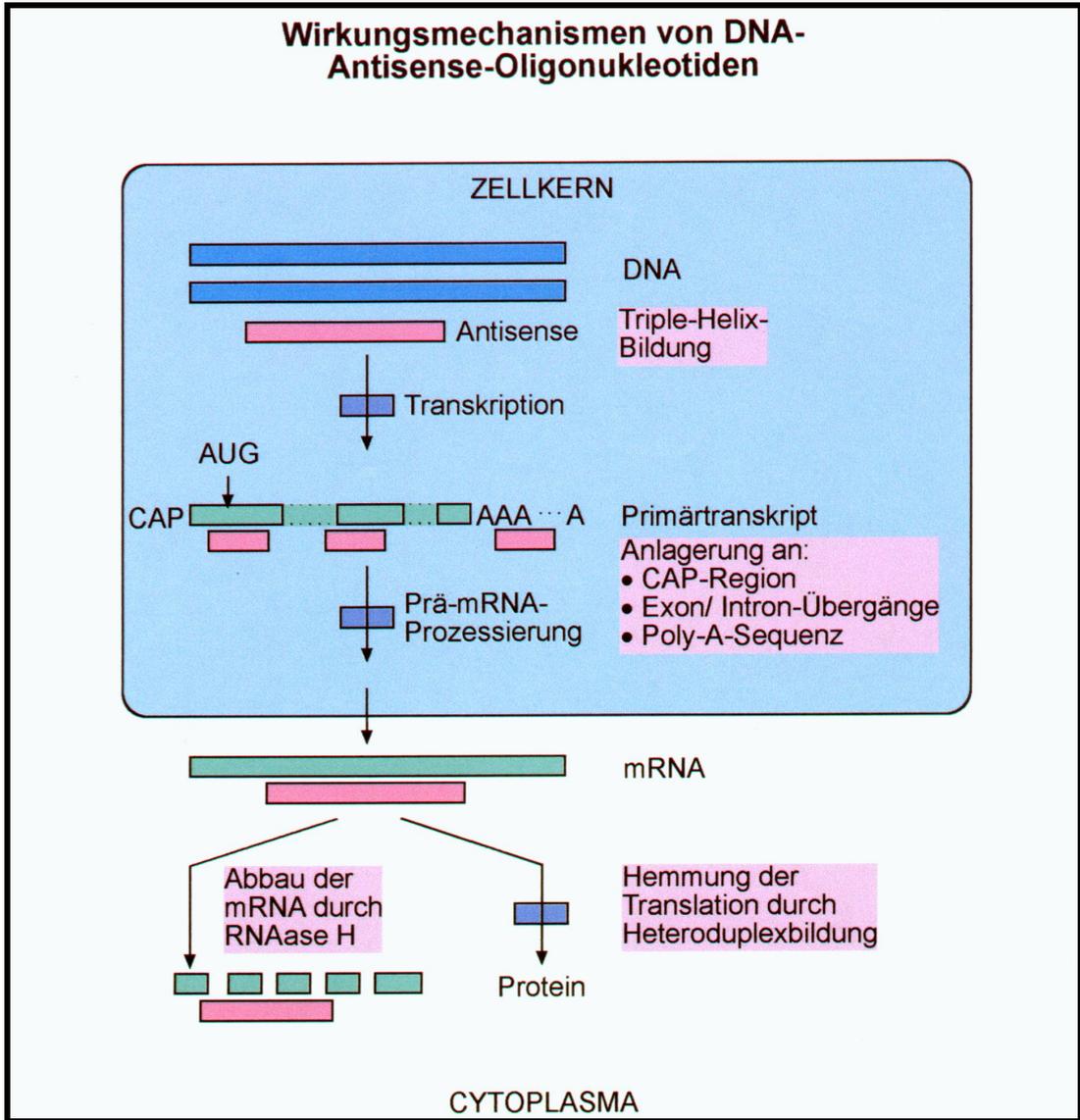


Abb. 1.5: Mechanismen von Antisense-Oligonukleotiden.

Quelle: E. Buddecke; Molekulare Medizin, ecomed 2002, Landsberg/ Lech

Neben der Maskierung strategisch wichtiger Sequenzen des Nucleinsäurestoffwechsels, sind Oligonukleotide jedoch noch über einen weiteren Mechanismus in der Lage, die Ziel-mRNA auszuschalten. Die mit der Ziel-mRNA gebildete Heteroduplex bildet das Substrat für mRNA-abbauende Enzyme, wie Ribonuklease H (RNase H). Dieses Enzym wird in eukaryoten als auch in prokaryoten Zellen exprimiert und zertrennt den mRNA-Anteil eines RNA-DNA-Doppelstranges unter Hydrolyse einer oder mehrerer Phosphodiesterbindungen (121) (123). Darunter dissoziiert das intakte Oligonukleotid von den mRNA-Fragmenten und steht für eine erneute Heteroduplexbildung zur Verfügung. Dies erklärt die überproportionale Wirksamkeit der RNase-aktivierenden Oligonukleotide (119).

Die Effektivität eines Antisense-Oligonukleotids beruht nicht nur auf dem gewählten Blockademechanismus. Besondere Bedeutung haben auch pharmakologische Eigenschaften wie Stabilität, Zellgängigkeit, Organverteilung, Toxikologie und Bioverfügbarkeit. Um diesen Anforderungen nachzukommen, wurden zahlreiche Modifikationen entwickelt, insbesondere zur Verbesserung der Nukleasestabilität. Oligonukleotide, deren Phosphodiesterückgrat modifiziert wurde, büßen in der Regel ihre Eigenschaft, RNasen zu aktivieren, ein. Eine Ausnahme bilden die Phosphorothioate (PS-ODN) (124), die sich bereits in zahlreichen Antisense-Experimenten bewährt haben und auch in klinischen Studien Anwendung finden.

Modifikationen können jedoch auch zu einer Verstärkung unspezifischer Oligonukleotideffekte führen, die häufig durch Interaktionen mit zahlreichen Proteinen in und außerhalb der Zelle bedingt sind. Daher ist es erforderlich die sequenzspezifische Wirkung von Antisense-Oligonukleotiden durch Kontrolloligonukleotide zu belegen.

Als Kontrolloligonukleotide werden bevorzugt Moleküle mit der komplementären Sequenz des Antisense-Oligonukleotides verwendet, die man auch als „Sense“ bezeichnet. Alternativ finden auch „Mismatch“- , „Reverse“- und „Scramble“-ODNs breiten Einsatz. (zur Erläuterung siehe Tab. 1.2)

Oligonukleotid	Charakterisierung	Beispiel
Antisense	Komplementäre Sequenz zur Ziel-mRNA	5'- G-A-C-C-T- 3'
Sense	komplementäre Sequenz des Antisense-Oligonukleotids	5'- A-G-G-T-C- 3'
Reverse	Antisense-Sequenz in Umkehrrichtung	5'- T-C-C-A-G- 3'
Mismatch	Austausch einzelner Basen der Antisense-Sequenz	5'- G-C-C-G-T- 5'
Scramble	Basen der Antisense-Sequenz in willkürlicher Reihenfolge	5'- A-C-T-C-G- 3', 5'- C-C-A-G-C- 3', etc.

Tab. 1.2: Kontrolloligonukleotidvarianten

1.6.2. Spezifität

Mit der Entwicklung von Antisense-Oligonukleotiden wurde ein hochspezifisches Therapiekonzept geschaffen. Die Spezifität, ein bestimmtes Zellprotein zu supprimieren, resultiert erstens aus dem Konzept der Doppelstrangbildung eines Oligonukleotids mit der mRNA des Zielproteins durch Watson-Crick-Basenpaarung und zweitens aus dem statistisch einmaligen Vorkommen einer 17-Basen-Sequenz im gesamten menschlichen Genom (125) (126). Da jedoch zu einem bestimmten Zeitpunkt nicht alle Gene aktiviert und zudem nicht alle Bereiche auf der DNA/mRNA entfaltet sind, kann auch bei Verwendung von kürzeren Oligonukleotiden (11-15 meren) eine hohe Spezifität erreicht werden (127). Längere Oligonukleotide mit über 20-25 Basen neigen eher dazu, unerwünschte Basenmißpaarungen zu tolerieren und auch mit nicht ganz komplementären Nukleinsäureketten einen Doppelstrang zu binden. Als optimal haben sich somit Oligonukleotide mit einer Länge von 14-20 Basen erwiesen (128). Da es infolge der

Basenpaarung bei optimaler Länge zur Ausbildung von 24-75 Wasserstoffbrückenbindungen (drei pro G-C- und 2 pro A-T bzw. A-U-Basenpaar) mit der mRNA kommt, gehen AS-ODN bei weitem mehr Wechselwirkungen mit ihrem Zielobjekt ein als konventionelle Wirksubstanzen (119).

1.6.3. Aufnahme in die Zelle

Oligonukleotide sind polyanionische Makromoleküle, deren Molekulargewicht bei einer Länge von 13-30 Basenpaaren mit 4500-9000 Dalton deutlich über dem Molekulargewicht konventioneller Wirksubstanzen mit einigen Hundert Dalton (128) liegt. Ihre Größe und stark negative Ladung ermöglichen keine freie Diffusion durch die Zellmembran (129) (130). Es wird angenommen, dass unmodifizierte Oligonukleotide über aktive, Rezeptor-vermittelte Aufnahme in die Zelle gelangen. Die Rezeptor-vermittelte Endozytose scheint der natürliche Aufnahmemechanismus für exogene Nukleinsäuren zu sein (131). Loke (132), Beltinger (133), Yakubov (134) und Budker et al. (130) haben in unterschiedlichen eukaryotischen Zelllinien Oberflächenproteine im Bereich von 20-143 kD detektiert, an denen die Makromoleküle mit niedriger Affinität binden. Aufnahmestudien Fluoreszenz- oder radioaktiv-markierter Oligonukleotide zeigen nach Aufnahme in das Zellinnere eine Anreicherung in cytoplasmatischen Endosomen und Lysosomen, aber auch im freien Zytoplasma und im Nukleus (133) (135). Der Aufnahmeprozess ist Energie- und Temperatur-abhängig mit einem Optimum bei 37°C (132) (136).

Die Details des Aufnahme-Modus sind bis heute noch nicht vollständig geklärt. Für eine aktive Rezeptor-vermittelte Endozytose sprechen eine initiale Konzentrations-abhängigkeit der ODN-Aufnahme mit Sättigungskinetik und Substratspezifität. Ferner ist die Oligonukleotidaufnahme durch Nukleotide kompetitiv hemmbar (132). Über die Spezifität und Energie-Abhängigkeit der Carrier-vermittelten Endozytose ist auch erklärbar, dass innerhalb der Zelle das 10 bis 30-fache der ODN-Konzentrationen wie im Medium gefunden wurden (137). Dennoch werden weitere Aufnahme-Mechanismen angenommen: Beltinger et al. (133) zeigten, dass Oligonukleotide in humanen Leukämie-Zellen (K652) ab einer Konzentration von < 1.0 µM zusätzlich

über Pinozytose aufgenommen werden. Dieser Mechanismus scheint jedoch im Vergleich zur Carrier-vermittelten Endozytose uneffektiver zu sein. ODN-Aufnahmeraten variieren in Abhängigkeit von der Zelllinie, als auch vom Zellzyklusstadium der Einzelzelle. Die höchste Aufnahmerate wurde in der G1/S-Phase gemessen, entsprechend des Nukleotidbedarfs für die DNA-Synthese (135). Die zelluläre Aufnahme von Oligonukleotiden ist des Weiteren abhängig von deren ODN-Länge, -Sequenz und Modifikation. Je kürzer die Oligonukleotide, desto schneller und intensiver erfolgt ihre Aufnahme in die Zelle (132). Eine Sequenz-Abhängigkeit spiegelt sich in einer bevorzugten Aufnahme G-reicher Oligonukleotide wider. Peymann et al. (138) zeigten eine Steigerung der ODN-Aufnahme in Abhängigkeit vom jeweiligen Anteil der unterschiedlichen Basen. Es ergab sich folgende Rangordnung $C < A < T < G$. Die Modifikation bestimmt die Interaktion des Oligonukleotids mit seinem Oberflächenrezeptor und beeinflusst auf diese Weise ebenfalls die ODN-Aufnahme. Da insbesondere Phosphorothioate eine starke Rezeptorbindung eingehen, wird eine effektive Aufnahmerate dieser ODN postuliert (139).

1.6.4. Strukturmodifizierte Oligonukleotide

Unmodifizierte Oligodesoxynukleotide entsprechen in ihrem Aufbau natürlichen Desoxynukleinsäuren: Eine heterozyklische Purin- (Adenin, Guanin) oder Pyrimidinbase (Thymin, Cytosin) ist am C1 -Atom mit einer 2-Desoxyribose N-glykosidisch verbunden, die wiederum, ausgehend vom C3- und C5-Atom, über Phosphodiesterbindungen an benachbarte Nucleoside koppelt. Unmodifizierte Oligodesoxynuklotide werden daher in der Literatur auch vereinfacht als „Phosphodiester“ bezeichnet.

Da kurze Nucleinsäurefragmente jedoch rasch von ubiquitären Endo- und Exonucleasen abgebaut werden, wurden bereits Anfang der 80er Jahre erste Strukturmodifikationen vorgenommen und somit Nuclease-resistentere

Oligonukleotide geschaffen. Mittlerweile existiert eine große Vielfalt an strukturmodifizierten Oligonukleotiden, wobei neben der Nukleasestabilität auch pharmakologische Eigenschaften, Affinität zur Ziel-RNA und Zellgängigkeit verbessert werden konnten.

Unter Oligonukleotiden der „ersten Generation“ werden Methylphosphonate (140) und Phosphorothioate (141) gefasst (Abb. 1.6).

In Methylphosphonaten ersetzt eine ungeladene Methylgruppe das freie, nicht in die Phosphodiesterbindung eingebundene Sauerstoffatom zwischen zwei Nucleosiden. Der erhöhten Nukleaseresistenz steht eine schlechtere Wasserlöslichkeit gegenüber. Ferner verfügen Methylphosphonate nicht mehr über die Fähigkeit, RNase H zu aktivieren und haben sich aufgrund ihrer schwächeren Wirkung nicht durchsetzen können.

In Phosphorothioaten wird das freie Sauerstoffatom durch ein Schwefelatom ersetzt, das dem Molekül eine zusätzliche negative Ladung verleiht.

Phosphorothioate sind demnach gut wasserlöslich, vermögen RNase H zu aktivieren und zeichnen sich durch eine zufriedenstellende Nukleasestabilität sowohl im Serum als auch innerhalb der Zelle aus. Die Halbwertszeit von Phosphorothioaten wird zwischen 12 und 24 Stunden angegeben (142) (143), die unmodifizierter Phosphodiester im Serum liegt dagegen nur bei 5 Minuten (144).

Oligonukleotide erhalten jedoch durch Einfügen von Phosphorothioatbrücken ein stark negativ geladenes Rückrat, welches ihnen polyanionische Eigenschaften verleiht. Diese können zu unspezifischen Proteinbindungen im Serum, an Zellmembranen als auch innerhalb der Zelle führen mit der Konsequenz einer bisher noch nicht überschaubaren Einflußnahme auf unterschiedlichste intra- und extrazelluläre Prozesse. Der Polyanioncharakter stellt daher eine ausgesprochen unerwünschte Eigenschaft der Phosphorothioate dar (145) (146) (147) (148) (149) (150) (151).

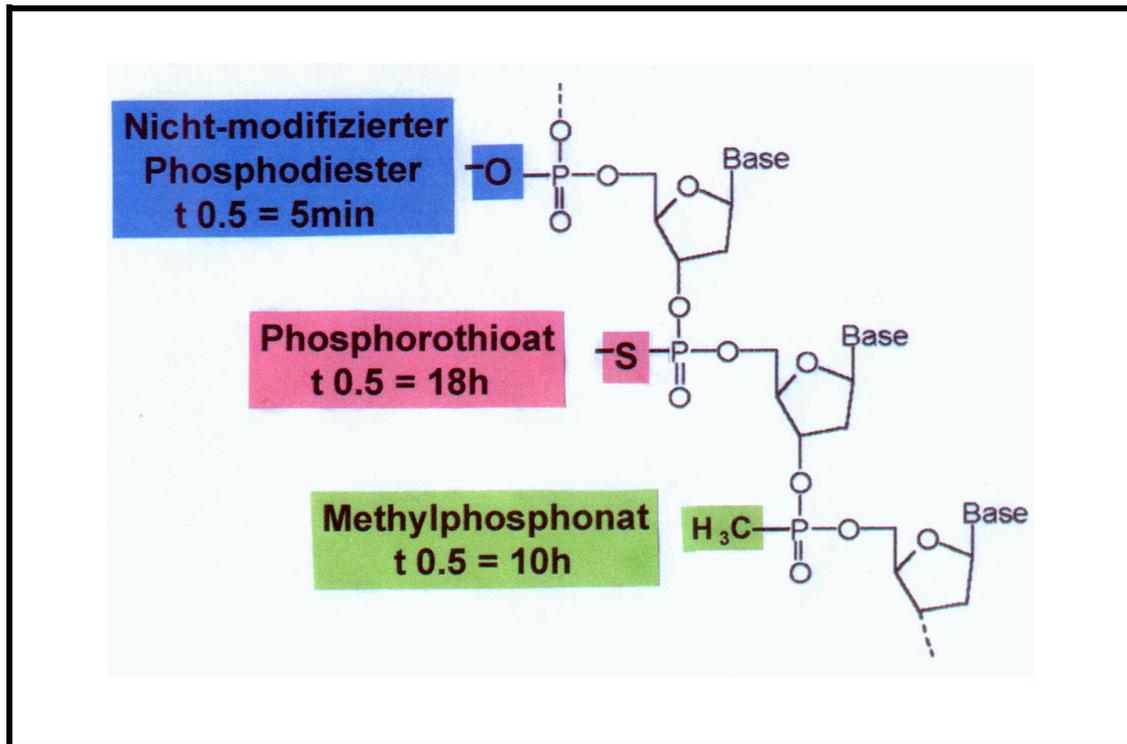


Abb. 1.6: Oligonukleotide mit strukturmodifizierten Internukleosidbindungen.
Quelle: E. Buddecke; Molekulare Medizin, ecomed 2002, Landsberg/ Lech

Neben weiteren Variationen der Nukleosidbrücken (Peptid- oder Polyamidnukleinsäuren (143)), wurden auch Veränderungen des Zuckers (alpha-Anomere, 2-,O-methyl-/ 2'O-alkyl-Ribosen (152)), der Basen (5-Propinylpyrimidine, 7-Desaza-7-alkinylpurine (143)) sowie das Anheften von Substituenten (Porphyrine, Cholesterol (143)) untersucht (Abb. 1.7). Die bedeutendsten Errungenschaften sind jeweils in Klammern angeführt.

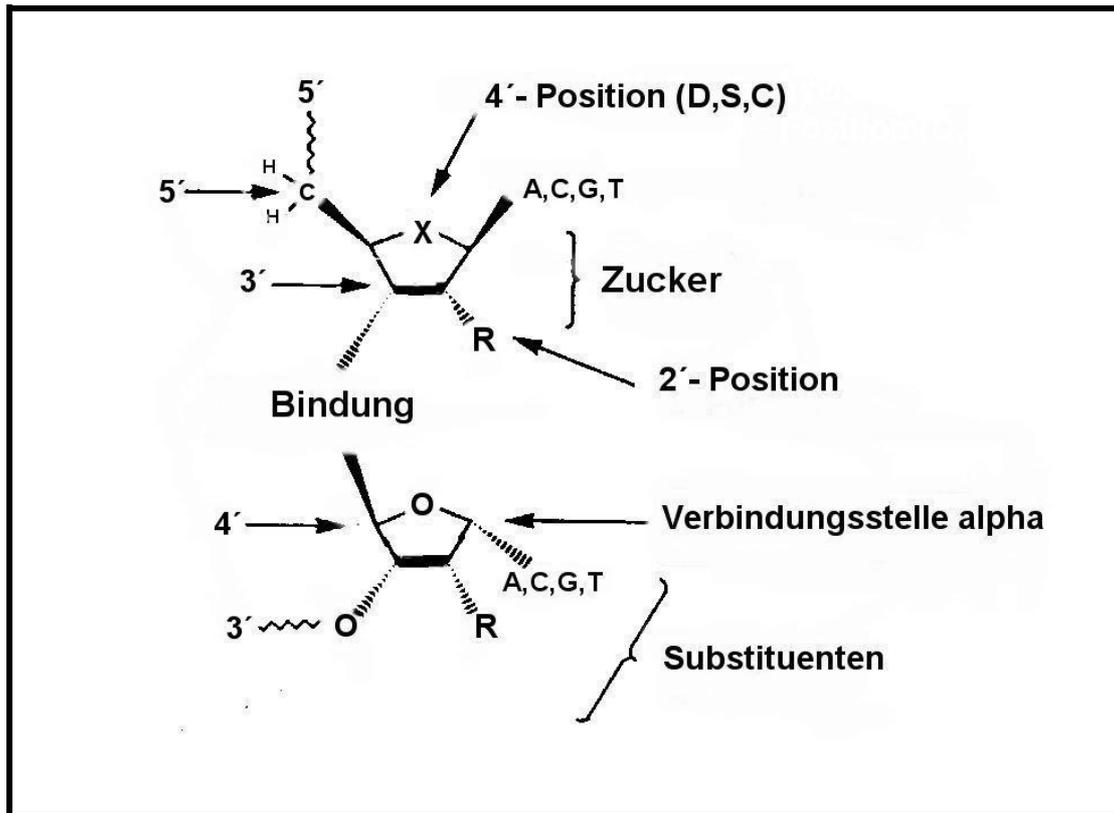


Abb. 1.7: Oligonukleotid-Modifikationsmöglichkeiten.

Quelle: Modifikation nach Ma DDF (153)

Neben Veränderungen einzelner Molekülbestandteile wurden darüber hinaus auch Oligonukleotidanaloga entwickelt, in denen das gesamte Zucker-Phosphat-Rückrat durch andere Verbindungen ersetzt und somit die Nucleinsäuregrundstruktur vollständig aufgehoben wurde. Unter den Oligonukleotidanaloga sind die PNAs (Peptid nucleic acid) und die Morpholinos führend. Während in PNA-Molekülen das Rückrat aus einer Peptidkette besteht, wurde bei den sogenannten Morpholinos der Zucker des ursprünglichen Zucker-Phosphat-Rückrates durch einen Morpholining ersetzt. Beide Substanzgruppen zeichnen sich durch eine hervorragende Nucleasestabilität und eine bislang unübertroffen starke Affinität zur Zielnucleinsäure aus, werden jedoch schlecht in die Zelle aufgenommen und können RNase H nicht aktivieren (143) (154) (155).

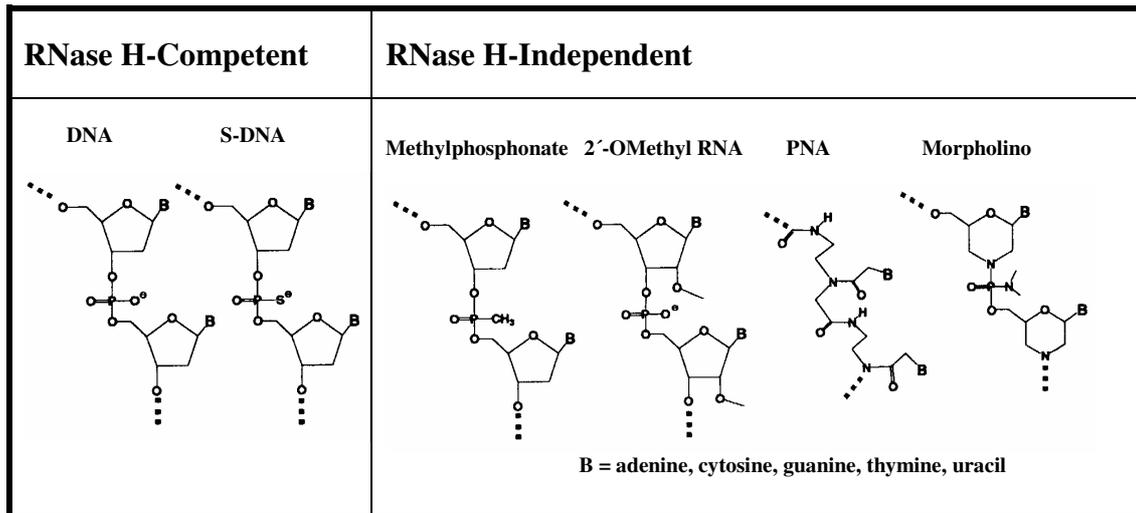


Abb. 1.8: RNase H- Kompetenz verschiedener modifizierter Oligonukleotide.

Quelle: Summerton J (155)

Bislang gelang es nicht, alle Eigenschaften, die für den breiten therapeutischen Einsatz von Antisense-Präparaten wünschenswert wären, in einem Molekül zu vereinigen.

Dennoch haben sich Nukleasestabilität und die Fähigkeit, RNAsen zu aktivieren als zentrale Eigenschaften effektiver Antisense-Oligonukleotide (156) herausgestellt (Abb. 1.8) und ließen Phosphorothioate trotz ihres Polyanioncharakters zur Basis für Weiterentwicklungen werden (153) (157) (158) (159) (160). Bei den Oligonukleotiden, die sich mittlerweile in der Phase der klinischen Untersuchung befinden, handelt es sich nahezu ausschließlich um Phosphorothioate.

Neuere Strukturmodifikationen der Phosphorothioate zielen auf eine Abschwächung ihres Polyanionencharakters ab. Dabei wurden chimäre Moleküle entwickelt, auch bezeichnet als Antisense-Oligonukleotide der 2. Generation, in denen man mehrere Modifikationen in einem Molekül kombiniert. Somit können verschiedene positive Effekte vereinigt und negative Eigenschaften relativiert werden.

Da zur Erhaltung der RNase H-Aktivität nur 4-5 Phosphorothioatbindungen pro Oligonukleotid benötigt (161) werden, wurden einige Phosphorothioatbrücken wieder durch die natürlichen Phosphodiesterbindungen ersetzt. Um weiterhin einen

ausreichende Nukleasestabilität zu gewährleisten, wurden die Phosphorothioatbrücken dabei gezielt an die Moleküleenden (sog. end-capping), dem Angriffspunkt der Exonukleasen, plaziert (157) (162) (163). Zusätzlich wurden interne Pyrimidinbasen, die Zielstrukturen der Endonukleasen, durch Phosphorothioatbindungen maskiert (157). Im Vergleich mit Vollphosphorothioaten zeichneten sich diese auch als Teilphosphorothioate (Partial Phosphorothioate Oligonucleotides, PPS) bezeichneten Oligonukleotide durch eine ähnliche Nukleasestabilität und Erhaltung der RNase H-Aktivität aus (157) (162). Gleichzeitig zeigten sie deutlich weniger unspezifische Effekte als Vollphosphorothioate und gelten daher als vielversprechend (154).

1.7. Einsatzgebiete der Antisense-Oligonukleotide in der Medizin

Nachdem in den sechziger und siebziger Jahren durch die Entwicklung der Antisense-Strategie (164) (165) ein völlig neues Therapiekonzept entstand, wurde die Hoffnung geschürt, dass die Oligonukleotide auch bald für den klinischen Gebrauch zur Verfügung stehen. Dennoch verging fast ein halbes Jahrhundert bis 1998 das erste Medikament auf Antisense-Basis -VitraveneTM (Formivirsen)- in den USA zugelassen wurde. Seine Wirksamkeit zur Behandlung der CMV Retinitis bei AIDS-Kranken wurde bei geringen Nebenwirkungen in vorausgegangenen Studien belegt (166) (167) (168).

Inzwischen werden auf diversen medizinischen Gebieten klinische und präklinische Studien durchgeführt. Antisense-ODN kommen vor allem in der Tumorthherapie, aber auch bei inflammatorischen Prozessen, in kardiovaskulären und hämatologischen Erkrankungen und als antivirale Substanzen zum Einsatz. Es gibt derzeit ca. 46 klinische Studien, davon zehn in Phase III und zwanzig in Phase II (169). Über die Hälfte der Studien werden im Bereich der Tumorthherapie durchgeführt.

Nahezu alle Antisense-Präparate verursachen dosisabhängig Thrombozytopenien, Hypotonie, Fieber und/oder Übelkeit, wobei die Ähnlichkeit der einzelnen Nebenwirkungsprofile nicht überrascht, da nahezu alle in fortgeschrittenen Studien eingesetzte Oligonukleotide Phosphorothioate sind.

In der Tumorthherapie werden verschiedene Antisense Ansätze verfolgt. Tabelle 1.3 gibt einen kurzen Überblick über die aktuellen klinischen Studien.

Ziel	Antisense	Chemie	Krankheit	Applikation	Phase
<i>Bcl-2</i>	G3139	PS	Kleinzelliges Bronchialkarzinom	i.v.	I
			Non Hogkin Lymphom	s.c.	I
			Fortgeschrittene solide Tumore	i.v.	I
			Chronische lymphatische Leukämie	i.v.	I/II
			Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom	i.v.	II/III
			Non Hogkin Lymphom	s.c.	III
			Melanom	i.v.	III
			Chronische lymphatische Leukämie	i.v.	III
			Akute myeloische Leukämie	i.v.	III
			Multiples Myelom	i.v.	III
<i>PKC-α</i>	ISIS 3521	PS	Diverse Karzinome	i.v.	I
			Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom	i.v.	II
			Astrozytom	i.v.	II
			Mamma Karzinom	i.v.	II
			Diverse Karzinome	i.v.	III
<i>Raf-1</i>	ISIS 5132, LÉrafAON	PS	Solide Tumore	i.v.	I
			Bronchial Karzinom	i.v.	II
		PPS	Ovarial Carcinom	i.v.	II
			Solide Tumore	i.v.	I
<i>H-ras</i>	ISIS 2503	PS	Solide Tumore	i.v.	I
			Pankreas Karzinom	i.v.	II
<i>PKA-I</i>	GEM 231	Chim. PS	Solide Tumore	i.v.	I
<i>DNA MeTase</i>	MG98	MB	Bronchial-, Kolon- und Mamma Karzinom	i.v.	II
<i>c-myc</i>	Oncomyc-MG	Morpholino	Diverse Karzinome	i.v.	I
<i>Tumor-zellen</i>	CpG 7909	CpG motif	Non Hogkin Lymphom	i.v.	I/II
<i>Natürliche Killerzellen</i>	CpG 8916	CpG motif	Melanom	i.v.	I
<i>c-myb</i>	INX 3001	PS	Reinigung autologen Knochenmarks	Ex-vivo	II
<i>RNR</i>	GTI-2040	PS	Karzinom	i.v.	II

Tab. 1.3: Antisense-Oligonukleotide in der Tumorthherapie.

Quelle: Pirollo FK et al. (154)

In der Tumortherapie wurden die besten Ergebnisse bislang mit dem PS-ODN G3139 gegen das Apoptose-Inhibitor-Protein bcl-2 erzielt. Als Monotherapeutikum wurde das Präparat erfolgreich beim Non Hodgkin Lymphom eingesetzt und befindet sich aktuell in der Phase III der klinischen Prüfung (170) (171) (172). In Kombination mit konventionellen Chemotherapeutika scheint aber auch eine gute Wirksamkeit gegen zahlreiche andere Tumoren wie dem kleinzelligen und nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (173), dem Prostatakarzinom (174), dem Mammakarzinom (175), dem malignen Melanom (176) (177) und bei akuten Leukämien (178) (179) vorzuliegen.

Weniger breit anwendbar waren dagegen Antisense-Präparate gegen Proteinkinase C α , c-raf-1, H-ras und Proteinkinase I. Das Phosphorothiat gegen Proteinkinase C α , ISIS 3521, erreichte nur in Kombination mit Carboplatin und Paclitaxel beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom die Phase III (180). Auch ISIS 5132, ein Phosphorothioat gegen c-raf-1, war in der Regel nur in Kombination wirksam (181). Als Monotherapeutikum gegen das klein- und nicht kleinzellige Bronchialkarzinom versagte das Präparat in einer Phase II-Studie (182).

ISIS 2503, ein Phosphorothioat-ODN gegen H-ras, schied ebenfalls als Monotherapeutikum in allen Phase-II-Studien zur Behandlung des kolorektale Karzinoms (183), des nicht kleinzelligen Bronchialkarzinoms (184) und des Pankreaskarzinoms (185) aus. Weitere Kombinationsstudien bleiben auch bei GEM231, einem AS-ODN gegen Proteinkinase I, abzuwarten.

In präklinischen Untersuchungen befinden sich derzeit erfolgversprechende AS-Oligonukleotide gegen Telomerase, MDM2, den Insulin-like growth factor-Rezeptor und HER-2 (154).

Ein weiteres medizinisches Einsatzgebiet für AS-ODN sind inflammatorische Erkrankungen wie der Morbus Crohn oder die rheumatoide Arthritis. Beim Morbus Crohn werden zur Zeit AS-ODN gegen die drei Hauptangriffsziele TNF- α , IL-18 und ICAM-1 untersucht, wobei das Präparat gegen ICAM-1, ISIS 2302 oder Alicaforsen, die Phase III der klinischen Prüfung erreicht hat. Es liegen ferner positive Ergebnisse einer simulierten Phase III-Studie vor (186).

Die rheumatoide Arthritis hingegen konnte mit Alicaforsen bislang nicht erfolgreich behandelt werden, wobei die Autoren die Ursache des Scheiterns in einer zu geringen ODN-Dosis sahen (187).

Im Bereich der viralen Infektionskrankheiten stellen aktuell HIVen und Hepatitis-Viren Hauptziele der AS-Oligonucleotide dar. Vielversprechend sind eine Phase-II Studie mit einem AS-ODN gegen das Hepatitis C-Virus und eine Phase II/III-Studie mit einem Präparat gegen Hepatitis B (169). Wie oben beschrieben ist das erste zugelassene AS-Medikament -Formiviren (VitraveneTM)- gegen das Zytomegalievirus bei HIV assoziierter Retinitis gerichtet.

AS-Moleküle fanden auch bei kardiovaskulären Erkrankungen Einsatz, insbesondere zur Verhinderung der vasoproliferativen Antwort auf einen Gefäßschaden wie der Restenose. 1999 zeigten Mann et al. (188), dass Venenbypässe, die ex vivo mit E2F Decoy behandelt wurden, nach der Transplantation deutlich weniger Insuffizienzen boten. Das Antisense-Präparat erbrachte anschließend auch im Rahmen der Prevent II-Studie ein deutliches Benefit für die E2F Decoy-Bypass versorgten Patienten (189) (190). Die Wirksamkeit eines c-myc-PS-ODN zur Proliferationsinhibition glatter vaskulärer Muskelzellen wurde bereits Anfang der neunziger Jahre belegt (191). Wie später nachgewiesen wurde, beruht die Wirkung jedoch nicht auf einem Antisense-Mechanismus allein, sondern auch auf einer G-Tetrad. Die sequenzgleiche Morpholino-Variante wurde weitergeführt und befindet sich aktuell in der Phase III der klinischen Prüfung. Das AS-ODN wurde bislang nach Stentimplantation intravenös zugeführt, hatte in dieser Form jedoch keinen Einfluß auf den Lumenverlust (192). Ursächlich diskutiert wurden eine zu geringe Dosis und eine zu kurze Kontaktzeit. An eine Stentbeschichtung werden neue Erwartungen geknüpft.

Darüberhinaus sind diverse Präparate gegen c-myc, cdc-2, cdk-2, p53, p21, RB2, p130, GATA-6, Kallikrein, Prostazyklin-Synthase, Gax und induzierbarer NO-Synthase in präklinischer Erforschung (193) (194) (195).

In Tabelle 1.4 sind die in Studien befindlichen Antisense-Oligonukleotide außerhalb der Tumorthherapie aufgeführt.

ODN	Biochemie	Ziel	Krankheit	Applikation	Phase
Alica-forsen™	PS	PKC- α	M. Crohn	parenteral	III
ISIS 2303	PS	ICAM-1	Topische Psoriasis	lokal	II
ISIS 2303	PS	ICAM-1	Ulcerative Colitis	Klistier	II
ISIS 14803	PS	antiviral	Hepatitis C	Parenteral	II
ISIS 104838	PS	TNF- α	Rheumatoide Arthritis	parenteral/ oral	II
ISIS 104838	PS	TNF- α	Psoriasis	lokal	II
E2F Decoy	nb	E2F	Arteriosklerose	ex-vivo	II/III
EPI-2010	PS	Adenosin A ₁ Rezeptor	Asthma	Aerosol	II
MBI 1121	nb	E1 Region von HPV	Genitale Warzen	lokal	I
Resten-NG	Morpholino	c-myc	Restenose	i.v.	III
AVI-4014	Morpholino	NF κ B	entzündliche Erkrankungen	i.v.	I
AVI-4126	Morpholino	c-myc	Zystennieren	i.v.	II
ProMune™	CpG motif	Immunstimulans	diverse	i.v.	I/II
Heptazyme™	RNA/DNA	HCV	Hepatitis C	i.v.	II
R-95288	Aptamer	HIV-1	HIV/AIDS	i.v.	I
HGTV43	DNA	T-Zellen	HIV/AIDS	ex-vivo	I
Product R	PNA	CCR5	HIV	nb	I/II
1018-ISS	PS	Immunantwort	Hepatitis B	i.v.	II/III
1018-ISS	PS	Immunantwort	Allergie	i.v.	II/III
1018-ISS	PS	Immunantwort	Asthma	i.v.	I/II

Tab. 1.4: AS-ODN in medizinischen Bereichen außerhalb der Tumorthherapie.

Quelle: Hogrefe R (169).

2. Material und Methoden

2.1. Oligonukleotide

2.1.1. Synthese und Bezug

Es handelte sich um Oligodeoxynukleotide, die von der Firma Hoechst AG Frankfurt bezogen wurden. Die Herstellung erfolgte nach der Amidit-Methode auf einem 394 DNA-Sythesizer (Applied Biosystems, Inc. Foster City, USA). Ein höchster Reinheitsgrad wurde nach mehrfachen Reinigungsschritten mit Integritätsprüfungen garantiert. Die Oligonukleotide wurden lyophilisiert und vakuumverpackt geliefert.

2.1.2. Sequenz und Modifikation

Das Antisense-Oligonukleotid besitzt die komplementäre Sequenz zu den Basen 334-358 der bFGF-mRNA, das Kontroll-Oligonukleotid die gleiche Sequenz der bFGF-mRNA in diesem Bereich (Sense). Das Antisense-Oligonukleotid zielt somit auf den mRNA-Bereich in unmittelbarer Umgebung des Translationsinitiationskodons AUG (Abb. 2.1).

Beide Moleküle lagen als 15mere vor. Zur Verbesserung der Nukleasestabilität waren insgesamt 8 Phosphodiester durch Phosphorothioatbindungen (*) ersetzt worden, wobei diese entsprechend der bevorzugten Angriffspunkte von Exo- und Endonukleasen an Nukleotidenden und vor Pyrimidinbasen innerhalb des Moleküls eingefügt worden waren. Es handelte sich demnach um Teilphosphorothioate.

2.2. Bovine glatte Muskelzellen

2.2.1. Materialien

Zellkulturgefäße	Bezugsquelle
25 cm ² - Zellkulturflaschen (Falcon)	Becton Dickinson, Heidelberg
75 cm ² - Zellkulturflaschen (Nunclon™)	Nunc, Wiesbaden
Gewebekultur Petrischalen (35 x 10 mm) EASY GRIP™	Becton Dickinson, Heidelberg

Zellkulturmedium und Zusätze	Bezugsquelle
DMEM (Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium)	ICN, Biomedicals Inc., Meckenheim
Fetales Kälberserum (FKS), hitzeinaktiviert	Boehringer/Roche, Mannheim
Ciprofloxacin (Ciprobay ^R 200)	Bayer, Leverkusen
L-Glutamin, 200mM (Zusatz erfolgte nur falls die Herstellung des Kulturmediums länger als sechs Wochen zurücklag)	Seromed, Berlin

Enzyme, Waschlösungen	Bezugsquelle
Trypsin 0,05 % / EDTA 0,02% in NaCl/P _i (Trypsin aus Rinderpankreas)	Seromed, Berlin
HANKS Balanced Salts	Seromed, Berlin

2.2.2. Anlegen von Primärkulturen

Die glatten Muskelzellen wurden unter sterilen Bedingungen mittels Explantattechnik aus Koronararterien gewonnen, die aus frisch vom Schlachthof bezogenen Kälberherzen stammen. Die Identifizierung der cSMCs erfolgte immunhistochemisch durch den Nachweis von alpha-smooth muscle Aktin durch einen monoklonalen Aktin-Antikörper. Als Zellkulturmedium wurde Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium (DMEM) mit 10% (v/v) fetalem Kälberserum (FKS), 10 mg/ml Ciprofloxacin und 1% (v/v) Glutamin verwendet. Die Kultivierung erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C, 98% Luftfeuchtigkeit und in einer mit 5% CO₂ angereicherten Atmosphäre

Antikörper	Bezugsquelle
Monoclonal Anti-Actin (alpha-smooth muscle); A2547	Sigma

2.2.3. Subkultivierung

Die Subkultivierung der Zellpopulationen wurde frühestens mit Erreichen des Konfluenzgrades spätestens aber nach weiteren zwei Wochen in Kultur durchgeführt. Die Zellen wurden zweimal mit Hanks'-Lösung gewaschen und durch Trypsinzugabe vom Flaschenboden abgelöst. Dabei genügte es, einen Trypsinfilm 10 min. bei 37°C auf dem Zellrasen zu belassen. Der enzymatische Vorgang wurde durch Zugabe von Kulturmedium gestoppt, und die Zellen in einer Dichte von 300.000-500.000 Zellen in 25cm²-Kulturflaschen neu ausgesät.

2.3. Versuche

Für die Experimente wurden ausschließlich konfluente Kulturen glatter boviner Muskelzellen der 4.-7. Passage verwendet.

2.3.1. Standardversuch mit Auswertung nach 96 Stunden

Glatte bovine Muskelzellen einer konfluenten Kultur wurden durch Trypsinproteolyse vom Kulturschalenboden abgelöst und in einer Dichte von 1300 Zellen/cm² in 35mm Petrischalen ausgesät. Die Zellen wurden über 96h in 10% FCS-haltigem DMEM in Kultur belassen.

Zum Zeitpunkt der Aussaat erfolgte die erstmalige Zugabe der Oligonukleotide. Die Substanzmengen wurden dabei so gewählt, dass sich in einem Volumen von 1,5ml Kulturmedium pro Kulturschale ODN-Konzentrationen von 0,5 und 1,0 µM ergaben.

Die Zugaben wurden jeweils nach 24, 48 und 72 Stunden wiederholt.

In einem Standardexperiment wurden jeweils 4 Kulturen mit dem AS-ODN behandelt, wobei jeweils zwei Kulturen die identische ODN-Konzentration (0,5 und 1,0 µM) erhielten. Weitere vier Kulturen wurden entsprechend mit dem S-ODN versetzt. Zwei Zellkulturen blieben unbehandelt.

Da die Bestimmungen der Zellzahl und des bFGF-Gehaltes aus technischen Gründen unabhängig von den übrigen Parametern durchgeführt werden musste, wurde der Versuchsaufbau dupliziert bzw. verdreifacht. Die Kultivierung erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C unter 5%iger CO₂-Anreicherung und 98% Luftfeuchtigkeit.

Nach 96h wurde der Versuch beendet und folgende Parameter pro Kultur bestimmt:

1. Zellzahl
2. Proteingehalt
3. [³H]Thymidin-Inkorporation
4. bFGF-Gehalt

Insgesamt wurden 8 Standardversuche mit Doppelwertbestimmungen durchgeführt. Während die Parameter 1-3 in allen Versuchen ermittelt wurden, erfolgte die Bestimmung des bFGF-Gehaltes als zusätzlicher Parameter in drei Versuchen mit entsprechenden Doppelwerten.

2.3.2. Verlaufsversuch über 96 Stunden

Um die Verläufe der einzelnen Parameter innerhalb der 96 Stunden Versuchszeit zu beurteilen, wurde in Anlehnung an den oben beschriebenen Standardversuch ein Versuch durchgeführt, in dem im 24-Stunden-Intervall alle Parameter (Zellzahl, Protein, [³H]Thymidin-Inkorporation und bFGF-Gehalt) bestimmt wurden. Die Parameter lagen jeweils als Doppelwerte vor.

2.4. Parameter-Messungen

2.4.1. Zellzahlbestimmung

Lösungen und Reagenzien	Bezugsquelle
SBTI (soybean trypsin inhibitor), 42nM	Boehringer/Roche, Mannheim
NaCl 0,9%	Merck

Geräte	Bezugsquelle
Z1-Zellzähl-Gerät	Coulter Electronics Limited, England

Nach 96 Stunden in Kultur wurde der Zellrasen zweimal mit je 1ml Hanks gewaschen und mit 1ml Trypsin über 15min bei 37°C vom Kulturschalenboden abgelöst. Der Proteolyseprozess wurde mit 0,5 ml SBTI gestoppt. Zur Zellzahlmessung wurde die Zellsuspension aus technischen Gründen je nach Zelldichte mit isotonischer Lösung 1:10 oder 1:20 verdünnt. Die Zellzählung erfolgte anschließend im Z1-Zell-Counter.

2.4.2. $[^3\text{H}]$ Thymidin-Inkorporation

Lösungen und Reagenzien	Bezugsquelle/ Herstellung
74kB $[^3\text{H}]$ Methyl-Thymidin (1 μCi / ml)	ICM, Biochemicals Inc, Meckenheim
PBS (Phosphate-buffered Saline)	Na_2 7 mM $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 3 mM NaCl 30mM pH 7,2
10 %-ige Trichloressigsäure (TCA)	Serva
96 %-iges Etanol (EtOH)	Serva
10 %-ige Natronlauge (NaOH)	Serva
12,5 molare Essigsäure	Serva
Quick-Safe (Szintillationsflüssigkeit)	ICM, Biochemicals Inc, Meckenheim

Die Zellkulturen wurden 10 Stunden vor Versuchsstop mit Tritium-markiertem Thymidin ($[^3\text{H}]$ Methyl-Thymidin) versetzt.

Da die Aufarbeitung etwas Zeit beanspruchte, wurden die Kulturen unmittelbar nach Versuchsende auf ein Metalltablett mit Eisgranulat gestellt, um die noch laufenden Proliferationsvorgänge der Zellkulturen auf ein Minimum zu reduzieren. Das Kulturmedium wurde mit einer Pasteurpipette abgezogen und entsorgt. Anschließend wurde der Zellrasen jeweils zweimal mit 1ml Hanks' Lösung, 1 ml 10% TCA und 1 ml 96% EtOH gewaschen. Die Waschlösungen wurden eiskalt verwendet und 5 min auf dem Zellrasen belassen. Die Zugabe erfolgte tropfenweise mit einer Stangenpipette, das Abziehen mit einer an einer Wasserstrahlpumpe angeschlossenen Pasteurpipette. Die Waschschrte dienten der weitgehenden Entfernung des noch an Zelloberflächen und der Kulturschale haftenden $[^3\text{H}]$ Thymidins.

Nach Absaugen des Ethanols wurden die Kulturschalen kurzzeitig zur Verdunstung der Restflüssigkeit in den Brutschrank (37°C) zurückgestellt.

Die [³H]Thymidinbestimmung und die Proteinmessung nach Lowry konnten parallel aus jeweils einer Kulturschale durchgeführt werden.

Zur Freisetzung des Zellproteins wurden die Kulturen über eine Stunde in 500 µl 10% NAOH pro Kulturschale bei 60 °C inkubiert, wobei die Zellschicht am Ende der Inkubationszeit vollständig solubilisiert sein sollte. Das Lysat wurde anschließend mit 125 µl 12,5 N Essigsäure neutralisiert.

Zur Radioaktivitätsmessung werden 250 µl des Gemisches entnommen, mit Aqua dest. auf 2 ml aufgefüllt und mit 3 ml Szintillationslösung gemischt.

Das Ergebnis der Szintillationszählung kann zur Ermittlung des Gesamteinbaus pro Kultur mit dem Faktor 2,5 multipliziert werden.

2.4.3. Proteinbestimmung nach Lowry

Reagenzien und Lösungen	Herstellung / Bezugsquelle
Lowry- Reagentien: Lowry 1 (1000 ml):	Na ₂ CO ₃ 20 g NaOH 4 g K-Na-Tartrat 0,2 g in Aqua dest. 1000 ml
Lowry 2 (1000 ml):	CuSO ₄ x 5 H ₂ O 5 g in Aqua dest. 1000 ml
Folinreagenz, 9001	Merck
BSA (Albumin bovine Fraction) 11930, standard grade, lyophil; Mr 67000	Serva

Zur Herstellung des Lowry-Reagenz wurden 50 ml der Lösung Lowry 1 und 1 ml der Lösung Lowry 2 gemischt.

Für die Proteinbestimmung wurden zweimal 100 µl des restlichen Zellysates zur Doppelwertbestimmung entnommen und mit 1ml Lowry-Reagenz versehen. Nach 10 min wurden noch 100 µl 1:3 verdünntes Folinreagenz hinzugefügt und die Proteinlösung gründlich durchmischt. Nach Ausbildung des Farbkomplexes wurden die Extinktionen der Proben (Leerwert Aqua dest.) durch photometrische Messung bei 750 nm (UV-VIS Spectrometer, UV-1202, Shimadzu) ermittelt und die Proteinmengen und mit Hilfe einer Eichkurve (5-50 µg Rinderserumalbumin) bestimmt. Die anschließende Multiplikation mit dem Faktor 6,25 ergab den Proteingehalt pro Kulturschale.

2.5. bFGF-Bestimmung im intrazellulären und perizellulären Kompartiment

Zur Bestimmung des bFGF-Gehaltes wurde bezüglich der Versuchsbedingungen wie im Standardversuch verfahren.

2.5.1. bFGF-Kompartiment-Separation

Reagenzien und Geräte	Bezugsquelle/ Herstellung
GS-15R Zentrifuge	Beckmann
Zentrifuge 5415C	Eppendorf
Oegema 10-fach, wird vor Einsatz mit PBS auf 1-fach verdünnt.	Serva
PMSF (Phenyl-methyl-sulfonyl-florid) 100mM, vor Einsatz auf 1mM verdünnt	Serva
Coat-Lösung:	100µg BSA /ml NaCL 0,9%
Eppendorf-Tubes, 1,5ml -Voumen	Greiner Labortechnik, Solingen
bFGF-ELISA	
Biotrak Fibroblast growth factor (bFGF basic), human, ELISA- System, code RPN 2158	Amersham Life Science

2.5.1.1 Gewinnung des perizellulären bFGFs

Der Zellrasen wurde nach Entfernung des Kulturmediums zweimal mit 1 ml Hanks'-Lösung von FKS- Rückständen befreit und 10min in 300µl Trypsin bei 37°C inkubiert.

Dabei wurde proteolytisch die Glykokalix von der Zelloberfläche abgetrennt, so daß sich die SMCs unter Verlust ihrer Adhäsionsmoleküle vom Kulturschalenboden ablösen. Nach Beendigung des Proteolysevorganges durch 150µl Trypsininhibitor

SBTI wurde die Zellsuspension in ein Spitzbodenglas transferiert. Unter schonender Zentrifugation (Labofuge Ae) über 5min bei 800 x g erfolgte die Auftrennung in einen Perizellulärpool (Überstand) und einen Zellpool (Pellet). Der perizelluläre Pool konnte durch Abpipettieren des Überstandes gewonnen werden.

Trypsin entfernt die Ektodomäne des bFGF-Rezeptors als auch das zellassozierte HSPG von der Zelloberfläche, wobei beide mit dem bFGF einen Trypsin-resistenten Komplex bilden (84). Demnach entstand kein bFGF-Verlust im Rahmen der Proteolyse.

2.5.1.2. Gewinnung des intrazellulären bFGFs

Nach Aufnahme in 300 µl Proteaseinhibitorlösung (Oegema mit 1mM Phenyl-methylsulfonyl-florid) wurde der Zellpool drei Frier-Tau-Schritten unterzogen und anschließend Ultraschall behandelt (5sec. bei 50 Watt), um das intrazelluläre bFGF aus den Zellen freizusetzen. Durch hochtouriges Zentrifugieren wurde anschließend ein klarer bFGF-haltiger Überstand gewonnen, der dem intrazellulären Pool entspricht. Die bFGF-Lösungen des intra- und extrazellulären Pools wurden in BSA-beschichtete 1,5 ml Eppendorf-Tubes transferiert. Zur BSA-Beschichtung wurden die Tubes zuvor mit 100µg BSA/ml NaCL-Lösung durchspült und luftgetrocknet. Die BSA-Beschichtung reduziert die bFGF-Haftung an den Kulturgefäßen.

2.5.2. bFGF-Bestimmung im ELISA

In einem „Solid-phase“-ELISA-System wurden intrazelluläres und perizelluläres bFGF getrennt bestimmt. Eingesetzt wurde das „Biotrak-bFGF basic, human, ELISA-System“, von Amersham Life Science, basierend auf einem primären monoklonalen Antikörper, der nach Angaben des Herstellers humanes als auch bovines bFGF gleichermaßen spezifisch bindet. Zur Katalyse der Farbreaktion war der sekundäre Antikörper mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert. Vor der ELISA-Durchführung war eine Verdünnung der stark bFGF-haltigen Proben in Abhängigkeit von ihrer

Kultivierungsdauer erforderlich, um auswertbare Extinktionen zu erhalten. Tabelle 2.1 zeigt die Verdünnungsstufen.

Kultivierzeit der Zellen	Verdünnungen	
	Perizellulär- Pool	Intrazellulär- Pool
24h	1: 3	1: 5
48h	1: 5	1:10
72h	1:10	1:25
96h	1:20	1:50

Tab. 2.1: Verdünnungsstufen der bFGF-Extrakte in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit

Es wurde jeweils ein Probenvolumen von 200µl im ELISA eingesetzt.

Die photometrische Auswertung erfolgte mit Hilfe einer speziellen Computersoftware (Biolinks).

2.6. Apoptose-Nachweis

ELISA	Bezugsquelle
Cell Death Detection ELISA	Boehringer/Roche, Mannheim

Verwendet wurde ein photomerischer Enzym-Immunoassay (Cell Death Detection ELISA; Boehringer/Roche), basierend auf der Detektion von zytoplasmatischen Histon-assoziierten-DNA-Fragmenten.

Ein an einer Mikrotiterplatte fixierter Histon-Antikörper (monoklonaler Maus-Antikörper) bindet freie, in einer Probe enthaltene Nukleosome über ihren Histon-Anteil. Mit einem gegen den DNA-Anteil der Nukleosomen gerichteten sekundären Antikörper (monoklonaler, Peroxidase-konjugierter Maus-Antikörper) wird anschließend ein Komplex gebildet, der durch eine Peroxidase-katalysierte Farbreaktion photometrisch quantifiziert werden kann.

2.6.1. Probenvorbereitung

Aus einem Standardversuch hervorgegangene Kulturen werden unter Trypsin-Einsatz vom Kulturschalenboden gelöst und nach Zellzahlbestimmung auf eine Konzentration von 100.000 Zellen/ml mit PBS verdünnt.

Dieser Suspension wird 1ml (entsprechend 100.000 Zellen) entnommen und 5 min. schonend bei 200 x g (Labofuge AE) zentrifugiert. Nach Abpipettieren des Überstandes werden die Zellen in 500µl Lysispuffer (im ELISA-Set enthalten) resuspendiert, gründlich durchmischt und über 30 min bei 4°C zur Lyse gebracht.

Durch hochtourige Zentrifugation bei 20000 x g konnten anschließend die Zellkerne mit intakter hochmolekularer DNA (Pellet) von zytoplasmatischen DNA-Fragmenten (Überstand) getrennt werden. Nach 1:10 Verdünnung wurden 2 x 100µl des Überstandes als Doppelwerte im ELISA eingesetzt. Als Kontrolle diente die zytoplasmatische Fraktion unbehandelter Zellen

2.6.2. Auswertung

Aus den gemessenen Extinktionen der Probendoppelwerte wurden die Mittelwerte gebildet.

Nach Subtraktion des Hintergrundwertes konnte die spezifische Anreicherung der Mono- und Oligonukleosomen nach folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Anreicherungsfaktor} = \frac{\text{Extinktion einer Probe behandelter Zellen}}{\text{Extinktion einer unbehandelten Probe}}$$

2.7. Western Blot

2.7.1. Probengewinnung

Lösungen und Geräte	Bezugsquelle/Herstellung
PBS (Phosphate-buffered Saline)	Na ₂ CO ₃ 7 mM Na ₂ H ₂ PO ₄ 3 mM NaCl 30mM pH 7,2
2 x SDS-Gelprobenpuffer (doppelt reduzierer Probenpuffer)	Tris x Cl (pH 6,8) 100 mmol Dithiothreitol 200 mmol SDS 4 % Bromophenol blue 0,2 % Glycerol 20%
Spektrophotometer Genequant 2	Pharmacia Biotech, Freiburg

Da im Western Blot im Vergleich zum ELISA eine fünf- bis zehnfache höhere bFGF-Menge (1-2 ng) eingesetzt werden sollte, um eine optimale Detektion zu erhalten, wurde der Standardversuch mit einer Ausgangszellzahl von 700000 Zellen/Kultur durchgeführt. Die Zellen wurden in 75cm²-Kulturflaschen in 10% FCS-haltigen Mediumvolumen von 10ml ausgesät, und die Oligonukleotide wie im Standardversuch zugesetzt. Nach 96 Stunden erreichte die Kontrollkultur auch hier nahezu das Konfluenzstadium.

Entsprechend der bFGF-ELISA-Aufarbeitung wurde durch Trypsinproteolyse der peri- und intrazelluläre bFGF- Pool gewonnen. Für den Trypsinisierungsvorgang wurden 1ml Trypsin und 0,5ml SBTI verwendet. Der Perizellulärpool wurde durch Lyophilisation und Aufnahme in einem kleineren Volumen von 200µl Aqua dest konzentriert.

Die Proteinkonzentration der Proben wurde spektrometrisch bestimmt und durch Verdünnung mit PBS einander angeglichen. Alle während der Elektrophorese eingesetzten Proben enthielten 100µg Protein.

Die Proben wurden 1:1 mit doppelt reduzierendem SDS- Probenpuffer versetzt und 5 min im Wasserbad gekocht.

2.7.2. Gelherstellung

Lösungen und Reagenzien	Herstellung /Bezugsquelle
Lösung A:	Acrylamid: 30 g Bis-N-Methylbisacrylamid: 0,8 g ad 100 ml Aqua dest, nach Lösung über einen Faltenfilter filtrieren
Lösung B:	Tris: 36,3 g Sodium-Dodecyl-Sulfat (SDS): 0,8 g in 150 ml Aqua dest lösen, pH-Einstellung auf 8,8 ad 200 ml Aqua dest
Lösung C:	Tris: 6,06 g SDS: 0,4% in 70 ml Aqua dest lösen, pH-Einstellung auf 6,8 ad 100 ml Aqua dest
APS-Lösung:	Ammoniumperoxidsulfat: 0,1 g ad 1 ml Aqua dest
TEMED: N,N,N',N'- Tetramethylethylethylendiamin	Serva
Laufpuffer:	Tris: 60 g Glycin: 288 g SDS: 20 g ad 2000 ml Aqua dest, pH-Einstellung auf 8,8
pH-Meter	Schott CG 840

Ein SDS-Elektrophorese-Gel setzt sich zusammen aus einem Trenngel, in dem die eigentliche Proteinseparation erfolgt und einem darüber geschichteten, geringer vernetzten Sammelgel, welches der Probenkonzentrierung vor der Auftrennung dient. Die Sammelgeltaschen fassen jeweils ein Probenvolumen von 120 μ l. Insgesamt können 15 Proben aufgetragen werden.

Zur Detektion der bFGF- Isoformen (18-26 kD) und eventueller Abbauprodukte wurden ein 15% Trenngel und ein 4,5% Sammelgel verwendet.

Die Herstellung der Gele erfolgte durch Mischung der Lösungen A, B, C und Hinzufügen der Polymerisationsstarter APS und Temed nach folgender Rezeptur:

Trenngel	Sammelgel
Lösung A: 16,0ml Lösung B: 8,0ml Aqua dest.: 8,0ml Zugabe von 32 μ l Temed und 320 μ l APS	Lösung A: 15,0ml Lösung C: 2,5ml Aqua dest.: 6,0ml Zugabe von 20 μ l Temed und 50 μ l APS Größe : 11.2cm x 14cm nach Polymerisation

Das Trenngel wurde mit dem Sammelgel überschichtet und ein Kamm zur Formung der Probenaschen eingesetzt. Nach Auspolymerisation wurde der Kamm entfernt und die Taschen des Sammelgels mit Probenpuffer gefüllt.

2.7.3. Auftragen der Proben und Elektrophorese

Die Proben werden mit einer Hamilton Spritze (Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz) in die Taschen des Sammelgels eingefüllt. Auf zwei der äußeren Bahnen wurde ein bFGF-Standard und ein Proteinstandard (Protein ladder, Gibbco) mitgeführt. Die Gele wurden anschließend in die Elektrophoresekammer (Hoefer Scientific Instruments, Modell SE 600, Pharmacia Biotech, Freiburg) eingesetzt, der Laufpuffer in die Kammer gefüllt und eine Spannungsquelle angelegt. Der Probenlauf durch das Sammelgel erfolgte mit einer Stromstärke von 20mA über etwa 1 Stunde und durch das Trenngel bei 30mA über etwa 5 Stunden. Während der Elektrophorese wurde mittels einer 4°C-Kühlung des Systems durch ein Külaggregat einem Temperaturgradienten entgegengewirkt.

Hat die Lauffront den unteren Gelrand erreicht, wurde die Elektrophorese beendet, und das Gel im nächsten Schritt auf eine Nitrozellulosemembran geblottet.

2.7.4. Proteintransfer auf Nitrozellulose nach dem Semi-Dry Verfahren

2.7.4.1. Pufferherstellung

Anodenpuffer I	MeOH/H ₂ O	20% (v/v)
	Tris (0,3M)	18,17 g
	ad 500ml Aqua dest	
Anodenpuffer II	MeOH/H ₂ O	20% (v/v)
	Tris (25mM)	1,51 g
	ad 500ml Aqua dest	
Kathodenpuffer	MeOH/H ₂ O	20% (v/v)
	6-Aminohexansäure	2,62 g
	(0,04M)	
	ad 500ml Aqua dest	

2.7.4.2. Elektroblot

Der Elektroblot wurde nach der Semi-Dry-Blotting-Methode von Kyhse-Andersen (196) durchgeführt. Dazu wurde in einer Blotkammer ein Transferkomplex basierend auf einem 3-Puffer-System hergestellt (s. Abb. 2.2).

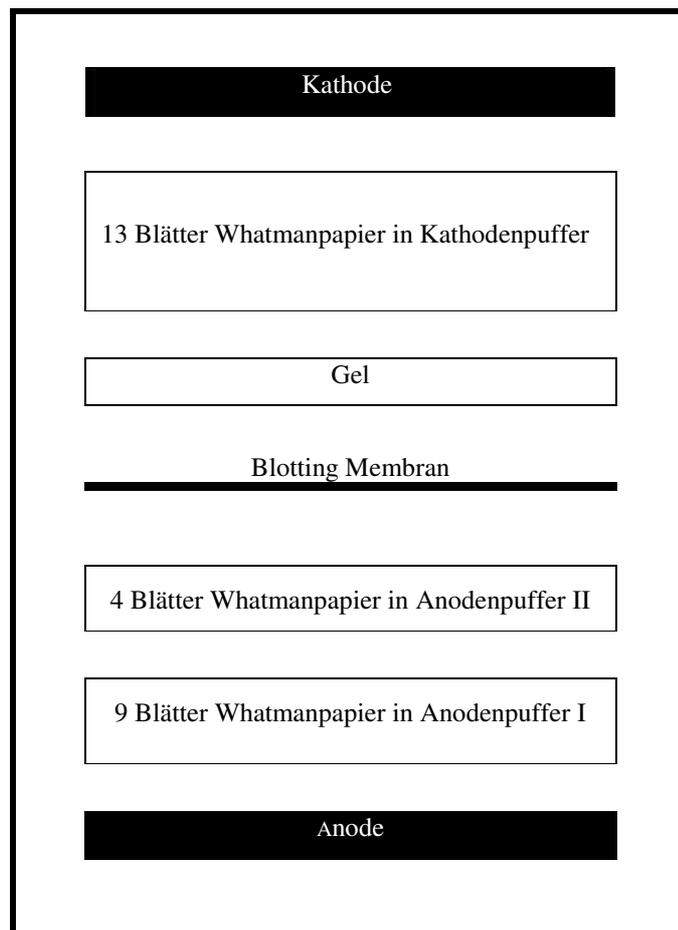


Abb. 2.2: Transferkomplex nach der Semi-Dry-Methode von Kyhse-Andersen et al. (196)

Vorbereitungen:

Aus Whatman-3M-Papier (Fleischhacker, Kamen) wurden insgesamt 26 Blätter auf Gelgröße (ca. 13 cm x 15cm) zugeschnitten und anschließend, wie in Abb. 2.2 angegeben, in entsprechendem Puffer getränkt. Zusätzlich wurde eine 0,2 µm Nitrozellulosemembran (Schleicher und Schuell, Dassel) in Anodenpuffer equilibriert. Das Gel selbst wurde am Ende der Elektrophorese der Kammer antommen und in Kathodenpuffer inkubiert.

Anschließend wurde der in Abb. 2.2 dargestellte Transferkomplex in einer Blotkammer (Biometra, Göttingen) geschichtet, die Blotkammer verschlossen und gleichmäßig beschwert.

Transferbedingungen:

Der Proteintransfer erfolgte über 2 Stunden bei 180mA entsprechend 1mA/cm². Ein Kühlaggregat sorgte für Temperaturkonstanz bei 20°C.

Transferkontrolle:

a) Proteinfärbung mit Ponceau S

Reagenzien	Bezugsquelle
0,5% (w/v) Ponceau S 5% (w/v) Trichloressigsäure	AppliChem, Darmstadt

Zur Transferkontrolle wurde die Nitrozellulosemembran fünf Minuten in Ponceau S inkubiert, wodurch die transferierten Proteinbanden reversibel angefärbt und sichtbar wurden. Die Transferspur des Standards wurde abgetrennt und für die spätere Blotinterpretation durch Trocknen konserviert. Die Membran ließ sich mit Aqua dest. wieder vollständig entfärben.

b) Gelfärbung mit Coomassie Blue

Reagenzien	Herstellung
Färbebad:	Methanol techn.: 400 ml Eisessig: 105 ml Coomassie Brillant Blue R250: 1g ad 1000ml Aqua dest
Entfärbebad:	Methanol techn.: 50ml Eisessig: 105ml ad 500ml Aqua dest
Schlauchfolie 300 x 0,2 mm	Fleischhacker, Kamen

Als zweite Transferkontrolle diente die Anfärbung des Gels mit Coomassie blue, wodurch im Gel verbliebene Proteinreste sichtbar wurden. Dazu wurde das Gel im Färbebad unter ständiger Schwenkbewegung für eine Stunde belassen. In einem Entfärbebad erfolgte die Löschung unspezifischer Anfärbungen, wobei die Entfärbedauer von der Intensität der vorausgegangenen Färbung abhing. Die Gele wurden anschließend zur Konservierung in Schlauchfolie eingeschweißt

2.7.5. Immunoblot

Lösungen und Reagenzien	Herstellung
Waschpuffer	Tris: 6,055 g NaCl: 2,922 g ad 900 ml Aqua dest pH-Einstellung auf 7,5 0,1% Tween 20: 1ml ad 1000ml Aqua dest
Absättigungslösung mit BSA	a) Absättigungslösung mit 1 % BSA Waschpuffer: 100ml BSA: 1 g b) Absättigungslösung mit 0,2 % BSA Waschpuffer 100ml BSA 0,2g
Puffer für alkalische Phosphatase	MgCl ₂ x 6 H ₂ O 1 g Tris 12 g NaCl 5,9 g ad 1000ml Aqua dest pH-Einstellung auf 9,5
BCIP	BCIP 20mg DMF 1ml
NBT	NBT: 70mg DMF 70% 1ml

Vorbereitungen:

Vor dem eigentlichen Immunoblot wurde die Nitrozellulosemembran über Nacht in 3%iger BSA-Lösung inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blocken. Durch vier Spülvorgänge mit Tween-haltigem Waschpuffer (einmal kurz, dreimal jeweils für vier Minuten) wurde die Membran anschließend von BSA-Überschüssen befreit.

Antikörper	Bezugsquelle
Primärer Antikörper: Anti-human bFGF IgG Sheep, monoklonal; vor Einsatz verdünnt auf 4 ng / ml in PBS+ 1%BSA	Collaborative Biochemical Products, Becton Dickinson Labware
Sekundärer Antikörper: Anti-Sheep-IgG; donkey, alkalische Phosphatase –konjugiert; vor Einsatz 1:20000 mit PBS+ 0,2 % BSA verdünnt	Sigma Biosciences

Inkubation mit dem primären Antikörper:

Die Membran wurde über zwei Stunden bei Raumtemperatur mit dem primären Antikörper (Stocklösung wurde 1:10000 mit 0,2% BSA-Absättigungslösung verdünnt) inkubiert. Dabei handelte es sich um ein Schaf-Anti-human-bFGF-Immunglobulin. Anschließend wird die Membran mit dem Waschpuffer fünfmal jeweils über fünf Minuten gereinigt.

Inkubation mit dem sekundären Antikörper:

Nach Entfernen des primären Antikörpers und wiederholtem Spülen wird die Membran mit dem sekundären Antikörper (Stocklösung wurde 1:20000 mit 0,2 % BSA-Absättigungslösung verdünnt) über 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Bei dem sekundären Antikörper handelt es sich um ein alkalisches Phosphatase-konjugiertes Anti-Sheep-IgG. Die Antikörperlösung wurde nach Gebrauch zur Wiederverwendung aufbewahrt. Die Membran wurde anschließend erneut durch mehrfache Waschschrte (s.o.) gereinigt.

Bei allen Blots wurde jeweils eine zusätzlich mitgeführte Probe ausschließlich mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Da sich hier in allen Fällen keine Farbreaktion ergab, konnte ein unspezifisches Binden des sekundären Antikörpers ausgeschlossen werden.

Farbreaktion:

Zur Farbreaktion wurde die Membran über 5 Minuten in Puffer für alkalische Phosphatase inkubiert, dieser wurde anschließend verworfen und durch 5ml frischen Puffer ersetzt. Durch Zugabe von 17,5 µl NBT und 31,25 µl BCIP wurde die Farbreaktion gestartet. Nach 15-30 min wurden Proteinbanden auf der Membran sichtbar.

Sonstige Materialien/Geräte	Bezugsquelle
Waage	Labor Alliance High Tech. LA/ 140P
Waage: HF 1200G	

2.8. Mikroskopische Kontrolle mit Photographien

Die Zellkulturphotographien wurden mit 400-facher Vergrößerung angefertigt.

3. Ergebnisse

In dieser Studie soll der Einfluß von Antisense-Oligodesoxynukleotiden gegen den Wachstumsfaktor bFGF auf proliferierende, glatte Muskelzellen untersucht werden. Dazu wurden Zellen der Tunika Media aus Koronararterien eines Kälberherzens verwendet. Die Zellen wurden enzymatisch aus ihrem Verband gelöst und kultiviert. Es handelte sich um eine heterogene Zellpopulation, die die natürliche Zusammensetzung der Gefäßwand repräsentierte.

3.1. Proliferationskinetik un behandelter glatter boviner Muskelzellen

Bovine Muskelzellen wurden zum Zeitpunkt Null in einer Ausgangszahl von 50.000 in 35mm-Durchmesser-Kulturschalen ausgesät. Die subkonfluenten Kulturen werden über 96 Stunden in serumreichem Medium gehalten. Das Wachstumsverhalten wurde anhand der Zellzahl, der [³H]Thymidin-Inkorporation in die DNA, des Proteingehaltes und des bFGF-Gehaltes beschrieben (Abb. 3.1 – 3.4).

3.1.1. Veränderungen der Zellzahl und des Proteingehaltes

Abb. 3.1 und 3.2 zeigen, dass sich in den ersten 24 Stunden die Zellzahl und der Proteingehalt kaum verändern. In dieser Zeit nehmen die zunächst im kontraktilem Phänotyp vorliegenden glatten Muskelzellen nach aufgehobener Kontaktinhibition ihren synthetischen Phänotyp an, um zu proliferieren. Nach 24 Stunden gehen die Zellen in die Phase des exponentiellen Wachstums über. Bei einer durchschnittlichen Verdopplungszeit von knapp 24 Stunden in den drei darauf folgenden Tagen hat sich die Zellzahl nach 96 Stunden nahezu verzehnfacht. Der parallele Anstieg des Proteingehaltes pro Zellkultur ist weniger stark ausgeprägt (Abb. 3.1). Das Zellprotein erreicht nach 96 Stunden nur das Vierfache seines Ausgangswertes.

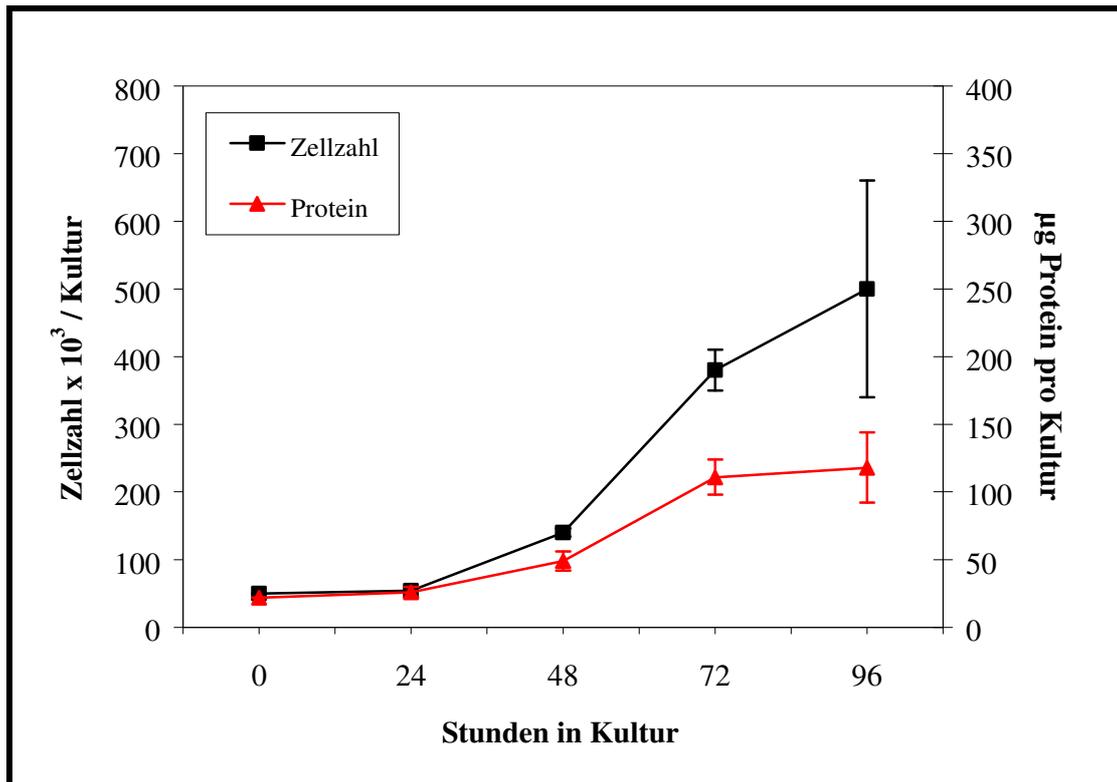


Abb. 3.1: Entwicklung von Zellzahl (linke Ordinate) und Proteingehalt (rechte Ordinate) über 96 Stunden Kulturzeit nach Aussaat von 50.000 Zellen in 10%-FCS haltigem Medium (n = 3).

Die Ursache des im Vergleich zur Zellzahl nur zögerlich ansteigenden Proteins pro Kultur liegt darin, dass der Proteingehalt der Einzelzelle in den ersten 72 Stunden bis auf die Hälfte zurückgeht (Abb. 3.2). Erst mit nachlassender Teilungsaktivität nach 72 Stunden durch die einsetzende Kontaktinhibition haben die Zellen Gelegenheit ihr Proteindepot wieder zu füllen.

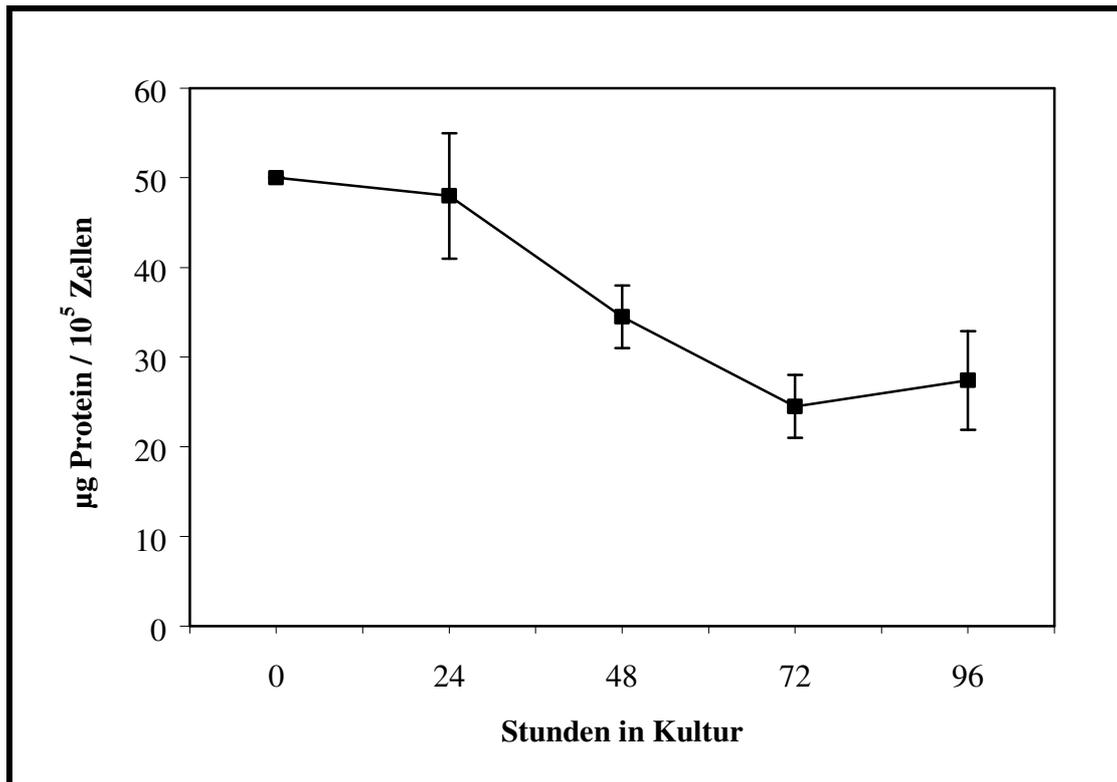


Abb. 3.2: Entwicklung des Proteingehaltes pro 10^5 Zellen über 96 Stunden Kulturzeit nach Aussaat von 50.000 Zellen in 10%-FCS haltigem Medium (n = 3)

3.1.2. Verlauf der DNA-Synthese anhand der [³H]Thymidin-Inkorporationsrate

Die DNA-Synthese der in Kultur befindlichen glatten Muskelzellen wurde anhand der [³H]Thymidin-Inkorporationsrate dargestellt (Abb. 3.3). Betrachtet wurde die [³H]Thymidin-Inkorporationsrate pro Kultur bei einer Ausgangszellzahl von 50.000 Zellen. Die DNA-Synthese erreicht nach einem steilen Anstieg maximale Werte zwischen 48 und 120 Stunden und verläuft in diesem Zeitraum plateauförmig. Nach der 72-stündigen Plateauphase verzeichnet sie einen rasanten Abfall aufgrund der bei zunehmender Konfluenz eintretenden Kontaktinhibition. Innerhalb von 24 Stunden erreicht die DNA-Synthese schließlich Minimalwerte, da Zellteilungen nur noch zur Aufrechterhaltung des Zell-Turnovers erfolgen.

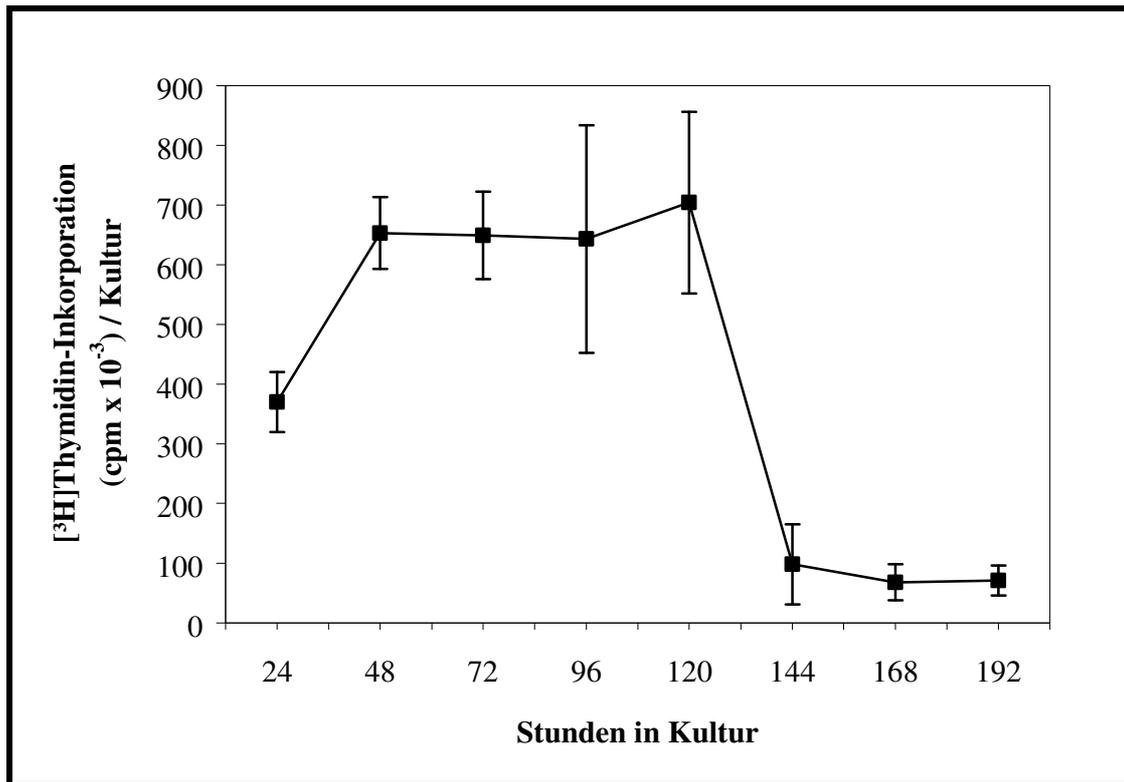


Abb. 3.3: [³H]Thymidin-Inkorporation über 192 Stunden Kultivierungszeit.

Kulturen von 50.000 cSMCs wurden 192 Stunden in 10% FCS-haltigem Medium gehalten und 12 Stunden vor Versuchsstop mit [³H]Thymidin versetzt. Anschließend erfolgte die Radioaktivitätsmessung der durch Trypsinisieren gewonnenen Zellen (n = 3).

3.1.3. Veränderungen des bFGF-Gehaltes

Der von vaskulären glatten Muskelzellen synthetisierte basische Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF) wird nach der Synthese auf einen intrazellulären (Zytoplasma, Nukleus) und einen perizellulären Pool (extrazelluläre Matrix) verteilt. Der Gesamt-bFGF-Gehalt entspricht der Summe beider Kompartimente.

Der bFGF-Gehalt und seine Kompartimentverteilung unterliegt nach Schmidt et al. (77) wachstumsabhängigen Veränderungen:

1. Der Gesamt-bFGF-Gehalt pro Zelle sinkt unter Zunahme der Teilungsaktivität und steigt bei abnehmender Proliferationsrate langsam wieder an.
2. Parallel zum Abfall des bFGF-Gehaltes kommt es zu einer Umverteilung von intrazellulärem bFGF in die extrazelluläre Matrix und somit zu einer verstärkten Oberflächenexpression des Wachstumsfaktors.

In dieser Studie sinkt der bFGF-Gehalt unter Proliferationsbedingungen in den ersten drei Tagen auf ein Minimum von ca. $125 \text{ pg}/10^5$ Zellen, wobei 58% des erstmals nach 12 Stunden gemessenen bFGFs verloren gehen (Abb. 3.4). Im Vergleich zum Gesamtprotein, das ebenfalls eine Abnahme in ähnlicher Größenordnung verzeichnet (Abb. 3.2), sinkt der bFGF-Gehalt hauptsächlich in den ersten 24 Stunden und verändert sich somit wesentlich früher als das Gesamtprotein. Ein Wiederanstieg erfolgt nach dem 3. Kulturtag.

Das in Abbildung 3.4 eingefügte Diagramm von Schmidt et al. (77) zeigt darüber hinaus die Entwicklung des bFGF-Gehaltes pro 10^5 boviner glatter Muskelzellen über einen Zeitraum von 10 Tagen. Daraus geht hervor, dass nach dem initialen Abfall in den ersten drei Tagen mit anschließendem Wiederanstieg der bFGF-Gehalt am 9.-10. Tag das Ausgangsniveau wieder erreicht.

Die von Schmidt et al. (77) verwendete Kultur boviner Muskelzellen weist im Vergleich zu der in dieser Studie untersuchten Population einen halb so hohen bFGF-Gehalt auf, ein Ausdruck der Heterogenität dieses Zelltyps.

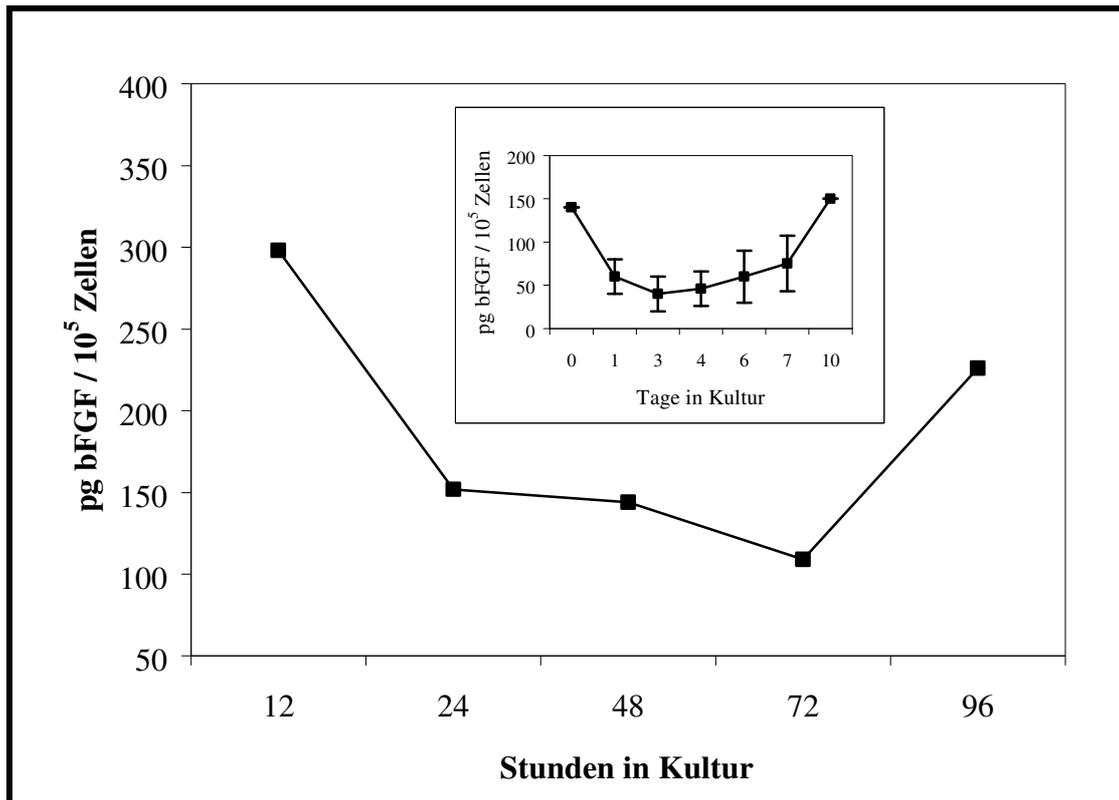


Abb. 3.4: Entwicklung des bFGF-Gehalt in pg / 10⁵ Zellen über eine Kulturzeit von 96 Stunden nach Aussaat von 50.000 cSMCs in 10% FCS-haltigem Medium (n = 1).

Das eingefügte Diagramm von Schmidt et al. (77) zeigt zum Vergleich die Veränderungen des bFGF-Gehaltes einer ähnlichen Population glatter, boviner Muskelzellen über einen verlängerten Kulturzeitraum von 10 Tagen.

3.2. Proliferationsverhalten glatter Muskelzellen unter Antisense- und Sense-Oligonukleotiden

Zur Proliferationsinhibition glatter boviner Muskelzellen wurde ein 15mer Antisense-Oligodesoxynukleotid (AS-ODN) gegen das Translationsstartkodon AUG der bFGF-mRNA verwendet. Als Kontrolloligonukleotid wurde das komplementäre Sense-Molekül (S-ODN) gewählt. Bei beiden Molekülen handelte es sich um Teilphosphorothioate.

Vor der eigentlichen Versuchsreihe wurde zur Optimierung der Versuchsbedingungen eine Dosis-Wirkungskurve des AS-ODN erstellt, als auch seine Wirkdauer in Kultur ermittelt.

3.2.1. Wirkungsvergleich unterschiedlicher AS-ODN-Konzentrationen auf die DNA-Synthese glatter, boviner Muskelzellen

Die Proliferationsinhibition glatter Muskelzellen durch Antisense-Oligodesoxynukleotide wurde zunächst anhand einer Dosis-Wirkungskurve überprüft. Dazu wurden frisch ausgesäte Muskelzellen Antisense-Konzentrationen von 0,1 µM, 0,3 µM, 0,5 µM, 1,0 µM und 2,0 µM über 24 Stunden ausgesetzt (Abb. 3.5).

Bereits nach 24 Stunden Kultivierungszeit unter AS-ODN-Einfluß ist eine deutliche Suppression der DNA-Synthese anhand einer reduzierten [³H]Thymidin-Einbaurrate erkennbar. Mit einer 20-75%-Inhibition ergibt sich unter 0,1-0,5 µM AS-ODN ein lineares Konzentration-Inhibitions-Verhältnis. Höhere AS-ODN-Konzentrationen (1,0 und 2,0 µM) weisen dahingegen mit einer Inhibition von 78-80% kaum noch Wirkungsunterschiede auf, so dass auf Testungen darüber hinausgehender Konzentrationen verzichtet wurde.

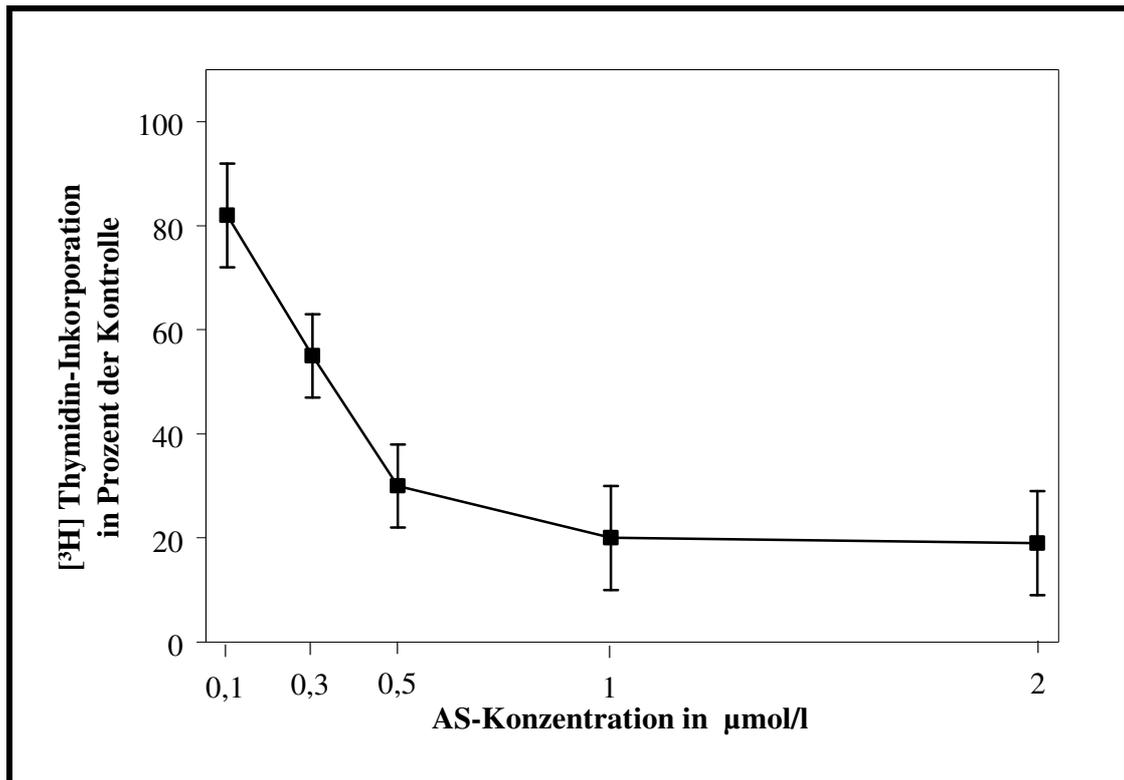


Abb. 3.5: Dosis-Wirkungskurve des Antisense-Oligodesoxynukleotids.

Konzentrationsabhängige Proliferationsinhibition glatter boviner Muskelzellen unter AS-ODN-Einfluß anhand der $[^3\text{H}]$ Thymidin-Inkorporationsrate.

50.000 cSMC wurden bei Aussaat in 10% FCS-haltigem Medium mit AS-ODN in den oben angeführten Konzentrationen versetzt und 24 Stunden in Kultur belassen. Zwölf Stunden vor Versuchsstop erfolgte die Zugabe von $[^3\text{H}]$ Thymidin mit Radioaktivitätsmessung der Zellkulturen zum Versuchsende.

3.2.2. Wirkungsdauer der AS- ODN

In einem Versuch über 4 Tage wurde die Wirkungsdauer der AS-ODN nach einmaliger Zugabe ermittelt. Abb. 3.6 zeigt eine kontinuierliche Abschwächung der ODN-Wirkung anhand einer zunehmenden $[^3\text{H}]$ Thymidin-Einbaurate der in Kultur befindlichen cSMCs. Die zum Zeitpunkt Null mit dem AS-ODN versetzten Kulturen

sind proliferationsinhibiert und weisen nach 24 Stunden eine auf 20% reduzierte [³H]Thymidin-Einbaurate unbehandelter Kulturen auf. Während in den ersten 48 Stunden in Kultur nur ein leichter Anstieg der [³H]Thymidin-Inkorporation zu verzeichnen ist, büßt das AS-ODN in den letzten 48 Stunden deutlich an Hemmwirkung ein. Mit nur noch um 20% reduzierter [³H]Thymidin-Inkorporation wird nach 96 Stunden die Rückkehr zu normaler DNA-Synthese nahelegt.

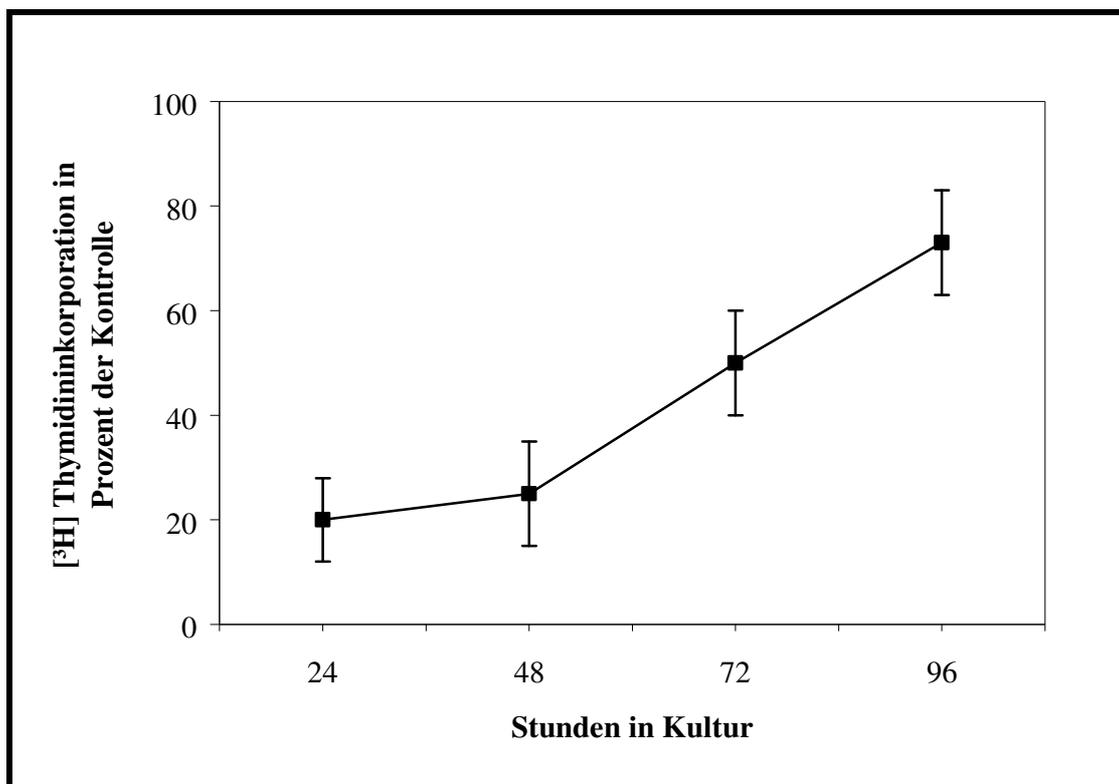


Abb. 3.6: Wirkungsdauer von AS-ODN in einer Konzentration von 0,5 μ M

50.000 cSMC wurden bei Aussaat in 10% FCS-haltigem Medium mit AS-ODN 0,5 μ M versetzt und die Entwicklung der [³H]Thymidin-Inkorporation über 96 Stunden verfolgt.

3.3. Einfluß wiederholter AS-/ S-ODN Zugabe auf die Proliferationskinetik glatter boviner Muskelzellen

Die Untersuchung der Proliferationskinetik von 50.000 cSMCs in 35mm Petrischalen zeigte, daß die Kulturen über 96 Stunden einem stetigen Wachstum unterliegen, bevor sie anschließend durch zunehmende Kontaktinhibition in eine Stagnationsphase übergehen. Zur Beurteilung der proliferationsinhibierenden Wirkung der AS-ODN waren daher nur die ersten 96 Kulturstunden geeignet.

Ziel der Experimente war es, eine möglichst hohe Proliferationsinhibition glatter, koronarer Muskelzellen durch AS-ODN zu erreichen. Dazu wurde unter Berücksichtigung der Dosis-Wirkungskurve (Abb. 3.5) ODN-Konzentrationen von 0,5 und 1,0 μM gewählt. Ferner wurde unter Kenntnis der ODN-Wirkungsdauer die Zugabe der gleichen ODN-Menge wie bei Aussaat nach jeweils 24, 48 und 72 Stunden Kultivierungszeit wiederholt, um eine uneingeschränkte ODN-Wirkung zu erhalten. Dabei musste von einer Potenzierung der ODN-Konzentration ausgegangen werden, da sich nach 24 Stunden nur eine leichte Abschwächung der Oligonukleotidwirkung einstellte (Abb. 3.6). Zur Steigerung der ODN-Aufnahmerate in die Zelle war dies sogar erwünscht, denn es wird vermutet, dass bei höheren ODN-Konzentrationen die Pinozytose als zusätzlicher Aufnahmemechanismus neben der Rezeptor-vermittelten Endozytose zum Tragen kommt (133). Die eigentliche ODN-Konzentration, die zu Versuchsende zwischen 0,5 μM und 2,0 μM bzw. zwischen 1,0 μM und 4,0 μM liegt, konnte aufgrund der dynamischen Oligonukleotidabbauprozesse in den Experimenten nicht genau ermittelt werden. Die durch viermalige ODN-Zugabe behandelten Zellkulturen wurden daher vereinfacht nach ihrem ersten ODN-Zusatz als AS 1,0-; AS 0,5-; S 1,0- und S 0,5-behandelte Kulturen bezeichnet.

Zur Beurteilung des Kulturwachstums unter ODN-Wirkung wurden nach 96 Stunden die [^3H]Thymidin-Inkorporation, die Zellzahl und das Gesamtprotein der Kulturen bestimmt. Außerdem wurde der Gehalt an bFGF als Indikator einer spezifischen Antisense-Wirkung gemessen.

Den Daten liegen 8 Experimente mit Doppelwertbestimmungen zugrunde. Um starke Streuungen aufgrund unterschiedlicher Proliferationsfreudigkeit der einzelnen

Zelllinien zu vermeiden, wurden die geprüften Parameter in Prozentwerte der Kontrolle berechnet und deren Mittelwerte mit Standardabweichungen bestimmt. Die Mittelwerte der Rohdaten sind jeweils als Säulenbeschriftung beigelegt. Proliferationsunterschiede der ODN-behandelten Kulturen wurden nach dem Zwei-Stichprobentest nach Student auf statistische Signifikanz ($p < 0.05$) geprüft. Die p -Werte wurden unter dem jeweiligen Diagramm tabellarisch aufgelistet.

Neben diesen 8 Experimenten wurde zusätzlich ein Versuch durchgeführt, in dem die Proliferationsparameter unter ODN-Wirkung jeweils nach 24, 48, 72 und 96 Stunden bestimmt wurden. Die Verlaufsbeobachtung der Proliferationsparameter dient der Anschaulichkeit und bestätigt die Ergebnisse der 8 Experimente nach 96 Stunden, sie ist aber, da $n = 1$, nicht statistisch gesichert.

3.3.1. Einfluß von AS-/ S-ODN auf die Zellzahl bei wiederholter Zugabe

Alle ODN-behandelten Kulturen, auch die mit Sense-ODN versetzt wurden, weisen einen signifikant () reduzierten Zellzuwachs im Vergleich zur Kontrollkultur auf (Abb. 3.8). Während sich in den nicht behandelten Kontroll-Kulturen die Zellzahl von 50.000 Zellen (Kulturbeginn) auf fast 500.000 Zellen erhöht, zeigt sich ein starker Effekt der AS-ODN bei wiederholter 1,0 μM -Zugabe in einer reduzierten Zunahme der Zellzahl von 50.000 auf etwa 230.000 Zellen. Auch eine 0,5 μM -Konzentration des Antisense-ODN in wiederholter Zugabe hat bei einer Zellzahl von etwa 280.000 noch eine eindeutige Hemmwirkung, die allerdings auch von dem Sense-ODN in 1,0 μM erreicht wird. Hier steigt die Zellzahl ebenfalls nur auf etwa 300.000 Zellen an ($p_{\text{AS } 0,5 - \text{S } 1,0} = 0,36$). Die Wirkungsunterschiede zwischen AS-ODN und S-ODN in den entsprechenden Konzentrationen sind signifikant (Tab. 3.1). Während auch die Wirkungsunterschiede zwischen den beiden S-ODN-Konzentrationen signifikant sind, bewirken die 1,0 μM - und 0,5 μM -AS-Konzentration untereinander keine signifikanten Zellzahlunterschiede mehr ($p = 0,19$).

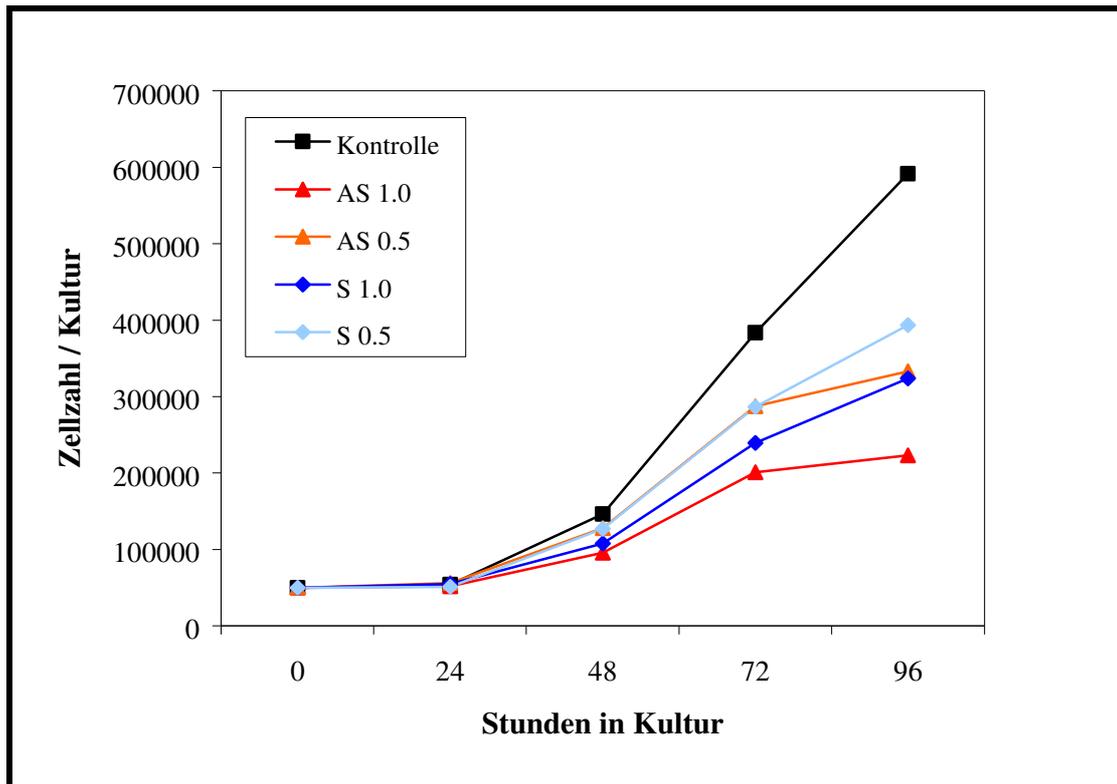


Abb. 3.7: Veränderungen der Zellzahl unter wiederholter AS-/ S-ODN-Zugabe.

50000 cSMCs wurden unter AS-/ S-ODN-Zugabe [0,5 μ M / 1,0 μ M] bei Aussaat und allen weiteren 24 Stunden über 4 Tage in Kultur belassen. Die Zellzahl der durch Trypsinisieren gewonnenen Zellen wurde nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h ermittelt (n = 1).

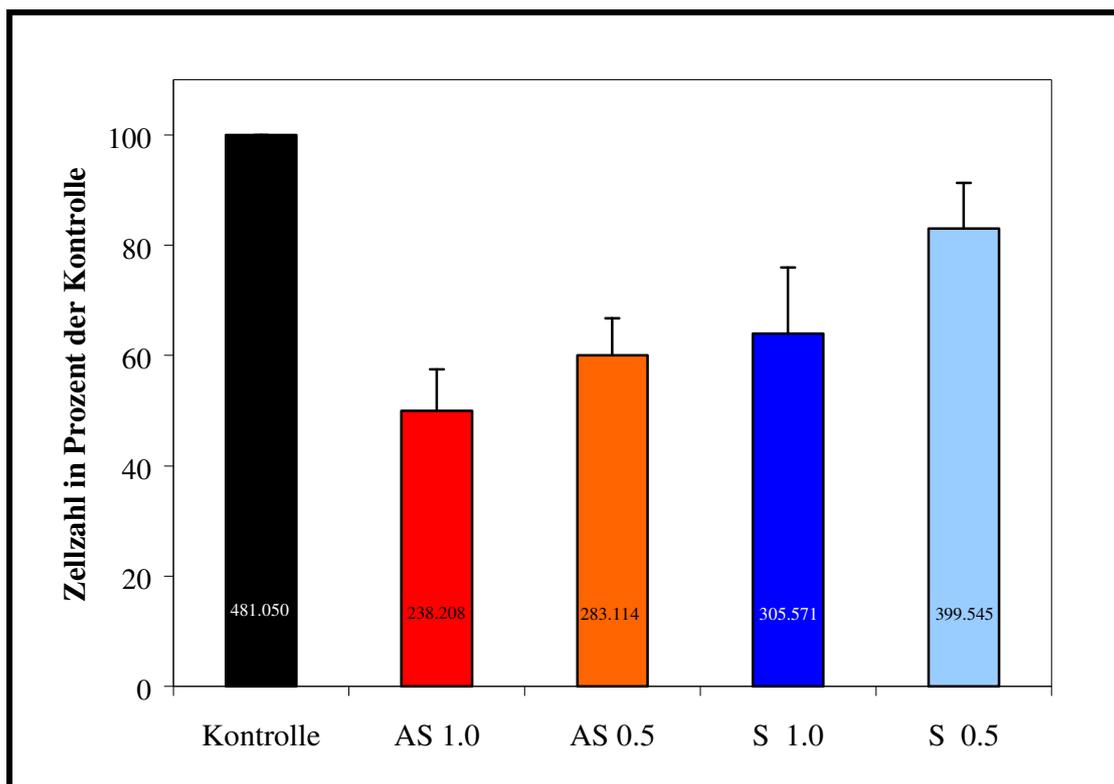


Abb. 3.8: Zellzahl nach 96 Stunden Kulturzeit unter wiederholter ODN-Zugabe (n =8).

Die Säulen stellen die Zellzahl in Prozent der Kontrolle dar, die Säulenbeschriftung gibt dabei den jeweiligen Absolutwert wieder.

Statistische Signifikanz ($p < 0.05$)				
	AS 1,0	AS 0,5	S 1,0	S 0,5
Kontrolle	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
AS 1,		0,19	< 0,05	
AS 0,5				< 0,05
S 1,0		0,36		< 0,05

Tab. 3.1: Zellzahlunterschiede der einzelnen Kulturen wurden im Zwei-Stichprobentest nach Student auf statistische Signifikanz ($p < 0.05$) geprüft.

3.3.2. Einfluß von AS-/ S-ODN auf die DNA-Synthese

Die DNA-Synthese, gemessen anhand der [³H]Thymidin-Inkorporationsrate, zeigt einen kontinuierlichen Abfall der Werte, der -allerdings im unterschiedlichen Ausmaß- nicht nur die AS-ODN, sondern auch die S-ODN betrifft. Die Werte 24 Stunden nach Beginn des Versuches zeigen eine 80%-Hemmung einer AS-Konzentration von 1,0 µM, aber auch eine Reduktion bei Einwirkung des korrespondierenden Sense-ODN um mehr als 50 % (Abb. 3.9). Auch bei Konzentrationen von 0,5 µM differieren die für Antisense- und Sense-ODN gemessenen Einbauraten nur um 10 %, obgleich auch hier die AS-ODN eine stärkere Wirkung zeigen.

Während es unter AS-ODN 1,0 µM nach 4-maliger Zugabe (nach 0 h, 24 h, 48 h und 72 h) mit einer Hemmung von 90 % zu einem fast vollständigen Erliegen des [³H]Thymidin-Einbaus in die Zell-DNA kommt, erreichen alle übrigen Substanzen (S 1,0; AS 0,5; S 0,5), die sich in ihrer Wirkung einander angenähert haben, eine Hemmung der DNA-Synthese von ca. 80 % (Abb. 3.10). Die Annäherung beruht unter anderem auf der bei zunehmender Konfluenz ohnehin geringeren DNA-Synthese. Der Einfluß sowohl der AS-ODN als auch der S-ODN auf die DNA-Synthese nach 96 Stunden ist signifikant, ebenso wie die Wirkungsunterschiede der AS- und S-ODN in den entsprechenden Konzentrationen (Tab. 3.2). Es ergeben sich jedoch keine signifikanten Wirkungsunterschiede mehr zwischen den einzelnen Konzentrationen eines Oligonukleotidtyps.

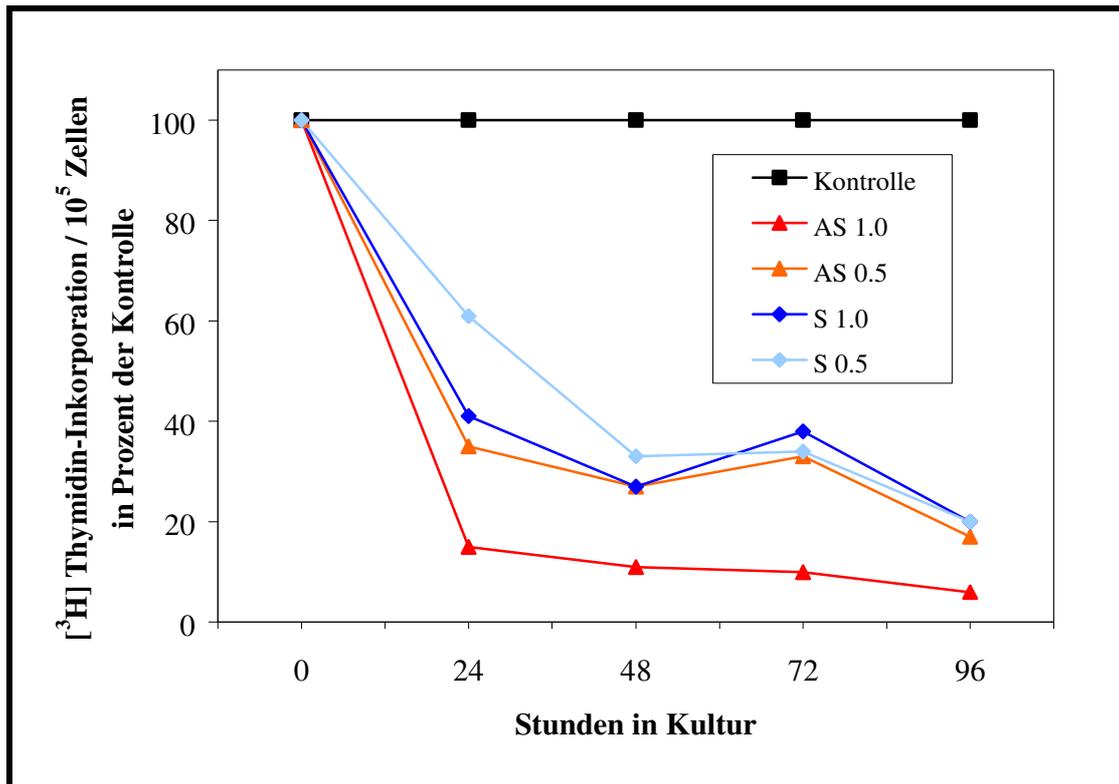


Abb. 3.9: Veränderungen der DNA-Synthese anhand der $[^3\text{H}]$ Thymidin-Einbaurate unter AS-S-ODN-Einfluß über 96 Stunden ($n = 1$).

50000 cSMCs wurden unter AS-/ S-ODN-Zugabe [$0,5 \mu\text{M}/1,0 \mu\text{M}$] bei Aussaat und allen weiteren 24 Stunden über 96 Stunden in Kultur belassen. Die DNA-Synthese wurde anhand der $[^3\text{H}]$ Thymidin-Einbaurate nach 24 h, 48 h, 72 h und 96 h gemessen. Dazu wurden die Kulturen 12 Stunden vor Versuchsstop mit $[^3\text{H}]$ Thymidin versetzt. Anschließend erfolgte die Radioaktivitätsmessung der durch Trypsinisieren gewonnenen Zellen. Die Einbaurate (cpm) ODN-behandelter Zellen wurde in % der Kontrolle angegeben.

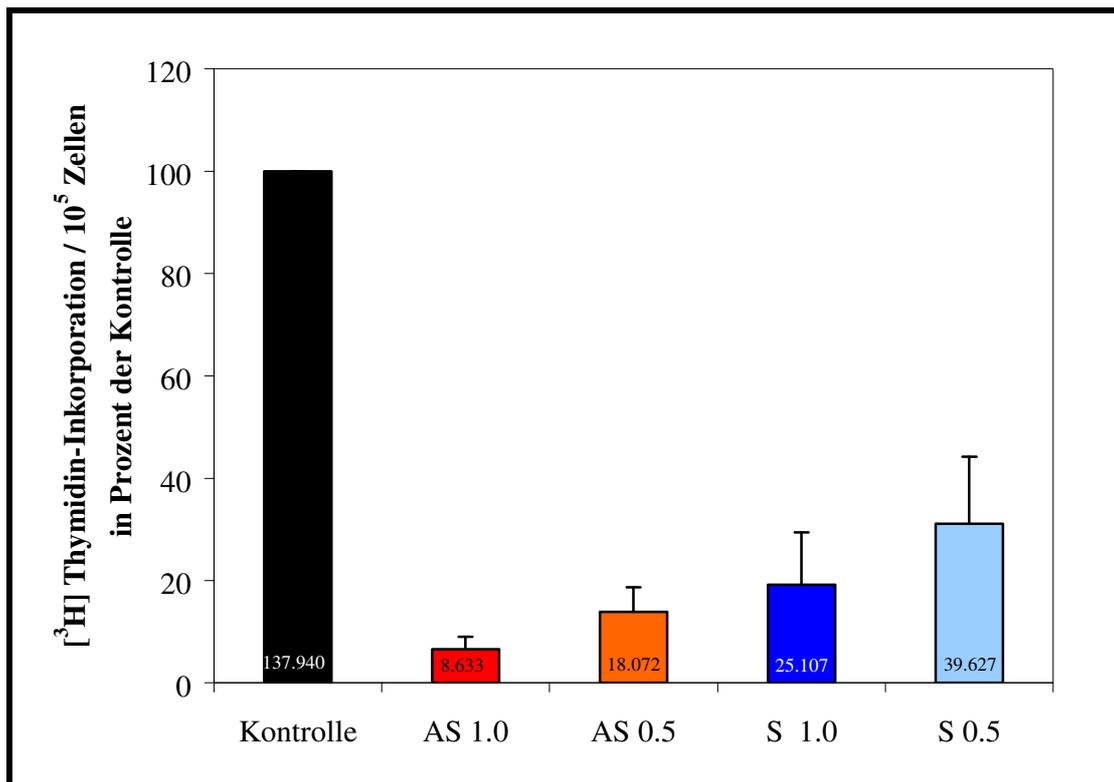


Abb. 3.10: [³H]Thymidin-Inkorporationsrate unter ODN-Einfluß nach 96 Stunden (n = 8).

Die Säulen stellen die [³H]Thymidin-Inkorporation in cpm pro 10⁵ Zellen in Prozent der Kontrolle dar, die Säulenbeschriftung gibt dabei den jeweiligen cpm-Absolutwert wieder.

Statistische Signifikanz p >0,05				
	AS 1,0	AS 0,5	S 1,0	S 0,5
Kontrolle	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
AS 1,0		0,06	< 0,05	
AS 0,5				< 0,05
S 1,0				0,07

Tab. 3.2: Unterschiede in der [³H]Thymidin-Einbaurrate der einzelnen Gruppen wurden im Zwei-Stichprobentest nach Student auf statistische Signifikanz (p < 0.05) geprüft.

3.3.3. Einfluß von AS-/ S-ODN auf den Proteingehalt bei wiederholter Zugabe

Es zeigt sich für den Proteingehalt der Einzelzelle, dass die bei Kontroll-Zellen beobachtete Proteinabnahme im Verlauf der ersten 96 Stunden in Kultur unter AS-ODN sehr viel weniger ausgeprägt ist (Abb. 3.11). Während die Kontrollwerte von 50 $\mu\text{g Protein}/10^5$ Zellen (0 h) auf einen Wert von 25 $\mu\text{g}/10^5$ Zellen nach 96 Stunden abgefallen sind, liegt der entsprechende Wert für das Antisense-ODN bei 1,0 μM Konzentration bei über 40 $\mu\text{g}/10^5$ Zellen (160 %) (Abb. 3.13). Gleichzeitig zeigt sich auch der generelle Trend, daß die Sense-ODN Antisense-ähnliche Effekte aufweisen und die 1,0 μM Konzentration des Sense-ODN häufig ähnlich starke Hemmwirkungen entfaltet wie die 0,5 μM Antisense-ODN- Konzentration (Abb. 3.11 und 3.12). Gegenüber der Kontrollkultur weisen alle ODN-behandelten Kulturen nach 96 Stunden signifikante Unterschiede des Proteingehaltes pro Zelle auf (Tab. 3.3). Auch die Wirkungsunterschiede zwischen den Konzentrationen eines Oligonucleotidtyps sind signifikant. Während zwischen AS-ODN und S-ODN in der höheren Konzentration weiterhin ein signifikanter Wirkungsunterschied besteht, liegt dieser in der niedrigen Konzentration nicht mehr vor.

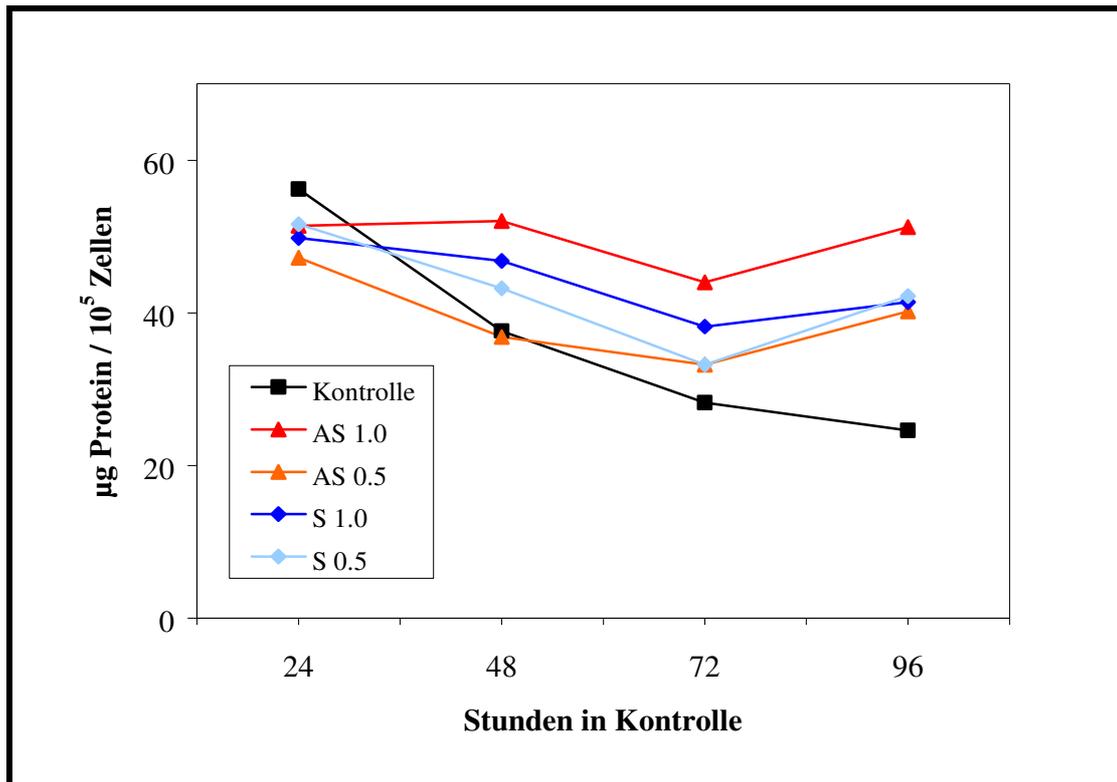


Abb. 3.11: Veränderungen des Proteingehaltes unter wiederholter AS-/ S-ODN-Zugabe über 96 Stunden (n = 1).

50000 cSMCs wurden unter AS-/ S-ODN-Zugabe [0,5 µM / 1,0 µM] bei Aussaat und alle weitere 24 Stunden über 96 Stunden in Kultur belassen. Der Proteingehalt der durch Trypsinisieren gewonnenen Zellen wurde nach Lowry zu den oben angeführten Zeitpunkten gemessen.

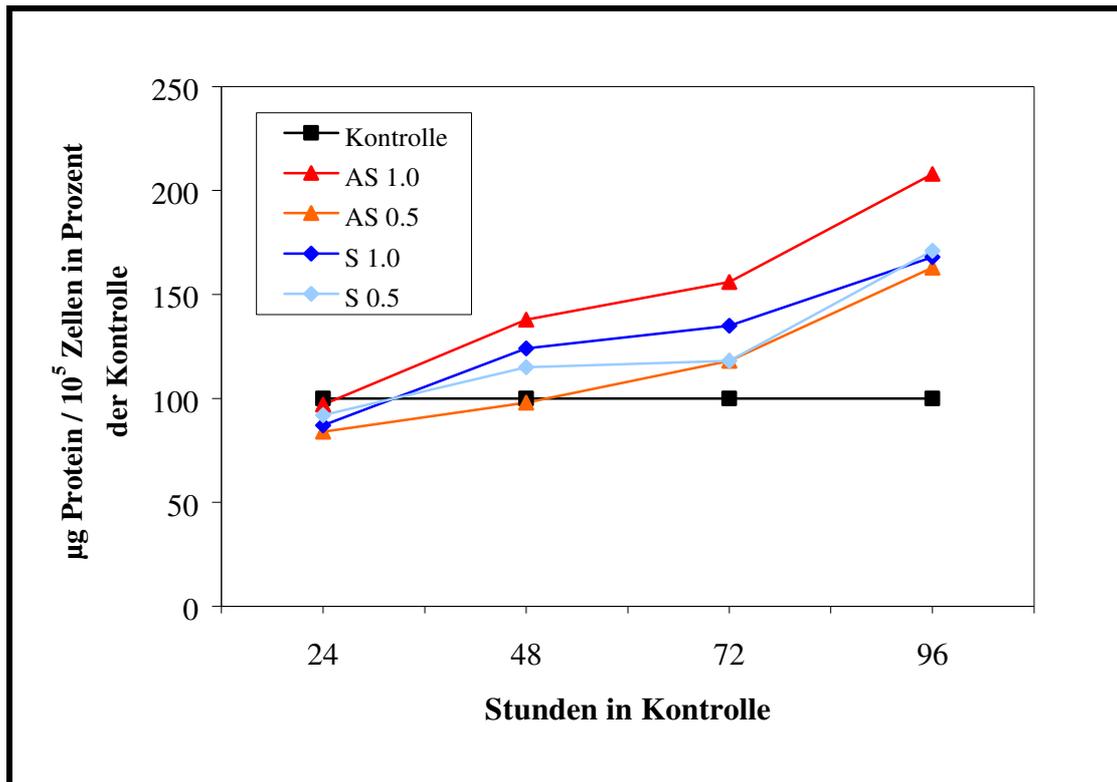


Abb. 3.12: Veränderungen des Proteingehaltes unter AS-/ S-ODN-Einfluß über 96 Stunden (n = 1).

Die Veränderungen des Proteingehaltes pro 10⁵ Zellen unter ODN-Einfluß wurden in Prozent der Kontrolle berechnet.

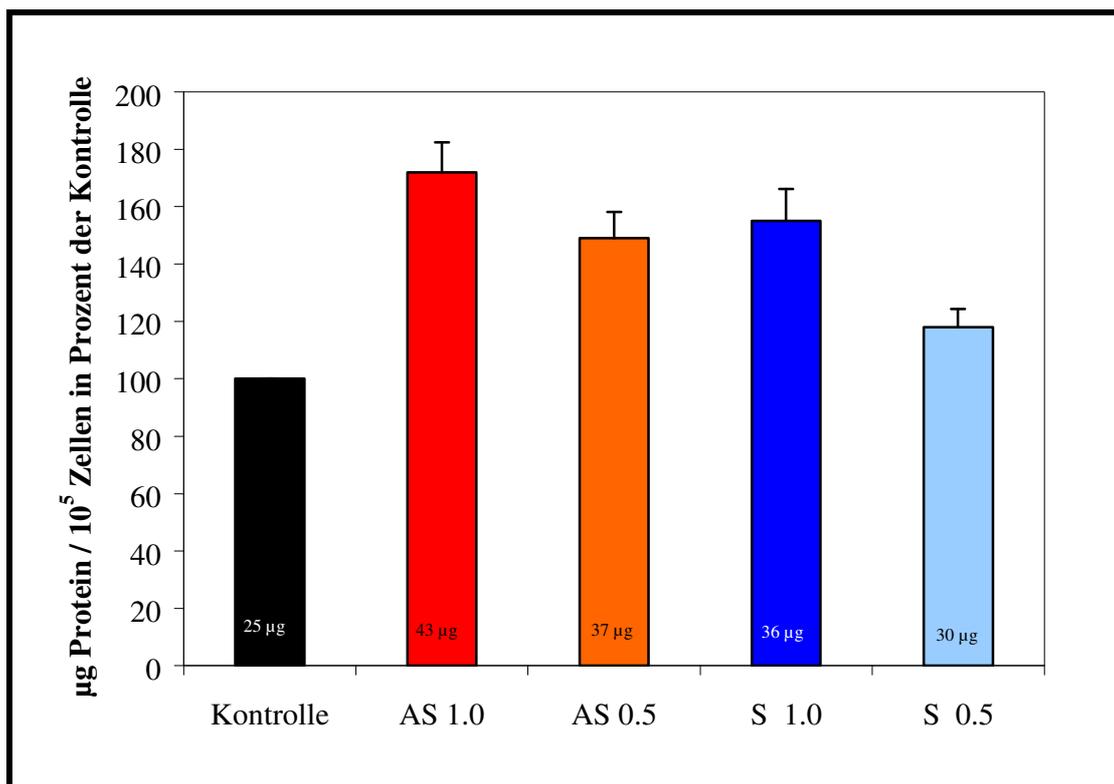


Abb. 3.13: Proteingehalt nach 96 Stunden Kulturzeit unter wiederholter ODN-Zugabe (n = 8).

Die Säulen stellen den Protein-Gehalt pro 10^5 Zellen in Prozent der Kontrolle dar, die Säulenbeschriftung gibt dabei den jeweiligen Absolutwert wieder.

Statistische Signifikanz $p < 0,05$				
	AS 1,0	AS 0,5	S 1,0	S 0,5
Kontrolle	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
AS 1,0		< 0,05	< 0,05	
AS 0,5				0,12
S 1,0				< 0,05

Tab. 3.3: Unterschiede des Proteingehaltes wurden im Zwei-Stichprobentest nach Student auf statistische Signifikanz ($p < 0,05$) geprüft.

3.3.4. Einfluß der AS-/ S-ODN auf den bFGF-Gehalt über 96 Stunden

Unter Einfluß der hier eingesetzten Phosphorothioat-ODN liegt der bFGF-Gehalt pro Zelle ab einer Kulturzeit von 24 Stunden entgegen der Erwartungen deutlich über dem bFGF-Gehalt einer unbehandelten Zelle (Abb. 3.14). Das Kurvenprofil des bFGF-Gehaltes der ODN-behandelten Zelle zeigt nach einem initialen Abfall bereits nach 24 Stunden einen kontinuierlichen bFGF-Anstieg, während sich in einer unbehandelten Zelle zunächst ein Proliferations-bedingtes bFGF-Minimum nach 72-Kulturstunden einstellt. Dieses wird somit von einer ODN-behandelten Zelle nicht durchlaufen. Ab einer Kulturzeit von 72 Stunden steigern Kontroll- als auch ODN-behandelte Zellen ihren bFGF-Gehalt im gleichen Maße. Dies äußert sich in einem parallelen Kurvenverlauf, wobei die ODN-behandelten Kulturen bzgl. ihres bFGF-Gehaltes jedoch durchgehend auf einem höheren Niveau liegen.

Nach 96 Stunden werden unter AS-ODN 1,0 μM nach wiederholter Zugabe sogar mehr als doppelt so hohe bFGF-Werte gemessen als unter Kontrollbedingungen. Die entsprechende Konzentration des Sense-ODN bewirkt ebenfalls, eine beträchtliche Anreicherung des Wachstumsfaktors auf etwa 150 % der Kontrolle.

Der ODN-Einfluß auf den bFGF-Gehalt erweist sich nach 96 h Kulturzeit, ausgenommen unter S-ODN 0,5 μM , als statistisch signifikant (Tab. 3.4). Ebenso bestand ein signifikanter Wirkungsunterschied zwischen AS- und S-ODN 1,0 μM , dieser war jedoch in der niedrigen ODN-Konzentration nicht mehr nachweisbar. Ebenso bestand kein signifikanter Wirkungsunterschied zwischen den unterschiedlichen Konzentrationen eines ODN-Typs.

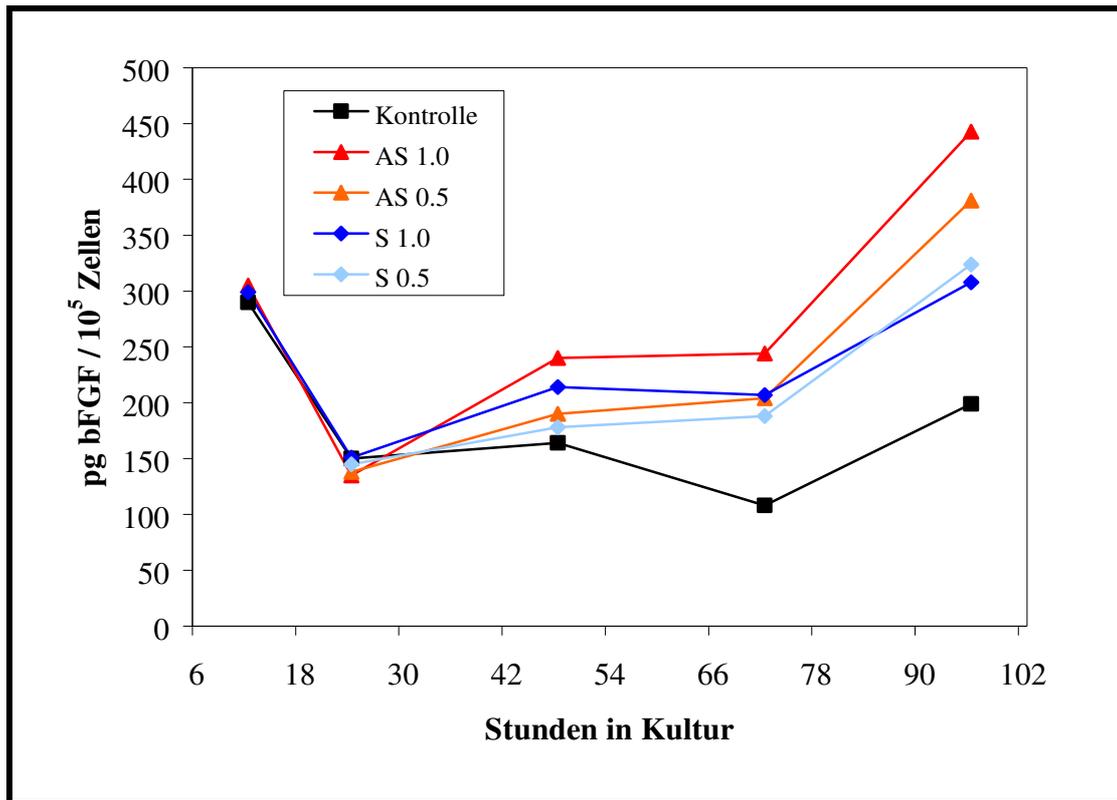


Abb. 3.14: Veränderungen des bFGF-Gehaltes / 10^5 Zellen unter AS-/ S-ODN-Einfluß über 96 Stunden (n = 1).

50000 cSMCs wurden unter AS-/ S-ODN-Zugabe [0,5 μ M/1,0 μ M] bei Aussaat und alle weitere 24 Stunden über 96 h in Kultur belassen. Der bFGF-Gehalt der durch Trypsinisieren gewonnenen Zellen wurde zu den oben genannten Zeitpunkten im ELISA bestimmt.

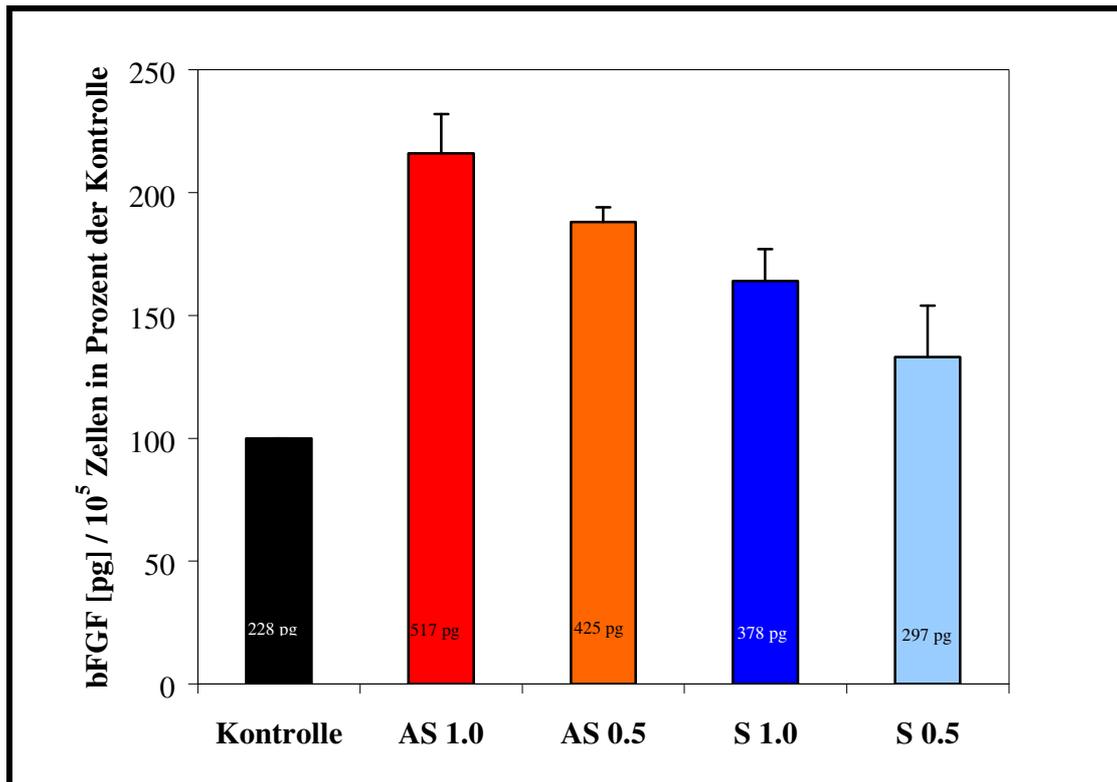


Abb. 3.15: bFGF-Gehalt [pg] / 10⁵ Zellen nach 96 Stunden Kulturzeit unter wiederholter ODN-Zugabe (n = 3).

Die Säulen stellen den bFGF-Gehalt pro 10⁵ Zellen in Prozent der Kontrolle dar, die Säulenbeschriftung gibt dabei den jeweiligen Absolutwert wieder.

Statistische Signifikanz p < 0,05				
	AS 1,0	AS 0,5	S 1,0	S 0,5
Kontrolle	< 0,05	< 0,05	< 0,05	0,16
AS 1,0		0,1	< 0,05	
AS 0,5				0,06
S 1,0				0,17

Tab. 3.4: Unterschiede des bFGF-Gehaltes/10⁵ Zellen wurden im Zwei-Stichprobentest nach Student auf statistische Signifikanz (p < 0.05) geprüft.

3.3.5. Veränderungen des bFGF-Gehaltes/ μ g Gesamtprotein unter ODN-Einfluß

Unter der proliferationsinhibierenden Wirkung bei wiederholter ODN-Zugabe kommt es neben der Zunahme des Gesamt-Proteingehaltes (Abb. 3.11, 3.12, 3.13) ebenfalls zu einer Anreicherung des bFGF. Da bFGF in der glatten Muskelzelle in großer Menge vorliegt, könnte eine spezifische AS-ODN-Wirkung sich in einer relativen bFGF-Reduktion im Vergleich zum Proteingehalt zeigen. Daher wurde zusätzlich das Verhältnis des bFGF- zum Proteingehalt betrachtet.

Nach Abb. 3.16 ergibt sich bezogen auf den Proteingehalt unter AS-ODN keine bFGF-Reduktion im Sinne einer spezifischen AS-Wirkung. Der unter ODN-Einfluß bestimmte Quotient pg bFGF/ μ g Zellprotein gleicht dem Wert unbehandelter Kontrollzellen. Unter AS-ODN-Wirkung besteht sogar die Tendenz einer Werterhöhung (Abb. 3.17), die sich statistisch jedoch nicht sichern ließ (Tab. 3.5).

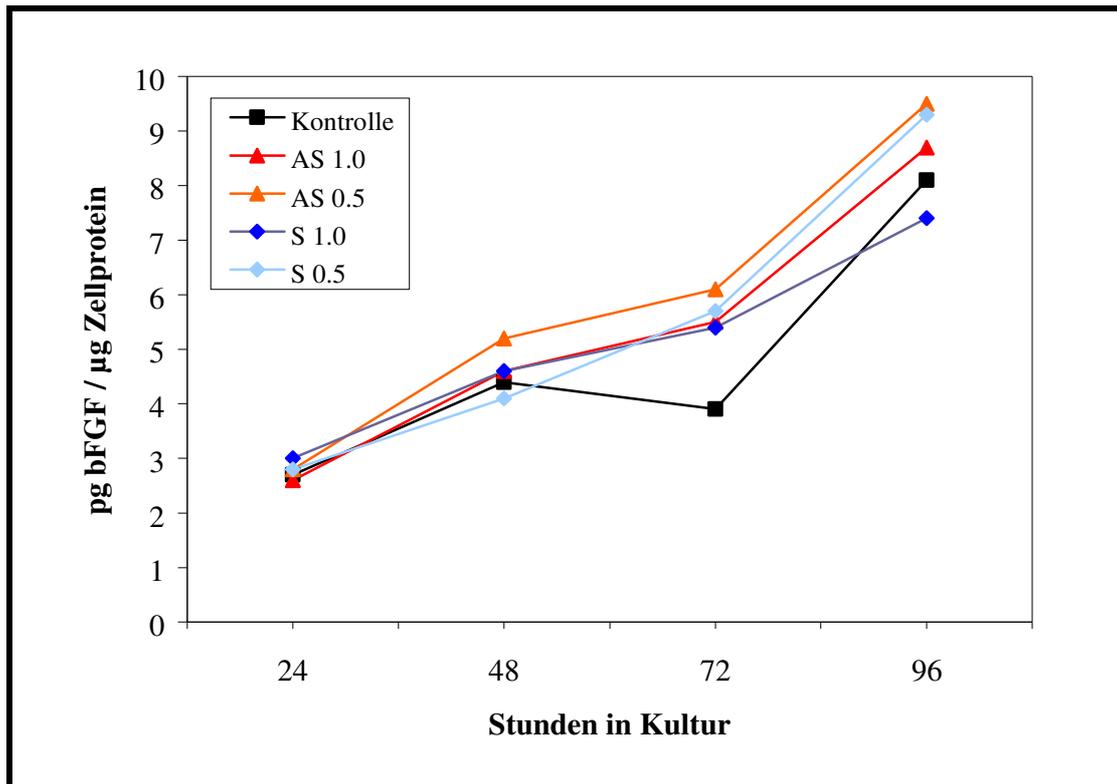


Abb. 3.16: Veränderungen des bFGF-Gehaltes bezogen auf den Proteingehalt unter ODN-Einfluß über 96 Kulturstunden (n = 1).

50000 cSMCs wurden unter AS-/ S-ODN-Zugabe [0,5 µM / 1,0 µM] bei Aussaat und allen weiteren 24 Stunden über 96 Stunden in Kultur belassen. Der bFGF-Gehalt der durch Trypsinisieren gewonnenen Zellen wurde im ELISA, und der Gesamtproteingehalt entsprechender Parallelkulturen nach Lowry alle 24 Stunden bestimmt.

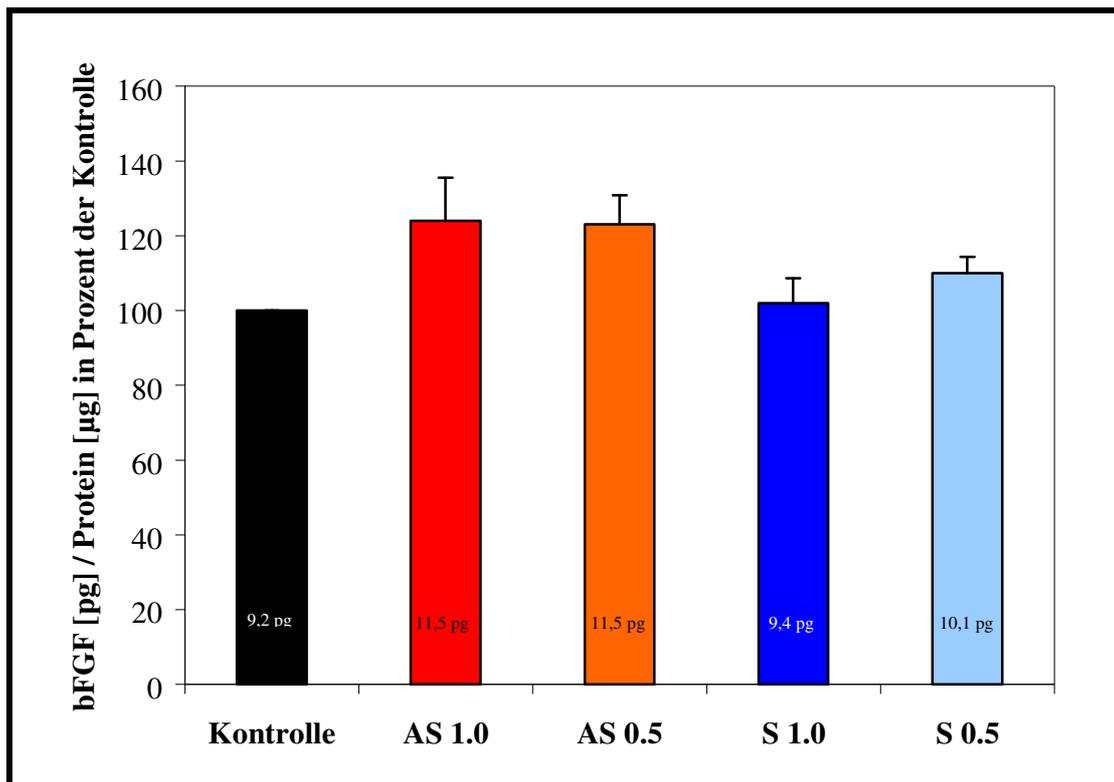


Abb. 3.17: bFGF-Gehalt bezogen auf das Gesamtprotein unter wiederholter ODN-Zugabe nach 96 Stunden Kulturzeit (n = 3).

Dargestellt ist der bFGF-Gehalt / Zellprotein in Prozent der Kontrolle, die Säulenbeschriftung gibt dabei den jeweiligen Absolutwert wieder.

Statistische Signifikanz $p < 0,05$				
	AS 1,0	AS 0,5	S 1,0	S 0,5
Kontrolle	0,01	0,05	0,76	0,08
AS 1,0		0,92	0,09	
AS 0,5				0,13
S 1,0				0,22

Tab. 3.5: Unterschiede des Quotienten bFGF-Gehalt [pg] / Gesamtprotein [µg] wurden im Zwei-Stichprobentest nach Student auf statistische Signifikanz ($p < 0.05$) geprüft.

3.3.6. bFGF-Verteilung im perizellulären und intrazellulären Kompartiment unter wiederholter ODN-Zugabe

Entgegen der Erwartung zeigt sich unter S-ODN als auch unter AS-ODN eine Zunahme des bFGF-Gehaltes pro Zelle. Ferner scheinen ODN-behandelte Kulturen das proliferations-typische bFGF-Minimum un behandelter Kulturen nach 72 Stunden nicht zu durchlaufen, sondern verzeichnen bereits nach 24 Stunden einen bFGF-Anstieg.

Es wurde daher in einem weiteren Schritt die bFGF-Kompartimentverteilung unter ODN-Einfluß untersucht. Dazu wurden das in der extrazellulären Matrix gelagerte bFGF (perizellulärer Pool) und das intrazelluläre bFGF (intrazellulärer Pool) separat bestimmt und der Verteilungsquotient (perizellulärer Pool/ intrazellulärer Pool) berechnet.

Nach 96 Stunden Kulturzeit befinden sich ca. ein Viertel des Gesamt-bFGFs in der extrazellulären Matrix und dreiviertel im Intrazellulärraum (Tab. 3.6). Die Veränderungen unter ODN-Einfluß sind nur geringfügig. Tendentiell zeigt sich während der 96 stündigen Kulturzeit unter ODN-Einfluß eine bFGF-Verlagerung in den perizellulären Pool und somit eine vermehrte bFGF-Expression an der Zelloberfläche (Tab. 3.6). Die maximale bFGF-Verschiebung in den Extrazellulärraum beträgt etwa 4 % des Gesamt-bFGFs unter AS 1,0, gefolgt in absteigender Reihenfolge unter S 1,0, AS 0,5 und S 0,5 (Abb. 3.19). Die Beobachtungen konnten jedoch statistisch nicht untermauert werden (Tab. 3.7).

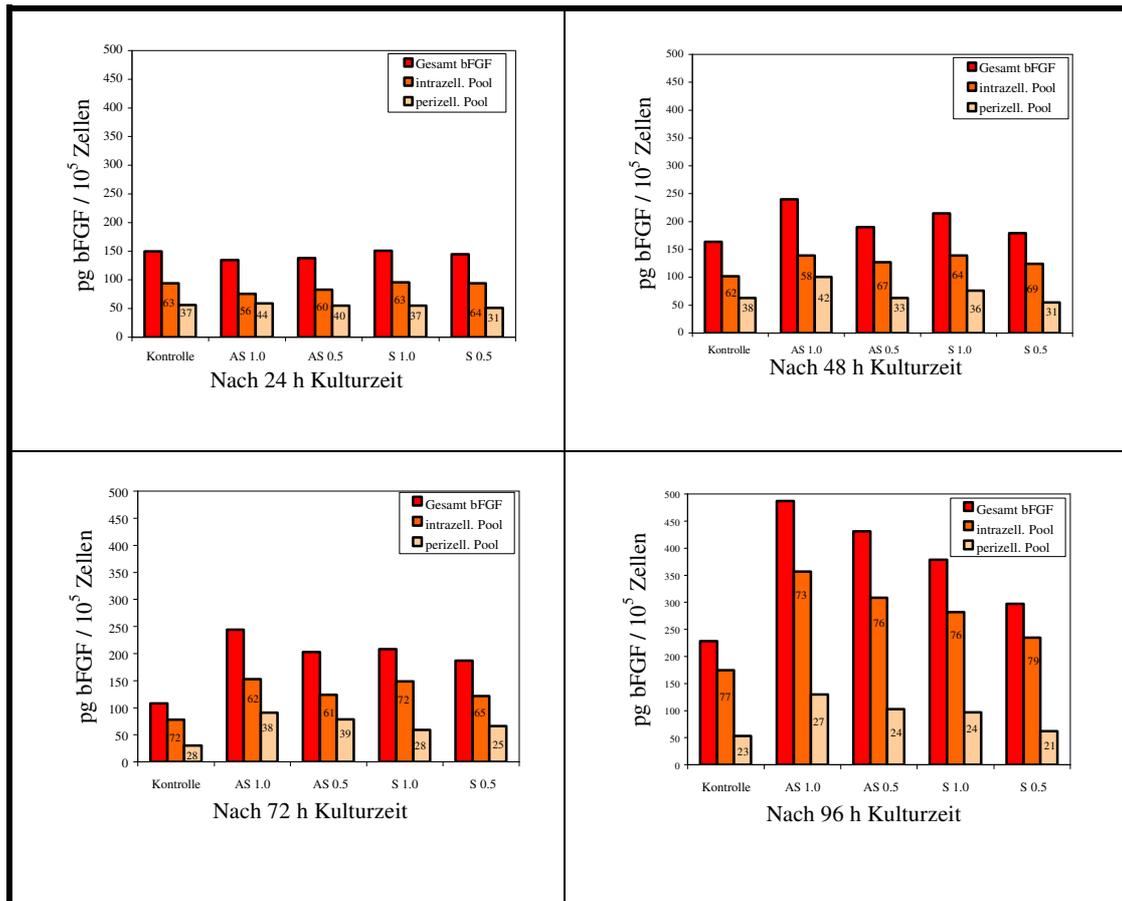


Abb. 3.18: Verhältnis von intrazellulärem und perizellulärem bFGF unter wiederholter AS-/ S-ODN-Zugabe (n = 1).

50000 cSMCs wurden unter AS-/ S-ODN-Zugabe [0,5 μ M/1,0 μ M] bei Aussaat und allen weiteren 24 Stunden über 96 h in Kultur belassen. Durch Trypsinisieren wurden die Zellen unter Verlust ihrer Glykokalix vom Kulturboden abgelöst. Der perizelluläre bFGF-Pool wurde nach schonender Zentrifugation im Überstand, der intrazelluläre bFGF-Pool im zurückbleibenden Zellpellet gewonnen. Die bFGF-Bestimmung erfolgte im ELISA.

Die Säulenbeschriftung gibt den Prozentanteil des entsprechenden bFGF-Kompartimentes am Gesamt-bFGF an.

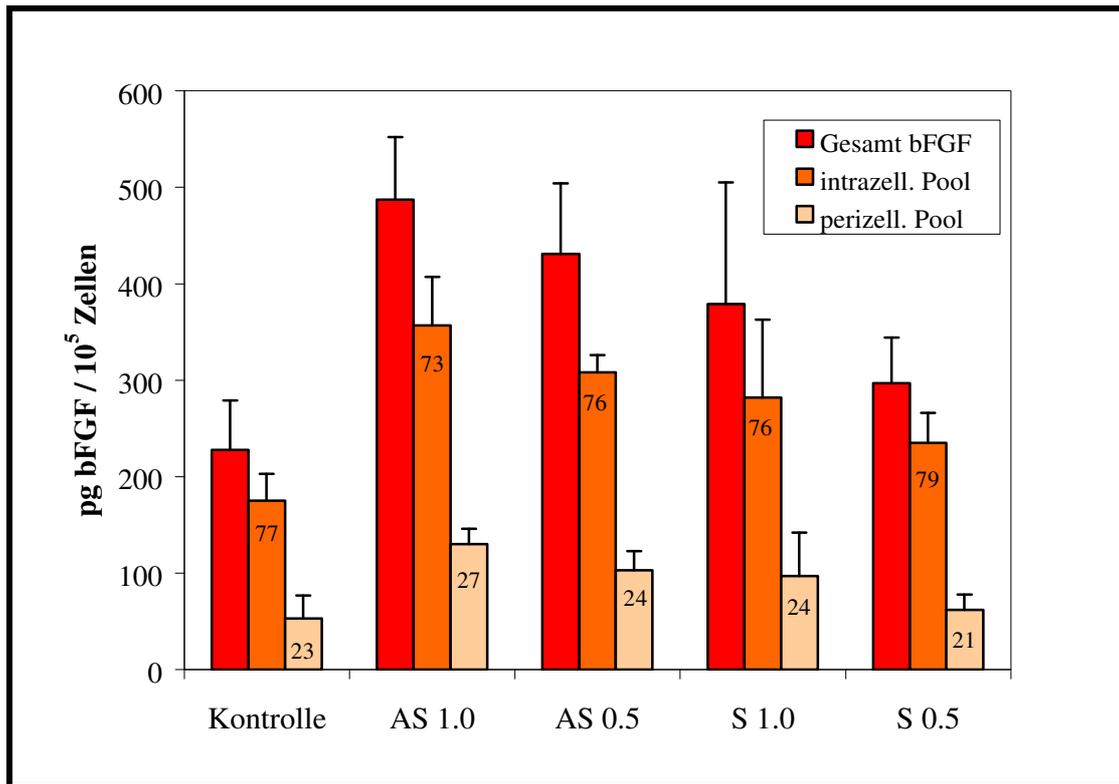


Abb. 3.19: Verhältnis von peri- und intrazellulärem bFGF-Pool unter wiederholter ODN-Zugabe nach 96 Stunden Kulturzeit (n = 3).

Die Säulenbeschriftung gibt den Prozentanteil des entsprechenden bFGF-Kompartimentes am Gesamt-bFGF an.

	Gehalt an bFGF in pg / 10 ⁵ Zellen in pg			Quotient
	Gesamt bFGF	Perizelluläres bFGF	Intrazelluläres bFGF	Perizelluläres/ Intrazelluläres bFGF
Kontrolle	228 +/- 51	53 +/- 24	175 +/- 28	23 : 77
AS 1,0	487 +/- 65	130 +/- 16	357 +/- 50	27 : 73
AS 0,5	431 +/- 72	103 +/- 20	329 +/- 55	24 : 76
S 1,0	379 +/- 126	97 +/- 44	288 +/- 77	24 : 76
S 0,5	279 +/- 47	62 +/- 17	249 +/- 70	21 : 79

Tab. 3.6: Gesamt-bFGF und seine Verteilung intra-und perizellulär unter ODN-Einfluß nach 96 Stunden (n = 3).

Statistische Signifikanz				
	AS 1,0	AS 0,5	S 1,0	S 0,5
Kontrolle	0,17	0,8	0,59	0,66
AS 1,0		< 0,05	0,20	
AS 0,5				0,29
S 1,0				0,22

Tab. 3.7: Unterschiede des Quotienten perizelluläres bFGF/ intrazelluläres bFGF unter ODN-Einfluß wurden im Zwei-Stichprobentest nach Student auf statistische Signifikanz ($p < 0.05$) geprüft.

3.3.7. bFGF-Defektproteine unter Oligonukleotideinfluß

Die Messungen des bFGF-Gehaltes (Abb. 3.15) ergaben, dass unter Einfluß des gegen bFGF gerichteten Antisense-Oligonukleotids trotz erzielter Proliferationsinhibition keine Reduktion, sondern sogar ein erhöhter Gehalt an bFGF pro Zelle zu verzeichnen war. Demnach handelt es sich um eine rein unspezifische Proliferationshemmung glatter Muskelzellen, die größtenteils auch vom Sense-Oligonukleotid geleistet wird, welches eigentlich als Kontroll-Oligonukleotid dienen und keine Proliferationshemmung bewirken sollte.

Das Antisense-Oligonukleotid ist gegen die Translationsstartregion der reifen bFGF-mRNA gerichtet. Demnach wäre es unter Umständen möglich, daß hinter dem vom Antisense blockierten mRNA-Abschnitt dennoch Translationsprozesse initiiert werden, die ein verkürztes bFGF-Protein entstehen lassen. Die bFGF-Bestimmungen erfolgten durch Antikörperdetektion im ELISA. Würden diese sogenannten „Non-Sense-Proteine“, die in der Regel keine biologische Funktion haben, dennoch vom bFGF-Antikörper im ELISA gebunden, könnten falsch zu hoch gemessene bFGF-Spiegel eine spezifische Antisense-Wirkung an der bFGF-mRNA verschleiern.

Es wurde daher ein Western Blot durchgeführt, der neben einer Antikörper-basierten Detektion des Wachstumsfaktors auch eine Proteinauftrennung anhand der Molekulargröße und somit eine Trennung der bFGF-Isoformen leistet. Die kürzeren „Non-Sense-Proteine“ würden somit als Antikörper-markierte Banden unter den klassischen 18 kD bFGF-Banden erscheinen.

Abb. 3.20 zeigt eine repräsentative Auswertung von insgesamt drei durchgeführten Western Blots. Das bFGF-Bandenmuster ODN-behandelter Kulturen zeigte dabei keine wesentlichen Unterschiede im Vergleich zu dem unbehandelter Kontrollkulturen. Es ergibt sich somit kein Hinweis dafür, dass unter Oligonukleotideinfluß Defektproteine gebildet und fälschlicherweise vom bFGF-Antikörper gebunden werden.



Abb. 3.20: bFGF-Nachweis im Western Blot.

700000 bovine Muskelzellen wurden unter wiederholter Oligonukleotidzugabe bei Aussaat und anschließend alle 24 Stunden über 96 Stunden in Kultur belassen (n = 3).

Nach Versuchsstop wurden die durch Trypsinisieren gewonnenen Zellen Frier-Tau-Schritten unterzogen, um die intrazellulären Bestandteile freizusetzen. Die Proben wurden bezüglich ihrer Proteinkonzentration einander angeglichen und elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit einem spezifischen bFGF-Antikörper. Die Detektion der Antikörper-markierten bFGF-Banden erfolgte über Farbreaktion eines sekundären Antikörpers mit alkalischer Phosphataseaktivität. Über einen mitgeführten Proteinstandard wurden die Banden einer bestimmten Molekularmasse zugeordnet. Die dargestellten Banden liegen im Bereich zwischen 15 und 20 kDa. Banden im Bereich geringerer Molekülgrößen konnten nicht detektiert werden.

Bei der deutlich hervortretenden Bande, die bei allen drei Proben gleich intensiv erscheint, handelt es sich um das intakte 18kD-bFGF.

3.3.8. Apoptose-Test

Unter Oligonukleotidwirkung zeichnet sich eine erhebliche Proliferationsinhibition glatter boviner Muskelzellen ab. Es wurde daher überprüft, ob durch die Oligonukleotidwirkung toxische Effekte vermitteln werden. In der Regel wird den Oligonukleotiden selbst eine gute Verträglichkeit zugesprochen.

In dieser Studie wird jedoch ein AS-ODN gegen einen Überlebensfaktor der glatten Muskelzelle eingesetzt. Sollte die Produktion des bFGFs dennoch unter Antisensewirkung in irgendeiner Form gestört sein, könnten möglicherweise Apoptosevorgänge durch Entzug des „survival“-Signals in Gang gesetzt werden. Die Kulturen wurden daher am Ende des 96-Stunden-Versuches auf apoptotische Zellen untersucht.

Im Frühstadium der Apoptose wird durch die bisher noch nicht im Einzelnen vollständig geklärte Aktivierung von Endonukleasen der DNA-Doppelstrang in Mono- und Oligonukleosomen gespalten, die in das Zytoplasma abgegeben werden. Während dieser zytoplasmatischen Anreicherung von Histon-assoziierten DNA-Fragmenten bleibt die Plasmamembran der sterbenden Zelle jedoch noch intakt.

Im sogenannten Cell-Death ELISA werden Histon-assoziierte DNA-Fragmente detektiert und über einen Anreicherungsfaktor (Tab. 3.8) quantifiziert. Unter wiederholter ODN-Zugabe in der jeweils höheren Konzentration ergeben sich im Vergleich zu unbehandelten Kulturen keine vermehrten Apoptoseabläufe nach 96 Stunden Kulturzeit. Eine ODN-Hemmwirkung aufgrund apoptotischer Einflüsse konnte somit ausgeschlossen werden.

Probe	Extinktionen der Proben abzüglich des Reagentien- Leerwertes	Anreicherungs- faktor
AS 1,0	0.014 +/- 0.024	0.875
S 1,0	0.013 +/- 0.027	0.813
Kontrolle	0.016 +/- 0.017	1.000

Tab. 3.8: Im Cell-Death-ELISA wurden zytoplasmatische Histon-DNA-Komplexe detektiert und photometrisch quantifiziert (n = 3).

Dargestellt sind Mittelwerte der Extinktionen ODN-behandelter und unbehandelter Kulturen abzüglich des Reagentien-Leerwertes. Mit Hilfe eines Anreicherungsfaktors, der anhand der Extinktionswerte ermittelt wird, können die behandelten Kulturen mit der Kontrolle, die gleich 1 gesetzt ist, verglichen werden.

3.3.9. Reversibilität der ODN-Wirkung

Um die Hemmeffekte der Oligonukleotide weiter zu charakterisieren, wurde überprüft, ob sich das Proliferationsverhalten boviner, glatter Muskelzellen, die 96 Stunden der Oligonukleotidwirkung ausgesetzt waren, nach ODN-Entzug wieder normalisiert.

Die ODN-supprimierten Kulturen erfahren bereits unmittelbar nach Entfernung der ODN aus dem Medium einen beträchtlichen Proliferationsschub mit einem Maximum nach 24 Stunden (Abb. 3.21). Die DNA-Synthese der Kulturen unter AS-ODN 1,0 μ M und AS-ODN 0,5 μ M wird auf 800 % bzw. 375 % gesteigert. Auch die DNA-Synthese unter S-ODN 1,0 μ M liegt immerhin bei 200 % des 96-Stunden-Wertes. In den S-ODN 0,5 μ M-Kulturen führt der ODN-Entzug zu einer Aufrechterhaltung der bestehenden DNA-Synthese, während unbehandelte Kontrollkulturen infolge zunehmender Konfluenz ihre ohnehin abnehmende DNA-Synthese weiterhin um 25 % drosseln.

Bereits 48 Stunden nach ODN-Entzug kommt es zu einem ebenso rasanten Abfall der DNA-Synthese, mit dem Resultat, dass sich alle ODN-behandelten Kulturen der Kontrolle angleichen.

Der Proteingehalt pro Zelle zeigt bei allen ODN-behandelten Kulturen unter Proliferationssteigerung nach ODN-Entzug eine Abnahme um etwa 40 % mit der Tendenz, sich der Kontrollkultur mit etwa 13 μg pro 10^5 Zellen anzugleichen (Abb. 3.21). Die AS 1,0- Kulturen verzeichnen dabei den höchsten Ausgangswert (34 $\mu\text{g} / 10^5$ Zellen) mit Abstand zu den übrigen ODN-behandelten Kulturen (AS 0,5: 26 $\mu\text{g}/10^5$ Zellen, S 1,0: 24 $\mu\text{g}/10^5$ Zellen, S 0,5: 21,4 $\mu\text{g}/10^5$ Zellen).

Da sich der Proteingehalt mit einem etwa 48-stündigen Verzug zur DNA-Synthese entwickelt, wird der Kontrollwert innerhalb der 96 Stunden nach ODN-Entzug noch nicht vollständig erreicht.

Die Zellzahl (hier nicht dargestellt) erhöht sich ebenfalls zögerlich. 96 Stunden nach ODN-Entzug sind Steigerungen von 2-15 % in den ODN-behandelten Kulturen zu verzeichnen. Dabei werden in den AS 1,0-Kulturen 46 %, in den AS 0,5-Kulturen 65 %, in den S 1,0-Kulturen 80 % und in den S 0,5-Kulturen 88 % der Kontrolle erreicht.

Die Verläufe sprechen insgesamt für eine Reversibilität der Oligonukleotid-hemmwirkung.

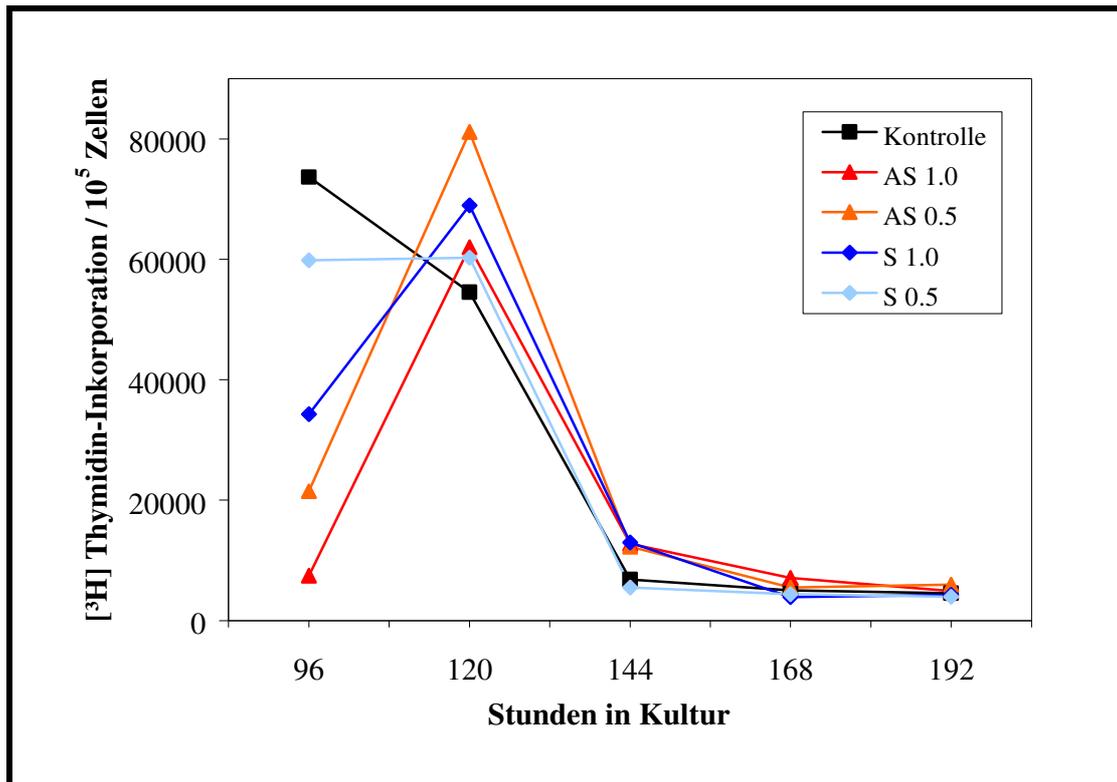


Abb. 3.21: DNA-Synthese anhand der [³H]Thymidin-Einbaurate über nach ODN-Entzug.

50000 cSMCs wurden unter AS-/ S-ODN-Zugabe [0,5 µM/1,0 µM] bei Aussaat und anschließend alle 24 Stunden zunächst über 96 in Kultur belassen. Nach 96 Stunden wurde das ODN-haltige Medium entfernt und die Kulturen durch mehrfache Zellwaschungen gereinigt. Das Proliferationsverhalten nach ODN-Entzug über weitere 96 Stunden anhand der [³H]Thymidin-Einbaurate ist hier dargestellt. Dazu wurden die Kulturen 12 Stunden vor Versuchsstop mit [³H]Thymidin versetzt und einer Radioaktivitätsmessung zugeführt.

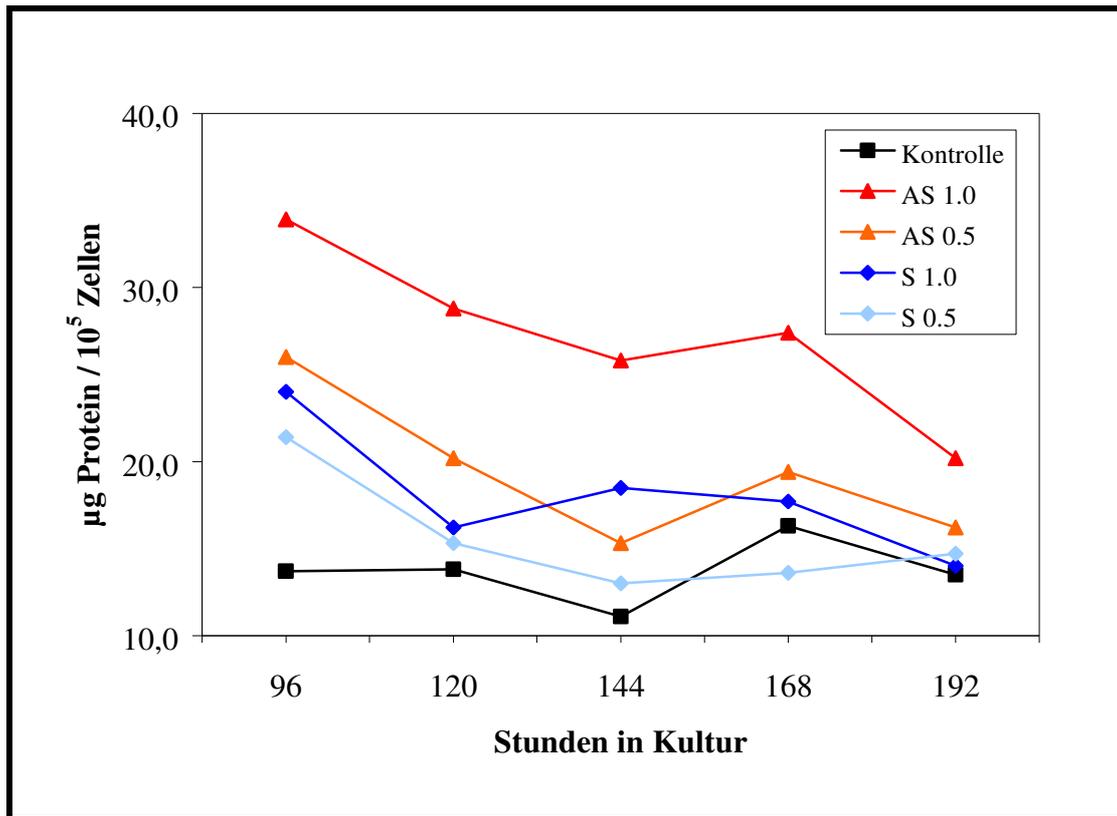
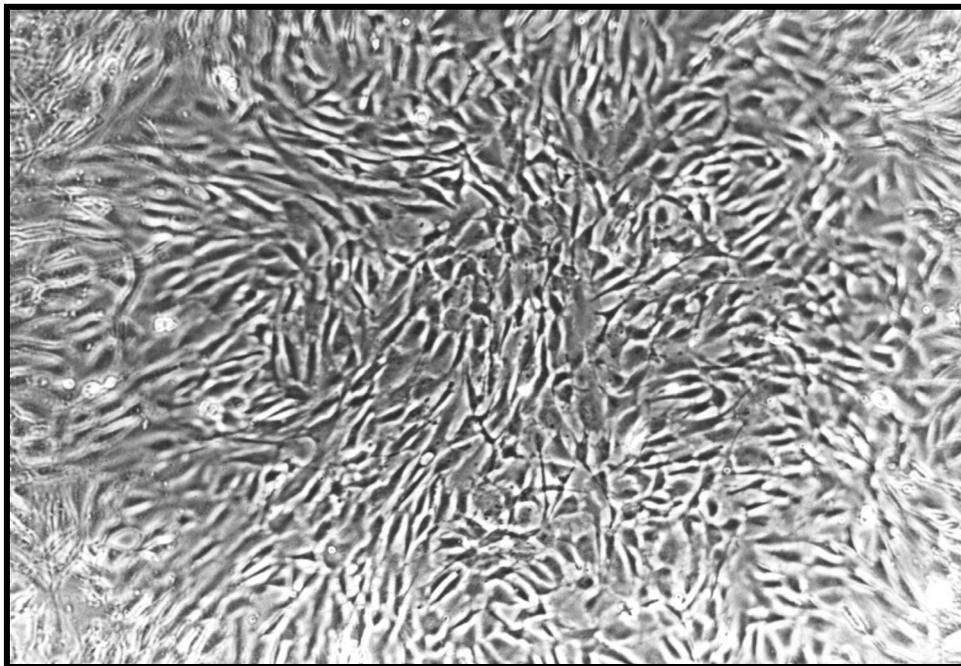


Abb. 3.22: Veränderungen des Proteingehaltes in μg pro 10^5 Zellen nach ODN-Entzug ($n = 1$)

50000 cSMCs wurden unter AS- / S-ODN-Zugabe [$0,5 \mu\text{M}$ / $1,0 \mu\text{M}$] bei Aussaat und anschließend alle 24 Stunden über 96 Stunden in Kultur belassen. Nach 96 Stunden wurde das ODN-haltige Medium entfernt und die Kultur durch mehrfache Zellwaschung gereinigt. Die Zellen wurden anschließend über weitere 4 Tage in Kultur belassen und der Proteingehalt und die Zellzahl zu oben angeführten Zeitpunkten bestimmt.

3.3.10. Zellmorphologie unter wiederholter AS-/ S-ODN-Zugabe über 96 Stunden

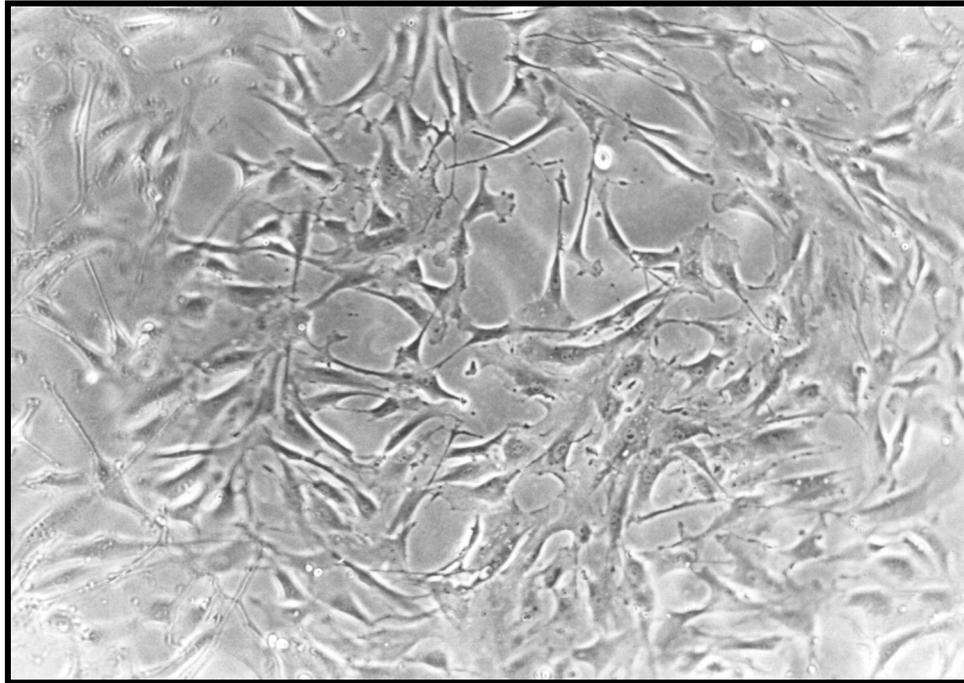
In der mikroskopischen Kontrolle zeigt sich unter Oligonukleotidwirkung im Vergleich zu unbehandelten Kontrollkulturen eine verminderte Zellzahl sowie eine deutliche Zunahme des Zellvolumens, die einen Übergang der Zellen in einen hypertrophischen Wachstumsstatus nahe legen. Zellablösungen vom Kulturboden, die auf toxische Einflüsse oder ungünstige Kulturbedingungen hinweisen könnten, wurden nicht beobachtet.



1 cm = 25 μ m

Abb. 3.23: Fotografie einer Kontrollkultur nach 96 Stunden (Vergrößerung 1:400)

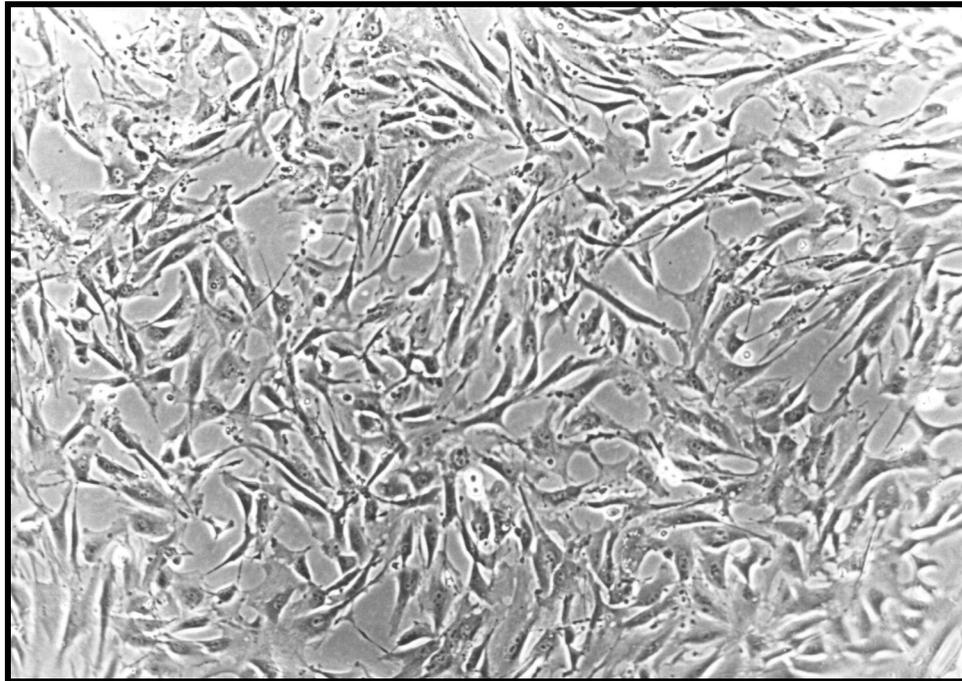
50.000 bovine Muskelzellen wurden nach Aussaat 96 Stunden in Kultur belassen und zeigten unter serumreichem Medium gute Proliferationsaktivität. Als Zeichen der Konfluenz gilt die zunehmende Ausbildung von Zellwirbel und -straßen, am deutlichsten zu sehen oben links im Bild.



1 cm = 25 μm

Abb. 3.24: Fotografie einer Antisense Kultur nach 96 Stunden (Vergrößerung 1:400)

50000 bovine Muskelzellen wurden unter AS-ODN-Zugabe in 1,0 μM -Konzentration zum Zeitpunkt Null, nach 24 h, 48 h und 72 h über 96 Stunden in Kultur belassen. Zum Versuchsende ist die Kultur aufgrund der ODN-bedingten Proliferationsinhibition weiterhin subkonfluent. Das Zellvolumen hat erheblich zugenommen, und die Zellen wirken im Vergleich zur Kontrollkultur insgesamt rundlicher.



1 cm = 25 μ m

Abb. 3.25: Photographie einer Sense Kultur nach 96 Stunden (Vergrößerung 1:400)

50000 bovine Muskelzellen wurden unter S-ODN-Zugabe in 1,0 μ M-Konzentration zum Zeitpunkt Null, nach 24 h, 48 h und 72 h über 96 Stunden in Kultur belassen. Die Kultur ist bei Versuchsende ebenfalls subkonfluent. Das Zellvolumen hat zugenommen, und die Zellen wirken auch hier im Vergleich zur Kontrollkultur rundlicher.

Insgesamt sind die Veränderungen der Zellmorphologie unter AS- deutlicher, als unter S-ODN.

3.4. Zusammenfassung der Ergebnisse

3.4.1. Proliferationsinhibition

Unter wiederholter AS-ODN-Zugabe über 4 Tage kann eine deutliche Proliferationsinhibition glatter, koronarer Muskelzellen erzielt werden. Bei fast vollständig supprimierter DNA-Synthese nach 96 Stunden steigt die Zellzahl insgesamt nur auf 50 % (AS 1,0) bzw. 60 % (AS 0,5) der Kontrollkultur an. Die Differenzen sind statistisch signifikant ()

3.4.2. Reversibilität der ODN-Wirkung

Trotz Potenzierung der ODN-Konzentration infolge wiederholter, 24-stündlicher Zugaben zeigen sich keine zytotoxischen Effekte der Oligonukleotide. Ihre Wirkung ist reversibel.

3.4.3. Proliferationsinhibition als unspezifische AS-ODN-Wirkung

Die Proliferationsinhibition beruht nicht auf einer spezifischen Wirkung der gegen den basischen Wachstumsfaktor gerichteten AS-ODN. Unter gehemmter Zellproliferation ist unter der AS-ODN-Wirkung neben einem höheren Proteingehalt auch ein erhöhter bFGF-Gehalt pro Zelle zu verzeichnen.

3.4.4. Antisense-ähnliche Effekte der S-ODN

In hohen Konzentrationen zeigen auch S-ODN eine proliferationshemmende Wirkung. Nach 96 Stunden ist die Zellzahl bei 70-80 % Suppression der DNA-Synthese nur auf 60 % (S 1,0) bzw. 80 % (S 0,5) der Kontrolle angestiegen. Somit verhalten sich AS-ODN der Konzentration 0,5 μM und S-ODN in 1,0 μM -Konzentration nach wiederholter Zugabe nahezu identisch. Dieser Effekt ist unter Berücksichtigung der unspezifischen ODN-Wirkung durchaus erklärbar.

3.4.5. Zellhypertrophie unter ODN-Wirkung

Unter wiederholter ODN-Zugabe geht die glatte Muskelzellen in den Status der Hypertrophie über, der durch eine Vergrößerung der Einzelzelle mit Zunahme des Proteingehaltes charakterisiert ist.

Unter ODN-Einfluß steigt der Proteingehalt pro Zelle nach 96 Stunden auf 120 % (S 0,5) bis 170 % (AS 1,0) unbehandelter Kulturen an. Der bFGF-Gehalt pro Zelle verhält sich nahezu konform. Bei der im Hypertrophiestatus erfolgenden Zunahme des Proteingehaltes ist also die Synthese von bFGF nicht überproportional steigend.

Die Vergrößerung der glatten Muskelzellen unter ODN-Wirkung konnte anhand einer mikroskopischen Fotoserie dokumentiert werden.

4. Diskussion

4.1. Wirkung der AS-/ S-ODN auf glatte bovine Muskelzellen in dieser Studie

Die vorgelegten Ergebnisse beschreiben die Wirkung von AS-ODN gegen das Translationsinitiationscodon der bFGF-mRNA sowie die Wirkung des Kontrolloligonukleotids mit der korrespondierende Sense-Sequenz auf kultivierte glatte Muskelzellen. Als Parameter für die AS-ODN- beziehungsweise S-ODN-Wirkung wurden die Zellzahl, die [³H]Thymidin-Inkorporation in die DNA, die Proteinmenge und der intra- und extrazelluläre bFGF-Gehalt gemessen.

Nach Zugabe von AS-ODN konnte dosisabhängig eine deutliche Proliferationsinhibition der glatten Muskelzellen nachgewiesen werden. Während sich die Zellzahl in unbehandelten Kulturen unter Serumstimulation innerhalb von 96 Stunden fast verzehnfachte, stieg die Anzahl an AS-ODN-exponierten Zellen auf das fünf- bis sechsfache (AS 0,5 µM) und in der höheren Konzentration (AS 1,0 µM) nur auf das vier bis fünffache der Ausgangszahl an (Abb. 3.7). Dies entspricht einer prozentualen Hemmung von 41 % (AS 0,5 µM) und 50 % (AS 1,0 µM) (Abb. 3.8). Die DNA-Syntheserate wurde unter wiederholter AS-Zugabe in 96 Stunden um 85 % (AS 0,5 µM) und 94 % (AS 1,0 µM) inhibiert (Abb. 3.9, Abb. 3.10).

Auch das zur Spezifitätskontrolle eingesetzte S-ODN verursachte eine Inhibition der Zellteilung von 17 % (0,5 µM) bzw. 36 % (1,0 µM) (Abb. 3.9) und der DNA-Synthese von 70 % (S 0,5 µM) und 83 % (S 1,0 µM) der Kontrollzellen (100 %) (Abb. 3.10) nach 96-stündiger Einwirkung. Der S-ODN-Hemmeffekt kann dennoch nicht auf einer Translationsinhibition der bFGF-mRNA beruhen.

Der bFGF-Gehalt pro Zelle stieg unter Wirkung beider Oligonukleotide konzentrationsabhängig (1,0 µM > 0,5 µM) signifikant an, und zwar in den AS-ODN-behandelten Zellen stärker als in den S-ODN-behandelten Zellen (Abb. 3.17 und 3.18). Da der Proteingehalt der Zelle unter AS- und S-ODN einen vergleichbar starken Anstieg erfuhr (Abb. 3.12), unterschied sich der bFGF-Gehalt/µg Zellprotein in den ODN-behandelten Kulturen nicht signifikant von dem unbehandelter Kulturen (Abb. 3.19).

4.2. Wirkung sequenzidentischer Antisense- und Senseoligo-desoxynukleotide auf glatte Muskel- und Endothelzellen in vergleichbaren Studien

Die hier vorgelegten Daten stehen nicht im Einklang mit Ergebnissen von Voruntersuchern, die AS-ODN der gleichen Sequenz gegen die bFGF-mRNA in Ratten Aorten (Li et al. (197) und Itoh et al. (99)) in bovinen, koronaren glatten Muskelzellen (Schmidt et al. (198)) und bovinen Endothelzellen (Itoh et al. (199)) eingesetzt haben.

Li et al. (197) exponierten Angiotensin II-stimulierte glatte Muskelzellen einer AS-Konzentration von 5 μ M über 6 Stunden und erhielten nach weiteren 14 Stunden Kulturzeit eine 42 %-ige Hemmung der DNA-Synthese und eine 22%-ige Reduktion der Zellzahl. Das Sense-Molekül zeigte dabei keine signifikanten Effekte. Die Oligonukleotide wurden den Zellkulturen als Lipofektinkomplex zugeführt, um ihre Aufnahme in die Zellen zu verbessern. Die Ergebnisse der Arbeit wurden im Sinne einer spezifischen Antisense-Hemmung interpretiert, da im Vergleich zu unbehandelten Zellen eine Abnahme der bFGF-mRNA (RNase H-Effekt) nachgewiesen werden konnte. Der bFGF-Protein- Gehalt selbst wurde nicht untersucht.

Itoh et al. (199) verwendeten ein unmodifiziertes Antisense-Molekül gleicher Sequenz sowie das entsprechende Reverse als Kontroll-ODN in Kulturen boviner Endothelzellen. Nach Itoh (199) und Schmidt et al. (77) produzieren bovine Endothelzellen und bovine vaskuläre glatte Muskelzellen die gleiche Menge an bFGF, ca. 7-8 ng/mg Zellprotein, so dass ein Vergleich der Studien im Hinblick auf die Inhibition der bFGF-Produktion trotz Verwendung unterschiedlicher Zelltypen zu vertreten ist. Beide Oligonukleotide wurden bovinen Endothelzellen durch einmalige Zugabe in einer Konzentration von 4 μ M über eine Kulturzeit von 20 Stunden zugeführt. Auch hier lagen die Oligonukleotide in einem Lipofektinkomplex vor. Itoh et al. (199) erzielten unter der AS-ODN-Wirkung eine Reduktion der DNA-Synthese um 60 % sowie eine Reduktion des bFGF-Gehaltes um 40 %. Die Effekte des Kontrolloligonukleotids waren hingegen nicht signifikant.

Ähnliche Ergebnisse lagen unter AS-ODN auch in Angiotensin II-stimulierten Ratten-SMCs vor (99). Dabei führten das AS-ODN im Lipofektin-Komplex zu einer

signifikanten Senkung der [³H]Thymidin-Inkorporationsrate und des bFGF-Gehaltes, das Kontroll-Oligonukleotid (Reverse) dagegen lieferte keine nennenswerten inhibitorischen Effekte.

Während in den oben genannten Studien unmodifizierte Oligonukleotide eingesetzt wurden, untersuchten Schmidt et al. (198) die Wirkung des gleich sequenzierten AS-ODNs erstmals als partielles Phosphorothioat, in dem 8 Phosphodiesterbindungen durch Phosphorothioatbrücken ersetzt worden waren. Sie verwendeten somit das identische Antisense- und Sense-Molekül wie in der vorgelegten Studie.

Ohne Einsatz kationischer Carrier-Molekülen konnte unter diesem AS-ODN in bovinen glatten Muskelzellen konzentrationsabhängig (0,1-1,0 µM) eine Reduktion der [³H]Thymidininkorporationsrate von 20-80% und eine Reduktion der Zellzahl erzielt werden. Der bFGF-Protein-Gehalt sank parallel auf von 50% des bFGF-Gehaltes unbehandelter Kontrollzellen. Eine Wiederholung der ODN-Zugabe innerhalb von 24 h potenzierte die Hemmwirkung. Das Kontrolloligonukleotid zeigte leichte Hemmeffekte, die zumindest bis zu einer Konzentration von 0,5 µM nicht signifikant waren. In der Studie wurde anhand einer reduzierten [³H]-Leucin-Inkorporationsrate ferner gezeigt, dass die Reduktion des bFGF-Gehaltes auf einer Inhibition der bFGF-Neusynthese beruht.

Die Autoren wiesen somit sowohl unter dem sequenzidentischen, unmodifizierten Antisense-Molekül als auch unter dem entsprechenden Teilphosphorothioat eine Proliferationsinhibition glatter Muskel- und Endothelzellen bei reduzierter bFGF-Synthese nach.

Ferner blieb die Wirkung der Kontrolloligonukleotids, ob Sense oder Reverse, ohne signifikanten Einfluß auf den bFGF-Gehalt und auf die Proliferationsaktivität. Die Autoren nahmen daher eine spezifische Antisense-Wirkung an.

In dieser Studie jedoch konnte bei deutlich reduzierter Proliferationsaktivität boviner glatter Muskelzellen unter AS-ODN-Einfluß keine Senkung des bFGF-Gehaltes verzeichnet werden. Ferner wies auch das Kontrolloligonukleotid eine deutliche proliferationshemmende Wirkung auf. Für diese grundlegenden Ergebnisunterschiede im Vergleich zu den oben genannten Studien ergeben sich folgende mögliche Ursachen.

4.3. Mögliche Ursachen für die Oligonukleotidwirkung dieser Studie

4.3.1. Proliferationsinhibition durch unspezifische Hemmwirkung der Oligonukleotide

- 4.3.1.1. Polyanioncharakter der Oligonukleotide
- 4.3.1.2. Antiproliferative Wirkung einer Sequenzmotiv bedingten Sekundärstruktur
- 4.3.1.3. Zytotoxizität

4.3.2. Ausbleibende bFGF-Reduktion durch fehlende Spezifität des Antisense-Oligonukleotids

- 4.3.2.1. Unzureichende Aufnahme in die Zelle
- 4.3.2.2. Unzureichende ODN-Konzentration
- 4.3.2.3. Speziesspezifische Variationen der bFGF-mRNA-Sequenz als Ursache einer unzureichenden Hybridisierungsaffinität des AS-ODN mit der Ziel-mRNA
- 4.3.2.4. Phänotypvariationen und speziesabhängige Heterogenität der glatten Muskelzelle
- 4.3.2.5. Herstellungsbedingte Inkonsistenz der Oligonukleotide

4.3.1. Proliferationsinhibition durch unspezifische Hemmwirkung der Oligonukleotide

4.3.1.1. Einfluß des Polyanioncharakters

Die Tatsache, dass auch Kontroll-Oligodesoxynukleotide (Kontroll-ODN) eine proliferationshemmende Wirkung aufweisen und somit eine ausschließlich sequenzspezifische Aktivität der Antisense-Moleküle in Frage stellen, ist ein zentrales und weit verbreitetes Problem zahlreicher Antisense-Experimente (160). Während Villa (200), Ettore (137) und Lövdahl et al. (201) unspezifische Hemmeffekte in ihren Experimenten mit Phosphorothioat-Oligodesoxynukleotiden (PS-ODN) feststellten, fanden auch Pickering et al. (202) bei Teilphosphorothioaten (PPS-ODN) und Gunn et al. (203) bei gänzlich unmodifizierten Molekülen (PD-ODN) deutliche Effekte der Kontroll-ODN. Native nicht-modifizierte Kontroll-ODN können ebenfalls eine über 50%-ige Zellzahlreduktion und eine deutliche Senkung der DNA-Syntheserate (203) bewirken. Die Modifikation allein kann somit nicht für alle unspezifischen Effekte verantwortlich gemacht werden. Es wird vermutet, dass beispielsweise Oligonukleotidspaltprodukte mit der Fähigkeit, RNase H zu aktivieren, unspezifische Wirkungen (203) verursachen. Auch werden Effekte der Oligonukleotide durch Bindungen an Zellproteine postuliert (145) (204). Guvakova et al. (147) entdeckten eine besondere Form der Proteininteraktion, die Fähigkeit von Phosphodiestern, Teilphosphorothioaten und besonders von Vollphosphorothioaten, an Heparinbindende Wachstumsfaktoren und ihre Rezeptoren zu binden, wodurch die Faktor-Rezeptorinteraktion gestört wird. Bergan et al. (205) wiesen unter ODN-Bindung eine deutlich niedrigere Phosphorylierungsrate von Rezeptor und nachfolgenden Proteinen der Signaltransduktionskaskade verschiedener Wachstumsfaktoren nach.

Oligonukleotide behindern somit die Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren und können bereits über diesen Mechanismus eine Proliferationsinhibition auslösen. Nachgewiesen wurde die ODN-Bindungsfähigkeit an Rezeptorsystemen von PDGF, bFGF, aFGF, Karposi-Wachstumsfaktor (FGF-4), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und Epidermal growth factor (EGF) (146) (147) (148). Bislang konnte die Bindung von polyanionischen ODN an der Zelloberfläche noch nicht exakt

charakterisiert werden. Es wird jedoch eine kompetitiv hemmbare, elektrostatische Bindung angenommen, die Zellwaschungen standhält und teilweise erst durch aufwändigere Maßnahmen wie z.B. eine pH-Wert-Senkung gelöst werden kann (147) (206). Die Bindungsfähigkeit ist bei unmodifizierten ODN vergleichsweise schwach, bei Phosphorothioaten jedoch aufgrund der zusätzlichen negativen Ladungen der eingefügten Schwefelatome stärker ausgeprägt. Ferner werden auch sequenzbedingte Sekundärstrukturen der Oligonukleotide, die z.B. durch G-Tetraden gebildet werden, für die Proteinbindung verantwortlich gemacht (122). Dieser Punkt soll jedoch erst weiter unten erläutert werden.

Um unspezifische Effekte möglichst gering zu halten und trotzdem eine ausreichende Nukleasestabilität zu gewährleisten, wurden in dieser Studie Teilphosphorothioate verwendet. Bei einer Kettenlänge von 15 Basen liegen 8 Phosphorothioat- und 6 Phosphodiesterbindungen vor.

Fennwald et al. (206) verglichen exakt dieses Antisense- und das zugehörige Sense-Molekül als Teilphosphorothioat mit der entsprechenden Vollphosphorothioat- und der reinen Phosphodiestervariante bezüglich ihrer bFGF-Peptid- und bFGF-Rezeptor-Bindungsaktivität. Dabei stellte sich heraus, dass das Teilphosphorothioat und der Phosphodiester erst in hohen Konzentrationen von $> 20 \mu\text{M}$ 50 % der bFGF-Rezeptoren einer 10^5 Zellen-Kultur blockierten.

Demnach war die Bindungsaktivität dieser Oligodesoxynukleotidformen vergleichbar, während die des Vollphosphorothioats, das bereits in Konzentrationen von 0,1- $2 \mu\text{M}$ entsprechend wirksam war, deutlich höher lag.

Guvakova et al. (147) fanden ähnlich große Unterschiede der Bindungsaktivität zwischen Vollphosphorothioaten einerseits und Teilphosphorothioaten und Phosphodiestern andererseits. Allerdings stellten die Autoren fest, dass Teil-PS-ODN und PD-ODN 15 % des matrixgebundenen bFGFs bereits in Konzentrationen von 0,5- $2,5 \mu\text{M}$ freisetzen.

Guvakova et al. (147) korrelierten die bFGF-Bindungsaktivität von Vollphosphorothioat-Oligonukleotiden mit ihrer proliferationsinhibierenden Wirkung, die anhand der [^3H]Thymidineinbaurate von NIH 3T3 Zellen bestimmt wurde. Hier ergab sich unter einer ODN-Konzentration von $20 \mu\text{M}$ eine 20- 70 %ige Reduktion der DNA-Synthese. Da die Autoren jedoch auf eine vergleichende Untersuchung von

Phosphodiestern und Teilphosphorothioaten verzichten, können zwar keine konkreten Aussagen über die Proliferationsinhibition dieser Oligonukleotidvarianten gemacht werden, anhand der schwächeren Bindungsaktivität muß jedoch von einer deutlich geringeren Proliferationshemmung ausgegangen werden (157).

Li et al. (197) und Itoh et al. (99) (199) konnten das Ausmaß unspezifischer Effekte wahrscheinlich durch den Einsatz von kationischen Trägermolekülen weitestgehend unterbinden, da diese Moleküle nicht nur die Aufnahme rate der Oligonukleotide erhöhen, sondern sie auch gegenüber ihrer Umgebung abschirmen (122).

Dass in der hier vorgelegten Studie im Gegensatz zu der Studie von Schmidt et al. (198) unspezifische Effekte unter Teilphosphorothioaten aufgetreten sind, entspricht nicht den Literaturangaben, die von einer weitgehenden Unterbindung unspezifischer Effekte durch Reduktion des Polyanioncharakters ausgehen. Ob die hier beobachtete unspezifische Wirkung allein auf der Modifikation der Oligodesoxynukleotide beruht, oder ob andere Mechanismen eine Rolle spielen, muß offen bleiben.

4.3.1.2. Einfluß Sekundärstruktur- bildender Sequenzmotive

Ein weiterer Wirkmechanismus von Oligonukleotiden beruht auf speziellen Sequenzmotiven, die innerhalb des Moleküls zur Ausbildung dreidimensionaler Strukturen führen. Smith et al. (207) zeigten beispielsweise, dass die G3-T4-G3-Sequenz zur Bildung eines asymmetrischen, durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisierten Rings führt, der sequenzspezifisch an komplexe Proteine bindet und die Proteinfunktion durch eine Konformationsänderung modulieren kann (158) (160) (208).

Von diesen als „Aptamer“ bezeichneten Effekt, muß der „Decoy“-Effekt unterschieden werden. Dieser beschreibt speziell die Blockierung DNA-bindender Proteine wie z.B. Transkriptionsfaktoren, indem Oligodesoxynukleotide zelleigene DNA-Zielsequenzen dieser Faktoren imitieren, sie binden und somit an ihrer eigentlichen Aufgabe, der Transkriptionsinitiation, hindern. Ein Decoy-Effekt geht direkt mit der Transkriptionsinhibition spezifischer Gene einher und wird in neuerer Zeit bereits als eigener Antisense-Mechanismus zur Inhibition der Genexpression

empfohlen (209). Bates et al. (210) identifizierte vier aufeinanderfolgende Guanin in der ODN-Sequenz als ein Aptamer-Effekt auslösendes Motiv und wies die Bindung von Oligonukleotiden mit G-Tetrade an ein Protein nach, bei dem es sich wahrscheinlich um Nucleolin, einem eng mit Proliferationsprozessen assoziierten Phosphoprotein handelt. Die Bindung von ODN an Nucleolin war mit einer Proliferationsinhibition vergesellschaftet. Burgess et al. (33), bestätigt durch Wang et al. (211), entdeckten bereits 1995 den proliferationinhibierenden Effekt von G-Tetraden und stellten damit bereits bewährte Antisense-Oligodesoxynukleotide gegen c-myc und c-myb bezüglich ihres Wirkmechanismus in Frage.

Neben der Bindung an Nucleolin fand man zusätzlich, dass ODN mit G-Tetrade besser in den Intrazellulärraum aufgenommen werden (138), so dass dieses Motiv bereits als Penetrationsverstärker eingesetzt wurde.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass Phospholipase A2 durch ODN, die mindestens 2 G-Triplets aufweisen, gehemmt wird (212). Demnach scheinen G-reiche ODN multifunktionelle intramolekulare Strukturen zu bilden, deren biologische Wirkungen noch nicht überschaubar sind.

Die in dieser Studie verwendete Antisense und Sense-ODN weisen zunächst keine der oben konkret genannten Schlüsselsequenzen auf.

Eine Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse der Studien von Li (197), Itoh (199) (99) und Schmidt et al. (198) und dieser Studie liefert dieser Punkt jedoch nicht, da alle Untersucher die gleiche Antisense-Sequenz gewählt haben.

4.3.1.3. Zytotoxizität

Prinzipiell besteht Einigkeit darüber, dass unmodifizierte als auch modifizierte Oligonukleotide in vitro bis zu einer Konzentration von 100 μ M nicht zytotoxisch wirken (208) (213). Auch in vivo sind Oligonukleotide in allen Verabreichungsformen gut verträglich. Studien an Ratten und Mäusen zeigten, dass Oligonucleotide eine LD50 von 500 mg/kg KG aufweisen. Eine Dosis-limitierende Toxizität besteht im Wesentlichen in der Immunstimulation und in der Auslösung von Gerinnungsstörungen. In chronisch verabreichten Dosen von über 20 mg/kg KG

können ODN über eine vermehrte Ausschüttung von Interferon, Aktivierung von natürlichen Killerzellen und Proliferationsstimulation von B-Lymphozyten (214), eine lymphatische Hyperplasie, Splenomegalie und eine entzündliche Multiorganinfiltration auslösen (208). Die Gerinnungsstörungen beruhen auf einer Aktivierung des Komplementsystems und Verlängerung der partiellen Thromboplastinzeit (144). Bei der Durchführung von ODN-in-vitro-Versuchen wird angesichts der allgemein anerkannten guten Verträglichkeit mittlerweile häufig auf den experimentellen Ausschluß zytotoxischer Effekte verzichtet. Dieser sollte jedoch in jedem Fall durchgeführt werden, wenn man beabsichtigt, Proteine zu supprimieren, die ein Überlebenssignal für die Zelle beinhalten, wie z.B. das c-myc-Protein (215) (216). Hiroyuki et al. (217) zeigten, dass auch eine Suppression des bFGF-Signals ab einem bestimmten Grad zytotoxisch wirkt und Apoptose auslöst.

In der vorgelegten Studie wurden zytotoxische Effekte als mögliche Ursache der unspezifischen Proliferationsinhibition anhand eines Apoptose-Tests und einer Reversibilitätsstudie ausgeschlossen. Diese Verfahren sind allgemein anerkannt und werden in zahlreichen ODN-Experimenten angewandt (218) (219).

4.3.2. Ausbleibende bFGF-Reduktion durch fehlende Spezifität des Antisense-ODN

4.3.2.1. Durch unzureichende ODN-Aufnahme in die Zelle

Ein wesentlicher Unterschied dieser Studie zu den Experimenten von Itoh (99) (199) und Li et al. (197) ist der Einsatz von kationischen Trägermolekülen, die den Transport der Oligonukleotide durch die Zellmembran verbessern. Da der bFGF-Gehalt unter Antisense-Wirkung in dieser Studie ansteigt, muß offen bleiben, ob die ODN ihre Ziel-mRNA intrazellulär erreicht haben.

Der ODN-Transport in die Zelle stellt ein zentrales Problem der Antisense-Experimente dar (139) (220). Da es sich um Makromoleküle mit je nach gewählter Modifikation mehr oder weniger starkem Anioncharakter handelt, stellt die außen negativ geladene lipophile Zellmembran eine Barriere dar, die eine freie Diffusion

der Oligonukleotide in den Intrazellularraum nicht ermöglicht (119). Als natürlicher Aufnahmemechanismus wird die Carrier-vermittelte Endozytose bzw. bei höheren ODN-Konzentrationen zusätzlich die Pinozytose angenommen, wofür ein eindeutiger Beweis jedoch aussteht (122) (132) (221).

Die ODN-Aufnahme über Rezeptor-vermittelte Endozytose wird *in vitro* von vielen Autoren als ineffizient betrachtet, denn nur sehr geringe Mengen erreichen das Zellinnere und somit ihre Ziel-mRNA (222) (223) (224) (225). Nur wenige Zelllinien wie stimulierte B und T-Lymphozyten bilden eine Ausnahme (226). Einmal in die Zelle gelangt, treffen die Oligonukleotide auf eine zweite schwierige Barriere, die Vesikelmembran, von der sie nach Rezeptor-vermittelter Endozytose umschlossen werden (227) (228). Das weitere Schicksal der ODN wird kontrovers diskutiert. Einige Studien zeigen in Abhängigkeit von der Zelllinie, dass ODN in den Vesikeln entweder gefangen bleiben (229), abgebaut oder wieder aus der Zelle ausgeschleust werden (230). Zamecnik et al. (135) zeigten dagegen elektronenmikroskopisch, dass Oligonukleotide in eukaryotischen Zellen (3T6-, CEF-, und HeLa-Zellen) innerhalb von 5 Minuten die Zellmembran durchqueren, das Zytosol durchwandern und in den Zellkern eindringen. Beim Durchqueren der Zelle wurde kein ODN-Abbau in zytoplasmatischen Vesikeln registriert. Beltinger et al. (133) demonstrierten die Aufnahme von Phosphorothioat-Oligonukleotiden in humanen Leukämiezellen innerhalb von 6 h bei 37°C, wobei 68 % der detektierten ODN im Nukleus, 14 % an der Plasmamembran und 5 % im freien Zytoplasma nachgewiesen wurden.

Da sich das Ausmaß der ODN-Aufnahme je nach Zelllinie unterscheidet, sollen im Folgenden Aufnahmestudien der vaskulären glatten Muskelzelle betrachtet werden. Auch hier ergaben sich widersprüchliche Resultate.

Farrell (231) und Ettore et al. (137) untersuchten die Aufnahme von Phosphorothioat-Oligonukleotiden in vaskulären glatten Muskelzellen. Ettore et al. (137) zeigten, dass die Intensität der Aufnahme mit einer hohen Affinität der ODN zu Membranproteinen einhergeht.

In beiden Studien konnte nachgewiesen werden, dass PS-ODN tatsächlich in Vesikeln das Zellinnere erreichen. Bezüglich ihrer Freisetzung aus den Vesikeln in das Zytosol sind die Meinungen der Autoren jedoch geteilt.

Etores et al. (137) fanden, dass bei einer extrazellulären ODN-Konzentration von 1 μM 5% in die Zelle aufgenommen werden, wobei 40-60 % der aufgenommenen Oligonukleotide intakt im freien Zytosol detektiert wurden. Der Aufnahmeprozess erreichte nach 1-2 Stunden einen Steady-State. Hochgerechnet auf die Einzelzelle ergab sich eine intrazelluläre Konzentration, die dem 10 bis 30-fachen der äußeren Konzentration entsprach.

Farrell et al. (231) dagegen beobachteten über 24-36 Stunden lang keine ODN-Freisetzung aus den Vesikeln.

Etores et al. (137) führten in einem weiteren Schritt einen endosomalen Marker mit, der nach rezeptorvermittelter Endozytose in den Endosomen verblieb und nicht wie die Oligonukleotide im Zytoplasma gefunden wurde. Daher scheinen Oligonukleotide durch einen bisher ungeklärten Mechanismus zumindest teilweise die Vesikel verlassen zu können. Lebedeva et al. (139) vermuteten, dass Oligonukleotide durch spontane Vesikelrupturen ins freie Zytosol gelangen. Um die intravesikale ODN-Konzentration und damit die Rate der Vesikelspontanrupturen zu steigern, schlugen die Autoren eine protrahierte Zufuhr entsprechend hoher Oligonukleotidkonzentrationen vor, die zusätzlich den Pinozytose-Aufnahmemechanismus beteiligen soll. Diesem Vorschlag entsprechend wurden in der vorliegenden Studie Langzeitexperimente mit wiederholter Zugabe der Wirkstoffe durchgeführt.

In anderen Studien wurden Trägermoleküle für den ODN-Transport eingesetzt. Die bisher gebräuchlichsten und am besten untersuchten Trägermoleküle sind kationische Lipide. Daneben wurden zahlreiche Alternativen entwickelt wie ODN-Ankopplungen an Poly-L-Lysin, Viren und Porphyrinen, um nur einige zu nennen (139). Kationische Lipide, die auch Itoh (99) (199) und Li et al. (197) in ihren Experimenten angewandt haben, sind amphiphile Moleküle mit hydrophoben aliphatischen Ketten, die mit den anionischen Oligonukleotiden einen Komplex bilden, sie vor Degradation schützen und als Penetrationsverstärker dienen. Mit seiner äußeren positiven Ladung bindet der Komplex über elektrostatische Kräfte an negativ geladene Gruppen von Membranproteinen und wird über rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen (139). Anschließend werden die Oligonukleotide nach einem Modell von Zelphati und Szoka (Abb. 4.1) durch Lipidumstrukturierungen ins freie Zytosol entlassen (232).

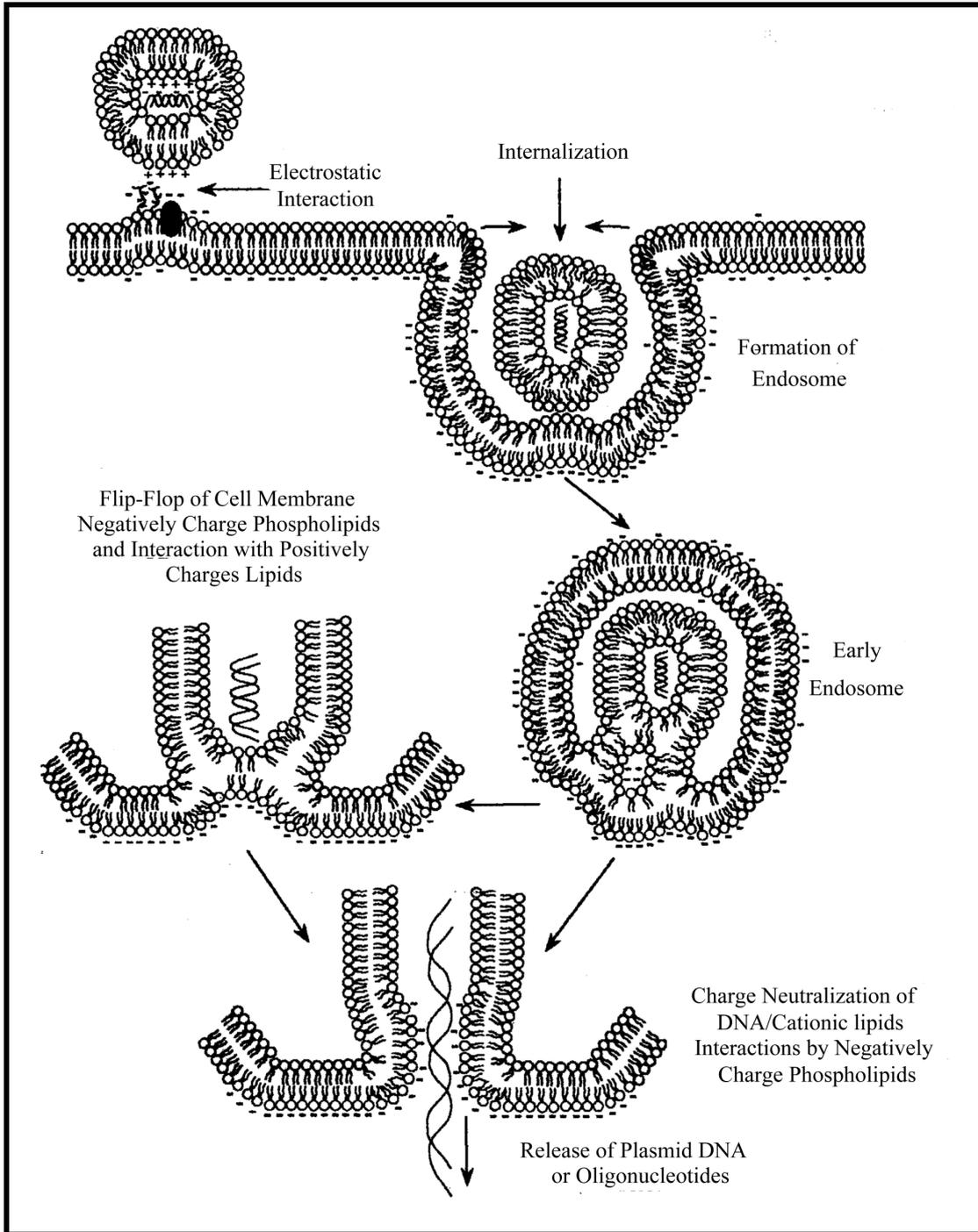


Abb. 4.1: Aufnahme von Liposomen in die Zelle und Freisetzung der transportierten DNA in das Zytoplasma nach einem Modell von Zelphati O und Szoka FC (232).

Untersuchungen, in denen kationische Trägermoleküle eingesetzt wurden, beschrieben eine höhere Wirksamkeit und längere Wirkdauer von Oligodesoxynukleotiden, da sie einen zusätzlichen Schutz vor Nukleasen bieten (158) (162) (233). Insbesondere bei Verwendung von Phosphorothioaten werden abschirmende Trägermoleküle empfohlen, um unspezifische Effekte durch Proteininteraktionen an der Zellmembran zu unterbinden (122). Dem entgegen steht jedoch eine vergleichende Studie von Pickering et al. (202), die in vaskulären glatten Muskelzellen die Aufnahme von chimären ODN mit und ohne Trägermoleküle untersucht haben. Hier wurde gezeigt, dass Liposome zwar die ODN-Aufnahme erhöhen, diese aber weiterhin in Vesikeln gefangen bleiben. Nackte ODN dagegen wurden frei im Zytosol und Nukleus detektiert und zeigten einen Antisense-Effekt. Demnach erhöhen kationische Liposome zwar die Aufnahme, wegen mangelnder Bioverfügbarkeit aber nicht die ODN-Wirksamkeit. Farrell et al. (231) fanden zudem zytotoxische Effekte der ODN in Verbindung mit verschiedenen Trägermolekülen auf glatte, vaskuläre Muskelzellen.

Bezüglich des Einsatzes von Trägermolekülen in Antisense-Experimenten der glatten Muskelzelle besteht somit kein Konsens, zumal die Kenntnisse über die ODN-Aufnahme in die Zelle ohne als auch mit Trägermolekülen weiterhin nicht ausreichend sind. Mit der stetigen Entwicklung verschiedener neuer Trägermoleküle zeichnet sich allgemein jedoch eindeutig ein Trend zur trägergestützten ODN-Aufnahme ab.

Li (197) und Itoh et al. (99) (199) verwendeten ein Trägerliposom und erzielten beide eine Reduktion des bFGF-Proteins oder seiner mRNA, ohne dass das Kontroll-ODN signifikante Effekte aufwies. Toxische Effekte der Liposome wurden nicht berichtet. Schmidt et al. (198) gelang auch ohne Einsatz von Trägermolekülen eine 50 %-ige Senkung der bFGF-Synthese, obwohl deutlich niedrigere ODN-Konzentrationen verwendet wurden.

In der vorgelegten Studie, die ohne Trägermoleküle durchgeführt wurde, stehen jedoch unspezifische Hemmeffekte im Vordergrund, eine spezifische Antisense-Wirkung wurde nicht beobachtet. Ob die Oligonukleotide durch unspezifische Interaktion mit Membranproteinen Hemmimpulse vermitteln und oder die

intrazelluläre ODN-Konzentration für einen sichtbaren Antisense-Effekt nicht ausreicht, lässt sich nicht entscheiden. Auch die Möglichkeit, dass unspezifische, die bFGF-Produktion anregende Impulse über die Zellmembran eine Antisense-induzierte Produktionssuppression verschleiern, kann nicht ausgeschlossen werden. Koibuchi Y (107), Itoh H (99), Belgore F (98) und Skaletz-Rorowski A et al. (84) haben gezeigt, dass die bFGF-Produktion sekundär durch Stimulationsprozesse über die Zellmembran angeregt werden kann.

4.3.2.2. *Unzureichende Oligodesoxynukleotidkonzentration*

Eine hohe Bindungsaffinität von Oligonukleotiden an die Ziel-mRNA ist eine der wichtigsten Voraussetzungen für das Gelingen der Experimente nach dem Antisense-Prinzip. Sie ist definiert durch die Schmelztemperatur T_m , bei der 50 % des DNA-RNA-Doppelstranges in Einzelstränge dissoziiert vorliegen. Als Faustregel zur Bestimmung der T_m unmodifizierter Oligonucleotide gilt die Formel: $T_m = n (2^\circ\text{C}) + m (4^\circ\text{C})$, wobei „n“ die Anzahl der AT-Basenpaare und „m“ die Anzahl der CG-Basenpaare symbolisiert (119). Danach weisen GC-reiche ODN eine vergleichsweise höhere Bindungsaffinität zu ihrer Ziel-mRNA auf. Ihre höhere Wirksamkeit wurden von Matveeva et al. (234) durch statistische Auswertung von Antisense-Sequenzen und ihrer Wirksamkeit belegt.

ODN-Modifikationen haben eine Änderung der Bindungsaffinität zur Folge. Die Phosphorothioat-Modifikation führt zu einer Senkung der Schmelztemperatur um $0,5^\circ\text{C}$ pro Nukleotid im Vergleich zum Phosphodiester (208). Daraus folgt, dass Phosphodiester deutlich effektiver sind als Phosphorothioate, die nach Gunn et al. (203) eine doppelt bis 20-fach höhere Dosis für die gleiche biologische Wirkung benötigen. Phosphorothioate weisen jedoch schon ab einer Konzentration von $2\mu\text{M}$ signifikante, unspezifische Effekte auf, während Stein CA (122) nach Auswertung zahlreicher Antisense-Experimente in der Regel Konzentrationen nackter ODN von mindestens $5\text{-}10\mu\text{M}$ für einen Antisense-Effekt erforderlich hält.

In dieser Studie wurde versucht, die oben beschriebene Problematik durch Verwendung von Teilphosphorothioaten zu lösen, die einerseits eine möglichst hohe Bindungsaffinität zur Ziel-RNA und Nukleasestabilität gewährleisten, andererseits wenig unspezifische Effekte vermitteln. Da die Teilphosphorothioate eine kürzere Wirkdauer aufweisen als Vollphosphorothioate (162), wurde die ODN-Zugabe in dieser Studie alle 24 h wiederholt. Ein spezifischer Antisense-Effekt im Sinne einer Reduktion des bFGF-Gehaltes konnte jedoch nicht erzielt werden. Ursache könnte eine zu niedrig gewählte ODN-Konzentration sein. Durch viermalige ODN-Zugabe wurden maximal 2-4 μM in den Kulturen erreicht, ohne Berücksichtigung des zwischenzeitlichen ODN-Abbaus.

Li (197) und Itoh et al. (99) (199) verwendeten durch einmalige Zugabe von 4 und 5 μM höhere ODN-Konzentrationen bei zusätzlichem Einsatz von Trägermolekülen, die nach Galderisi et al. (162) die Effektivität und die Wirkungsdauer der Oligonukleotide weiter erhöhen.

Schmidt et al. (198) hingegen erzielten mit dem identischen AS-Molekül wie in der vorgelegten Studie bereits einen spezifischen Antisense-Effekt in 0,5 μM -Konzentration ohne Einsatz wirkungsverstärkender Trägermoleküle.

Die in dieser Studie gewählten Konzentrationen beruhen auf einer Dosis-Wirkungskurve, die nicht den bFGF-Gehalt als Parameter, sondern die Proliferationsinhibition durch die Oligonukleotide betrachtet (vgl. Abb. 3.6).

Die Proliferationsinhibition ist jedoch ein Parameter, in den sowohl unspezifische als auch spezifische ODN-Effekte eingehen können. In dieser Studie stehen unspezifische Effekte im Vordergrund, so dass der Parameter in diesem Fall zur Bestimmung der erforderlichen ODN-Dosis ungeeignet ist.

4.3.2.3. Spezies-spezifische Unterschiede der bFGF-Sequenz als Ursache einer unzureichenden Bindungsaffinität zwischen dem AS-ODN und seiner Ziel-mRNA

Bei dem Wachstumsfaktor bFGF handelt es sich um ein hochkonserviertes Protein mit hohem Selektionsdruck in der Evolution und starker Homologie unter den Vertebraten. So unterscheiden sich bovines und humanes bFGF lediglich in 2 Aminosäuren, entsprechend einer Homologie von 99% (28). Im Vergleich zu der Aminosäure-Sequenz treten Unterschiede in der Basensequenz jedoch deutlich häufiger auf (28) (235). In der vorgelegten Studie wurde ein Antisense-Molekül gegen die humane bFGF-mRNA in einer bovinen Zellkultur eingesetzt. Ein Basensequenzvergleich der Translationsinitiationsregionen der humanen und bovinen bFGF-mRNA (Abb. 4.2) ergibt 2 Basendifferenzen, drei Basen vor und drei nach dem AUG-Startkodon.

Humane bFGF-mRNA-Sequenz: 5'-G-G-G- A-C-C- A-U-G - G-C-A- G-C-C -3'
Bovine bFGF-mRNA-Sequenz: 5'-G-G-G- G-C-C - A-U-G - G-C-C- G-C-C- 3'

Abb. 4.2: Basensequenzvergleich der Translationsinitiationsregionen der humanen und bovinen bFGF-mRNA

Demnach ist das verwendete Antisense-ODN an 2 von 15 Positionen nicht komplementär. Nach Freier et al. (236) kann die Differenz an Gibbs freier Energie durch ein Mismatch 0,3 bis 4,0 kcal/mol betragen, und die Bindungsaffinität des ODNs zur Ziel-mRNA bis zu 500-fach reduziert sein. Das Ausmaß der Destabilisierung ist dabei abhängig von der ODN-Länge, der Position des Mismatches im Molekül und von den umgebenden Basen. CG-Basenpaarungen erhöhen die Stabilität des RNA-Oligonukleotid-Hybrids stärker als AT-Verbindungen. Das Vorkommen von zwei Mismatches reduziert die Stabilität des Hybrides überproportional stärker (236). Demnach ist zu hinterfragen, ob das verwendete AS-

ODN eine ausreichend starke Bindung zu einer Ziel-mRNA aufnimmt, um eine spezifische bFGF-Produktions-Inhibition zu bewirken. Bennet et al. (237) zeigten, dass die Einfügung von zwei Basen Mismatches in ein 15mer AS-ODN gegen c-myc zu einem vollständigen Wirkungsverlust führte. Schmidt et al. (198) hingegen demonstrierten, dass das in der vorgelegten Studie verwendete AS-ODN gegen humane bFGF-mRNA die bFGF-Produktion sowohl in humanen als auch in bovinen SMCs um 50 % zu reduzieren vermochte. Da keine speziesbedingten Unterschiede der AS-ODN- Wirksamkeit festgestellt werden konnten (198), muß angenommen werden, dass die Destabilisierung des Hybrids durch das zwei Basen-Mismatch durch jeweils fünf CG-Basenpaarungen in unmittelbarer Umgebung vollständig kompensiert werden konnte.

4.3.2.4. Phänotypvariationen speziesabhängige Heterogenität der glatten Muskelzelle

Villa et al. (200) wiesen bereits deutliche ODN-Wirkungsunterschiede in glatten Muskelzellen unterschiedlicher Spezies nach. Während ein 18mer-AS-ODN gegen c-myc und ein 18-mer-c-myc-Scramble in Ratten-Aorten keinerlei Proliferationshemmung zeigten, wirkte in Hunde-Aorten nur das Scramble inhibitorisch. In humanen Aorten führten beide Moleküle dagegen zu einer 50%-igen Proliferationshemmung. Li (197) als auch Itoh et al. (99) (199) verwendeten in ihren Studien Ratten-SMCs bzw. Endothelzellen, während die Muskelzellen in der Studie von Schmidt et al. (198) als auch in der vorgelegten Studie boviner Herkunft sind.

Die glatte vaskuläre Muskelzelle verfügt im Gegensatz zu sich terminal differenzierenden Zelltypen (wie z.B. Skelett- oder Herzmuskelzellen) über die Eigenschaft ihre Protein- und Organellenausstattung nach äußeren Bedürfnissen auszurichten. Als Extremvarianten werden 2 Phänotypen mit unterschiedlichen Funktionen beschrieben. Glatte Muskelzellen vom kontraktilem Phänotyp sind spindelförmig und exprimieren große Mengen an kontraktilem Proteinen. Sie proliferieren und migrieren extrem langsam und produzieren kaum extrazelluläre

Matrix. Sie sind vorwiegend in reifen und gesunden Gefäßabschnitten zu finden. Ihre Hauptaufgabe ist die Kontraktion zur Aufrechterhaltung des Gefäßtonus (238). Der synthetische Phänotyp dagegen ist epitheloidförmig, besitzt kaum Myofilamente und verfügt stattdessen über einen großen Proteinbiosynthese- und Sekretionsapparat. Er reagiert sensibel auf Wachstumsfaktoren und chemotaktische Substanzen. Seine Hauptaufgaben sind die Proliferation, Migration und Produktion extrazellulärer Matrix (63). Diese Eigenschaften werden in Wachstums- und Entwicklungs- als auch in vaskulären Reparaturprozessen benötigt (92) (239). Der Übergang zwischen den Phänotypen ist fließend und abhängig von einer Vielzahl äußerer Stimuli wie z.B. mechanische Traumata, Toxine, Zytokine und Lösung von Zellkontakten.

Farell et al. (231) wiesen in vivo unterschiedliche ODN-Aufnahmeraten glatter vaskulärer Muskelzellen nach. Während Muskelzellen in gesunden Arterien kaum Oligonukleotide internalisierten, nahmen Zellen nach Gefäßtrauma verstärkt Oligonukleotide auf. Diese Beobachtung legt nahe, dass die ODN-Aufnahme phänotypabhängig sein könnte. Entsprechend seiner erhöhten Proliferationsaktivität verfügt der synthetische Phänotyp über einen gesteigerten Nucleinsäurestoffwechsel, der einen vermehrten Umsatz von Nucleinsäuren erfordert.

Frisch ausgesäte, kultivierte vaskuläre glatte Muskelzellen, die aus einem geschlossenen Zellverband herausgelöst werden, liegen im kontraktilem Phänotyp vor. Werden sie unter Zugabe von serumreichen Medium in einem subkonfluenten Stadium gehalten, nehmen sie den synthetischen Phänotyp an und proliferieren bis zur Konfluenz (240) (241). Diese vorübergehende Phänotypänderung ist vollständig reversibel (240). In der konfluenten Zellschicht ist der kontraktile Phänotyp der glatten Muskelzelle wieder vorherrschend und relativ stabil, dennoch kann auch hier eine Umtransformierung unter Zytokinstimulation oder auch durch Stressfaktoren wie suboptimale Kulturbedingungen erfolgen (240) (242).

Unter Verwendung des identischen Antisense- und Sense-Moleküls wie in der vorgelegten Studie wiesen Schmidt et al. (198) eine antisense-spezifische Reduktion des bFGF-Gehaltes in bovinen koronaren Muskelzellen nach. Eine Suppression der bFGF-Synthese gelang jedoch in dieser Studie nicht. Die Diskrepanz könnte auch hier auf der Präsenz unterschiedlicher Phänotypen mit entsprechender Bereitschaft zur Oligonukleotidaufnahme beruhen. Graham et al. (243) wiesen eine Inhibition von

Phänotypveränderungen glatter Muskelzellen unter Phosphorothioat-ODN nach. In der vorgelegten Studie erfolgte die Oligonukleotidzugabe unmittelbar bei der Aussaat, so dass möglicherweise die Transformation der glatten Muskelzelle vom kontraktilem in den sythetischen Phänotyp unterbleibt. Schmidt et al. (198) dagegen setzten die Oligonukleotide erst 6 Stunden nach Aussaat zu, in denen die Phänotypveränderungen zunächst ungehindert ablaufen konnten. Auch bei Li (197) und Itoh et al. (77) (199) erfolgte die Oligonukleotidzugabe Stunden bis Tage nach der Zellaussaat.

Da in beiden Studien jedoch keine Charakterisierung des vorherrschenden Phänotyps der glatten Muskelzellen erfolgt war, muss auch diese Annahme offen bleiben.

4.3.2.5. *Inkonsistenz der Oligonukleotide*

Neben den bereits diskutierten chemischen und biologischen Einflussfaktoren existieren auch technische Einflüsse der ODN-Herstellung, die zu einer Inkonsistenz sequenzidentischer und chemisch modifizierter Oligonukleotide unterschiedlicher Firmen führen (200).

4.4. Hypothese zum Inhibitionsmechanismus der Oligodesoxynukleotide dieser Studie

4.4.1. Ergebniskonstellation und daraus resultierende weitere Fragestellungen

1a) Unter AS-ODN-Einfluß kommt es zu einer Hemmung der Mitose glatter vaskulärer Muskelzellen unter nahezu unbeeinträchtigter Protein- und bFGF-Biosynthese. Der bFGF- und Protein-Gehalt/Zellkultur unter AS-ODN entspricht im Wesentlichen dem unbehandelten Kontrollkulturen. Da die Zellen jedoch einer Mitoseinhibition unterliegen, resultiert, bezogen auf die Einzelzelle, ein bis zu doppelt so hoher Protein- und bFGF-Gehalt.

1b) Auch das Kontrolloligonukleotid Sense verursacht eine Inhibition der Mitose, wobei der Hemmeinfluß, quantifiziert anhand der [³H]Thymidininkorporation, bis zu 87 % der AS-Wirkung ausmacht

1c) Die Hemmwirkung der Oligonukleotide ist weniger sequenz- als konzentrationsabhängig, was nahelegt, dass die Hemmwirkung der Antisense-ODN größtenteils unspezifisch sein muss.

2) In der vorgelegten Studie konnte jedoch nicht geklärt werden, welcher Proliferationsinhibitionsmechanismus der verwendeten Oligonukleotide zugrunde liegt.

3) Auffällig ist des Weiteren, dass die Zellen unter AS-Wirkung bei deutlich reduzierter Proliferationsrate ihren Proteingehalt bis maximal auf das Doppelte steigern und somit definitionsgemäß in einen hypertophen Status übergehen.

Auch hier stellt sich die Frage sowohl nach dem verantwortlichen Mechanismus, als auch nach der biologischen Bedeutung dieser Reaktionsweise.

Mögliche Ursachen für das Ergebnis dieser Antisense Studie wurden bereits oben diskutiert und ergeben sich konkret aus dem Vergleich mit den Studien von Itoh (77) (199), Li (197) und Schmidt et al. (198), in denen die gleiche AS-Sequenz zu einer Suppression der bFGF-Synthese geführt hat. Eine zentrale Bedeutung spielt dabei die Oligonukleotidaufnahme in die Muskelzelle.

Ein wesentlicher Unterschied der vorgelegten Studie zu den Experimenten von Itoh (77) (199) und Li et al.(197) ist der fehlende Einsatz von Trägermolekülen.

Es ist fraglich, ob die in dieser Studie verwendeten Oligonukleotide überhaupt in ausreichender Zahl von den glatten Muskelzellen aufgenommen wurden. In der Literatur werden den Teilphosphorothioat-Oligonukleotiden aufgrund des im Vergleich zu Vollphosphorothioaten reduzierten Anioncharakters nur geringe unspezifische Wirkungen bescheinigt.

Dennoch besitzen sie einen stärkeren Anionencharakter als unmodifizierte Oligonukleotide und könnten ohne Liposomenumhüllung durch elektrostatische Proteininteraktionen in der Glykokalix darin gehindert werden, zu ihrem eigentlichen Wirkort zu gelangen.

Eine herabgesetzte, Phänotyp-abhängige ODN-Aufnahmebereitschaft der glatten Muskelzelle könnte ein zusätzliches Hindernis darstellen.

4.4.2. Phosphorothioat-Oligonukleotide als heparinähnliche Wachstumsfaktorinhibitoren

4.4.2.1. Proliferationsinhibition

Unter der Annahme, dass Oligonukleotide durch unspezifische, extrazelluläre Proteininteraktionen zurückgehalten werden, ergeben sich nach den Arbeiten von Guvakova (147), Fennewald (206) und Rockwell et al. (148) alternative Funktionsmechanismen dieser Moleküle. Die Autoren haben nachgewiesen, dass polyanionische ODN die Interaktion von Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren, insbesondere von bFGF, mit ihren Rezeptoren stören und somit die Signaltransduktion unterbrechen können.

Es wäre weiterhin nicht auszuschließen, dass die Proliferationshemmung in dieser Studie über einen derartigen Mechanismus erfolgt. Die durch die wiederholte ODN-Zugabe anhaltend gestörte Interaktion beispielweise von bFGF mit seinem Rezeptor und/oder Corezeptor könnte auch erklären, dass trotz eines erhöhten bFGF-Gehaltes pro Einzelzelle das Proliferationssignal nicht umgesetzt wird. Demnach können polyanionische ODN nach Fennewald et al. (206) Heparin oder Heparin-ähnlichen Wachstumsfaktoringhibitoren funktionell entsprechen.

Zellassoziiertes Heparin und Heparansulfat fördern die Bindung von bFGF an seinen Rezeptor unter Bildung des trimolekularen Komplexes und wirken somit proliferationsfördernd. Unter Zugabe von exogenem Heparin in Konzentrationen von 50-100µg/ml Medium, werden glatte Muskelzellen in ihrem Wachstum stark inhibiert. Exogenes Heparin in dieser Konzentration Dosen konkurriert mit HSPG um die Bindung des bFGFs, führt aber nicht zu einer bFGF-Rezeptorinteraktion- und Rezeptoraktivierung (244). Im Vergleich zum HSPG hat exogenes Heparin den Vorteil einer stärkeren negativen Ladung und wird somit zum potenten Proliferationsinhibitor. Die Störung der bFGF-Rezeptor-Interaktion durch polyanionische, Heparin-imitierende Moleküle wurde bereits in zahlreichen Studien genutzt, um eine Proliferationsinhibition glatter Muskelzellen herbeizuführen (245) (246) (247) (248) (249).

4.4.2.2. Reversibilität der Proliferationsinhibition

bFGF beinhaltet neben seiner Funktion als Mitogen zusätzlich ein Überlebenssignal (216). Hiroyuki et al. (217) zeigten, dass die Produktion eines unvollständigen bFGF-Rezeptors durch Einschleusen eines veränderten Rezeptorgenes zur Zelldegeneration und Apoptose führt. Demnach ist der bFGF-Rezeptor an der Vermittlung dieses Überlebenssignals beteiligt.

Apoptosevorgänge unter ODN-Einfluß konnten in dieser Studie nicht nachgewiesen werden, da es womöglich nicht zu einem absoluten Entzug des bFGF-Signals kommt. Oligonukleotide können den Wachstumsfaktor von seinem Rezeptor und Corezeptor

verdrängen. Diese werden dabei jedoch nicht irreversibel blockiert, da es sich um eine kompetitive Hemmung der Rezeptorinteraktion handelt (s. 4.3.1.1.).

Die Reversibilität der ODN-Wirkung wurde in dieser Studie belegt und ist mit der Annahme eines kompetitiven Rezeptorantagonismus zwischen bFGF und den Oligodesoxynukleotiden vereinbar.

4.4.2.3. Sequenzabhängigkeit der Wachstumsfaktorinhibition durch Oligonukleotide

In der vorgelegten Studie wurde eine signifikant stärkere Proliferationshemmung der glatten Muskelzellen unter AS-ODN als unter S-ODN beobachtet.

Unter der Annahme, dass Oligonukleotide in der vorgelegten Studie als polyanionische Inhibitoren die Interaktion Heparin-bindender Wachstumsfaktoren mit ihren Rezeptoren stören, muß daher zusätzlich vermutet werden, dass die ODN-Sequenz in der Beeinträchtigung der Faktor-Rezeptor-Interaktion eine Rolle spielt. Die Literatur bietet diesbezüglich widersprüchliche Daten. Während Rockwell et al. (148) eine Sequenzabhängigkeit verneinen, sahen Fennewald et al. (206) in Abhängigkeit von der ODN-Sequenz eine unterschiedliche Potenz, die Wachstumsfaktor-Rezeptor-Interaktion zu stören. Guvakova et al. (147) bestätigten ebenfalls eine Bedeutung der ODN-Sequenz, stuften diese aber im Vergleich zur ODN-Länge als vergleichsweise gering ein.

4.4.2.4. Hypertrophie unter Heparin und Heparin-ähnlichen Wachstumsfaktorinhibitoren

In der vorgelegten Studie wurde beobachtet, dass die glatte Muskelzelle unter der ODN-Wirkung konzentrationsabhängig in einen hypertrophen Status übergeht. Auch unter Heparin und Heparin-ähnlichen Wachstumsfaktorinhibitoren wurde bereits eine hypertrophe Wachstumsform der glatten Muskelzelle beschrieben (84) (250).

Die Hypertrophie existiert in der heutigen Literatur als eine neben der Hyperplasie mögliche Wachstumsform der glatten, vaskulären Muskelzelle. Verläßt eine Zelle

ihren Ruhezustand, um in einen Wachstumsstatus überzugehen, so entscheidet der äußere Stimulus, ob sich eine Hyperplasie mit Zellzahlvermehrung oder eine Hypertrophie mit Zellvolumenvergrößerung einstellt. Das entsprechende Proliferationssignal wird häufig durch das Zusammenspiel sekundär exprimierter Wachstumsfaktoren mit Mitose-stimulierender als auch -inhibierender Potenz vermittelt (s. Tab. 1.1). Voraussetzung für beide Wachstumsformen ist jedoch zunächst die Steigerung der Proteinsynthese.

Ein weitere Aspekt ergibt sich aus der Arbeit von Hafizi et al. (60), die durch Analyse der Signaltransduktionskaskaden aufzeigten, dass hypertrophische G-Protein-vermittelte Wachstumsstimuli und mitogene Tyrosinkinase-vermittelte Stimuli unter anderem in einer gemeinsamen zytoplasmatischen Endstrecke -einer MAPK-Kaskade-münden. Am Ende dieser Kaskade steht ein durch Phosphorylierung aktivierbares Protein, das „extracellular signal-regulated kinase“-Protein (ERK-Protein). Dieses Protein tritt im aktivierten Zustand in den Nukleus ein, löst dort die Transkription des Protoonkogenes c-fos aus und gibt somit das Mitosesignal weiter. Voraussetzung für die ERK-Aktivierung und seine Wanderung in den Nukleus ist nach Mii et al. (251) jedoch eine über mindestens 2 Stunden anhaltende Phosphorylierung dieses Proteins. Wachstumsfaktoren unterscheiden sich in ihrer Potenz, diese Phosphorylierung auszulösen. So wurde PDGF beispielsweise durch eine über 24h anhaltende Phosphorylierung des ERK-Proteins als starkes Mitogen identifiziert, während Angiotensin II mit einer Phosphorylierungszeit von unter 30 min einen schwachen Stimulus bietet (251). Wird das Mitosesignal wie bei Angiotensin II nicht weitergegeben, mündet das Wachstumssignal unter vorangetriebener Proteinsynthese in eine hypertrophische Antwort.

Bezogen auf die Hypothese, dass polyanionische Oligonukleotide ihre Wirkung über einen kompetitiven Rezeptorantagonismus zu bFGF ausüben, ist es möglich, dass das an sich als stark einzustufende bFGF-Proliferationssignal durch intermittierende Verdrängung des Faktors von seinem Rezeptor abgeschwächt wird und eine Mitose-auslösende Phosphorylierung des ERK-Proteins nicht leisten kann, während die Stimulation der Proteinbiosynthese noch ausreichend ist.

4.4.2.5. *Zunahme des bFGF -und Protein-Gehaltes pro Zelle unter Proliferationsinhibition*

In der vorgelegten Arbeit wurde eine Zunahme des bFGF-Gehaltes als auch des Proteingehaltes pro Zelle unter Oligonukleotid einfluß beobachtet.

Skaletz-Rorowski et al. (84) beschreiben in einem 96 Stunden-Versuch die Heparin - Wirkung auf proliferierende, bovine glatte Muskelzellen unter Berücksichtigung der Zellzahl, des Protein- und bFGF-Gehaltes, der bFGF-Verteilung im Intra- und Extrazellulärraum sowie des bFGF-Rezeptor und des HSPG-Gehaltes. Aufgrund nahezu identischer Versuchsbedingungen, die zufällig bedingt sind, können die Ergebnisse unter Heparin und unter Oligonukleotiden direkt miteinander verglichen werden.

Der Vergleich der Proliferationsparameter nach 96 Stunden zeigt, dass die in der vorgelegten Studie verwendeten Oligonukleotide und Heparin in ihrer proliferationsinhibierenden Konzentration tendenziell die gleichen Veränderungen hervorrufen.

Die deutlichen Unterschiede der bFGF-Werte/ 10^5 Zellen können auf unterschiedliche Stadien im Kulturwachstum zurückgeführt werden, zumal Skaletz-Rorowski et al. (84) nur mit 50 % der in dieser Studie verwendeten Ausgangszellzahl arbeiteten.

Der tabellarisch angeführte Vergleich zeigt deutliche Parallelen der Proliferationsmodulation unter Heparin- und Oligonukleotid einfluß und stützt die Vermutung eines ähnlichen Wirkmechanismus.

Während Skaletz-Rorowski et al. (84) unter der inhibitorischen Wirkung des Heparins eine Zunahme des bFGF- und Proteingehaltes pro Zelle fanden, beobachteten auch Schriever et al. (252) unter der Proliferationshemmung glatter Muskelzellen durch IGF-I- und II derartige Veränderungen, vereinbar mit einer hypertrophen Wachstumsform der glatten Muskelzelle. Da beiden Studien ein unterschiedlicher Mechanismus der Proliferationsinhibition zugrunde liegt, könnte die synchron beobachtete Protein- und bFGF-Zunahme aber auch eine unspezifische Reaktion der glatten Muskelzelle auf inhibitorische Einflüsse, ggf. ein Kompensationsmechanismus darstellen.

	Skaletz-Rorowski et al.		Aktuelle Studie	
Probentyp	Kontrolle	Heparin 50µg/ml	Kontrolle	AS-ODN 1.0µM
Zellzahl zu Versuchsbeginn	25.000/ 35er dish	25.000/ 35er dish	50.000/ 35er dish	50.000/ 35er dish
Zellzahl in Prozent der Kontrolle nach 96 h	100%	35%	100%	50%
Protein/10 ⁵ Zellen	25µg	38µg	25µg	43µg
Protein/10 ⁵ Zellen in Prozent der Kontrolle	100%	150%	100%	170%
bFGF/10 ⁵ Zellen	90pg	240pg	228pg	517pg
bFGF/10 ⁵ Zellen in Prozent der Kontrolle	100%	260%	100%	227%
bFGF-Kompartimente nach 96h im Vergleich zur Kontrolle		Shift in den Pericellulärraum		Shift in den Perizellulärraum
Initialer proliferationsbedingter Abfall des bFGF-Gesamtgehaltes	vorhanden	vorhanden	vorhanden	vorhanden

Tab. 4.1: Wirkungsvergleich von Heparin und den Oligonukleotiden dieser Studie auf Zellzahl, Zellprotein, bFGF-Gehalt, bFGF-Kompartimentierung glatter vaskulärer Muskelzellkulturen.

4.5. Abschließende Beurteilung

Zusammenfassend liegt dieser Studie ein in weiten Teilen unspezifischer Oligonukleotidmechanismus zugrunde, der zwar die intendierte durch bFGF ausgelöste Proliferation wirkungsvoll inhibiert, jedoch das eigentliche Ziel, die bFGF-Syntheserate selbst zu senken, verfehlt und einen hypertrophischen Status der glatten Muskelzelle herbeiführt. Zahlreiche unspezifische Wirkungsformen insbesondere der Phosphorothioat-ODN wurden bereits in der Literatur beschrieben. Die nachgewiesene Interaktion zwischen polyanionischen Oligonukleotiden und Heparin-bindenden Wachstumsfaktoren macht die Wirkungsinterpretation von Oligonukleotiden, die die Synthese eben dieser Faktoren inhibieren sollen, problematisch.

Im Hinblick auf die zahlreichen, unspezifischen ODN-Wirkungsmechanismen lässt sich die Konstellation der Proliferationsparameter in dieser Studie am ehesten mit der Annahme einer ODN-bFGF-Rezeptorinteraktion erklären.

Zum Beweis dieser Hypothese wären jedoch ausführliche Aufnahmestudien dieser Oligonukleotide notwendig gewesen. Ferner hätte überprüft werden müssen, ob freies, vom Rezeptor verdrängtes bFGF wie unter der Heparinwirkung im Medium nachweisbar ist. Die ODN-Wirkung müßte unter Zugabe von exogenem bFGF antagonisierbar sein.

Vergleichende Experimente mit und ohne Trägermolekül-Einsatz können die Aussage der Aufnahmestudie festigen. Auch Oligonukleotide mit gleicher Sequenz aber unterschiedlicher Modifikation und Ladung sollten in Vergleichsexperimenten untersucht werden.

Abschließend bleibt noch zu diskutieren, ob der Mechanismus der bFGF-Verdrängung vom seinem Rezeptor durch polyanionische Oligonukleotide nicht selbst ein konkurrenzfähiges Konzept zur Restenoseprophylaxe nach PTCA darstellt.

Dafür spricht zunächst, dass die Mitoseaktivität der glatten Muskelzelle deutlich inhibiert wird. Parallel baut sich jedoch unter ODN-Einfluß ein erhebliches Proliferationspotential auf, indem die glatten Muskelzellen Protein und bFGF anhäufen. Dies birgt das Risiko in sich, dass jeder weitere Mitosestimulus zu einer

heftigen Reboundreaktion mit überschießender Proliferationsaktivität führen kann. Demnach ist die alleinige Ausnutzung dieses unspezifischen Oligonukleotidmechanismus in der Restenoseprophylaxe weiterhin problematisch und nicht zukunftsreich. In vielen anderen Bereichen der Medizin wie der Onkologie und der Virologie (s. 1.7.) hat sich der Antisense-Einsatz jedoch bereits einen festen Platz gesichert.

5. Zusammenfassung

Der basische Fibroblasten Wachstumsfaktor (bFGF) -ein potenter Stimulator vaskulärer Muskelzellen- spielt in der Pathogenese der Arteriosklerose und der Entwicklung einer post-Angioplastie Stenose eine wichtige Rolle. In der vorliegenden experimentellen Studie wurde geprüft, ob Antisense-Oligonukleotide, die gegen die mRNA des basischen Fibroblasten Wachstumsfaktors gerichtet sind, die Fähigkeit aufweisen, die bFGF-Synthese zu supprimieren und die Proliferation kultivierter boviner, glatter Muskelzellen zu inhibieren. Für die Versuche wurde ein 15-mer Antisense-Oligonukleotid (AS-ODN) verwendet, das gegen die Translations-initiationsregion der bFGF-mRNA gerichtet war. Als Kontrolloligonukleotid wurde eine dem AS-ODN komplementäre Sequenz -ein Sense-Oligonukleotid (S-ODN)- verwendet. Die Oligonukleotide waren durch partielle Modifikation in die Phosphorothioat-Form gegen den Abbau durch zelleigene Nukleasen geschützt. AS-ODN und S-ODN wurden kultivierten glatten Muskelzellen in einer Konzentration von 0,5 μ M und 1,0 μ M dreimal im 24-Stunden Intervall zugesetzt. Nach 96 Stunden in Kultur (Versuchsende) wurde das Proliferationsverhalten durch Bestimmung der Zellzahl und der DNA-Synthese ermittelt und die Konzentration des zellulären und perizellulären bFGF-Gehaltes und des zellulären Gesamtproteins bestimmt. Unter dem Einfluß von AS-ODN ergab sich im Vergleich zu unbehandelten Kulturen (100 %) eine konzentrationsabhängige, bis auf 6 % reduzierte DNA-Synthese sowie eine bis auf 50 % herabgesetzte Zellzahl. Gleiche, wenn auch geringer ausgeprägte Effekte, wurden unter dem Einfluss von S-ODN beobachtet, das die DNA-Synthese bis auf 17 % und die Zellzahl bis auf 64 % inhibierte. Die Proliferationshemmung war in allen Fällen mit einer bis zu 200 % betragenden Zunahme des Gesamtproteingehaltes und des Gehaltes an bFGF der Einzelzelle assoziiert. Lichtmikroskopisch zeigten sich unter AS-ODN-/ S-ODN-Einfluss intakte glatte Muskelzellen mit den deutlichen Merkmalen eines hypertrophen Wachstumstatus. Die Proliferationsinhibition durch die Oligonukleotide war bei anschließender Kultivierung in ODN freiem Medium reversibel, Apoptosereaktionen wurden nicht beobachtet.

Die vorgelegten Ergebnisse zeigen, dass bFGF-mRNA sequenzdeterminierte Antisense-/ Sense-Oligonukleotide eine beträchtliche Sensitivität, aber geringe

Spezifität bezüglich ihrer zellbiologischen Wirkung aufweisen. Die Ursachen für diese auch in anderen Untersuchungen festgestellten Eigenschaften sowie das Ausbleiben der theoretisch vorausgesagten Hemmung der Synthese von bFGF können -wie anhand der Fachliteratur ausführlich dargelegt- vielfältiger Natur sein und sind in weiteren Studien zu klären.

6. Verzeichnisse

6.1. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
Abb.	Abbildung
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
AK	Antikörper
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AS	Antisense
ATP	Adenosin Triphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyphosphat p-Toluidinsalz
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
BSA	Bovine Serumalbumine
chim. PS	Chimäre Phosphorothioate
CMV	Cytomegalie Virus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECM	Extracellular Matrix
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ELISA	Enzym-Linked-Immunosorbent-Assay
ER	Extraplasmatisches Retikulum
ERK	Extrazellulär signal-regulated Kinase
FCS	Fetal Calf Serum
FGF	Fibroblast Growth Factor
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
GDP	Guanindiphosphat
G-Phase	GAP-Phase
GTP	Guanintriphosphat
HBGF	Heparin-binding Growth Factor

Abkürzung	Bedeutung
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HLGAG	heparin- like Glykosaminoglykane
HS	Heparansulfat
HSPG	Heparansulfatproteoglykan
Ig	Immunglobulin
IGF	Insulin-like Growth Factor
IL	Interleukin
kD	Kilo Dalton
LD50	Dosis/kg Körpergewicht bei der 50% der Zellen absterben
LDL	Low Density Lipoprotein
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MB	mixed backbone
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
n	Anzahl der Versuche
nb	nicht bekannt
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
NO	Stickstoffmonoxid
ODN	Oligonukleotid(e)
PBS	Phosphate-buffered Saline
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PI-3-K	Phosphatidylinositol-3'-Kinase
PNA	Peptid nucleic acid
PNAs	Peptid nucleic acids
PPS	Partial Phosphorothioate Oligonucleotides = Teilphosphorothioate
PS	Phosphorothioate
PTCA	Percutaneous Transluminal Coronarangioplasty
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNase H	Ribonuklease H
S	Sense

Abkürzung	Bedeutung
SBTI	soybean trypsin inhibitor
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SDS-Page	Sodium-Dodecyl-Sulfate Polyacrylamisgel-Elektrophorese
SMC	Smooth Muscle Cell
SMCs	Smooth Muscle Cells
S-Phase	Synthese Phase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylethylendiamin
TGF- β	Transforming Growth Factor-beta
TK	Tyrosinkinase
Tyr	Tyrosin
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

6.2. Literaturverzeichnis

- 1 Basilico C, Moscatelli D (1992)
The FGF family of growth factors and oncogenes.
Adv Cancer Res (United States) 59: 115-65
- 2 Armelin HA (1973)
Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth.
PNAS 70: 2702-2706
- 3 Gospodarowicz D (1974)
Localization of fibroblast growth factor and its effects alone and with hydrocortisone on 3T3 cell growth.
Nature 249: 124-127
- 4 Ago H, Kitagawa Y, Fujishima A, Matsuura Y, Katsube Y (1991)
Crystal structure of basic fibroblast growth factor at 1.6Å resolution.
Journal of Biochemistry 110: 360-363
- 5 Aviezer D, Levy E, Safran M (1994)
Differential structural requirements of heparin and heparan sulfate proteoglycans that promote binding of basic fibroblast growth factor to its receptor.
J Biol Chem (United States) 269(1):114-21
- 6 Gospodarowicz D, Cheng J (1986)
Heparin protects basic and acidic FGF from inactivation.
J Cell Physiol (United States): 128(3): 475-84
- 7 Saksela O, Rifkin DB, Saksela O, Moscatelli D, Sommer A (1988)
Endothelial cell-derived heparan sulfate binds basic fibroblast growth factor and protects it from proteolytic degradation.
J Cell Biol (United States) 107(2): 743-51
- 8 Logan A, Hill DJ (1992)
Bioavailability: is this a key event in regulating the actions of peptide growth factors?
J Endocrinol 134(2):157-61
- 9 Ornitz DM, Yayon A, Flanagan JG, Svahn CM, Levi E, Leder P (1992)
Heparin is required for cell-free binding of basic fibroblast growth factor to a soluble receptor and for mitogenesis in whole cells.
Molecular and Cellular Biology 12: 240-247
- 10 Manetti F, Corelli F and Botta M (2000)
Fibroblast growth factors and their inhibitors.
Current Pharmaceutical Design 6: 1897-1924

- 11 Zhu X, Komiya H, Chirino A, Faham S, Fox GM, Arakawa T, Hsu BT, Rees DC (1991)
Three-dimensional structures of acidic and basic fibroblast growth factors.
Science 251: 90-93
- 12 Goldfarb M (1996)
Functions of fibroblast growth factors in vertebrate development.
Cytokines Growth Factors Rev 7(4): 311-325
- 13 Chai N, Patel Y, Jacobson K, Mc Manon J, McManon A, Rappolee DA (1998)
FGF is an essential regulator of fifth cell division in preimplantation mouse embryos.
Developmental Biology 198: 105-115
- 14 Herbert JM, Boyle M, Martin GR (1991)
mRNA-localization studies suggest that murine FGF-5 plays a role in gastrulation.
Development 112: 407-415
- 15 Ortega S, Ittmann M, Tsang SH, Ehrlich M, Basilico C (1998)
Neuronal defects and delayed wound healing in mice lacking fibroblast growth factor-2.
PNAS 95: 5672-5677
- 16 Cohn MJ, Izisua-Belmonte JC, Abud H, Heath JK, Tickle C (1995)
Fibroblast growth factor induce additional limb development from the flank of chick embryos.
Cell 80: 739-746
- 17 Sekine K, Ohuchi H, Fujiwara M, Yamasaki M, Yoshizawa T, Sato T, Yagishita N, Matsui D, Koga Y, Itoh N, Kato S (1999)
FGF-10 is essential for limb and lung formation.
Nature Genetics 21: 138-141
- 18 Okada-Ban M (2000)
Fibroblast growth factor -2.
Int J Biochem Cell Biol 32(3): 263-7
- 19 Lindner V, Lappi DA, Baird A (1991)
Role of basic fibroblast growth factor in vascular lesion formation.
Circ Res (United States), 68(1): 106-13
- 20 Sepp NT, Li-LJ, Lee KH, Brown EJ, Caughman SW, Lawley TJ, Swerlick RA (1994)
Basic fibroblast growth factor increases expression of alphaVbeta3 integrin complex on human microvascular endothelial cells.
Journal of Investigative Dermatology 103: 295-299

- 21 Watanabe E, Smith DM, Sun J, Smart FW, Delcarpio JB, Roberts TB, Van Meter CH, Claycomb WC (1998)
Effect of basic fibroblast growth factor on angiogenesis in the infarcted porcine heart. *Basic Research in Cardiology* 93: 30-37
- 22 Tsuboi R and Rifkin DB (1990)
Recombinant basic fibroblast growth factor stimulates wound healing in healing impaired db/db mice.
Journal of Experimental Medicine 172: 245-251
- 23 Byrd VM, Ballard DW, Mille GG, and Thomas JW (1999).
Fibroblast growth factor -1 (FGF-1) enhances Il-2 production and nuclear translocation of NF - κ B in FGF receptor-bearing Jurkat T cells.
Journal of Immunology 162: 5853-5859
- 24 Ichimura T, Finch PW, Zhang G, Kann M and Stevens JL (1996).
Induction of FGF-7 after kidney damage- a possible paracrine mechanism for tubule repair.
American Journal of Physiology 271: F967-F976
- 25 Powers CJ, McLeskey SW and Wellstein A (2000).
Fibroblast growth factors, their receptors and signaling.
Endocrine-Related Cancer 7: 165-197
- 26 Kornmann M, Ishiwata T, Beger HG and Korc M (1997)
Fibroblast growth factor-5 stimulates mitogenic signaling and is overexpresses in human pancreatic cancer: evidence for autocrine and paracrine actions.
Oncogene 15: 5541-5544
- 27 Takahashi JA, Fukumoto M, Igarashi K, Oda Y, Kikuchi H and Hatanaka M (1992)
Correlation of basic fibroblast growth factor expression levels with the degree of malignancy and vascularity in human gliomas.
Journal of Neurosurgery 76: 792-798
- 28 Abraham JA, Whang JL, Tumolo A, (1986)
Human basic fibroblast growth factor: nucleotide sequence and genomic organization.
EMBO J (England) 5(10): 2523-8
- 29 Botta M, Manetti F, Corelli F (2000)
Fibroblast growth factors and their inhibitors.
Curr Pharm Des (Netherlands) 6(18): 1897-924
- 30 Burchill SA, Westwood G (2002)
Mechanism of basic fibroblast growth factor- induced cell death.
Apoptosis 7(1): 5-12

- 31 Mignatti P, Morimoto T, Rifkin DB (1992)
Basic fibroblast growth factor, a protein devoid of secretory signal sequence, is released by cells via a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex.
J Cell Physiol (United States), 151(1): 81-93
- 32 Miyamoto T, Leconte I, Swain JL (1998)
Autocrine FGF signaling is required for vascular smooth muscle cell survival in vitro.
J Cell Physiol (United States), 177(1): 58-67.
- 33 Burgess WH, Maciag T (1989)
The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins.
Annu Rev Biochem (United States) 58: 575-606
- 34 Olsen NE (1992)
Intimal Smooth muscle cell Proliferation after ballon injury. The role of basic fibroblast growth factor.
Am J Pathol 140: 1017-1023
- 35 Caplice NM, Aroney CN, Bett JH (1997)
Growth factors released into the coronary circulation after vascular injury promote proliferation of human vascular smooth muscle cells in culture.
J Am Coll Cardiol (United States) 29(7): 1536-41
- 36 Crowley ST, Ray CJ, Nawaz D (1995)
Multiple growth factors are released from mechanically injured vascular smooth muscle cells.
Am J Physiol (United States) 269 (5 Pt 2): H1641-7
- 37 Lindner V, Reidy MA (1991)
Proliferation of smooth muscle cells after vascular injury is inhibited by an antibody against basic fibroblast growth factor.
Proc Natl Acad Sci U S A (United States) 88(9): 3739-43
- 38 Rhoads DN, Eskin SG, McIntire LV (2000)
Fluid flow releases fibroblast growth factor-2 from human aortic smooth muscle cells.
Arterioscler Thromb Vasc Biol (United States) 20(2): 416-21
- 39 Cheng GC, Libby P, Grodzinsky AJ (1996)
Induction of DNA synthesis by a single transient mechanical stimulus of human vascular smooth muscle cells. Role of fibroblast growth factor-2.
Circulation (United States) 93(1): 99-105

- 40 Davis MG, Zhou M, Ali S, Coffin JD, Doetschman T, Dorn GW
2nd.(1997)
Intracrine and autocrine effects of basic fibroblast growth factor in
vascular smooth muscle cells.
J Mol Cell Cardiol. 29(4): 1061-1072
- 41 Arese M, Chen Y, Klorkiewicz RZ, Gualandris A, Shen B, Rifkin DB
(1999)
Nuclear Activities of basic fibroblast growth factor : potentiation of low-
serum growth mediated by natural or chimeric nuclear localizing signals.
Mol. Biol. Cell 10: 1429-1444
- 42 Bikfalvi A, Klein S, Pintucci G, Quarto N, Mignatti P, Rifkin DB (1995)
Differential Modulations of cell Phenotype by different molecular weight
forms of basic fibroblast growth factor: possible intracellular signaling by
the high molecular weight forms.
J Cell Biol. 129 (1): 233-243
- 43 Schmidt A, Skaletz-Rorowski A, Buddecke E (1995)
Basic fibroblast growth factor controls expression and molecular structure
of heparan sulfate in corneal endothelial cells.
Eur J Biochem 234 (2): 479-484
- 44 Yayon A, Klagsbrunn M (1991)
Cell surface, heparin-like molecules are required for basic fibroblast
growth factor binding to its high affinity receptor.
Cell 64: 841-848
- 45 Pellegrini L (2001)
Role of heparan sulfate in fibroblast growth factor signaling: a structural
view
Current Opinion in Structural Biology 11: 629-634
- 46 Gallagher JT; Turnbull JE (1992)
Heparan sulphate in the binding and activation of basic fibroblast growth
factor.
Glycobiology 2(6):523-8
- 47 Guimond S; Maccarana M; Olwin BB; Lindahl U; Rapraeger AC (1993)
Activating and inhibitory heparin sequences for FGF-2 (basic FGF).
Distinct requirements for FGF-1, FGF-2, and FGF-4.
J Biol Chem 268(32): 23906-14

- 48 Aviezer D, Levy E, safran M, Svahn C, Buddecke E, Schmidt A, David G, Vlodavsky I, Yayon A (1994)
Differential Structure Requirements of Heparin and Heparan sulfat Proteoglycans that promote binding of basic fibroblast growth factor to ist receptor.
J Biol Chem 269: 114-121
- 49 Habuchi H; Suzuki S; Saito T; Tamura T; Harada T; Yoshida K; Kimata K (1992)
Structure of a heparan sulphate oligosaccharide that binds to basic fibroblast growth factor.
Biochem J 285 (Pt 3): 805-13
- 50 Reiland J; Rapraeger AC (1993)
Heparan sulfate proteoglycan and FGF receptor target basic FGF to different intracellular destinations.
J Cell Sci 105 (Pt 4):1085-9
- 51 Hughes SE (1996)
Localisation and differential expression of the fibroblast growth factor receptor (FGFR) multigene family in normal and atherosclerotic human arteries.
Cardiovasc Res (Netherlands) 32(3): 557-69
- 52 Venkataraman G, Raman R, Sasisekharan V (1999)
Molecular characteristics of fibroblast growth factor-fibroblast growth factor receptor-heparin-like glycosaminoglycan complex. Proc Natl Acad Sci U S A (United States) 96(7): 3658-63
- 53 Johnson DE, Williams LT (1993)
Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family.
Advances in Cancer Research 60: 1-41
- 54 Fernig DG, Gallagher JT (1994)
Fibroblast growth factors and their receptors: an information network controlling tissue growth, morphogenesis and repair.
Prog Growth Factor Res 5 (4): 353-77
- 55 Berry D, Shriver Z, Natke B, Kwan C, Venkataraman G, Sasisekharan R (2003)
Heparan sulphate glykosamoniglycans derived from endothelial cells and smooth muscle cells differentially modulate fibroblast growth factor-2 biological activity through fibroblast growth factor receptor-1.
Biochem J 373(Pt 1): 241-249

- 56 Lee PL, Johnson DE (1989)
Purification and complementary DNA cloning of a receptor for basic fibroblast growth factor.
Science 245: 57-60
- 57 Moscatelli D (1992)
Basic fibroblast growth factor (bFGF) dissociates rapidly from heparan sulfates but slowly from receptors. Implications for mechanisms of bFGF release from pericellular matrix.
J Biol Chem (United States) 267(36): 25803-9
- 58 Liebmann C (2001)
Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity.
Cell Signal (England) 13(11): 777-85
- 59 Fiesel R, Maciag T (1999)
Fibroblast growth factor prototype release and fibroblast growth factor receptor signaling.
Thrombosis and Haemostasis 82(2): 748-754
- 60 Hafizi S. (1997)
Molecular Mechanisms of vascular smooth muscle cell growth.
Current Opinion in Cardiology 12: 495-503
- 61 Chabrier PE (1996)
Growth factors and vascular wall.
Int Angiol 15: 100-103
- 62 Rosenkran S, Böhm M, Kazlauskas A (1999)
Pathophysiologische Bedeutung von Wachstumsfaktoren und neue Therapiekonzepte bei kardiovaskulären Erkrankungen.
Med Klin 94: 496-504
- 63 Berk BC (2001)
Vascular smooth muscle growth: Autocrine growth mechanisms.
Physiological Reviews Vol. 81, No.3
- 64 Vezza R; Habib A; Fitz Gerald GA (1999)
Differential signaling by the thromboxane receptor isoforms via the novel GTP-binding protein.
Gh. J Biol Chem 274(18): 12774-9
- 65 Luo K; Lodish HF (1997)
Positive and negative regulation of type II TGF-beta receptor signal transduction by autophosphorylation on multiple serine residues.
EMBO J 16(8):1970-81

- 66 Vanhoutte P (1989)
Endothelium and control of vascular function: State of the art lecture.
Hypertension 13: 658-667
- 67 Vlodavsky I, Friedman R, Sullivan R, Sass J, Klagsbrun M (1987)
Aortic endothelial cells synthesize basic fibroblast growth factor which
remains cell associated and platelet-derived growth factor –like protein
which is secreted.
J Cell Physiol 131(3): 402-408
- 68 Akopov SE, Orekhov AN, Tertov VV, Khashimov KA, Gabrielyan ES,
Smirnov VN (1988)
Stable analogues of prostacyclin and thromboxane A display contradictory
influences on atherosclerotic properties of cells cultured from human aorta:
the effect of calcium antagonists.
Atherosclerosis 72: 245-248
- 69 Thomae KR, Nakayama DK, Billiar TR, Simmons RL, Pitt BR, Davies P
(1995)
The effect of nitric oxide on fetal pulmonary artery smooth muscle growth.
J Surg Res 59: 337-343
- 70 Heydarkhan-Hagvall S, Helenius G, Johansson BR, Li JY, Mattsson E,
Risberg B (2003)
Co-culture of endothelial cells and smooth muscle cells affects gene
expression of angiogenic factors.
J Cell Biochem 89(6): 1250-1259
- 71 Lindner V, Olson NE, Clowes AW, Reidy MA (1992)
Inhibition of smooth muscle cell proliferation in injured rat arteries.
Interaction of Heparin with basic fibroblast growth factor.
J Clin Invest 90(5): 2044-9
- 72 Vlodavsky I, Folkman J, Sullivan R, Friedman R, Ishai-Michaeli R, Sasse J,
Klagsbrun M (1987)
Endothelial cell-derived basic fibroblast growth factor: synthesis and
deposition into subendothelial extracellular matrix.
PNAS 84: 2292-2296
- 73 Lindner V, Reidy MA (1993)
Expression of basic fibroblast growth factor and its receptor by smooth
muscle cells and endothelium in injured rat arteries.
Circ Res 73(3): 589-95.
- 74 Akimoto S, Ishikawa O, Inijima C (1999)
Expression of basic fibroblast growth factor and its receptor by fibroblast,
macrophages and mast cells in hypertrophic scar.
Eur J Dermatol 9(5): 357-62

- 75 Allera C, Blaes N (1996)
Smooth muscle cells with high alpha-actin level cloned by FGF-2 transfection.
C R Acad Sci III 319 (8): 671-80
- 76 Lundergan CF, Phillips T, Chmielinska JJ, Eisenhower, Katz RJ (1994)
Human atherosclerotic tissue analysis: Mechanisms of restenosis.
JACC 1A-484A, Abstract 734
- 77 Schmidt A, Skaletz-Rorowski A, Breithardt G, Buddecke E (1995)
Growth status-dependant changes of bFGF compartmentalization and heparan sulfate structure in arterial smooth muscle cells.
Eur J Cell Biol 67: 130-134
- 78 Cheng GC, Briggs WH, Gerson DS (1997)
Mechanical strain tightly controls fibroblast growth factor-2 release from cultured human vascular smooth muscle cells.
Circ Res (United States) 80(1): 28-36
- 79 Hartnett ME, Garcia CM, D'Amore PA (1999)
Release of bFGF, an endothelial cell survival factor, by osmotic shock.
Invest Ophthalmol Vis Sci 40(12): 2945-51
- 80 Chai YC, Howe PH, DiCorleto PE, Chisolm GM (1996)
Oxidized low density lipoprotein and lysophosphatidylcholine stimulate cell cycle entry in vascular smooth muscle cells. Evidence for release of fibroblast growth factor-2.
J Biol Chem (United States) 271(30): 17791-7
- 81 Myler HA; West JL (2002)
Heparanase and platelet factor-4 induce smooth muscle cell proliferation and migration via bFGF release from the ECM.
J Biochem (Tokyo)131(6): 913-22
- 82 Bashkin P, Doctrow S, Klagsbrun M, Svahn CM, Folkman J, Vlodavsky I. (1989)
Basic fibroblast growth factor binds to subendothelial extracellular matrix and is released by heparitinase and heparin-like molecules.
Biochemistry 28: 1737-1743
- 83 Flaumenhaft R, Moscatelli D, Saksela O (1989)
Role of extracellular matrix in the action of basic fibroblast growth factor: matrix as a source of growth factor for long-term stimulation of plasminogen activator production and DNA synthesis.
J Cell Physiol (United States) 140(1): 75-81

- 84 Skaletz-Rorowski A, Schmidt A, Breithardt G, Buddecke E. (1996)
Heparin-induced overexpression of basic fibroblast growth factor, basic fibroblast growth factor receptor and cell-associated proteoglycan sulfate in cultured coronary smooth muscle cells.
Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 16: 1063-1069
- 85 Baldin V, Roman AM, Bosc-Bierne I (1990)
Translocation of bFGF to the nucleus is G1 phase cell cycle specific in bovine aortic endothelial cells.
EMBO J (England) 9(5): 1511-7
- 86 Hill DJ; Logan A (1992)
Cell cycle-dependent localization of immunoreactive basic fibroblast growth factor to cytoplasm and nucleus of isolated ovine fetal growth plate chondrocytes.
Growth Factors 7(3): 215-31
- 87 Tanaka H, Sukhova G, Schwartz D (1996)
Proliferating arterial smooth muscle cells after balloon injury express TNF-alpha but not interleukin-1 or basic fibroblast growth factor.
Arterioscler Thromb Vasc Biol (United States) 16(1): 12-8
- 88 Owens GK Owens GK (1989)
Control of hypertrophic versus hyperplastic growth of vascular smooth muscle cells.
Am J Physiol (United States) 257 (6 Pt 2): H1755-65
- 89 Owens GK, Schwartz SM (1982)
Alterations in vascular smooth muscle mass in the spontaneously hypertensive rat. Role of cellular hypertrophy, hyperploidy, and hyperplasia.
Circ Res (United States) 51(3): 280-9
- 90 Owens GK (1998)
Molecular control of vascular smooth muscle cell differentiation.
Acta Physiol Scand 164: 623-635
- 91 Kato S, Shanley JR, Fox JC (1996)
Serum stimulation, cell-cell interactions, and extracellular matrix independently influence smooth muscle cell phenotype in vitro.
Am J Pathol 149(2): 687-97
- 92 Ross R (1993)
The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s.
Nature 362: 801-809

- 93 Yayon, A (1990)
Autokrin regulation of cell growth and transformation by basic fibroblast growth factor.
Cancer Metastasis Rev 9(3): 191-202
- 93 Pickering, JG (1997)
Fibroblast Growth Factor-2 potentiates vascular smooth muscle cells migration to platelet-derived growth factor: upregulation of $\alpha_2\beta_1$ integrin and desassembly of actin filaments.
Circ Res 80(5): 627-637
- 94 Kato S, Muraishi A, Miyamoto T, Fox JC (1998)
Basic fibroblast growth factor regulates extracellular matrix and contractile protein expression independent of proliferation in vascular smooth muscle cells.
In Vitro Cell Dev Biol Anim 34(4): 341-346
- 95 Hayashi K, Takahashi M, Kimura K, Nishida W, Saga H, Sobue K (1999)
Changes in the balance of phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B (Akt) and the mitogen-activated protein kinases (ERK/p38MAPK) determine a Phenotype of visceral and vascular smooth muscle cells.
J Cell Biol 17; 145(4): 727-40
- 96 Hao H, Ropraz P, Verin V, Camenzind E, Geinoz A, Pepper MS, Gabbiani G, Bochaton-Pillat ML (2002)
Heterogeneity of smooth muscle cell populations cultured from pig coronary artery.
Arterioscler Thromb Vasc Biol 22(7): 1093-1099
- 97 Calara F, Ameli S, Hultgardh-Nilsson A, Cercek B, Kupfer J, Hedin U, Forrester J, Shah PK, Nilsson J (1996)
Autocrine Induction of DNA synthesis by mechanical injury of cultured smooth muscle cells. Potential role of bFGF and PDGF. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 16(2): 187-93
- 98 Belgore F, Lip GY, Blann AD (2003)
Basic fibroblast growth factor induces the secretion of vascular endothelial growth factor by human aortic smooth muscle cells but not by endothelial cells.
Eur J Clin Invest 33(10): 833-839
- 99 Itoh H, Mukoyama M, Pratt RE (1993)
Multiple autocrine growth factors modulate vascular smooth muscle cell growth response to Angiotensin II.
J Clin Invest 91: 2268-2274

- 100 Ali, S. Ali S, Davis MG, Becker MW (1993)
Thromboxane A₂ stimulates vascular smooth muscle hypertrophy by up-regulating the synthesis and release of endogenous basic fibroblast growth factor.
J Biol Chem (United States) 268(23): 17397-403
- 101 Cucina A, Borrelli V, Lucarelli M, Sterpetti AV, Gavallaro A, Strom R, Santoro-D'Angelo L, Scarpa S (2002)
Autocrine production of basic fibroblast growth factor translated from novel synthesized mRNA mediates thrombin-induced mitogenesis in smooth muscle cells. Cell Biochem Funct 20: 39-46
- 102 Kimura I; Okabe M; Ogasawara M; Kimura M (1996)
Competence effect of basic fibroblast growth factor on cell cycle in subcultured endothelial cells of rat aorta by flow cytometry.
Jpn J Pharmacol 71(1): 21-7
- 103 Hughes SE, Crossman D, Hall PA (1993)
Expression of basic and acidic fibroblast growth factors and their receptor in normal and atherosclerotic human arteries.
Cardiovasc Res (England) 27(7): 1214-9
- 104 Dorn GW; Becker MW; Davis MG (1992)
Dissociation of the contractile and hypertrophic effects of vasoconstrictor prostanoids in vascular smooth muscle.
J Biol Chem 267(34): 24897-905
- 105 Berk BC, Vekshtein V, Gordon HM (1989)
Angiotensin II-stimulated protein synthesis in cultured vascular smooth muscle cells.
Hypertension (United States) 13(4): 305-14
- 106 Geisterfer AA, Owens GK (1989)
Arginine vasopressin-induced hypertrophy of cultured rat aortic smooth muscle cells.
Hypertension (United States) 14(4): 413-20
- 107 Koibuchi Y, Lee WS, Gibbon GH and Pratt RE (1993)
Role of Transforming Growth Factor-beta 1 in the cellular growth response to angiotensin II.
Hypertension, 21: 1046-1050
- 108 Craven PA, Studer RK, De Rubertis FR (1996)
Thromboxane/prostaglandin endoperoxide-induced hypertrophy of rat vascular smooth muscle cells is signaled by protein kinase C-dependent increases in transforming growth factor-beta.
Hypertension 28(2): 169-76

- 109 Cotter TG, Lennon SV, GlynnJG, Martin SJ (1990)
Cell death via apoptosis and its relationship to growth. Development and differentiation of both tumor and normal cells.
Anticancer Res 10: 1153-1160
- 110 Mayr M, Xu Q (2001)
Smooth muscle cell apoptosis in arteriosclerosis.
Exp Gerontol 36(7): 969-87
- 111 Geng YJ (1997)
Regulation of programmed cell death or apoptosis in atherosclerosis.
Heart Vessels Suppl 12: 76-80
- 112 Kockx MM, Herman AG (2000)
Apoptosis in atherosclerosis: beneficial or detrimental?
Cardiovasc Res 45(3): 736-46
- 113 Bennett MR, Evan GI, Schwartz SM (1995)
Apoptosis of human vascular smooth muscle cells derived from normal vessels and coronary atherosclerotic plaques.
J Clin Invest 95(5): 2266-74
- 114 Geng YJ (2001)
Molecular signal transduction in vascular cell apoptosis.
Cell Res 11(4): 253-64
- 115 Isner JM, Kearney M, Bortman S, Passeri J (1995)
Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis.
Circulation 91(11): 2703-11
- 116 Zamecnik PC and Stephenson ML (1978)
Inhibition of Rous sarcoma virus replication and transformation by a specific oligodeoxynucleotide.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 280-284
- 117 Simons RW (1988)
Naturally occurring antisense RNA control - a brief review.
Gene (Netherlands) 72(1-2): 35-44
- 118 Simons RW, Kleckner N. (1988)
Biological regulation by antisense RNA in prokaryotes.
Annu Rev Genet (United States) 22: 567-600
- 119 Uhlmann E (1998)
Antisense-Oligonucleotide- ein universelles Therapieprinzip. Chemie in unserer Zeit, 32. Jahrg. Nr.3

- 120 Cowsert LM, Fox MC, Zon G (1993)
In vitro evaluation of phosphorothioate oligonucleotides targeted to the E2 mRNA of papillomavirus: potential treatment for genital warts.
Antimicrob Agents Chemother (United States) 37(2): 171-7
- 121 Baker BF, Condon TP, Koller E (2001).
Discovery and analysis of antisense oligonucleotide activity in cell culture.
Methods (United States) 23(2):191-8
- 122 Stein CA (1999)
Two problems in antisense biotechnology: in vitro delivery and the design of antisense experiments.
Biochem et Biophys Acta 1489: 45 – 52 (Review)
- 123 Giles RV, Spiller DG, Tidd DM (1995)
Detection of ribonuclease H-generated mRNA fragments in human leukemia cells following reversible membrane permeabilization in the presence of antisense oligodeoxynucleotides.
Antisense Res Dev (United States) 5(1): 23-31
- 124 Stein CA, Subasinghe C, Shinozuka K (1988)
Physicochemical properties of phosphorothioate oligodeoxynucleotides.
Nucleic Acids Res (England) 16(8): 3209-21
- 125 Thein SL, Wallace RB (1986)
The use of synthetic oligonucleotides specific hybridization probes in the diagnosis of genetic disorders, in K.E. Davies, *Human genetic diseases: A practical approach*.
IRL press, Oxford 33-50
- 126 Helene C. in Cohen JS (1989),
Oligodesoxynucleotides
London: Macmillan Press 137-172
- 127 Gosh MK (1992)
In Cohen WE, Moldave, K. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. New York: Wiley-Liss, Inc
- 128 Bennett MR, Schwartz SM (1995)
Antisense therapy for angioplasty restenosis. Some critical considerations.
Circulation (United States) 92(7): 1981-93
- 129 Shoji Y, Akhtar S, Periasamy A(1991)
Mechanism of cellular uptake of modified oligodeoxynucleotides containing methylphosphonate linkages.
Nucleic Acids Res (England) 19(20): 5543-50.

- 130 Budker VG, Knorre DG, Vlassov VV. (1992)
Cell membranes as barriers for antisense constructions.
Antisense Res Dev (United States) 2(2): 177-84
- 131 Bennett RM, Gabor GT, Merritt MM. (1985)
DNA binding to human leukocytes. Evidence for a receptor-mediated
association, internalization, and degradation of DNA.
J Clin Invest (United States) 76(6): 2182-90
- 132 Loke SL, Stein CA, Zhang XH. (1989).
Characterization of oligonucleotide transport into living cells.
Proc Natl Acad Sci U S A (United States) 86(10): 3474-8.
- 133 Beltinger C, Saragovi HU, Smith RM.(1995)
Binding, uptake, and intracellular trafficking of phosphorothioate-modified
oligodeoxynucleotides.
J Clin Invest (United States) 95(4): 1814-23
- 134 Yakubov L, Yurchenko L, Nechaeva M. (1991)
Interaction of oligonucleotides with cellular receptors.
Nucleic Acids Symp Ser (England) (24): 311
- 135 Zamecnik P, Aghajanian J, Zamecnik M. (1994)
Electron micrographic studies of transport of oligodeoxynucleotides across
eukaryotic cell membranes.
Proc Natl Acad Sci U S A (United States) 91(8): 3156-60.
- 136 Gao WY, Storm C, Egan W, et al. (1992). Cellular pharmacology of
phosphorothioate homooligodeoxynucleotides in human cells.
Mol Pharmacol (United States) 43(1): 45-50.
- 137 Eto F, Tenu JP, Teiger E. (1998)
Sequence dependency of the internalization and distribution of
phosphorothioate oligonucleotides in vascular smooth muscle cells.
Biochem Pharmacol (England) 55(9): 1465-73
- 138 Peymann A, Rytte A., Helsing M., Kretzschmar G., Mag M., Uhlmann E
(1995)
Enhanced cellular uptake of G-rich oligonucleotides.
Nucleosides and Nucleotides 14 (3-5): 1077-1081
- 139 Lebedeva I, Benimetskaya L, Stein CA (2000).
Cellular delivery of antisense oligonucleotides.
Eur J Pharm Biopharm (Netherlands) 50(1): 101-19
- 140 Miller PS, McParland KB, Jayaraman K (1981)
Biochemical and biological effects of nonionic nucleic acid
methylphosphonates. Biochemistry (United States) 20(7): 1874-80

- 141 Vosberg HP, Eckstein F (1982)
Effect of deoxynucleoside phosphorothioates incorporated in DNA on cleavage by restriction enzymes.
J Biol Chem (United States) 257(11): 6595-9
- 142 Crooke ST (1999)
Molecular mechanisms of action of antisense drugs.
Biochim Biophys Acta (Netherlands) 1489(1): 31-44
- 143 Cook PD (1999). Making drugs out of oligonucleotides: a brief review and perspective.
Nucleosides Nucleotides (United States) 18(6-7): 1141-62
- 144 Agrawal S, Iyer RP. (1997)
Perspectives in antisense therapeutics.
Pharmacol Ther Vol 76, Nos 1-3: 151-160
- 145 Benimetskaya L, Tonkinson JL, Koziolkiewicz M, Karwowski B, Guga P, Zeltser R, Stec W, Stein CA (1995)
Binding of phosphorothioate oligonucleotides to basic fibroblast growth factor, recombinant soluble CD4, laminin and fibronectin is P-chirality independent.
Nucleic Acids Res (England) 23(21): 4239-45.
- 146 Neckers LA, Iyer K (1998)
Nonantisense effects of antisense oligonucleotides. In CA Stein, A Krieg (Eds), Applied Antisense Oligonucleotide Technology (pp147-160). New York: Wiley-Liss.
- 147 Guvakova MA, Yakubov LA, Vlodaysky I. (1994).
Phosphorothioate oligodeoxynucleotides bind to basic fibroblast growth factor, inhibit its binding to cell surface receptors, and remove it from low affinity binding sites on extracellular matrix.
J Biol Chem (United States) 270(6): 2620-7
- 148 Rockwell P, O'Connor WJ, King K (1997)
Cell-surface perturbations of the epidermal growth factor and vascular endothelial growth factor receptors by phosphorothioate oligodeoxynucleotides.
Proc Natl Acad Sci U S A (United States) 94(12): 6523-8
- 149 Levin AA (1999)
A review of the issues in the pharmacokinetics and toxicology of phosphorothioate antisense oligonucleotides.
Biochim Biophys Acta (Netherlands) 1489(1): 69-84

- 150 Yakubov L, Khaled Z, Zhang LM (1993)
Oligodeoxynucleotides interact with recombinant CD4 at multiple sites.
J Biol Chem (United States), 268(25): 18818-23.
- 151 Agrawal S, Zhang X, Cai Q (1998).
Effect of aspirin on protein binding and tissue disposition of
oligonucleotide phosphorothioate in rats.
J Drug Target (Switzerland) 5(4): 303-12
- 152 Agrawal S (1996)
Antisense Oligonucleotides:towards clinical trials. Trends.
Biotechnol 14: 376-387
- 153 Ma DDF, Ree T, Naqui NA, Cook PD (2000)
Synthetic oligonucleotides as therapeutics: the coming of age.
Biotechnology Annual Review Vol 5: 155-196
- 154 Pirollo KF; Rait A; Sleer LS; Chang EH (2003)
Antisense therapeutics: from theory to clinical practice [In Process
Citation]
Pharmacol Ther 99(1) :55-77
- 155 Summerton J (1999)
Morpholino antisense oligomers: the case for RNase H-independent
structural type.
Biochimica et Biophysica Acta 1489: 141-158
- 156 Stein C, Cohen J (1989)
Phosphorothioate analogues.
In Cohen J, ed. Antisense inhibitors of gene expression.
Boca Raton, Fla: CRC Press: 97-108
- 157 Peymann A, Uhlmann E (1996)
Minimally modified oligonucleotides. Combination of end-capping and
pyrimidine-protection.
Biol. Chem. Hoppe Seyler. Vol 377: 67-70
- 158 Galderisi U, Cascino A, Giordano A (1999)
Antisense oligonucleotides as therapeutic agents.
J Cell Physiol (United States) 181(2): 251-7.
- 159 Agrawal S (1999)
Importance of nucleotide sequence and chemical modifications of
antisense oligonucleotides.
Biochim Biophys Acta (Netherlands) 1489(1): 53-68

- 160 Agrawal S, Kandimalla R (2000).
Antisense therapeutics: Is it as simple as complementary base recognition?
Molecular medicine today, Vol 6: 72-81
- 161 Donis-Keller H (1979)
Site specific enzymatic cleavage of RNA.
Nucleic Acids Res (England) 7(1): 179-92
- 162 Galderisi U, Di Bernardo G, Melone MA (1999)
Antisense inhibitory effect: a comparison between 3'-partial and full
phosphorothioate antisense oligonucleotides.
J Cell Biochem (United States) 74(1): 31-7.
- 163 Tamsamani J, Roskey A, Chaix C (1997)
In vivo metabolic profile of a phosphorothioate oligodeoxyribonucleotide.
Antisense Nucleic Acid Drug Dev (United States) 7(3): 159-65.
- 164 Belikova, AM, Zarytova VF, Grineva NI
Synthesis of ribonucleosides and diribonucleosides phosphates containing
2-chloroethylamine and nitrogen mustard residues.
Tetrahedon Lett 37, 3557-3562
- 165 Paterson BM, Roberts BE, Kuff EL (1977)
Structural gene identification and mapping by DNA-mRNA hybrid-
arrested cell-free translation.
Proc Natl Acad Sci U S A (United States) 74(10): 4370-4
- 166 Vitravene Study Group (2002)
A randomized controlled clinical trial of intravitreal fomivirsen for
treatment of newly diagnosed peripheral cytomegalovirus retinitis in
patients with AIDS.
Am J Ophthalmol 133(4):467-74
- 167 Henry SP, Miner RC, Drew WL, Fitchett J, York-Defalco C, Rapp LM,
Levin AA (2001)
Antiviral activity and ocular kinetics of antisense oligonucleotides
designed to inhibit CMV replication.
Invest Ophthalmol Vis Sci 42(11): 2646-51
- 168 Detrick B, Nagineni CN, Grillone LR, Anderson KP, Henry SP, Hooks JJ
(2001)
Inhibition of human cytomegalovirus replication in a human retinal
epithelial cell model by antisense oligonucleotides.
Invest Ophthalmol Vis Sci 42(1): 163-9
- 169 Hogrefe RI (1999)
An antisense oligonucleotide primer.
Nucleic Acid Drug Dev (United States) 9(4): 351-7

- 170 Webb A, Cunningham D, Cotter F (1997)
BCL-2 antisense therapy in patients with non-Hodgkin lymphoma.
Lancet (England) 349(9059): 1137-41
- 171 Waters JS, Webb A, Cunningham D, Clarke PA, Raynaud F, di Stefano F, Cotter FE (2000)
Phase I clinical and pharmacokinetic study of bcl-2 antisense oligonucleotide therapy in patients with non-Hodgkin's lymphoma.
J Clin Oncol 18(9): 1812-23
- 172 Morris MJ, Tong WP, Cordon-Cardo C, Drobnjak M, Kelly WK, Slovin SF, Terry KL, Siedlecki K, Swanson P, Rafi M, Di Paola RS, Rosen N, Scher HI (2002)
Phase I trial of BCL-2 antisense oligonucleotide (G3139) administered by continuous intravenous infusion in patients with advanced cancer.
Clin Cancer Res 8(3): 679-83
- 173 Rudin CM, Otterson GA, Mauer AM, Villalona-Calero MA, Tomek R, Prange B, George CM, Szeto L, Vokes EE (2002)
A pilot trial of G3139, a bcl-2 antisense oligonucleotide, and paclitaxel in patients with chemorefractory small-cell lung cancer.
Ann Oncol 13(4): 539-45
- 174 Chi KN, Gleave ME, Klasa R, Murray N, Bryce C, Lopes de Menezes DE, D'Aloisio S, Tolcher AW (2001)
A phase I dose-finding study of combined treatment with an antisense Bcl-2 oligonucleotide (Genasense) and mitoxantrone in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer.
Clin Cancer Res 7(12): 3920-7
- 175 Chen HX, Marsdhal JL, Trock N, Ling Y, Baidas S, Rizvi N, Bhargava P, Lippmann ME, Yang D, Hayes DF (2000)
A phase I study of BCL-2 antisense G3139 (Genta) and weekly docetaxel in patients with advanced breast cancer and other solid tumors
Proc Am Soc Clin Oncol 19: 178a
- 176 Jansen B, Wacheck V, Heere-Ress E, Schlagbauer-Wadl H, Hoeller C, Lucas T, Hoermann M, Hollenstein U, Wolff K, Pehamberger H (2000)
Chemosensitisation of malignant melanoma by BCL2 antisense therapy.
Lancet 356 (9243):1728-33
- 177 Hakansson A, Gustafsson B, Abdiu A, Krysander L, Hakansson L (2003)
Bcl-2 expression in metastatic malignant melanoma. Importance for the therapeutic efficacy of biochemotherapy.
Cancer Immunol Immunother 52(4): 249-54

- 178 Marcucci G, Bloomfield CD, Balcerzak SP, Chen K, Byrd JC, Kraut EH, Grever, M.R., Caligiuri, M.A. (2001)
Biological activity of G3139 (Genasense), a BCL-2 antisense (AS), in refractory or relapsed acute leukemia
Proc AM Soc Clin Oncol 20: 288a
- 179 Marcucci G, Byrd JC, Dai G, Klisovic MI, Kourlas PJ, Young DC, Cataland SR, Fisher DB, Lucas D, Chan KK, Porcu P, Lin ZP, Farag SF, Frankel SR, Zwiebel JA, Kraut EH, Balcerzak SP, Bloomfield CD, Grever MR, Caligiuri MA (2003)
Phase I and pharmacodynamic studies of G3139, a Bcl-2 antisense oligonucleotide, in combination with chemotherapy in refractory or relapsed acute leukemia.
Blood 101(2): 425-32
- 180 Niiler E (2001)
Analysts: Isis-Lilly deal validates antisense.
Nat Biotechnol (United States) 19(10): 898-9
- 181 Flaherty KT, Stevenson JP, O'Dwyer PJ (2001)
Antisense therapeutics: lessons from early clinical trials.
Curr Opin Oncol (United States) 13(6): 499-505
- 182 Coudert B, Anthony A, Fiedler W (2001)
Phase II trial with ISIS 5132 in patients with small-cell (SCLC) and non-small cell (NSCLC) lung cancer. A European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) Early Clinical Studies Group report.
Eur J Cancer (England) 37(17): 2194-8
- 183 Saleh M, Posey J, Pleasant L, Lobuglio A, Moore M, Dorr A und Holmlund J (2000)
A Phase II trial of ISIS 2503, an antisense inhibitor of H-ras, as first line therapy for advanced colorectal carcinoma.
Proc Am Soc Clin Onkol 19: 318a
- 184 Dang T, Johnson D, Kelly K, Rizvi N, Holmlund J und Dorr A (2002)
Multicenter phase II trial of an antisense inhibitor of H-ras (ISIS 2503) in advanced non-small cell lung cancer.
Proc Am Soc Clin Oncol 20: 332a
- 185 Perez RP, Smith III J, Alberts SR, Kaufmann H., Dorr A und Holmlund J (2001)
Phase II trial of ISIS 2503, an antisense inhibitor of H-ras, in patients with advanced pancreatic carcinoma
Proc Am Soc Clin Oncol 20:158a

- 186 Yu RZ, Su JQ, Grundy JS, Geary RS, Sewell KL, Dorr A, Levin AA (2003)
Prediction of clinical responses in a simulated phase III trial of Crohn's patients administered the antisense phosphorothioate oligonucleotide ISIS 2302: comparison of proposed dosing regimens [In Process Citation].
Antisense Nucleic Acid Drug Dev 13(1): 57-66
- 187 Maksymowych WP, Blackburn WD, Tami JA, Shanahan WR (2002)
A randomized, placebo controlled trial of an antisense oligodeoxynucleotide to intercellular adhesion molecule-1 in the treatment of severe rheumatoid arthritis.
J Rheumatol; 29(3): 447-53
- 188 Mann MJ, Whittemore AD, Donaldson MC (1999)
Ex-vivo gene therapy of human vascular bypass grafts with E2F decoy; the PREVENT single-center, randomised, controlled trial.
Lancet 354: 1493-1498
- 189 SoRelle R (2001)
Late-breaking clinical trials at the American Heart Association's scientific sessions 2001
Circulation 104: E9046-E9048
- 190 Terashima M, Grube E, Takahshi T (2002)
Intraoperative cell-cycle blockade using E2F decoy for prevention of early atherosclerosis in coronary bypass vein grafts: a volumetric IVUS subanalysis from a prospective randomized double blind clinical trial.
J Am Coll Cardiol 39: 228A
- 191 Shi Y, Hutchinson HG, Hall DJ, Zalewski A (1993)
Downregulation of c-myc expression by antisense oligonucleotides inhibits downregulation human smooth muscle cells.
Circulation 88: 1190-1195
- 192 Kutryk MJ, Foley DP, van den Brand M, Hamburger JN, van der Giessen WJ, de Feyter PJ, Bruining N, Sabate M, Serruys PW (2002)
Local intracoronary administration of antisense oligonucleotide against c-myc for the prevention of in-stent restenosis: results of the randomized investigation by the Thoraxcenter of antisense DNA using local delivery and IVUS after coronary stenting (ITALICS) trial.
J Am Coll Cardiol 39(2): 281-7
- 193 McKay MJ, Gaballa MA (2001)
Gene transfer therapy in vascular diseases.
Cardiovasc Drug Rev Fall 19(3): 245-62

- 194 Khurana R; Martin JF; Zachary I (2001)
Gene therapy for cardiovascular disease: a case for cautious optimism.
Hypertension 38(5): 1210-6
- 195 Rutanen J; Markkanen J; Yla-Herttuala S (2002)
Gene therapy for restenosis: current status.
Drugs 62(11): 1575-85
- 196 Kyhse-Andersen J (1984)
Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose.
J Biochem Biophys Methods 10(3-4): 203-9
- 197 Li GH, Yang GJ (1998)
Inhibitory effect of antisense basic fibroblast growth factor oligonucleotides on proliferation of cultured aortic smooth muscle cells induced by angiotensin II in SHR rats.
Acta Pharmacol. Sinica 19(2): 132-135
- 198 Schmidt A, Sindermann J, Peymann A, Uhlmann E, Will DW, Müller JG, Breitdardt G, Buddecke E (1997)
Sequence-specific antiproliferative effects of antisense and end-capping-modified antisense oligonucleotides targeted against the 5'-terminus of basic-fibroblast-growth factor mRNA in coronary smooth muscle cells.
Eur. J. Biochem 248: 543-549
- 199 Itoh H, Mukoyama M, Pratt RE (1992)
Specific blockade of basic fibroblast growth factor gene expression in endothelial cells by antisense oligonucleotide.
Biochem Biophys Res Commun (United States) 188(3): 1205-13
- 200 Villa AE, Guzman LA, Poptic EJ (1995)
Effects of antisense c-myc oligonucleotides on vascular smooth muscle cell proliferation and response to vessel wall injury.
Circ. Res. 76, 505-513.
- 201 Lövdahl C, Thyberg J, Cercek B, Blomgren K, Dimayuga P, Kallin B, Hultgadh-Nilsson A (1999)
Antisense oligonucleotides to stromelysin mRNA inhibit injury-induced proliferation of arterial smooth muscle cells.
Histol Histopathol 14: 1101-1112
- 202 Pickering JG, Isner M, Ford CM, Weir L, Chow LH (1996)
Processing of chimeric antisense oligonucleotides by human vascular smooth muscle cells and human atherosclerotic plaque.
Circulation Vol 93, No.4

- 203 Gunn J, Holt CM, Francis SE (1997)
The Effect of Oligonucleotides to c- myb on vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation after porcine coronary angioplasty.
Circ. Res. 80: 520-531
- 204 Stein CA (1996)
Phosphorothioate antisense oligonucleotides: Questions of specificity.
Trends Biotechnol 14: 147-149
- 205 Bergan RC, Kyle E, Connell Y (1995)
Inhibition of protein-tyrosine kinase activity in intact cells by the aptameric action of oligodeoxynucleotides.
Antisense Res Dev (United States) 5(1): 33-8
- 206 Fennewald SM, Rando RF (1995)
Inhibition of high affinity basic fibroblast growth factor binding by oligonucleotides.
J Biol Chem (United States) 270(37): 21718-21
- 207 Smith FW, Lau FW, Feigon J (1994)
d(G3T4G3) forms an asymmetric diagonally looped dimeric quadruplex with guanosine 5'-syn-syn-anti and 5'-syn-anti-anti N-glycosidic conformations.
Proc Natl Acad Sci U S A (United States) 91(22): 10546-50
- 208 Crooke ST (1999)
Progress in antisense technology: the end of the beginning.
Methods in Enzymology 313: 3-45
- 209 Morishita R, Nakagami H, Taniyama Y (1998)
Oligonucleotide-based gene therapy for cardiovascular disease.
Clin Chem Lab Med (Germany) 36(8): 529-34
- 210 Bates PJ, Kahlon JB, Thomas SD (1999)
Antiproliferative activity of G-rich oligonucleotides correlates with protein binding.
J Biol Chem (United States) 274(37): 26369-77
- 211 Wang W, Chen HJ, Schwartz A (1996)
Sequence-independent inhibition of in vitro vascular smooth muscle cell proliferation, migration, and in vivo neointimal formation by phosphorothioate oligodeoxynucleotides.
J Clin Invest (United States) 98(2): 443-50
- 212 Bennett CF, Chiang MY, Wilson-Lingardo L (1994)
Sequence specific inhibition of human type II phospholipase A2 enzyme activity by phosphorothioate oligonucleotides.
Nucleic Acids Res (England) 22(15): 3202-9

- 213 Uhlmann U, Peymann, A (1990)
Antisense Oligonucleotides: A therapeutic principle.
Chemical Reviews Vol 90, No.4: 544-579
- 214 Krieg AM (1999)
Mechanisms and applications of immune stimulatory CpG
oligodeoxynucleotides.
Biochim Biophys Acta (Netherlands) 1489(1): 107-16
- 215 Lambert DL, Malik N, Shepherd L (2001)
Localization of c-Myb and induction of apoptosis by antisense
oligonucleotide c-Myb after angioplasty of porcine coronary arteries.
Arterioscler Thromb Vasc Biol (United States) 21(11): 1727-32
- 216 Fox JC, Shanley JR (1996)
Antisense inhibition of basic fibroblast growth factor induces apoptosis in
vascular smooth muscle cells.
J Biol Chem (United States) 271(21): 12578-84
- 217 Hiroyuki Y (1998)
In vitro growth suppression of vascular smooth muscle cells using adeno-
virus-mediated gene transfer of a truncated form of fibroblast growth
factor receptor.
Atherosclerosis 141: 125-132
- 218 Speir E, Epstein SE (1992)
Inhibition of smooth muscle cell proliferation by an antisense
oligodeoxynucleotide targeting the messenger RNA encoding proliferating
cell nuclear antigen.
Circulation (United States) 86(2): 538-47
- 219 Simons M, Rosenberg RD (1992)
Antisense nonmuscle myosin heavy chain and c-myb oligonucleotides
suppress smooth muscle cell proliferation in vitro.
Circ Res (United States) 70(4): 835-43
- 220 Manoharan M (2002)
Oligonucleotide conjugates as potential antisense drugs with improved
uptake, biodistribution, targeted delivery, and mechanism of action.
Antisense Nucleic Acid Drug Dev (United States) 12(2): 103-28
- 221 Bennett RM (1993)
As nature intended? The uptake of DNA and oligonucleotides by
eukaryotic cells.
Antisense Res Dev (United States), Fall 1993, 3(3): 235-41

- 222 Wagner RW (1994)
Gene inhibition using antisense oligodeoxynucleotides.
Nature (England) 372(6504): 333-5
- 223 Stein CA, Cheng YC (1993)
Antisense oligonucleotides as therapeutic agents--is the bullet really magical?
Science (United States) 261(5124): 1004-12
- 224 Akhtar S, Kole R, Juliano RL (1991)
Stability of antisense DNA oligodeoxynucleotide analogs in cellular extracts and sera.
Life Sci (England) 49(24):1 793-801
- 225 Liang E, Ajmani PS, Hughes JA (1999)
Oligonucleotide delivery: a cellular prospective.
Pharmazie (Germany) 54(8): 559-66
- 226 Krieg AM, Gmelig-Meyling F, Gourley MF (1991)
Uptake of oligodeoxyribonucleotides by lymphoid cells is heterogeneous and inducible.
Antisense Res Dev (United States) 1(2): 161-71
- 227 Juliano RL, Alahari S, Yoo H (1999)
Antisense pharmacodynamics: critical issues in the transport and delivery of antisense oligonucleotides.
Pharm Res (United States) 16(4): 494-502
- 228 Schmajuk G, Sierakowska H, Kole R (1999)
Antisense oligonucleotides with different backbones. Modification of splicing pathways and efficacy of uptake.
J Biol Chem (United States) 274(31): 21783-9
- 229 Wu-Pong S, Weiss TL, Hunt CA (1994)
Antisense c-myc oligonucleotide cellular uptake and activity.
Antisense Res Dev (United States), Fall 1994, 4(3) p155-63
- 230 Tonkinson JL, Stein CA (1994)
Patterns of intracellular compartmentalization, trafficking and acidification of 5'-fluorescein labeled phosphodiester and phosphorothioate oligodeoxynucleotides in HL60 cells.
Nucleic Acids Res (England) 22(20): 4268-75
- 231 Farrell CL, Bready JV, Kaufman SA (1995)
The uptake and distribution of phosphorothioate oligonucleotides into vascular smooth muscle cells in vitro and in rabbit arteries.
Antisense Res Dev (United States), Fall 1995, 5(3) p175-83

- 232 Zelphati O, Szoka FC (1996)
Mechanism of oligonucleotide release from cationic liposomes.
Proc Natl Acad Sci U S A (United States) 93(21): 11493-8
- 233 Bennett CF, Chiang MY, Chan H (1992)
Cationic lipids enhance cellular uptake and activity of phosphorothioate antisense oligonucleotides.
Mol Pharmacol (United States) 41(6): 1023-33
- 234 Matveeva OV, Tsodikov AD, Giddings M (2000)
Identification of sequence motifs in oligonucleotides whose presence is correlated with antisense activity.
Nucleic Acids Res (England) 28(15): 2862-5
- 235 Abraham JA, Mergia A, Whang JL, Tumolo A, Friedman J, Hjerrild KA, Gospodarowicz D, Fiddes JC (1986)
Nucleotide Sequence of a bovine clone encoding the angiogenic protein, basic fibroblast growth factor.
Science Vol 233: 545-548
- 236 Freier S, Lima W, Sanghvi Y (1992)
Thermodynamics of antisense oligonucleotide by hybridization. In: Erickson R, Izant J editors gene regulation: Biology of antisense RNA and DNA.
New York Raven Press,1992; 95-109
- 237 Bennett MR, Anglin S, McEwan JR, Jagoe R, Newby AC, Evan GI (1994)
Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation in vitro and in vivo by c-myc antisense oligonucleotides. J Clin Invest 93: 820-828
- 238 Owens GK (1995)
Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells.
Physiol Rev (United States) 75(3): 487-517
- 239 Owens GK (1996)
Role of alterations in differentiated state of vascular smooth muscle cells in atherogenesis.
aus „Atherosclerosis and coronary artery disease, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia
- 240 Chamley-Campbell JH (1981)
What controls smooth muscle Phänotype?
Atherosclerosis 40: 347-357
- 241 Hultgardh-Nilsson A, Lovdahl C, Blomgren K (1997)
Expression of Phänotype- and proliferation-related genes in rat aortic smooth muscle cells in primary culture.
Cardiovasc Res (Netherlands) 34(2): 418-30

- 242 Wen JK, Han M, Zheng B (2002)
Comparison of gene expression patterns and migration capability at quiescent and proliferating vascular smooth muscle cells stimulated by cytokines.
Life Sci (England) 70(7): 799-807
- 243 Graham LD; Hayward IP; Fitzgerald M; Whitelock JM; Bingley JA; Campbell JH; Underwood PA (1997)
Inhibition of Phenotype modulation, growth, and migration of vascular smooth muscle cells by a guanosine-rich 30-mer phosphorothioate oligodeoxynucleotide
Cell Biol Int 21(9): 585-94
- 244 Ishihara M, Shaklee PN, Yang Z. (1994)
Structural features in heparin which modulate specific biological activities mediated by basic fibroblast growth factor.
Glycobiology (England) 4(4): 451-8
- 245 Segev A, Aviezer D, Safran M (2002)
Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by a novel fibroblast growth factor receptor antagonist.
Cardiovasc Res (Netherlands) 53(1): 232-41
- 246 Regan J, Ben-Sasson SA (1993)
Mimicry of biological macromolecules by polyaromaticanionic compounds.
J Bioact Compat Polymer 8: 317-337
- 247 Benezra M, Ben-Sasson SA, Vlodaysky I (1999)
Antiproliferative activity to vascular smooth muscle cells and receptor binding of heparin- mimicking polyaromatic compounds.
Arterioscler Thromb 14: 1992-9
- 248 Miao HQ, Ornitz DM, Aingorn E, Ben-Sasson SA, Vlodaysky I (1997)
Modulation of fibroblast growth factor-2 receptor binding, dimerization, signaling, and angiogenic activity by a synthetic heparin-mimicking polyanionic compound.
J Clin Invest 99: 1565-1575
- 249 Francis DJ, Parish CR, McGarry M, Santiago FS, Lowe HC, Brown KJ, Bingley JA, Hayward IP, Cowden WB, Campbell JH, Gordon R, Chestermann CN, Khachigian LM (2003)
Blockade of vascular smooth muscle cell proliferation and intimal thickening after balloon injury by the sulfated oligosaccharide PI-88: Phosphomannopentaose.
Circ Res, Vol 92 (8): e70-e77

- 250 Schmidt A, Vlodaysky I, Volker W (1999)
Differentiation of coronary smooth muscle cells to a cell cycle-arrested hypertrophic growth status by a synthetic non-toxic heparin-mimicking compound.
Atherosclerosis (Ireland) 147(2): 387-97
- 251 Mii S, Khalil RA, Morgan KG (1996)
Mitogen-activated protein kinase and proliferation of human vascular smooth muscle cells.
Am J Physiol (United States): 270 (1 Pt 2): H142-50
- 252 Schriever C, Schmidt A, Breithardt G, Buddecke E (1996)
Human recombinant insulin-like growth factor I and -II stimulate the expression of basic fibroblast growth factor but suppress the division of bovine coronary smooth muscle cells.
Atherosclerosis 122: 255-263

6.3. Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Titel	Seite
Abb. 1.1	Funktionsweise des bFGF-HSPG-Rezeptorsystems	7
Abb. 1.2	bFGF-Signaltransduktionskaskade	9
Abb. 1.3	Wachstumsabhängige Veränderungen der bFGF-Kompartimentverteilung	14
Abb. 1.4	Proliferationsantwort glatter Muskelzellen auf verschiedene Wachstumsfaktoren in serumfreien Medium	18
Abb. 1.5	Mechanismen von Antisense-Oligonukleotiden	24
Abb. 1.6	Oligonukleotide mit strukturmodifizierten Internukleosidbindungen	30
Abb. 1.7	Oligonukleotid-Modifikationsmöglichkeiten	31
Abb. 1.8	RNase H- Kompetenz verschiedener modifizierter Oligonukleotide	32
Abb. 2.1	Zielbereich des AS-ODN auf der bFGF-mRNA	39
Abb. 2.2	Transferkomplex nach der Semi-Dry-Methode	58
Abb. 3.1	Entwicklung von Zellzahl und Proteingehalt über 96 Stunden Kulturzeit	65
Abb. 3.2	Entwicklung des Proteingehaltes pro 10^5 Zellen über 96 Stunden Kulturzeit	66
Abb. 3.3	[^3H]Thymidin-Inkorporation über 192 Stunden Kultivierungszeit	67
Abb. 3.4	Entwicklung des bFGF-Gehalt in $\text{pg} / 10^5$ Zellen über eine Kulturzeit von 96 Stunden	69
Abb. 3.5	Dosis-Wirkungskurve des Antisense-Oligodesoxynukleotids	71
Abb. 3.6	Wirkungsdauer von AS-ODN in einer Konzentration von 0,5 μM	72
Abb. 3.7	Veränderungen der Zellzahl unter wiederholter AS-/ S-ODN-Zugabe	75
Abb. 3.8	Zellzahl nach 96 Stunden Kulturzeit unter wiederholter ODN-Zugabe	76

Abbildung	Titel	Seite
Abb. 3.9	Veränderungen der DNA-Synthese anhand der [³ H]Thymidin-Einbaurate unter AS-S-ODN-Einfluß über 96 Stunden	78
Abb. 3.10	[³ H]Thymidin-Inkorporationsrate unter ODN-Einfluß nach 96 Stunden	79
Abb. 3.11	Veränderungen des Proteingehaltes unter wiederholter AS-/ S-ODN-Zugabe über 96 Stunden	81
Abb. 3.12	Veränderungen des Proteingehaltes unter AS-/ S-ODN-Einfluß über 96 Stunden	82
Abb. 3.13	Proteingehalt nach 96 Stunden Kulturzeit unter wiederholter ODN-Zugabe	83
Abb. 3.14	Veränderungen des bFGF-Gehaltes /10 ⁵ Zellen unter AS-/ S-ODN-Einfluß über 96 Stunden	85
Abb. 3.15	bFGF-Gehalt/10 ⁵ Zellen nach 96 Stunden Kulturzeit unter wiederholter ODN-Zugabe	86
Abb. 3.16	Veränderungen des bFGF-Gehaltes bezogen auf den Proteingehalt unter ODN-Einfluß über 96 Kulturstunden	88
Abb. 3.17	bFGF-Gehalt bezogen auf das Gesamtprotein unter wiederholter ODN-Zugabe nach 96 Stunden Kulturzeit	89
Abb. 3.18	Verhältnis von intrazellulärem und perizellulärem bFGF unter wiederholter AS-/ S-ODN-Zugabe	91
Abb. 3.19	Verhältnis von peri-und intrazellulärem bFGF-Pool unter wiederholter ODN-Zugabe nach 96 Stunden Kulturzeit	92
Abb. 3.20	bFGF-Nachweis im Western Blot	95
Abb. 3.21	DNA-Synthese anhand der [³ H]Thymidin-Einbaurate nach ODN-Entzug	99
Abb. 3.22	Veränderungen des Proteingehaltes in µg pro 10 ⁵ Zellen nach ODN-Entzug	100
Abb. 3.23	Fotographie einer Kontrollkultur nach 96 Stunden	101
Abb. 3.24	Fotographie einer Antisense-Kultur nach 96 Stunden	102
Abb. 3.25	Fotographie einer Sense- Kultur nach 96 Stunden	103

Abbildung	Titel	Seite
Abb. 4.1	Aufnahme von Liposomen in die Zelle und Freisetzung der transportierten DNA in das Zytoplasma	117
Abb. 4.2	Basensequenzvergleich der Translationsinitiationsregionen der humanen und bovinen bFGF-mRNA	121

6.4. Tabellverzeichnis

Tabelle	Titel	Seite
Tab. 1.1	Vasokonstriktoren und ihre sekundär exprimierten Wachstumsfaktoren	20
Tab. 1.2	Kontrolloligonukleotidvarianten	26
Tab. 1.3.	Antisense-Oligonukleotide in der Tumorthapie	34
Tab. 1.4	Antisense-Oligonukleotide in medizinischen Bereichen außerhalb der Tumorthapie	37
Tab. 2.1	Verdünnungsstufen der bFGF-Extrakte in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit	50
Tab. 3.1	Zellzahlunterschiede der einzelnen Kulturen	76
Tab. 3.2	Unterschiede in der [³ H]Thymidin-Einbaurrate der einzelnen Gruppen	79
Tab. 3.3	Unterschiede des Proteingehaltes	83
Tab. 3.4	Unterschiede des bFGF-Gehaltes/10 ⁵ Zellen	86
Tab. 3.5	Unterschiede des Quotienten bFGF-Gehalt in pg /Gesamtprotein in µg	89
Tab. 3.6	Gesamt bFGF und seine Verteilung intra-und perizellulär unter ODN-Einfluß nach 96 Stunden	93
Tab. 3.7	Unterschiede des Quotienten perizelluläres bFGF/ intrazelluläres bFGF unter ODN-Einfluß	93
Tab. 3.8	Im Cell-Death-ELISA	97
Tab. 4.1	Wirkungsvergleich von Heparin und den Oligonukleotiden dieser Studie	131

6.5. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. rer. nat. Annette Schmidt und Herrn Prof. Dr. med. Eckhart Buddecke für die nette und engagierte Betreuung im Rahmen dieser Arbeit, für die stets angetroffene Gesprächsbereitschaft und die wertvollen Anregungen und Diskussionen.

Ein herzliches Dankeschön möchte ich auch folgenden Personen aussprechen, die in besonderer Weise an dieser Arbeit mitgewirkt haben:

Herrn Marc Levejohann für die qualifizierte Einarbeitung in zahlreiche Labortechniken, stets versüßt durch einen Hauch von Comedy.

Frau Anke Lütkemeyer für ihre angenehme Gesellschaft während unserer Promotionsarbeiten in einsamer Inselatmosphäre.

Meinem Lebensgefährten und besten Freund Dr. med. Michael Hense für seine stete Hilfsbereitschaft und sein ausgesprochenes Engagement bei der Bewältigung zahlreicher computertechnischer Herausforderungen und für die Mitgestaltung des Layouts dieser Arbeit.

Meinen lieben Eltern, die mir immer die Daumen gedrückt haben.

6.6 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Höschchen
Vorname	Karin
Geburtstag	05.08.1972
Geburtsort	Bad Driburg
Eltern	Hermann und Elisabeth Höschchen, geb. Unverzagt

Schulbildung

1979 – 1983	Besuch der Grundschule in Brakel, Kreis Höxter
1983 – 1992	Besuch des Gymnasiums Brede in Brakel, Kreis Höxter
Juni 1992	Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife
1992 - 1993	Ausbildung zur MTA an der Völker-Schule in Osnabrück

Studium

1993 - 1999	Studium an der medizinischen Fakultät der WWU-Münster
1998 -1999	Praktisches Jahr im St.Vincenz-Krankenhaus, Paderborn

Examina

März 1995	Ärztliche Vorprüfung
März 1996	Erstes Staatsexamen
August 1998	Zweites Staatsexamen
Oktober 1999	Drittes Staatsexamen

Berufstätigkeit

Februar 2000 – April 2001	Ärztin im Praktikum, Innere Medizin Stadtkrankenhaus Soest, 59494 Soest
Mai 2001 – Juli 2001	Ärztin im Praktikum, Innere Medizin Dreifaltigkeitshospital, 59555 Lippstadt
1. August 2001	Erhalt der Approbation
August 2001 – Oktober 2002	Assistenzärztin, Innere Medizin Dreifaltigkeitshospital, 59555 Lippstadt
seit November 2002	Assistenzärztin, Anästhesie Dreifaltigkeitshospital, 59555 Lippstadt

Soest, den 28.01.2004