

Klinik für Herz- und Kreislauferkrankungen  
der Technischen Universität München  
Deutsches Herzzentrum München

(Direktor: Univ.- Prof. Dr. A. Schömig)

**Der Effekt von Rapamycin auf die proliferativen und inflammatorischen  
Eigenschaften glatter Muskelzellen**

**Katja Denker**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: **Univ.- Prof. Dr. D. Neumeier**

Prüfer der Dissertation:

**1. Priv.- Doz. Dr. D. Zohlhöfer**

**2. Univ.- Prof. Dr. F. Fend**

Die Dissertation wurde am 08.12.2004 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 11.05.2005 angenommen.

## Inhaltsverzeichnis

<b>Der Effekt von Rapamycin auf die proliferativen und inflammatorischen Eigenschaften glatter Muskelzellen .....</b>	<b>2</b>
<b>1. Einleitung .....</b>	<b>4</b>
1.1 Pathophysiologische Grundlagen der Restenose im Menschen .....	6
1.1.1 Entstehung der Restenose nach Stentimplantation durch Neointimahyperplasie....	6
1.1.2 Ablauf der Neointimaformation.....	6
1.1.2.a.) Zeitverlauf des Pathomechanismus.....	6
1.1.2.b.) Pathomechanismus auf zellulärer Ebene .....	7
1.1.3 Zellzyklusregulation während der Neointimaformation.....	8
1.1.4 Bedeutung von Entzündungsreaktionen in der Neointimabildung nach Stentimplantation .....	9
1.1.5 Therapieversuche zur Behandlung der koronaren Restenose im Stent.....	11
1.1.6 Entwicklung und Wirkungsweise von Rapamycin .....	12
1.1.6 a.) Entwicklung .....	12
1.1.6.b.) Wirkungsweise .....	12
<b>2. Fragestellungen dieser Arbeit .....</b>	<b>15</b>
<b>3. Angewandte Methoden .....</b>	<b>17</b>
3.1 Patienten und Probengewinnung .....	17
3.2 Methoden .....	17
3.2.1 Zellkultur .....	17
3.2.2 Adhäsionsassay.....	18
3.2.3 Western Blot und Kinase Assay .....	18
3.2.4 Durchflusszytometrische Messung der Apoptose.....	19
3.2.5 TUNEL Assay zur Apoptosemessung .....	19
3.2.7 Isolierung von mRNA aus glatten Muskelzellen, cDNA- Synthese und Amplifizierung.....	20
3.2.8 Hybridisierung der cDNA- Arrays und Auswertung.....	21
3.2.9 Analyse der Daten der cDNA- Arrays.....	21
3.2.10 Validierung der cDNA- Daten mittels genspezifischer PCR.....	22
3.2.11 Real Time PCR.....	23
3.2.12 Immunhistochemische Analyse .....	23
3.3 Statistische Auswertung .....	23
<b>4. Ergebnisse .....</b>	<b>25</b>
4.1 Effekt von Rapamycin auf proliferative und inflammatorische Eigenschaften glatter Muskelzellen <i>in vitro</i> .....	25
4.1.1 Darstellung der mTOR Kinase in Neointimagewebe im Vergleich zur mTOR-Kinase bei gesunden glatten Muskelzellen.....	25
4.1.2 Wirkung von Rapamycin auf die p70 S6- Kinase und pRB .....	27
4.2 Wirkung von Rapamycin auf das Transkriptom glatter Muskelzellen.....	28
4.2.1 Ergebnisse der Genexpressionsanalyse .....	28
4.2.2 Validierung durch PCR.....	33
4.2.2.1 Validierung der Wirkung von Rapamycin durch Gen- spezifische PCR.....	33

4.2.2.2 Validierung der Wirkung von Rapamycin auf Apoptose- assoziierte Gene....	34
4.2.2.3 Validierung der Wirkung von Rapamycin auf die Expression von E2F-1 .....	35
4.3 Wirkung von Rapamycin auf biologische Eigenschaften glatter Muskelzellen.....	36
4.3.1 Wirkung von Rapamycin auf die Proliferation glatter Muskelzellen.....	36
4.3.2 Wirkung von Rapamycin auf die Apoptose glatter Muskelzellen.....	36
4.4 Wirkung von Rapamycin auf die Adhäsivität monozytärer Zellen.....	38
<b>5. Diskussion .....</b>	<b>41</b>
5.1 Effekt von Rapamycin auf die proliferativen und inflammatorischen Eigenschaften glatter Muskelzellen .....	42
5.1.1 Die mTOR-Kinase in neointimalen glatten Muskelzellen und T- Lymphozyten und der Einfluss von Rapamycin.....	43
5.1.2 Wirkung von Rapamycin auf die p70 S6-Kinase und pRb.....	44
5.2 Wirkung von Rapamycin auf die Zellzykluskontrolle und Proliferation glatter Muskelzellen.....	45
5.3 Wirkung von Rapamycin auf die Apoptose glatter Muskelzellen.....	46
5.4 Der Einfluss von EMAP- II auf die Adhäsivität glatter Muskelzellen.....	47
<b>6. Zusammenfassung.....</b>	<b>50</b>
<b>7. Abkürzungen .....</b>	<b>51</b>
<b>8. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>52</b>
<b>9. Publikation.....</b>	<b>56</b>
<b>10. Danksagung.....</b>	<b>57</b>

## 1. Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen auch heute noch weltweit die häufigste Todesursache der Menschen in der westlichen Welt dar (Braunwald, 1997).

Als Behandlungsmethode stenosierter, atherosklerotisch veränderter Koronararterien hat sich die transluminale koronare Angioplastie durchgesetzt, deren langfristiger Erfolg allerdings durch das Auftreten von Restenosen limitiert wird. Durch die Entwicklung Rapamycin-beschichteter Stents konnte die Bildung von Neointima, die der Restenose zugrunde liegt, inzwischen deutlich verringert werden (Sousa et al., 2001).

Diese Promotion beschäftigt sich mit der Untersuchung des genauen Wirkmechanismus von Rapamycin auf molekulargenetischer Ebene unter Anwendung der Genexpressionsanalyse.

Im Jahre 1977 entwickelte Grüntzig die Methode verengte Gefäße minimal- invasiv mittels perkutaner transluminaler koronarer Angioplastie (PTCA) zu reperfundieren (Gruentzig and Meier, 1983). Damit eröffnete sich ein weites Feld an therapeutischen Möglichkeiten, beispielsweise bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom, instabiler Angina pectoris und akutem Myokardinfarkt. Allerdings treten auch bei dieser Therapieform Nebenwirkungen auf, wobei die häufigste die koronare Restenose darstellt. Die Wahrscheinlichkeit für die Entstehung einer Restenose nach primär erfolgreicher PTCA liegt bei 30- 40 % wie in verschiedenen Studien beschrieben wurde (Serruys et al., 1994; Cox et al., 2003). Dabei wird unter einer Restenose ein Lumenverlust um mehr als 50% oder um mehr als 30% des initialen postinterventionellen Lumens binnen sechs Monaten nach koronarer Angioplastie verstanden. Durch die Gefäßverletzung, die bei einer PTCA verursacht wird, kommt es zur Neointimabildung, die die Hauptursache der Restenose nach perkutaner koronarer Angioplastie darstellt. Dieser Prozess besteht aus verschiedenen Schritten wie Aktivierung, Proliferation und Migration glatter Muskelzellen und die Produktion extrazellulärer Matrix. Beeinflusst wird dieses Geschehen durch Wachstumsfaktoren, Hormone und mechanische Faktoren (Bauters et al., 1997).

Die Therapiemöglichkeiten zur Verhinderung einer Restenose sind begrenzt- die bislang probateste Methode stellt die intrakoronare Implantation von Stents dar, die die Restenoserate um bis zu zehn Prozent senken kann (Serruys et al., 1994). Dennoch liegen die Restenoseraten angiographisch bei 20- 30 % der behandelten Patienten (Cox et al., 2003); dies führt dazu, dass sich bis zu 20 % der Patienten einer erneuten Intervention unterziehen müssen (Fischman

et al., 1994; Serruys et al., 1994). Die wiederholte Implantation von Stents bei Patienten mit einer In-Stent-Restenose hingegen, erbrachte keine weitere Verbesserung der Restenoserate im Vergleich mit einer erneuten PTCA (Alfonso et al., 2003).

Vor diesem Hintergrund wird die Problematik der Restenose in der modernen Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen und die immense Bedeutung, die eine Senkung der Restenoserate hat, deutlich.

In der Vergangenheit gab es verschiedene therapeutische Ansätze, allerdings ließ sich weder die Wirkung pharmakologischer Therapien in großen randomisierten Studien nachweisen, noch brachten Änderungen an der Interventionstechnik den erhofften Erfolg. Der Einsatz der rotierenden Atherektomie beispielsweise erbrachte keinen Vorteil im Vergleich zur perkutanen transluminalen koronaren Angioplastie (PTCA) (Mauri et al., 2003).

Bei der Ursachenforschung stellte man bei Untersuchungen der pathophysiologischen Abläufe fest, dass zwar bei allen Patienten nach perkutaner Angioplastie mit Stentimplantation ähnliche Reaktionen an der Gefäßwand stattfinden, sich aber nur bei einem Teil dieser Patienten eine relevante Restenose entwickelt (Lehmann et al., 1996, Schömig et al., 1997).

Zunächst ging man davon aus, dass eine Restenose die grundsätzlich ablaufende Antwort des Körpers auf eine Verletzung der Intima darstellt, wobei man jedoch fälschlicherweise annahm, dass die Verteilung der Patienten mit Restenose nach Koronarangioplastie einer Gaußschen Normalverteilung entsprach (Kuntz et al., 1992; Rensing et al., 1992).

Genauere Analysen zeigten jedoch überraschende Ergebnisse: Die signifikante Restenose nach PTCA (Lehmann et al., 1996) und Stentimplantation (Schömig et al., 1997) trat tatsächlich nur bei einem Teil der Patienten auf, wobei gezeigt werden konnte, dass es sich um eine bimodale Verteilungskurve der Patienten mit Restenose handelt (Schömig et al., 1997). Weiterhin gelang der Nachweis, dass das Risiko eines Patienten, eine Restenose zu entwickeln 59 % betrug, wenn bereits an einer anderen Gefäßläsion eine Restenose vorlag. Wiesen weitere Läsionen eines Patienten hingegen keine Restenose auf, betrug dieses Risiko lediglich 22 %. (Kastrati et al., 1998). Im Ergebnis bedeutet dies, dass Patienten mit mehreren verschiedenen Läsionen ein zweieinhalbfach erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Restenose haben, wenn eine Nachbarläsion bereits eine Restenose aufweist.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Wahrscheinlichkeit, eine Restenose zu entwickeln vom einzelnen Patienten abhängig ist. Weiter liegt der Schluss nahe, dass das individuelle Risiko, eine Restenose zu entwickeln, auf genetischer Ebene verankert ist

## **1.1 Pathophysiologische Grundlagen der Restenose im Menschen**

### **1.1.1 Entstehung der Restenose nach Stentimplantation durch Neointimahyperplasie**

Im Gegensatz zum Lumenverlust nach PTCA, der durch negatives Remodeling verursacht wird, entsteht die Restenose nach Stentimplantation durch Bildung einer Neointimahyperplasie (Mintz et al., 1996). Histologisch gesehen besteht die humane Neointima größtenteils aus lose angeordneter extrazellulärer Matrix (Komatsu et al., 1998). Im zellulären Anteil der humanen Neointima der Restenose finden sich ganz überwiegend glatte Muskelzellen (Komatsu et al., 1998). Zwischen zwei und zwanzig Prozent dieser glatten Muskelzellen sind für verschiedene Proliferationsmarker positiv (Kearney et al., 1997), was grundlegende Bedeutung für den Effekt von Rapamycin hat.

Bei der Stentimplantation kommt es unvermeidbar zu einer Verletzung der arteriellen Gefäßwand. Diese provoziert eine Neointimabildung, die als Ausdruck eines überschießenden Heilungsprozesses interpretiert wird.

Das Ausmaß der Neointimaformation und die Restenoserate sind abhängig von der Schwere der Verletzung der Gefäßwand bei der initialen Implantation des Stents. Die Neointimadiecke, die Entzündungszelldichte und die Dichte an neointimalen Gefäßen sind signifikant größer wenn eine Intervention zur Ruptur der Media führt. Kommt es bei der Katheterintervention zu einer Verletzung der Media ist dies mit einer 29%igen Erhöhung der Neointimadiecke im Vergleich zu ebenfalls behandelten Arterien mit intakt gebliebener Media verbunden (Farb et al., 2002).

### **1.1.2 Ablauf der Neointimaformation**

#### **1.1.2.a.) Zeitverlauf des Pathomechanismus**

Ausgelöst durch die Katheterintervention und die damit verbundene Verletzung läuft ein Pathomechanismus ab, der nach Poon in folgende Phasen eingeteilt werden kann (Poon et al., 2002):

##### **I. Endotheliale Denudation und Plaqueruptur**

Durch die Gefäßverletzung und die Stentimplantation kommt es zunächst zu einer endothelialen Denudation mit Plaqueruptur und Freilegung subendothelialer Gefäßschichten.

## II. Thrombozytenablagerung, -aktivierung und Thrombusformation

Als Antwort auf diesen Verletzungsreiz wird die Blutgerinnung aktiviert, was zur Thrombozytenablagerung, mit nachfolgender Thrombozytenaktivierung und Thrombusformation führt.

## III. Aktivierung von Botenstoffen

Konsekutiv kommt es zu einer Freisetzung von Mitogenen sowie zur Rekrutierung von Monozyten und Granulozyten. Dadurch werden chemotaktisch und proliferativ wirkende Botenstoffe aktiv und es kommt zur Entdifferenzierung, Proliferation und Emigration glatter Muskelzellen.

Diese Entzündungs- und Proliferationsprozesse finden ganz überwiegend innerhalb des ersten Monats nach Stentimplantation statt und sind dann weitgehend abgeschlossen.

## IV. Neointimabildung

Die Neointima schließlich besteht zum größten Teil aus entdifferenzierten glatten Muskelzellen. Zum weiteren Lumenverlust des Gefäßes und zur Restenose führt die überschießende Bildung extrazellulärer Matrix (Virmani und Farb, 1999).

### **1.1.2.b.) Pathomechanismus auf zellulärer Ebene**

Durch die Verletzung der Gefäßwand wird ein Stimulus gesetzt, der zu einer Freisetzung von verschiedenen Zytokinen und Wachstumsfaktoren führt. Diese wiederum regen die glatten Muskelzellen zur Entdifferenzierung und Proliferation an. Solche Wachstumsfaktoren sind unter anderem PDGF (Platelet Derived Growth Factor), FGF (Fibroblast Growth Factor) und TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ), die hauptsächlich auf transkriptioneller Ebene reguliert werden.

PDGF wird in den  $\alpha$ - Granula von Blutplättchen gespeichert und bei Aktivierung der Thrombozyten von diesen ausgeschüttet. Bei *in vitro* Versuchen konnte gezeigt werden, dass der Platelet Derived Growth Factor (PDGF) die Zellteilung und die Migration glatter Muskelzellen stimuliert (Ross, 1999a).

Im Rattenmodell konnte gezeigt werden, dass eine Blockierung von PDGF mittels eines inhibierenden Antikörpers zu einer Reduzierung der Neointimaformation führt. Anders als erwartet kommt es allerdings nicht zu einer Hemmung der Proliferation, sondern zu einer Inhibierung der Migration glatter Muskelzellen (Ferns et al., 1991).

Außer PDGF werden von den aktivierten Thrombozyten noch weitere Wachstumsfaktoren freigesetzt, wie beispielsweise TGF- $\beta$ , der Epidermal Growth Factor und Thrombin. (Poon et al., 2002).

TGF- $\beta$ 1 wirkt grundsätzlich als potenter wachstumshemmender und apoptotischer Faktor für proliferierende Gefäßzellen. Aus atherosklerotischen Gefäßläsionen konnten Zellen kultiviert werden, die gegen den antiproliferativen Effekt von TGF- $\beta$ 1 resistent sind. Diese Resistenz lässt sich auf eine im Rahmen der Läsion erworbene Mutation im Typ II Rezeptor für TGF- $\beta$ 1 zurückführen (McCaffrey et al., 1999). McCaffrey untersuchte 43 Zelllinien (lesion-derived cell cultures (LDC)) gezüchtet aus menschlichen Gefäßläsionen, die in 84% funktionelle Resistenzen gegenüber dem antiproliferativen Effekt von TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 und TGF- $\beta$ 3 zeigten. Während normale glatte Muskelzellen eine vierfach erhöhte Apoptoserate nach TGF- $\beta$ 1 Behandlung aufwiesen, waren die gezüchteten Zellen resistent gegen die Induktion der Apoptose nach Gabe von TGF- $\beta$ 1 und zeigten einen selektiven Verlust von Typ II Rezeptoren. McCaffrey zieht daraus die Schlussfolgerung, dass dieser Mechanismus zur langsamen Proliferation resistenter Zelluntereinheiten führen und damit zur Progression von atherosklerotischen und restenotischen Läsionen beitragen könne (McCaffrey et al., 1999).

Thrombozyten sind indes nicht die einzigen Zellen, die Wachstumsfaktoren exprimieren. Auch vaskuläre glatte Muskelzellen setzen beispielsweise TNF  $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor-  $\alpha$ ) Interleukine, Chemokine, Matrixmetalloproteinasen und Angiotensin frei (Ross, 1999a). Die ausgeschütteten Faktoren stimulieren ihrerseits die Expression weiterer Wachstumsfaktoren. Dieser Kreislauf führt vermutlich dazu, dass der Prozess der Neointimabildung über einen langen Zeitraum aufrechterhalten bleibt, auch wenn die ursprüngliche Verletzung bereits längere Zeit zurückliegt.

### **1.1.3 Zellzyklusregulation während der Neointimaformation**

Normalerweise liegen glatte Muskelzellen in der Media als ruhender kontraktiler Phänotyp in der G<sub>0</sub>- Phase des Zellzyklus vor. Sie können jedoch jederzeit wieder in die G<sub>1</sub>- Phase eintreten, beispielsweise nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren oder durch eine Gefäßwandverletzung. (Poon et al., 2002). Dieser Eintritt in die G<sub>1</sub>- Phase wird durch eine Kaskade von regulativen Proteinen gesteuert: den Zyklinen und den Zyklin- abhängigen Kinasen (cyclin dependent kinases; CDK). Voraussetzung für die Aktivierung des Zellzyklus ist die Phosphorylierung und Dephosphorylierung dieser Kinasen, weiterhin die An- oder



Abwesenheit von spezifischen CDK- Inhibitoren und die Aktivierung von Zyklinen. Die anhaltende Akkumulation und Aktivierung des Komplexes aus Zyklin und dem CDK-Komplex wird durch CDK- Inhibitoren verhindert.

Bisher sind beim Menschen zwei Klassen dieser Inhibitoren bekannt:

Dabei handelt es sich zum einen um die INK4- Familie (Inhibitor of cyclin- dependent kinase 4) (p15, p16, p18, p19), die spezifisch den CDK4/ Cyclin D- Komplex hemmt, zum anderen die CIP/ KIP- Familie (p21 und p27), die durch den Tumorsuppressor p53 reguliert wird.

Eine entscheidende Rolle in der Regulierung der Zellzyklusprogression spielt der Tumorsuppressor Retinoblastoma- Gen (pRb). pRb wurde erstmalig aus Retinoblastomatumoren isoliert und als nukleäres Phosphoprotein identifiziert, das im dephosphorylierten, also aktivierten Zustand zum Zellzyklusarrest in der G1- Phase führt. Dies geschieht indem es die Transkription von Genen hemmt, die den Übergang von der G1- zur S1- Phase regulieren (Harbour and Dean, 2000a). Eine der Proteingruppen, die vom aktivierten pRb gehemmt werden, ist die Familie der E2F- Transkriptionsfaktoren (Harbour and Dean, 2000b). E2F aktiviert die Transkription einer Gruppe von Genen, die für Proteine kodieren, die zur DNA Replikation notwendig sind und spielt damit eine entscheidende Rolle in der Regulation der Zellzyklusprogression in der G1 Phase (Ohtani et al, 1995). Die Bindung von dephosphoryliertem, aktiviertem pRb an den oben genannten E2F- Transkriptionsfaktor führt zur Inhibierung der transkriptionellen Aktivität von E2F.

Voraussetzung für die Progression des Zellzyklus von der G1- zur S- Phase ist demnach die Inaktivierung von pRb, die durch Phosphorylierung von pRb durch den CDK4/ Cyclin D- Komplex reguliert wird.

#### **1.1.4 Bedeutung von Entzündungsreaktionen in der Neointimabildung nach Stentimplantation**

In vorangegangenen präklinischen Studien hat sich gezeigt, dass eine intimale Entzündungsreaktion eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Neointimaformation spielt. Im Kaninchenmodell beispielsweise kam es zur frühen Monozytenadhäsion, nachdem ein Stent in der Arteria iliaca implantiert wurde. Diese Adhäsion korrelierte mit dem Ausmaß der Proliferation neointimaler glatter Muskelzellen und der Neointimadicke (Rogers et al., 1996). Bei Reduzierung der Monozytenadhäsion und -infiltration, konnte in diesem Modell ein signifikanter Rückgang der Neointimadicke nachgewiesen werden. Entsprechend korrelierte

das Ausmaß der Monozytenadhäsion mit der Stärke der Proliferation neointimaler glatter Muskelzellen und damit auch der Neointimabildung (Rogers et al., 1996).

Auch im Schweinmodell korrelierte die Dichte der lymphohistiozytären Zellinfiltration mit erhöhter Neointimadicke und dementsprechend stärkerer Lumeneinengung des Gefäßes (Kornowski et al., 1998).

Auch andere Studien zeigten, dass eine therapeutische Hemmung der Entzündungsreaktion und damit der Rekrutierung von Entzündungszellen zu einer Verringerung des neointimalen Wachstums führen. Nach Stentimplantation in der Arteria iliaca im Kaninchenmodell konnte durch einen inhibierenden Antikörper gegen das leukozytäre Adhäsionsmolekül Mac-1 die Leukozyteninfiltration um die Hälfte reduziert werden, wodurch auch die Neointimabildung signifikant verringert wurde (Rogers et al., 1998). Auch P-Selektin<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten nach Ligatur der Arteria carotis eine verminderte Leukozyteninfiltration und ein um 76% reduziertes Neointima/Media-Verhältnis (Kumar et al., 1997). Das von Endothelzellen exprimierte P-Selektin beeinflusst schon zu einem frühen Zeitpunkt die inflammatorische Reaktion auf Gefäßwandverletzungen. Die Adhäsion von Leukozyten am Endothel wird durch eine erhöhte Expression von P-Selektin gesteigert und es kommt zu einer vermehrten Rekrutierung von Makrophagen rekrutiert (Johnson et al., 1995). Ebenso im Restenosemodell der Arteria carotis der Ratte kam es nach der Verabreichung eines hemmenden Antikörpers gegen ICAM-1 zu einer signifikanten Reduzierung der Neointimabildung um 50% (Yasukawa et al., 1997). Es handelt sich bei ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1) um ein endotheliales Adhäsions-Molekül, das eine wichtige Rolle in der Aggregation und Adhäsion von Leukozyten spielt (Siu et al., 1989).

In einer Untersuchung humaner Neointimaproben wurde die Neointimadicke in Abhängigkeit der Tiefe der Gefäßläsion analysiert. Die Neointimadicke und die Zahl der Entzündungszellen korrelierten mit dem Ausmaß der Verletzung der Media. In den ersten drei Tagen nach Stentimplantation wiesen drei Prozent der Stentstruts, die nur Kontakt mit fibrösen Plaques hatten, mehr als 20 Entzündungszellen auf. Stents, die die Media verletzten, zeigten in 36% der Fälle eine erhöhte Zahl an Entzündungszellen. Bei einer Implantation des Stents in den Lipidkern der Gefäßwand fand sich bei 44% der Proben eine derartige Infiltration mit Entzündungszellen (Farb et al., 1999). Die Stents mit Restenose wiesen eine 2,4-fach höhere Anzahl an neointimalen Entzündungszellen im Vergleich zu den Stents ohne Restenose auf. Weiterhin war die Entzündung mit einer erhöhten Neoangiogenese verbunden (Farb et al., 2002).

Daraus lässt sich ableiten, dass die Verletzung der tiefen Schichten der Media oder des Lipidkerns zu einer verstärkten Entzündungsreaktion führt. Und das Ausmaß dieser Entzündungsreaktion wiederum korreliert mit der Neointimadicke. Die Infiltration durch neutrophile Granulozyten bildet sich binnen der ersten 30 Tage nach Stentimplantation zurück (Farb et al., 1999), (Farb et al., 2002).

Wie bereits erwähnt, wird nicht nur ein akute, sondern auch eine chronische Entzündungsreaktion, die länger als sechs Monate nach Stentimplantation andauert, ausgelöst. Das Ausmaß und die Häufigkeit dieser Entzündung waren von der Größe und Tiefe der Verletzung bei der Implantierung der Stents abhängig. Diese Entzündungsreaktion wiederum beeinflusst signifikant die Stärke der Neointimabildung und damit die Restenoserate (Farb et al., 2002).

Die angeführten Studien verdeutlichen die entscheidende Rolle, die der Entzündungsreaktion nach Stentimplantation bei der Entstehung von Neointimagewebe zukommt.

### **1.1.5 Therapieversuche zur Behandlung der koronaren Restenose im Stent**

Durch die Implantation von Stents gelang es, die Restenoserate signifikant zu senken, wenn auch nicht in befriedigendem Maße. Da eine Gefäßwandverletzung und der damit verbundene Entzündungsreiz zu einer Aktivierung der Proliferation glatter Muskelzellen führen, lag ein Therapieversuch mit antiproliferativen Substanzen nahe. Allerdings zeigten die erprobten Substanzen wie beispielsweise ACE- Hemmer (Ribichini et al., 2003), das antiproliferativ wirksame Paclitaxel (Liistro et al., 2002), oder das antiinflammatorisch wirksame Colchicin (O'Keefe, Jr. et al., 1992) nicht die erhoffte Wirkung.

Die Brachytherapie zeigte zunächst eine signifikante Reduktion der Restenose (Teirstein and Kuntz, 2001), jedoch traten schwerwiegende Nebenwirkungen auf: Es kam zu einem erhöhten Risiko einer späten Stentthrombose, weiterhin traten am Rand der Stents so genannte Edge-Restenosen auf. Verantwortlich für die Stentthrombose macht man die mangelnde Selektivität der Brachytherapie, wodurch nicht nur das Wachstum glatter Muskelzellen, sondern auch das der Endothelzellen gehemmt und somit die Reendothelialisierung der Gefäßwand verhindert wird (Marx and Marks, 2001). Die Edge- Restenose wird mit der geringen Strahlendosis im Randbereich des Stents erklärt, die dort nicht mehr antiproliferativ, sondern vielmehr stimulierend, also proliferativ auf die glatten Muskelzellen wirkt.

Daher suchte man weiter nach Möglichkeiten, die Restenoserate signifikant und dauerhaft zu verringern.

## 1.1.6 Entwicklung und Wirkungsweise von Rapamycin

### 1.1.6 a.) Entwicklung

Rapamycin wurde ursprünglich als Makrolidantibiotikum entwickelt. Bei Rapamycin handelt es sich um das natürlich vorkommende Fermentationsprodukt des *Streptomyces hygroscopicus*. Entdeckt wurde Rapamycin bereits 1975 in einer Bodenprobe auf den Rapa Nui Inseln (Vezina et al., 1975). Zunächst ging man davon aus, dass es eine antimykotische Wirkung habe, bis die ausgeprägte immunsuppressive Wirkung nachgewiesen werden konnte (Sehgal et al., 1975).

Lange Zeit wurde es aufgrund seiner immunsuppressiven Wirkung auf T- Lymphozyten ausschließlich als Immunsuppressivum eingesetzt. Im Tierversuch führte die Therapie mit Rapamycin in Kombination mit Cyclosporin A nicht nur zu einer Reduzierung der Häufigkeit von Transplantatvaskulopathien, sondern auch zu einer Verringerung bereits vorhandener Intimaverdickungen (Poston et al., 1999).

Schließlich gelang der Nachweis eines positiven Effektes auf die Eigenschaften glatter Muskelzellen (Gallo et al., 1999; Poon et al., 2002). Bei *in vitro* Versuchen konnte gezeigt werden, dass Rapamycin eine antiproliferative Wirkung auf glatte Muskelzellen hat und dass es *in vivo* die Neointimabildung im Schweinmodell reduziert (Gallo et al., 1999), weshalb man den Einsatz in der interventionellen Kardiologie in Erwägung zog. Es zeigte sich, dass durch die Implantation Rapamycin- beschichteter Stents die Restenoserate deutlich gesenkt werden kann (Sousa et al, 2001, Moses et al 2003).

### 1.1.6.b.) Wirkungsweise

Die Wirkung Rapamycins erfolgt über die Bindung an seinen intrazellulären Rezeptor, das FK506 Binding Protein (FKBP 12).

Es konnte kürzlich nachgewiesen werden, dass FKBP 12 in glatten Muskelzellen der Neointima verstärkt exprimiert wird. Diese nachgewiesene Hochregulierung von FKBP 12 ist in Abbildung eins (s.Seite 13) auf mRNA Ebene und in Abbildung zwei (s.Seite 13) auf Proteinebene dargestellt. (Zohlhöfer et al., 2000).

Der gebildete Komplex aus FKBP 12 und Rapamycin inhibiert die Proteinkinase mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) (Johnson et al., 1994).

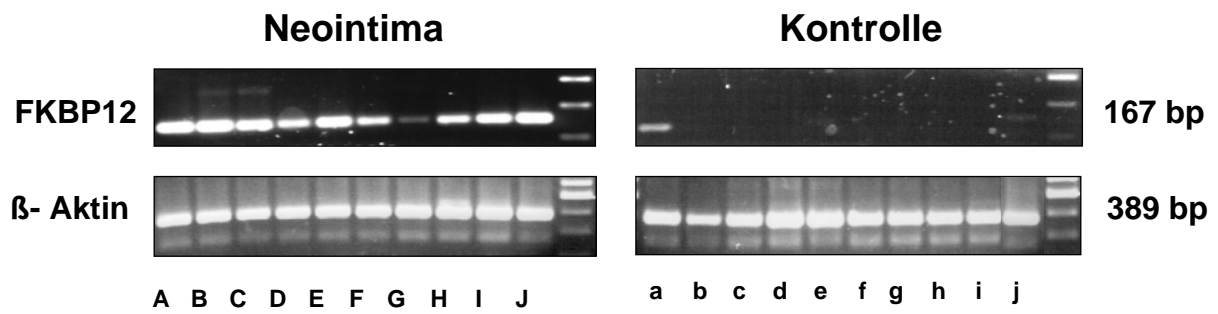
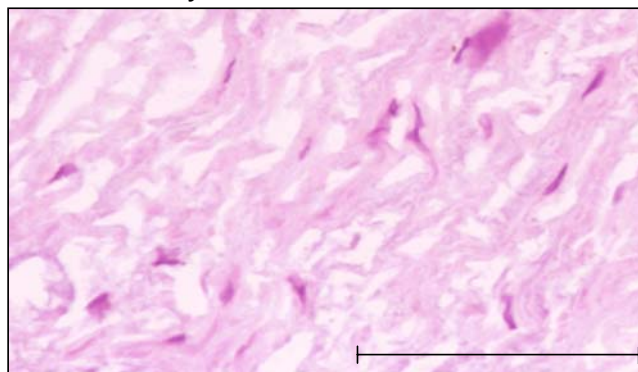
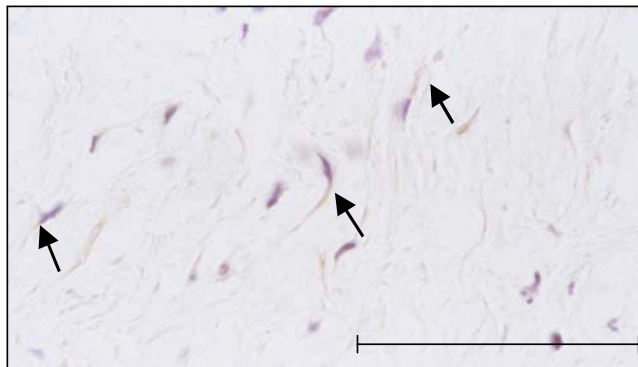


Abbildung 1: Verifizierung der differentiell exprimierten mRNA durch eine genspezifische PCR. Die Größe der erwarteten PCR-Fragmente ist auf der rechten Seite angegeben. bp= Basenpaar.

### A Hematoxylin Eosin



### B Neointima



### C Kontrolle

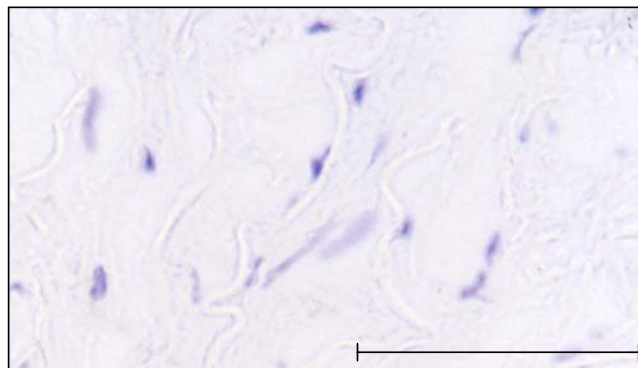


Abbildung 2: Repräsentative humane Neointima aus Stenosen der *A. carotis* (HE-Färbung, A) mit dem immunhistochemischen Nachweis von FKBP-12 im Zytoplasma neointimaler glatter Muskelzellen (B, Pfeile) im Gegensatz zur Kontrollmedia (C). Der Balken entspricht 100µm.

Die mTOR Kinase reguliert die Translation und die Zellzyklusprogression durch Phosphorylierung und damit Aktivierung der p70 S6- Kinase (p70 S6- K) (Johnson et al., 1994). Die p70 S6- Kinase steuert die Zellzyklusprogression und wird in humanen glatten Muskelzellen durch Wachstumsfaktoren wie PDGF und Angiotensin aktiviert (Pearson and Thomas, 1995). Rapamycin hemmt die Aktivierung der p70 S6- Kinase und führt damit zu einer Verminderung der Migration und Proliferation glatter Muskelzellen (Poon et al., 2002).

Es konnte bereits im T- Lymphozyten gezeigt werden, dass die Hemmung der Proliferation durch Rapamycin zunächst durch Inaktivierung der mTOR- Kinase erfolgt, die wiederum eine Dephosphorylierung und damit Inaktivierung der p70 S6- Kinase und zugleich eine Phosphorylierung, also Aktivierung des Tumorsuppressors pRb bewirkt (Brennan et al., 1999).

Die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen analysieren die Wirkung von Rapamycin auf humane glatte Muskelzellen und stellen somit eine umfassende systematische Untersuchung der therapeutischen Wirkung von Rapamycin dar.

## 2. Fragestellungen dieser Arbeit

Eine Analyse der differentiellen Genexpression humaner Neointima aus Restenosen im Stent ergab, dass FKBP 12 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in glatten Muskelzellen der humanen Neointima überexprimiert wird. Glatte Muskelzellen der Media gesunder Koronarien hingegen zeigten keine FKBP 12 Expression.

Das Makrolidantibiotikum Rapamycin bindet intrazellulär an das Immunophilin FKBP 12. In T-Lymphozyten entfaltet Rapamycin seine immunsuppressive und antiproliferative Wirkung nach Bindung an FKBP 12 durch Inhibierung der p70 S6- Kinase und Aktivierung des Retinoblastoma Genprodukts (Rb). Dieser Mechanismus liegt der Wirkung Rapamycin-beschichteter Stents zugrunde.

Der genaue Wirkmechanismus von Rapamycin auf molekulare und zellbiologische Eigenschaften humaner, glatter Muskelzellen und auf die Neointimaformation ist bisher aber noch nicht bekannt. Um diese Eigenschaften systematisch zu erfassen, wurde zunächst die Regulation der durch Rapamycin hemmbaren mTOR- Kinase in der humanen Neointima analysiert und der Effekt von Rapamycin auf das globale Genexpressionsmuster und die funktionellen Eigenschaften glatter Muskelzellen untersucht.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand der Effekt von Rapamycin auf die p70 S6- Kinase und das Retinoblastoma Genprodukt Rb. Weiterhin wurde der Einfluss auf das globale Genexpressionsmuster, auf die Proliferation und Apoptose humaner, glatter Muskelzellen und auf die Adhäsion von Monozyten an proliferierenden, glatten Muskelzellen untersucht.

Es kam unter anderem die Methode der Genexpressionsanalyse zur Anwendung, mittels derer tausende verschiedener Gene simultan auf eine verstärkte oder verminderte Expression hin untersucht werden können. Dadurch besteht die Möglichkeit, gleichzeitig eine große Anzahl an Genen, die unter identischen Bedingungen gewonnen wurden, miteinander zu vergleichen und eventuelle Änderungen in der Regulation zu identifizieren (Abb.3)

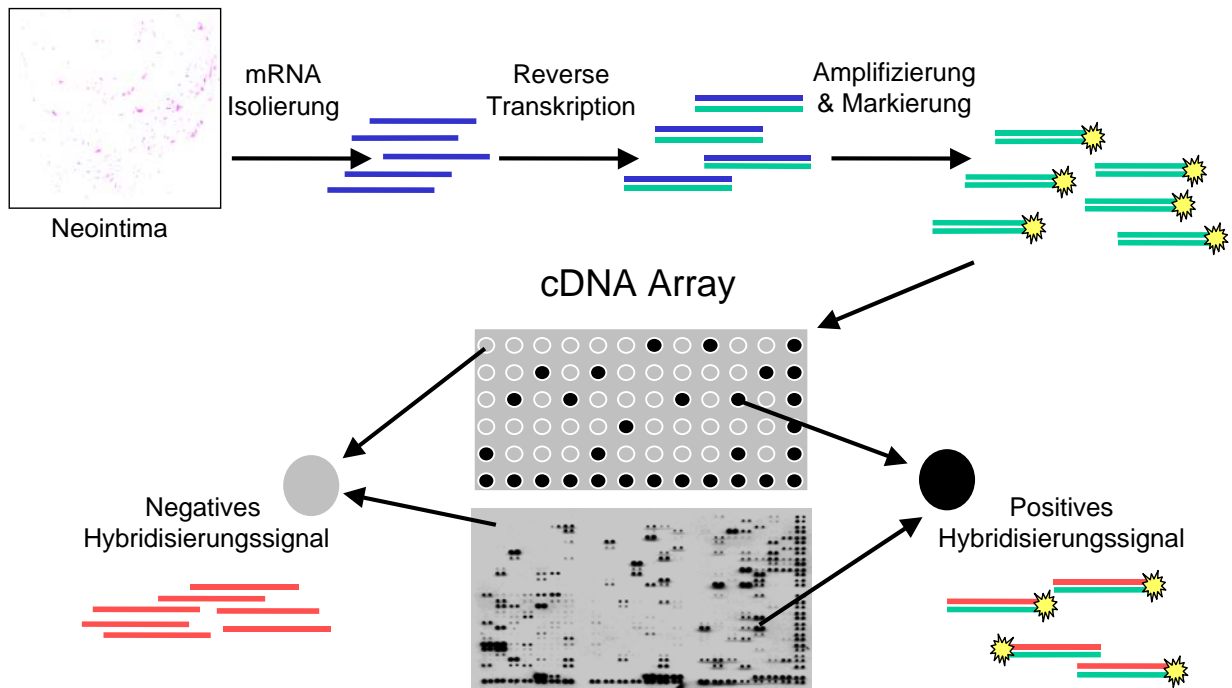


Abbildung 3: Schema der angewandten Methode der Genexpressionsanalyse von Neointima- Proben



### **3. Angewandte Methoden**

#### **3.1 Patienten und Probengewinnung**

Zwei der Neointimaproben wurden von Patienten gewonnen, die sich aufgrund einer symptomatischen In- Stent- Restenose erneut einer Koronarangiographie unterziehen mussten (n= 2). Die Proben wurden mittels Atherektomie (X- Sizer Atherectomie Device, Endicor) gewonnen. Ein 6- French Katheter wurde über konventionelle Führungsdrähte bis zur Läsion vorgeschoben. Der Helixcutter dreht sich mit einer Geschwindigkeit von 2100 rpm und transportiert das gewonnen Material unter kontinuierlichem Sog in eine Filtereinheit mit einer Porengröße von 100µm. Weitere Proben stammten aus Restenosen, die an peripheren Arterien entstanden waren (n= 3). Als Kontrollgruppe wurde die Media von Patienten, die sich einer Herztransplantation unterziehen mussten, ebenfalls aus zwei Koronargefäßen (n= 2) und aus drei peripheren Arterien (n= 3) herangezogen. Alle Patienten hatten vorher ihr schriftliches Einverständnis gegeben.

#### **3.2 Methoden**

##### **3.2.1 Zellkultur**

In den Versuchsreihen wurden humane glatte Muskelzellen aus Koronararterien (SMCs, Cell Systems) in einem Wachstumsmedium („Smooth Muscle Growth Medium- 2“, SMGM- 2) unter Zusatz von fünf Prozent fötalem Kälberserum (FCS, Cell Systems) bei einer Umgebungstemperatur von konstant 37°C, einem Kohlendioxidgehalt von fünf Prozent und einer Luftfeuchtigkeit von neunzig Prozent kultiviert. Für die Genexpressionsanalyse wurden Zellen, zwischen der fünften bis siebten Passage verwendet. Die Proben wurden sodann ohne und mit Zugabe von wahlweise 5, 20, 100 und 200 ng/ml Rapamycin 24, 48 und 72 Stunden lang kultiviert.

Für die mRNA Präparation wurden die SMCs zweimal mit eiskalter Phosphat- gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen.  $1 \times 10^4$  Zellen wurden anschließend in 1ml Lysispuffer (Dyna) lysiert und bis zur DNA- Synthese in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Für den Proliferationsassay wurden die Zellen von den Platten gelöst, indem sie mit 0,02% EDTA inkubiert wurden, die anschließende Zellzählung erfolgte durch einen Zellzähler. Um die Apoptose zu induzieren, wurden die glatten Muskelzellen bei einer konstanten Temperatur von 37° eine Stunde lang in HBSS (*Hanks' Balanced Salt Solution*, Cambrex®) mit 100 µmol/l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 100 µmol/l Fe<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> inkubiert. Nach anschließendem zweimaligem

Waschen mit PBS wurden die Zellen wieder in SMGM- 2 Medium kultiviert, sechs Stunden lang für die Annexin- V Färbung und 12 Stunden lang für den TUNEL Assay.

Für die Adhäsionsassays wurde eine humane Zelllinie mit Eigenschaften reifer Monozyten, sogenannte MonoMac6- Zellen (Ziegler- Heitbrock et al., 1988) in VLE- RPMI- 1640 (Biochrom) unter Zusatz von 10% fötalem Kälberserum kultiviert.

### **3.2.2 Adhäsionsassay**

Für den Adhäsionsassay wurden die glatten Muskelzellen in 24- Well- Zellkulturplatten (Costar) kultiviert. Neben der Kontrollgruppe wurden jeweils eine Gruppe mit oder ohne Rapamycin (100 ng/ml), beziehungsweise mit oder ohne den Caspase- Inhibitor ZVAD-fmk (50µM) 24 Stunden lang kultiviert.

Anschließend wurden die glatten Muskelzellen zwei Stunden lang in der An- oder Abwesenheit von 40 µg/ml EMAP- II Protein zwei Stunden lang inkubiert. Ein weiterer Caspase- Inhibitor Z-ASTD-fmk (50µM) wurde zwei Stunden vor der Koinkubation mit MonoMac6- Zellen hinzugefügt. Die MonoMac6- Zellen wurden zweimal in serumfreiem RPMI 1640/ Hepes- Medium 25mM gewaschen und mit den bereits gewaschenen glatten Muskelzellen ( $7 \times 10^5$  Zellen/ml) 30 Minuten lang koinkubiert. Als Positivkontrolle wurden MonoMac6- Zellen zwei Stunden vor der Koinkubation mit EMAP- II Protein (40µg/ml) stimuliert.

In einer weiteren Versuchsanordnung wurde die Adhäsivität glatter Muskelzellen 6 Stunden nach Induktion von Apoptose mit 100µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 100µM Eisensulfat beurteilt. Die Zellen waren zuvor in An- oder Abwesenheit von Rapamycin (100ng/ml) beziehungsweise des Caspase- Inhibitors ZVAD- fmk (50µM) 24 Stunden lang inkubiert worden.

Im Anschluss daran wurden die Platten bis zu fünfmal gewaschen und die übrig gebliebenen adhärenen monozytären Zellen wurden durch Auszählen von 16 Feldern mittels Lichtmikroskop quantifiziert.

### **3.2.3 Western Blot und Kinase Assay**

Die Versuchszellen wurden mit 100 ng/ml Rapamycin behandelt, um die Phosphorylierung der p70S6- Kinase und des Tumorsuppressors pRb zu untersuchen.

Diese wurden sodann nach zweimaligem Waschen bei 4°C in Lysispuffer (20mM TRIS (pH 7.5), 137mM NaCl, 15% (vol/vol) Glycerol, 1% (vol/vol) NP-40, 2mM Phenylmethylsulfonyl Fluoride, 10 mg/ml Aprotinin, 20 mM Leupeptin, 2 mM Benzamidine, 1 mM Sodiumvanadate, 25 mM Glycerolphosphate, 50 mM NaF und 10 mM NaPPi) lysiert. Anschließend wurden die Lysate bei Umdrehungsgeschwindigkeiten von 14,000 g pro Minute fünf Minuten lang zentrifugiert und die Aliquots mit einem Westernblot auf die Proteinexpression untersucht. Es erfolgte die Auftrennung der Proben mittels eines SDS-PAGE- Gels. Die Gele wurden auf Nitrocellulose-Filter (Schleicher & Schuell) transferiert. Die Blockierung der Filter erfolgte in TBST (*Tris-Buffered Saline Tween*) mit 5% (wt/vol) Trockenmilchpulver, danach wurden die entsprechenden Antikörper hinzugegeben. Gebundener Antikörper wurde mittels anti- Maus- oder anti- Kaninchen- konjugierter *Horseradish*-Peroxidase (Transduction Laboratories, BD) in TBST mittels des *Chemoluminescence SuperSignal-West-Dura*-Substrats (Pierce) nachgewiesen.<sup>1</sup>

### 3.2.4 Durchflusszytometrische Messung der Apoptose

Der Nachweis apoptotischer Zellen erfolgte mit Annexin-V (Roche Diagnostics) und Propidium Iodid (Roche Diagnostics). Im Rahmen der durchflusszytometrischen Messung wurden  $10^4$  Zellen je Probe mit einem FacsScan analysiert (Becton Dickinson).

Apoptotische Zellen können dabei durch die Bindung von Annexin- V und die Exklusion von Propidium- Iodid identifiziert werden, da die Nicht- Aufnahme des Propidium- Iodids der Beweis für die Intaktheit der Zellmembran ist und die Zellmembran bei der Apoptose im Gegensatz zur Nekrose unbeschädigt bleibt.

### 3.2.5 TUNEL Assay zur Apoptosemessung

Glatte Muskelzellen wurden mit TUNEL Substrat (Roche) entsprechend des Herstellerprotokolls markiert.  $5 \cdot 10^3$  Ereignisse/ Probe wurden mittels FacsScan Durchflusszytometer gemessen (Becton Dickinson).

Mittels TUNEL Assay können apoptotische Zellen nachgewiesen werden. Während der Apoptose wird die nukleäre DNA auf typische Art und Weise durch Endonukleasen fragmentiert. Diese für die Apoptose charakteristischen DNA Fragmente werden am

---

<sup>1</sup> Der polyklonale anti-p70S6k Antikörper (C-18) wurde von Santa Cruz Biotechnology und der polyklonale anti-pRb Antikörper (#9301) von Cell Signaling Technology bezogen.

3'OH- Ende mit digoxigenierten Desoxyribonucleotiden markiert und durch immunhistochemische Färbung sichtbar gemacht.

### **3.2.7 Isolierung von mRNA aus glatten Muskelzellen, cDNA- Synthese und Amplifizierung**

Nach Isolierung der mRNA mittels magnetischer Beads (Dynal) Superscript II (Gibco) wurde die gewonnene mRNA mit dem CFL5c-Primer [5'-(CCC)<sub>5</sub> GTC TAG A (NNN)<sub>2</sub>-3'] + SS-II zunächst in cDNA umgeschrieben. Durch die Terminale Deoxynucleotide Transferase (MBI Fermentas) wurden im sogenannten Tailing- Schritt an das freie 5' Ende der cDNA zwischen 15 und 20 dGTP- Basen angehängt. Danach konnte die cDNA mittels PCR mit dem CP2-Primer [5'-TCA GAA TTC ATG (CCC)<sub>5</sub>-3'] + SS-II amplifiziert werden (Abb.3).

Der Versuchsablauf im Einzelnen:

1. Es erfolgte die Lysierung der schockgefrorenen Versuchs- und Kontrollproben in einem Milliliter Lysis- Puffer (Dynal).
2. Zugabe von magnetischen Dynabeads Oligo (dT)<sub>25</sub> (Dynal) für 30 Minuten bei einer Umgebungstemperatur von 4°C, um die mRNA an die Beads zu binden.
3. Wechselndes Waschen mit Waschpuffer 1 (50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 0.5% Igepal) und Waschpuffer 2 (50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 0.5% Tween- 20).
4. Die an die Beads gebundene mRNA wurde sodann in First Strand Buffer (Gibco) mit 0.01 M DTT , 0.25% Igepal, 50 µM CFL5c- Primer [5'-(CCC)<sub>5</sub> GTC TAG A (NNN)<sub>2</sub>-3'], 0.5 mM dNTP, und 200 U Superscript II (Gibco) in einer 20 µl Reaktion revers transkribiert.
5. Nach 45 Minuten Inkubation bei 44°C wurden die Beads mit Tailingwaschpuffer (50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.0, 1 mM DTT, 0.25% Igepal) gewaschen.
6. In einem nächsten Schritt erfolgte die Denaturierung (vier Minuten bei 94°C) und Lösung der cDNA von den Beads.
7. Das anschließende Tailing erfolgte in einem Volumen von 10 µl mit 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM DTT, 0.2 mM dGTP, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, und 10 U terminaler Desoxynucleotidtransferase (MBI Fermentas) bei 37°C für 24 Minuten.

Nun wurde die so gewonnene cDNA mittels PCR im Puffer 1 (Expand<sup>TM</sup> Long Template, Roche) mit 3% deionisiertem Formamid, 1.2 µM CP2-Primer [5'-TCA GAA TTC ATG (CCC)<sub>5</sub>-3'], 350 µM dNTP und 4.5 U DNA-Polymerase-Mix (Roche) in einem Gesamtvolumen von 50 µl amplifiziert. Die PCR-Reaktion folgte dabei dem folgenden Schema von je 20 Zyklen: zunächst Erwärmung auf 94°C für 15 Sekunden, dann auf 65°C für je 30 Sekunden und zuletzt auf 68°C für 2 Minuten. Im Anschluss daran wurden erneut 20 Zyklen durchgeführt, wobei die Schritte eins und zwei identisch waren, der dritte jedoch 68°C für 2,5 Minuten plus 10 Sekunden pro Zyklus betrug. Abschließend erfolgte eine Extension bei 68°C für sieben Minuten.

### 3.2.8 Hybridisierung der cDNA- Arrays und Auswertung

Für die Hybridisierung wurden 25 ng der jeweiligen cDNA Proben während der amplifizierenden PCR-Reaktion mit Digoxigenin-11-dUTP (50 µM Digoxigenin-11-dUPT, Dig-dUTP) (Roche), sowie mit 300 µM dTTP und den anderen dNTPs in einer Konzentration von 350 µM markiert.

Bevor die cDNA auf die Arrays<sup>2</sup> hybridisiert werden konnten, mussten sie 12 Stunden lang mit 50 µg/ml *Escherichia coli*-DNA, 50 µg/ml *pbluescript*-DNA und 15 µg/ml Heringsperm-DNA in *DigEasyHyb*-Puffer (Roche) bei 44°C Umgebungstemperatur prähybridisiert werden. In die so vorbereitete Hybridisierungslösung wurde dann die zuvor denaturierte und markierte cDNA-Sonde hinzugegeben und erneut bei 44°C 48 Stunden lang inkubiert.

Nach Abschluss dieses Vorganges wurden die Arrays nach Anleitung des Herstellers erneut gewaschen, wobei zwei Waschgänge in 0.1x SSC/0.1 % SDS für 30 min bei 68°C hinzugefügt wurden. Der Nachweis der gebundenen cDNA-Probe erfolgte mit dem Digoxigenin Detection System (Roche).

### 3.2.9 Analyse der Daten der cDNA- Arrays

Die entwickelten Filme wurden mit einem kalibrierbaren Scanner eingescannt.<sup>3</sup> Die untenstehende Abbildung (Abb.4) zeigt beispielhaft zwei typische Arrays nach vollständig durchgeführtem Versuchsablauf; markiert sind zwei Beispiele für differentiell exprimierte Gene.

---

<sup>2</sup> Atlas human cancer 1.2, human 1.2, und cardiovascular Arrays der Firma Clontech

<sup>3</sup> Die Auswertung erfolgte mit der array *vision*<sup>TM</sup> Software (Imaging Research Inc.).

Um die Darstellungen der Arrays miteinander vergleichen zu können, wurde der Hintergrund des entwickelten Filmes subtrahiert und die Stärke des Signals auf neun Housekeeping- Gene normalisiert, die auf jedem Filter aufgetragen waren. Der Auswertung wurden folgende Axiome zugrunde gelegt: der Wert „eins“ wurde aus dem Durchschnitt der neun Housekeeping- Gene gebildet, das Hintergrundsignal bekam entsprechend den Wert „null“ zugeordnet. Als positives Signal wurden nur diejenigen Spots gewertet, deren relatives Signal über dem Wert 0,05 lag, da nur Signale über diesem Wert zusätzlich mittels genspezifischer PCR validiert werden konnten. Als statistisch verwertbar schließlich wurde der strenge Maßstab von Unterschieden im mittleren Expressionsniveau von  $\geq 2,5$  festgelegt, um eine hohe Datenqualität sicherzustellen.

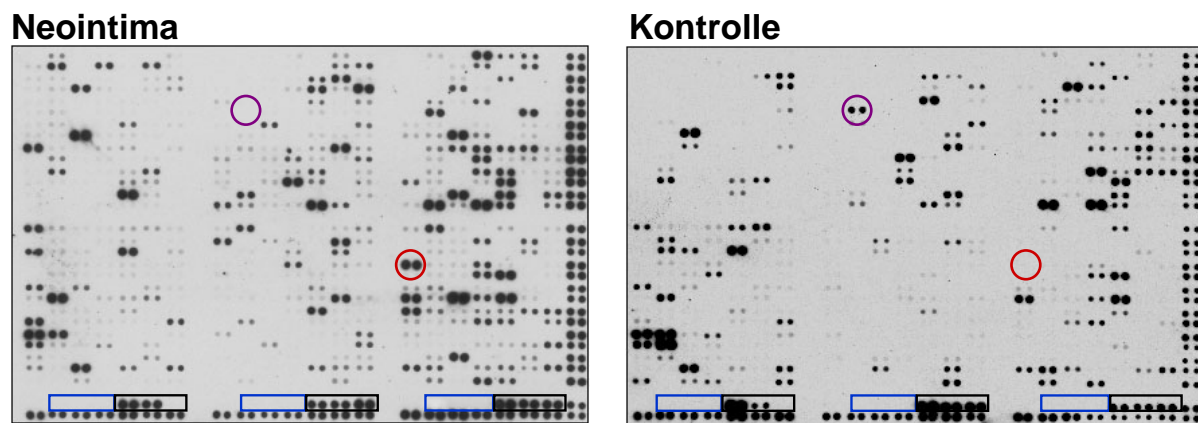


Abbildung 4: Zwei typische cDNA- Arrays (Human Cardiovascular, Clontech), links wurde die Probe aus humaner Neointima, rechts die Probe aus Kontrollmedia aufgetragen. Es finden sich 588 Gene, inklusive drei Negativkontrollen. Blau umrandet sind die Negativkontrollen, schwarz umrandet die neun Housekeeping Gene. Am rechten und unteren Rand der Membran wurde genomische DNA als zusätzliche Positivkontrolle aufgetragen. Als Beispiel sind zwei zwischen den Proben unterschiedlich exprimierte Gene umrandet (rot: COX-1; violett: MDGI).

### 3.2.10 Validierung der cDNA- Daten mittels genspezifischer PCR

Um die Ergebnisse der cDNA- Array- Analyse zu validieren, wurde eine Auswahl Rapamycin- regulierter Gene durch eine genspezifische PCR nachgewiesen. Die Amplifizierung wurde mit 2,5 ng einer jeden cDNA in einem 25  $\mu$ l Reaktionsvolumen mit PCR Puffer (Sigma), 200  $\mu$ M dNTPs, 0,1  $\mu$ M eines jeden Primers und 0,75 U Taq Polymerase (Sigma) durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden auf einem 2%igen Agarosegel mit Ethidiumbromide (0,5  $\mu$ g/mL) aufgetragen und elektrophoretisch getrennt.

### 3.2.11 Real Time PCR

Die RNA wurde aus den Zellen unter Verwendung des RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) gewonnen. Die RNA wurde unter Verwendung der Omniscript Reverse Transcriptase (Qiagen) und Random Hexamers (Gibco, Karlsruhe, Deutschland) in cDNA transkribiert. Die Real Time PCR- Reaktion wurde mit dem „SybrGreen- PCR Core Reagents Kit“ getreu den Herstellerangaben durchgeführt (Applied Biosystems, Deutschland), unter Verwendung eines die Exons sechs und sieben überspannenden Primers (5'-CCCATCCCAGGAGGTCACCTT-3', 3'-GGACAACAGCGGTTCTTGCT-5'). Die Primer Sequenzen für GAPDH als Kontrolle waren 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3' und 3'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'.

### 3.2.12 Immunhistochemische Analyse

Für die histologische und immunhistochemische Untersuchung wurden die Proben bei einem pH- Wert von 7,0 in 4%igem Formaldehyd fixiert und in Paraffin eingebettet. Eine Serie von 3 µm dicken Schnitten wurde entparaffinisiert, dehydriert und zur Antigendarstellung vier Minuten lang in 10 mM Citratpuffer bei einem pH- Wert von 6,0 druckerhitzt. Die endogene Peroxidase wurde durch eine fünfzehnminütige Inkubation von einprozentigem Wasserstoffperoxid blockiert. Anschließend wurden die Schnitte mit vierprozentiger „dried skim milk“ in Antibody Diluent (Dako) präinkubiert. Die Immunfärbung erfolgte mittels Streptavidin- Alkaline- Phosphatase Technik für α- Aktin und Streptavidin- Horseradish- Peroxidase Technik (Dako ChemMate Detection Kit) für FKBP 12, CD3, mTOR und p- mTOR. Als primäre Antikörper dienten gegen α- Aktin (M0635, Dako, 1:300), CD3 (A0452, Dako; 1:80), mTOR (sc1549, Santa Cruz; 1:30) und phosphoryliertes p\*mTOR (Ser2448, # 2971, Cell Signaling), welches mTOR nur detektiert, wenn es an Ser2448 phosphoryliert ist. FKBP 12 wurde mit dem anti- FKBP 12 Antikörper SA-218 (Biomol, 1:20) nachgewiesen.

### 3.3 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse der humanen Neointima werden als mittlere Expressionswerte von fünf Proben jeder Gruppe dargestellt. Dabei erhobene Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen wurden mit dem ANOVA- Test weiter analysiert.

Dabei wurde die Maßgabe festgelegt, dass ein Unterschied im mittleren Expressionsniveau zwischen den untersuchten Gruppen größer als  $\geq 2,5$  und ein P- Wert in der statistischen Analyse  $< 0,05$  betragen muss, um in der Auswertung ein Gen als differentiell exprimiert anzuerkennen.

Die Daten der *in vitro*- Experimente wurden entweder mittels des gepaarten T- Tests oder der einfaktoriellen ANOVA analysiert. Als Signifikanzniveau wurde ein  $P < 0,05$  angenommen.

Alle statistischen Analysen wurden mit dem SPSS Statistikpaket (Version 8.0-10.0) durchgeführt.



## 4. Ergebnisse

Das Makrolidantibiotikum Rapamycin bindet intrazellulär an das Immunophilin FKBP 12 und entfaltet seine immunsuppressive und antiproliferative Wirkung durch Inhibierung der p70 S6-Kinase und Aktivierung des Retinoblastoma Genprodukts (Rb).

Eine Analyse der differentiellen Genexpression von humaner Neointima aus Restenosen im Stent ergab, dass FKBP 12 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene in glatten Muskelzellen (SMCs) der humanen Neointima überexprimiert wird, während SMCs der Media von gesunden Koronarien keine FKBP 12 Expression zeigten (Zohlhöfer et al., 2001a).

FKBP 12 ist von besonderer Bedeutung für die Signaltransduktionskaskade, die zur Aktivierung der ribosomalen p70 S6-Kinase führt. Die Aktivierung der p70 S6-Kinase wiederum spielt in der Signaltransduktion vieler Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise PDGF oder Angiotensin, eine zentrale Rolle. Weiterhin ist bekannt, dass Rapamycin die Migration und Proliferation glatter Muskelzellen *in vitro* inhibiert und zu einer Reduktion der Neointimahyperplasie führt. Der genaue Wirkmechanismus von Rapamycin auf humane, proliferierende, glatte Muskelzellen und auf die Neointimaformation ist bisher aber noch nicht bekannt. Daher war es Ziel dieser Studie, den Effekt von Rapamycin auf die Genexpression, die p70 S6-Kinase, auf das Retinoblastoma Genprodukt Rb, auf die Proliferation und Apoptose humaner, glatter Muskelzellen und auf die Adhäsion von Monozyten an proliferierenden, glatten Muskelzellen zu untersuchen.

### 4.1 Effekt von Rapamycin auf proliferative und inflammatorische Eigenschaften glatter Muskelzellen *in vitro*

#### 4.1.1 Darstellung der mTOR Kinase in Neointimagewebe im Vergleich zur mTOR-Kinase bei gesunden glatten Muskelzellen

In vorangegangenen Analysen konnte bereits nachgewiesen werden, dass es nach einer Behandlung ruhender Zellen mit Wachstumsfaktoren zu einem verstärkten nukleären „Shuttling“ und zu einer Phosphorylierung der mTOR Kinase und zur Phosphorylierung von Zielproteinen der mTOR Kinase, wie beispielsweise der p70 S6-Kinase kommt (Kim und Chen, 2000).

Hierauf aufbauend wurde in dieser Versuchsreihe Neointimagewebe aus Restenosen der Arteria femoralis immunhistochemisch mit einem Antikörper gegen nicht-phosphoryliertes

und phosphoryliertes mTOR markiert, mit der Zielsetzung, die Veränderungen der Phosphorylierung der mTOR- Kinase im Neointimagewebe darstellen zu können.

In Abbildung 5 A ist dargestellt, dass mTOR in Endothelzellen (offener Pfeil) und in glatten Muskelzellen der Media gesunder, nicht atherosklerotisch veränderter Zellen (ausgefüllter Pfeil) nachweisbar ist. Abbildung 5 B zeigt hingegen, dass mTOR in der Neointima restenotischer Arterien in den Zellkernen neointimaler glatter Muskelzellen (5 B, ausgefüllte Pfeilspitze) und T- Lymphozyten (5 B, offene Pfeilspitze) zu finden ist.

mTOR wird also während der Neointimaformation zu einer Translokation in die Zellkerne angeregt. Weiterhin zeigt die menschliche Neointima im Vergleich mit den glatten Muskelzellen der Kontrollgruppe eine erhöhte Phosphorylierung von mTOR (= p\*mTOR) in glatten Muskelzellen (5 D, Pfeil) und T- Lymphozyten (5 D, offener Pfeil).

Dies weist auf eine Aktivierung von mTOR in glatten Muskelzellen und T- Lymphozyten während der Neointimabildung im Menschen hin.

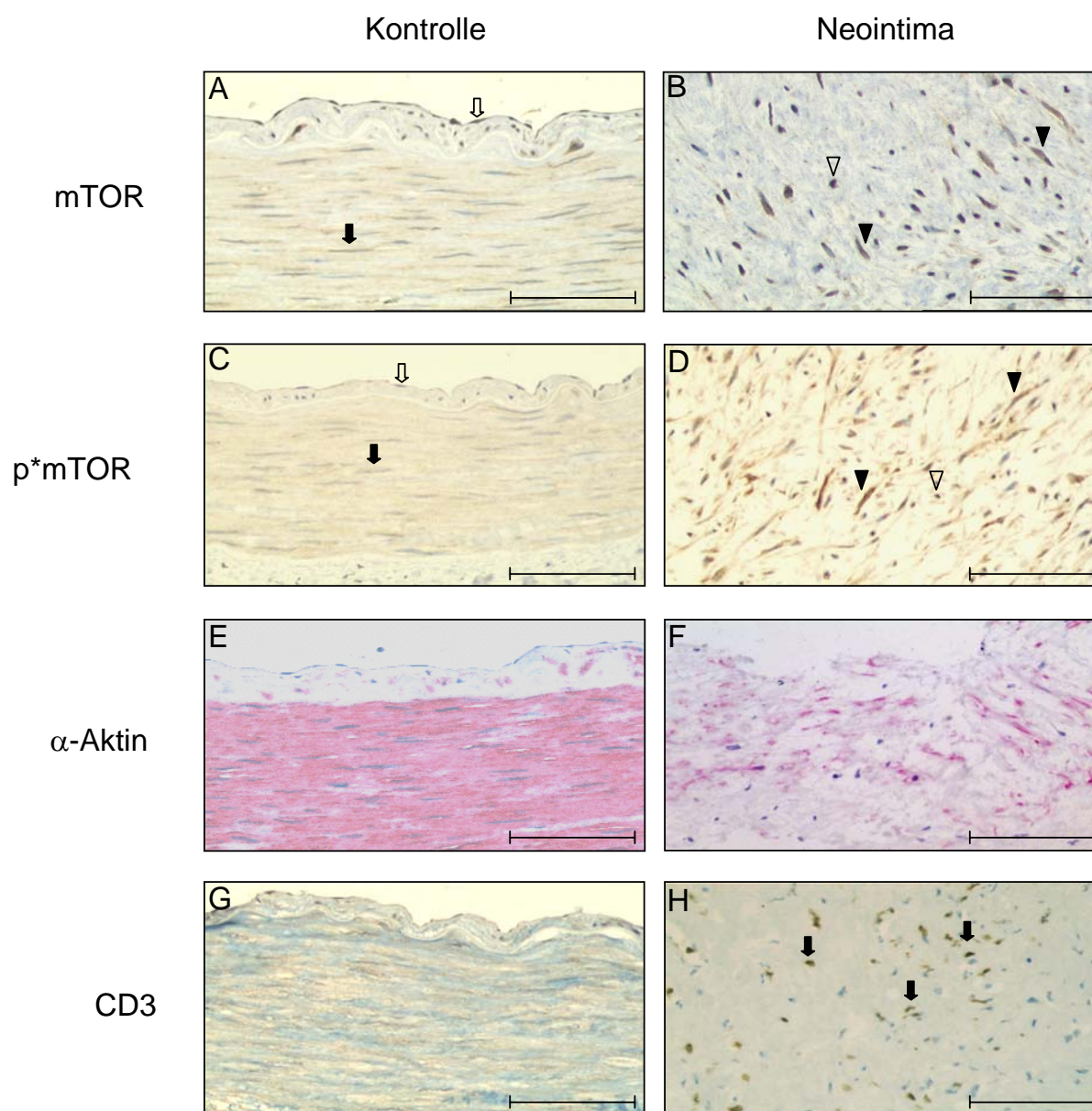


Abbildung 5: Proteinexpression der mTOR-Kinase in humaner Neointima. Immunhistochemischer Nachweis der mTOR-Kinase (A, B) und der phosphorylierten p\*mTOR-Kinase (C, D) in Endothelzellen (offene Pfeile) und glatten Muskelzellen (ausgefüllte Pfeile) in gesunder Kontrollmedia (A, C, braun) oder in glatten Muskelzellen (ausgefüllte Pfeilspitze) oder T-Lymphozyten (offene Pfeilspitze) in der Neointima aus einer *Arteria femoralis* (B, D, braun). Nachweis  $\alpha$ -Aktin positiver glatter Muskelzellen in der Neointima und Kontrollmedia (E, F, rot), während T-Lymphozyten nur in neointimalem Gewebe nachweisbar waren (H, braun). Gezeigt ist eines von fünf unabhängigen Experimenten.

#### 4.1.2 Wirkung von Rapamycin auf die p70 S6- Kinase und pRB

In unbehandelten, proliferierenden glatten Muskelzellen liegt die p70 S6- Kinase in einem hyperphosphorylierten, aktivierten Zustand vor (Abb. 6, Spalten 2, 4, 6). Der Tumorsuppressor pRb befindet sich ebenfalls in einem hyperphosphorylierten, aber damit inaktivierten Zustand (Abb. 6, Spalten 2, 4, 6 gekennzeichnet).

Nach Behandlung proliferierender glatter Muskelzellen mit 100 ng/ml Rapamycin kommt es bereits nach sechs Stunden zu einer frühen und anhaltenden Inaktivierung durch Dephosphorylierung der p70 S6- Kinase, wie der Vergleich mit den Ergebnissen nach 24 bzw. 48 Stunden zeigt.

Die Inkubation mit Rapamycin führte bei dem Tumorsuppressor pRb zu einer zeitlich verzögerten Dephosphorylierung und damit zu einer Aktivierung von pRb in den Muskelzellen.

Die Wirkung von Rapamycin auf die Phosphorylierung der p70 S6- Kinase und des Tumorsuppressors pRb hielt mindestens 48 Stunden an und war bereits nach einer Behandlung mit 20 ng/ml Rapamycin nachweisbar.

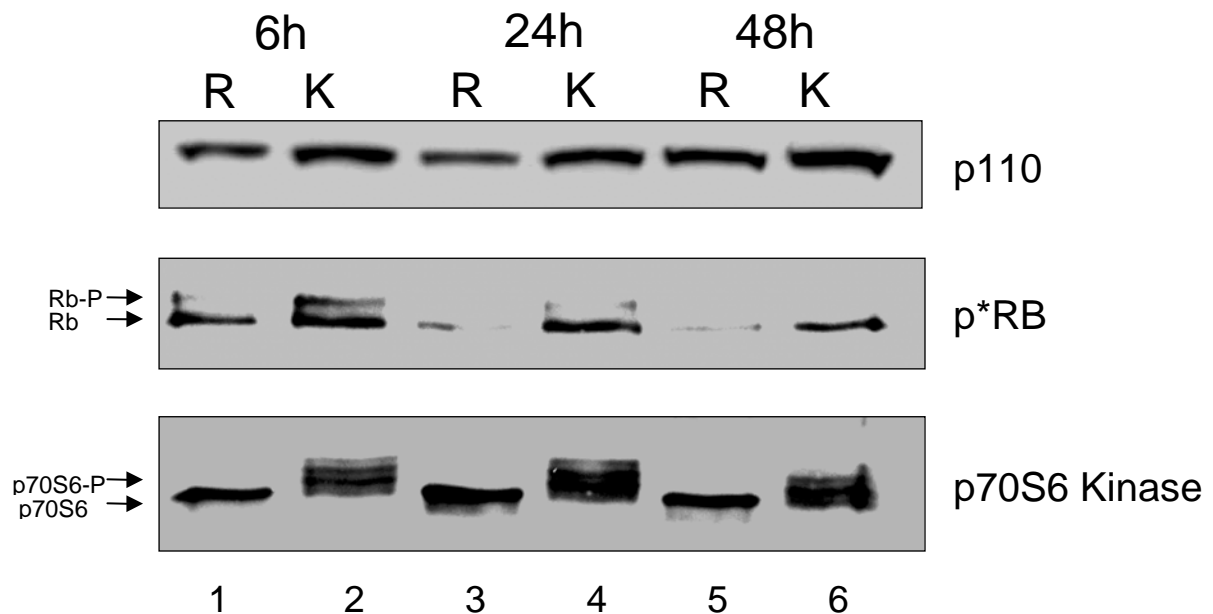


Abbildung 6: Nachweis der Wirkungsweise von Rapamycin auf die Phosphorylierung der p70 S6- Kinase und pRb in glatten Muskelzellen *in vitro*. Die mit „R“ gekennzeichneten Spalten sind für die angegebene Zeit mit Rapamycin behandelt worden, „C“ kennzeichnet die Kontrollgruppe. P110 diente als Ladungskontrolle. Mittels eines spezifischen Antikörpers gegen phosphoryliertes pRb (p\*Rb) kann die Dephosphorylierung von pRb durch Rapamycin nachgewiesen werden.

## 4.2 Wirkung von Rapamycin auf das Transkriptom glatter Muskelzellen

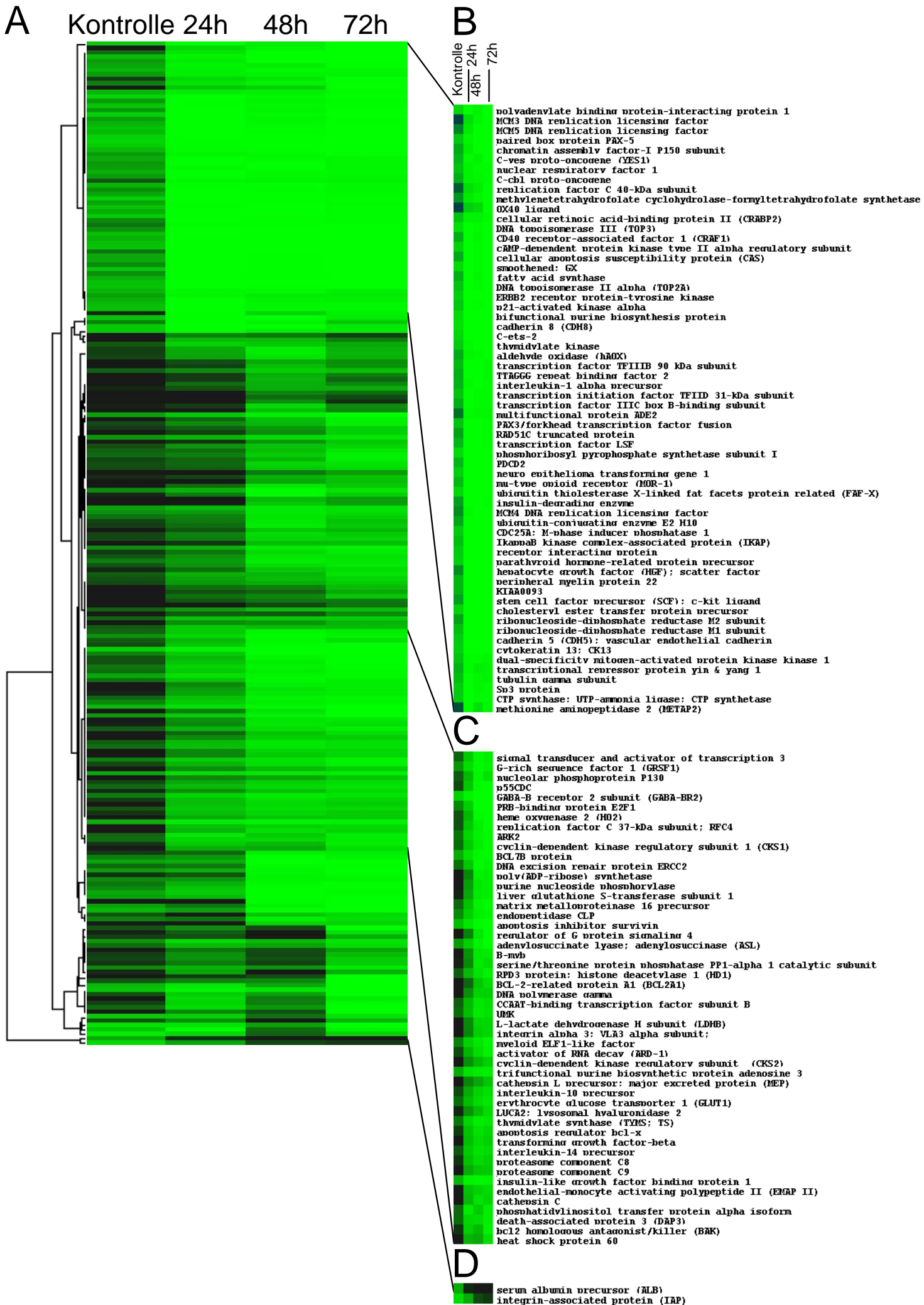
### 4.2.1 Ergebnisse der Genexpressionsanalyse

Die Untersuchung proliferierender glatter Muskelzellen, die 24, 48 oder 72 Stunden mit Rapamycin behandelt wurden, ergab, dass 227 von 2231 Genen differentiell exprimiert wurden; dies entspricht einer Rate von 9,8 %.

Die nachstehende Abbildung zeigt mittels Clusteranalyse die hierarchische Anordnung der Gene nach dem Zeitverlauf der veränderten Expression (Abb. 7). Die weit überwiegende Mehrheit der Gene wurde durch die Anwesenheit von Rapamycin vermindert exprimiert. Durch den Buchstaben „A“ wird die Gesamtheit der Proben gekennzeichnet. Die Gruppe „B“ zeigt die Gene, die bereits nach 24 Stunden Inkubation mit Rapamycin herunterreguliert werden. Die Gruppe „C“ enthält jene Gene, deren mRNA Expression nach 48 Stunden supprimiert wurde. Die Gruppe „D“ schließlich enthält jene beiden Gene, die durch Rapamycin verstärkt exprimiert wurden.

In der Gruppe „B“ finden sich viele Gene, die für Proteine der Replikation, der Apoptose und der Zellzyklusregulation kodieren. Die Gene der Gruppe „C“ hingegen kodieren überwiegend für Proteine, die für die Apoptose, extrazelluläre Matrix oder Adhäsionsmoleküle verantwortlich sind.

Abbildung 7 (nächste Seite): Clusteranalyse der Daten der Genexpression von glatten Muskelzellen im Zeitverlauf nach Behandlung mit Rapamycin. (A) cDNA Arrays wurden mit der markierten cDNA von proliferierenden glatten Muskelzellen (n=5) und von glatten Muskelzellen, die für 24, 48 und 72 Stunden mit Rapamycin behandelt wurden (n=5) hybridisiert. Es wurden solche Gene als differentiell exprimiert anerkannt, deren mittlerer Expressionswert einen mindestens 2,5-fachen Unterschied zum Nullwert aufwies und im ANOVA-Test einen deskriptiven P-Wert  $< 0.05$  erreichte. Jedes Gen wird in einer Reihe dargestellt, jeder Zeitpunkt durch eine Säule. Für jedes Gen ist der Mittelwert der mRNA-Expression von fünf unabhängigen Experimenten auf das Expressionsniveau der Housekeeping-Gene normalisiert und durch einen Grünwert entsprechend der Signalintensitätsskala dargestellt. (B) Ausschnitt eines Genclusters, das 64 Gene zeigt, die bereits nach 24 Stunden vermindert exprimiert sind. (C) Ausschnitt eines Genclusters, das 50 Gene enthält, deren Expression nach 48 Stunden supprimiert ist. (D) Vergrößerter Ausschnitt der beiden konsistent induzierten Gene.



Zusätzlich zur statistischen Analyse wurde die Aussagekraft der Daten durch die Ergebnisse von Hybridisierungsversuchen an gleichen Genen gestützt, die auf verschiedenen Arrays bestimmt wurden. Die Expression dieser Gene wies ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit auf. Neun Beispiele von Doppelbestimmungen werden in Abbildung 8 dargestellt und sind mit einer Klammer ({} gekennzeichnet.

Um einen besseren Überblick über den Effekt von Rapamycin zu gewinnen, sind in Abbildung acht die Gene nach funktionellen Gesichtspunkten geordnet. In den ersten beiden Gruppen finden sich Gene, die bei der Replikation bzw. Translation von Zellen eine Rolle spielen. Hierbei handelt es sich um knapp 30 Gene, die durch die Behandlung mit Rapamycin in deutlich geringerem Ausmaß exprimiert werden (Abb. 8 A).

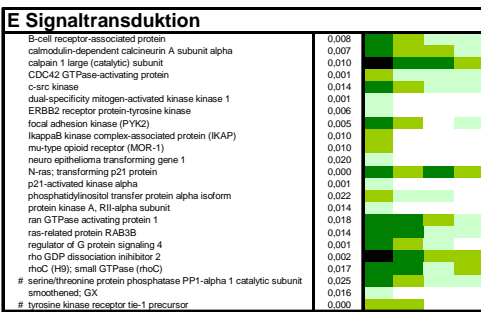
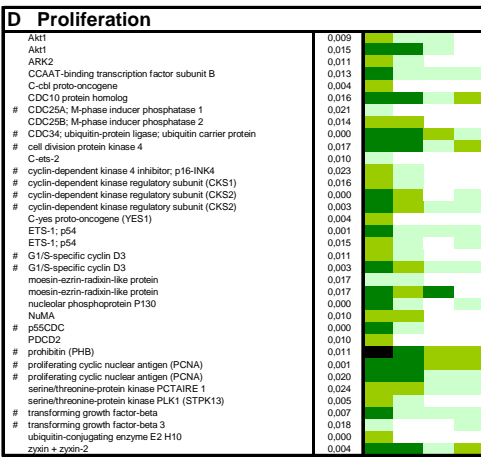
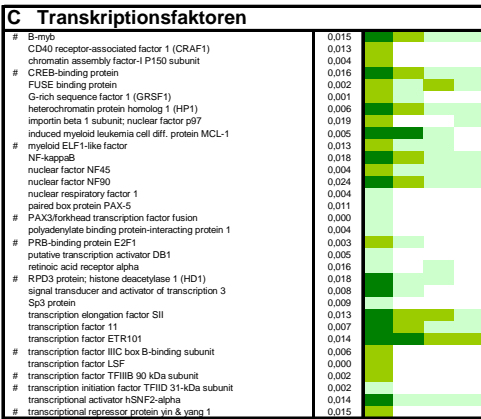
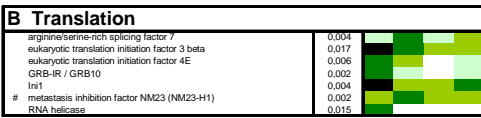
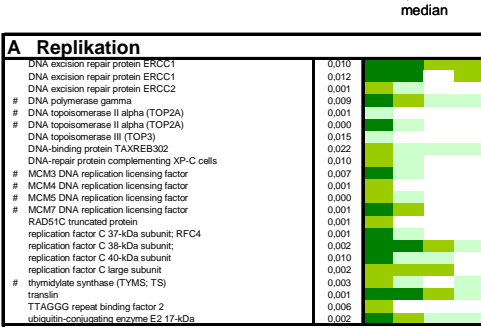
Von den durch die Behandlung mit Rapamycin differentiell exprimierten Genen konnten 32 Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, wie beispielsweise MCL- 1 (Myeloid Cell Leukemia 1) oder NF-  $\kappa$  B, die in der dritten Gruppe aufgeführt sind (Abb. 8 C). Eine entscheidende Bedeutung für den Zellzyklus hat dabei der Transkriptionsfaktor E2F- 1, der eine verminderte Expression nach Behandlung mit Rapamycin nach 24 bzw. 48 Stunden zeigte. Weiterhin waren 41 E2F- 1 assoziierte oder regulierte Gene ebenfalls vermindert exprimiert. Dabei handelte es sich beispielsweise um den transkriptionellen Repressor Yin& Yang-1 (YY1), Replikationsfaktoren, wie die MCM DNA Replikationsfaktoren, oder E2F- 1 Zielgene, wie Cyclin D3 oder CDK4, die wichtige Funktionen in der Phosphorylierung von pRb und damit im Zellzyklus ausüben (Kato et al., 1993).

Auch in der Gruppe der für Proliferation verantwortlichen Gene, zu denen Wachstumsfaktoren wie der „transforming growth factor beta“ gehört, zeigte sich ein hemmender Effekt Rapamycins größtenteils bereits nach 24 Stunden (Abb. 8 D).

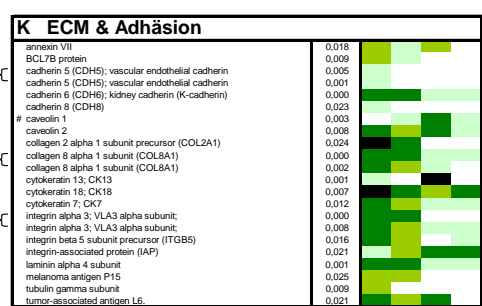
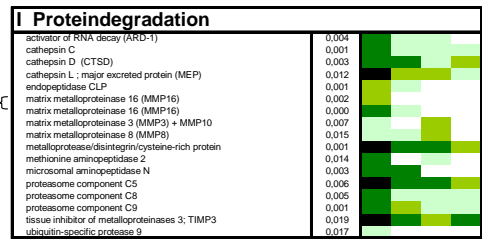
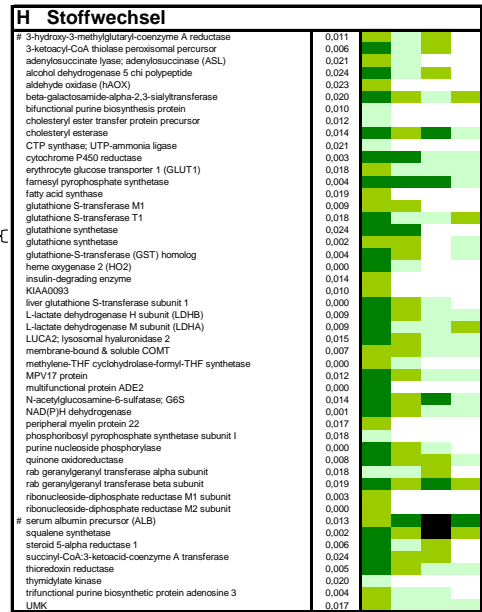
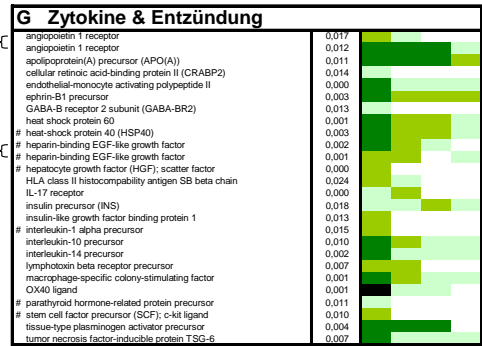
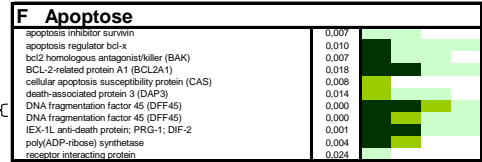
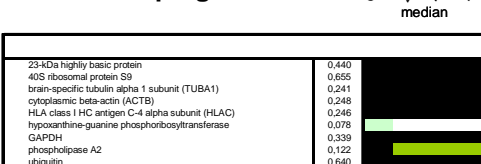
Weiterhin kam es unter der Wirkung von Rapamycin zu einer verminderten Expression Apoptose- assoziierter Gene. Es zeigte sich sowohl eine verminderte Expression proapoptotischer Gene, wie CAS (*Cellular Apoptosis Susceptibility Gen*), als auch anti-apoptotischer Gene, wie des *BCL- 1-related Protein A1* (BCLA- 1) (Abb. 8 F).

Abbildung 8 (nächste Seite): In der Clusteranalyse sind die durch Rapamycin verändert regulierten Gene nach 24, 48 und 72 Stunden dargestellt. Die Gene sind zehn Gruppen entsprechend ihrer Funktion zugeordnet. Die Genexpression im zeitlichen Verlauf ist horizontal dargestellt, jede Spalte demonstriert die mittlere mRNA Expression der fünf Gruppen. Mit # markierte Gene sind mit dem E2F- 1/ pRb- Signalweg assoziiert.

# I Differentielle Gene



# II Housekeeping Gene





Weiterhin werden durch Rapamycin einige funktionell entscheidende Adhäsionsmoleküle und extrazelluläre Matrixproteine wie beispielsweise Cadherin 5, Kollagen  $8\alpha-1$  oder die Metalloproteinase MMP- 16 (Abb. 8 K) herabreguliert. Diesen Einfluss hat Rapamycin auch auf Gene, die wichtig für die Adhäsion und Rekrutierung von Leukozyten und Monozyten sind. In den Versuchsreihen konnte eine verminderte Expression des Endothelial- Monocyte Activating- Polypeptide- II (EMAP- II), ein wichtiges Chemokin für Monozyten (Kao et al., 1994), nachgewiesen werden.

#### **4.2.2 Validierung durch PCR**

##### **4.2.2.1 Validierung der Wirkung von Rapamycin durch Gen- spezifische PCR**

Zur Validierung der Genexpressionsanalyse wurde eine genspezifische PCR durchgeführt. Dabei sollte zusätzlich ermittelt werden, ab welcher Dosierung eine ausreichende Wirkung durch Rapamycin erzielt und auch nachgewiesen werden kann. Es wurden sechs Gene ausgewählt, die eventuell dem therapeutischen Effekt von Rapamycin zugrunde liegen. Dabei handelte es sich um die Gene: E2F- 1, Cyclin D1, RFC 40, YY- 1, CAS und MMP- 16. Zusätzlich wurde das „*Housekeeping- Gen*“  $\beta$ - Aktin als Kontrolle aufgetragen.

Dadurch konnte bereits ab einer Dosierung von 5 ng/ml Rapamycin ein hemmender Effekt von Rapamycin auf die Expression der vier Gene E2F- 1, Cyclin D3, CAS und YY- 1 nachgewiesen werden. Auf RFC 40 und MMP- 16 wirkte sich erst eine Gabe von 20 ng/ml Rapamycin hemmend aus. Das Kontroll- Gen  $\beta$ - Aktin hingegen wies keine Änderung der Expression unter dem Einfluss von Rapamycin auf. Die Darstellung der Ergebnisse ist in Abbildung 9, Seite 34 zusammengefasst.

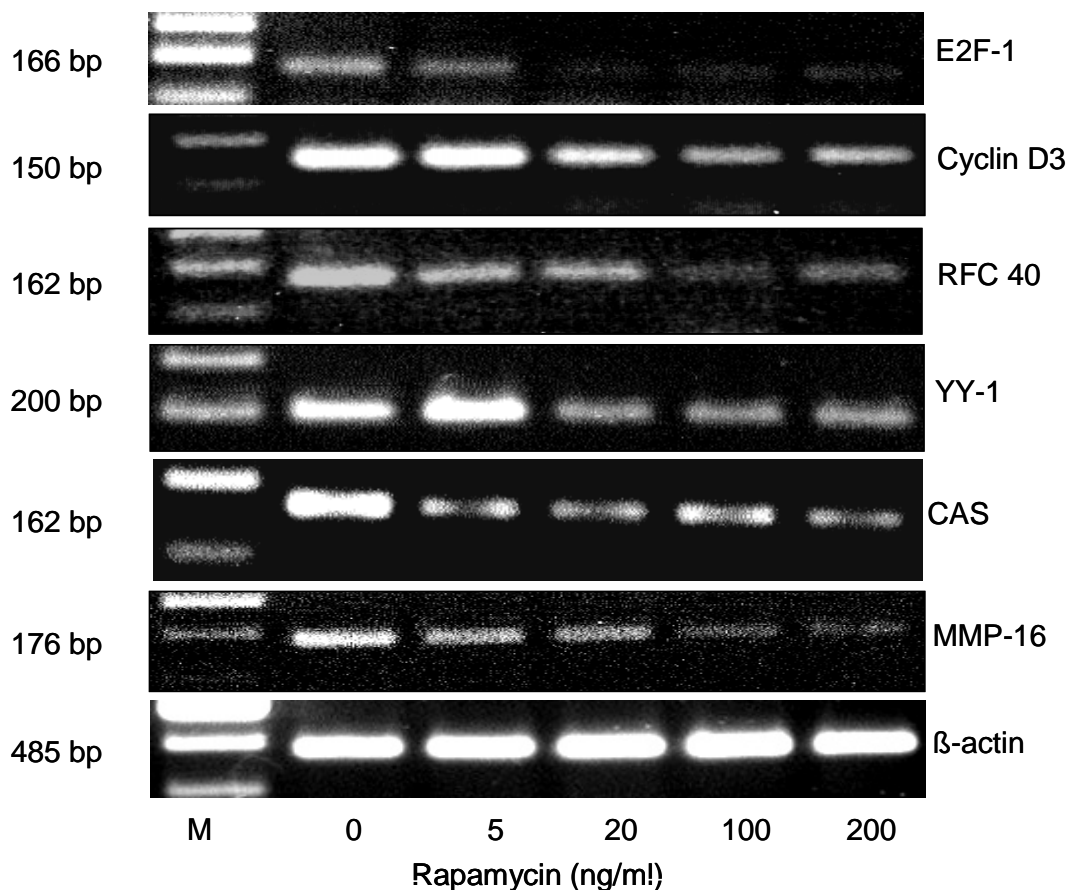


Abbildung 9: Genspezifische PCR nach Behandlung glatter Muskelzellen mit Rapamycin für 48 Stunden in unterschiedlichen Konzentrationen, die in der untersten Reihe aufgeführt werden. Die erwartete Größe der PCR-Fragmente ist am linken Rand angegeben. M Marker; bp Basenpaar.

#### 4.2.2.2 Validierung der Wirkung von Rapamycin auf Apoptose- assoziierte Gene

In einer weiteren Gen- spezifischen PCR wurden verschiedene mit der Regulation der Apoptose assoziierten Gene untersucht. Wie in Abbildung 10 (S.35) erkennbar führt Rapamycin zu einer deutlichen Herabregulierung der mRNA- Expression von Survivin, ein zelluläres Apoptoseprotein und BAK (BCL2 Antagonist Killer). Survivin beeinflusst sowohl den programmierten Zelltod als auch Mechanismen der Zellzyklusprogression (Altieri, 2003). BAK spielt eine entscheidende pro- apoptotische Rolle (Cartron et al, 2003).

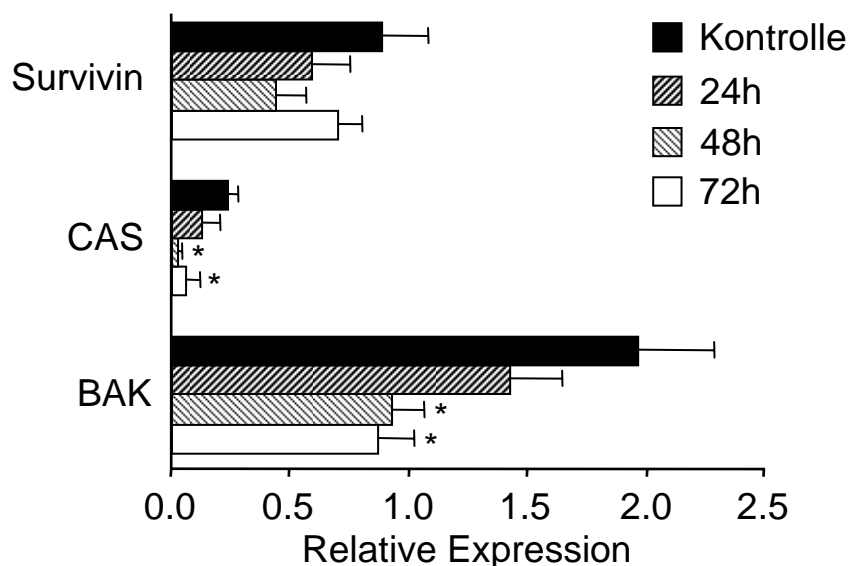


Abbildung 10: Densitometrische Messung zur Verifizierung der Abnahme der mRNA- Expression Apoptose- assoziierter Gene mittels genspezifischer PCR. Die Ergebnisse sind Durchschnittswerte aus drei verschiedenen Experimenten, \* $p < 0.05$

#### 4.2.2.3 Validierung der Wirkung von Rapamycin auf die Expression von E2F-1

E2F- 1 stellt einen zentralen Transkriptionsfaktor in der Regulation des Zellzyklus glatter Muskelzellen dar und reguliert die Expression vieler E2F- 1 assoziierter Gene.

Um die bisher gewonnen Daten über den Effekt von Rapamycin auf die Genexpression von E2F-1 zu bestätigen, wurde eine Real- Time PCR durchgeführt. Wie in Abbildung 11 zu erkennen, führt die Inkubation glatter Muskelzellen mit Rapamycin zu einer 50- 60 prozentigen Reduktion von E2F-1 nach 24- 72 Stunden.

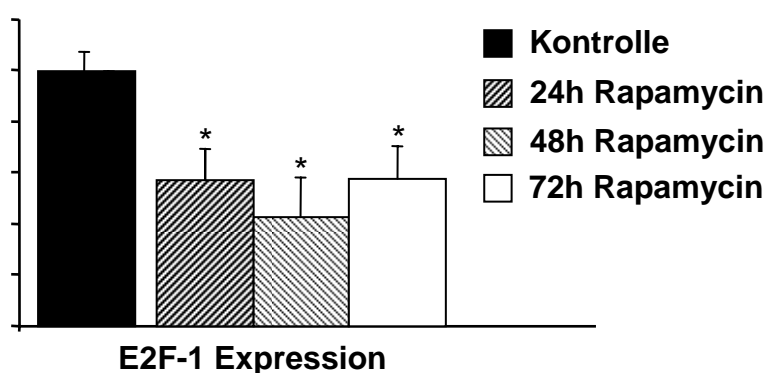


Abbildung 11: Verifizierung der zeitabhängigen Abnahme der mRNA Expression in E2F-1 durch Real Time PCR. Die Ergebnisse werden als Durchschnittswert von fünf verschiedenen Experiment dargestellt, \* $p < 0.05$

### 4.3 Wirkung von Rapamycin auf biologische Eigenschaften glatter Muskelzellen

#### 4.3.1 Wirkung von Rapamycin auf die Proliferation glatter Muskelzellen

Um zu untersuchen, ob der Effekt von Rapamycin auf die Expression von E2F-1 zu einer Hemmung des Zellzyklus führt, wurde ein Proliferationsassay durchgeführt. Wie bereits in der Literatur beschrieben (Gallo et al., 1999; Poon et al., 2002), konnte eine signifikante Hemmung des Wachstums glatter Muskelzellen nachgewiesen werden (Abbildung 12). Dabei bestätigte sich, dass der wachstumshemmende Effekt von Rapamycin bereits nach relativ kurzer Zeit einsetzt und über einen längeren Zeitraum erhalten bleibt (Abbildung 12).

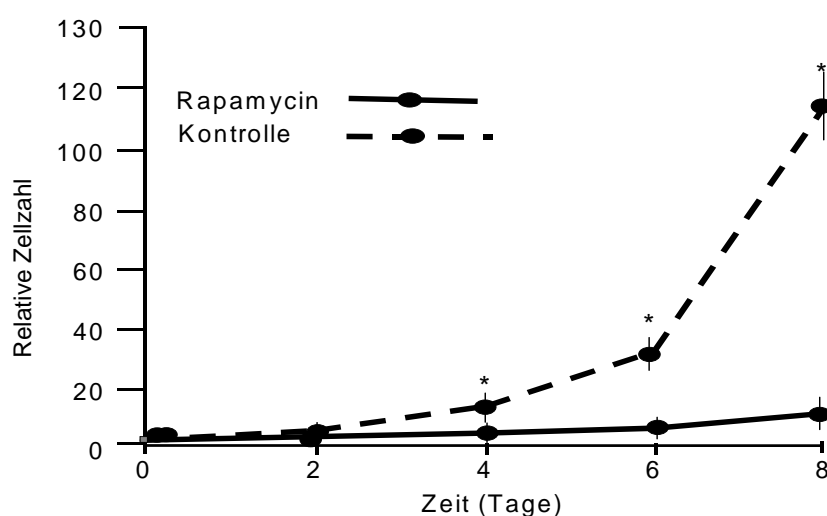


Abbildung 12: Effekt von Rapamycin auf die Proliferation glatter Muskelzellen.

#### 4.3.2 Wirkung von Rapamycin auf die Apoptose glatter Muskelzellen

Es wurde bereits gezeigt, dass unter dem Einfluss von Rapamycin sowohl eine Hemmung proapoptotisch als auch anti-apoptotisch wirksamer Gene nachgewiesen werden kann (s. Abbildung 7F). Um den Effekt von Rapamycin auf die Apoptose glatter Muskelzellen genauer analysieren und darstellen zu können, wurden die mit Rapamycin behandelten glatten Muskelzellen mittels einer Annexin V-Färbung und durchflusszytometrischen Analyse untersucht.

Sechs Stunden nach Induktion der Apoptose mit 100  $\mu\text{mol/l}$  Wasserstoffperoxid wurden die Zellen mit Annexin-V und Propidiumjodid doppelt gefärbt.

Die grafisch dargestellten Werte wurden aus dem Mittelwert von fünf unabhängigen Experimenten erstellt (Abbildung 13). Es zeigte sich, dass Rapamycin zu einer signifikanten

Senkung der Apoptoserate im Vergleich mit unbehandelten glatten Muskelzellen führt. Auch jene Zellen, die zur Apoptoseinduktion mit Wasserstoffperoxid behandelt wurden, zeigten eine signifikante Reduktion der apoptotischen Zellen nach Rapamycinbehandlung (Abbildung 13).

### Annexin-V- Färbung

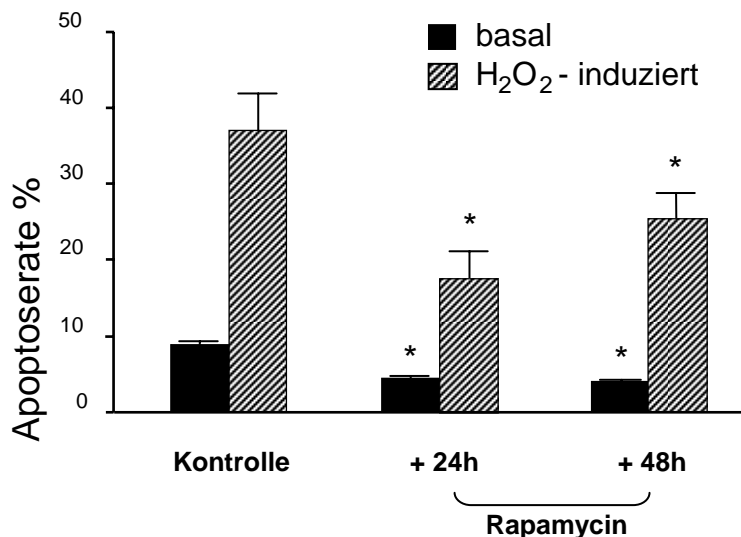


Abbildung 13: Nachweis des Effektes von Rapamycin auf die Überlebensrate glatter Muskelzellen. Die Zellen wurden teilweise mit Rapamycin behandelt und mit Annexin V 6 Stunden nach Induktion der Apoptose gefärbt. Die Ergebnisse sind der Mittelwert aus 5 unabhängigen Experimenten.

Diese Daten wurden durch den sehr sensitiven TUNEL Assay weiter verifiziert (Abb.14). Dieser Assay weist die in typischer Weise fragmentierte DNA nach, die während des programmierten Zelltodes entsteht.

### TUNEL- Assay

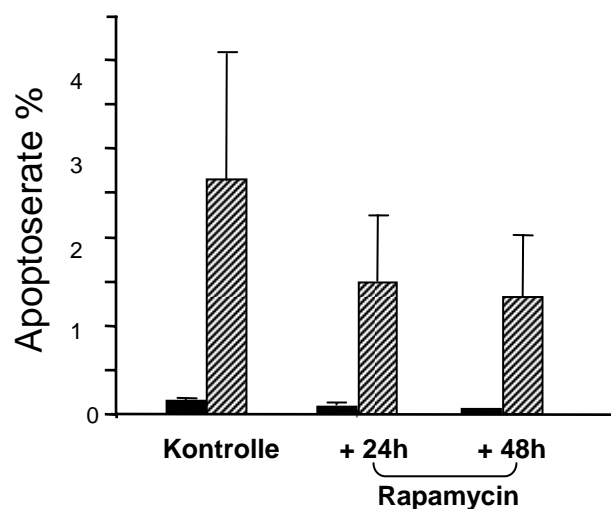


Abbildung 14: Effekt von Rapamycin auf die Apoptose glatter Muskelzellen. Durchflußzytometrische Analyse spontaner oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzierter Apoptose. Zellkultur in An- oder Abwesenheit von Rapamycin. TUNEL- Färbung 12h nach Apoptoseinduktion.

#### 4.4 Wirkung von Rapamycin auf die Adhäsivität monozytärer Zellen

Durch den Nachweis eines eindeutigen Zusammenhanges zwischen Neointimadicke und dem Ausmaß der Makrophageninfiltration in der Neointima (Farb et al., 2002), wurde die Hypothese gestärkt, dass die Entzündungsreaktion nach Gefäßwandverletzung, sowie die Aktivierung und Einwanderung von Monozyten und Makrophagen eine entscheidende Rolle in der Neointimabildung spielen.

Daher ist es von grundlegender Bedeutung, die Wirkung von Rapamycin auf die Adhäsivität glatter Muskelzellen für monozytäre Zellen genauer zu analysieren.

Im Mausembryo wurde EMAP- II verstärkt in Gewebe mit hoher apoptotischer Aktivität exprimiert. Apoptotische Zellen wiederum werden überwiegend durch Makrophagen abgebaut. Interessanterweise fand man in Gewebsstrukturen mit hoher apoptotischer Aktivität eine verstärkte EMAP- II mRNA Expression (Knies *et al.*, 1998).

Es handelt sich bei EMAP- II demnach um ein proinflammatorisches Zytokin, das entscheidend ist für die Rekrutierung von Entzündungszellen und zusätzlich eine pro-apoptotische Wirkung auf die Endothelzellen hat (Kao et al., 1994; Knies et al., 1998).

Aktiviertes EMAP- II ist ein 23 kDa Protein, das aus der Spaltung eines Multisynthetase Komplex nach der Abspaltung seiner p43/ pro EMAP- II Komponente freigesetzt wird (Shalak *et al.*, 2001). In apoptotischen Zellen wird über eine durch Caspase 7 gesteuerte Abspaltung und Freisetzung von aktiviertem EMAP- II berichtet, dies weist darauf hin, dass das koordinierte Programm des Zelltods, die Aktivierung einer Entzündungsreaktion umfasst (Knies *et al.*, 1998; Behrendorf *et al.*, 2000).

In der Genexpressionsanalyse der mit Rapamycin inkubierten glatten Muskelzellen konnte gezeigt werden, dass Rapamycin die Expression des Chemokins EMAP- II herabreguliert.

Durch Zugabe blockierender Antikörper gegen die beiden Adhäsionsmoleküle ICAM- 1 und VCAM- 1 konnte die Hemmung der Adhäsion monozytärer Zellen an glatte Muskelzellen um 34 % reduziert werden (Abbildung 15). Ein blockierender Antikörper gegen E- Selektin hingegen zeigte so gut wie keinen hemmenden Effekt. Somit konnte gezeigt werden, dass die Applikation von Rapamycin interessanterweise zu einer signifikant verringerten Adhäsion monozytärer Zellen an glatten Muskelzellen führte.

In Abbildung 15 ist erkennbar, dass die Hemmung der Adhäsion monozytärer Zellen durch Rapamycin mittels Zugabe von EMAP- II aufgehoben werden kann. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass der hemmende Effekt von Rapamycin auf die Adhäsivität glatter Muskelzellen zumindest teilweise auf die verminderte Expression von EMAP- II zurückzuführen ist.

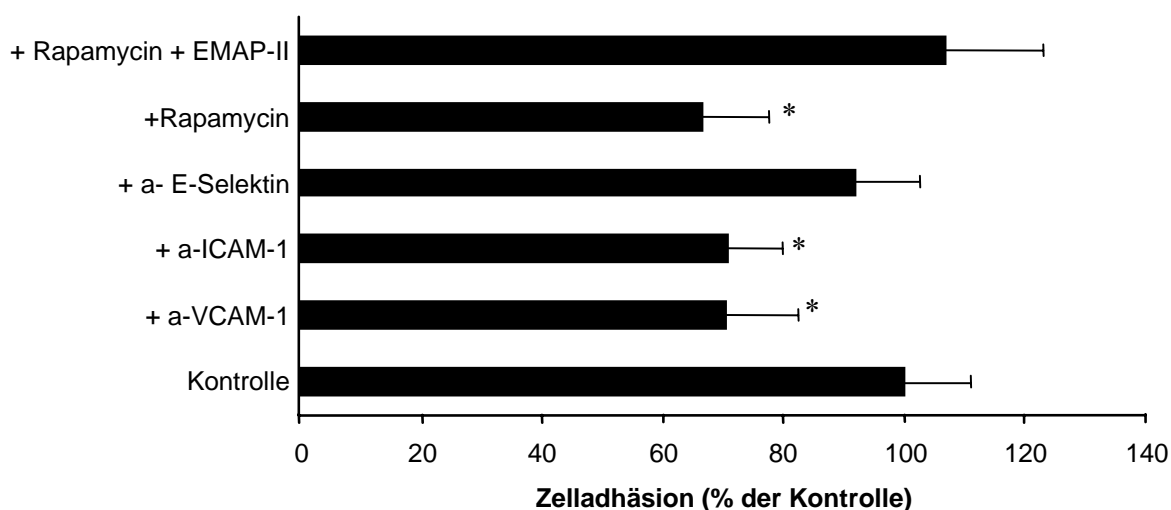


Abbildung 15: Wirkung von Rapamycin auf die Adhäsivität glatter Muskelzellen. Glatte Muskelzellen wurden in An- oder Abwesenheit von 100 ng/ml Rapamycin für 24 Stunden kultiviert, anschließend gewaschen und in An- oder Abwesenheit von 40 µg/ml EMAP-II Protein oder den Adhäsionsmolekülen ICAM- 1 und VCAM- 1 inkubiert; (s.a. Methodenteil). Nach erneutem Waschen, Zugabe von MonoMac 6-Zellen und Bestimmung der Adhäsion monozytärer Zellen nach 30 Minuten. Die dargestellten Ergebnisse zeigen jeweils den Mittelwert dreier unabhängiger Experimente; \* p<0.05

Wenn Rapamycin seine Wirkung über EMAP-II entfaltet, sollte die Induktion der Apoptose die Adhäsivität glatter Muskelzellen erhöhen, genauso wie die Behandlung mit einem allgemeinen oder spezifischen Caspase- Inhibitor die Adhäsivität glatter Muskelzellen inhibieren würde, ähnlich wie bei der Applikation von Rapamycin. (Abbildung 15)

Diese Hypothese der verminderten EMAP- II Freisetzung aufgrund reduzierter mRNA Expression und der verringerten Apoptoserate als Ausdruck der antiinflammatorischen Wirkung von Rapamycin, wurde durch folgendes Experiment bestätigt:

Als erstes wurde die Adhäsivität glatter Muskelzellen für monozytäre Zellen in Anwesenheit des unspezifischen Caspase- Inhibitors ZVAD- fmk und des spezifischen Caspase- Inhibitors ZASTD- fmk überprüft. Diese inhibieren die Spaltung und die Freisetzung des aktivierten EMAP-II (Knies et al., 1998).

Sodann wurden glatte Muskelzellen mit Hydrogenperoxid zur Induktion der Apoptose präinkubiert. Dies geschah vor der Beurteilung der Adhäsivität in Gegenwart oder Abwesenheit des Caspase Inhibitors ZVAD- fmk oder Rapamycin.

Tatsächlich erhöhte die Induktion der Apoptose durch Hydrogenperoxid signifikant die Adhäsivität der glatten Muskelzellen für monozytäre Zellen. Vorbehandlung mit Rapamycin oder ZVAD hingegen verhinderte eine signifikante Veränderung der Adhäsivität glatter Muskelzellen (Abbildung 16).

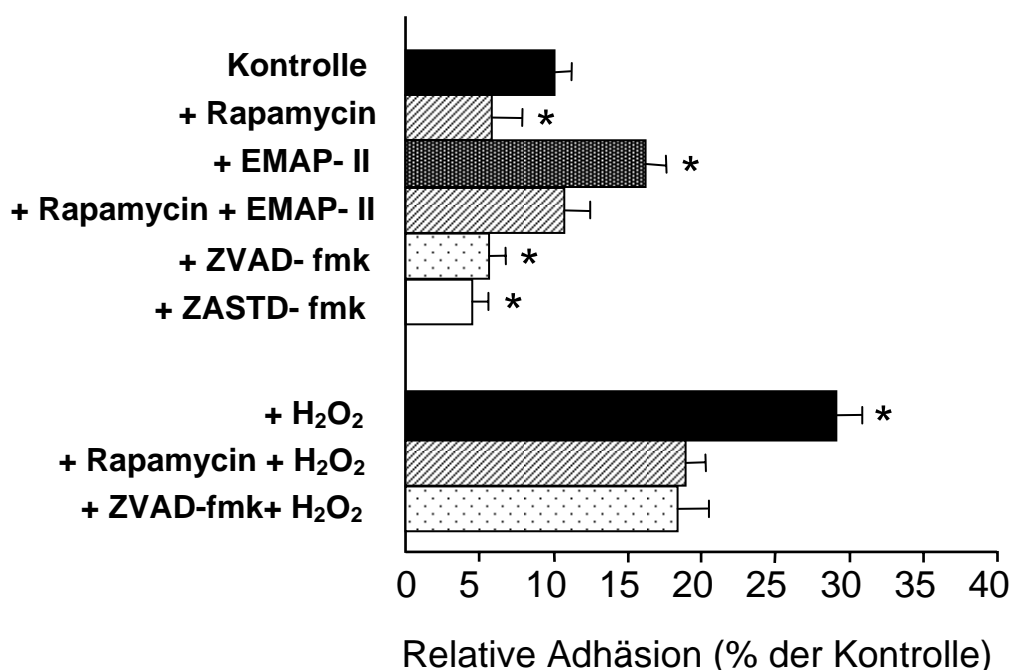


Abbildung 16: Wirkung von Rapamycin auf die Adhäsion glatter Muskelzellen. Glatte Muskelzellen wurden in An- oder Abwesenheit von Rapamycin beziehungsweise dem Caspase Inhibitor ZVAD- fmk kultiviert. Anschließend wurden die glatten Muskelzellen vor der Zugabe von MonoMac-6 Zellen in An- oder Abwesenheit von EMAP- II, beziehungsweise dem spezifischen Caspase Inhibitor ZASTD- fmk kultiviert. Als Positivkontrolle wurden MonoMac-6 Zellen mit EMAP-II stimuliert. Weiterhin wurde die Adhäsivität glatter Muskelzellen 6 Stunden nach Apoptose- Induktion mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in An- oder Abwesenheit von Rapamycin beziehungsweise dem Caspase Inhibitor ZVAD-fmk untersucht. Die Ergebnisse sind Durchschnittswerte aus 3 unabhängigen Experimenten; \*p<0.05

Folglich scheint die beobachtete Herabregulierung des EMAP-II durch Rapamycin funktionell für den hemmenden Effekt Rapamycins auf die Adhäsivität glatter Muskelzellen verantwortlich zu sein.



## 5. Diskussion

In den letzten Jahren wurden in der interventionellen Kardiologie deutliche Fortschritte bei der perkutanen transluminalen Angioplastie gemacht, sodass viele therapiebedürftige Koronarstenosen im Herzkatheterlabor therapiert werden können. Bisher sind dieser Methode aber durch das Auftreten von Restenosen immer noch Grenzen gesetzt. Durch Einführung der Stentimplantation konnte ein entscheidender Fortschritt erzielt werden, allerdings konnte auch damit in 20- 30% der Fälle die Entstehung einer Restenose nicht verhindert werden (Kastrati et al., 1999). Durch den Einsatz von Rapamycin wurde das Risiko einer In- Stent Restenose durch Verringerung der Neointimaprolieration gesenkt (Sousa *et al.*, 2001; Poston *et al.*, 1999). Allerdings sind die Mechanismen, die dieser Neointimareduktion zugrunde liegen noch nicht im Einzelnen bekannt. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit besonderes Augenmerk auf die Wirkung Rapamycins auf glatte Muskelzellen gerichtet.

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass der intrazelluläre Rezeptor für Rapamycin, FKBP 12, in glatten Muskelzellen der Neointima auf mRNA- und Proteinebene induziert wird (Zohlhöfer et al., 2001a). Außerdem ist die p70 S6- Kinase- II in humaner Neointima überexprimiert. Diese Aussagen stützen die Hypothese, dass FKBP 12 und die p70 S6- Kinase in der Signaltransduktion und zellulären Proliferation während des Wachstums von glatten Muskelzellen und damit auch in der Neointimaformation von entscheidender Bedeutung sind.

In dieser Arbeit wurde zunächst die Proteinexpression von mTOR (mammalian target of Rapamycin) in glatten Muskelzellen und T- Lymphozyten der menschlichen Neointima untersucht, sowie der Einfluss von Rapamycin auf die p70S6 Kinase und pRb analysiert.

Es zeigte sich hierbei eine Translokation von mTOR in den Zellkern und eine verstärkte Phosphorylierung von mTOR in glatten Muskelzellen der humanen Neointima.

Um die Wirkungsweisen von Rapamycin auf humane glatte Muskelzellen genau analysieren zu können, wurde die Methode der Genexpressionsanalyse gewählt, da diese die Möglichkeit bietet, eine sehr große Anzahl verschiedener Gene einer einzelnen Probe zu untersuchen.

Rapamycin beeinflusste die Expression von 227 Genen aus einer Gesamtmenge von 2231 untersuchten Genen, dabei handelte es sich unter anderem um ein pRb-/ E2F1- assoziiertes Genmuster.

Es wurde ferner gezeigt, dass durch Applikation von Rapamycin sowohl die basale als auch  $H_2O_2$ -induzierte Apoptoserate eindeutig reduziert werden konnte.

Als ein weiterer Effekt von Rapamycin konnte gezeigt werden, dass die Adhäsivität glatter Muskelzellen für monozytäre Zellen durch eine supprimierte Expression von EMAP- II reduziert wird.

### **5.1 Effekt von Rapamycin auf die proliferativen und inflammatorischen Eigenschaften glatter Muskelzellen**

Es konnte zwar bereits gezeigt werden, dass die Implantation Rapamycin beschichteter Stents das Risiko der Restenose durch Hemmung der Neointimabildung signifikant senken kann (Sousa et al., 2001), aber der dieser Wirkung zugrunde liegende Effekt ist bisher nicht ausreichend geklärt.

Bei der systematischen Untersuchung des Effektes von Rapamycin auf das Transkriptom und die biologischen Eigenschaften glatter Muskelzellen zeigte sich, dass die durch Rapamycin hemmbare mTOR- Kinase sowohl in neointimalen glatten Muskelzellen als auch in T-Lymphozyten in nukleärer, phosphorylierter also aktivierter Form vorliegt.

Die Genexpressionsanalyse ergab, dass die Inkubation glatter Muskelzellen mit Rapamycin zu einer differentiellen Expression im Sinne einer Herabregulierung von 227 der 2231, also 9,8% der analysierten Gene führt. Wir fanden weder eine erhöhte Rate von apoptotischen Zellen in den mit Rapamycin behandelten glatten Muskelzellen, noch eine veränderte Expression der „Housekeeping- Gene“. Dieser Umstand erlaubt den Rückschluss, dass es sich um eine Medikamenten- spezifische Wirkung handelt, die zu einer verminderten Expression einer großen Anzahl an Genen führt.

Bei der genauen Analyse nach funktionellen Gesichtspunkten zeigte sich, dass es sich nicht nur um Gene handelt, die die Proliferation glatter Muskelzellen regulieren, sondern auch um die Expression von Genen, die für die Regulation der Apoptose, der Zell- Zell Interaktion und der extrazellulären Matrix verantwortlich sind.

### **5.1.1 Die mTOR-Kinase in neointimalen glatten Muskelzellen und T- Lymphozyten und der Einfluss von Rapamycin**

mTOR als eines der Zielproteine von Rapamycin spielt eine entscheidende Rolle in der Regulation des Zellwachstums und damit auch der Proliferation. Über den Effekt von mTOR auf das Wachstum glatter Muskelzellen und entsprechend auch seiner Rolle in der Neointimabildung ist bisher wenig bekannt.

Zunächst konnte im Rahmen dieser Dissertation nachgewiesen werden, dass mTOR in glatten Muskelzellen der Media sowohl gesunder Koronarien als auch restenotischer Arterien und in T- Lymphozyten neointimalen Gewebes exprimiert wird.

Desweiteren konnte gezeigt werden, dass die mTOR- Kinase eine stärkere Translokation in den Zellkern und Phosphorylierung im neointimalen Gewebe zeigt als in der Kontrolle. Es ist bereits bekannt, dass nukleäres mTOR eine verstärkte Kinaseaktivität im Vergleich zu zytoplasmatischem mTOR zeigt (Zhang et al., 2002). Diese Kinaseaktivität von mTOR hängt essentiell von seiner Umverteilung in den Zellkern ab, eine vermehrte nukleäre Umverteilung korreliert mit einem Aktivitätsanstieg (Kim and Chen, 2000).

Der genaue Mechanismus mit dem die Aktivierung von mTOR gesteuert wird ist derzeit noch nicht geklärt, es wurde bisher nur gezeigt, dass eine Aktivierung des Phosphoinositide 3-Kinase [PI(3)K]/AKT –Signalweges zu einer Phosphorylierung von mTOR an Ser 2448 führt (Abbildung 17). Diese Phosphorylierung korreliert mit einem Anstieg der mTOR- Aktivität (Nave et al., 1999; Reynolds et al., 2002). Daraus lässt sich schließen, dass die Phosphorylierung der mTOR- Kinase funktionell relevant ist und damit als Marker für die Aktivitätssteigerung der mTOR- Kinase wirken könnte. Der [PI(3)K]/AKT– Signaltransduktionsweg ist ein wesentlicher Signalweg in der proliferativen Antwort von glatten Muskelzellen auf Mitogene wie z.B. PDGF (Walker et al., 1998). Diese Daten sprechen für einen kausalen Zusammenhang zwischen der Aktivierung dieses Weges und der Replikation glatter Muskelzellen nach einer arteriellen Gefäßwandverletzung (Shigematsu et al., 2000).

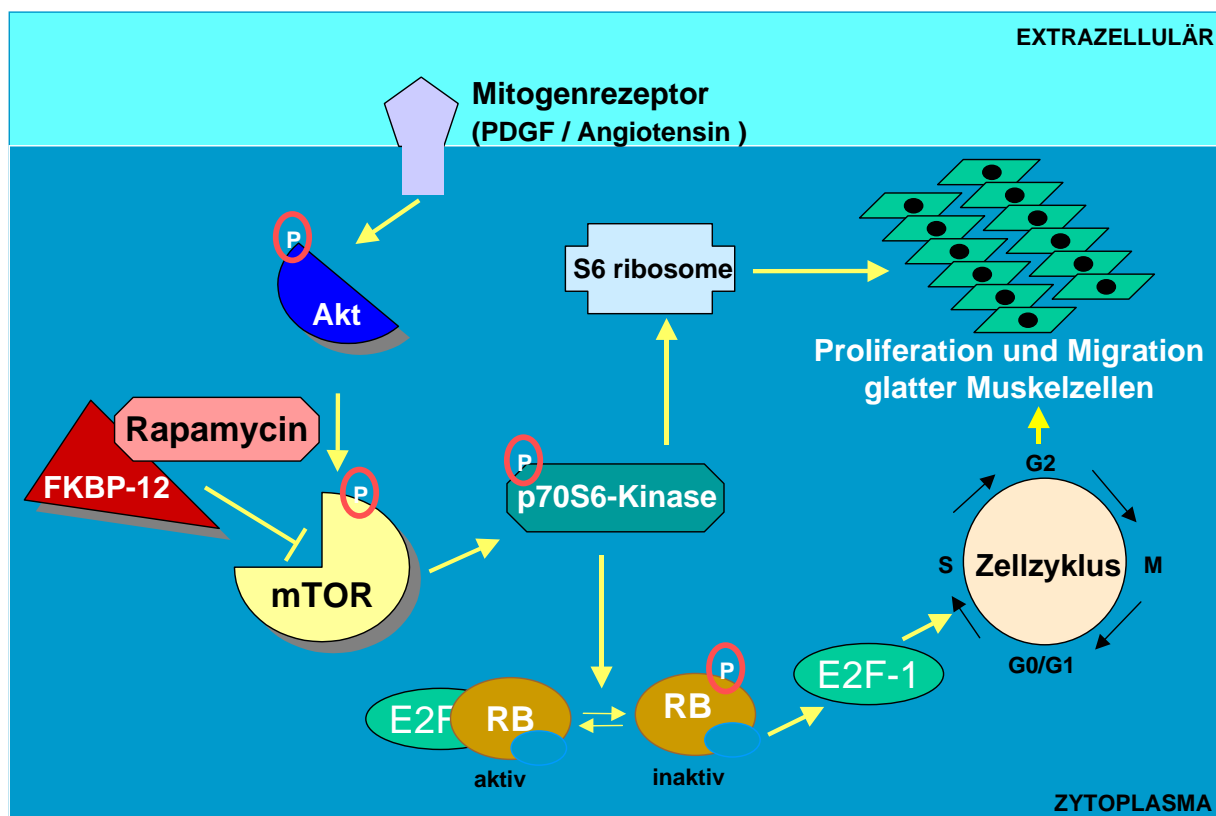


Abbildung 17: Darstellung des mTOR- Signaltransduktionsweges in glatten Muskelzellen nach Aktivierung durch mitogene Substanzen, wie PDGF und Angiotensin.

Somit wird die Hypothese gestärkt, dass die Aktivierung der mTOR- Kinase in neointimalen glatten Muskelzellen wichtig für die Regulation der vasoproliferativen Reaktion auf eine Gefäßwandverletzung ist und der Effekt Rapamycins auf die Neointimabildung unter anderem durch eine Hemmung der mTOR- Kinase zu erklären ist.

### 5.1.2 Wirkung von Rapamycin auf die p70 S6-Kinase und pRb

In ruhenden glatten Muskelzellen führt die Stimulation mit Wachstumsfaktoren zu einer Aktivierung der p70 S6- Kinase. Durch eine Inkubation mit Rapamycin vor einer Stimulierung mit Wachstumsfaktoren wird die Aktivierung der p70 S6- Kinase verhindert (Braun- Dullaes et al., 2001).

Die Bildung von Neointima ist ein Prozess, der über einen langen Zeitraum stattfindet und die Wirkung des von beschichteten Stents freigesetzten Rapamycins setzt erst nach Aktivierung der glatten Muskelzellen ein. Die Wirkung Rapamycins auf bereits aktivierte glatte Muskelzellen war aber bisher nicht erforscht, weshalb wir den Effekt auf die p70S6- Kinase in bereits aktivierten, proliferierenden glatten Muskelzellen untersuchten. Dabei konnte gezeigt

werden, dass die Anwendung von Rapamycin zu einer Inaktivierung der p70 S6- Kinase und zu einer andauernden Aktivierung des Tumorsuppressors pRb führt. Daraus lässt sich der Schluss ziehen, dass der Effekt von Rapamycin solange anhält, solange das aktive Medikament anwesend ist und es sich bei der Wirkung nicht um einen negativen Feedback-Mechanismus handelt.

## **5.2 Wirkung von Rapamycin auf die Zellzykluskontrolle und Proliferation glatter Muskelzellen**

Durch die Genexpressionsanalyse konnten 227 aus 2231 Genen identifiziert werden, die durch den Einfluss von Rapamycin differentiell exprimiert wurden. Der weitaus größte Teil dieser Gene wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe nach Applikation von Rapamycin vermindert exprimiert.

Aufgrund der Tatsache, dass keine erhöhte Nekrose- oder Apoptoserate nachweisbar war und die Expression der neun „*Housekeeping Gene*“ nicht beeinflusst wurde, ist davon auszugehen, dass es sich nicht um einen toxischen Effekt des Wirkstoffes handelt, sondern um einen Rapamycin- spezifischen Effekt.

Es fanden sich profunde Veränderungen bei der Expression von Genen, die mit der Zellzykluskontrolle assoziiert sind. Die Applikation von Rapamycin führte zu einer Inaktivierung der p70 S6- Kinase und zur Aktivierung des Tumorsuppressors pRb, der entscheidend ist für die Regulation des Zellzyklus (Harbour and Dean, 2000a; Harbour and Dean, 2000b). Indem das dephosphorylierte, also aktivierte Retinoblastoma- Gen (pRb) an den Transkriptionsfaktor E2F- 1 bindet, hemmt es die Transkription von proliferations- und apoptoseassoziierten Genen (Harbour and Dean, 2000b). Rapamycin führt zu einer Dephosphorylierung und damit Aktivierung von pRb, was eine Freisetzung von E2F-1 verhindert. E2F-1 spielt eine entscheidende Rolle bei der Zellzyklusregulation. Interessanterweise wurde die Expression von E2F-1 durch die Applikation von Rapamycin deutlich reduziert.

Unsere Daten stehen im Widerspruch mit den Ergebnissen von Brennan et al aus dem Jahre 1999 (Brennan et al, 1999), die gezeigt hatten, dass Rapamycin die Aktivität von E2F reduziert, ohne die Expression von E2F-1 zu beeinflussen. Die Autoren dieser Arbeit hatten ihre Versuche allerdings an T- Lymphozyten durchgeführt und die frühen Effekte von Rapamycin auf die E2F-1- Proteinexpression analysiert. Die von uns beschriebenen Veränderungen der Expression von E2F-1 traten aber erst nach 48 Stunden Inkubation mit

Rapamycin am stärksten auf. Dies stützt die These, dass die Herabregulierung der Genexpression später auftritt als die Inaktivierung von E2F-1.

Dementsprechend wurden 41 pRb/ E2F- 1- assoziierte Gene wie beispielsweise Yin& Yang-1 (YY1) und Cyclin D3 in der Rapamycin behandelten Gruppe vermindert exprimiert. YY1 ist ein Transkriptionsfaktor, dessen Aktivierung in glatten Muskelzellen zu einer Progression des Zellzyklus in die S- Phase führt. Dieser Effekt wird wiederum durch aktiviertes pRb inhibiert (Petkova et al., 2001).

Aus Abbildung 7 (S.29) ist ersichtlich, dass E2F- 1 und CyclinD3 in glatten Muskelzellen differentiell exprimiert werden. Es wurde bereits gezeigt, dass E2F- 1 und CyclinD3 in humaner Neointima hochreguliert sind (Zohlhöfer et al., 2001a). Daraus lässt sich schließen, dass sie mit der proliferativen Antwort glatter Muskelzellen während der Neointimabildung zusammenhängen. Durch die Inkubation mit Rapamycin wird die Expression der Faktoren E2F- 1, CyclinD3 und der CDK4 supprimiert. Cyclin D3 bindet an CDK4 und zugleich an aktiviertes pRb, wodurch CDK4 mit pRb in Kontakt tritt. Diese Interaktion führt zur Phosphorylierung und damit Inaktivierung von pRb und zur Zellzyklusprogression (Kato et al., 1993).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch den Einsatz von Rapamycin die mRNA Expression von physiologischen pRb Antagonisten vermindert wird. Dieser Effekt könnte eine entscheidende Bedeutung in der Proliferationshemmung glatter Muskelzellen durch Rapamycin haben und die hohe Effektivität dieser Substanz in der Behandlung der koronaren Restenose begründen.

### **5.3 Wirkung von Rapamycin auf die Apoptose glatter Muskelzellen**

Die Apoptose glatter Muskelzellen beeinflusst die Reaktion auf eine Gefäßwandverletzung und spielt eine Rolle in der Pathogenese der Restenose (Isner *et al.*, 1995). Sie geht der Proliferation zeitlich voraus und könnte damit eine zusätzliche Aktivierung glatter Muskelzellen verursachen, die wiederum zur Neointimaformation weiter beitragen könnten (Malik et al., 1998).

Durch die Applikation von Rapamycin konnte sowohl eine Reduktion der basalen Apoptose als auch der durch Wasserstoffperoxid- induzierten Apoptose erzielt werden.

Die erhobenen Daten stehen in Widerspruch mit den Daten von Roque et al., die eine leicht erhöhte Apoptoserate in murinen glatten Muskelzellen nach der Behandlung mit Rapamycin nach 72h fanden (Roque *et al.*, 2001). In den hier beschriebenen Experimenten wurden die glatten Muskelzellen maximal 48 Stunden mit Rapamycin in einer Konzentration von 100ng/ml behandelt. Im Gegensatz dazu setzten Roque et al. Rapamycin in einer Konzentration von 10ng/ml ein. Damit könnte also der Unterschied in der Apoptoserate glatter Muskelzellen nach der Behandlung mit Rapamycin mit einem Zeit- und Dosisabhängigen Effekt erklärt werden.

Die Supprimierung der Apoptose durch die Therapie mit Rapamycin ergänzt vermutlich den antiinflammatorischen Effekt. Denn es konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der Apoptose zu einer Reduzierung der Entzündungsreaktion und der Gewebeverletzung führen kann (Daemen et al., 1999).

#### **5.4 Der Einfluss von EMAP- II auf die Adhäsivität glatter Muskelzellen**

Die signifikante Hemmung der Adhäsivität glatter Muskelzellen für monozytäre Zellen kann zumindest teilweise auf eine verminderte Expression des Chemokins EMAP- II zurückgeführt werden. Nach Zugabe von EMAP- II zu den mit Rapamycin behandelten glatten Muskelzellen kam es zu einer vollständigen Aufhebung des zuvor erzielten hemmenden Effektes.

In einem Tierversuch an Primaten nach Stentimplantation konnte gezeigt werden, dass die Entzündungsreaktion eine entscheidende Komponente bei der Entstehung der Neointima darstellt. Es kommt zu einer dauerhaften Rekrutierung von Makrophagen. Eine Hemmung dieser Makrophageninfiltration bewirkt eine signifikante Reduktion der Neointimabildung (Horvath et al., 2002). Weiterhin fand man heraus, dass eine Verletzung der Media während der Angioplastie und Stent- Implantation eine arterielle Entzündungsreaktion verursacht, die zu einer erhöhten Zahl an Entzündungszellen in der humanen Neointima führt (Farb et al., 2002). Diese Entzündungsreaktion korrelierte signifikant mit dem Ausmaß der Neointimabildung und der Restenose, was auf eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der Restenose hinweist.

Als eines der Verbindungsmoleküle zwischen Apoptose und Entzündung wurde EMAP- II, das aus dem 43kDa pro- EMAP- Protein gebildet wird, identifiziert (Daemen et al., 1999).

Die Expression des Monozyten-Chemokins EMAP-II wird durch Zugabe von Rapamycin signifikant gehemmt. Es kommt hierdurch zu einer verminderten Adhäsivität glatter Muskelzellen und einer Hemmung der Rekrutierung inflammatorischer Zellen. Die Beobachtung, dass durch Zugabe von rekombinantem Endotoxin-freiem EMAP-II die Adhäsion von Monozyten an Rapamycin-behandelte glatte Muskelzellen wieder hergestellt werden konnte, bestärkt die Hypothese, dass EMAP-II eine entscheidende Rolle in der Entzündungsreaktion während der Neointimaformation spielt.

Die Hemmung von EMAP-II spricht für einen zusätzlich anti-adhäsiven und damit auch anti-inflammatorischen Effekt von Rapamycin. Durch die Hemmung der Adhäsion und der damit verbundenen verminderten Rekrutierung inflammatorischer Zellen an die Gefäßläsion könnte außerdem eine Verminderung der vasoproliferativen Reaktion erzielt werden.

Die Expression von EMAP-II kann von verschiedenen Faktoren beeinflusst werden, wie aus Abbildung 18 ersichtlich. Diese Erkenntnis lässt die Schlussfolgerung zu, dass Rapamycin sowohl die mRNA Expression als auch die Spaltung des pro-EMAP-II durch die Inhibierung der Apoptose vermindert, was wiederum zu einer verringerten Adhäsivität glatter Muskelzellen für monozytäre Zellen führt. Diese Annahme wird durch die Tatsache unterstützt, dass ein spezifischer Caspase Inhibitor für Caspase-7 und ein genereller Caspase-Inhibitor die Adhäsivität glatter Muskelzellen für Monozyten signifikant reduziert, ein ähnlicher Effekt wie er durch Applikation von Rapamycin beobachtet wurde.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass der hier eingesetzte spezifische Caspase Inhibitor die Menge an freigesetztem EMAP-II reduziert (Knies *et al.*, 1998), was die Vermutung nahe legt, dass EMAP II als Verbindung zwischen Apoptose und erhöhter Adhäsivität glatter Muskelzellen fungiert.



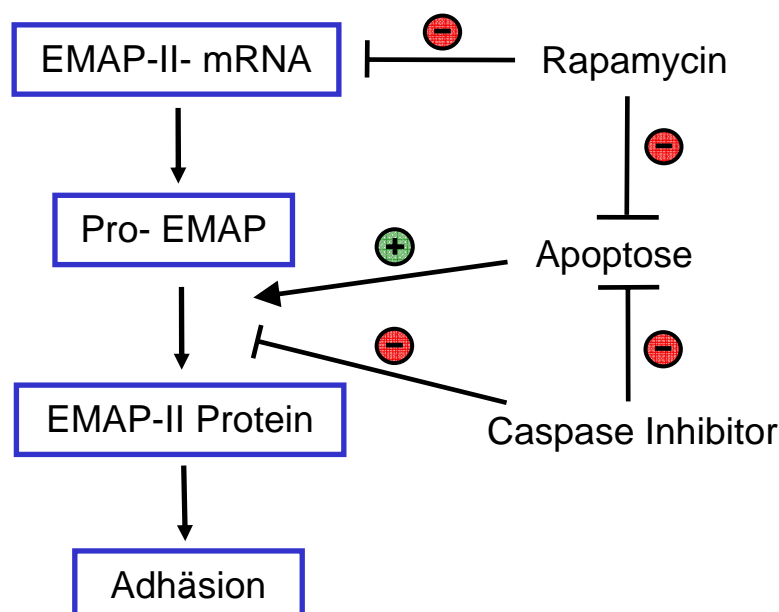


Abbildung 18: Darstellung der Regulierung von EMAP- II und der Einfluss auf die Adhäsion glatter Muskelzellen durch Rapamycin und Caspase Inhibitoren

Damit weisen unsere Daten auf einen zusätzlichen anti- adhäsiven und anti- inflammatorischen Effekt Rapamycins hin. Durch die verminderte Expression des Chemokins EMAP- II führt Rapamycin zu einer Abnahme der Adhäsivität glatter Muskelzellen und könnte dadurch die frühe Rekrutierung von Entzündungszellen in den verletzten Arterien verhindern. Dieser Effekt führt vermutlich zu einer weiteren Verminderung der vasoproliferativen Reaktion beim Menschen.

Die mTOR- Kinase ist sowohl in den glatten Muskelzellen als auch in den T- Lymphozyten der humanen Neointima exprimiert. Daraus lässt sich folgern, dass auch neointimale T- Lymphozyten einen möglichen Angriffspunkt für Rapamycin darstellen.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass T- Lymphozyten und IFN-  $\gamma$  eine Rolle bei der Neointimabildung spielen (Zohlhöfer *et al.*, 2001b). Eine Inaktivierung von T- Lymphozyten durch Rapamycin könnte in Kooperation mit den übrigen anti- proliferativen Eigenschaften von Rapamycin einen weiteren Beitrag zur Reduktion der Neointimabildung leisten.

## 6. Zusammenfassung

Rapamycin bedeutete einen entscheidenden Fortschritt auf dem Gebiet der interventionellen Kardiologie, da die Implantation Rapamycin-beschichteter Stents eine sichere Möglichkeit zur signifikanten Reduktion der Restenose im Menschen darstellt (Sousa et al., 2001). Der genaue Wirkmechanismus von Rapamycin auf humane, proliferierende, glatte Muskelzellen und auf die Neointimaformation ist jedoch bis heute zu wenig verstanden.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit den molekularen Mechanismen, die der Wirkung von Rapamycin zugrunde liegen. Hierbei wurden sowohl der zellbiologische als auch der genregulatorische Effekt Rapamycins in Zellkulturexperimenten untersucht.

Ziel dieser Dissertation war es, den Effekt von Rapamycin auf die p70 S6-Kinase, auf das Retinoblastoma Genprodukt Rb, auf die Genexpression, auf die Proliferation und Apoptose humaner, glatter Muskelzellen und auf die Adhäsion von Monozyten an proliferierenden, glatten Muskelzellen zu untersuchen.

Es gelang der Nachweis, dass der mTOR- Signaltransduktionsweg während der Neointimaformation aktiviert wird. Weiterhin zeigte sich, dass Rapamycin neben der Hemmung der Proliferation glatter Muskelzellen, vielfältige Effekte auf die zellulären Eigenschaften glatter Muskelzellen hat.

Bei der genauen Untersuchung des Wirkmechanismus von Rapamycin auf zellulärer Ebene zeigte sich, dass Rapamycin wichtigen Einfluss auf die Transkription von Genen nimmt, die entzündliche und proliferative Eigenschaften glatter Muskelzellen kontrollieren.

Unter dem Einfluss von Rapamycin kam es zu einer Aktivierung des Tumorsuppressors pRb und zu einer stark reduzierten Expression einer E2F- 1 abhängigen Gruppe von Genen, was den proliferationshemmenden Effekt von Rapamycin auf glatte Muskelzellen erklären könnte.

Weiterhin konnte der Nachweis der verringerten Adhäsivität glatter Muskelzellen und der verminderten Expression des Chemokins EMAP- II erbracht werden. Durch Zugabe von EMAP- II konnte der anti- adhäsive Effekt von Rapamycin aufgehoben werden, was auf eine entscheidende Rolle von EMAP- II in der pro- inflammatorischen Aktivierung glatter Muskelzellen schließen lässt.

Im Rahmen dieser Dissertation konnte somit die therapeutische Wirkung von Rapamycin sowohl auf die breit gefächerten Effekte auf die Proliferation und Apoptose glatter Muskelzellen, als auch auf eine verminderte Adhäsivität für monozytäre Zellen zurückgeführt werden.

## 7. Abkürzungen

BAK	BCL2 Antagonist Killer 1; BCL2L7
CDK	Cyclin- abhängige Kinase
EMAP- II	Endothelial Monocyte Activating Polypeptide-II
FKBP 12	FK506 binding protein 12
ICAM- 1	Intercellular Adhesion Molecule- 1
IFN $\gamma$	Interferon gamma
IL	Interleukin
INK	Inhibitor of cyclin- dependent kinase 4
Mac- 1	Macrophage antigen-1
MCL- 1	Myeloid Cell Leukemia 1
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
NF- k B	Nuclear Factor- Kappa B
PTCA	Perkutane transluminale koronare Angioplastie
p70 S6- K	p70 S6 Kinase
PDGF	Platelet derived growth factor
pRb	Retinoblastoma- Genprodukt
P- Selektin	entspricht GMP-140
FGF	Fibroblast Growth Factor
TBST	Tris- Buffered Saline Tween
TGF- $\beta$	Transforming Growth Factor $\beta$
TNF $\alpha$	Tumor Nekrosis Faktor- $\alpha$
VCAM- 1	Vascular Adhesion molecule-1
YY1	Yin& Yang-1

## 8. Literaturverzeichnis

Alfonso F., Zueco J., Cequier A., Mantella R., Bethencourt A., Lopez- Minguéz JR., Angel J., Auge JM., Gomez- Recio M., Moris C., Seabra- Gomes R., Perez- Vizcayno MJ., Macaya C., (2003). Restenosis Intra-stent: Balloon Angioplasty versus elective Stenting (RIPBS) Investigators. *J. Am. Coll. Cardiol.* 42 (5), 796- 805.

Altieri DC (2003) Validating Survivin As a Cancer Therapeutic Target. *Nat Rev Cancer* 3: pp 46-54.

Bauters C., Isner JM., (1997). The biology of restenosis. *Prog. Cardiovasc Dis.* 40(2): 107- 116;

Braun-Dullaes,R.C., Mann,M.J., Seay,U., Zhang,L., Der Leyen,H.E., Morris,R.E., and Dzau,V.J. (2001). Cell cycle protein expression in vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo is regulated through phosphatidylinositol 3-kinase and mammalian target of rapamycin. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21, 1152-1158.

Braunwald,E. (1997). Shattuck lecture--cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns, and opportunities. *N. Engl. J. Med.* 337, 1360-1369.

Brennan,P., Babbage,J.W., Thomas,G., and Cantrell,D. (1999). p70(s6k) integrates phosphatidylinositol 3-kinase and rapamycin-regulated signals for E2F regulation in T lymphocytes. *Mol. Cell Biol.* 19, 4729-4738.

Cartron PF, Juin P, Oliver L, Martin S, Meflah K and Vallette F M (2003) Nonredundant Role of Bax and Bak in Bid-Mediated Apoptosis. *Mol Cell Biol* 23: pp 4701-4712.

Cox DA., Stone GW., Grines CL., Stuckey T., Cohen DJ., Tchong JE., Garcia E., Guagliumi G., Iwaoka RS., Fahy M., Turco M., Lansky AJ., Griffin JJ., Mehran R., CADILLAC Investigators (2003). *J. Am. Coll. Cardiol.* 42 (6): 971-977;

Daemen,M.A., van't Veer,C., Wolfs,T.G., and Burman,W.A. (1999). Ischemia/reperfusion-induced IFN-gamma up-regulation: involvement of IL- 12 and IL-18. *J. Immunol.* 162, 5506-5510.

Farb,A., Sangiorgi,G., Carter,A.J., Walley,V.M., Edwards,W.D., Schwartz,R.S., and Virmani,R. (1999). Pathology of acute and chronic coronary stenting in humans. *Circulation* 99, 44-52.

Farb,A., Weber,D.K., Kolodgie,F.D., Burke,A.P., and Virmani,R. (2002). Morphological predictors of restenosis after coronary stenting in humans. *Circulation* 105, 2974-2980.

Ferns,G.A., Raines,E.W., Sprugel,K.H., Motani,A.S., Reidy,M.A., and Ross,R. (1991). Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF. *Science* 253, 1129-1132.

Fischman,D.L., Leon,M.B., Baim,D.S., Schatz,R.A., Savage,M.P., Penn,I., Detre,K., Veltri,L., Ricci,D., and Nobuyoshi,M. (1994). A randomized comparison of coronary-stent placement and balloon angioplasty in the treatment of coronary artery disease. Stent Restenosis Study Investigators. *N. Engl. J. Med.* 331, 496-501.

Gallo,R., Padurean,A., Jayaraman,T., Marx,S., Roque,M., Adelman,S., Chesebro,J., Fallon,J., Fuster,V., Marks,A., and Badimon,J.J. (1999). Inhibition of intimal thickening after balloon angioplasty in porcine coronary arteries by targeting regulators of the cell cycle. *Circulation* 99, 2164-2170.

Gruentzig,A.R. and Meier,B. (1983). Percutaneous transluminal coronary angioplasty. The first five years and the future. *Int. J. Cardiol.* 2, 319-323.

Harbour,J.W. and Dean,D.C. (2000a). Rb function in cell-cycle regulation and apoptosis. *Nat. Cell Biol.* 2, E65-E67.

Harbour,J.W. and Dean,D.C. (2000b). The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms. *Genes Dev.* 14, 2393-2409.

Horvath,C., Welt,F.G., Nedelman,M., Rao,P., and Rogers,C. (2002). Targeting CCR2 or CD18 inhibits experimental in-stent restenosis in primates: inhibitory potential depends on type of injury and leukocytes targeted. *Circ. Res.* 90, 488-494.

- Johnson,D.G., Ohtani,K., and Nevins,J.R. (1994). Autoregulatory control of E2F1 expression in response to positive and negative regulators of cell cycle progression. *Genes Dev.* 8, 1514-1525.
- Johnson RC, Mayadas TN, Frenette PS, Mebius RE, Subramaniam M, Lacasce A, Hynes RO, Wagner DD. (1995). Blood cell dynamics in P-selectin-deficient mice. *Blood.* 1995 Aug 1;86(3):1106-14.
- Kao,J., Fan,Y.G., Haehnel,I., Brett,J., Greenberg,S., Clauss,M., Kayton,M., Houck,K., Kiesel,W., Seljelid,R.. (1994). A peptide derived from the amino terminus of endothelial-monocyte-activating polypeptide II modulates mononuclear and polymorphonuclear leukocyte functions, defines an apparently novel cellular interaction site, and induces an acute inflammatory response. *J. Biol. Chem.* 269, 9774-9782.
- Kastrati,A., Schömig,A., Elezi,S., Dirschinger,J., Mehilli,J., Schühlen,H., Blasini,R., and Neumann,F.J. (1999). Prognostic value of the modified american college of Cardiology/American heart association stenosis morphology classification for long-term angiographic and clinical outcome after coronary stent placement. *Circulation* 100, 1285-1290.
- Kato,J., Matsushime,H., Hiebert,S.W., Ewen,M.E., and Sherr,C.J. (1993). Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. *Genes Dev.* 7, 331-342.
- Kearney,M., Pieczek,A., Haley,L., Losordo,D.W., Andres,V., Schainfeld,R., Rosenfield,K., and Isner,J.M. (1997). Histopathology of in-stent restenosis in patients with peripheral artery disease. *Circulation* 95, 1998-2002.
- Kim,J.E. and Chen,J. (2000). Cytoplasmic-nuclear shuttling of FKBP12-rapamycin-associated protein is involved in rapamycin-sensitive signaling and translation initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14340-14345.
- Knies,U.E., Behrendorf,H.A., Mitchell,C.A., Deutsch,U., Risau,W., Drexler,H.C., and Clauss,M. (1998). Regulation of endothelial monocyte-activating polypeptide II release by apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 12322-12327.
- Komatsu,R., Ueda,M., Naruko,T., Kojima,A., and Becker,A.E. (1998). Neointimal tissue response at sites of coronary stenting in humans: macroscopic, histological, and immunohistochemical analyses. *Circulation* 98, 224-233.
- Kornowski,R., Hong,M.K., Tio,F.O., Bramwell,O., Wu,H., and Leon,M.B. (1998). In-stent restenosis: contributions of inflammatory responses and arterial injury to neointimal hyperplasia. *J. Am. Coll. Cardiol.* 31, 224-230.
- Kumar,A., Hoover,J.L., Simmons,C.A., Lindner,V., and Shebuski,R.J. (1997). Remodeling and neointimal formation in the carotid artery of normal and P-selectin-deficient mice. *Circulation* 96, 4333-4342.
- Kuntz,R.E., Safian,R.D., Levine,M.J., Reis,G.J., Diver,D.J., and Baim,D.S. (1992). Novel approach to the analysis of restenosis after the use of three new coronary devices. *J. Am. Coll. Cardiol.* 19, 1493-1499.
- Lehmann,K.G., Melkert,R., and Serruys,P.W. (1996). Contributions of frequency distribution analysis to the understanding of coronary restenosis. A reappraisal of the gaussian curve. *Circulation* 93, 1123-1132.
- Liistro,F., Stankovic,G., Di Mario,C., Takagi,T., Chieffo,A., Moshiri,S., Montorfano,M., Carlino,M., Briguori,C., Pagnotta,P., Albiero,R., Corvaja,N., and Colombo,A. (2002). First clinical experience with a paclitaxel derivate-eluting polymer stent system implantation for in-stent restenosis: immediate and long-term clinical and angiographic outcome. *Circulation* 105, 1883-1886.
- Malik,N., Francis,S.E., Holt,C.M., Gunn,J., Thomas,G.L., Shepherd,L., Chamberlain,J., Newman,C.M., Cumberland,D.C., and Crossman,D.C. (1998). Apoptosis and cell proliferation after porcine coronary angioplasty. *Circulation* 98, 1657-1665.
- Marx,S.O. and Marks,A.R. (2001). Bench to bedside: the development of rapamycin and its application to stent restenosis. *Circulation* 104, 852-855.
- Mauri L., Reisman M., Buchbinder M., Popma JJ., Sharma SK., Cutlip DE., Ho KK., Prpic R., Zimetbaum PJ., Kuntz RE (2003). Comparison of rotational atherectomy with conventional balloon angioplasty in the prevention

of restenosis of small coronary arteries: results of the Dilatation vs Ablation Revascularization Trial Targeting Restenosis (DART). *Am Heart J.* 145(5): 847-54

McCaffrey, T.A., Du, B., Fu, C., Bray, P.J., Sanborn, T.A., Deutsch, E., Tarazona, N., Shakhovitch, A., Newman, G., Patterson, C., and Bush, H.L., Jr. (1999). The expression of TGF-beta receptors in human atherosclerosis: evidence for acquired resistance to apoptosis due to receptor imbalance. *J. Mol. Cell Cardiol.* 31, 1627-1642.

Mintz, G.S., Popma, J.J., Hong, M.K., Pichard, A.D., Kent, K.M., Satler, L.F., and Leon, M.B. (1996). Intravascular ultrasound to discern device-specific effects and mechanisms of restenosis. *Am. J. Cardiol.* 78, 18-22.

Moses JW, Leon MB, Popma JJ, Fitzgerald PJ, Holmes DR, O'Shaughnessy C, Caputo RP, Kereiakes DJ, Williams DO, Teirstein PS, Jaeger JL, Kuntz RE. (2003). Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery. *N Engl J Med.* 2003 Oct 2;349(14):1315-23

Nave, B.T., Ouwens, M., Withers, D.J., Alessi, D.R., and Shepherd, P.R. (1999). Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *Biochem. J* 344 Pt 2:427-31., 427-431.

Ohtani K, DeGregori J, Nevins JR. (1995). Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Dec 19;92(26):12146-50.

O'Keefe, J.H., Jr., McCallister, B.D., Bateman, T.M., Kuhnlein, D.L., Ligon, R.W., and Hartzler, G.O. (1992). Ineffectiveness of colchicine for the prevention of restenosis after coronary angioplasty. *J. Am. Coll. Cardiol.* 19, 1597-1600.

Pearson, R.B. and Thomas, G. (1995). Regulation of p70s6k/p85s6k and its role in the cell cycle. *Prog. Cell Cycle Res.* 1:21-32, 21-32.

Petkova, V., Romanowski, M.J., Suljoadikusumo, I., Rohne, D., Kang, P., Shenk, T., and Usheva, A. (2001). Interaction between YY1 and the retinoblastoma protein. Regulation of cell cycle progression in differentiated cells. *J Biol Chem.* 276, 7932-7936.

Poon, M., Badimon, J.J., and Fuster, V. (2002). Overcoming restenosis with sirolimus: from alphabet soup to clinical reality. *Lancet* 359, 619-622.

Poston RS, Billingham M, Hoyt E G, Pollard J, Shorthouse R, Morris R E and Robbins R C (1999) Rapamycin Reverses Chronic Graft Vascular Disease in a Novel Cardiac Allograft Model. *Circulation* 100: pp 67-74.

Rensing, B.J., Hermans, W.R., Deckers, J.W., de Feyter, P.J., Tijssen, J.G., and Serruys, P.W. (1992). Lumen narrowing after percutaneous transluminal coronary balloon angioplasty follows a near gaussian distribution: a quantitative angiographic study in 1,445 successfully dilated lesions. *J. Am. Coll. Cardiol.* 19, 939-945.

Reynolds, T.H., Bodine, S.C., and Lawrence, J.C., Jr. (2002). Control of Ser2448 phosphorylation in the mammalian target of rapamycin by insulin and skeletal muscle load. *J. Biol. Chem.* 277, 17657-17662.

Ribichini, F., Wijns, W., Ferrero, V., Matullo, G., Camilla, T., Feola, M., Guarrera, S., Vado, A., Piazza, A., and Uslenghi, E. (2003). Effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on restenosis after coronary stenting. *Am. J. Cardiol.* 91, 154-158.

Rogers, C., Edelman, E.R., and Simon, D.I. (1998). A mAb to the beta2-leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) reduces intimal thickening after angioplasty or stent implantation in rabbits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 10134-10139.

Rogers, C., Welt, F.G., Karnovsky, M.J., and Edelman, E.R. (1996). Monocyte recruitment and neointimal hyperplasia in rabbits. Coupled inhibitory effects of heparin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16, 1312-1318.

Roque M, Reis E D, Cordon-Cardo C, Taubman M B, Fallon J T, Fuster V and Badimon J J (2001) Effect of P27 Deficiency and Rapamycin on Intimal Hyperplasia: in Vivo and in Vitro Studies Using a P27 Knockout Mouse Model. *Lab Invest* 81: pp 895-903.

Ross, R. (1999a). Atherosclerosis-- an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* 340, 115-126.

- Schömig,A., Kastrati,A., Elezi,S., Schühlen,H., Dirschinger,J., Dannegger,F., Wilhelm,M., and Ulm,K. (1997). Bimodal distribution of angiographic measures of restenosis six months after coronary stent placement. *Circulation* 96, 3880-3887.
- Sehgal,S.N., Baker,H., and Vezina,C. (1975). Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *J. Antibiot. (Tokyo)* 28, 727-732.
- Serruys,P.W., de Jaegere,P., Kiemeneij,F., Macaya,C., Rutsch,W., Heyndrickx,G., Emanuelsson,H., Marco,J., Legrand,V., and Materne,P. (1994). A comparison of balloon-expandable-stent implantation with balloon angioplasty in patients with coronary artery disease. Benestent Study Group [see comments]. *N. Engl. J. Med.* 331, 489-495.
- Shigematsu,K., Koyama,H., Olson,N.E., Cho,A., and Reidy,M.A. (2000). Phosphatidylinositol 3-kinase signaling is important for smooth muscle cell replication after arterial injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 2373-2378.
- Sousa,J.E., Costa,M.A., Abizaid,A., Abizaid,A.S., Feres,F., Pinto,I.M., Seixas,A.C., Staico,R., Mattos,L.A., Sousa,A.G., Falotico,R., Jaeger,J., Popma,J.J., and Serruys,P.W. (2001). Lack of Neointimal Proliferation After Implantation of Sirolimus-Coated Stents in Human Coronary Arteries : A Quantitative Coronary Angiography and Three-Dimensional Intravascular Ultrasound Study. *Circulation* 103, 192-195.
- Teirstein,P.S. and Kuntz,R.E. (2001). New frontiers in interventional cardiology: intravascular radiation to prevent restenosis. *Circulation*;104, 2620-2626.
- Vezina,C., Kudelski,A., and Sehgal,S.N. (1975). Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J. Antibiot. (Tokyo)* 28, 721-726.
- Virmani,R. and Farb,A. (1999). Pathology of in-stent restenosis [In Process Citation]. *Curr. Opin. Lipidol.* 10, 499-506.
- Walker,T.R., Moore,S.M., Lawson,M.F., Panettieri,R.A., Jr., and Chilvers,E.R. (1998). Platelet-derived growth factor-BB and thrombin activate phosphoinositide 3-kinase and protein kinase B: role in mediating airway smooth muscle proliferation. *Mol Pharmacol.* 54, 1007-1015.
- Yasukawa,H., Imaizumi,T., Matsuoka,H., Nakashima,A., and Morimatsu,M. (1997). Inhibition of intimal hyperplasia after balloon injury by antibodies to intercellular adhesion molecule-1 and lymphocyte function-associated antigen-1. *Circulation* 95, 1515-1522.
- Zhang,X., Shu,L., Hosoi,H., Murti,G., and Houghton,P.J. (2002). Predominant nuclear localization of mTOR in normal and malignant cells in culture. *J Biol Chem.* ..
- Ziegler-Heitbrock,H.W., Thiel,E., Futterer,A., Herzog,V., Wirtz,A., and Riethmuller,G. (1988). Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes. *Int. J Cancer* 41, 456-461.
- Zohlhöfer,D., Brand,K., Schipek,K., Pogatsa-Murray,G., Schömig,A., and Neumann,F.J. (2000). Adhesion of monocyte very late antigen-4 to endothelial vascular cell adhesion molecule-1 induces interleukin-1beta-dependent expression of interleukin-6 in endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 353-359.
- Zohlhöfer,D., Klein,C.A., Richter,T., Brandl,R., Murr,A., Nuhrenberg,T., Schömig,A., Baeuerle,P.A., and Neumann,F.J. (2001a). Gene expression profiling of human stent-induced neointima by cDNA array analysis of microscopic specimens retrieved by helix cutter atherectomy: Detection of FK506-binding protein 12 upregulation. *Circulation* 103, 1396-1402.
- Zohlhöfer D, Richter T, Neumann F J, Nuhrenberg T, Wessely R, Brandl R, Murr A, Klein C A and Baeuerle P A (2001b) Transcriptome Analysis Reveals a Role of Interferon- in Human Neointima Formation. *Mol Cell* pp 1059-1069.

## 9. Publikation

Zohlhofer D, Nuhrenberg TG, Neumann FJ, Richter T, May AE, Schmidt R, Denker K, Clauss MA, Schomig A, Baeuerle PA.

**Rapamycin effects transcriptional programs in smooth muscles cells controlling proliferative and inflammatory properties.**

Mol Pharmacol. 2004 Apr; 65(4): 880-9



## **10. Danksagung**

Ich möchte meiner „Doktormutter“ Frau PD Dr. Zohlhöfer für ihr wirklich außerordentliches Engagement danken, für ihre liebevolle Geduld und dafür, dass ich von ihr so vieles lernen durfte, was weit über den Rahmen dieser Arbeit hinausgeht!

Ich danke meiner großartigen Familie, meinem einzigartigen Partner und meinen wundervollen Freunden, die mich durch diese Arbeit begleitet und stets in jeder nur denkbaren Form unterstützt haben.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe und des Labors, allen voran Thomas Nührenberg, für ihre Mithilfe bedanken.