

Aus dem Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten  
Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Peter C. Weber

**Antiapoptotische Wirkung von FGF-2 bei der zelldichteabhängigen  
Apoptosesensitivität in glatten Gefäßmuskelzellen**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Martin Neureuter  
aus Augsburg  
2007

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. W. Erl

Mitberichterstatter: Prof. Dr. P. Boekstegers

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 25.10.2007

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	6
Abbildungsverzeichnis	7
<b>1 Einleitung</b>	<b>8</b>
1.1 Allgemeines zur Apoptose	8
1.1.1 Einführung in die Terminologie	8
1.1.2 Bedeutung in Physiologie, Pathologie und Therapie	8
1.1.3 Morphologische Merkmale und Unterschiede zur Nekrose	9
1.1.4 Von der Induktion zum Zelltod: Molekularbiologischer Ablauf der Apoptose	10
1.2 Apoptose glatter Gefäßmuskelzellen im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen	11
1.2.1 Atherosklerose	11
1.2.2 Restenose	12
1.3 Experimentelle Grundlagen	13
1.3.1 HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren	13
1.3.2 Pyrrolidin-Dithiocarbamat (PDTC)	14
1.3.3 Zelldichte als Faktor der Apoptosesensitivität	14
<b>2 Fragestellung</b>	<b>15</b>
<b>3 Material und Methodik</b>	<b>16</b>
3.1 Material	16
3.1.1 Chemikalien und Reagenzien	16
3.1.2 Proteine	16
3.1.3 Medien und Lösungen	16
3.1.4 Medikamente	17
3.1.5 Kits	17
3.2 Methodik	18
3.2.1 Gewinnung und Kultur der Zellen	18
3.2.1.1 Isolation der Zellen (Explantat-Technik)	18
3.2.1.2 Zellkultur	18

	Seite	
3.2.2	Herstellung des konditionierten Mediums	19
3.2.3	Immunpräzipitation des konditionierten Mediums	20
3.2.4	Trypanblau-Zählung	20
3.2.5	Bestimmung der MTT-Aktivität	21
3.2.6	Durchflusszytometrie	22
3.2.6.1	Grundlagen	22
3.2.6.2	Annexin-V-Färbung	23
3.2.6.3	Zellzyklusanalyse und <i>sub-G1-peak</i> -Bestimmung	24
3.2.6.4	Beispiel einer <i>sub-G1-peak</i> -Bestimmung an Hand der Apoptose- induktion durch Serumentzug und Lovastatin	25
3.2.7	Western Blot	26
4	Ergebnisse	28
4.1	Apoptoseinduktion bei glatten Gefäßmuskelzellen	28
4.1.1	Wirkung von Lovastatin auf proliferierende glatte Gefäßmuskel- zellen	28
4.1.2	Wirkung von Lovastatin auf nicht proliferierende glatte Gefäß- muskelzellen	29
4.2	Zelldichte als Faktor der Apoptosesensitivität	31
4.2.1	Wirkung von serumhaltigem konditioniertem Medium auf glatte Gefäßmuskelzellen bei der Apoptoseinduktion	31
4.2.2	Wirkung von serumfrei konditioniertem Medium auf glatte Gefäß- muskelzellen	32
4.2.3	Wirkung von serumfrei konditioniertem Medium bei der Apoptose- induktion durch PDTC	35
4.2.3.1	Wirkung von PDTC in serumfreiem Medium	35
4.2.3.2	Untersuchung von serumfrei konditioniertem Medium bei der In- duktion von Apoptose durch PDTC	37
4.2.3.3	Wirkung des serumfrei konditionierten Mediums mit Zusatz von Albumin als Trägerprotein	39

	Seite	
4.2.4	Wirkung von serumfrei konditioniertem Medium bei der Apoptoseinduktion durch Lovastatin	40
4.2.5	FGF-2 als Faktor der Apoptoseprotektion in serumfrei konditioniertem Medium	42
4.2.5.1	Nachweis der Aktivität von FGF-2 mittels Immunpräzipitation	42
4.2.5.2	Nachweis von FGF-2 durch Western Blot	44
5	Diskussion	45
5.1	Zellspezifische Apoptosestimuli	45
5.2	Konditioniertes Medium mit antiapoptotischen Eigenschaften in Abhängigkeit des verwendeten Stimulus	46
5.3	FGF-2-Expression in glatten Gefäßmuskelzellen hoher Dichte	48
5.4	Klinische Aspekte	50
6	Zusammenfassung	53
7	Literaturverzeichnis	54
8	Publikationen	60
9	Danksagung	61
10	Lebenslauf	62

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Cond.	Konditioniertes Medium
Cu	Kupferionen
DMEM	modifiziertes Eagle Medium
DMSO	<i>Dimethyl Sulfoxide</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DTT	DL-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamin Tetraacetat
FAS-L	FAS-Ligand
FCS	Fötale Kälberserum
FGF-2	<i>Fibroblast growth factor 2</i>
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
g	Erdbeschleunigung
gr.	griechisch
h	Stunde(n)
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl) Piperazin-N`-(2-Ethansulfonsäure)
HMG-CoA	3-Hydroxy,3-Methylglutaryl Coenzym A
IAP	<i>Inhibitor of apoptosis proteins</i>
KON	Kontrolle
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LOV	Lovastatin
M	Molar
min	Minute(n)
MTT	Methylthiazoltetrazolium
NF- $\kappa$ B	Nuklear-Faktor kappa B
PBS	Phosphatgepufferte isotone Kochsalzlösung
PDTC	Pyrrolidin-Dithiocarbamat
PI	Propidiumjodid
PTA	Perkutane transluminale Angioplastie
PTCA	Perkutane transluminale koronare Angioplastie
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
T-25	Zellkulturflasche mit 25 cm <sup>2</sup> Wachstumsfläche
T-75	Zellkulturflasche mit 75 cm <sup>2</sup> Wachstumsfläche
TBS	Tris- gepufferte Kochsalzlösung
TMPP	<i>5,10,5,20-tetrakis (methyl-4-pyridyl)-21H,23H-porphine tetra-p-tosylate salt</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TNF-R	TNF-Rezeptor
U	<i>Unit(s)</i>
Zn	Zinkionen

## Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abb. 1. Beispiel einer <i>sub-G1-peak</i> -Messung an Hand der Apoptoseinduktion durch zwei unterschiedliche Stimuli.	26
Abb. 2. Dosis- und Zeitabhängigkeit bei der Apoptoseinduktion durch Lovastatin bei proliferierenden glatten Gefäßmuskelzellen.	28
Abb. 3. Effekt von Lovastatin unter serumhaltigen (10% FCS) und unter serumfreien (0% FCS) Bedingungen auf glatte Gefäßmuskelzellen.	29
Abb. 4. Verminderte Potenz des Apoptosestimulus Lovastatin bei nicht proliferierenden glatten Gefäßmuskelzellen.	30
Abb. 5. Einfluss von serumhaltigem konditioniertem Kulturmedium auf die Apoptosestimulation.	31
Abb. 6. Wirkung von serumfrei konditioniertem Medium auf die Zellzahl von primär nicht proliferierenden glatten Gefäßmuskelzellen.	33
Abb. 7. Wirkung von serumfrei konditioniertem Medium auf den Zellzyklus.	34
Abb. 8. Effekt von PDTC in Kombination mit Kupfer und Zink auf die Zellzahl sowie auf die Anzahl Trypanblau-positiver glatter Gefäßmuskelzellen in serumfreiem Medium.	36
Abb. 9. Effekt von serumfrei konditioniertem Medium bei der Apoptosestimulation durch PDTC in Kombination mit Kupfer.	38
Abb. 10. Effekt von serumfrei konditioniertem Medium bei der Apoptosestimulation durch PDTC in Kombination mit Zink.	38
Abb. 11. Effekt von serumfrei konditioniertem Medium bei der Apoptosestimulation durch PDTC in Kombination mit Kupfer und Zink.	38
Abb. 12. Effekt von serumfrei konditioniertem Medium bei der Apoptosestimulation mit Lovastatin bei humanen glatten Gefäßmuskelzellen.	41
Abb. 13. Einfluss der FGF-2-Immünpräzipitation auf das antiapoptotische Verhalten von serumfrei konditioniertem Medium im Rahmen der Apoptoseinduktion mit Lovastatin bei humanen glatten Gefäßmuskelzellen.	43
Abb. 14. Nachweis von FGF-2 mittels Western Blot.	44
Abb. 15. Schematische Darstellung der Rolle von FGF-2 bei glatten Gefäßmuskelzellen als proliferationsinduzierendes bzw. antiapoptotisches Protein.	49
Abb. 16. Modell der autokrinen FGF-2-Produktion glatter Gefäßmuskelzellen nach Ballonverletzung.	51

# **1 Einleitung**

## **1.1 Allgemeines zur Apoptose**

### **1.1.1 Einführung in die Terminologie**

Im Jahre 1972 wurde der Begriff „Apoptose“ (gr. *apoptein* = „Herabfallen“) zum ersten Mal von Kerr et al (30) für eine von der Nekrose zu unterscheidende bestimmte Form des Zelltodes formuliert, um dessen morphologischen Erscheinungen gerecht zu werden. Dabei wurden die augenscheinlichen Merkmale dieses Zelltodes mit dem Herabfallen der Blätter von den Bäumen im Herbst in metaphorischer Weise verglichen. Heute wird das Wort Apoptose häufig synonym verwendet zu dem Ausdruck „programmierter Zelltod“, welcher mehr die funktionellen Zusammenhänge betont. Dabei soll zum Ausdruck gebracht werden, dass bei dieser Form des Absterbens der Zelle ein typisches, genetisch determiniertes Programm der Zelle abläuft, welches deren Zelltod zum Ausgang hat. Dies ist auch der Grund dafür, warum Apoptose häufig mit einem „Selbstmord“ der Zelle verglichen wird. Abzugrenzen ist die Apoptose von anderen Formen des Zelltodes, welche oft unter dem Begriff „Nekrose“ zusammengefasst werden und nicht mit diesen charakteristischen Merkmalen in Verbindung zu bringen sind.

### **1.1.2 Bedeutung in Physiologie, Pathologie und Therapie**

Seit der ersten Formulierung des Begriffs „Apoptose“ in diesem Zusammenhang sind ungefähr dreißig Jahre vergangen und die Erkenntnisse über diese Form des Zelltodes haben gerade in den letzten Jahren drastisch zugenommen. Dass Apoptose im Rahmen der Entwicklung von Vertebraten eine große Rolle spielt, ist mittlerweile unbestritten. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die überschüssige Produktion von Nervenzellen im Laufe des Wachstums durch mit Wachstumsfaktorentzug induzierte Apoptose ausgeglichen wird (21). Auch bei einigen pathologischen Prozessen hat diese Form des Zelltodes einen unumstrittenen Stellenwert eingenommen. Dabei scheint oft ein aus dem Gleichgewicht geratenes Verhältnis zwischen Apoptose und Proliferation eine große Rolle zu spielen, so dass allgemein gesprochen sowohl ein im Verhältnis zur Proliferation zu hohes als auch ein zu niedriges Maß an Apoptose zu pathologischen Prozessen führen kann. So konnte u.a. gezeigt werden, dass degenerative



Erkrankungen wie Morbus Parkinson (29) oder Morbus Alzheimer (28) und Autoimmunerkrankungen wie z.B. die Hashimoto-Thyreoiditis (50) durch exzessive Apoptoseraten der Zellen des entsprechenden Gewebes gekennzeichnet sind. Ein bekanntes Beispiel dafür, dass eine quantitative Dysregulation der Apoptose im Sinne einer „*Downregulation*“ zur Krankheit führt, ist das B-Zell-Lymphom (9). Auch im Rahmen der Atheroskleroseentwicklung hat die Apoptose von Zellen eine enorme Bedeutung.

Des Weiteren spielt die Apoptose bei therapeutischen Prozessen eine Rolle, was u.a. bei der Behandlung von Tumoren mittels Chemotherapie (38) oder Bestrahlung (39) gezeigt werden konnte.

### **1.1.3 Morphologische Merkmale und Unterschiede zur Nekrose**

Es wurde bereits darauf hingewiesen, dass Zellen während des Vorgangs der Apoptose bestimmte morphologische Veränderungen durchlaufen. Letztere werden in der Regel stadientypisch nach einer bestimmten Reihenfolge durchschritten. Dabei kommt es zunächst zu einer Schrumpfung der Zelle, gefolgt von einer Chromatinkondensation und Fragmentation des Zellkerns. Im weiteren Verlauf vollzieht sich eine bläschenförmige Einstülpung der Zellmembran, welche in einer Aufteilung der gesamten Zelle in sogenannte „Apoptosekörperchen“ resultiert. Anschließend werden diese Zellreste in der Regel von benachbarten Zellen oder Phagozyten aufgenommen. Das im Rahmen des apoptotischen Vorgangs auf der Zelloberfläche exponierte Phosphatidylserin der zu Grunde gehenden Zelle dient dabei als Erkennungssignal und interagiert mit entsprechenden Rezeptoren der phagozytierenden Zellen (6).

Während so die Zellmembran der apoptotischen Zellen weitestgehend intakt bleibt, kommt es im Gegensatz dazu im Rahmen des Vorgangs der Nekrose, bei der die Zellen zunächst stark anschwellen, sehr früh zu einem Membrandefekt, wodurch intrazelluläres Material in den Extrazellulärraum übergeht und dort in Folge dessen eine Entzündungsreaktion auslöst. Letztere tritt bei der Apoptose nicht in Erscheinung.

#### 1.1.4 Von der Induktion zum Zelltod: Molekularbiologischer Ablauf der Apoptose

In mehreren Studien konnte belegt werden, dass sich der Prozess der Apoptose in drei aufeinanderfolgende Stadien einteilen lässt: 1) die Entscheidung zur Apoptose, durch entsprechende Stimuli provoziert, 2) der Vollzug des Zelltodes mittels Aktivierung spezieller intrazellulärer Proteasen und 3) die Aufnahme der abgetöteten Zellreste durch benachbarte phagozytierende Zellen.

Inzwischen konnten eine ganze Reihe verschiedenartiger Stimuli identifiziert werden, welche zum programmierten Zelltod führen. Hierbei handelt es sich um Reize wie Ischämie, Hitze, Bestrahlung oder Behandlung mit Chemotherapeutika sowie Wachstumsfaktorenentzug, was allgemein unter dem Begriff „Zellstress“ subsumiert wird. Alternativ spielen bei der Initiation des Prozesses sog. „Todesrezeptoren“ (z.B. FAS, TNF-R) eine wichtige Rolle, wobei das Vorhandensein entsprechender extrazellulärer Liganden (z.B. FAS-L oder TNF- $\alpha$ ) zur Signaltransduktion führt (53,63). Eingebunden in den Prozess des Apoptosevorganges sind ferner die Mitochondrien (62).

Als zentrales Element des apoptotischen Vorgangs kann auf molekularbiologischer Ebene die Aktivierung von sog. Caspasen gesehen werden, bei denen es sich um Apoptose-spezifische Proteasen handelt, welche zahlreiche für das Leben der Zelle notwendige Proteine (z.B. Proteine der Signaltransduktion, des Zytoskeletts oder des Zellkerns) spalten und damit den Zelltod unumgänglich machen (42). Einen auf diese Weise in Gang gesetzten, wichtigen Prozeß stellt die Inaktivierung des hierbei gespaltenen Proteins „*Inhibitor of caspase activated DNase*“ dar, welches normalerweise eine entsprechende cytoplasmatisch lokalisierte Endonuklease in ihrer Aktivität inhibiert. Folglich kommt es beim apoptotischen Vorgang zu einer Aktivierung letzterer, was nach deren Translokation in den Zellkern die Spaltung der DNS zur Folge hat (12).

Zusätzlich konnten inzwischen noch eine Reihe von Proteinen identifiziert werden, welche bei der Apoptoseregulation eine Rolle spielen. Im Wesentlichen handelt es sich hierbei um die Familie der Bcl-2-Proteine mit pro- (z.B. Bax, Bad) oder antiapoptotischer (z.B. Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>) Aktivität (8,54), und um die Gruppe der antiapoptotisch wirkenden „*Inhibitor of apoptosis proteins*“ (z. B. c-IAP1, c-IAP2) (58).

## 1.2 Apoptose glatter Gefäßmuskelzellen im Rahmen kardiovaskulärer Erkrankungen

Im Folgenden soll die Rolle von Apoptose glatter Gefäßmuskelzellen im Rahmen von zwei ausgesuchten kardiovaskulären pathologischen Prozessen (Atherosklerose und Restenose) erläutert werden.

### 1.2.1 Atherosklerose

Betrachtet man Untersuchungen bezüglich Apoptose von glatten Gefäßmuskelzellen in atherosklerotisch veränderten Gefäßwänden, so stellt man fest, dass das Vorkommen von apoptotischen Gefäßmuskelzellen in atherosklerotischen Plaques stadienabhängig ist. So konnte im Rahmen histopathologischer Untersuchungen von Kockx et al. gezeigt werden, dass sich in frühen Stadien („*adaptive intimal thickening*“ und „*fatty streak*“) der Atherosklerose noch keine apoptotische Gefäßmuskelzellen in den Läsionen befinden. Jedoch konnte bereits in den „*fatty streaks*“ im Rahmen immunhistochemischer Untersuchungen eine erhöhte Expression des proapoptotischen Proteins Bax in von glatten Gefäßmuskelzellen abstammenden Schaumzellen festgestellt werden. Im fortgeschrittenen Stadium („*advanced atherosclerotic plaque*“) zeigten sich schließlich apoptotische Zellen v.a. in den Bereichen, welche von Makrophagen infiltriert waren (33). Nachdem die Stadienabhängigkeit für das Vorkommen von apoptotischen glatten Gefäßmuskelzellen in atherosklerotischen Läsionen feststeht, drängt sich die Frage nach deren Bedeutung in diesen Regionen auf. In der gängigen Literatur stößt man dabei v.a. auf zwei Aspekte: Zum Einen die Rolle von vitalen glatten Gefäßmuskelzellen im Rahmen der Plaquestabilisierung, zum Anderen die im Zuge der durch erhöhte Apoptoseraten dieses Zelltyps entstehende Vulnerabilität und Thrombogenität des atherosklerotischen Plaques.

Die Theorie der plaquestabilisierenden Funktion von vitalen glatten Gefäßmuskelzellen rührt daher, dass letztere die einzigen Zellen im Bereich der fibrösen Kappe - also der lumennahen Seite des atherosklerotischen Plaques - sind, welche im Stande sind, Kollagen zu synthetisieren. Fällt diese Kollagenquelle auf Grund erhöhter Apoptoseraten dieser Zellen aus, so lässt sich leicht nachvollziehen, dass dies eine Destabilisierung des Plaques und somit - bei weiterer Progredienz -

auch eine Plaqueruptur mit entsprechenden klinischen Folgen bedeuten kann (z.B. instabile Angina pectoris, Myokardinfarkt bei Koronarsklerose) (45,59).

Die erhöhte Thrombogenität im Bereich des Plaques durch apoptotische glatte Gefäßmuskelzellen wird dadurch erreicht, dass im Rahmen des Apoptosevorganges Phosphatidylserin an der Zelloberfläche exprimiert wird, welches nach Flynn et al. (18) eine Thrombinaktivierung zur Folge hat und damit die Thrombusbildung im Bereich des Plaques unterstützt.

Insgesamt gesehen scheint also das Vorhandensein von apoptotischen glatten Gefäßmuskelzellen im atherosklerotischen Plaque sich eher ungünstig auf den Krankheitsprozess auszuwirken.

### **1.2.2 Restenose**

Ein weiterer pathophysiologischer Prozess, bei dem Apoptose von glatten Gefäßmuskelzellen offensichtlich eine Rolle spielt, ist das relativ häufige Auftreten von Restenosen nach interventionellen Therapien wie PTA oder PTCA ohne oder mit nachfolgendem *Stenting*. So wurde im Rahmen klinischer Studien festgestellt, dass man bei etwa 33% der Patienten, welche sich einer primär erfolgreichen PTCA unterziehen, mit Restenosen rechnen muß, wobei sich die Rate durch Verwendung von Stents auf ungefähr 19% reduzieren läßt (37). Ein pathophysiologischer Prozess, der neben anderen Mechanismen eine Rolle spielt, ist die Neointimabildung, bei der es nach primär erfolgreicher Koronarintervention zur Zytokin-vermittelten Migration von glatten Gefäßmuskelzellen aus der Media in die Intima der Gefäßwand kommt. Die nachfolgende starke Proliferation dieser Zellen und entsprechende Produktion von extrazellulärer Matrix durch letztere führt dann zur Bildung der Neointima, welche letztendlich eine Verkleinerung des Gefäßdurchmessers und damit die Entstehung einer Restenose zur Folge hat (48,34).

Bei histopathologischen Untersuchungen von Instent-Restenosen konnte ferner gezeigt werden, dass es neben dem Zuwachs an proliferierenden Zellen auch zu einer Zunahme an apoptotischen glatten Gefäßmuskelzellen kommt (26). Der Sinn dieses Phänomens wird darin gesehen, dass durch die apoptotischen Vorgänge eine zu rasche Lumenreduktion durch die oben beschriebene Proliferation der Zellen verhindert werden soll. Folglich könnte die Unterbindung einer überschießenden Proliferation der Zellen bzw. das Fördern apoptotischer Vorgänge von glatten Gefäßmuskelzellen bei diesem pathophysiologischen Prozess als ein

primärprophylaktisches Konzept gesehen werden, um Restenosen nach primär erfolgreicher Intervention zu verhindern.

### **1.3 Experimentelle Grundlagen**

Aus den oben genannten Beobachtungen wird leicht ersichtlich, warum es lohnt, sich mit der Apoptoseregulation von glatten Gefäßmuskelzellen zu beschäftigen. Im Laufe der Zeit wurden so einige Substanzen entdeckt, welche in der Lage sind, Apoptose bei glatten Gefäßmuskelzellen zu induzieren. Als Beispiele, welche auch in dieser Arbeit Verwendung fanden, seien hier genannt HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren, sog. „Statine“ (2, 22) und Pyrrolidin-Dithiocarbamat (PDTC) (56).

#### **1.3.1 HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren**

Bei den HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren wie Lovastatin oder Atorvastatin handelt es sich um Hemmstoffe der Cholesterin-Biosynthese, welche pharmakologisch ihre Wirkung über die Inhibition des Schlüsselenzyms der Cholesterinsynthese entfalten. Durch die dadurch vermittelte erhöhte Expression von hepatischen LDL-Rezeptoren kommt es schließlich zu einer Senkung des LDL-Spiegels im Blut (20). Ein Nebeneffekt ist die gleichzeitige Anhebung des HDL-Cholesterins sowie eine Senkung der Triglyceride. Neben der positiven Beeinflussung des Lipidprofils entfalten die Statine auch andere protektive Effekte, welche unter dem Begriff der sog. „pleiotropen“ Effekte subsumiert werden. Hierzu zählen z.B. antientzündliche (z.B. Senkung des C-reaktiven Proteins im Serum), antithrombotische (z.B. Inhibierung der Expression von *tissue factor* in Endothelzellen) oder plaquestabilisierende (z.B. Inhibierung von Matrix-Metalloproteinasen) Wirkungen (52,16,10). Inzwischen steht auch fest, dass Statine in der Lage sind, Apoptose in diversen Zelltypen zu induzieren, darunter Tumorzelllinien (24,61) und glatte Gefäßmuskelzellen (2,22).

### **1.3.2 Pyrrolidin-Dithiocarbamat (PDTC)**

Bei PDTC handelt es sich um einen Radikalfänger mit antioxidativen Eigenschaften. Da oxidativer Stress bekanntlich als eine Möglichkeit der Apoptoseinduktion gesehen wird (36), ist es kaum verwunderlich, dass PDTC in Versuchen mit unterschiedlichen Zelltypen (z.B. Lymphocyten oder Tumorzelllinien) antiapoptotische Eigenschaften entwickelte (7,47). Überraschenderweise konnte aber auch gezeigt werden, dass PDTC in anderen Zelltypen - wie z.B. glatten Gefäßmuskelzellen - Apoptose zu induzieren vermag (56). Über die Ursache dieser Eigenschaft von PDTC gibt es inzwischen mehrere Hypothesen. So wurde beispielsweise die Inhibition von NF- $\kappa$ B als für diesen Effekt verantwortlich gesehen (3). Bei weiteren Untersuchungen mit glatten Gefäßmuskelzellen konnte festgestellt werden, dass sich die apoptotische Wirkung von PDTC nur in Abhängigkeit des Vorhandenseins von extrazellulären Kupfer- oder Zinkionen entfalten kann (15).

### **1.3.3 Zelldichte als Faktor der Apoptosesensitivität**

Wurden einerseits diese apoptoseinduzierenden Agentien entdeckt, war es andererseits interessant, herauszufinden, unter welchen Umständen sich Zellen resistent gegenüber Apoptose zeigten. So konnte bei diversen Zelltypen in vitro gezeigt werden, dass u.a. die Dichte der Zellpopulation während der Zellkultur hierbei eine Rolle spielt. Beispielsweise ließ sich bei Zellen der Retina demonstrieren, dass sich diese in hoher Zelldichte kultiviert resistenter gegenüber Apoptose erwiesen als in Kulturen niedrigerer Zelldichte (55). Bei Experimenten mit Hepatozyten wurde jedoch eine genau umgekehrte Korrelation von Zelldichte und Apoptoseempfindlichkeit festgestellt (43), so dass das Phänomen der dichteabhängigen Apoptoseempfindlichkeit vom Zelltyp abhängig zu sein scheint.

Auch bei menschlichen Endothelzellen der Nabelschnur konnte festgestellt werden, dass diese Zellen in niedrigerer Dichte kultiviert resistenter gegenüber Apoptose waren als in hoher Dichte. Dabei ließ sich mittels Immunpräzipitation und Western Blot zeigen, dass von den Endothelzellen eigens gebildetes und in den Extrazellulärraum abgegebenes FGF-2 für diesen Effekt verantwortlich ist (31).

Auch bei glatten Gefäßmuskelzellen konnte eine Dichteabhängigkeit bezüglich der Apoptosesensitivität festgestellt werden. So konnte gezeigt werden, dass glatte

Gefäßmuskelzellen in hoher Dichte kultiviert resistenter gegenüber Apoptoseinduktion sind als in normaler Dichte kultivierte Zellen (15).

Zusätzlich spielt FGF-2 auch bei glatten Gefäßmuskelzellen eine entscheidende Rolle für die Proliferation und Apoptose (40,19).

## **2 Fragestellung**

Aus letztgenannten Aspekten ergab sich die Fragestellung dieser Arbeit. Es sollte gezeigt werden, in welcher Weise es zu einer verminderten Apoptoseempfindlichkeit bei glatten Gefäßmuskelzellen hoher Dichte kommt.

So sollte zunächst untersucht werden, ob extrazelluläre Faktoren einen Einfluß diesbezüglich nehmen. Hierfür wurden zunächst glatte Gefäßmuskelzellen in hoher Dichte kultiviert und das dabei verwendete Kulturmedium nach 48 h Inkubation gewonnen und für weitere Untersuchungen verwendet (sog. „konditioniertes Medium“). Bei Nachweis einer antiapoptotischen Eigenschaft des konditionierten Mediums sollte dieses auf das Vorhandensein von FGF-2 als ein möglicher antiapoptotischer Faktor untersucht werden. Die Ergebnisse sind von belang, da apoptotische glatte Gefäßmuskelzellen sowohl im Rahmen von Atherosklerose als auch bei Restenosen nach Ballonangioplastie eine Rolle spielen. So kann z.B. als Therapieansatz versucht werden, durch gezielte Apoptoseinduktion glatter Gefäßmuskelzellen eine überschießende Proliferation und damit eine Restenose post interventionem zu verhindern.

### 3 Material und Methodik

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

<i>Agarose beads</i>	Santa Cruz
Annexin-V-FITC	PharMingen
Aprotinin	Sigma
Bovines Serum-Albumin	Sigma
DMSO	Sigma
EDTA	Sigma
Glycerol	Fluka
HEPES	Sigma
Isopropanol	Fluka
Leupeptin	Sigma
Methanol	Fluka
MgCl <sub>2</sub>	Fluka
MTT	Sigma
NaCl	Merck
PDTC	Sigma
Pepstatin	Sigma
PI	Sigma
Salzsäure	Fluka
SDS	Bio-Rad
Sodium Orthovanadat	Sigma
Tris	Biomol
Triton X-100	Fluka
Tween 20	Sigma
β-Glycerophosphat	Sigma

##### 3.1.2 Proteine

rekombinantes humanes FGF-2	Promo Cell
<i>rabbit-anti-FGF-2</i>	Santa Cruz
<i>mouse-IgG1</i>	Santa Cruz

##### 3.1.3 Medien und Lösungen

	<u>Zusammensetzung</u>	
Annexin-V-Lösung	Annexin-V-FITC (1:400) 1 % FCS PBS mit 1,5 mM Ca <sup>2+</sup>	
DMEM		Gibco
DMEM-F12		Gibco



FCS		Sigma
MTT-Lösung	MTT (0,5 mg/ml) 0,5 % FCS DMEM-F12 phenolfrei	
PBS		PAA
PBS mit Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>		PAA
PI-Lösung	10 µg/ml DNSase-freie RNSase 0,1 % Triton-X 100 20 µg/ml PI in PBS mit Ca <sup>2+</sup> und Mg <sup>2+</sup>	
Running Buffer (10X)	32,1 g/l Tris 144 g/l Glycin 10 g/l SDS	
TBS	10 ml 1 M Tris 33 ml 5 M NaCl Auf 1000 ml Wasser	
TBS-Milch	5 % Lösung in TBS	
Transfer Buffer	3,03 g Tris 14,4 g Glycin auf 800 ml Wasser 200 ml Methanol	
Trypanblau-Lösung (0,4 %)		Sigma
Trypsin/EDTA-Lösung 1x		Sigma

### 3.1.4 Medikamente

Lovastatin  
 Lovastatin wurde in DMSO gelöst, PDTC in PBS. MSD Sharp & Dohme

### 3.1.5 Kits

*Bio-Rad<sub>DC</sub> Protein Assay Kit*  
*Chemiluminescence Luminol Reagent* Bio-Rad  
 Santa Cruz

## **3.2 Methodik**

### **3.2.1 Gewinnung und Kultur der Zellen**

#### **3.2.1.1 Isolation der Zellen (Explantat-Technik)**

Zur Isolation humaner glatter Gefäßmuskelzellen wurden die zur Verfügung stehenden Nabelschnurarterien zunächst präpariert und dabei von Bindegewebe befreit. Anschließend wurden die Gefäße in kleine Ringe von etwa 1 mm Dicke geschnitten und in T-25, welche zuvor mit PBS gefüllt wurden, überführt. Der Puffer wurde danach wieder mit einer Pipette abgesaugt, um die Gefäßscheiben am Boden der Fläschchen anheften zu lassen. Für diesen Prozess wurden die Kulturfläschchen für etwa 20 min im Inkubator untergebracht. Anschließend wurde den Gefäßstücken 1 ml Kulturmedium (DMEM-F12) zugeführt und diese im Inkubator belassen, wobei das Medium alle drei Tage gewechselt wurde. Nach etwa ein bis zwei Wochen ließen sich Zellen erkennen, welche aus den Gefäßstückchen sprossen. Vier bis sechs Wochen später wurden die Zellen erstmals passagiert, wobei die Gefäßreste entfernt wurden. Da das Wachstum humaner Endothelzellen von der Anwesenheit von Wachstumsfaktoren abhängig ist, letztere aber nicht im verwendeten Kulturmedium vorhanden waren, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei den wachsenden Zellen um glatte Gefäßmuskelzellen handelt.

Die glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte wurden aus deren Aorta in gleicher Weise gewonnen, wobei jedoch vorhandene Endothelzellen vom Gefäßlumen durch Aufschneiden und Abschaben der obersten Zellschicht entfernt wurden.

Nach der zweiten Passage konnten sowohl die humanen als auch die glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte je nach Bedarf entweder weiter kultiviert oder zunächst zur Aufbewahrung kryokonserviert werden.

#### **3.2.1.2 Zellkultur**

Sowohl die humanen als auch die glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte wurden in T-75 mit DMEM-F12 kultiviert, welches mit 10% FCS versetzt wurde. Die im Serum enthaltenen Wachstumsfaktoren stellen dabei den nötigen Stimulus zur Vermehrung der Zellen bereit. Kultiviert wurden die Zellen im Sterikult-Inkubator, welcher die Raumluft mit 5% CO<sub>2</sub> bei 90% Luftfeuchtigkeit und 37°C anreichert. Ein Wechsel des Kulturmediums erfolgte alle zwei bis drei Tage. Die im *Monolayer* wachsenden Zellen

wurden regelmäßig unter dem Lichtmikroskop beobachtet und bei Konfluenz „passagiert“, d.h. in neue Kulturflaschen überführt. Dabei wurde das alte Medium verworfen und die Fläschchen zweimal mit PBS gewaschen, bevor die Zellen mittels 5 ml Trypsin/EDTA-Lösung vom Boden des Fläschchens abgelöst wurden. Nach Ablösung der Zellen, welche unter dem Lichtmikroskop beobachtet wurde, wurde Trypsin mit FCS im Verhältnis 2:1 neutralisiert. Die Zellen wurden anschließend in einem 50 ml-Röhrchen aufgefangen, wobei die alte Kulturflasche zweimal mit DMEM nachgespült wurde, um möglichst wenig Zellen bei der Passage zu verlieren. Während die Zellen nun zentrifugiert wurden (800 g für 8 min), wurde die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Kammer unter dem Lichtmikroskop bestimmt. Durch den Prozess der Zentrifugation sammeln sich die Zellen als *pellet* am Boden des Röhrchens an. Die Zellen wurden dann wieder in DMEM-F12 mit 10% FCS resuspendiert und entsprechend der vorher bestimmten Zellzahl in einer Zelldichte von  $1 \times 10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  bei Zellen der Ratte bzw.  $0,4 \times 10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  bei humanen Zellen in die neuen Kulturflaschen überführt.

Für die Experimente wurden ausschließlich Zellen der Passagen 3 bis 12 verwendet. Vor der Stimulation der Zellen wurden diese bei gleicher Zelldichte ausgesät und für 48 h im Inkubator kultiviert. Um eine Zellkultur mit hoher Dichte zu erhalten, wurde bei Zellen der Ratte eine Zelldichte von  $1 \times 10^5$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  bzw. von  $4 \times 10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  bei humanen Zellen angesetzt.

### **3.2.2 Herstellung des konditionierten Mediums**

Zur Herstellung des konditionierten Mediums wurden die glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte in einer Dichte von  $1 \times 10^5$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  bzw. von  $4 \times 10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  bei humanen Zellen in T-75 ausgesät. Nach 48 h Inkubation wurde das Kulturmedium (DMEM-F12 mit 10% FCS) nach zweimaligem Waschen mit PBS gewechselt. Nach 48 h weiterer Inkubation konnte das konditionierte Medium gewonnen werden. Dabei wurde der Überstand von toten Zellen oder Zelltrümmern durch Filtration mittels eines sterilen  $0,2 \mu\text{m}$ -Filters befreit. Das auf diese Weise gewonnene serumhaltige konditionierte Medium wurde bis zu seiner Verwendung bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren.

Zur Gewinnung von serumfrei konditioniertem Medium wurde nach den ersten 48 h Inkubation mit serumhaltigen Medium der Serumanteil zunächst nach zweimaligem Waschvorgang mit PBS auf 0,1% FCS reduziert, um möglichen Zelltod durch abrupten Serumentzug zu vermeiden. Nach 24 h Inkubation wurde erneut das

Kulturmedium nach zweimaligem Waschen mit PBS gewechselt, wobei nun 10 ml serumfreies DMEM-F12 verwendet wurde. Der Überstand dieser Zellkulturen wurde dann nach 48 h Inkubation als serumfreies konditioniertes Medium gewonnen. Dabei wurde dieses ebenso dem Prozess der Filtration unterzogen wie für das serumhaltige konditionierte Medium oben beschrieben, bevor auch dieses Medium bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren wurde.

Bei Vorversuchen bezüglich der Aktivität von gefrorenem und frischem konditionierten Medium konnten keine Wirkunterschiede festgestellt werden.

### **3.2.3 Immunpräzipitation des konditionierten Mediums**

Die Methode der Immunpräzipitation wurde verwendet, um die Aktivität von FGF-2 im serumfrei konditionierten Medium von glatten Gefäßmuskelzellen nachzuweisen. Hierfür wurde das serumfrei konditionierte Medium mit einem FGF-2-Antikörper in einer Verdünnung von 1:2000 für 60 min bei 4°C unter Rühren inkubiert. Als Kontrolle wurde für jeden Versuch konditioniertes Medium der gleichen *Charge* mit *mouse-IgG1*-Antikörper in entsprechender Weise behandelt. Anschließend wurde den so behandelten Medien *Agarose beads* in einer Konzentration von 10 µl/ml hinzugefügt und erneut für 120 min bei 4°C unter Rühren inkubiert. Hierdurch wird das am entsprechenden Antikörper gebundene Protein an die *beads* gebunden und nach Abzentrifugieren der *beads* (1000 g für 5 min) aus dem Überstand entfernt. Letzterer wurde dann zur Aufbewahrung bei -20°C eingefroren. Die Effekte der Immunpräzipitation auf das konditionierte Medium wurden im weiteren Verlauf durch die Behandlung glatter Gefäßmuskelzellen mit den aufgetauten Überständen untersucht.

### **3.2.4 Trypanblau-Zählung**

Mit Hilfe der Trypanblau-Zählung ist es möglich, tote von lebenden Zellen unter dem Lichtmikroskop zu unterscheiden und durch Zählung mit der Neubauer-Kammer in Relation zu setzen. Somit kann mit dieser Methode die Vitalität einer Zellpopulation ausgedrückt werden, z.B. nach Behandlung der Zellen mit apoptoseinduzierenden Substanzen.

Grundlage der Trypanblau-Zählung ist die Tatsache, dass tote Zellen die Integrität ihrer Zellmembran verlieren und der Farbstoff in die Zelle eindringt, während lebende

Zellen in der Lage sind, diesen auszuschließen. Hierbei ist zu beachten, dass bei dieser Methode nicht zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen unterschieden werden kann, weshalb diese Methode bei noch unbekannter Wirkung eines Stimulus auf die Zellen mit spezifischeren Methoden der Apoptosedetektion kombiniert werden sollte. Ferner ist zu berücksichtigen, dass Zellen nur in einem späten Stadium der Apoptose anfärbbar werden, da die Zellmembranintegrität beim Vorgang der Apoptose noch relativ lange erhalten bleibt.

Um die Trypanblau-Zählung durchzuführen, wurde zunächst das Kulturmedium aus den T-25 jeweils in ein 50 ml-Röhrchen überführt. Dies ist notwendig, um abgestorbene Zellen, welche sich aus dem Zellverband am Boden des Kulturfläschchens ablösen, bei der Zählung der toten Zellen mitzuerfassen. Die restlichen Zellen wurden danach mit 2,5 ml Trypsin vom Boden des Kulturfläschchens abgelöst und das Trypsin durch Zugabe von FCS im Verhältnis 2:1 neutralisiert. Unter zweimaligem Nachspülen mit DMEM wurden die Zellen in den gleichen Röhrchen aufgefangen und anschließend zentrifugiert (800 g für 8 min). Nach Resuspension der Zellen in 1 ml PBS (mit  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) wurden 50  $\mu\text{l}$  dieser Zellsuspension entnommen und im Verhältnis 1:1 mit Trypanblau vermischt. Um ein Eindringen des Farbstoffes in die toten Zellen zu ermöglichen, wurde das Gemisch bei Raumtemperatur für zwei Minuten belassen. Danach war die Betrachtung und Zählung der Zellen mit Hilfe der Neubauer-Kammer unter dem Lichtmikroskop möglich. Hierbei erscheinen die lebenden Zellen in weißlicher Farbe, während sich tote Zellen durch den aufgenommenen Farbstoff blau darstellen.

### **3.2.5 Bestimmung der MTT-Aktivität**

Ähnlich der Trypanblau-Zählung ist die Bestimmung der Methylthiazoletetrazolium (MTT)-Aktivität eine Methode zur Messung der Zellvitalität bzw. Zellproliferation. Bei diesem Verfahren wird der zu untersuchenden Zellkultur das Tetrazoliumsalz als zunächst gelb erscheinendes Substrat zugegeben. Lebende Zellen besitzen die Eigenschaft, den Tetrazoliumring dieses Substrates mit Hilfe von Dehydrogenasen zu spalten und es in ein dann blau erscheinendes Formazanprodukt umzuwandeln. Da dieser Prozess nur in Abhängigkeit von Mitochondrien stattfindet, ist er auf lebende Zellen beschränkt, so dass die Intensität dieses Vorgangs ein Maß für die Zellvitalität darstellt. Folglich wird eine sich im Absterben befindliche Zellpopulation

weniger Substrat umwandeln können als eine vitale und eine Zunahme der Zellzahl wird sich entsprechend in einem Anstieg des Produktes auswirken. Das relative Ausmaß der Umwandlung des Substrates und damit die Vitalität der Zellkultur kann hierbei quantitativ mit Hilfe eines Photometers bestimmt werden.

Für eine solche Messung wurden die Zellen in 96-Well-Platten für 48 h kultiviert und anschließend für 24 h stimuliert. Danach wurden die Platten zweimal mit PBS gewaschen, bevor jeweils 100 µl MTT-Lösung pro Well zugegeben wurden. Die anschließende Inkubation der Zellen erfolgte bei 37°C für zwei Stunden. Danach wurde die Substratlösung von den Zellen entfernt und jeweils 100 µl einer HCl-Lösung (0,04 M) in Isopropanol pro Well hinzugegeben, um die Zellen zu lysieren und das entstandene Formazanprodukt in eine homogene und somit für die photometrische Messung ideale Lösung zu bringen. Die Well-Platten wurden nochmals für 5 min bei Raumtemperatur belassen, um eine vollständige Auflösung kristalliner Strukturen zu erreichen. Abschließend konnte die Absorption bei 570 nm im *SLT 400 ATX ELISA Reader* gemessen werden.

### **3.2.6 Durchflusszytometrie**

#### **3.2.6.1 Grundlagen**

Mittels der Durchflusszytometrie ist es möglich, einzelne Zellen in Suspension auf Fluoreszenzeigenschaften hin zu untersuchen. Neben der Fluoreszenz können gleichzeitig die relative Zellgröße und die Granularität der Zellen bestimmt werden. Hierbei sind Partikel bis zu einer Größe von weniger als 0,5 µm unterscheidbar.

Die theoretische Grundlage dieser Art der Messung basiert darauf, dass fluoreszierende Verbindungen Lichtenergie eines weiten Wellenlängenbereichs absorbieren. Dadurch werden von den Elektronen kurzfristig höhere Energieniveaus erreicht, so dass diese beim Rücksprung in den Ursprungszustand Licht abstrahlen. Dabei ist die Wellenlänge dieses emittierten Lichts länger als die des Anregungslichtes, welches bei dem hier verwendeten Gerät (*FACScan*, Becton Dickinson) durch einen luftgekühlten Argon-Ionenlaser ( $\lambda=488\text{nm}$ ) hervorgebracht wird. Geeignete Fluoreszenzfarbstoffe sind nun solche, welche ihr Absorptionsmaximum nahe des Wellenlängenbereichs des Laserlichts erreichen. Die

in dieser Arbeit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe waren Fluorescein Isothiocyanat (FITC) zur Immunfluoreszenz bzw. Propidiumiodid zur Zellzyklusanalyse bzw. Bestimmung des *sub-G1-peaks*.

Um eine solche Messung durchzuführen, ist es nötig, die Zellen vor der Messung in Suspension zu bringen und mit den entsprechenden Fluoreszenzfarbstoffen zu behandeln. Die Zellen, die sich für die Analyse in speziellen Probenröhrchen befinden müssen, werden mittels Überdruck über eine Stahlkapillare der Messzelle des Geräts zugeführt. Dabei werden die Zellen durch die sie umgebende Trägerflüssigkeit beschleunigt. Auf diese Weise gelangen die einzelnen Zellen perlschnurartig aneinandergereiht zum Analysenpunkt des Gerätes. Hier werden die Zellen durch den Laser erfasst und die emittierten Lichtsignale von speziellen Detektoren empfangen. Dabei wird das Licht je nach Größe und Granularität der gerade erfassten Zelle entsprechend gestreut, wobei das Vorwärtsstreulicht (FSC) ein relatives Maß der Zellgröße, das im rechten Winkel seitwärts gestreute Licht (SSC) ein Maß der Granularität der Zelle darstellt. Somit ist es möglich, neben der Fluoreszenzintensität weitere Parameter der Zellen zu analysieren. Über eine nachfolgende elektronische Schaltung werden die von den Detektoren empfangenen Signale gemessen und danach die Daten auf einen angeschlossenen Rechner zur Auswertung übertragen, wobei die Streulichtimpulse linear und die Fluoreszenzimpulse logarithmisch nachverstärkt wurden. Während die Streulichtimpulse in einer korrelierten Zweiparameterdarstellung als Punkteplot angezeigt wurden, diente für die Beschreibung der Fluoreszenzimpulse die Einparameterdarstellung als Histogramm. Des Weiteren konnte bei der Analyse der Daten ein Filter (sog. „Gate“) gesetzt werden, der nur Ereignisse aus einem bestimmten Bereich der Messung zur Auswertung zulässt. Auf diese Weise gelingt es, unerwünschte Ereignisse, wie z.B. an ihrer übermäßigen Größe erkennbare Zellverklumpungen, von der Auswertung auszuschließen.

### **3.2.6.2 Annexin-V-Färbung**

Eine Methode der Durchflusszytometrie, um Zellen auf Vorgänge der Apoptose hin zu untersuchen, ist die Annexin-V-Färbung. Hierbei wird das an der Zelloberfläche von apoptotischen Zellen exponierte Phosphatidylserin durch FITC-konjugiertes

Annexin-V markiert. Je höher demnach die bei einer solchen durchflusszytometrischen Messung ermittelte Fluoreszenzintensität einer Zellpopulation ist, desto größer ist auch der Anteil an apoptotischen Zellen. Um nekrotische Zellen von der Messung auszuschließen, wird gleichzeitig eine Gegenfärbung mit PI vollzogen. Während sich nekrotische Zellen sowohl durch PI als auch durch Annexin-V färben lassen, sind apoptotische Zellen Annexin-V-positiv und gleichzeitig PI-negativ.

Zur Durchführung dieser Methode wurden die in T-25 für 48 h kultivierten und für 24 h stimulierten Zellen samt Überstand mittels Trypsinierung in 50 ml-Röhrchen überführt und zentrifugiert (800 g für 8 min). Die Zellen wurden anschließend in 100 µl PBS (mit  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) resuspendiert und mit 100 µl Annexin-V-Lösung vermischt, wodurch eine Verdünnung des Annexins von 1:400 erreicht wurde. Nach Inkubation der Zellen bei Raumtemperatur für 20 min, wurden diese mit 1 ml PBS gewaschen, abzentrifugiert und nach Resuspension der Zellen in 200 µl PBS (mit  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  und 1% FCS) in entsprechende Probenröhrchen überführt und mit 5 µl PI-Lösung gefärbt. Die anschließende Messung mit dem *FACScan* wurde - wie auch die vorherigen Arbeitsschritte – ohne direkte Beleuchtung der Proben durchgeführt, um eine Abnahme der Fluoreszenzintensität zu vermeiden. Die Auswertung der Daten erfolgte wieder mit Hilfe des Rechners.

### **3.2.6.3 Zellzyklusanalyse und *sub-G1-peak*-Bestimmung**

Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, eine Zellsuspension im Hinblick auf ihren Zellzyklus bzw. auf Apoptose zu untersuchen. Die theoretische Grundlage bildet die Tatsache, dass das fluoreszierende Propidiumiodid (PI) bei der Inkubation mit den zu untersuchenden Zellen eine DNS-Bindung eingeht. Da nun der Gehalt an DNS pro Zelle vom Zellzyklus derselben abhängt, ist auch die Bindung von PI und damit die Fluoreszenzintensität, welche mit dem *FACScan* bestimmt wird, durch den Zyklus der Zelle bedingt. So findet man bei Zellen, welche sich in der S- oder G2-/M- Phase des Zellzyklus befinden eine höhere durch PI vermittelte Fluoreszenzintensität als bei Zellen der G0-/G1- Phase. Infolgedessen stellt sich eine normal wachsende Zellpopulation mit einem typischen Zellzyklusprofil dar.

Es ist leicht verständlich, dass sich eine Zunahme des Anteils proliferierender Zellen durch einen *Shift* der Zellpopulation von der G0-/G1- Phase hin zur S- und G2-/M-



Phase in einer solchen Darstellung zeigen läßt, was die Bedeutung dieser Methode im Rahmen der Untersuchung von Zellproliferation unterstreicht.

Aber nicht nur Vorgänge der Proliferation, sondern auch die der Apoptose lassen sich mittels dieser Methode quantitativ erfassen. So hat sich gezeigt, dass bei der Untersuchung einer Zellpopulation, welche einen hohen Anteil an apoptotischen Zellen hat, sich die typische Verteilung einer normal wachsenden Zellpopulation dergestalt ändert, dass eine weitere Spitze sichtbar wird, welche als *sub-G1-Peak* bezeichnet wird, und den Anteil der apoptotischen Zellen darstellt, deren DNS durch Caspase-aktivierte Endonukleasen abgebaut wurde. Hierbei ist zu beachten, dass eine Degradierung der DNS typischerweise in späten Phasen der Apoptose auftritt. Durch die Analyse der Zunahme dieses Bereichs kann so auf die Zunahme des Anteils an apoptotischen Zellen geschlossen werden.

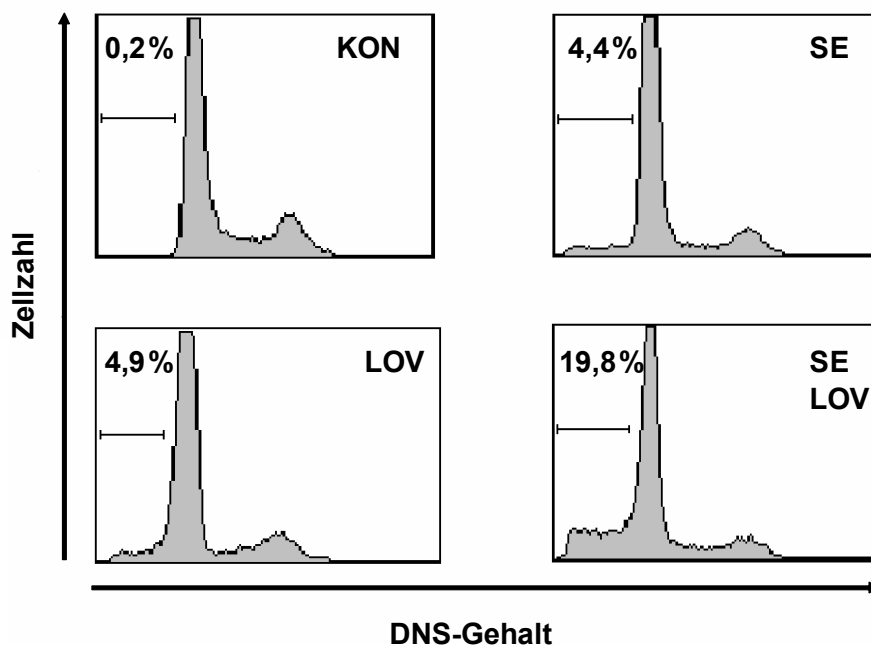
Zur Durchführung einer solchen durchflusszytometrischen Bestimmung wurden die Zellen in T-25 für 48 h kultiviert und für 24 h stimuliert. Danach wurden die Zellen samt Überstand durch Trypsinierung in 50 ml-Röhrchen überführt und nach Zentrifugation (800 g für 8 min) in 500 µl PBS (mit  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) resuspendiert. Um die Zellen zu fixieren, wurde jeder Suspension 5 ml eiskaltes Methanol tröpfchenweise unter Schütteln zugeführt und diese Mischung anschließend für 30 min bei 4°C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation der Suspensionen (1000 g für 5 min) wurden diese zweimal hintereinander mit PBS gewaschen und abzentrifugiert, um das Methanol in den Röhrchen zu entfernen. Im Anschluss an die zweite Zentrifugation wurden die Zellen in je 200 µl PI-Lösung resuspendiert, in die entsprechenden Probenröhrchen überführt und für eine Stunde bei 37°C in Dunkelheit inkubiert. Hinterher konnte die Messung am *FACScan* durchgeführt werden und die Auswertung mit entsprechender Software (*CellQuest*, Becton Dickinson) am Rechner erfolgen.

#### **3.2.6.4 Beispiel einer *sub-G1-peak*-Bestimmung an Hand der Apoptose-induktion durch Serumentzug und Lovastatin**

Als Beispiel für eine *sub-G1-peak*-Bestimmung wird hier die Apoptoseinduktion glatter Gefäßmuskelzellen der Ratte durch abrupten Serumentzug sowie durch Lovastatin dargestellt. Hierfür wurden die Zellen für 48 h kultiviert und für 24 h stimuliert, zum einen durch Vollzug eines abrupten Serumentzuges, wobei das

serumhaltige Medium nach zweimaligen Waschen mit PBS durch ein serumfreies Medium ersetzt wurde, zum anderen durch Lovastatin (40  $\mu$ M). Ferner wurden beide Apoptosestimuli in Kombination zeitgleich angewandt.

Nach durchflusszytometrischer Untersuchung konnte dabei im Vergleich zur Wirkung der einzelnen Stimuli - für Lovastatin ein Anteil apoptotischer Zellen im *sub-G1-peak* von 4,9% an der Gesamtpopulation, für Wachstumsfaktorenentzug ein Anteil von 4,4% - für die simultane Apoptoseinduktion ein synergistischer Effekt bezüglich der Wirkung festgestellt werden, wobei sich der Anteil der Zellen im *sub-G1-peak* auf 19,8% erhöhte (s.Abb. 1).



**Abb. 1. Beispiel einer *sub-G1-peak*-Messung an Hand der Apoptoseinduktion durch zwei unterschiedliche Stimuli.** *Sub-G1-peak*-Messungen als Histogrammplot für die Kontrolle (KON) und die einzelnen Apoptosestimuli „Wachstumsfaktorenentzug“ (SE) und Lovastatin 40  $\mu$ M (LOV) sowie die zeitgleiche Anwendung beider Stimuli (SE LOV) mit synergistischem Effekt.

### 3.2.7 Western Blot

Für den direkten Nachweis von Proteinen wurde in dieser Arbeit der Western Blot benutzt. Dabei wurde versucht, das von den glatten Gefäßmuskelzellen in hoher Zelldichte gebildete FGF-2 sowohl in Proteinextrakten der Zellen als auch im konditionierten Medium – mit und ohne vorheriger Immunpräzipitation – bzw. in den Immunpräzipitaten selbst nachzuweisen.

Für die Gewinnung der Proteinextrakte wurden die Zellen in Petrischalen sowohl in normaler Zelldichte als auch in hoher Zelldichte für 48 h kultiviert. Die Zellen wurden dann trypsinisiert und zentrifugiert (300 g für 5 min). Nach Inkubation der Zellen mit Zellextraktionspuffer [0,5% Triton X-100, 25 mM HEPES (pH 7,6), 300 mM NaCl, 10% Glycerol, 0,2 mM EDTA, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM β-Glycerophosphat, 10 mM p-Nitrophenylphosphat, 0,3 mM Natrium Orthovanadat, 10 mM Benzamidin, 2 mM DTT, 20 µg/ml Aprotinin, 2,5 µg/ml Leupeptin, 1,7 µg/ml Pepstatin] für 30 min auf Eis wurde die Suspension erneut bei 14000 g für 10 min zentrifugiert, um DNS- sowie Membranreste zu entfernen. Anschließend konnte der Gesamtproteingehalt mit dem *Bio-Rad<sub>DC</sub> Protein Assay Kit* bestimmt werden. Zum Auftrennen der Proteine nach ihrem Molekulargewicht mittels Gelelektrophorese wurde 30 µg Protein auf ein 10 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach der Auftrennung wurden diese mittels Elektroblothing auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Membranen wurden anschließend für 2 h bei Raumtemperatur in TBS-Milch blockiert. Über Nacht erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden Primärantikörper (*rabbit-anti-FGF-2*) in einer Verdünnung von 1:1000. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBS-Tween wurde diese mit dem *horseradish peroxidase*-markierten Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:2000 für 45 min inkubiert. Wiederum wurde die Membran dreimal mit TBS-Tween gewaschen und mit *Chemiluminescence Luminol Reagent* für 2 min inkubiert. Nach Exposition, Entwicklung und Fixierung kamen entsprechende Proteinbanden zur Darstellung.

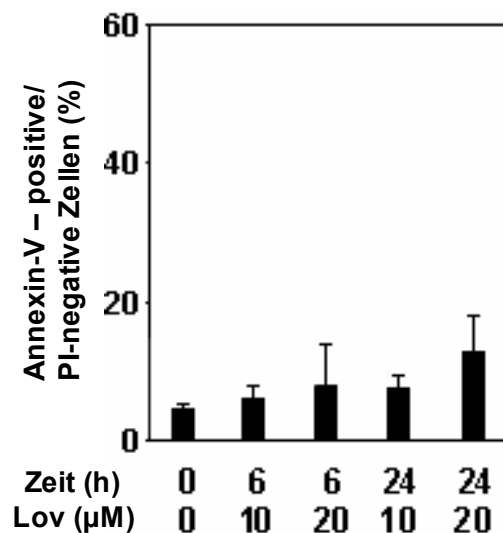
Mit dem konditionierten Medium, den Immunpräzipitaten sowie dem verdünnten rekombinanten humanen FGF-2, welches als Kontrolle diente, wurde entsprechend verfahren.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Apoptoseinduktion bei glatten Gefäßmuskelzellen

#### 4.1.1 Wirkung von Lovastatin auf proliferierende glatte Gefäßmuskelzellen

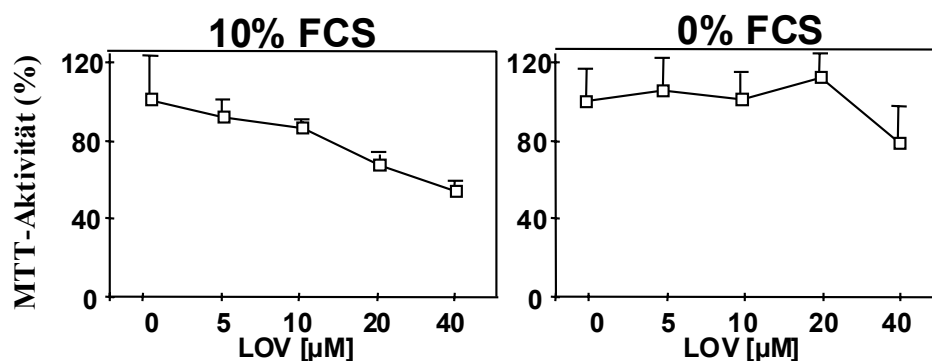
Dass Lovastatin Apoptose in proliferierenden glatten Gefäßmuskelzellen zu induzieren vermag, ist bekannt. Im Rahmen der hier durchgeführten Annexin-V-Färbung ergibt sich für glatte Gefäßmuskelzellen der Ratte, welche in normaler Dichte ( $1 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup>) ausgesät und nach 48 h Inkubation in 10% FCS-haltigem Kulturmedium mit Lovastatin stimuliert wurden, eine Dosis- und Zeitabhängigkeit, welche unter Abb. 2 dargestellt ist.



**Abb. 2. Dosis- und Zeitabhängigkeit bei der Apoptoseinduktion durch Lovastatin bei proliferierenden glatten Gefäßmuskelzellen.** Bestimmung der Annexin-V-positiven/PI-negativen Zellen nach 6 bzw. 24 h Stimulation mit Lovastatin (Lov) 10 oder 20 µM.

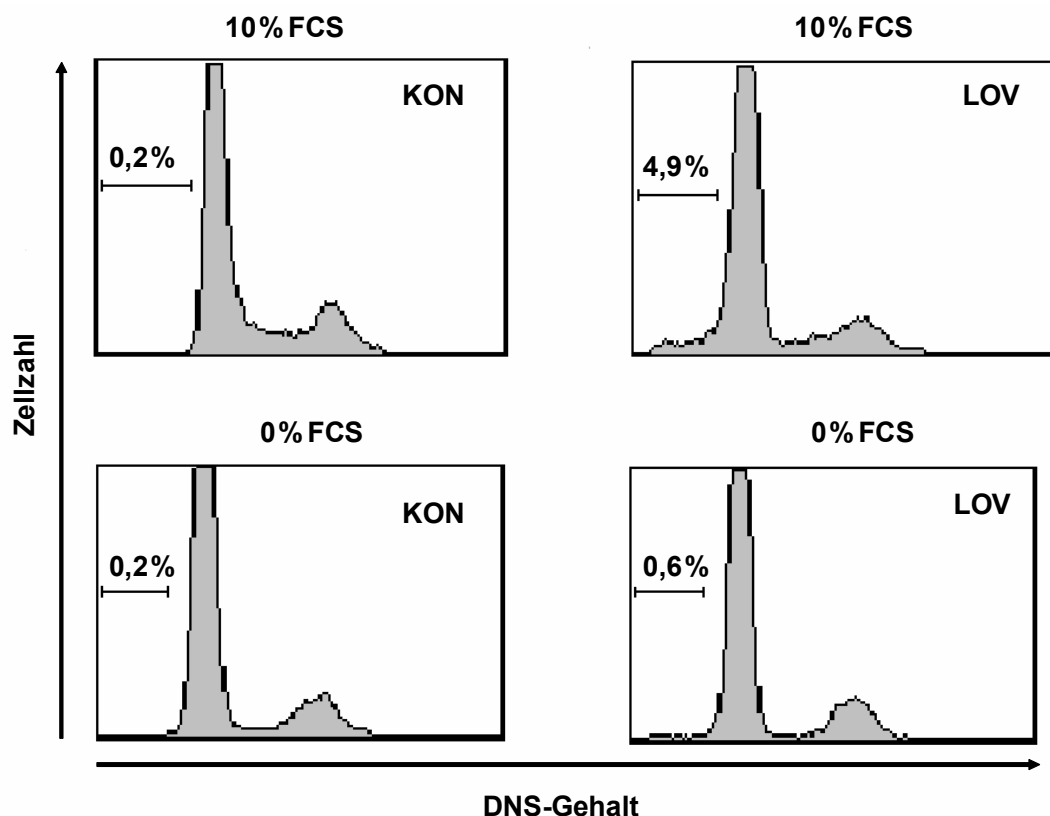
#### 4.1.2 Wirkung von Lovastatin auf nicht proliferierende glatte Gefäßmuskelzellen

Da die apoptoseinduzierende Wirkung von Lovastatin bisher nur bei proliferierenden glatten Gefäßmuskelzellen untersucht wurde, sollte nun dessen Effekt auf nicht proliferierende Zellen getestet und mit der Wirkung auf proliferierende Zellen verglichen werden. Um in der Zellkultur nicht proliferierende Zellen zu erhalten, wurden glatte Gefäßmuskelzellen der Ratte mit einer Zelldichte von  $1 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät, für 48 h inkubiert und anschließend der FCS-Anteil des Kulturmediums nach zweimaligem Waschen mit PBS auf 0,1% reduziert. Nach weiteren 24 h Inkubation wurde auf dieselbe Weise der Serumanteil des Mediums auf 0% verringert und die Zellen für weitere 24 h inkubiert, bevor sie mit Lovastatin (5, 10, 20, 40  $\mu$ M) für 24 h stimuliert wurden. Die Zellen wurden dann einer MTT-Aktivitätsbestimmung unterzogen. Zum Vergleich wurde ebenso eine Messreihe mit in 10% FCS-haltigem Kulturmedium behandelten Zellen durchgeführt. In den mit serumhaltigen Medium behandelten Zellen ergab sich entsprechend der ansteigenden Konzentrationen von Lovastatin eine beständige Abnahme der MTT-Aktivität. Bei der maximalen Konzentration von 40  $\mu$ M ergab sich im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine Reduktion der MTT-Aktivität von  $47,5 \pm 4,8\%$  (n=4) (s. Abb.3). Zellen, welche in serumfreiem Medium mit Lovastatin behandelt wurden, waren jedoch deutlich resistenter bezüglich des Apoptosestimulus. Hier zeigte sich lediglich bei der Behandlung mit der höchsten Dosis des Statins (40  $\mu$ M) eine Abnahme der MTT-Aktivität um  $21,3 \pm 19,3\%$  (n=4) (s. Abb. 3).



**Abb. 3. Effekt von Lovastatin unter serumhaltigen (10% FCS) und unter serumfreien (0% FCS) Bedingungen auf glatte Gefäßmuskelzellen.** Bestimmung der MTT-Aktivität der mit Lovastatin in verschiedenen Dosen für 24 h stimulierten Zellen in Prozent im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (n=4).

Auch im Rahmen einer durchgeführten *sub-G1-peak*-Messung der so behandelten Zellen zeigte sich ein entsprechender Effekt. Hierbei nahm der Anteil der Zellen im *sub-G1-peak* unter serumhaltigen Bedingungen zu von 0,2% in der unbehandelten Kontrolle auf 4,9% in den mit Lovastatin (40  $\mu$ M) behandelten Zellen (s. Abb. 4). Unter serumfreien Bedingungen kam es zu einer deutlich geringeren Zunahme des Anteils der Zellen im *sub-G1-peak* von 0,2% in der Kontrolle auf nur 0,6% in den mit Lovastatin (40  $\mu$ M) stimulierten Zellen.

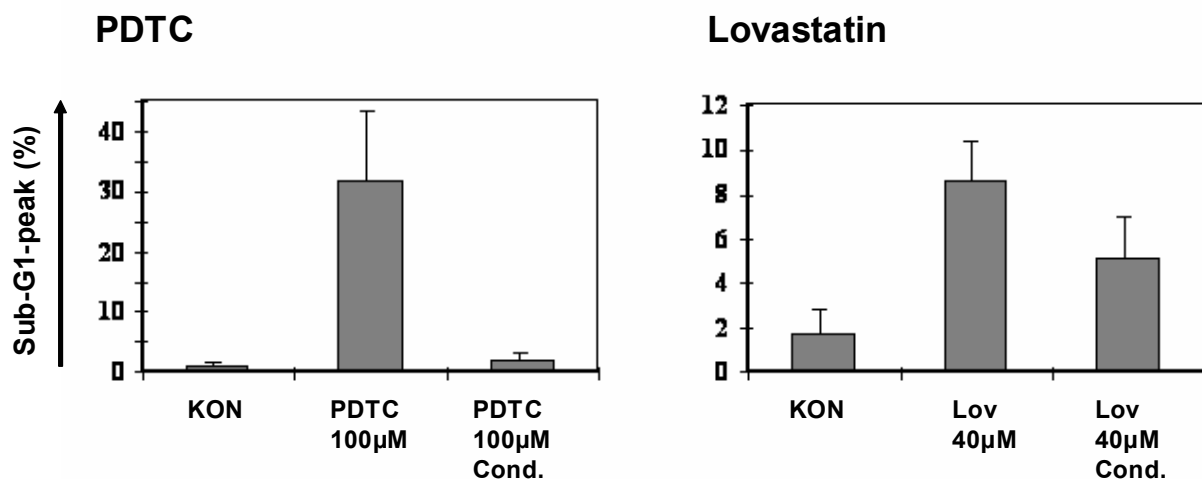


**Abb. 4. Verminderte Potenz des Apoptosestimulus Lovastatin bei nicht proliferierenden glatten Gefäßmuskelzellen. Sub-G1-peak-Messung** als Histogrammplots für die Kontrolle (KON) und die für 24 h mit Lovastatin 40  $\mu$ M (LOV) behandelten Zellen unter serumhaltigen (10% FCS) und serumfreien (0% FCS) Bedingungen.

## 4.2 Zelldichte als Faktor der Apoptosesensitivität

### 4.2.1 Wirkung von serumhaltigem konditioniertem Medium auf glatte Gefäßmuskelzellen bei der Apoptoseinduktion

Glatte Gefäßmuskelzellen zeigen eine dichteabhängige Apoptoseempfindlichkeit. Je höher die Zelldichte dieser Zellen ist, um so geringer ist die Apoptoseempfindlichkeit der Zellen (15). Ob es sich hierbei um einen von den Zellen selbst gebildeten Faktor handelt, der – wie bei Endothelzellen gezeigt (31) – im Extrazellulärraum nachweisbar ist, sollte durch folgende Versuchsreihe eruiert werden: Es wurden glatte Gefäßmuskelzellen der Ratte in normaler Dichte ( $1 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup>) ausgesät und für 48 h inkubiert. Das Kulturmedium wurde entfernt und nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde serumhaltiges konditioniertes Medium hinzugegeben. Die Zellen wurden anschließend mit PDTC (100  $\mu$ M) oder Lovastatin (40  $\mu$ M) für 24 h stimuliert. Es erfolgte die Färbung der Zellen mit PI und die Bestimmung des *sub-G1-peaks* mittels Durchflusszytometrie. Zum Vergleich wurden unstimulierte und stimulierte Zellen herangezogen, welche mit konventionellem serumhaltigem Medium behandelt wurden (s. Abb. 5).

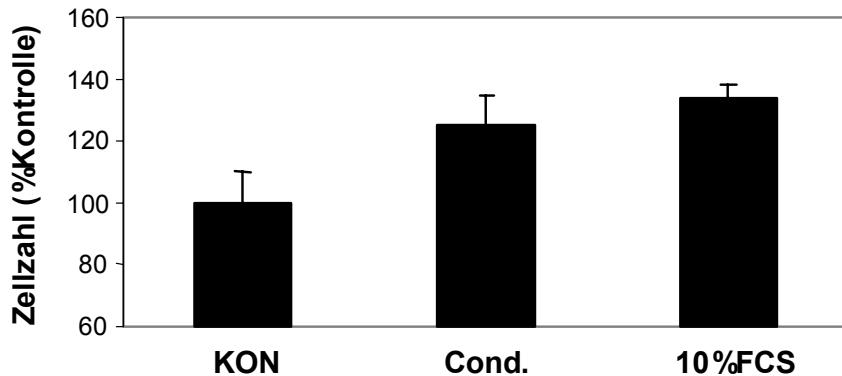


**Abb. 5. Einfluss von serumhaltigem konditioniertem Kulturmedium auf die Apoptosestimulation.** *Sub-G1-peak*-Bestimmung glatter Gefäßmuskelzellen, welche in konditioniertem serumhaltigem Medium (Cond.) mit PDTC 100  $\mu$ M bzw. Lovastatin 40  $\mu$ M (Lov) für 24 h stimuliert wurden. Als Kontrolle dienten Zellen, welche in konventionellem serumhaltigem Medium nicht stimuliert wurden (KON) bzw. in gleicher Weise stimuliert wurden.

#### **4.2.2 Wirkung von serumfrei konditioniertem Medium auf glatte Gefäßmuskelzellen**

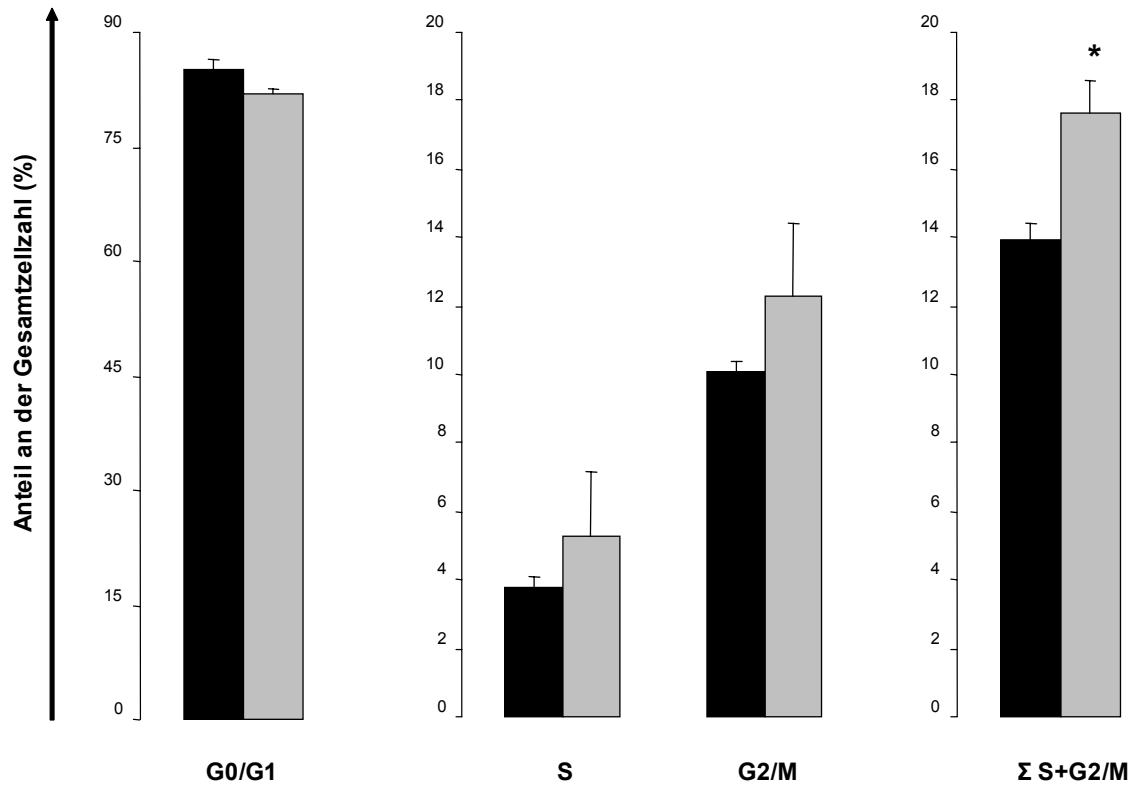
Um die Wirkung von serumfrei konditioniertem Medium auf glatte Gefäßmuskelzellen der Ratte zu untersuchen, wurden diese in T-25 in normaler Dichte ( $1 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup>) ausgesät und für 48 h inkubiert. Damit eventuelle Wirkungen des konditionierten Mediums auf das Proliferationsverhalten der Zellen möglichst genau untersucht werden konnten, sollten die Zellen aus der Proliferations- in die Ruhephase überführt werden. Dies wurde erreicht, indem den Zellen nach 48 h Inkubation der FCS-Anteil des Kulturmediums nach zweimaligem Waschen mit PBS auf 0,1% reduziert wurde und nach weiteren 24 h Inkubation auf dieselbe Weise der Serumanteil des Mediums auf 0% verringert wurde. Diesen nicht proliferierenden Zellen wurde dann nach weiteren 24 h Inkubation sowie zweimaligem Waschvorgang mit PBS das serumfreie konditionierte Medium zur Kultur gegeben. Die Wirkung dieses Mediums auf die glatten Gefäßmuskelzellen wurde nach 24 h Inkubation mit Hilfe der Zellzahlbestimmung unter dem Lichtmikroskop und der Zellzyklusanalyse mittels Durchflusszytometrie untersucht. Zur Kontrolle dienten jeweils Zellen, die mit serumfreien nicht konditioniertem Medium behandelt wurden, und als positive Proliferationskontrolle solche, die mit normalen 10% FCS-haltigen Kulturmedium behandelt wurden. Hierbei ließ sich bei der Zählung der Zellzahl ein Anstieg auf  $125 \pm 10\%$  ( $n=7$ , SEM) (serumfrei konditioniertes Medium) im Vergleich zur nicht stimulierten Kontrolle (normales serumfreies Medium) zeigen ( $100 \pm 10\%$ ;  $n=7$ , SEM). Bei der Stimulation mit 10% FCS-haltigen Kulturmedium kam es zu einer Erhöhung der Zellzahl auf  $134 \pm 4\%$  ( $n=7$ , SEM) (s. Abb. 6).





**Abb. 6. Wirkung von serumfrei konditioniertem Medium auf die Zellzahl von primär nicht proliferierenden glatten Gefäßmuskelzellen.** Darstellung der mit serumfreiem konditioniertem Medium für 24 h behandelten Zellen (Cond.) im Vergleich zu der mit normalem Medium behandelten Kontrolle (KON) und der mit 10% FCS im Kulturmedium behandelten Zellen (10% FCS).

Auch bei der Zellzyklusmessung konnte dieser Effekt der Proliferationsinduktion durch serumfrei konditioniertes Medium auf die glatten Gefäßmuskelzellen nachgewiesen werden, wobei sich hier ein deutlicher Übergang der Zellpopulation von der G<sub>0</sub>-/G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus hin zur S- bzw. G<sub>2</sub>-/M-Phase im Vergleich zur Kontrolle zeigte (s. Abb. 7). So befanden sich in der Kontrolle 84,9±1,6% der Zellpopulation in der G<sub>0</sub>-/G<sub>1</sub>-Phase gegenüber 81,9±0,8% bei den mit serumfrei konditioniertem Medium behandelten Zellen (n=3). Bei den Zellen in der S-Phase nahm der Anteil von 3,8±0,3% (Kontrolle) auf 5,3±1,9% zu (serumfrei konditioniertes Medium). Auch in der G<sub>2</sub>-/M-Phase nahm der Anteil der Zellen von 10,1±0,3% (Kontrolle) auf 12,3±2,1% zu (serumfrei konditioniertes Medium). Dabei konnte ein signifikanter Unterschied ermittelt werden zwischen der Kontrolle mit 13,9±0,5% (n=3) und den mit konditioniertem Medium behandelten Zellen mit 17,6±1% bezüglich des Anteils der Zellen, welche sich insgesamt in der Proliferationsphase befinden (S- und G<sub>2</sub>/M-Phase; p<0,005, ungepaarter T-Test).



**Abb. 7. Wirkung von serumfrei konditioniertem Medium auf den Zellzyklus.** Darstellung von durchflusszytometrischen Zellzyklusbestimmungen mittels PI-Färbung (n=3). Im Vergleich zur Kontrolle (schwarz) zeigt sich in den mit serumfrei konditioniertem Medium behandelten Zellen (grau) ein deutlicher *Shift* von der G0-/G1-Phase hin zur S- bzw. G2/M-Phase als Ausdruck des vermehrten Proliferationsverhaltens dieser Zellen (\* p<0,005, ungepaarter T-Test).

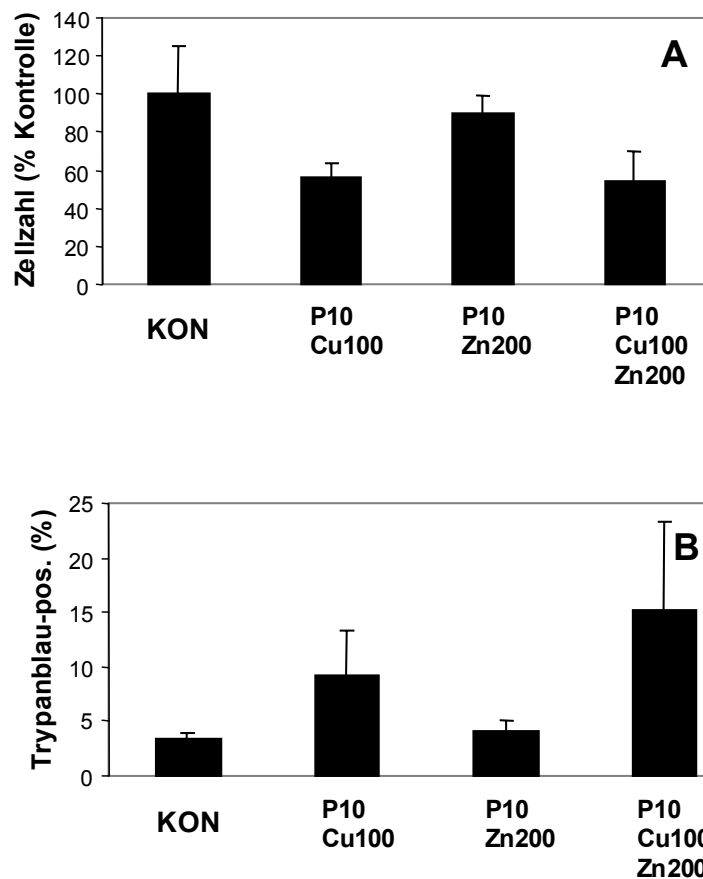
### **4.2.3 Wirkung von serumfrei konditioniertem Medium bei der Apoptose-induktion durch PDTC**

Um neben dem gezeigten proliferationsinduzierenden Effekt des serumfrei konditionierten Mediums auch einen eventuell vorhandenen antiapoptotischen - wie für serumhaltiges Medium bereits bestätigt - nachzuweisen, dienten die nachfolgenden Experimente. Dabei wurde als Apoptosestimulus PDTC in Kombination mit Kupfer- oder Zinkionen ausgewählt, da dessen Wirkung im serumfreien Medium - gerade bei glatten Gefäßmuskelzellen - schon genau untersucht worden ist (15) und so bekannte wirksame Konzentrationen für die Versuche gewählt werden konnten. Entsprechend der Dosis-Wirkungs-Verhältnisse bei glatten Gefäßmuskelzellen und der Apoptosestimulation durch PDTC in serumfreiem Medium in Kombination mit Kupfer- und Zinkionen wurden für PDTC 10  $\mu\text{M}$ , für die Kupferionen 100 nM und für die Zinkionen 200 nM als Konzentrationen verwendet.

#### **4.2.3.1 Wirkung von PDTC in serumfreiem Medium**

Zunächst sollte in Vorversuchen die Wirkung von PDTC unter spezifischen serumfreien Bedingungen im Rahmen von Zellzahlbestimmungen mit Trypanblaufärbung nachvollzogen werden, bevor es für die Experimente mit serumfrei konditioniertem Medium verwendet wurde. Dazu wurden glatte Gefäßmuskelzellen der Ratte in normlar Zelldichte ( $1 \times 10^4$  Zellen/ $\text{cm}^2$ ) ausgesät und nach 48 h Inkubation ein Mediumwechsel auf 0,1% FCS-haltiges Kulturmedium durchgeführt. Nach weiteren 24 h Inkubation wurden die Zellen dann mit PDTC (10  $\mu\text{M}$ ), Kupfer (100 nM) oder Zink (200 nM) in serumfreiem Medium für 24 h stimuliert und der Effekt durch Zellzahlbestimmung und Trypanblaufärbung verifiziert. Hierbei bewirkte die Kombination von PDTC mit Kupfer eine Reduktion der Zellzahl auf  $56,1 \pm 7,3\%$  im Vergleich zur Kontrolle ( $n=5$ ) bzw. einen Anstieg der Trypanblau-positiven Zellen von  $3,4 \pm 0,5\%$  in der Kontrolle auf  $9,2 \pm 4,1\%$  (s. Abb. 8). Weniger effektiv war die Kombination von PDTC mit Zink, bei der sich die Zellzahl auf  $89,9 \pm 9,2\%$  im Vergleich zur Kontrolle reduzierte und sich die Trypanblau-positiven Zellen von  $3,4 \pm 0,5\%$  (Kontrolle) auf lediglich  $4,2 \pm 0,9\%$  erhöhte. Bei der Kombination von PDTC mit Kupfer und Zink zeigte sich bei der Zellzahl eine nahezu gleiche Reduktion wie bei der vorherigen PDTC-Kupfer-Kombination auf  $54,4 \pm 15,4\%$  im Vergleich zur Kontrolle. Jedoch fiel im Vergleich dazu die Rate Trypanblau-positiver

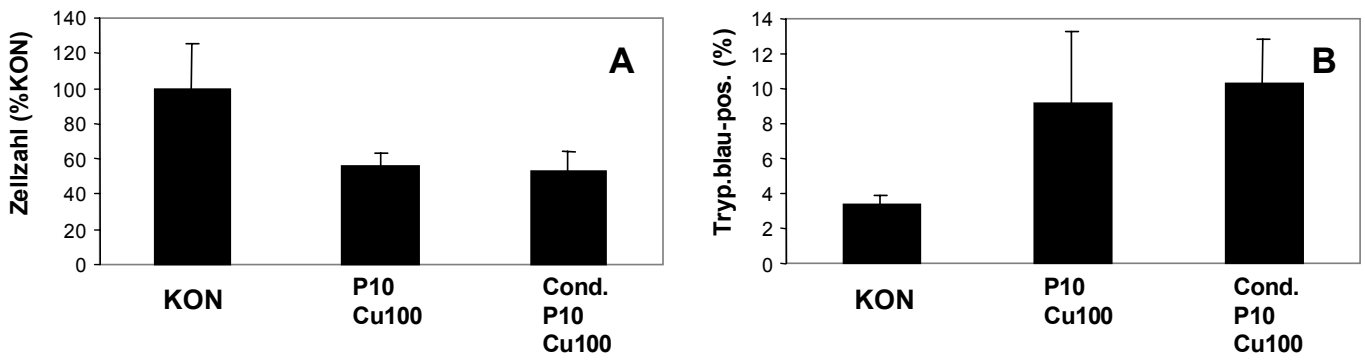
Zellen höher aus, welche sich hier auf  $15,3 \pm 8\%$  erhöhten. PDTC, Kupfer oder Zink allein hatten unter diesen serumfreien Versuchsbedingungen keinen Einfluß auf Zellzahl bzw. Zelltod (nicht abgebildet).



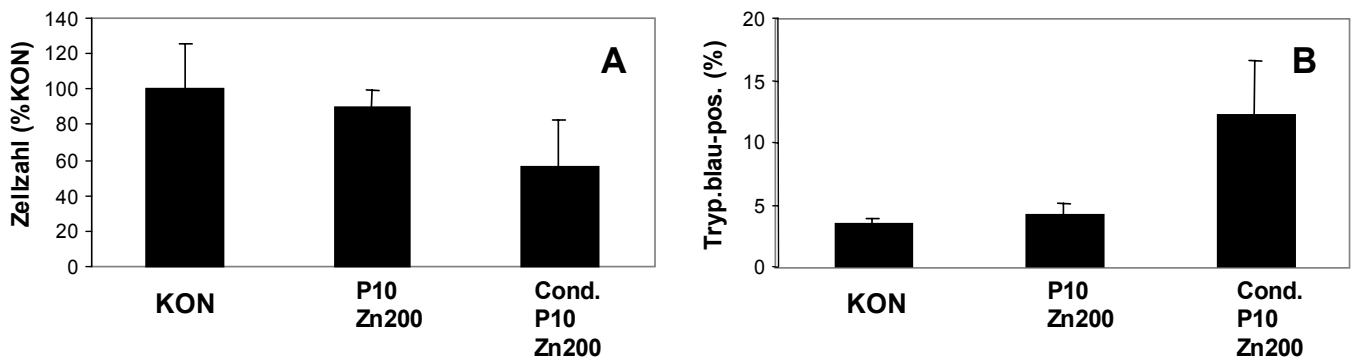
**Abb. 8. Effekt von PDTC 10  $\mu$ M (P10) in Kombination mit Kupfer 100 nM (Cu100) und Zink 200 nM (Zn200) für 24 h auf die Zellzahl (A) sowie auf die Anzahl Trypanblau-positiver glatter Gefäßmuskelzellen (B) in serumfreiem Medium. Darstellung der Zellzahl jeweils im Vergleich zur Kontrolle (KON) in Prozent bzw. des Anteils der Trypanblau-positiven Zellen an der Gesamtzellzahl in Prozent.**

#### **4.2.3.2 Untersuchung von serumfrei konditioniertem Medium bei der Induktion von Apoptose durch PDTC**

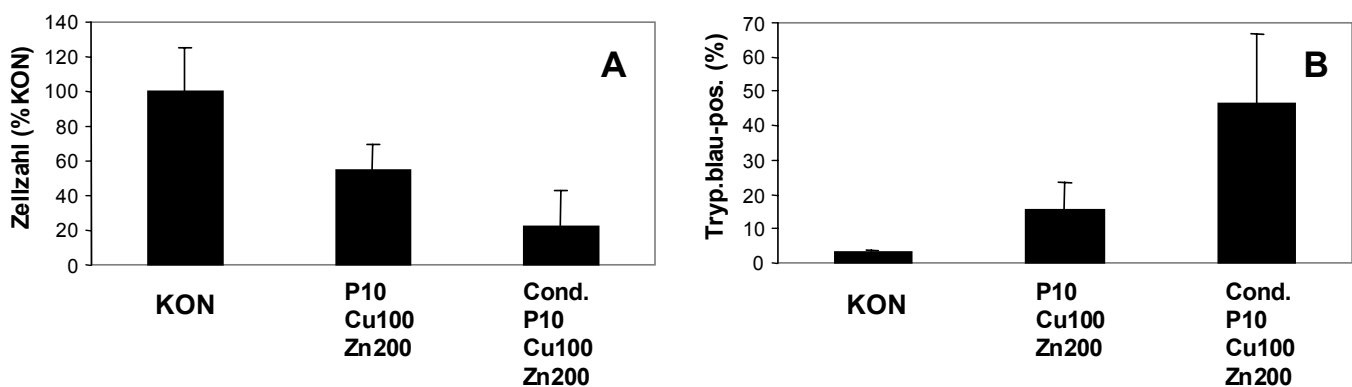
Im Weiteren sollte nun untersucht werden, ob sich neben dem gezeigten proliferationsinduzierenden Effekt des serumfrei konditionierten Mediums auch eine antiapoptotische Wirkung feststellen läßt. Hierbei wurde bei Vorversuchen geklärt, dass PDTC ohne Kupfer und Zink oder die Metallionen für sich bei der Anwendung von serumfrei konditioniertem Medium keinen Einfluß auf Zellzahl oder Zelltod hat (nicht abgebildet). Für die Versuche wurden glatte Gefäßmuskelzellen der Ratte in normaler Zelldichte ( $1 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup>) ausgesät und für 48 h inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, bevor diese für weitere 24 h in nun 0,1% FCS-haltigen Kulturmedium inkubiert wurden. Anschließend erfolgte die Stimulation der Zellen mit PDTC (10 µM) mit oder ohne Kupfer- (100 nM) bzw. Zinkionen (200 nM) für 24 h in serumfrei konditioniertem Medium bzw. zur Kontrolle in normalem serumfreiem Medium (s. Abb. 9 bis 11). Dabei konnte bei der nachfolgenden Bestimmung der Zellzahl bzw. Trypanblau-Färbung für keine der Kombinationen von Kupfer oder Zink mit PDTC eine protektive Wirkung bezüglich der Apoptoseinduktion von serumfrei konditioniertem Medium nachgewiesen werden. Für die Kombination PDTC mit Zink ließ sich eine Verringerung der Zahl lebender Zellen bei serumfrei konditioniertem Medium nachweisen (s. Abb. 10). Dieses Ergebnis wurde durch die Bestimmung der Trypanblau-positiven Zellen bestätigt. So kann angenommen werden, dass das serumfrei konditionierte Medium in dieser Konstellation einen eher proapoptotischen Effekt zeigt. Ein ähnliches Bild zeigte sich auch bei der Stimulation der Zellen durch die Kombination PDTC mit Kupfer und Zink (s. Abb. 11). Kein Effekt zeigte sich bei der Kombination von PDTC mit Kupferionen (s. Abb. 9). Hier nahm die Zellzahl im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle nicht ab. Auch die Zahl Trypanblau-positiver Zellen blieb unverändert.



**Abb. 9.** Effekt von serumfrei konditioniertem Medium (Cond.) bei der Apoptosestimulation durch PDTC 10  $\mu$ M (P10) in Kombination mit Kupfer 100 nM (Cu100) für 24 h. Darstellung der Zellzahl (A) im Vergleich zur Kontrolle (KON) in Prozent bzw. des Anteils Trypanblau-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl in Prozent (B).



**Abb. 10.** Effekt von serumfrei konditioniertem Medium (Cond.) bei der Apoptosestimulation durch PDTC 10  $\mu$ M (P10) in Kombination mit Zink 200 nM (Zn200) für 24 h. Darstellung der Zellzahl (A) im Vergleich zur Kontrolle (KON) in Prozent bzw. des Anteils Trypanblau-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl in Prozent (B).



**Abb. 11.** Effekt von serumfrei konditioniertem Medium (Cond.) bei der Apoptosestimulation durch PDTC 10  $\mu$ M (P10) in Kombination mit Kupfer 100 nM (Cu100) und Zink 200 nM (Zn200) für 24 h. Darstellung der Zellzahl (A) im Vergleich zur Kontrolle (KON) in Prozent bzw. des Anteils Trypanblau-positiver Zellen an der Gesamtzellzahl in Prozent (B).

#### **4.2.3.3 Wirkung des serumfrei konditionierten Mediums mit Zusatz von Albumin als Trägerprotein**

Da sich für serumfrei konditioniertes Medium also zunächst kein antiapoptotischer Effekt nachweisen ließ - ganz im Gegensatz zu serumhaltigem Medium - , sollte nun untersucht werden, ob serumfrei konditioniertes Medium unter Zusatz von 1% Albumin einen antiapoptotischen Effekt entwickelt. Dadurch sollte erreicht werden, dass der Zellkultur unter serumfreien Bedingungen durch die Zugabe von Albumin ein Transportprotein zur Verfügung steht, das einen von den Zellen produzierten antiapoptotischen Faktor in den Extrazellulärraum und damit in das konditionierte Medium überführen könnte. Somit ließe sich auch erklären, dass serumhaltiges - und damit proteinreiches - konditioniertes Medium einen antiapoptotischen Effekt zeigt und serumfreies Medium nicht.

Für diesen Zweck wurde dem serumfreien Medium vor Konditionierung 1% Albumin zugefügt, bevor es wie üblich nach 48 h Inkubation gewonnen wurde. Bei Voruntersuchungen wurde dabei zunächst festgestellt, daß Albumin selbst sowohl bei glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte als auch bei humanen Zellen keinen Einfluß auf die Zellvitalität hat, weder in normalen noch in serumfreien Medium, und somit für die Untersuchung von Apoptose in der Zellkultur verwendet werden kann.

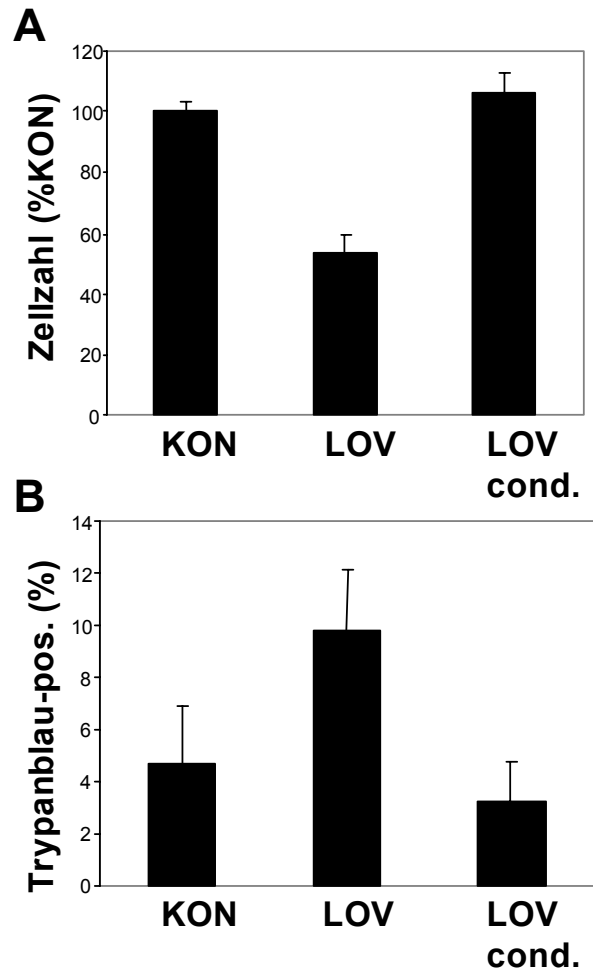
Auch für diese Untersuchung sollten glatte Gefäßmuskelzellen der Ratte zur Apoptoseinduktion mit PDTC in Kombination mit Kupfer- oder Zinkionen stimuliert werden. Während der Behandlung der Zellen ließ sich jedoch mit Hilfe des Lichtmikroskops feststellen, dass diese im Gegensatz zu den vorherigen Untersuchungen bei der Stimulation mit PDTC in Kombination mit Kupfer- oder Zinkionen unter dem zusätzlichen Einfluß von Albumin fast vollständig abstarben. Somit ließ sich auch unter diesen Bedingungen kein antiapoptotischer Effekt des serumfrei konditionierten Mediums zeigen.

#### **4.2.4 Wirkung von serumfrei konditioniertem Medium bei der Apoptose-induktion durch Lovastatin**

Da also bei der Apoptoseinduktion durch PDTC kein antiapoptotischer Effekt des serumfrei konditionierten Mediums nachgewiesen werden konnte, sollte im weiteren Verlauf noch eine andere Substanz zur Apoptoseinduktion verwendet werden, um auszuschließen, dass der beobachtete proapoptotische Effekt bei der Verwendung von serumfrei konditionierten Medium (mit 1% Albumin-Anteil) PDTC-spezifisch ist. Deshalb wurde nun Lovastatin in einer Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  zur Apoptoseinduktion verwendet.

Es wurden humane glatte Gefäßmuskelzellen in normaler Dichte ( $0,4 \times 10^4$  Zellen/ $\text{cm}^2$ ) ausgesät, für 48 h inkubiert, mit Lovastatin (20  $\mu\text{M}$ ) für 24 h stimuliert und danach mittels Bestimmung der Zellzahl und Trypanblau-Färbung untersucht. Dabei wurde der Unterschied zwischen normalem serumfreiem Medium und serumfrei konditioniertem Medium (mit Zusatz von 1% Albumin) bei der Apoptoseinduktion durch Lovastatin ermittelt. Als Kontrolle dienten Zellen, welche nur mit serumfreiem Medium ohne Apoptosestimulus behandelt wurden. Hierbei stellte sich heraus, dass sich durch Behandlung mit serumfrei konditioniertem Medium eine Lovastatin-vermittelte Abnahme der Zellzahl verhindern ließ (s. Abb. 12). So lag die Zellzahl bei den Zellen, welche ohne konditioniertes serumfreies Medium stimuliert wurden, bei  $53,6 \pm 5,7\%$  und diejenige der mit serumfrei konditioniertem Medium stimulierten Zellen bei  $106,2 \pm 6,6\%$  im Vergleich zur Kontrolle ( $n=3$ ). Auch der Anstieg an Trypanblau-positiven Zellen konnte durch Behandlung mit serumfrei konditioniertem Medium verhindert werden. Hier lag der Anteil der Trypanblau-positiven Zellen bei den mit normalem serumfreiem Medium stimulierten Zellen bei  $9,8 \pm 2,3\%$  im Vergleich zu  $3,0 \pm 1,5\%$  bei den mit serumfrei konditioniertem Medium behandelten Zellen ( $n=3$ ) (s. Abb. 12).



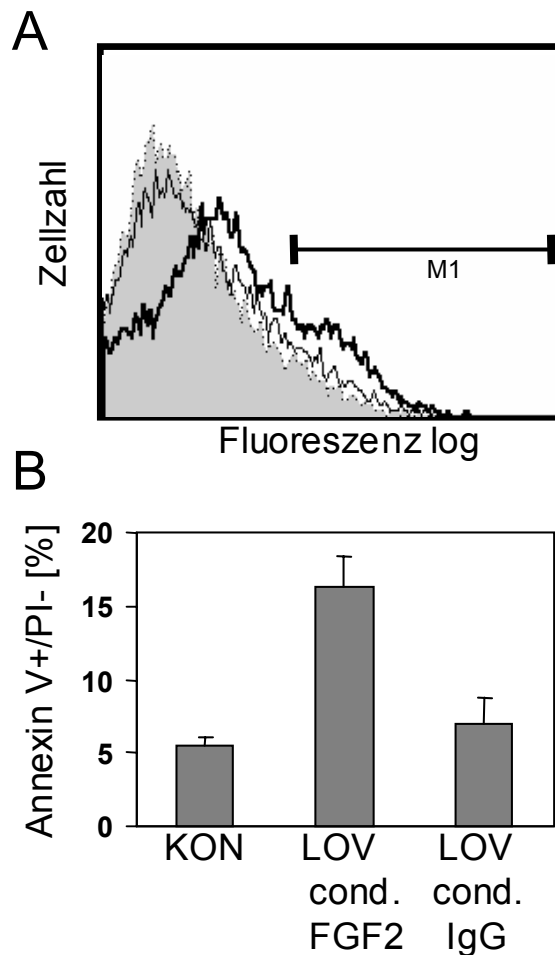


**Abb. 12. Effekt von serumfrei konditioniertem Medium bei der Apoptosestimulation mit Lovastatin (20  $\mu$ M) bei humanen glatten Gefäßmuskelzellen.** Bestimmung von Zellzahl (A) und Trypanblau-positiven Zellen (B) nach Apoptosestimulation mit Lovastatin (20  $\mu$ M) für 24 h bei normalem serumfreiem Medium (LOV) und bei konditioniertem serumfreiem Medium (LOVcond.), jeweils mit einem Anteil von 1% Albumin (n=3).

## **4.2.5 FGF-2 als Faktor der Apoptoseprotektion in serumfrei konditioniertem Medium**

### **4.2.5.1 Nachweis der Aktivität von FGF-2 mittels Immunpräzipitation**

Um einen eventuell für den protektiven Effekt des konditionierten serumfreien Mediums verantwortlichen Faktor zu finden, wurde das serumfrei konditionierte Medium mit Hilfe der Immunpräzipitation untersucht. Für die Versuchsreihe wurden humane glatte Gefäßmuskelzellen in normaler Dichte ( $0,4 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup>) ausgesät und nach 48 h Inkubation mit Lovastatin (20  $\mu$ M) stimuliert, wobei nun immunpräzipitiertes serumfrei konditioniertes Medium (mit 1% Albuminanteil) verwendet wurde. Dabei wurden die Zellen mittels Annexin-V-Färbung durchflusszytometrisch untersucht. In Zellen, welche nur mit serumfrei konditioniertem Medium stimuliert wurden, lag der Anteil Annexin-V-positiver/PI-negativer Zellen bei  $5,5 \pm 0,6\%$  (Abb. 13). Im mit *mouse-IgG1*-Kontroll-Antikörpern immunpräzipitierten konditionierten Medium stieg nach Lovastatin-Behandlung der Anteil Annexin-V-positiver/PI-negativer Zellen auf nur  $6,9 \pm 1,8\%$  an. Bei Behandlung von konditioniertem Medium mit FGF-2-Antikörpern und anschließender Stimulation der Zellen mit Lovastatin in diesem Medium stieg der Anteil Annexin-V-positiver/PI-negativer Zellen auf  $16,3 \pm 2,0\%$ . Somit kann gefolgert werden, dass für den antiapoptotischen Effekt des serumfrei konditionierten Mediums FGF-2 mitverantwortlich ist.

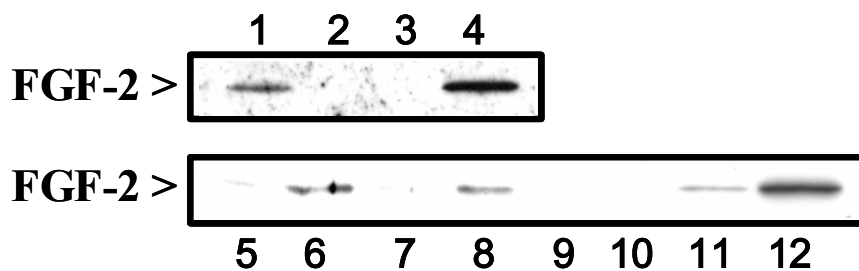


**Abb. 13. Einfluss der FGF-2-Immunpräzipitation auf das antiapoptotische Verhalten von serumfrei konditioniertem Medium im Rahmen der Apoptoseinduktion mit Lovastatin (20 $\mu$ M) bei humanen glatten Gefäßmuskelzellen.** Anzahl der Annexin-V-positiven/PI-negativen Zellen nach Apoptosestimulation mit serumfrei konditioniertem Medium, das mit Anti-FGF-2-Antikörper (A: dicke schwarze Linie, B: FGF2) immunpräzipitiert wurde, im Vergleich zu mit *mouse-IgG1*-Antikörper (A: dünne schwarze Linie, B: IgG) immunpräzipitierten Medium in Prozent. Abbildung als Histogrammplot (A) und als Balkendiagramm (n=3) (B), jeweils im Vergleich zur Kontrolle (A: graue Fläche, B: KON).

*Mouse-IgG1*-Antikörper, FGF-2-Antikörper und die zur Immunpräzipitation verwendeten *Agarose beads* allein hatten jeweils keinen Effekt auf die Zellvitalität, so dass der beobachtete Effekt eindeutig durch eine neutralisierende Wirkung des immunpräzipitierten FGF-2 zustande kam. Die antiapoptotische Potenz von serumfrei konditioniertem Medium konnte durch Immunpräzipitation mit FGF-2-Antikörpern aufgehoben werden und damit eine antiapoptotische Aktivität von FGF-2 im serumfrei konditionierten Medium gezeigt werden.

#### 4.2.5.2 Nachweis von FGF-2 durch Western Blot

Im Western Blot ließ sich die Bildung von FGF-2 durch in hoher Dichte kultivierte glatte Gefäßmuskelzellen bestätigen. So konnte FGF-2 einerseits in den gewonnenen Proteinextrakten von glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte sowie des Menschen – jeweils in hoher Dichte kultiviert - nachgewiesen werden. Als Antikörper diente dabei *rabbit-anti-FGF-2*-Antikörper, welcher in der Lage ist, sowohl FGF-2 der Ratte als auch humanes FGF-2 zu detektieren. Andererseits ließ sich auch in den Immunpräzipitaten des serumfrei konditionierten Mediums FGF-2 nachweisen. Im Gegensatz dazu ließ sich im konditionierten Medium allein sowie in der Kontrollgruppe der mit *mouse-IgG1*-Antikörper behandelten Immunpräzipitate FGF-2 nicht nachweisen (s. Abb. 14). Als Kontrolle diente rekombinantes humanes FGF-2, welches in drei verschiedenen Konzentrationen aufgetragen wurde (0,01 µg/ml, 0,1 µg/ml sowie 1,0 µg/ml), um FGF-2 eindeutig nachzuweisen und die Konzentration in den Proben abzuschätzen.



**Abb. 14. Nachweis von FGF-2 mittels Western Blot.** 1: Zellextrakt glatter Gefäßmuskelzellen der Ratte hoher Dichte. 2: Serumfrei konditioniertes Medium glatter Gefäßmuskelzellen der Ratte. 3: Serumfrei konditioniertes Medium humaner Zellen. 4: Zellextrakt humaner Zellen hoher Dichte. 5: IgG-Immünpräzipitat von serumfrei konditioniertem Medium humaner Zellen. 6: Anti-FGF-2-Immünpräzipitat von serumfrei konditioniertem Medium humaner Zellen. 7: wie 5. 8: wie 6. 9: rhFGF-2 0 µg/ml. 10: rhFGF-2 0,01 µg/ml. 11: rhFGF-2 0,1 µg/ml. 12: rh-FGF-2 1,0 µg/ml.

## **5 Diskussion**

### **5.1 Zellspezifische Apoptosestimuli**

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass sowohl PDTC als auch Lovastatin bei glatten Gefäßmuskelzellen Apoptose verursacht (56,22). Beide Substanzen wurden im Rahmen dieser Experimente zur Apoptoseinduktion eingesetzt.

Da die apoptoseinduzierende Wirkung von Lovastatin bisher nur an proliferierenden glatten Gefäßmuskelzellen gezeigt wurde, sollte untersucht werden, ob diese Substanz auch bei nicht proliferierenden glatten Gefäßmuskelzellen Apoptose zu induzieren vermag.

So konnte hier im Rahmen von Untersuchungen mittels Trypanblau-Färbung und Durchflusszytometrie gezeigt werden, dass sich nicht proliferierende glatte Gefäßmuskelzellen der Ratte bei der Apoptoseinduktion mittels Lovastatin deutlich resistenter zeigen als proliferierende Zellen.

Dass die Cholesterinbiosynthese beim Membranaufbau von Zellen eine wichtige Rolle spielt, ist bekannt. Da durch Statine wie Lovastatin die Cholesterinbiosynthese durch Hemmung des Schlüsselenzyms HMG-CoA-Reduktase, welches die Umwandlung von 3-Hydroxy-Methyl-Glutarylsäure in die Cholesterinvorstufe Mevalonsäure katalysiert, vermindert wird, ist durchaus vorstellbar, dass proliferierende Zellen, welche bei der Zellteilung auf Cholesterinbausteine zum Membranaufbau angewiesen sind, sensitiver gegenüber der Apoptosestimulation durch Lovastatin reagieren als ruhende Zellen. Es ist durchaus möglich, dass auch andere Apoptosestimuli ihre Wirkung in Abhängigkeit des Proliferationsstatus einer Zelle entfalten. So sollte bei Untersuchungen bezüglich Apoptose stets berücksichtigt werden, ob die Zellen in der Wachstums- oder Ruhephase stimuliert wurden.

Bei den hier durchgeführten Experimenten wurden nicht proliferierende glatte Gefäßmuskelzellen gewonnen, indem den proliferierenden Zellen schrittweise das Serum entzogen wurde. Dadurch konnte in der Kultur, wie sich unter dem Lichtmikroskop feststellen ließ, ein Absterben der Zellen verhindert werden, so dass der Wachstumsfaktorenentzug unter diesen Bedingungen - im Gegensatz zum abrupten Serumentzug, der bekanntlich Apoptose induziert (5) - keinen wesentlichen Apoptosestimulus darstellt.

Im Rahmen anderer Arbeiten unseres Labors konnte ferner unter Anwendung von Co-Kulturen gezeigt werden, dass proliferierende glatte Gefäßmuskelzellen der Neointima eine höhere Sensitivität bezüglich der Apoptoseinduktion durch Lovastatin aufweisen als nicht proliferierende glatte Gefäßmuskelzellen der Media (14). Dieser Effekt ist durchaus interessant, da sich somit die in Tierstudien gezeigte protektive Wirkung von Statinen bezüglich Restenoseentwicklung nach Ballonangioplastie (23,25) über eine zellspezifische Apoptoseinduktion durch diese Substanzen erklären ließe.

## **5.2 Konditioniertes Medium mit antiapoptotischen Eigenschaften in Abhängigkeit des verwendeten Stimulus**

Es ist bekannt, dass die Apoptoseempfindlichkeit glatter Gefäßmuskelzellen von der Zelldichte abhängt. So konnte gezeigt werden, dass eine höhere Zelldichte bei dieser Zellart vor Apoptose schützt (15). Dabei wurde festgestellt, dass die verminderte Apoptosesensitivität von Zellen höherer Dichte durch eine erhöhte Aktivität des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B zu Stande kommt, was zu einer konsekutiven vermehrten Expression des antiapoptotisch wirksamen Proteins IAP-1 führt, da ein Teil der IAP-1-Promotor-Region einen NF- $\kappa$ B-bindenden Teil enthält (13). Dass auch die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen abhängig vom Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B ist, konnte bereits in Experimenten gezeigt werden (1,4).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch durchflusszytometrische Bestimmung des *sub-G1-peaks* gezeigt werden, dass serumhaltiges konditioniertes Medium eine protektive Wirkung bezüglich der Apoptosestimulation durch PDTC und Lovastatin entfaltet. Es wurde daher angenommen, dass für den Effekt der zelldichte-abhängigen Apoptosesensitivität glatter Gefäßmuskelzellen ein autokriner Mechanismus verantwortlich ist, bei welchem glatte Gefäßmuskelzellen hoher Dichte einen Faktor produzieren und in den Extrazellulärraum sezernieren, welcher antiapoptotisch wirkt.

Für weitere Untersuchungen auf Proteinebene und zum Ausschluß der Möglichkeit, dass das Serum mit seinen Wachstumsfaktoren für den Apoptose-protektiven Effekt des konditionierten Mediums verantwortlich ist, wurde serumfreies konditioniertes

Medium auf seine Eigenschaften hin untersucht. Hierbei ließ sich im Rahmen von durchflusszytometrischen Zellzyklusanalysen mittels PI-Färbung zunächst feststellen, dass serumfreies konditioniertes Medium bei glatten Gefäßmuskelzellen eine proliferationsinduzierende Eigenschaft besitzt.

Bei der weiterführenden Untersuchung des serumfrei konditionierten Mediums hinsichtlich Apoptose-protektiver Eigenschaften - wie für serumhaltiges Medium bereits gezeigt - ließ sich jedoch zunächst im Rahmen der Apoptoseinduktion mittels PDTC kein positiver Effekt nachweisen. Hier zeigte das serumfrei konditionierte Medium eher proapoptotische Effekte. Unter der Überlegung, dass im serumfreien Medium ein eventuell notwendiges Trägerprotein fehlt, mit welchem ein von den Zellen produzierter antiapoptotischer Faktor in den Extrazellulärraum transportiert wird, wurde dem Kulturmedium 1% Albumin zugeführt und die Versuchsreihe mit PDTC als Apoptosestimulus wiederholt. Auch hier blieb der Nachweis eines antiapoptotischen Effektes des serumfrei konditionierten Mediums aus.

Bei der Anwendung von Lovastatin als Apoptosestimulus ließ sich jedoch eine protektive Wirkung von serumfrei konditioniertem Medium hinsichtlich Apoptoseinduktion - wie für serumhaltiges Medium bereits im Vorfeld gezeigt - durch Annexin-V-Färbung bestätigen.

Eine Erklärung dafür, dass sich - im Gegensatz zu Lovastatin - bei der Verwendung von PDTC kein antiapoptotischer Effekt des serumfrei konditionierten Mediums nachweisen ließ, könnte sein, dass im Rahmen des Vorgangs der Konditionierung Zink- oder Kupferionen in das Medium abgegeben werden. Denn es ist bekannt, dass PDTC seine apoptotische Wirkung nur in Abhängigkeit von Kupfer- oder Zinkionen entfaltet (15). Dass dieser proapoptotische Effekt des konditionierten Mediums nur unter serumfreien Bedingungen auftritt, könnte wiederum dadurch erklärt werden, dass im serumhaltigen konditionierten Medium Wachstumsfaktoren enthalten sind, welche die apoptotische Wirkung unterdrücken.

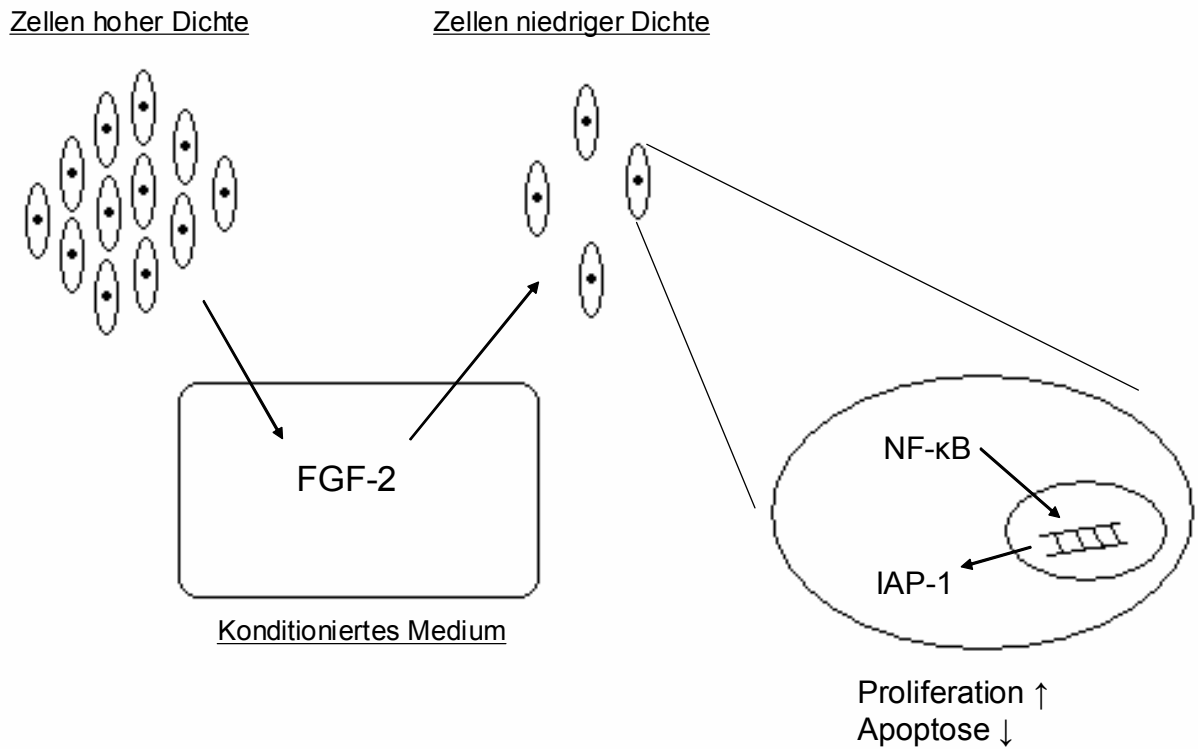
### **5.3 FGF-2-Expression in glatten Gefäßmuskelzellen hoher Dichte**

Bei Untersuchungen mit Endothelzellen konnte gezeigt werden, dass der Wachstumsfaktor FGF-2 antiapoptotische Eigenschaften besitzt (31), wobei im Rahmen dieser Experimente ferner gezeigt werden konnte, dass die autokrine Produktion von FGF-2 bei dieser Zellart dichteabhängig ist. Es zeigte sich nämlich, dass Endothelzellen in niedrigerer Dichte kultiviert gegenüber Apoptose resistenter waren als Zellpopulationen hoher Dichte. Mittels Anti-FGF-2-Antikörpern konnte diese verringerte Apoptoseempfindlichkeit aufgehoben werden, so dass diesem Protein neben der bekannten proliferationsinduzierenden Eigenschaft auch eine antiapoptotische Potenz bei Endothelzellen zugeschrieben wurde.

Für glatte Gefäßmuskelzellen war gezeigt worden, dass FGF-2 sowohl für die Proliferation als auch die Apoptose eine wichtige Rolle spielt (40,19). Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit das serumfrei konditionierte Medium von humanen glatten Gefäßmuskelzellen - nachdem ein proliferationsinduzierender und antiapoptotischer Effekt dieses Mediums gezeigt werden konnte - auf das Vorhandensein von FGF-2 untersucht.

Im Rahmen von Experimenten mit Immunpräzipitation des serumfrei konditionierten Mediums und nachfolgender Untersuchung dieses Mediums in der Zellkultur von humanen glatten Gefäßmuskelzellen mittels Trypanblaufärbung und Durchflußzytometrie konnte eine proapoptotische Wirkung des mit neutralisierenden FGF-2-Antikörper immunpräzipitierten serumfrei konditionierten Mediums bei der Apoptoseinduktion durch Lovastatin aufgezeigt werden. Zudem ließ sich eine erhöhte FGF-2-Aktivität sowohl im serumfrei konditionierten Medium als auch in den in hoher Dichte kultivierten Zellen selbst mittels Western Blot zeigen. Somit läßt sich folgern, dass ein protektiver Faktor der Apoptosesensitivität von glatten Gefäßmuskelzellen die dichteabhängige Produktion von FGF-2 ist (s. Abb 15).





**Abb. 15. Schematische Darstellung der Rolle von FGF-2 bei glatten Gefäßmuskelzellen als proliferationsinduzierendes bzw. antiapoptotisches Protein.** Durch Wachstum in hoher Zelldichte wird in den Zellen vermehrt FGF-2 exprimiert und in den Extrazellulärraum abgegeben. Unter dem Einfluss von FGF-2 kommt es zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB, was sowohl eine vermehrte Proliferation der Zellen als auch eine erhöhte Transkription des antiapoptotischen Proteins IAP-1 zur Folge hat.

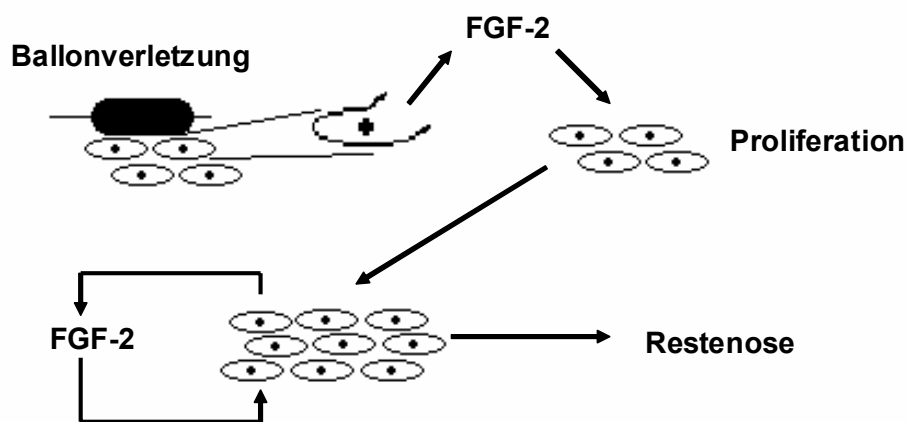
## 5.4 Klinische Aspekte

Zwar konnte in den bisherigen klinischen Studien insgesamt gesehen keine signifikante Verbesserung der Restenoserate nach PTCA durch den Einsatz von Statinen nachgewiesen werden, jedoch zeigte sich in allen Studien eine Verringerung der Neointimabildung bei den behandelten Patienten (32,46,57,60). Eine Ursache für diese Diskrepanz könnte eine zu gering erreichte Wirkstoffkonzentration am Wirkort durch die perorale Aufnahme sein, da die bei in-vitro-Experimenten verwendete Konzentration der Substanz weitaus höher ist als die nach peroraler Aufnahme gefundene Serumkonzentration des Wirkstoffes. Dass eine lokale Applikation von Wirkstoffen am Entstehungsort der Restenose inzwischen möglich ist, ist der Entwicklung von sog. beschichteten Stents zu danken, welche heute schon oft erfolgreich bei speziellen Indikationen zum klinischen Einsatz kommen. Bisher kamen als Wirkstoff für beschichtete Stents nur antiproliferative Wirkstoffe wie Sirolimus oder Paclitaxel zum Einsatz, welche sich in klinischen Studien im Hinblick auf die Restenoseentwicklung als günstig erwiesen (11,41,51). Somit ist durchaus zu erwägen, ob nicht auch Statine auf diesem Weg appliziert werden könnten, und diese dadurch eine höhere lokale Konzentration am Wirkort erreichen, was dann durch die apoptoseinduzierende Eigenschaft dieser Substanzen nicht nur zu einer verringerten Neointimabildung, sondern auch zu einer niedrigeren Restenoserate führen könnte.

Nach den Untersuchungsergebnissen dieser Arbeit scheint es bei dem Versuch der Prävention von post-Angioplastie-Restenosen sinnvoll zu sein, einen besonderen Wert auf die möglichst frühzeitige Inhibition der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen post interventionem zu legen. Denn überträgt man die Ergebnisse dieser Arbeit auf die in-vivo-Situation, so ist mit einer vermehrten Produktion des proliferativ und antiapoptotisch wirkenden FGF-2 durch glatte Gefäßmuskelzellen zu rechnen, sobald die Zelldichte der Neointima durch Proliferation der Zellen post interventionem zunimmt, so dass der Versuch der Antagonisierung der Neointimabildung zu einem späteren Zeitpunkt erschwert sein würde.

Dass der Wachstumsfaktor FGF-2 eine wesentliche Rolle bei der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen im Rahmen der post-Angioplastie-Restenose spielt, ist unumstritten (44). Es wird vermutet, dass durch die Verletzung der Zellen während der Intervention FGF-2 aus diesen freigesetzt wird und dessen proliferative Wirkung

auf Zellen der sich bildenden Neointima entfaltet. Nach den Ergebnissen dieser Arbeit muss jedoch gefolgert werden, daß FGF-2 nicht nur durch die im Rahmen der Intervention verletzten glatten Gefäßmuskelzellen freigesetzt wird, sondern auch durch sich bereits vermehrende und in ihrer Dichte zunehmende Zellen der sich bildenden Neointima, so dass FGF-2 nicht nur zum Zeitpunkt der Verletzung, sondern auch danach zum Wachstum der Zellen der Neointima beiträgt, was letztlich zur Entwicklung einer Restenose führt (s. Abb. 16).



**Abb. 16. Modell der autokrinen FGF-2-Produktion glatter Gefäßmuskelzellen nach Ballonverletzung.** Durch Ballonverletzung wird aus geschädigten glatten Gefäßmuskelzellen intrazelluläres FGF-2 in die Umgebung freigesetzt. Hierdurch kommt es zu einer Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen, welche wiederum bei zunehmender Zelldichte vermehrt FGF-2 exprimieren und freisetzen, was die Proliferation der Zellen weiter unterhält mit dem Endergebnis einer Restenose.

Segev et al. zeigten, dass TMPP – ein FGF-Rezeptor-Antagonist – in der Lage ist, die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen zu inhibieren (49). Auch dem synthetischen Oligosaccharid PI-88, welches in Tumorzelllinien antiproliferative Eigenschaften zeigte, konnte im Rahmen von Untersuchungen sowohl mit Ratten als auch mit Hasen eine antiproliferative Wirkung auf glatte Gefäßmuskelzellen nach Ballonangioplastie nachgewiesen werden, wobei gezeigt werden konnte, dass diese antiproliferative Eigenschaft u.a. durch die Fähigkeit entsteht, FGF-2 direkt zu binden und so dessen Aktivität zu vermindern (17). So wird in der Literatur die Antagonisierung von FGF-2 auch beim Menschen als eine Möglichkeit zur Verhinderung der post-Angoplastie-Stenose gesehen. Bei Versuchen mit Ratten konnte inzwischen demonstriert werden, dass sich nach einer systemischen Injektion von neutralisierenden Antikörpern gegen FGF-2 vor Ballon-induzierter Gefäßverletzung der Carotiden die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen post interventionem um etwa 80% signifikant verringert (35). Ob FGF-2-inaktivierende Substanzen in Zukunft wirklich als therapeutische Alternative zur Prävention von Restenosen eine Rolle spielen werden, bleibt abzuwarten, zumal bereits andere antiproliferative Substanzen, wie z. B. Sirolimus, bei beschichteten Stents eine wesentliche erfolgreiche Rolle spielen.

Im Rahmen eines Tiermodells mit Stenting der Carotiden von Ratten wendeten Wessely et al. erstmals ein Statin (Cerivastatin) als Präparat für einen beschichteten Stent an, wobei gezeigt werden konnte, dass das lokal applizierte Statin im Vergleich zu herkömmlichen Stents in der Lage ist, die Neointima-Bildung post interventionem signifikant zu inhibieren (27). So könnte diese Substanzgruppe in Zukunft neben den bisherigen Wirkstoffen eine Rolle bei der Anwendung beschichteter Stents spielen. Auch eine Kombination aus Wirkstoffen ist zur Beschichtung eines Stents denkbar. Da im Rahmen einer durchflusszytometrischen Messung in dieser Arbeit ein synergistischer Effekt bei der Anwendung zweier verschiedener Apoptose-induzierender Stimuli in vitro bei glatten Gefäßmuskelzellen demonstriert werden konnte, in diesem Falle abrupter Serumentzug und Lovastatinbehandlung, könnte natürlich solch ein Phänomen auch bei der gleichzeitigen Anwendung zweier verschiedener Apoptose-induzierender Substanzgruppen bei beschichteten Stents eine Rolle spielen. Dies würde zur Folge haben, dass von den gewählten Wirkstoffen eine geringere Dosis zur Antagonisierung der Neointimabildung nötig wäre.

## **6 Zusammenfassung**

Apoptose glatter Gefäßmuskelzellen spielt eine wichtige Rolle sowohl im Rahmen der Pathogenese der Atherosklerose als auch der Restenose nach Ballonangioplastie. Zu Beginn der Arbeit war bekannt, dass glatte Gefäßmuskelzellen in Abhängigkeit von der Zelldichte auf bestimmte Substanzen wie z.B. PDTC oder Lovastatin mit Apoptose reagieren. Bei hoher Zelldichte konnte keine Apoptose induziert werden. Ziel der Arbeit war es, die apoptoseinduzierenden Substanzen PDTC und Lovastatin zu charakterisieren und verantwortliche Mechanismen der Apoptoseprotektion zu identifizieren. Dazu wurden glatte Gefäßmusklezzellen in hoher Dichte kultiviert und konditioniertes Medium gewonnen. Dieses konditionierte Medium induzierte Proliferation in glatten Gefäßmuskelzellen und vermittelte einen Schutz vor Apoptose. Durch Immunpräzipitation und Western Blot konnte eindeutig gezeigt werden, dass die verminderte Apoptoseempfindlichkeit glatter Gefäßmuskelzellen in hoher Dichte durch eine autokrine Produktion von FGF-2 vermittelt wird.

## 7 Literaturverzeichnis

- 1 Autieri MV, Yue TL, Ferstein GZ, Ohlstein E. Antisense oligonucleotides to the p65 subunit of NF- $\kappa$ B inhibit human vascular smooth muscle cell adherence and proliferation and prevent neointima formation in rat carotid arteries. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;213:827-836.
- 2 Baetta C, Donetti E, Comparato C, Calore M, Rossi A, Teruzzi C, Paoletti R, Fumagalli R, Soma MR. Proapoptotic effect of atorvastatin on stimulated rabbit smooth muscle cells. *Pharmacol Res.* 1997;36:115-121.
- 3 Bellas RE, FitzGerald MJ, Fausto N, Sonenshein GE. Inhibition of NF- $\kappa$ B activity induces apoptosis in murine hepatocytes. *Am J Pathol.* 1997;151:891-896.
- 4 Bellas RE, Lee JS, Sonenshein GE. Expression of a constitutive NF- $\kappa$ B like activity is essential for proliferation of cultured bovine vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 1995;96:2521-2527.
- 5 Bennett MR, Evan GI, Schwartz SM. Apoptosis of human vascular smooth muscle cells derived from normal vessels and coronary atherosclerotic plaques. *J Clin Invest.* 1995;95:2266-2274.
- 6 Bennett MR, Gibson DF, Schwartz SM, Tait JF. Binding and phagocytosis of apoptotic vascular smooth muscle cells is mediated by exposure of phosphatidylserine. *Circ Res.* 1995;77:1136-1142.
- 7 Bessho R, Matsubara K, Kubota M, Kuwakado K, Hirota H, Wakazono Y, Lin YW, Okuda A, Kawai M, Nishikomori R, Heike T. Pyrrolidine dithiocarbamate, a potent inhibitor of nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) activation, prevents apoptosis in human promyelocytic leukaemia HL-60 cells and thymocytes. *Biochem Pharmacol.* 1994;48:1883-1889.
- 8 Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Turka LA, Mao X, Nunez G, Thompson CB. bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 1993;74:597-608.
- 9 Cory S, Strasser A, Jacks T, et al. Enhanced cell survival and tumorigenesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1994;59:365-375.
- 10 Crisby M, Nordin-Fredriksson G, Shah PK, Yano J, Zhu J, Nilsson J. Pravastatin treatment increases collagen content and decreases lipid content, inflammation, metalloproteinases, and cell death in human carotid plaques: implications for plaque stabilization. *Circulation* 2001;103:926-933.

- 11 Degertekin M, Serruys PW, Foley DP, Tanabe K, Regar E, Vos J, Smits PC, van der Giessen PJ, van den Brand M, de Feyter P, Popma JJ. Persistent inhibition of neointimal hyperplasia after sirolimus- eluting stent implantation; long-term (up to 2 years) clinical, angiographic, and intravascular ultrasound follow-up. *Circulation* 2002;106:1610-1613.
- 12 Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 1998;391:43-50.
- 13 Erl W, Hansson GK, de Martin R, Draude G, Weber KSC, Weber C. Nuclear Factor- $\kappa$ B regulates induction of apoptosis and inhibitor of apoptosis protein-1 expression in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1999;84:668-677.
- 14 Erl W, Hristov M, Neureuter M, Yan ZQ, Hansson GK, Weber PC. HMG-CoA reductase inhibitors induce apoptosis in neointima-derived vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 2003;169:251-258.
- 15 Erl W, Weber C, Hansson GK. Pyrrolidine dithiocarbamate-induced apoptosis depends on cell type, density, and the presence of  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$ . *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000;278:C1116-C1125.
- 16 Eto M, Kozai T, Cosentino F, Joch H, Luscher TF. Statin prevents tissue factor expression in human endothelial cells: role of Rho/Rho-kinase and Akt pathways. *Circulation* 2002;105:1756-1759.
- 17 Francis DJ, Parish CR, McGarry M, Santiago FS, Lowe HC, Brown KJ, Bingley JA, Hayward IP, Cowden WB, Campbell JH, Campbell GR, Chesterman CN, Khachigian LM. Blockade of vascular smooth muscle cell proliferation and intimal thickening after balloon injury by the sulfated oligosaccharide PI-88. *Circ Res* 2003;92:e70-e77.
- 18 Flynn PD, Byrne CD, Baglin TP, Weissberg PL, Bennett MR. Thrombin generation by apoptotic vascular smooth muscle cells. *Blood* 1997;89:4378-4384.
- 19 Fox JC, Shanley JR. Antisense inhibition of basic fibroblast growth factor induces apoptosis in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1996;271:12578-12584.
- 20 Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature.* 1990;343:425-430.
- 21 Gordon N. Apoptosis (programmed cell death) and other reasons for elimination of neurons and axons. *Brain Dev.* 1995;17:73-77.

- 22 Guijarro C, Blanco-Colio LM, Ortego M, Alonso C, Ortiz A, Plaza JJ, Diaz C, Hernandez G, Egido J. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase and isoprenylation inhibitors induce apoptosis of vascular smooth muscle cells in culture. *Circ Res.* 1998;83:490-500.
- 23 Herdeg C, Fitzke M, Oberhoff M, Baumbach A, Schroeder S, Karsch KR. Effects of atorvastatin on in-stent stenosis in normo- and hypercholesterolemic rabbits. *Int J Cardiol.* 2003;91:59-69.
- 24 Horiguchi A, Sumitomo M, Asakuma J, Asano T, Asano T, Hayakawa M. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme a reductase inhibitor, fluvastatin, as a novel agent for prophylaxis of renal cancer metastasis. *Clin Cancer Res.* 2004;10:8648-55.
- 25 Indolfi C, Cioppa A, Stabile E, Di Lorenzo E, Esposito G, Pisani A, Leccia A, Cavuto L, Stingone AM, Chieffo A, Capozzolo C, Chiariello M. Effects of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor simvastatin on smooth muscle cell proliferation *in vitro* and neointimal formation *in vivo* after vascular injury. *J Am Coll Cardiol.* 2000;35:214-221.
- 26 Isner JM, Kearney M, Bortman S, Passeri J. Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis. *Circulation* 1995;91:2703-2711.
- 27 Jaschke B, Michaelis C, Milz S, Vogeser M, Mund T, Hengst L, Kastrati A, Schomig A, Wessely R. Local statin therapy differentially interferes with smooth muscle and endothelial cell proliferation and reduces neointima on a drug-eluting stent platform. *Cardiovasc Res.* 2005;68:483-492.
- 28 Jellinger KA, Bancher C. Neuropathology of Alzheimer`s disease: a critical update. *J Neural Transm.* 1998;54:77-95.
- 29 Jenner P, Olanow CW. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson`s disease. *Neurology* 1996;47:S161-170.
- 30 Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-257.
- 31 Kinoshita M, Shimokado K. Autocrine FGF-2 is responsible for the cell density-dependent susceptibility to apoptosis of HUVEC : A role of a calpain inhibitor-sensitive mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:2323-2329.
- 32 Kleeman A, Eckert S, von Eckardstein A, Lepper W, Schernikau U, Gleichmann U, Hanrath P, Fleck E, Neiss A, Kerber S, Assmann G, Breithardt and the CLAPT Study. Effects of lovastatin on progression of non-dilated and dilated coronary



- segments and on restenosis in patients after PTCA. The cholesterol lowering atherosclerosis PTCA trial (CLAPT). *Eur Heart J.* 1999;20:1393-1406.
- 33 Kockx MM, De Meyer GRY, Muhring J, et al. Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques. *Circulation* 1998;97:2307-2315.
  - 34 Libby P, Tanaka H. The molecular bases of restenosis. *Prog Cardiovasc Dis.* 1996;40:97-106.
  - 35 Lindner V, Reidy MA. Proliferation of smooth muscle cells after vascular injury is inhibited by an antibody against basic fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:3739-3743.
  - 36 Li PF, Dietz R, von Harsdorf R. Reactive oxygen species induce apoptosis of vascular smooth muscle cell. *FEBS Lett.* 1997;404:249-252.
  - 37 Mercado N, Boersma E, Wijns W, et al. Clinical and quantitative coronary angiographic predictors of coronary restenosis: a comparative analysis from the balloon-to-stent era. *J Am Coll Cardiol.* 2001;38:645-652.
  - 38 Meyn RE, Stephens LC, Hunter NR, Milas L. Induction of apoptosis in murine tumors by cyclophosphamide. *Cancer Chemother Pharmacol.* 1994;33:410-414.
  - 39 Mirkovic N, Meyn RE, Hunter NR, Milas L. Radiation-induced apoptosis in a murine lymphoma in vivo. *Radiother Oncol.* 1994;33:11-16.
  - 40 Miyamoto T, Leconte I, Swain JL, Fox JC. Autocrine FGF signaling is required for vascular smooth muscle cell survival in vitro. *J Cell Physiol.* 1998;177:58-67.
  - 41 Morice MC, Serruys PW, Sousa JE, Fajadet J, Ban Hayashi E, Perin M, Colombo A, Schuler G, Barragan P, Guagliumi G, Molnar F, Falotico R. RAVEL study group. A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization. *N Engl J Med.* 2002;346:1773-1780.
  - 42 Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci.* 1997;22:299-306.
  - 43 Qiao L, Farrell GC. The effects of cell density, attachment substratum and dexamethasone on spontaneous apoptosis of rat hepatocytes in primary culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1999;35:417-424.
  - 44 Reidy MA, Fingerle J, Lindner V. Factors controlling the development of arterial lesions after injury. *Circulation* 1992;86:III-43-III-46.
  - 45 Rekhter MD. Collagen synthesis in atherosclerosis: Too much and not enough. *Cardiovasc Research.* 1999;41:376-384.

- 46 Sahni R, Maniet AR, Voci G, Banka VS. Prevention of restenosis by lovastatin after successful coronary angioplasty. *Am Heart J.* 1991;121:1600-1608.
- 47 Sandstrom PA, Mannie MD, Buttke TM. Inhibition of activation-induced death in T cell hybridomas by thiol antioxidants: oxidative stress as a mediator of apoptosis. *J Leukoc Biol.* 1994;55:221-226.
- 48 Schwartz RS, deBlois D, O'Brien ER. The intima. Soil for atherosclerosis and restenosis. *Circ Res.* 1995;77:445-465.
- 49 Segev A, Aviezer D, Safran M, Gross Z, Yaron A. Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by a novel fibroblast growth factor receptor antagonist. *Cardiovasc Research* 2002;53:232-241.
- 50 Stassi G, Todaro M, Bucchieri F, et al. Fas/Fas ligand-driven T cell apoptosis as a consequence of ineffective thyroid immunoprivilege in Hashimoto's thyroiditis. *J Immunol.* 1999;162:263-267.
- 51 Stone GW, Ellis SG, Cox DA, Hermiller J, O'Shaughnessy C, Mann JT, Turco M, Caputo R, Bergin P, Greenberg J, Popma JJ, Russell ME. TAXUS-IV Investigators. One-year clinical results with the slow-release, polymer-based, paclitaxel-eluting TAXUS stent: the TAXUS-IV trial. *Circulation* 2004;109:1942-1947.
- 52 Strandberg TE, Vanhanen H, Tikkanen MJ. Effect of statins on C-reactive protein in patients with coronary artery disease. *Lancet* 1999;353:118-119.
- 53 Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 1993;75:1169-1178.
- 54 Tao W, Kurschner C, Morgan JI. Modulation of cell death in yeast by the Bcl-2 family proteins. *J Biol Chem.* 1997;272:15547-15552.
- 55 Tezel G, Seigel GM, Wax MB. Density-dependent resistance to apoptosis in retinal cells. *Curr Eye Res.* 1999;19:377-388.
- 56 Tsai JC, Jain M, Hsieh CM, Lee WS, Yoshizumi M, Patterson C, Perrella MA, Cooke C, Wang H, Haner E, Schlegel R, Lee ME. Induction of apoptosis by pyrrolidine dithiocarbamate and N-acetylcysteine in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1996;271:339-343.
- 57 Weintraub WS, Boccuzzi SJ, Klein JL, Kosinski AS, King SB, Ivanhoe R, Cedarholm JC, Stillabower ME, Talley JD, DeMaio SJ, O'Neill WW, Frazier JE, Cohen-Bernstein CL, Robbins DC, Brown CL, Alexander RW, for The Lovastatin

- Restenosis Trial Study Group. Lack of effect of lovastatin on restenosis after coronary angioplasty. Lovastatin Restenosis Trial Study Group. *N Engl J Med.* 1994;331:1331-1337.
- 58 Uren AG, Pakusch M, Hawkins CJ, Puls KL, Vaux DL. Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind tumor necrosis factor receptor-associated factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93:4974-4978.
- 59 Van der Wal AC, Becker AE. Atherosclerotic plaque rupture-pathologic basis of plaque stability and instability. *Cardiovasc Research* 1999;41:334-344.
- 60 Walter DH, Schachinger V, Elsner M, Mach S, Auch-Schwelk W, Zeiher AM. Effect of statin therapy on restenosis after coronary stent implantation. *Am J Cardiol.* 2000;85:962-968.
- 61 Wong WW, Dimitroulakos J, Minden MD, Penn LZ. HMG-CoA reductase inhibitors and the malignant cell: the statin family of drugs as triggers of tumor-specific apoptosis. *Leukemia* 2002;16:508-519.
- 62 Zamzami N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Gomez-Monterrey I, Castedo M, Kroemer G. Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J Exp Med.* 1996;183:1533-1544.
- 63 Zheng L, Fisher G, Miller RE, Peschon J, Lynch DH, Lenardo MJ. Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor. *Nature* 1995;377:348-351.

## **8 Publikationen**

Erl W, Hristov M, Neureuter M, Yan ZQ, Hansson GK, Weber PC. HMG-CoA reductase inhibitors induce apoptosis in neointima-derived vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 2003;169:251-258.

## **9 Danksagung**

Herrn PD Dr. rer. biol. hum. Wolfgang Erl für die Überlassung des Themas, die geduldige Einarbeitung in die Labortechniken und die immerzu freundliche und kollegiale Arbeitsatmosphäre.

Herrn Prof. Dr. med. Peter C. Weber für die Möglichkeit, die Arbeit am Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten durchführen zu dürfen.

Frau Brigitte Zimmer für die nette und hilfsbereite Unterstützung im Labor.

## 10 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Martin Neureuter  
geboren am: 24.12.1975  
Geburtsort: Augsburg  
Familienstand: verheiratet, 2 Kinder

### Bildungsweg

1982-1986: Grundschule in Friedberg  
1986-1995: Wernher-von-Braun-Gymnasium Friedberg  
1995-1996: Zivildienst in der Ambulanten Krankenpflege in Friedberg  
1996-2003: Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Praktisches Jahr:  
Chirurgie, Klinikum Augsburg  
Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Klinikum Großhadern  
Innere Medizin, Städtisches Krankenhaus München-Schwabing  
2003-2004: Arzt im Praktikum, Klinikum Dachau, Abteilung für Kardiologie und Pneumologie  
seit 10/2004: Assistenzarzt, Klinikum Kaufbeuren-Ostallgäu, Abteilung für Kardiologie