



Aus der Klinik für Hämatologie, Onkologie und klinische Immunologie,
des Universitätsklinikums Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. Rainer Haas

**Hemmung der Angiogenese in vitro
durch Antisense-Oligonukleotide gegen
die α v-Kette des Vitronectin-Rezeptors**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Thorsten Gräf

2003

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Haas

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Bojar

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
A. EINLEITUNG	8
A.I. Angiogenese	8
A.I.1. Der Mechanismus der Angiogenese	8
A.I.2. Die Bedeutung von Adhäsions-Molekülen für die Angiogenese	10
A.I.3. Anti-angiogenetische Therapeutika	10
A.II. Das Integrin $\alpha v \beta_3$ - der „Vitronectin-Rezeptor“ -	12
A.II.1. Aufbau, Struktur und Gewebsverteilung des Integrins $\alpha v \beta_3$	12
A.II.2. Biologische Funktionen des $\alpha v \beta_3$ -Rezeptors	13
A.II.2.a. Angiogenese	13
A.II.2.b. Zell-Matrix- und Zell-Zell-Interaktionen	15
A.II.2.c. Apoptose	15
A.II.2.d. Knochenresorption	16
A.II.3. Medizinische und pharmazeutische Anwendungsgebiete von $\alpha v \beta_3$ -Antagonisten ...	17
A.III. Das Antisense-Prinzip	17
A.III.1. Voraussetzungen für die Wirksamkeit von Antisense-Oligonukleotiden	19
A.III.2. Therapeutische Konzepte	20
A.III.3. Klinische Studien	21
B. MATERIAL UND METHODEN	23
B.I. Identifikation und Auswahl geeigneter mRNA-Zielstrukturen für Antisense-ODN ...	23
B.II. Oligodesoxyribonukleotide	24
B.II.1. Synthese	24
B.II.2. Sequenzen	24
B.III. Zelllinien und Zellkultur	26
B.III.1. HUVEC	26
B.III.2. Trypsinierung von Endothelzellen	26
B.IV. Transfektion der HUVEC mit Antisense-ODN und Lipofektin®	26
B.V. Immunfluoreszenzfärbung und Durchflusszytometrie (FACS)	27
B.VI. RT-PCR	28
B.VI.1. RNA-Extraktion	28
B.VI.2. Reverse Transkription (RT)	29

B.VI.3.	PCR	29
B.VI.4.	Agarosegel-Elektrophorese	30
B.VII.	Quantitative “Real-Time“ RT-PCR.....	30
B.VII.1.	Prinzip der “Real-Time“ RT-PCR.....	30
B.VII.2.	Quantitative “Real-Time“ RT-PCR mittels Hybridisierungssonden	31
B.VII.3.	Quantifizierung.....	33
B.VIII.	Funktionelle Untersuchungen	33
B.VIII.1.	Proliferations-Test.....	33
B.VIII.2.	Apoptose-Test	34
B.VIII.3.	Migrations-Test.....	34
B.VIII.4.	Test zur Ausbildung von Kapillar-ähnlichen Strukturen aus Endothelzellen (MatriGel-Test).....	35
B.VIII.5.	<i>In Vitro</i> -Angiogenese-Test.....	35
B.IX.	Statistische Analysen	36
C.	ERGEBNISSE	38
C.I.	Auswahl αv-gerichteter Antisense-ODN-Sequenzen.....	38
C.II.	Transfektion αv-gerichteter AS-ODN in primäre Endothelzellen	40
C.II.1.	Hemmung der α v-Proteinexpression durch AS-ODN.....	40
C.II.2.	Hemmung der α v-mRNA-Expression	42
C.II.3.	Dosis-abhängige Hemmung der α v-Expression.....	44
C.II.4.	Hemmung der α v-Expression auf unstimulierten Zellen	45
C.III.	Funktionelle Effekte der αv-Expressionshemmung	47
C.III.1.	Effekte auf die Proliferation	47
C.III.2.	Effekte auf die Apoptose	49
C.III.3.	Effekte auf die Migration.....	50
C.III.4.	Effekte der Inhibition der α v-Integrin-Expression auf die Angiogenese	52
C.III.4.a.	Hemmung der Bildung Kapillar-ähnlicher Strukturen im MatriGel-Test.....	52
C.III.4.b.	Hemmung Kapillar-ähnlicher- und Netzartiger-Strukturen in einem “Co-Kultur- Angiogenese-Assay“ aus menschlichen Zellen.....	55

D.	DISKUSSION	58
D.I.	Hemmung der Expression von α v-Integrinen durch Computer-unterstützte Auswahl effektiver α v-gerichteter-Antisense-ODN.....	58
D.II.	Bedeutung der α v-Expressionsstärke für die Proliferation, Transmigration und Apoptose von HUVEC	59
D.III.	Hemmung der Angiogenese <i>in vitro</i> durch α v-gerichtete AS-ODN	60
D.IV.	Schlussfolgerung und Ausblick	61
E.	ZUSAMMENFASSUNG.....	64
 CURRICULUM VITAE.....		65
 DANKSAGUNG		66
 LITERATURVERZEICHNIS.....		67

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AIDS	Aquired immun deficiency syndrome
AK	Antikörper
AS	Antisense
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	Basic fibroblast growth factor
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum-Albumin
CAM	Zell-Adhäsions-Moleküle
CD	Cluster of differentiation
cpm	Counts per minute
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	Doppel-Strang
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ECM	Extrazelluläre Matrix
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FCS	Fetal calf serum
FSC	Forward scatter
HBS	HEPES buffered saline
HEPES	Hydroxyethylpiperazinoethansulfonsäure
HIV-1	Humanes Immundefizienzvirus 1
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
Ig	Immunglobulin
IFN- γ	Interferon- γ
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-8	Interleukin-8
Kap.	Kapitel
kD	Kilodalton
LFA-1	Leukocyte function antigen 1
MDR-1	Multidrug resistance gene 1
MNC	Mononukleäre Zellen
M-CSF	Monocyte colony-stimulating factor

mRNA	Messenger-RNA
ODN	Oligodesoxyribonukleotid
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
pdN6	Random-Hexamere
PE	Phycoerytherin
Rpm	Rotationen pro Minute
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkription
s.	siehe
SA	Standardabweichung
ss	Einzelstrang
SSC	Sodium saline citrate
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
Tris	Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan
vgl.	Vergleiche
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VLA-4	Very late antigen 4
z.B.	Zum Beispiel

A. Einleitung**A.I. Angiogenese****A.I.1. Der Mechanismus der Angiogenese**

Angiogenese ist die Entstehung von neuen Blutgefäßen^{1,2}. Dieser Vorgang besteht aus einer Abfolge komplexer Prozesse, die die Auflösung der Basalmembran der Gefäße sowie die Aktivierung der Endothelzellen zur Migration und Proliferation ebenso beinhalten, wie die Ausbildung neuer Endothelzellschläuche und deren Reifung zu funktionellen Blutgefäßen³. Physiologisch bedeutsam ist die Angiogenese vor allem während der Embryonalentwicklung. Pathophysiologisch bedeutsam ist die Angiogenese bei einer Vielzahl von entzündlichen Erkrankungen und tumorösen Prozessen. Beispiele hierfür sind die rheumatoide Arthritis, die Psoriasis, die diabetische Retinopathie und insbesondere verschiedene Tumorerkrankungen^{4,5,36}.

Gerade in der Pathophysiologie der Tumore spielt die Angiogenese eine der wichtigsten Rollen für deren kontinuierliches Größenwachstum^{3,6,9}. Ein Tumor bis zu einer Größe von 0,5 mm im Durchmesser kann die nötige Menge an Sauerstoff und Nährstoffen über Diffusion sicherstellen. Ab einem Durchmesser über 0,5 mm kann ein Tumor seine Versorgung nur durch die zusätzliche Bildung von Gefäßen gewährleisten^{3,9}. Bei Tumoren dienen die neu entstandenen Blutgefäße nicht nur der Nährstoffversorgung des Tumors, sondern bilden durch deren Anschluß an das präexistente Gefäßsystem auch die Grundlage für die Metastasierung^{5,52}. Bleibt die Angiogenese aus, kommt es im Idealfall zu einem Stillstand im Tumorwachstum und zu einem Ausbleiben der Metastasenbildung.

Im Gefäßsystem eines gesunden adulten Organismus befinden sich die Endothelzellen im Ruhezustand und beschränken sich hauptsächlich auf den Zellersatz. In den oben beispielhaft erwähnten pathologischen Situationen und in Zuständen der Ischämie, bei hypoxischen Bedingungen, im entzündeten Gewebe kommt es zur Sekretion von Angiogenesefaktoren^{7,8}, die eine Aktivierung der ruhenden Endothelzellen bewirken^{7,8}. Die Aktivierung der ruhenden Endothelzellen leitet die Neubildung von Gefäßen ein⁹.

Der Prozess der Angiogenese besteht im wesentlichen aus drei Schritten.

Die Initiation wird über die Sekretion verschiedener Zytokine eingeleitet. Zu den wichtigsten Angiogenesefaktoren gehören der "Vascular endothelial growth factor" (VEGF), der "basic fibroblast growth factor" (bFGF), das Interleukin-8 (IL-8) und der Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α). Die meisten dieser Zytokine stimulieren sowohl die Proliferation, als auch die Migration von Endothel- und glatten Muskelzellen^{5,36}. Diese werden zum einen aus ischämischen Wunden oder entzündlichen Geweben freigesetzt^{7,8}, zum anderen sind Tumore in der Lage Zytokine zu produzieren und zu sezernieren^{5,48}. Wenn VEGF oder bFGF auf Endothelzellen treffen, aktivieren diese über spezifische Rezeptoren eine Serie von Signaltransduktionsproteinen, die letztendlich zur Aktivierung der Endothelzellen führen^{10,11} (siehe Abb. 1).

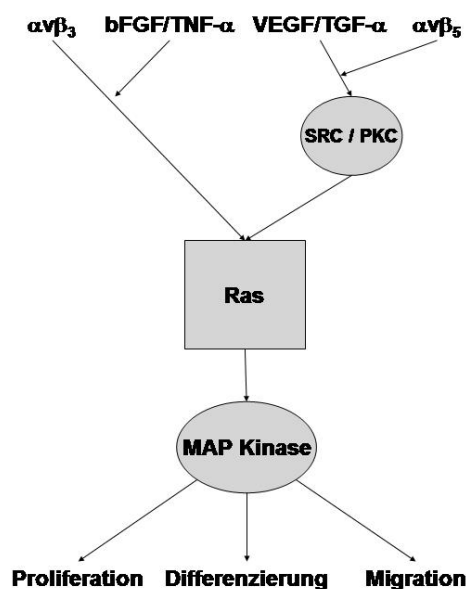


Abbildung 1: Schematische Darstellung der durch bFGF- und VEGF-induzierten Angiogenese (modifiziert nach Eliceiri BP et al. Cancer J 2000; 6: (245-249))

Die Aktivierung der Endothelzellen leitet die Proliferation / Invasion der Zellen ein. Die aktivierten Endothelzellen produzieren Matrix-Metallo-Proteinasen (MMPs) und stimulieren die Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle, deren Rolle in den folgenden Abschnitten genauer erläutert wird. Die MMPs sind eine spezielle Gruppe von proteolytisch wirksamen Enzymen¹², die in der Lage sind, die ECM im anliegenden Gewebe aufzulockern¹³. Die aufgelockerte ECM vereinfacht die Migration von Endothelzellen. Während ihres Einwanderns teilen sich die aktivierten Endothelzellen und erhalten, als noch undifferenzierte Gefäßknospen, Anschluss an den Tumor oder das entzündete Gewebe³⁶.

Zum Abschluss der Gefäßneubildung müssen die Endothelzellen ein Lumen ausbilden, um als intaktes Blutgefäß zu fungieren. Dieser letzter Differenzierungsschritt, der als Maturation / Differenzierung bekannt ist, wird durch verschiedene Adhäsionsmoleküle unterstützt^{14,15}.

Innerhalb dieser einzelnen Schritte der Angiogenese, sind verschiedene Wege beschrieben⁴⁴, die im wesentlichen alle von αv -Integrinen abhängig sind. Die zwei am

besten beschriebenen Wege werden von den beiden Integrinen $\alpha v \beta_3$ und $\alpha v \beta_5$ vermittelt (siehe Abb. 1 und A.II.2.a).

A.I.2. Die Bedeutung von Adhäsions-Molekülen für die Angiogenese

Während der Angiogenese spielen verschiedene Faktoren zusammen. Sie hängt zum einen von der Stimulation ruhender Endothelzellen, zum anderen von dem Einfluss der verschiedenen Wachstumsfaktoren, sowie von den Interaktionen der Adhäsions-Proteine mit ihren Liganden ab^{5,30,44}. Adhäsionsmoleküle ermöglichen es, dass Zellen untereinander kommunizieren und interagieren können. Spezifische Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen ermöglichen die Kommunikation zwischen Zellen und ihrer Umgebung, sie sind entscheidend für eine weitere Entwicklung und die Funktionalität des Organismus¹⁶. So werden sowohl die Invasion und Migration, als auch die Proliferation von Gefäßendothelzellen und glatten Muskelzellen von mehreren Adhäsions-Molekülen geregelt^{4,48}. Verschiedene unterschiedliche Familien von Rezeptoren vermitteln diese Interaktionen. Zu den Adhäsionsmolekülen gehören die Selektine, die Integrine, die Immunglobuline und die Cadherine^{17,18}. Durch die Integrine können die zelluläre Adhäsion und die zelluläre Migration an verschiedene ECM Proteine gesteuert werden, die in den Zwischenräumen der verschiedenen Zellen und an den Basalmembranen zu finden sind^{10,19}. Integrine beeinflussen den Ein- und Austritt im Zellzyklus, und die Bindung von Integrinen an ihren Liganden lösen eine Reihe von intrazellulären Prozessen aus, wie die Tyrosin-Phosphorylierung verschiedener Adhäsions-Kinasen, gesteigerte intrazelluläre pH- und Ca^{2+} -Werte und die Inositol-Lipid-Synthese^{20,21,22}. Die Unterbindung dieser Integrin-Liganden-Interaktionen hemmen das Zellwachstum / Reifezustand der betroffenen Endothelzellen und können die Apoptose, den programmierten Zelltod der Endothelzellen verursachen^{23,22,48} und somit die Angiogenese maßgeblich stören.

A.I.3. Anti-angiogenetische Therapeutika

Das heutige wissenschaftliche Interesse richtet sich besonders auf die Aufklärung der molekularen Prozesse der Gefäßneubildung. Man erhofft sich dadurch neue Thera-

piestrategien, die gezielt gegen pathophysiologische Angiogeneseprozesse in der Tumorentwicklung oder bei entzündlichen Erkrankungen angewandt werden können. Zurzeit werden verschiedene Medikamente mit unterschiedlichen Wirkmechanismen in klinischen Studien getestet, wobei einige Substanzen die Endothelzellen direkt hemmen, andere wiederum in die Signal-Kaskade der Angiogenese eingreifen oder die Fähigkeit von Endothelzellen blockieren, die ECM aufzulockern.

Die eine Gruppe von Angiogenese-Inhibitoren, die bei verschiedenen Krebserkrankungen (z.B. Kolorektales Karzinom) am Patienten erprobt werden, sind Moleküle, die direkt das Wachstum von Endothelzellen hemmen. Hierzu zählt Endostatin, ein natürlich vorkommendes Protein, das schon in verschiedenen Tierversuchen eine Hemmung des Tumorwachstums zeigte. Combretastatin A4 ist ein Wirkstoff, der aktivierte Endothelzellen veranlasst, in die Apoptose überzugehen. Ein weiterer Wirkstoff dieser Klasse ist Thalidomid. Es hemmt Endothelzellen direkt, sein genauer Wirkmechanismus ist jedoch noch nicht geklärt²⁴.

Eine andere Gruppe von Angiogenese-Inhibitoren wirken direkt gegen die von Endothelzellen produzierten Matrix-Metalloproteinasen. Diese Enzyme katalysieren den Abbau der ECM, die für die Migration der Endothelzellen wichtig ist. Verschiedene synthetische (Marimastat, BMS-275291) und natürlich (Neovastat) vorkommende Moleküle, die eine Hemmung der MMP-Aktivität erzielen, werden derzeit klinisch getestet²⁴.

Eine weitere erwähnenswerte Gruppe von Angiogenese-Inhibitoren wirkt direkt gegen die Signal-Kaskade der Angiogenese. Durch das Blockieren der VEGF-, bFGF- und PDGF-Rezeptoren (SU6668) wird die Initiation der Angiogenese gehemmt und somit auch alle weiteren Schritte. Interferon-alpha wird zur Hemmung der bFGF- und VEGF-Produktion eingesetzt und der Antikörper Anti-VEGF wird derzeit in verschiedenen Phase III Studien auf seine Effektivität hin überprüft²⁴.

A.II. Das Integrin $\alpha v \beta_3$ - der „Vitronectin-Rezeptor“ -

A.II.1. Aufbau, Struktur und Gewebsverteilung des Integrins $\alpha v \beta_3$

Das Adhäsionsmolekül $\alpha v \beta_3$ gehört zur Familie der Integrine. Den Namen „Vitronectin-Rezeptor“ erhielt das $\alpha v \beta_3$ -Integrin aufgrund früherer Beschreibungen, die zeigten, dass Vitronectin an diesen Rezeptor bindet. Dies ist mißverständlich, da $\alpha v \beta_3$ weder spezifisch noch der einzige Rezeptor für Vitronectin ist²⁵. Der $\alpha v \beta_3$ Rezeptor ist ein Transmembranes Glykoprotein, der als α/β Heterodimer aus der nicht-kovalent ver-

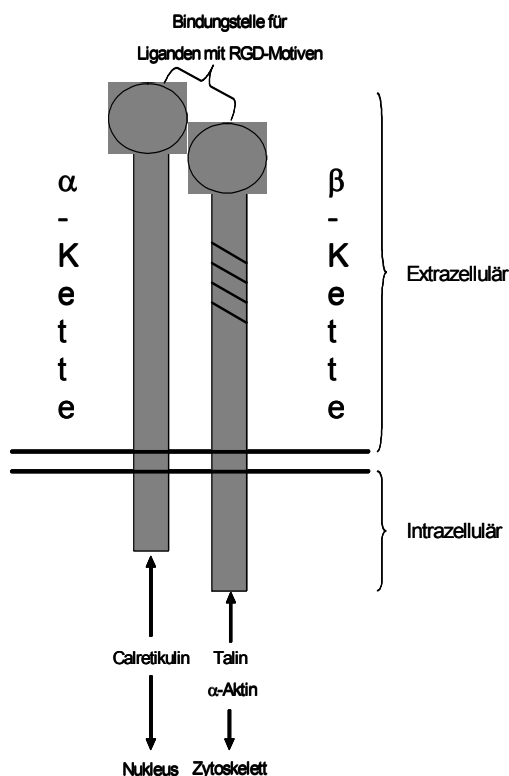


Abbildung 2: Skizziertes Schema des $\alpha v \beta_3$ Rezeptors (modifiziert nach Horton MA Int. J. Biochem. Cell Biol. 29(5), 721-725)

bundenen α Kette α_v (lokalisiert auf dem Gen 2q31-32²⁹) und der β Kette β_3 (lokalisiert auf dem Gen 17q21²⁹) besteht¹⁰ (siehe Abb. 2). Der Rezeptor hat eine Länge von ca. 1100 Aminosäuren²⁶. Die intrazellulären Enden der α und β Ketten interagieren beide mit dem Zytoskelett und den Komponenten der intrazellulären Signaltransduktion, wie z.B. den Kinasen FAK, ILK. Der $\alpha v \beta_3$ -Rezeptor verfügt über ein sogenanntes „key recognition motif“, eine Bindungsstelle, (siehe Abb. 2) die in der Lage ist, Liganden die mit dem Aminosäuren-Triplet Arginin-Glycin-Asparagin (RGD) ausgestattet sind, zu erkennen und zu binden²⁷. Dieses Triplet (RGD) kann verschiedenen Integrinen bei der Erkennung von Kollagenen, Fibrinogen oder Fibronectin behilflich sein²⁸. Der $\alpha v \beta_3$

Rezeptor ist auf einer Vielzahl von verschiedenen Zellen exprimiert, besonders auf hämatopoetischen, wie z.B. Monozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, Thrombozyten, aktivierten Lymphozyten und nicht-hämatopoetischen Zellen, wie z.B. Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Tumorzellen. Die stärkste Expression von $\alpha v \beta_3$ *in vivo* findet man auf Osteoklasten²⁹ und auf Endothelzellen von neuen Gefäßen³⁰. Die Biosynthese von $\alpha v \beta_3$ ähnelt der der Integrine LFA und gpIIb/IIIa²⁹. Die αv -

und β_3 -Ketten werden getrennt voneinander synthetisiert und erst vor der Oberflächenexpression auf der Zelle in ihre biologisch aktive Form $\alpha v \beta_3$ zusammengefügt.

Verschiedene Studien zeigten, dass die $\alpha v \beta_3$ -Expressionswerte durch die Stimulation mit verschiedenen Zytokinen, wie bFGF, VEGF, TNF- α und IL-8 weit über das normale physiologische Niveau hochreguliert werden können^{29,31}, daher ist die Expression von $\alpha v \beta_3$ bei verschiedenen pathologischen Umständen deutlich gesteigert. Eine Eigenschaft die die meisten anderen Integrine nicht aufzeigen.

Tumore können selbst bFGF und VEGF produzieren, wie z.B. Glioblastome (Spätstadium), maligne Melanome und Mamma-Karzinome und verstärken so die $\alpha v \beta_3$ Expressionswerte. TNF- α und Interleukine werden aus den umliegenden Zellen und Geweben bei einer Vielzahl von entzündlichen Erkrankungen sezerniert, sowie bei Erkrankungen aus dem rheumatoiden Formenkreis, z.B. rheumatoide Arthritis, Makuladegeneration, bei Kardiovaskulären Erkrankungen, z.B. Myokardinfarkt und bei der Osteoporose^{32,33,34,35,36}

A.II.2. Biologische Funktionen des $\alpha v \beta_3$ -Rezeptors

Der $\alpha v \beta_3$ Rezeptor ist auf einer Vielzahl von verschiedenen Zellen exprimiert, besonders auf hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen und ist vorwiegend an der Regulierung der Apoptose^{37,38}, der Gen-Expression¹⁶, der Zell-Proliferation³⁹, der Metastasierung⁴⁰, der Angiogenese⁴¹ und an den Interaktionen zwischen Extrazellulärer Matrix und anderen Zellen beteiligt. Er bindet Vitronectin, Fibrinogen, Fibronectin, von Willebrand Faktor und Thrombospondin⁴² und bindet Thrombozyten und Leukozyten während Entzündungsprozessen an das Endothel.

A.II.2.a. Angiogenese

Seine vielleicht wichtigste physiologische Aufgabe übernimmt das Integrin $\alpha v \beta_3$ in der Angiogenese. Es ist minimal auf ruhenden Blutgefäßen exprimiert, doch sind die Expressionswerte von $\alpha v \beta_3$ um ein Vielfaches auf Gefäßendothelzellen von menschlichen Tumoren, Granulationsgewebe und in Anwesenheit von verschiedenen Wachstumsfaktoren in Zellkultur-Tests erhöht^{4,12,43}. Eine deutliche Erhöhung dieser Expres-

sionswerte findet man bei Tumoren die auf CAM Zellen („chick chorioallantonic membrane“) kultiviert wurden⁴, auf Zellkultur-Tests der „rabbit cornea“⁴⁴, *in vivo* während der Wundheilung, Makuladegeneration, diabetische Retinopathie und bei Erkrankungen aus dem chronisch-entzündlichen Formenkreis (rheumatoide Arthritis, Colitis ulcerosa). Gerade der Kontrast zwischen kaum vorhandener Expression und einer um ein Vielfaches erhöhten Expression während der Angiogenese führen zu der Vermutung, dass das Integrin $\alpha v \beta_3$ die Angiogenese maßgeblich mitbeeinflusst. Unterstützt wird diese Behauptung durch verschiedene Experimente, die zeigten, dass eine Inhibition von $\alpha v \beta_3$ einen messbaren Erfolg bei der Unterdrückung der Angiogenese hat, diese Ergebnisse wurden bei der selektiven Inhibition von β_3 -Integrinen oder anderen Integrinen nicht erzielt. Neuere Untersuchungen zeigten, dass $\alpha v \beta_3$ auch für das Überleben und die Adhäsion von Endothelzellen mitverantwortlich ist, wichtige Schritte innerhalb des Angiogeneseprozesses. Die Bindung von $\alpha v \beta_3$ an seine Liganden ist eine wichtige Voraussetzung für das Wachstum und das Ausreifen von Blutgefäßen. Tierexperimente belegten, dass es bei αv -Null Mäusen zu einer ausgeprägten Störung der Blutgefäßbildung im Gehirn und im Intestinaltrakt kommt. 80% der αv -Null Mäuse verstarben bereits vor der Geburt, während die anderen 20% nur wenige Tage überlebten⁴⁵. Diese Ergebnisse untermauerten die Theorie, dass dem Integrin $\alpha v \beta_3$ eine entscheidende Bedeutung in der embryonalen Entwicklung zukommt, vor allem im Hinblick auf die Gefäßausbildung beim Wachstum des Organismus.

Die Effektivität der Hemmung des αv -Integrins, beruht auch auf den verschiedenen Wegen der Angiogenese, die im wesentlichen von αv -Integrinen abhängig sind (siehe Abb. 1)⁴⁴. In Tierexperimenten konnte verdeutlicht werden, dass Antagonisten die gegen $\alpha v \beta_3$ gerichtet sind, die durch bFGF-induzierte Angiogenese blocken können, aber maximal nur 50% der VEGF-induzierten Angiogenese hemmen. Antagonisten die gegen $\alpha v \beta_5$ gerichtet sind, hemmen im Gegensatz zu den $\alpha v \beta_3$ gerichteten Antagonisten die VEGF-induzierte Angiogenese komplett, haben aber keinen Einfluss auf die bFGF-induzierte Angiogenese. αv -Antagonisten haben somit einen Einfluß sowohl auf die bFGF-induzierte als auch auf die VEGF-induzierte Angiogenese.

Auch in der medizinischen Praxis ergeben sich Hinweise auf die Bedeutung eines Gendefektes selektiv für die αv - oder β_3 -Untereinheit des Integrins $\alpha v \beta_3$. Patienten mit einem selektiven Gendefekt der β_3 -Untereinheit leiden an dem sog. Glanzmann-Naegeli-Syndrom, einem Erkrankungsbild aus der Reihe der hämorrhagischen Dia-

thesen, bei denen eine Störung der Thrombozyten bei normaler Thrombozytenzahl vorliegt, also ohne besondere Störungen des Gefäßsystems. Patienten, die einen selektiven Gendefekt der αv -Untereinheit besitzen, zeigten dagegen schwerste Missbildungen an Gefäßen des Cerebrellums und des Intestitiums. An Tiermodellen ließ sich nachweisen, dass gerade durch die spezifische Hemmung des Integrins αv das Tumorwachstum und die Metastasierung unterdrückt werden konnte, ohne dabei bestehende Gefäße zu schädigen.

A.II.2.b. Zell–Matrix- und Zell–Zell-Interaktionen

Das Integrin $\alpha v \beta_3$ ist eines der vielseitigsten Mitglieder aus der Integrin-Familie und erlaubt es den Endothelzellen mit einer Vielzahl von verschiedenen Komponenten der ECM zu interagieren⁴⁶. Die Interaktion mit der ECM ist gerade bei der Angiogenese bedeutsam, da die Gefäßzellen praktisch in jedes Gewebe vordringen müssen. Es sendet Signale nach Bindung an die ECM an das intrazelluläre Kompartiment⁴⁷ und regelt so, z.B. über Calcium-Signale die Zell-Beweglichkeit. Außerdem schützt die $\alpha v \beta_3$ Expression menschliche Melanom-Zellen vor der Apoptose durch die Unterstützung eines "Überlebens-Signals"⁴⁸. Desweiteren ist $\alpha v \beta_3$ an der Zell-Proliferation, Zell-Differenzierung, Zell-Migration, Zell-Bindung und am Überleben der Zelle beteiligt^{49,50}. Neuere Studien zeigen, dass $\alpha v \beta_3$ verschiedene Signale in die Wege leiten kann, die zu einer Stimulation der Tyrosin-Phosphorylierung verschiedener zellulärer Proteine, wie z.B. Ras, Raf-1 und Mitglieder aus der MAP-Kinasen-Familie⁵¹ führen. Diese Proteine sind an der Zellzyklusregulation, der Apoptose, der Zelladhäsion und an der Zell-Beweglichkeit beteiligt^{30,52}.

A.II.2.c. Apoptose

Neuere Untersuchungen zeigten, dass das Integrin $\alpha v \beta_3$ nicht nur die Angiogenese direkt beeinflusst, sondern auch Einfluss auf die Apoptose hat. Brooks konnte nachweisen, dass $\alpha v \beta_3$ Antagonisten selektiv die Apoptose von neuen Blutgefäßen *in vivo* induzieren können⁵³. Weiterhin zeigte Stromblad⁵⁴, dass die systemische Applikation von $\alpha v \beta_3$ Antagonisten zu einer selektiven Aktivierung von p53 bei Endothelzellen

führt und es auf der Gegenseite zu einem Anstieg des p53-induzierten Zellzyklus-Inhibitor-Proteins p21^{WAF1/CIP1} kommt⁵⁴. Bei der Bindung von $\alpha v \beta_3$ an einen seiner Liganden wird die p53 Aktivität gehemmt, p21^{WAF1/CIP1} blockiert, und es kommt zu einem Anstieg des bcl2/bax Quotienten³⁰. Ein Anstieg des bcl2/bax Quotienten fördert das Überleben von Zellen. Diese Ergebnisse stützen die Theorie, dass die Bindung von $\alpha v \beta_3$ an einen seiner Liganden eine wichtige Voraussetzung für das Wachstum und das Ausreifen von Blutgefäßen im menschlichen Organismus ist und eine Hemmung dieser Liganden-Interaktion den programmierten Zelltod in Zytokin-aktivierten Endothelzellen einleiten kann^{30,53,54,57}.

A.II.2.d. Knochenresorption

Osteoklasten sind Knochen-resorbierende, multinukleäre Zellen, welche von den hämatopoetischen Stammzellen abstammen⁵⁵. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die Entwicklung der Osteoklasten zu multinukleären Zellen abhängig von ihrem direkten Umfeld sind. Osteoklasten benötigen zur Reifung ein Milieu, in dem sie adhären werden können.

Verschiedene Integrine sind für die Reifung der Osteoklasten und für ihre Fähigkeit der Knochenresorption mitverantwortlich⁵⁶. Das Integrin αv ist auf Osteoklasten sehr hoch exprimiert, vor allem bildet die αv -Kette mit den Untereinheiten β_3 und β_1 auf den Osteoklasten Rezeptoren für Vitronectin, Osteopontin und diverse Knochenproteine^{57,58}. Die Adhäsions- und Resorptions-Effekte der Osteoklasten werden hauptsächlich über die Integrine $\alpha v \beta_3$ und $\alpha_2 \beta_1$ gesteuert und wurden daher als Zielproteine der Knochenresorption und ihren pathophysiologischen Erkrankungen, wie der Osteoporose ausgemacht⁵⁹. Während der Knochenresorption reguliert das Integrin $\alpha v \beta_3$ die Adhäsion der Osteoklasten an die extrazellulären Matrixproteine der Knochen und stellt somit den Beginn der Knochenresorption dar⁵⁸. Doch sind die Integrin Untereinheiten αv und β_3 nicht nur an der Knochenresorption durch die Osteoklasten beteiligt, sondern vor allem auch an der Proliferation von Osteoklast-Vorläuferzellen und ihrer Weiterentwicklung zu multinukleären Osteoklasten⁶⁰.

A.II.3. Medizinische und pharmazeutische Anwendungsgebiete von $\alpha v \beta_3$ -Antagonisten

Antikörper, wie Medi-522 (Vitaxin II), oder synthetische Peptide, wie EMD121974 (Cilengitide), gegen das Integrin $\alpha v \beta_3$ werden derzeit in verschiedenen klinischen Studien getestet. Medi-522 (Vitaxin II), ein $\alpha v \beta_3$ gerichteter Antikörper, verhindert die Liganden-Interaktion und kann über diesen Mechanismus die Apoptose der Endothelzellen einleiten^{30,99}. Vitaxin befindet sich z.Z. in der Erprobungsphase bei therapieresistenten fortgeschrittenen kolorektalen Karzinomen.

EMD121974 (Cilengitide), ein synthetisches zyklisches anti- αv Peptid, das die Integrine $\alpha v \beta_3$ und $\alpha v \beta_5$ blocken kann, zeigte sehr gute anti-angiogenetische Erfolge in *in vitro* Tests. Es wird gerade in Phase I Studien an Patienten mit HIV-assoziierten Kaposi-Sarkomen und in einer Phase I/II Studie bei fortgeschrittenen oder rezidivierenden anaplastischen Gliomen eingesetzt³⁰.

A.III. Das Antisense-Prinzip

Antisense-Oligonukleotide erweitern die Pharmakotherapie um ein grundlegendes neues therapeutisches Prinzip. Während dem Wirkmechanismus zahlreicher Arzneimittel die Hemmung der Funktion von Proteinen zugrunde liegt und bei der Gentherapie zusätzliche genetische Informationen in die Zelle eingefügt werden, greift die Antisense-Technik in die Bildung dieser Proteine ein⁶¹ und kann gezielt gegen pathophysiologisch relevante Gene eingesetzt werden. Die Wirkung von Antisense-Oligonukleotiden beruht auf einer spezifischen Hemmung der Bildung von Proteinen. Antisense-Oligonukleotide sind kurzkettige synthetische Nukleinsäure mit einer frei wählbaren Abfolge von Basen. Ein Antisense-Oligonukleotid bindet über komplementäre Basenpaarung an eine Nukleinsäure, deren Basenabfolge dazu exakt paßt (Sense-Nukleinsäure). Durch die spezifische Bindung des Antisense-Oligonukleotids an die komplementäre Sequenz der mRNA des Proteins wird letztlich dessen Synthese verhindert. Antisense-Oligonukleotide können synthetisch hergestellt und so modifiziert werden, dass eine ausreichende Stabilität gegenüber abbauenden Enzymen gewährleistet ist. Antisense-Oligonukleotide werden von Zellen über Rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommen. Zudem kann durch die Verwendung bestimmter Träger-Lipide eine Verbesserung der Aufnahme und eine für die Wirkung der Oli-

gonukleotide günstigere intrazelluläre Verteilung erreicht werden⁶². Die Wirksamkeit von Antisense-Oligonukleotiden in Zellkulturen und in Tiermodellen ist gut belegt^{63,64}. Obwohl das Wirkprinzip von Antisense-Oligonukleotiden erstmals 1978 gezeigt werden konnte⁶⁵, ist es bis heute nicht vollständig gelungen, die letzten Hürden hinsichtlich einer therapeutischen Anwendung zu überwinden.

Neben der gezielten Antisense-vermittelten Hemmung des Ziel-Proteins werden zusätzlich weitere Wirkungen von Antisense-Oligonukleotiden nachgewiesen, die unabhängig vom Antisense-Effekt auftreten. Diese sogenannten nicht-Antisense-vermittelten Wirkungen von Oligonukleotiden beruhen meistens auf deren Bindung an Proteinen^{66,67}. Die Bindung von Antisense-Oligonukleotiden an die einzelnen Proteine kann abhängig oder unabhängig von der Basenabfolge des Oligonukleotids auftreten. Die dadurch entstehenden nicht-Antisense-vermittelten Effekte werden von der Art der chemischen Modifikation des Oligonukleotids beeinflusst. In verschiedenen experimentellen Systemen konnten als nicht-Antisense vermittelte Effekte anti-virale, anti-adhäsive und immunstimulierende Wirkungen, sowie eine Hemmung der Gefäßneubildung identifiziert werden⁶⁸. Die Gesamtwirkung eines Oligonukleotids setzt sich aus beiden Komponenten, Antisense- und nicht-Antisense-vermittelten Effekten, zusammen.

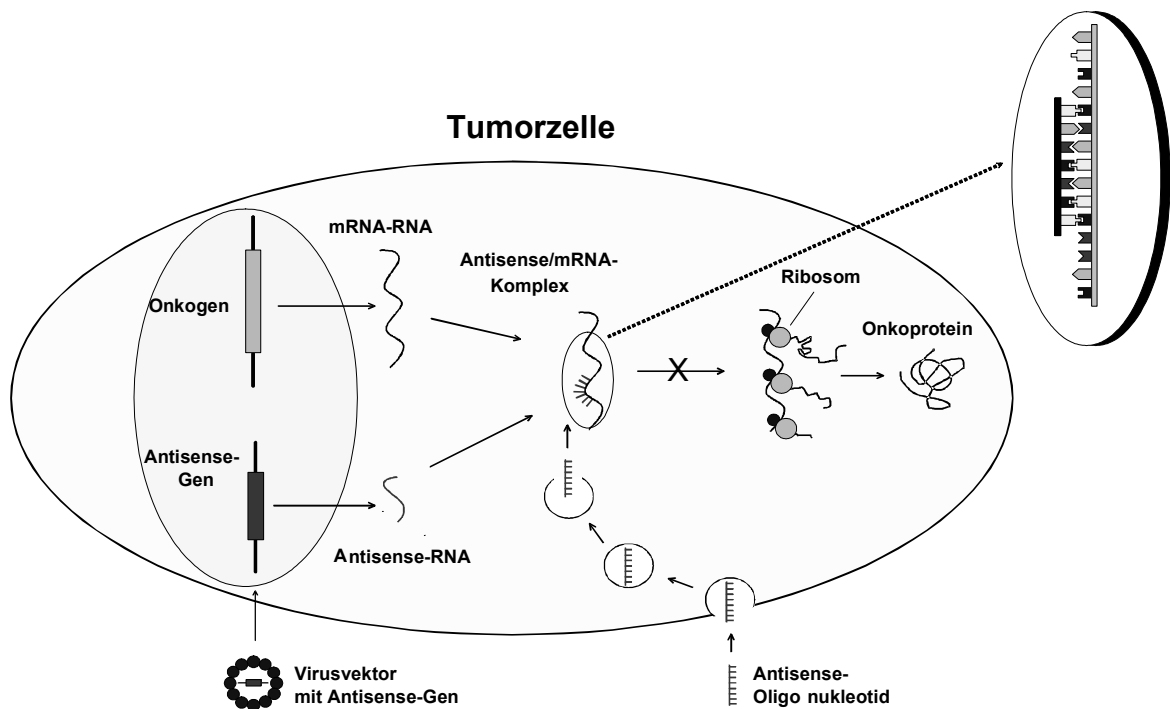


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Wirkweise von Antisense-ODN (modifiziert nach Kronenwett R et al.⁶⁹)

A.III.1. Voraussetzungen für die Wirksamkeit von Antisense-Oligonukleotiden

Um eine spezifische biologische Wirkung in einer Zelle zu erreichen, müssen Antisense-Oligonukleotide mehrere Voraussetzungen erfüllen.

Die Stabilität der Antisense-ODN spielt eine wichtige Rolle, da Einzelstrang-DNA durch extra- und intrazelluläre Endo- und Exonukleasen innerhalb von wenigen Minuten degradiert werden kann. Sowohl bei der ex vivo-, als auch bei der in vivo- Anwendung ist der Abbau durch Serum-Nukleasen ein Problem. Durch chemische Modifikationen, wie z.B. der Verwendung von Methylphosphonat- und Phosphorothioat-Kopplungen, entstehen Nuklease-resistente Antisense-ODN⁷⁰. In der vorliegenden Arbeit wurden Antisense-ODN verwendet, die durchgängig durch Phosphorothioatbindungen modifiziert wurden und so vor Exonukleasen geschützt ~~waren~~⁷¹. Damit die spezifische Antisense-Wirkung entfalten zu können, müssen Antisense-ODN die Zellkompartimente erreichen, in denen sich die Zielmoleküle befinden. Die Antisense-ODN müssen in die Zelle eindringen und intrazellulär in ausreichender Konzentration vorliegen. Die Interaktion mit der Ziel-mRNA findet wahrscheinlich im Zellkern oder im Zytoplasma statt. Dazu müssen die Antisense-ODN die Zellmembran penetrieren. Eine passive Diffusion ist aufgrund des polyanionischen Charakters der Antisense-ODN nicht möglich, jedoch können sie durch Endozytose aufgenommen werden^{72,73,74}. Aufgrund der geringen Kapazität des endozytotischen Transportes erreicht nur eine kleine Menge der extrazellulären Antisense-ODN das Zellinnere. Eine Lokalisation der Antisense-ODN in der Zellmembran oder in endo- oder lysosomalen Strukturen ist aber vermutlich nicht ausreichend⁷⁵. Der Suche nach effizienten Transfektionsmethoden kommt daher eine besondere Bedeutung zu. Eine Möglichkeit, die zelluläre Aufnahme von ODN zu verbessern, ist die Verwendung von kationischen Lipiden. Durch den Einsatz moderner Transfektionsreagenzien - kationische Lipide, die mit einem ungeladenen Helferlipid L-Dioleoyl-phosphatidylethanolamin (DOPE) gemischt sind, um so die Fusion mit der Zelle zu erleichtern⁷⁶ - können die Liposomen-ODN-Komplexe mit der Zellmembran fusionieren. Die ODN gelangen dadurch über "Endozytose" leichter in die Zelle.

Die Bindung an die Ziel-mRNA muss möglichst spezifisch sein. Sind weitere Bindungspartner wie Proteine oder andere Nukleinsäuren vorhanden, kann die Interaktion mit der gewünschten Ziel-RNA abgeschwächt oder verhindert werden. Spezifische Ziele lassen sich durch Sequenzvergleiche in Datenbanken oder durch in vitro- Selektionsverfahren ausfindig machen^{77,78,79}. Eine moderne und erfolgversprechende

Methode ist die Computer-unterstützte Sekundärstrukturanalyse einer gegebenen mRNA Sequenz. Um eine Liste möglicher erfolgsversprechender Motive zu erstellen, werden Strukturabschnitte der mRNA Sequenz in ihren energieärmsten Zuständen verglichen und nach erfolgsversprechenden Motiven, sogenannten „Loops“, „Bulges“, „Joint Sequences“ oder „Free Ends“ gezielt gesucht. Diese Methode erzielt eine höhere Wahrscheinlichkeit bei der Auswahl effektiver Antisense-ODN, doch kann sie die Überprüfung in Zellkultur-Experimenten zusammen mit Kontroll-ODN nicht ersetzen. Ist das Ziel der Antisense-ODN ein Gen, das für eine RNA oder ein Protein mit langer Halbwertszeit kodiert, müssen die Antisense-ODN lange genug in ausreichender Konzentration in der Zelle vorhanden sein. Das bedeutet, intakte Antisense-ODN müssen eine hinreichende intrazelluläre Halbwertszeit besitzen und dürfen nicht zu schnell durch exozytotische Prozesse eliminiert werden, um Effekte auf RNA- oder Proteinniveau zu erreichen⁸⁰. Dieses Problem kann über chemische Modifikationen an den Antisense-ODN gelöst werden, die so für eine ausreichende Stabilität sorgen.

A.III.2. Therapeutische Konzepte

Antisense-ODN hemmen die Bildung von Zielproteinen. Bei inflammatorischen, onkologischen und viralen Erkrankungen sind Proteine bekannt, die wesentlich zur Pathogenese der jeweiligen Erkrankung beitragen. So führt bei inflammatorischen Erkrankungen die Hemmung der Bildung proinflammatorischer Zytokine und leukozytärer/endothelialer Adhäsionsmoleküle zu einer Verminderung der unerwünschten Entzündungsreaktion. Beispielsweise wurde für das pro-inflammatorische Zytokin Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF) eine zentrale Mediatorfunktion bei akuten und chronischen entzündlichen Erkrankungen nachgewiesen⁸¹. Die Synthese von TNF kann mit Antisense-Oligonukleotiden in Zellkulturen spezifisch gehemmt werden⁸². Unter den leukozytären Adhäsionsmolekülen besitzt ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1) eine zentrale Bedeutung bei der Bindung verschiedener Entzündungszellen untereinander und an das Gefäßendothel. Mit der Hemmung der Expression von ICAM-1 durch Antisense-Oligonukleotide ist daher ein entzündungshemmender Effekt zu erwarten⁸³.

Bei Leukämie-Zelllinien führt die Hemmung der Proteinkinase A-I (PKA-I) mit einem Antisense-Oligonukleotid zu einer Gleichgewichtsverschiebung zugunsten der Expression der Proteinkinase A-II (PKA-II). Damit verbunden ist eine Hemmung der Pro-

liferation und eine zunehmende Differenzierung der Tumorzellen. Auch für die Hemmung der Expression der Proteinkinasen C-a (PKC-a) mit Antisense-Oligonukleotiden konnte eine Verminderung des Wachstums von verschiedenen tierexperimentellen Tumoren nachgewiesen werden^{84,85,86}.

Neben Proteinkinasen bieten die Apoptose-assoziierten Proteine einen wichtigen übergeordneten Angriffspunkt bei Tumoren. In einem intakten Zellverband wird in einer Zelle mit einem irreparablen Schaden am Erbgut die Apoptose ausgelöst. Das Apoptose-Schutzprotein bcl-2 (B-cell leukemia/lymphoma-2) erhöht die Schwelle ab der die Apoptose in Gang gesetzt wird. Tumorzellen weisen ausgeprägte Veränderungen im Erbgut auf und schützen sich gegenüber dem programmierten Zelltod durch eine verstärkte Expression des Apoptose-Schutzproteins bcl-2. Die therapeutische Hemmung der Bildung von bcl-2 durch Antisense-Oligonukleotide kann somit Apoptose induzieren⁸⁷. Da viele Chemotherapeutika über eine Induktion der Apoptose wirken, ist die Kombination von Chemotherapeutika mit einer Hemmung der bcl-2 Expression besonders erfolgsversprechend⁸⁸.

A.III.3. Klinische Studien

Die wichtigsten klinischen Studien über Antisense-ODN sind in Tabelle 1 zusammengefaßt. Die systemische Applikation von Antisense-Oligonukleotide in therapeutischer Dosierung war in allen Studien bisher gut verträglich.

Das Konzept einer zielgerichteten Hemmung der Bildung krankheitsverursachender Proteine mit Antisense-Oligonukleotiden zeigt in klinischen Studien bei viralen, inflammatorischen und Tumor-Erkrankungen erste positive Ergebnisse. Die Wirksamkeit eines Antisense-Oligonukleotids gegen die CMV-Retinitis bei AIDS-Patienten ist nachgewiesen. Die Untersuchungen bei Patienten mit Morbus Crohn und mit Non-Hodgkin-Lymphomen wurden bisher an kleinen Patientenkollektiven durchgeführt und bedürfen der Bestätigung in größeren Studien.

Oligonukleotide mit verbesserten Eigenschaften sind in der Entwicklung⁸⁹. Die chemischen Modifikationen dieser Oligonukleotide gewährleisten sowohl eine höhere Affinität an die Ziel-RNA, als auch eine höhere Stabilität gegenüber Nukleasen. Damit verbunden ist eine Verstärkung der spezifischen Antisense-Wirkung und eine Verminderung von begleitenden unerwünschten nicht-Antisense-Effekten. Einzelne dieser Verbindungen zeigen auch nach oraler Applikation eine ausreichende Bioverfügbarkeit.

Stadium	Indikation	Ziel-Protein	Name	Firma
Phase III	CMV-Retinitis bei AIDS	CMV-Protein1	ISIS 2922 (Fomivirsen)	ISIS/Novartis
Phase II	Morbus Crohn, Colitis ulcerosa, Rheumatoide Arthritis, Psoriasis, Nierentransplantat- abstoßung	ICAM-1	ISIS 2302	ISIS
	Solide Tumoren	PKC-a3	ISIS 3521	ISIS/Novartis
	Solide Tumoren	c-raf Kinase4	ISIS 5132	ISIS/Novartis
	CMV-Infektion	CMV-Protein	GEM 132*	Hybridon
Phase I	Non-Hodgkin-Lymphom	bcl-25	G3139	Genta
	Solide Tumoren	Ha-ras6	ISIS 2503	ISIS
	HIV7-Infektion	HIV-Protein	ISIS 5320	ISIS/NCI8
	HIV-Infektion	HIV-Protein	GPs0193	Chugai
	HIV-Infektion	HIV-Protein	AR177	Aronex
	HIV-Infektion	HIV-Protein	GEM 92* +	Hybridon
	CML9	-	-	Lynx
	AML10	-	-	Lynx

Tabelle 1: Klinische Studien mit Antisense-Oligonukleotiden

B. Material und Methoden

B.I. Identifikation und Auswahl geeigneter mRNA-Zielstrukturen für Antisense-ODN

Zwischen der mRNA-Zielstruktur und der Effektivität von Antisense-ODN gegen diese Zielstrukturen bestehen Beziehungen, die man bei der Auswahl neuer Antisensesequenzen in seine Überlegungen mit einbeziehen sollte. Zu den wichtigsten gehören: die Möglichkeit, dass endständige Nukleotide das Annealing von AS-ODN einleiten können, die spezifischen Sequenzeigenarten der Antisense- und der Zielsequenz, die Sequenzeigenarten, die eine schon beschriebene wichtige Rolle für die Funktion und die Effektivität der Sequenz haben, und die möglichen biologischen Funktionen der umschriebenen Zielsequenz⁹⁰.

Bei der Identifizierung geeigneter Zielstrukturen für den Einsatz kurzkettiger Antisense ODN übernimmt in struktureller Hinsicht die lokale Zielstruktur der Ziel-RNA den Haupteinfluß auf die Annealing-Fähigkeit von Oligonukleotiden mit der Ziel-RNA. Die Effekte von möglichen Strukturbildungen der ODN sind zu vernachlässigen. Vorherige Arbeiten haben gezeigt, dass zu den aussichtsreichsten lokalen Zielstrukturen sogenannte Stem-Loops (Schleifen) mit einer minimalen Größe von ~10nt, Bulges (Ausbuchtungen), Joint Sequenzen (die eine Verbindung zu aufeinander folgenden Sequenzen herstellen) und endständige Sequenzen (welche keine direkten Auswirkungen auf intramolekulare Interaktionen besitzen) gehören.

Es wurde die Computer Software mfold 2.0, die auf dem Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources (HUSAR, Version 4.0, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) hinterlegt ist,⁹¹ verwendet. Mfold2.0 ermöglicht Vorhersagen über mögliche Sekundärstrukturen einer gegebenen DNA- oder RNA-Sequenz. Die Zielstruktur konnte durch die verwendete Hard- und Software nicht in ihrer ganzen Länge am Stück dargestellt werden. Daher wurde die α v-mRNA in einzelne Subsequenzen (Windows) von 1400 nt zerlegt und die einzelnen Windows in separaten Rechenschritten um 250 nt vom 5'-Ende bis hin zum 3'-Ende der mRNA verschoben. Um eine Liste möglicher erfolgsversprechender Motive zu erstellen, wurden die verschiedenen überlappenden Strukturabschnitte in ihren energieärmsten Zuständen verglichen und ihre Ergebnisse über die günstigsten Ziel-Strukturen für Antisense-ODN, wie große Loops, Bulges, Joints und Free-Ends zusammengetragen⁹². Die endgültigen Antisense-ODN Sequenzen wurden nach Erfahrungskriterien ausgewählt. Aus

diesem theoretischen Analyseansatz sind 10 unserer 12 getesteten ODN's hervorgegangen (siehe Tabelle 2).

Frühere Arbeiten zeigten, dass die AUG-Startregion - unabhängig von ihrer theoretischen Struktur - eine geeignete Zielstruktur darstellt. Antisense-ODN, die gegen das Start Kodon oder seiner unmittelbar folgenden Sequenz gerichtet sind, wirken über andere Mechanismen, als über den üblich angenommenen Weg, der RNase H Aktivität. Daher wurden zwei Antisense-ODN ($\alpha v32$ und $\alpha v35$) gegen das Translations-Initiationskodon ausgewählt⁹⁰.

B.II. Oligodesoxyribonukleotide

B.II.1. Synthese

Die Antisense-ODN und die Kontroll-ODN wurden als Phosphorothioat-Derivate von einem kommerziellen Hersteller (Interactiva, Ulm) synthetisiert. Die ODN wurden vom Hersteller durch reverse-phase-HPLC (high performance liquid chromatography) gereinigt und anschließend lyophilisiert. Bevor die ODN benutzt werden konnten, wurde das Lyophilisat mit PBS gelöst und auf eine Konzentration von 100 μ M eingestellt. Die Stammlösung wurde bei -20°C gelagert.

B.II.2. Sequenzen

Die verwendeten Oligodesoxyribonukleotid-Sequenzen sind in Tabelle 2 aufgelistet. Die ODN $\alpha v32$ und $\alpha v35$ sind gegen die AUG-Region gerichtet, alle anderen Antisense-ODN wurden unter wie unter B.I. beschrieben ausgewählt. Vor den Versuchsreihen wurden die Sequenzen der Antisense- und der Kontroll-ODN mit dem Computerprogramm BLASTN 2.1.3 (National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD) auf mögliche Übereinstimmung / Überschneidungen mit Sequenzen aus der Nukleotid Datenbank der NCBI hin überprüft.

Name	Sequenz	Position ⁹²
Antisense-ODN		
α V32	5'-GAAAAGCCATCGCCGAAGTG-3'	32-52
α V35	5'-GCGGAAAAGCCATCGCCGAA-3'	35-55
α V3698	5'-TTCTACCATATGAGTGATTA-3'	3698-3717
α V3717	5'-CATGTATGTGTTTATAAAAT-3'	3717-3736
α V3869	5'-TTGAAGGATTTGACCTAAAA-3'	3869-3888
α V3880	5'-TATAGGTTGGCTTGAAGGAT-3'	3880-3899
α V4044	5'-AATAAAATGCTTTTTTTTATA-3'	4044-4063
α V4050	5'-TATTTTAATAAAATGCTTTT-3'	4050-4069
α V4174	5'-TGGAAATATAAGGAAAAGTA-3'	4174-4193
α V4175	5'-TTGGAAATATAAGGAAAAGT-3'	4175-4194
α V4182	5'-AACAGTTTTTGGAAATATAAG-3'	4182-4201
α V4806	5'-GAATATATTCTCAAGATTAG-3'	4806-4825
Kontroll-ODN		
rs- α V32	5'-GTGAAGCCGCTACCGAAAAG-3'	
rs- α V35	5'-AAGCCGCTACCGAAAAGGCG-3'	
rs- α V3880	5'-TAGGAAGTTCGGTTGGATAT-3'	
rs- α V4182	5'-GAATATAAAGGTTTTGACAA-3'	
icam1840	5'-ATCAGATGCGTGGCCTAGTG-3'	
rs-icam1840	5'-GTGATCCGGTGCGTAGACTA-3'	

Tabelle 2. Auflistung der verwendeten α V-Sequenzen und ihrer genauen Position, laut Suzuki S. J Biol Chem. 1987;262:14080-14085.

B.III. Zelllinien und Zellkultur**B.III.1. HUVEC**

Primäre menschliche Endothelzellen, die aus den Venen der Nabelschnur gewonnen werden (HUVEC), wurden bei der Firma PromoCell (Heidelberg, Deutschland) gekauft und nach Herstellerangaben kultiviert. Als Medium diente das "Endothelial Cell Growth Medium" mit folgenden Zusätzen: 2% FCS, 0,1 ng/ml "Epidermal Growth Factor", 1 µg/ml Hydrocortison, 1 ng/ml "Basic Fibroblast Growth Factor", 0,4% "Bovine Hypothalamic Extract" mit Heparin, 50 ng/ml Amphotericin B und 50 µg/ml Gentamicin. Das Medium und die Zusätze wurden ebenfalls von der Firma PromoCell (Heidelberg, Deutschland) geliefert. Die Zellen wurden ab der dritten Passage in 125 cm² Zellkulturflaschen (Cellstar® Greiner, Frickenhausen, Deutschland) in Kultur genommen und bis zur 8.- 10.-Passage für Experimente genutzt. Die Zellen wurden zweimal durch Trypsinierung passagiert.

B.III.2. Trypsinierung von Endothelzellen

Das Medium der Zellkulturflasche wurde von der adhärennten Endothelzellschicht abgenommen und einmal mit 5 ml sterilem PBS gewaschen, um Reste des serumhaltigen Mediums zu entfernen. Zur Passagierung wurde das Detach-Kit (HepesBSS, Trypsin/EDTA, Trypsin Neutralizing Solution (TNS)) der Firma Firma PromoCell (Heidelberg, Deutschland) verwendet. Die Endothelzellschicht wurde mit 0,5 ml 37°C vorgewärmtem Trypsin/EDTA (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) überschichtet und 3 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 1,5 ml Trypsin Neutralizing Solution (TNS) (PromoCell, Heidelberg, Deutschland) wurde das Trypsin inaktiviert. Die Zellen wurden anschließend durch sorgfältiges Mischen in Suspension gebracht und etwa 1,8 - 2,5 10⁵ Zellen mit 5 ml "Endothelial Cell Growth Medium" mit den oben beschriebenen Zusätzen erneut kultiviert.

B.IV. Transfektion der HUVEC mit Antisense-ODN und Lipofektin®

Die HUVEC wurden nach Herstellerangaben behandelt und in Kultur genommen. Für die Transfektion wurden sie in einer Dichte von 1-2 x 10⁵ Zellen/well in eine 6-well

Kulturplatte (Cellstar® Greiner, Frickenhausen, Deutschland) überführt und bis zu einer Konfluenz von 60-80% kultiviert.

Zunächst wurden 500 µl Opti-MEM Medium (Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland) und 5µg/ml eines kationischen Lipids DOTMA/DOPE (Lipofectin®, Life Technologies) zusammen pipettiert und entsprechend der benötigten Mengen ein Master-Mix erstellt. Der Master-Mix wurde zwischen einer halben und einer dreiviertel Stunde bei Raumtemperatur vorinkubiert. Desweiteren wurden 500 µl Opti-MEM Medium in ein Eppendorf Tube (1,5 ml) vorgelegt und mit der gewünschten Menge an Antisense-ODN auf die Endkonzentrationen zwischen 0,035 µM bis und 0,1 µM AS-ODN versetzt. Das "Endothelial Cell Growth Medium" mit Zusätzen wurde aus den 6-Well Platten abgenommen und anschließend die Zellen vorsichtig zweimal mit 1 ml Opti-MEM Medium gewaschen. Nach dem Waschen wurden pro Well jeweils 500 µl des Master-Mix aus Opti-MEM und Lipofectin® zu den Zellen pipettiert und 500 µl des Opti-MEM-AS-ODN Gemischs tropfenweise hinzupipettiert. Die Zellen wurden für vier Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Medium abgenommen, durch 1 ml Medium 199 mit 10% FCS und 2mM L-Glutamin ersetzt und für weitere vier Stunden bei 37°C inkubiert. Zuletzt wurde das Medium wiederum gegen 2 ml frisches Medium 199 inklusive Zusätze ersetzt und zusätzlich noch mit 200µg/ml Phorbol 12-myristate 13-Acetat (PMA) versetzt, um eine α_v -Expression zu induzieren. Immunfluoreszenz-Analysen, RNA-Extraktionen und funktionelle Tests wurden im Anschluß an eine 40-stündige PMA-Stimulation durchgeführt. Für die genannten weiteren Analysen und Tests, wurden die behandelten HUVEC mit Hilfe von 1 ml vorgewärmten (37°C) Trypsin/EDTA nach einer Einwirkzeit von 3 bis 5 Minuten von den Platten entfernt und entsprechend weiter behandelt.

B.V. Immunfluoreszenzfärbung und Durchflusszytometrie (FACS)

Die gewaschenen HUVEC in Suspension wurden in 15 ml Medium 199 überführt, abzentrifugiert und danach in insgesamt 500 µl PBS resuspendiert. Etwa 1 bis 2 x 10⁵ Zellen (in 250 µl) wurden mit 10 µl Isothiocyanate (FITC)-konjugierten α_v /CD51 monoklonalen Antikörpern (Clone AMF7, Immunotech, Krefeld, Deutschland) oder dem Isotyp-identischen Kontrollantikörper (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) in 1% BSA-haltigem PBS bei Raumtemperatur für 16 Minuten im Dunkeln inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Proben mit 1000 µl PBS aufgefüllt und er-

neut abzentrifugiert, in 200 μ l FACSFlow (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) mit 0,5 % Formalinlösung resuspendiert und sofort auf ihre α v Expression hin analysiert. Die durchflusszytometrische Analyse erfolgte mit einem Becton Dickinson FACSCalibur (Heidelberg). Zur Fluoreszenzmessung wurden für FITC ein 530/15 nm - Filter und für PE, bei Zweifarben-Immunfluoreszenz-Analyse (siehe B.VIII.2.) ein 575/36 nm - Filter eingesetzt und später, nachdem auf lebendige Zellen, über den Nachweis von AnnexinV oder Viaprobe "gated" wurde, mit der Becton Dickinson CELL QUEST Software (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) analysiert und ausgewertet. Für die Zweifarben-Immunfluoreszenz-Analyse wurde eine Darstellung als FI1/FI2 "Dot Plot" gewählt. Die mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) wurde von der Software berechnet und in relativen Einheiten angegeben.

B.VI. RT-PCR

B.VI.1. RNA-Extraktion

Nach der Transfektion von HUVEC mit α v-gerichteten Antisense-ODN wurde die zelluläre RNA mit Hilfe des "RNeasy RNA-Isolations-Kit" (Qiagen, Hilden) extrahiert. Dazu wurden 1,5 bis 4 $\times 10^5$ transfizierte Zellen kurz abzentrifugiert, der Überstand verworfen, die Zellen in 350 μ l RLT-Puffer (im KIT enthalten), der mit 10 μ l/ml β -Mercaptoethanol versetzt wurde, aufgenommen und durch 1-minütiges kräftiges „Vortexen“ lysiert. Danach wurden 350 μ l Ethanol 70% hinzugegeben und gut gemischt. Der Ansatz wurde anschließend auf eine Rneasy-Zentrifugationssäule aufgetragen und 30 Sekunden bei 10.000 g zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen, die Säule in ein Sammelröhrchen eingebracht und 650 μ l RW1 Waschpuffer hinzugegeben. Nach einer Minute Zentrifugation bei 10.000 g und Verwerfen des Durchflusses wurden 500 μ l RPE Wasch-Puffer auf die Säule gegeben und wiederum eine Minute bei 10.000 g zentrifugiert. Nach Einbringen der Säule in ein neues Sammelröhrchen und nochmaliger Zugabe von 500 μ l RPE-Wasch-Puffer wurde 2 Minuten bei 12.000 g zentrifugiert und danach die trockene Säule vorsichtig entnommen. Anschließend wurde die RNA mit 30 μ l Wasser durch einminütige Zentrifugation bei 10.000 g eluiert und die reverse Transkription unmittelbar angeschlossen.

B.VI.2. Reverse Transkription (RT)

Zu 19 µl RNA-Eluat (0,5 µg/µl) wurden 21 µl cDNA-Mix mit M-MLV-RT und RNasin hinzugegeben und 2 Stunden bei 37 °C, danach 10 Minuten bei 65 °C inkubiert. Der cDNA-Mix bestand aus: 10,5 µl 5xGibco-M-MLV-Puffer, 0,53 µl Gibco-DTT (0,1 M), 2,1 µl 4xdNTPs (je 25 mM), 1,1 µl pdN₆-Lösung [539 µl H₂O, 21 µl KCl (0,5 M), 50 U pdN₆] und 10,3 µl RNase freies H₂O. Aus dem Mix wurden 19 µl von 24,53 µl entnommen. Die Angaben beziehen sich auf eine einzelne Probe, für die Versuchsreihen wurde ein Master-Mix entsprechend der benötigten Menge angefertigt. Unmittelbar vor jeder reversen Transkription wurden zu den 19µl des cDNA-Mix, 1,33 µl M-MLV-RT (Gibco, 200 u/µl) und 0,67 µl RNasin (Gibco, 40 u/µl) hinzugegeben. Die RT wurde auf dem "Mastercycler personal" der Firma Eppendorf (Eppendorf, Köln, Deutschland) durchgeführt.

B.VI.3. PCR

Primer Sequenzen:

α v-SE	5'-GGC TTT TTT AAA CGG GTC CGG-3'
α v-AS	5'-GTG GGT CAA GAT GTA GC-3'
GAPDH-SE-487	5'-TCC ATG ACA ACT TTG GTA TCG-3'
GAPDH-AS-863	5'-GTC GCT GTT GAA GTC AGA GGA-3'

Zur Amplifizierung der α v-cDNA wurde eine RT-PCR durchgeführt. Pro Ansatz wurden 5,0 µl 10xPuffer (Gibco), 4 µl 4xdNTPs (10 mM), 1,0 µl Primer α v-SE (100 µM), 1,0 µl Primer α v-AS (100 µM), 0,8 µl MgCl₂ (125 mM), 0,5 µl Gibco-Taq-Pol (250U) und 37,5 µl H₂O als Mastermix (45 µl pro Ansatz) angesetzt und einzeln mit jeweils 5 µl cDNA aus der reversen Transkription auf 50 µl aufgefüllt. In einer Kontroll-PCR für GAPDH wurden statt α v-SE und α v-AS die beiden Primer GAPDH-SE-487 und GAPDH-AS-863 in einer Endkonzentration von jeweils 2 µM eingesetzt. Die PCR wurde mit einem "Mastercycler personal" PCR-System (Eppendorf, Köln, Deutschland) durchgeführt. Nach einer Denaturierungsphase von 3 Minuten bei 95 °C folgten 35 Zyklen mit jeweils 60 Sekunden Denaturierung bei 95 °C, 60 Sekunden Primer-Annealing bei 54 °C und eine Minute Kettenverlängerung bei 72 °C. Der letzte Ket-

tenverlängerungsschritt war 10 Minuten lang, um eine komplette Synthese der amplifizierten DNA sicherzustellen.

B.VI.4. Agarosegel-Elektrophorese

Die PCR-Produkte wurden mittels einer 1,8% Agarosegel-Elektrophorese analysiert. Hierzu wurden 1,8 g Agarose (Life Technologies, Paisley, Schottland) zu einem Endvolumen von 100 ml in 1x TBE Puffer (5x TBE Ansatz: 108 g Tris, 55 g Borsäure, 9,3 g EDTA auf 2 Liter destilliertes Wasser) durch Erhitzen in einem Mikrowellengerät gelöst, und bis zum Verfestigen in der Gelkammer stehengelassen. 10 µl PCR-Produkt wurden mit 2 µl 6x Auftragspuffer (Blue/Orange Loading Dye 6x) versetzt und 12 µl aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit 110 V etwa 1,5 Stunden lang durchgeführt.

Danach wurde das Agarosegel für 1-2 Stunden in ein Wasserbad aus destilliertem Wasser (600 ml) und Ethidiumbromid (60 µl) gelegt, um die PCR-Produkte zu färben. Um den Kontrast der Banden zu erhöhen, wurde das gefärbte Agarosegel für 30 Minuten mit normalem Wasser entfärbt und danach unter UV Licht betrachtet und abgeleuchtet.

B.VII. Quantitative “Real-Time“ RT-PCR

B.VII.1. Prinzip der “Real-Time“ RT-PCR

Um eine Sequenz-Spezifikation der detektierten PCR-Produkte zu ermöglichen, wurde ein spezielles Sonden-Format auf dem LightCycler etabliert. Das sogenannte Hybridisierungs-Format wurde für die DNA-Detektion und -Quantifizierung entwickelt und ermöglicht eine maximale Spezifikation der PCR Produkte. Das Hybridisierungs-Format beruht auf zwei, speziell für das erwünschte PCR-Produkt hergestellten, Hybridisierungssonden. Eine der Hybridisierungssonden ist an ihrem 3' Ende mit Fluoreszein und die zweite Hybridisierungssonde an ihrem 5' Ende mit LightCycler Red640 markiert (A.). Die Sequenzen der zwei Sonden sind so beschaffen, dass sie beide an die amplifizierten DNA Fragmente hybridisieren können. In jeder Annealing-Phase binden die Sonden an die entstandenen PCR-Produkte. Treten beide

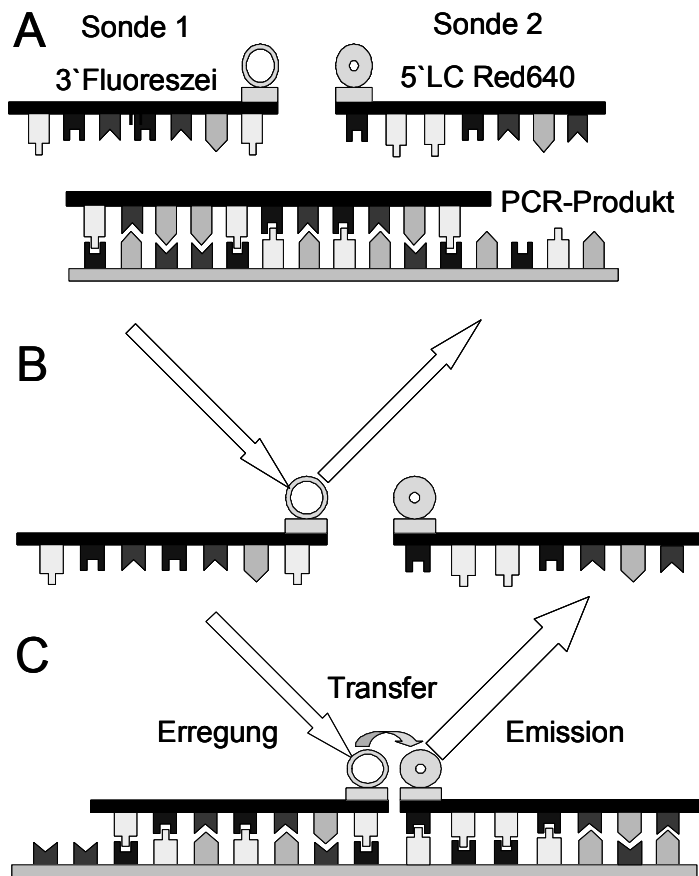


Abbildung 4: Schematische Darstellung des FRET-Prinzips mittels Hybridisierungssonde.

Fluoreszenz-Farbstoffe in unmittelbarem Kontakt (zwischen 1 und 5 Nukleotiden), wird die emittierte Energie der Fluoreszenz-Hybridisierungssonde auf die zweite Hybridisierungssonde übertragen. Dieser Vorgang wird als FRET (Fluorescence resonance energy-transfer) bezeichnet (C.). FRET entsteht dadurch, dass der Fluoreszenz-Farbstoff durch die blaue LED Diode (470nm) des LightCyclers angeregt wird und grünes Licht einer etwas größeren Wellenlänge emittiert (B.). Wenn durch den unmittelbaren Kontakt der beiden Fluoreszenz-Farbstoffe die emittierte Energie

der Fluoreszenz-Hybridisierungssonde auf die zweite Hybridisierungssonde übertragen wird, dann wird der zweite Fluoreszenzfarbstoff LightCycler Red640 angeregt, welcher ein Rotfluoreszierendes Licht einer höheren Wellenlänge absondert (C.). Die Lichtintensität des LightCycler Red640 wird anschließend über den zweiten Kanal des LightCyclers gemessen und "online" angezeigt. Da das LightCycler Red640 Licht nur emittiert wird, wenn beide Oligonukleotide an die Probe hybridisieren, kann die Fluoreszenz nur während der Annealing-Phase gemessen werden. Die Menge des emittierten Lichts ist proportional zur Menge an PCR-Produkten. Die Quantifizierung der Produkt-Menge ist in jeder Annealing-Phase der "Real-Time"-PCR möglich.

B.VII.2. Quantitative "Real-Time" RT-PCR mittels Hybridisierungssonden

Die RNA-Extraktion und die Reverse Transkription (RT) wurden wie unter B.VI.1. und B.VI.2. beschrieben und durchgeführt.

Primer Sequenzen:

ITGAV-A	5'-CTA ATT CTA GTG GGT CAA GAT GTA GC-3'
ITGAV-S	5'-GTA TTT GTA ATG TAC AGG ATG GGC T-3'
GAPDH-F	5'-TCC ATG ACA ACT TTG GTA TCG -3'
GAPDH-R	5'-GTC GCT GTT GAA GTC AGA GGA -3'

Hybridisierungssonden :

ITGAV-FL	5'- TTC CTT ACA CAT TTT CAT GAG GTT GA - Fluorescein
ITGAV-LC	5'- CTG CTC CCT TTC TTG TTC TTC TTG AG - LC Red640
GAPDH-1 FL	5'- TGT CCC CAC TGC CAA CGT GTC AG - Fluorescein
GAPDH-1 LC	5'- GGT GGA CCT GAC CTG CGT CTA GA - LC Red 640

Die hier verwendeten Primer und Hybridisierungssonden wurden von der Firma TIB MOLBIOL (Berlin, Deutschland) gestaltet und synthetisiert.

Zur Amplifizierung des αv -Genes wurde eine quantitative "Real-Time" RT-PCR durchgeführt. Es wurde das "LightCycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes" Kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland) verwendet und nach Herstellerangaben verwendet. Pro Ansatz wurden 1,5 μ l ITGAV-FL (0,15 μ M), 1,5 μ l ITGAV-LC (0,15 μ M), 2 μ l aus einem 10 mM Primer Mix aus ITGAV-S (1 μ M) und ITGAV-A (1 μ M), 2,4 μ l $MgCl_2$ (4 mM), 2 μ l LC-FastStart DNA Master (1x) und 8,6 μ l steriles H_2O als Mastermix (18 μ l pro Ansatz) angesetzt und einzeln mit jeweils 2 μ l cDNA aus der reversen Transkription auf 20 μ l aufgefüllt. In einer Kontroll-PCR für GAPDH wurden die beiden Primer GAPDH-F und GAPDH-R in einer Endkonzentration von jeweils 0,5 μ M eingesetzt und die Hybridisierungssonden GAPDH-1 LC und GAPDH-1 FL in einer Endkonzentration von je 0,15 μ M. Die quantitative "Real-Time" RT-PCR wurde auf dem LightCycler Instrument der Firma Roche durchgeführt. Nach einer Vor-Inkubationszeit von 8 Minuten bei 95°C folgten 45 Zyklen mit jeweils 15 Sekunden Denaturierung bei 95 °C, 10 Sekunden Primer-Annealing bei 52°C und 15 Sekunden Kettenverlängerung bei 72°C. Die Fluoreszenzstärke (F2/F1) wurde über die Software "LightCycler SW3.5", der Firma Roche, einmal pro Zyklus, während der Annealing-Phase, detektiert. Die Software errechnete anhand der Fluoreszenzstärke in den einzelnen Zyklen die "Crossing Points" der Proben.

B.VII.3. Quantifizierung

Um die Ergebnisse aus der quantitativen Real-Time RT-PCR mittels Hybridisierungs-sonden zu quantifizieren, wurde eine Verdünnungsreihe (10-, 100-, 1000- und 10.000-fache Verdünnung) aus der cDNA einer unbehandelten HUVEC-Probe hergestellt. Die "Crossing Points" der αv - und GAPDH-PCR wurden ermittelt, in die RelQuant Software (Roche Molecular Biochemicals) übertragen und anhand dieser Daten konnten die Standardkurven der αv - und GAPDH-PCR errechnet werden. Die RelQuant Software ermöglichte uns, dass die beiden Standardkurven in allen späteren quantitativen αv RT-PCR's zur Analyse verwendet werden konnten, falls eine der oben beschriebenen 100- oder 1000-fachen cDNA Verdünnungen als Kalibrator während der "Real-Time" RT-PCR mitlief. Basierend auf den Werten der Kalibrator-Proben und der Standardkurven, konnte die RelQuant Software die Höhe der αv mRNA als αv /GAPDH Verhältnis errechnen. Das αv /GAPDH Verhältnis der Kalibrator-Proben wurde als 1 festgesetzt. Jede Probe wurde im Doppelansatz analysiert.

B.VIII. Funktionelle Untersuchungen

B.VIII.1. Proliferations-Test

Für die Beurteilung der Proliferationsrate wurde die Transfektion und Stimulation der HUVEC in 96-well-Platten (Cellstar® Greiner, Frickenhausen, Deutschland) durchgeführt. Das Volumen der Lipofektin/ODN Lösung wurde entsprechend den veränderten Größenverhältnisse von 1000 μ l auf 200 μ l reduziert. Nach einer 40-stündigen PMA-Stimulation wurde die Proliferationsrate mit Hilfe von Bromo-desoxyuridin(BrdU)-Einbau bestimmt. Hierfür verwendeten wir einen kommerziellen BrdU-ELISA Kit (Colorimetric Cell Proliferation ELISA BrdU, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers. Die HUVEC wurden 14 Stunden lang mit BrdU inkubiert. Nach der Immunzytochemischen-Färbung (entsprechend den Herstellerangaben), wurde die Absorption durch einen Wallac 1420 Victor² Multilabel Counter (Wallac, Turku, Finnland) bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenz-Wellenlänge von 690 nm bestimmt. Die Absorption der nicht-transfizierten PMA-stimulierten Zellen wurde als 100% gesetzt.

B.VIII.2. Apoptose-Test

Die Apoptoserate wurde mit Hilfe des "Annexin V Binding Assay" bestimmt. Der "Annexin V Binding Assay" beruht auf der Bindung des AnnexinV an früh-apoptotischen Zellen. Die HUVEC wurden, wie oben beschrieben transfiziert und mit PMA stimuliert. Es wurden aus jedem Well $1,5 \times 10^5$ Zellen in 200 μ l "Annexin V Binding Puffer" (Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) resuspendiert. Davon wurden 100 μ l mit 10 μ l PE/FITC-konjugiertem Kontrollantikörper (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) und 5 μ l Viaprobe (Pharmingen, Heidelberg, Deutschland), welches in der Lage ist, nekrotische Zellen zu färben, versetzt. Zu den restlichen 100 μ l wurden 10 μ l CD51/ α v-FITC monoklonaler Antikörper (Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland), 10 μ l Annexin V-PE (Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) und 5 μ l Viaprobe hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 4°C wurden die Zellen gewaschen und durch eine Dreifarben-Immunfluoreszenz mithilfe eines Dickinson FACSCalibur analysiert. Nachdem die Viaprobe negativen Zellen über ein Gate herausgenommen wurden, wurden die Expressionsdaten von α v und der Anteil an AnnexinV-positiven Zellen über die Cell Quest-Software (Becton Dickinson) bestimmt.

B.VIII.3. Migrations-Test

Die Migrationsfähigkeit von Antisense- und Kontrollsense-ODN behandelten HUVEC wurde mit Hilfe von Transwell-Polycarbonat-Membranen untersucht. Die Transwell-Microporen-Membranen mit einem Durchmesser von 24mm und einer Porengröße von 8 μ m (Costar, Bodenheim, Deutschland) teilten jedes Loch einer 6-Well-Platte in eine obere und untere Kammer. Bevor die Transwell-Membranen benutzt wurden, wurden sie über Nacht mit 10 ng/ml humanem Fibronektin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) bei 37°C inkubiert und anschließend nochmals für 30 Minuten mit 1% bovinem Serum-Albumin (BSA) in PBS inkubiert. Für den Migrations-Test wurden 500 μ l Medium 199 (versetzt mit 10% FCS, 2mM Glutamin) in die untere Kammer der Transwell-Membran gegeben. Die transfizierten HUVEC wurden nach 40-stündiger Stimulation mit PMA abtrypsiniert und einmal mit PBS gewaschen. 3×10^4 Zellen wurden in 500 μ l Medium 199 resuspendiert und anschließend in die obere Kammer gegeben. Nach einer weiteren Inkubation für 38 Stunden bei 37°C wurden die

migrierten Zellen aus der unteren Kammer mit PBS gewaschen und die lebenden (Trypanblau-negativen) Zellen mit Hilfe des Mikroskops ausgezählt.

B.VIII.4. Test zur Ausbildung von Kapillar-ähnlichen Strukturen aus Endothelzellen (Matrigel-Test)

Um die Fähigkeit zur Ausbildung von Kapillar-ähnlichen Gebilden durch HUVEC zu untersuchen, verwendeten wir das extrazelluläre Matrixpräparat Matrigel (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland). Matrigel ist ein lösliches Basalmembran Präparat, das aus dem Tumor der Engelbreth-Holm-Swarm Sarkom Maus hergestellt wird. Dieser Tumor ist reich an extrazellulären Matrix-Proteinen und stellt als Matrix alle wichtigen Substrate für unsere Untersuchungen der Kapillar-ähnlichen Gebilde bereit⁹³. Eine 48-Well-Platte wurde für 45 Minuten mit 100 µl Matrigel beschichtet. Die transfizierten HUVEC wurden nach 40-stündiger Stimulation mit PMA abtrypsiniert und einmal mit PBS gewaschen. $2,5 \times 10^4$ Zellen wurden in 500 µl Medium 199 (versetzt mit 10% FCS, 2mM Glutamin) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen auf die mit Matrigel beschichteten Wells gegeben und für 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Formationen der Kapillar-ähnlichen Strukturen wurden lichtmikroskopisch (Zeiss, Jena, Deutschland) untersucht. Von jedem Well wurden sechs verschiedene Fotos (Vergrößerungsfaktor 100) nach festgelegtem Schemata angefertigt. Zur Quantifizierung der Ergebnisse wurden die geschlossenen Ringstrukturen der Kapillar-ähnlichen Strukturen aller sechs Fotos eines Wells zusammengezählt.

B.VIII.5. *In Vitro*-Angiogenese-Test

Um das Anti-angiogenetische Potential unserer αv -gerichteten Antisense-ODN zu messen, benutzten wir einen kommerziellen Angiogenese-Test (Angiogenese Kit, CellSystems, St. Katharinen, Deutschland). Dieser Test besteht aus einer Kokultur von HUVEC mit menschlichen diploiden Fibroblasten dermalen Ursprungs, welche in der Lage sind, extrazelluläre Matrix-Proteine wie Kollagen I, Kollagen IV, Fibronektin, Elastin und Laminin zu bilden⁹⁴. Auf das Hinzufügen von weiteren Matrix-Proteinen oder Wachstumsfaktoren, die nicht in dem "Endothelial Growth Medium" (im Angiogenese Kit enthalten) enthalten sind, kann verzichtet werden. Die Endothelzellen pro-

liferieren und migrieren in einer 24-Well-Platte durch die von den Fibroblasten gebildete Matrix, und bilden ein Netzwerk aus sich verbindenden Röhrchen, welche dem Kapillarbett des "chick chorioallantoic membran assay"⁴ sehr ähnlich sind. Die Röhrchenformationen, wie oben beschrieben, wurden von Bishop ET über konfokale-Laser- und Elektronen-Mikroskopie gesichert⁹⁴. Der Angiogenese-Test wurde nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Am Tage der Zustellung (Tag 1) wurde das Wachstumsmedium der Kokultur durch vorgewärmtes Endothelial Growth Medium (im Angiogenese Kit enthalten) ersetzt, am 4. Tag wurde das Medium wieder gewechselt und zusätzlich wurden ab diesem Zeitpunkt die Testkomponenten zusammen mit dem Medium auf die Zellen gegeben. Das Austauschen des Mediums und seiner Testkomponenten wurden am 7.Tag und am 9.Tag wiederholt. Ansonsten wurde der Assay nicht aus dem Brutschrank bei 37°C entfernt, um Kontaminationen zu vermeiden und äußere Einflüsse so gering wie möglich zu halten. Die Endothelzellen wurden am 11.Tag fixiert und zur indirekten Immunozytochemie mit dem Antikörper gegen "von Willebrand Faktor" nach den Anweisungen des Herstellers (Cell-Systems, St. Katharinen, Deutschland) gefärbt. Jedes Well wurde nach einem festgelegtem Schema 5-mal (bei einer Vergrößerung um den Faktor 100) abfotografiert. Die Gesamtlänge aller sichtbaren Röhrchenstrukturen der 5 Fotos jedes einzelnen Lochs wurde zusammen gerechnet. Dabei wurde die Gesamtlänge der Röhrenstrukturen jedes einzelnen Fotos mit Hilfe eines Distanzmessers für Karten (ADAC, Düsseldorf, Deutschland) ermittelt und anhand der Skala umgerechnet.

Als Testkomponenten wurden Antisense- und Kontroll-ODN, sowie Sumarin, ein bekannter Angiogenese-Inhibitor, eingesetzt⁹⁵. Die ODN wurden entweder ohne Zugabe von Transfektions-Reagenzien in einer Endkonzentration von 0,5 µM oder zusammen mit kationischen Lipiden, in denselben Konzentrationen wie oben erwähnt, als Transfektions-Reagenzien in einer Endkonzentration von 0,035 oder 0,05µM eingesetzt. Die Transfektion wurde wie unter B.III.3. besprochen durchgeführt, mit der Ausnahme, dass Medium 199 durch das im Kit enthaltene "Endothelial Growth Medium" ersetzt wurde. Die Endkonzentration von Sumarin betrug 20µM.

B.IX. Statistische Analysen

Aus den erhaltenen Daten wurden Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet (EXCEL^{XP} und SPSS Version 10.0). Um das statistische Signifikanzniveau zu

bestimmen, wurde ein Student-t-Test für verbundene Stichproben durchgeführt. Verglichen wurden jeweils Antisense-ODN-behandelte mit Kontroll-ODN-behandelten Zellen. Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

C. Ergebnisse

C.I. Auswahl α v-gerichteter Antisense-ODN-Sequenzen

Die Effektivität von kurzkettigen Antisense-ODN ist von den Hybridisierungseigenschaften an die langkettige Ziel-mRNA abhängig. Da die Bindungsfähigkeit der Antisense-ODN von strukturellen Besonderheiten an der komplementären Ziel-mRNA abhängig ist, suchten wir nach den aussichtsreichsten lokalen Zielstrukturen, den sogenannten "Stem-Loops", "Bulges", "Joint Sequenzen" und endständigen Sequenzen. Wir identifizierten mittels Computer-gestützter Sekundärstrukturanalyse der α v-mRNA potentiell für AS-ODN zugängliche Regionen (Abb. 5). Dadurch ergaben sich fünf verschiedene Sequenz-Bereiche, die sich als günstige Zielregionen für Antisense-ODN anboten. Diese befanden sich innerhalb der 3' nicht-translatierten Region der α v-mRNA um die Positionen 3700, 3880 (Abb. 6A), 4050, 4180 (Abb. 6B) und 4800 bezogen auf die publizierte cDNA-Sequenz von Suzuki et al.⁹². Gegen die fünf Zielregionen wurde auf der Basis empirischer Selektions-Kriterien zehn verschiedene 20-mer Antisense Sequenzen ausgewählt. Weiterhin wurden zwei Antisense-ODN α v32 und α v35 gegen die AUG-Startregion ausgewählt, da frühere Arbeiten zeigten, dass das Translationsinitiationskodon eine geeignete Zielsequenz für Antisense-ODN darstellt. Zur Kontrolle wählten wir zwei Antisense-ODN aus, deren Nukleotid Sequenz wir in umgekehrter Reihenfolge anordneten (sog. "reversed sense ODN") und zwei weitere ODN, deren Sequenzen keinerlei Komplementarität mit der α v-mRNA aufwiesen. Alle Sequenzen der verwendeten ODN und ihrer Zielpositionen sind in der Tabelle 2. unter B.II. aufgelistet.

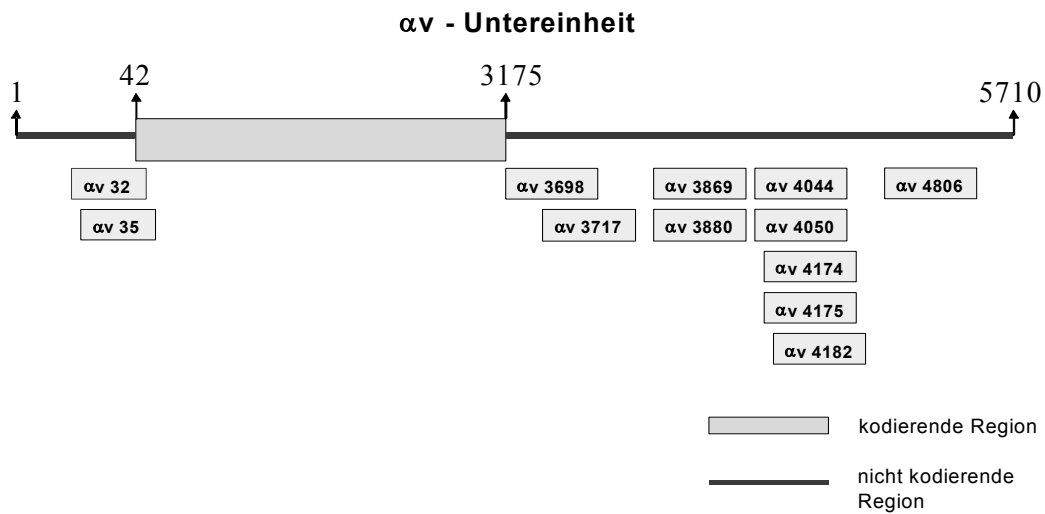


Abbildung 5. Schematische Darstellung der αv -mRNA und die Positionen der ausgewählten AS-ODN.

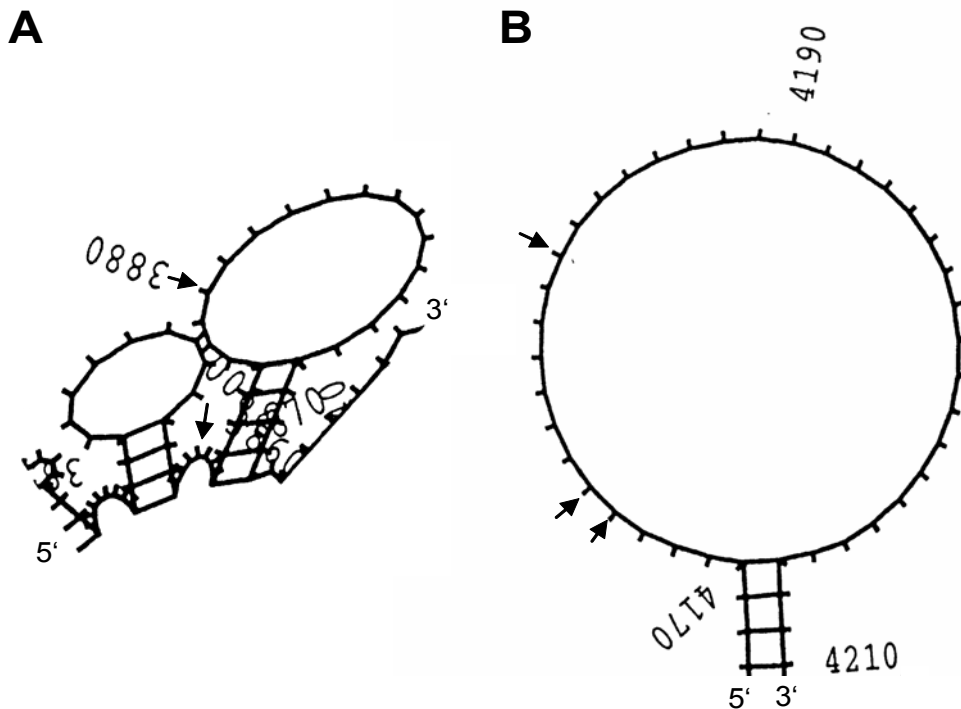


Abbildung 6. Zielregionen der αv -gerichteten Antisense-ODN. Abgebildet sind die vom Computer berechneten Sekundärstrukturen für zwei der fünf ausgewählten Zielregionen. Die Nummern geben die Positionen innerhalb der αv -mRNA entsprechend der Literaturangabe⁹² an. Die Pfeile zeigen die Position, an der die 3'-Enden der Antisense-ODN αv 3869 und αv 3880 (A), sowie der Antisense ODN αv 4174, αv 4175 und αv 4182 (B) an die αv Ziel-mRNA hybridisierten.

C.II. Transfektion αv -gerichteter AS-ODN in primäre Endothelzellen

C.II.1. Hemmung der αv -Proteinexpression durch AS-ODN

Zur Evaluierung der Effektivität unserer ausgewählten αv -Antisense-ODN etablierten wir ein Zellkultur-Modell mit PMA-stimulierten HUVEC-Zellen. Da aktivierte Endothelzellen die *in vivo* Bedingungen von Gefäßen während der Angiogenese besser widerspiegeln als ruhende, haben wir die Untersuchungen an HUVEC durchgeführt, die durch PMA stimuliert wurden. Wir transfizierten zwölf αv -gerichtete Antisense-ODN und vier Kontroll-ODN mit Hilfe von Lipofektin in HUVEC und induzierten nach 8 Stunden die αv -Expression der HUVEC durch Zugabe von PMA. Nach weiteren 40 Stunden wurde die αv -Expression durch Immunfluoreszenz-Analyse bestimmt (Abb. 7).

Die Transfektion der Antisense-ODN $\alpha v32$, $\alpha v35$ und $\alpha v3880$ verhinderte, bei einer ODN-Konzentration von 0,05 μM , die Hochregulierung der αv -Expression durch PMA komplett. Das Antisense-ODN $\alpha v3880$ zeigte eine signifikante Reduktion der αv -Expression um 32% im Vergleich zu seinem Kontroll-ODN rs- $\alpha v3880$ und eine 49% Reduktion im Verhältnis zu den PMA-behandelten Proben (Abb. 8). Vier weitere Antisense-ODN zeigten eine Inhibition der αv -Expressionserhöhung zwischen 35% und 40% im Verhältnis zu den PMA-stimulierten Zellen (Abb. 8). Fünf der Antisense-ODN zeigten keine signifikanten Effekte auf die αv -Expression (Abb. 8). Die vier Kontroll-ODN rs- $\alpha v3880$, rs- $\alpha v4174$, icam1840 und rs-icam1840 hatten im Vergleich mit der Lipofektin-Kontrolle ebenfalls keinen Effekt.

In den folgenden Experimenten wurden die Antisense-ODN mit der höchsten Effektivität ($\alpha v32$, $\alpha v35$ und $\alpha v3880$) weiter verwendet.

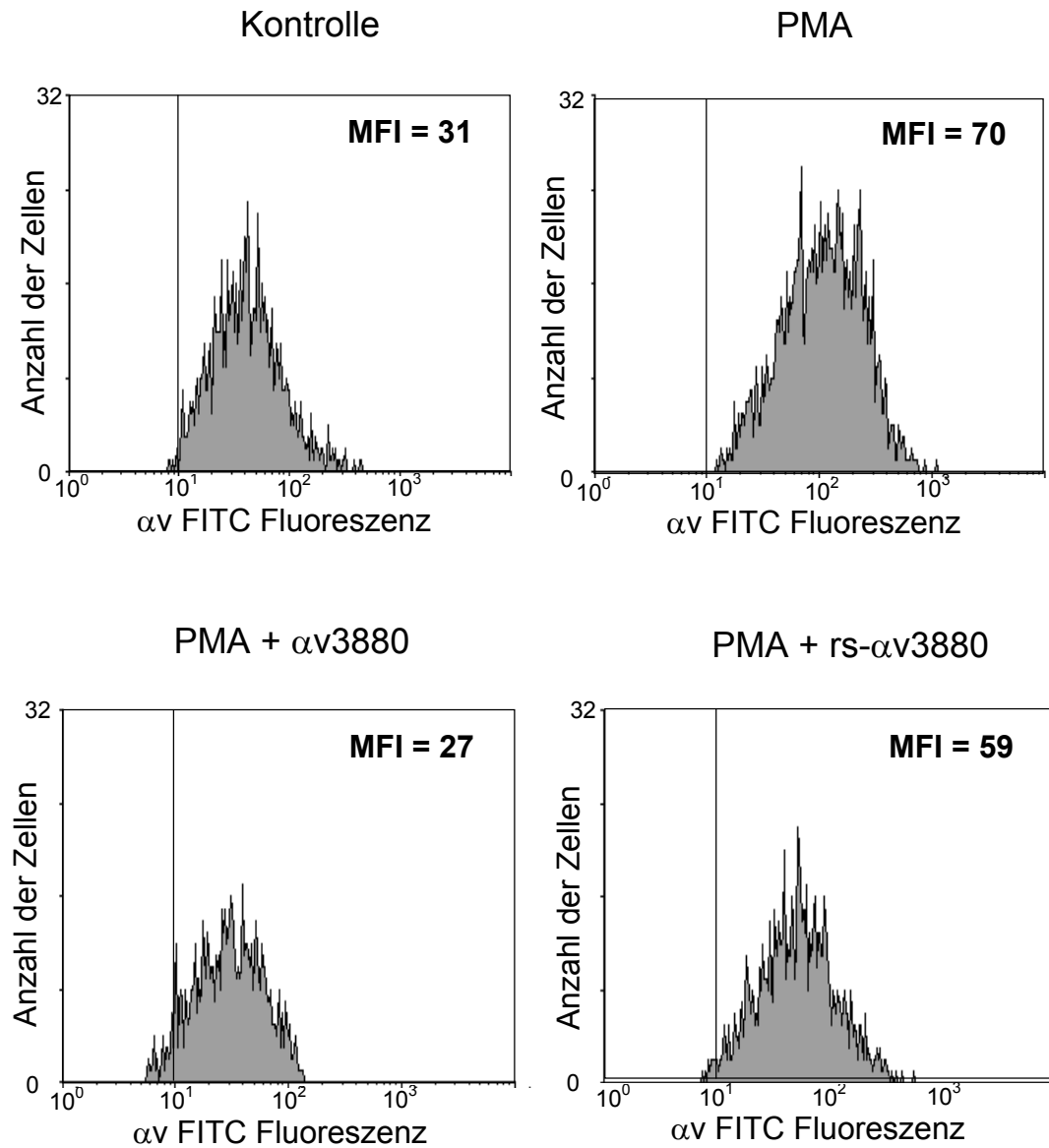


Abbildung 7. Immunfluoreszenz-Analyse der α v-Expression von HUVEC nach Transfektion mit Antisense-ODN. Dargestellt sind Histogramme aus einem repräsentativen Experiment. Auf jedem Histogramm ist die “Mean fluorescence intensity” (MFI) angezeigt.

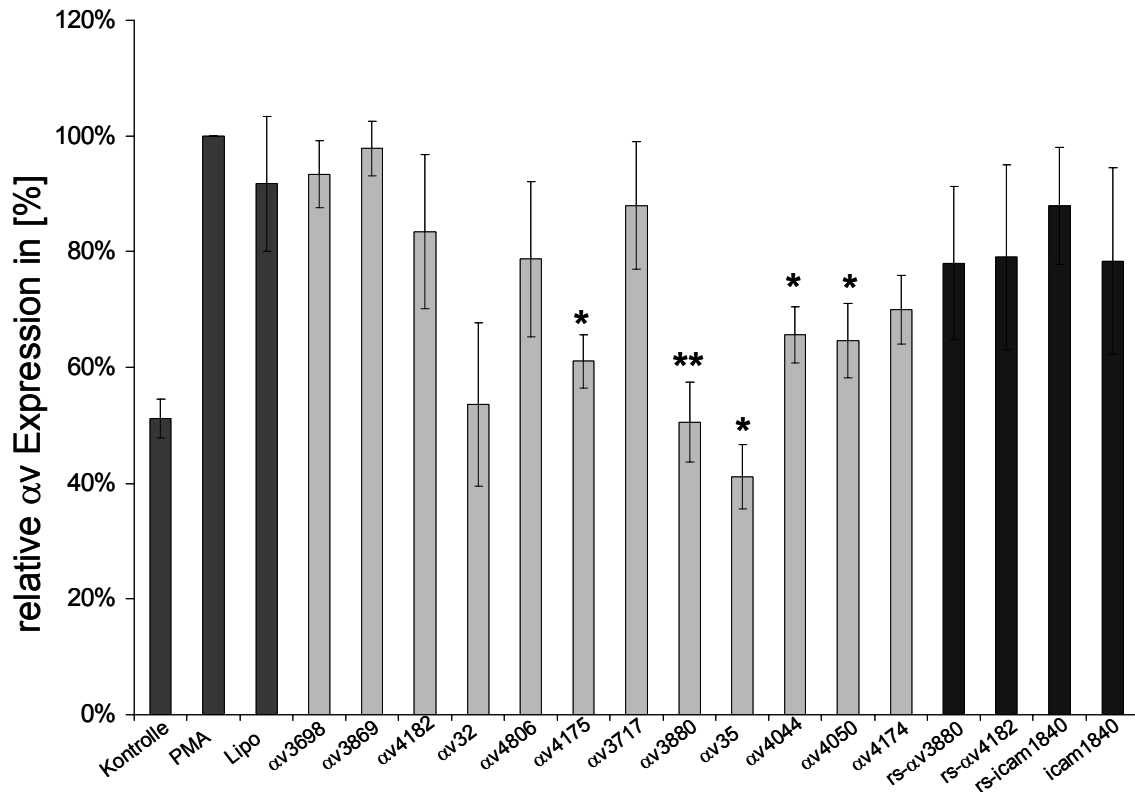


Abbildung 8. Hemmung der α v-Expression durch AS-ODN. Gezeigt werden Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen α v-Expression nach Transfektion mit den angegebenen ODN. Eine statistisch signifikante Inhibition im Vergleich zum Kontroll-ODN rs- α v3880 ist durch * ($p < 0,05$) oder ** ($p < 0,01$) gekennzeichnet.

C.II.2. Hemmung der α v-mRNA-Expression

Wir benutzten die “Real-Time” RT-PCR, um die Hemmung auch auf mRNA-Ebene zu untersuchen. Die α v-spezifischen PCR-Kurven der einzelnen mit Antisense- und Kontroll-ODN behandelten Versuchsproben wurden untereinander verglichen. Der “Crossing Point” für die α v-spezifischen PCR-Kurven lag bei den mit AS- α v3880-ODN transfizierten Zellproben im Durchschnitt bei Zyklus 23,0. Im Vergleich dazu lag der Durchschnitt bei den mit rs- α v3880 behandelten Proben bei 21,8. Die “Crossing Points” für die GAPDH spezifischen PCR-Kurven beider ODN behandelten Proben lagen im Durchschnitt bei 18,5 (Abb. 9). Ähnlich verhielten sich die Werte für die “Crossing Points” der mit AS- α v35-ODN transfizierten Proben. Der “Crossing Point” der α v-spezifischen PCR-Kurve lag für α v35 im Durchschnitt bei 25,3 und der

GAPDH-spezifischen PCR-Kurve bei 23,0. Für rs- α v35 lag der “Crossing Point” der α v-spezifischen PCR-Kurven im Durchschnitt bei 22,3 und bei 20,5 für die GAPDH-spezifischen PCR-Kurven (nicht abgebildet). Ein Größenunterschied des CP (Crossing-Point) von einem Zyklus bedeutet einen Unterschied der nachzuweisenden cDNA-Menge um etwa den Faktor 1,9.

Berechnungen des α v/GAPDH Quotienten mit der Hilfe der Quantifizierungs-Software RelQuant zeigte, dass die PMA-induzierte Hochregulierung der α v-mRNA durch die Antisense-ODN α v3880 (Abb. 10) und α v35 komplett gehemmt werden konnte.

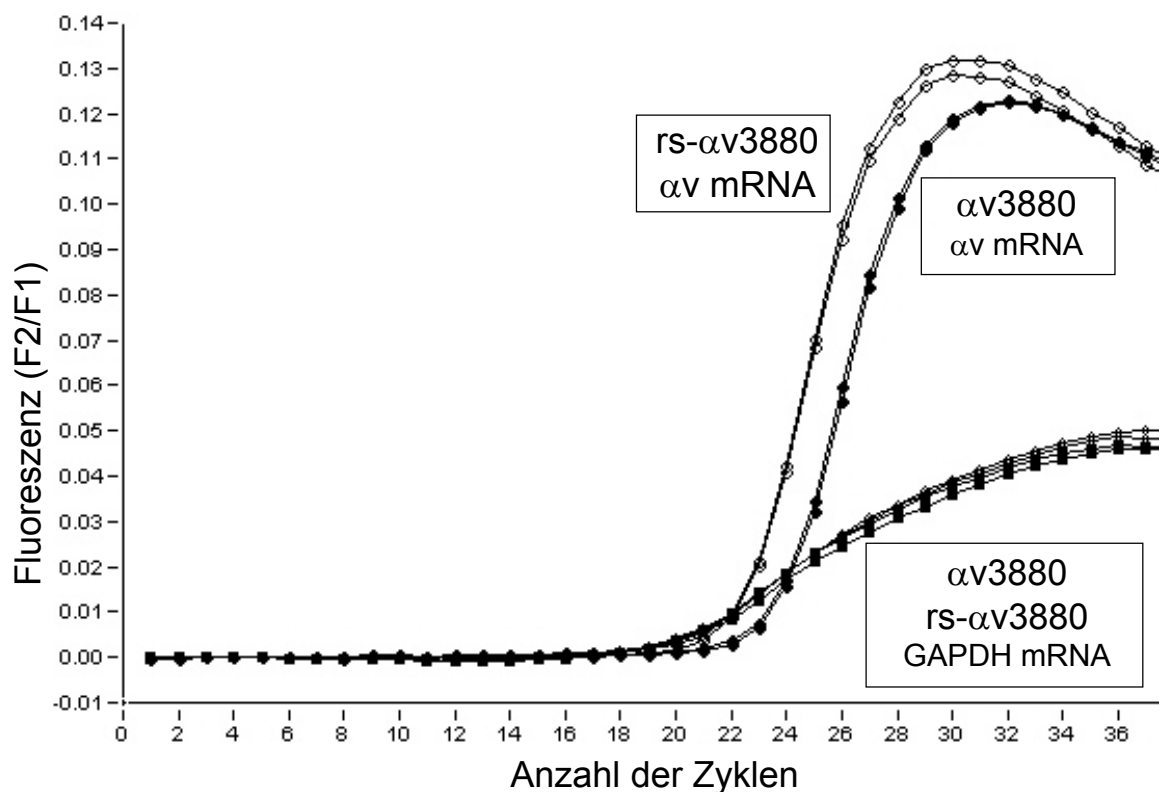


Abbildung 9. “Real-Time“ RT-PCR Analyse der α v-mRNA Expression. Dargestellt sind die PCR-Kurven der α v-spezifischen und GAPDH-spezifischen PCR aus einem repräsentativen Experiment im Doppelansatz. Kurven mit einem offenen Symbol repräsentieren die Proben, die mit dem Kontrol-ODN rs- α v3880 transfiziert wurden. Proben, die mit α v3880 transfiziert wurden, sind durch ein geschlossenes Symbol gekennzeichnet.

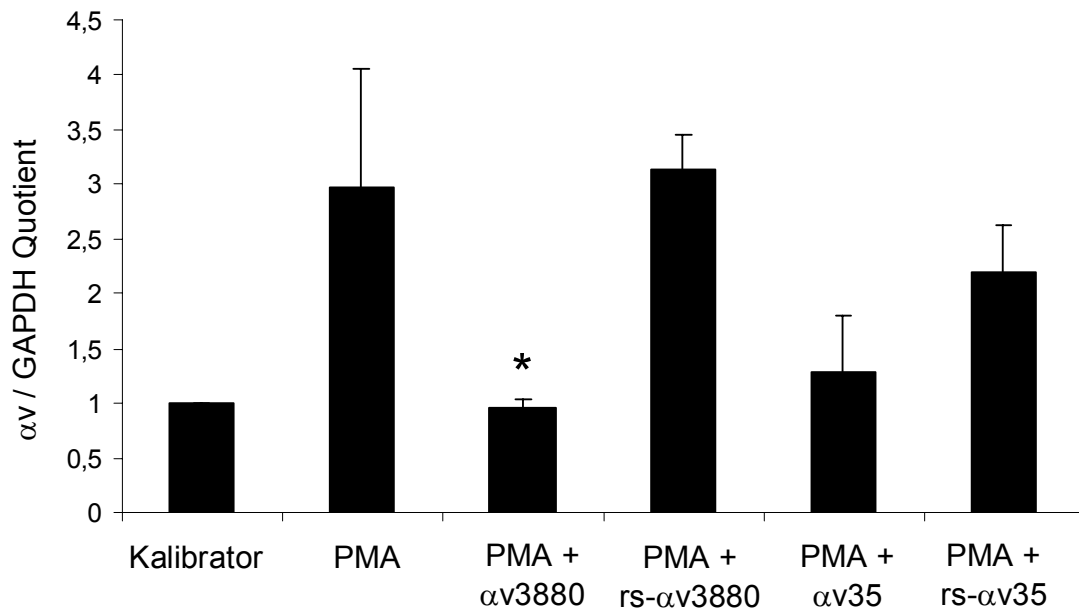


Abbildung 10. αv /GAPDH-Quotienten nach Transfektion von AS-ODN. Mittelwerte und Standardabweichungen der αv /GAPDH-Quotienten aus zwei Experimenten im Doppelansatz sind dargestellt. Als Kalibrator dienten unstimulierte HUVEC. Die statistische Signifikanz der Hemmwirkung von Antisense-ODN im Vergleich zu Kontroll-ODN ist durch * ($p < 0,05$) gekennzeichnet.

C.II.3. Dosis-abhängige Hemmung der αv -Expression

Wir transfizierten die HUVEC mit verschiedenen ODN-Konzentrationen zwischen 0,035 und 0,08 μM . Die Hemmung der αv -Expression nahm mit der eingesetzten ODN-Konzentration zu (Abb. 11). Die maximale Hemmung wurde durch eine ODN-Konzentration von 0,08 μM erreicht. Mit dieser Konzentration wurden Hemmungen zwischen 32% und 50% erzielt. ODN-Konzentrationen von 0,05 μM hemmten die αv -Expression zwischen 25% und 35%. Mit ODN-Konzentrationen von 0,035 μM konnten noch Hemmwirkungen zwischen 17% und 23% erzielt werden.

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen der Zellkulturen zeigten, dass erhöhte ODN/Lipofektin-Konzentrationen einen toxischen Einfluss auf die HUVEC haben. Daher bestimmten wir den Anteil Trypanblau-positiver, d.h. toter Zellen, um einen allgemeinen Überblick über die Toxizität der ODN/Lipid-Komplexe zu bekommen. Genauere Untersuchungen und Daten sind im Kapitel C.III.1.b. niedergeschrieben. Der

Anteil toter Zellen lag zwischen 2% und 5% bei einer Konzentration von 0,035 μM ODN, 14,5% bei einer Konzentration von 0,05 μM ODN und bei einer Endkonzentration von 0,08 μM ODN lag der Anteil der toten Zellen bei 33%.

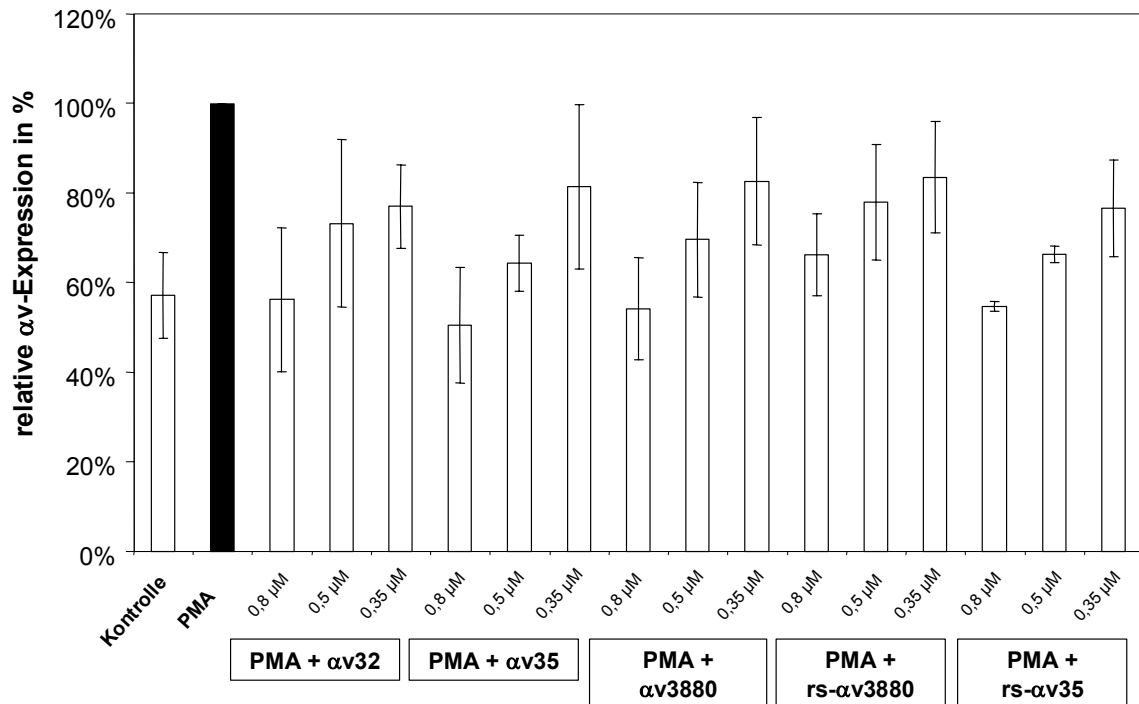


Abbildung 11. Dosis-abhängige αv -Expression. Vorliegend sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen αv -Expression nach Transfektion mit den angegebenen ODN dargestellt.

C.II.4. Hemmung der αv -Expression auf unstimulierten Zellen

Um die Hemmung der αv -Expression auf unstimulierten Zellen zu messen, wurden HUVEC zwischen einem und drei Tagen mit 0,05 μM lipid-komplexierten ODN inkubiert (Abb. 12).

Nach der Transfektion mit lipid-komplexierten ODN zeigte sich bereits nach 24 Stunden eine Hemmung der αv -Basis-Expression um bis zu 21% (AS-ODN $\alpha v35$). Diese wurde nach 48 Stunden noch übertroffen und erreichte zu diesem Zeitpunkt ihr Maximum von 20% bis 36% im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Längere Inkubationszeiten von insgesamt 72 Stunden zeigten einen Wiederanstieg der αv -Expression. Man kann davon ausgehen, dass die ODN nach 72 Stunden von intrazell-

lulären Prozessen eliminiert werden und so kaum noch Effekte auf das RNA/Proteinniveau erzielen können. Es zeigten sich nach 72 Stunden noch Hemmwirkungen von 8% bis 19% auf die αv -Expression.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass eine Inkubationszeit von 2 Tagen für die mit 0,05 μ M lipid-vermittelte Transfektion von menschlichen Endothelzellen (HUVEC) optimal ist.

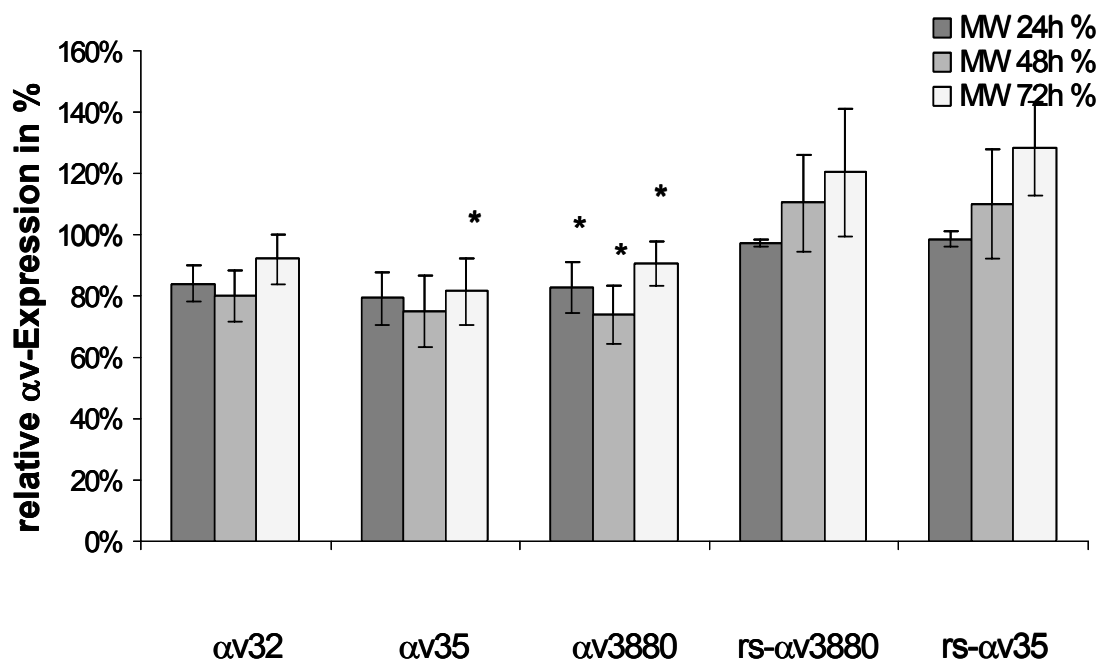


Abbildung 12. Zeitabhängige Hemmung der αv -Expression. Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen αv -Expression ohne Stimulation mit PMA nach 24-, 48- und 72-stündiger Transfektion mit den angegebenen ODN. 100% entspricht dem Wert der unbehandelten Kontrolle. Die statistische Signifikanz der Hemmwirkung von Antisense-ODN im Vergleich zu Kontroll-ODN ist durch * ($p < 0,05$) gekennzeichnet.

C.III. Funktionelle Effekte der Inhibition der α_v -Expressionshemmung

In den folgenden Experimenten wurden die Antisense-ODN mit der höchsten Effektivität α_v35 , α_v32 und α_v3880 und die Kontroll-ODN rs- α_v35 und rs- α_v3880 weiterverwendet. Wir untersuchten die Auswirkungen einer gehemmten α_v -Expression auf die biologischen Anforderungen an die Endothelzellen, wie Proliferation, Apoptose, Migration und der Fähigkeit, Kapillaren auszubilden.

C.III.1. Effekte auf die Proliferation

Zur Beurteilung des Einflusses der Hemmung der α_v -Expression auf die Proliferation der transfizierten HUVEC wurden die Experimente in 96-Loch-Platten durchgeführt. Die Proliferationsrate wurde über die Aufnahme von Bromo-desoxyuridin (BrdU) gemessen. Die Stimulation mittels PMA erbrachte eine zweifach größere Proliferationsrate im Vergleich zu nicht stimulierten Zellen (Abb. 13A). Während der Antisensevermittelten Hemmung der α_v -Hochregulierung zeigte sich eine dosisabhängige Hemmung der Proliferation durch die AS-ODN, die aber auch bei den Kontroll-ODN auftrat (Abb. 13A). Bei einer ODN-Konzentration von 0,05 μ M zeigte α_v32 im direkten Vergleich zu seinem Kontroll-ODN eine Hemmung der Proliferation von 31%, die sich aber als nicht signifikant herausstellte. Auch das ODN α_v3880 zeigte eine nicht signifikante Proliferationshemmung von 7% im Vergleich zu seinem Kontroll-ODN (Abb. 13B). Da sowohl AS-, als auch Kontroll-ODN eine Hemmung der Proliferation zeigten, müssen wir daraus schließen, dass die Proliferationsrate der HUVEC unabhängig von der α_v -Expressionsstärke ist (Abb. 13B) und unsere AS-ODN keinen spezifischen Effekt auf die Proliferation haben.

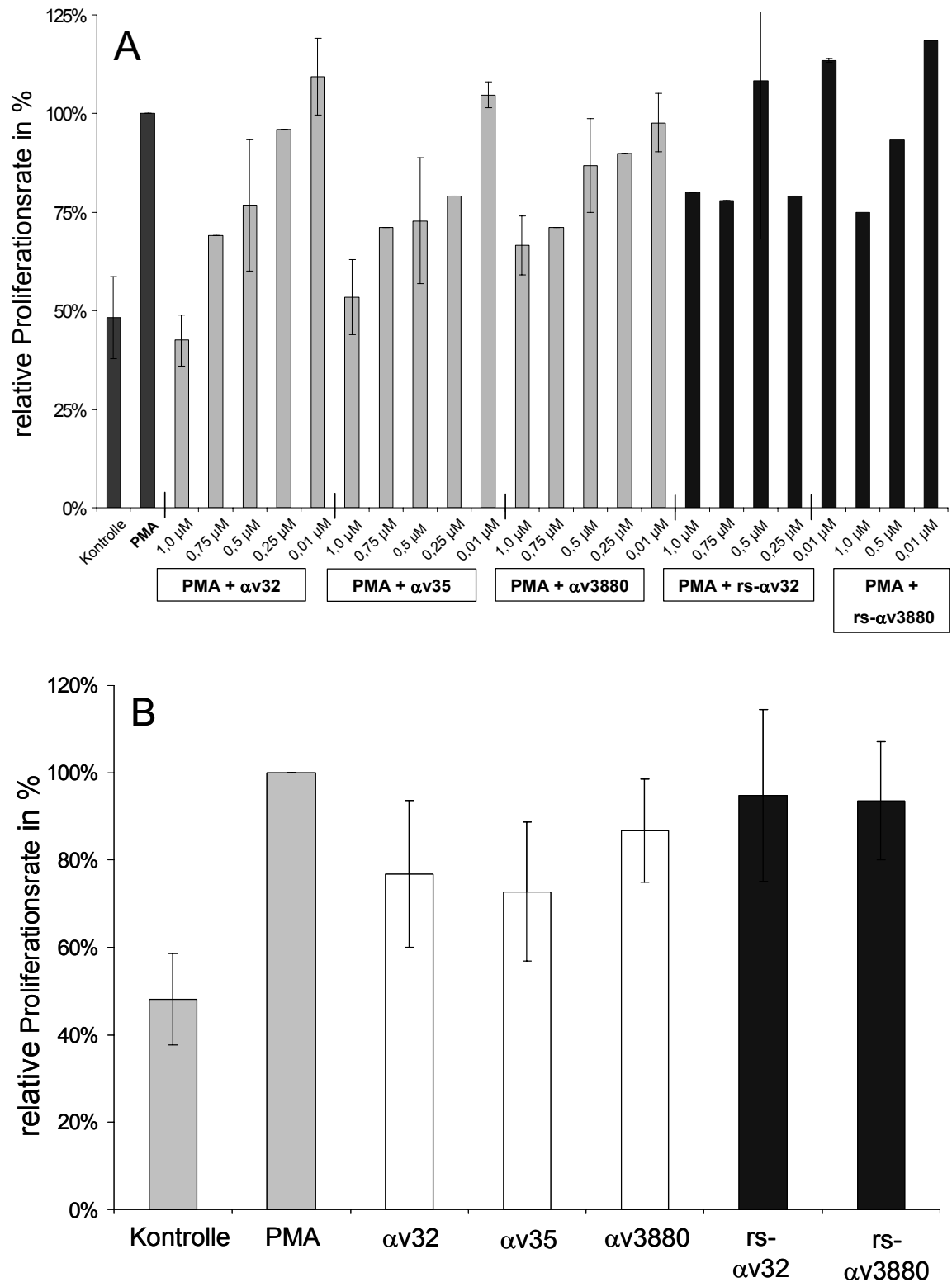


Abbildung 13. Proliferation der HUVEC nach Transfektion mit Antisense-ODN. **(A)** Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Proliferationsraten der transfizierten HUVEC mit fünf unterschiedlichen Konzentrationen der ODN. **(B)** Darstellung der effektivsten ODN bei einer ODN-Konzentration von 0,05 μM .

C.III.2. Effekte auf die Apoptose

Der Einfluss der αv -Expression auf die Apoptoserate der HUVEC wurde mit Hilfe des AnnexinV-Bindungs-Versuchs untersucht. Mittels einer Drei-Farben-Immunfluoreszenz-Analyse wurde der Anteil an "früh-apoptotischen" Zellen bestimmt. Bei unstimulierten, nicht-transfizierten HUVEC war der Anteil an apoptotischen Zellen 13%, während die mit PMA-stimulierten Zellen einen signifikant niedrigeren Anteil an apoptotischen Zellen von 4,5% zeigten. Die Transfektion des Antisense-ODN $\alpha v3880$ und der beiden Kontroll-ODN zeigten ähnlich niedrige Anteile an apoptotischen Zellen, sowie keine signifikanten Unterschiede (Abb. 14). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Reduktion der Apoptoserate durch PMA unabhängig von der αv -Hochregulierung ist.

Dagegen zeigten die gegen die AUG-Region gerichteten Antisense-ODN $\alpha v32$ und $\alpha v35$ eine deutliche Erhöhung des Anteils an "früh-apoptotischen" Zellen von 20% im Mittelwert (Abb. 14). Diese unterschiedlichen Ergebnisse sind am ehesten auf unspezifische Effekte zurückzuführen, da alle AS-ODN ähnliche Hemmwirkungen auf die Protein-Expression von αv gezeigt haben.

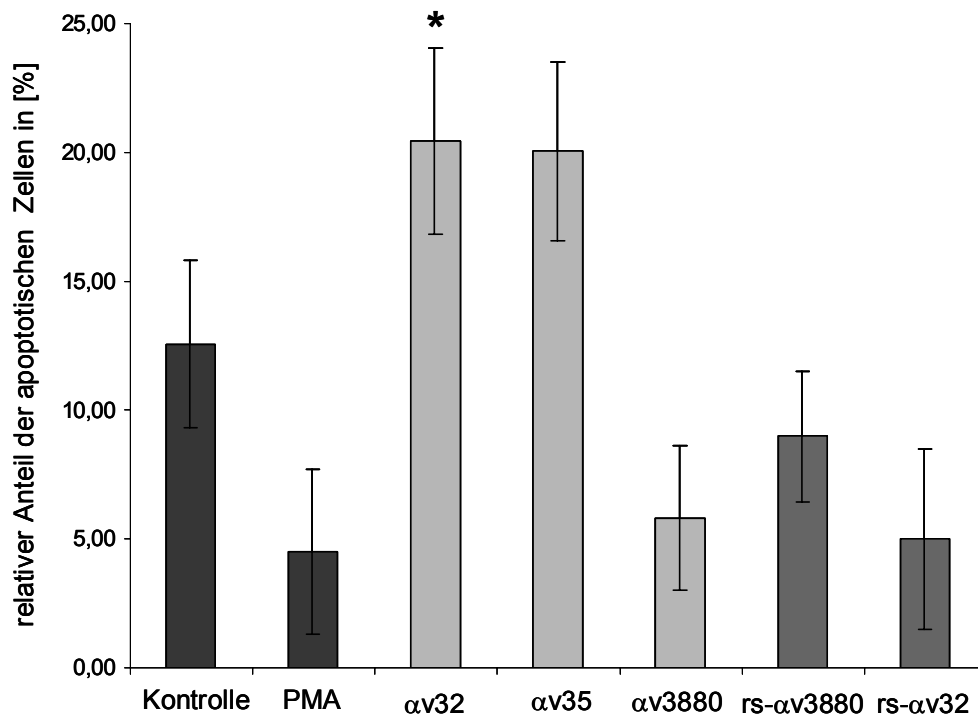


Abbildung 14. Anteil der apoptotischen Zellen der HUVEC nach Transfektion mit Antisense-ODN. Mittelwerte und Standardabweichungen des Anteils apoptotischer Zellen der transfizierten HUVEC bei einer ODN-Konzentration von $0,08\mu\text{M}$. Die statistische Signifikanz des Antisense-ODN im Vergleich zu seinem Kontroll-ODN ist durch * ($p < 0,05$) gekennzeichnet.

C.III.3. Effekte auf die Migration

Die Migration der Endothelzellen spielt eine bedeutende Rolle für die Angiogenese. Deshalb untersuchten wir die Auswirkung der reduzierten α_v -Expression auf die Migrationseigenschaften von Endothelzellen. Dazu verwendeten wir Transwell-Microporen-Membranen mit einem Durchmesser von 24mm und einer Porengröße von 8 μm .

Im Falle der nicht mit PMA-stimulierten HUVEC migrierten zwischen 100 und 143 Zellen durch die mit Fibronectin beschichteten Transwell-Membranen. Nach PMA-Stimulation fanden sich dagegen zwischen 160 und 260 Zellen auf der anderen Seite der Membranen, was einer Steigerung von ca. 100% entspricht. Die Transfektion des Antisense-ODN α_v35 ergab im Vergleich zum Kontroll-ODN eine signifikante Reduktion der Gesamtzahl an migrierten Zellen von 17% (Abb. 15A/B). Das Antisense-ODN α_v3880 zeigte nach Transfektion mit PMA-stimulierte Zellen im Vergleich zum Kontroll-ODN rs- α_v3880 eine signifikante Reduktion der durch die Membran migrierten HUVEC von 62 Zellen (Abb. 15A). Dies bedeutet eine Reduktion von 26% der mit α_v3880 transfizierten Zellen in der unteren Kammer der "Transwells" im Vergleich zu den mit Kontroll-ODN transfizierten und PMA-stimulierten Zellen (Abb. 15B). Die Ergebnisse der mit α_v3880 und α_v35 behandelten Zellen sind mit den Werten der unbehandelten, unstimulierten Kontrollzellen nahezu identisch. Daraus schließen wir, dass es durch den Einsatz α_v -gerichteter Antisense-ODN zu einer kompletten Hemmung der durch PMA vermittelten Migration kommt.

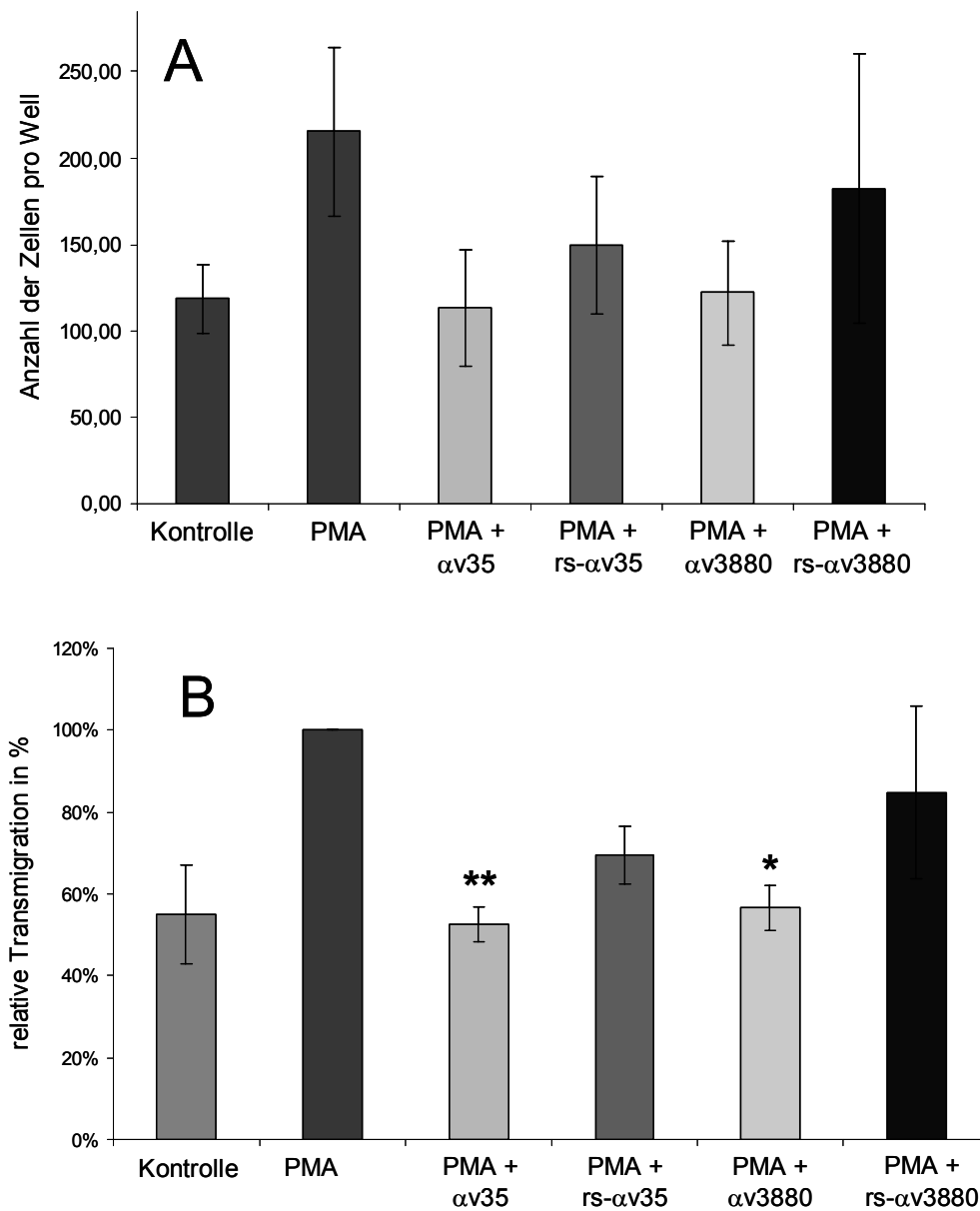


Abbildung 15. Migration der HUVEC unter Transfektion mit Antisense-ODN. **(A)** Mittelwert und Standardabweichung der Anzahl der migrierten HUVEC nach Transfektion mit einer Konzentration der ODN von $0,05\mu\text{M}$ aus vier unabhängigen Experimenten. **(B)** Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Migration durch die mit Fibronectin-beschichteten “Transwell membran“ in [%]; (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

C.III.4. Effekte der Inhibition der α_v -Integrin-Expression auf die Angiogenese

Nachdem wir die zentralen funktionellen Eigenschaften der Endothelzelle während der Angiogenese, wie das Proliferations-, Apoptose- und Transmigrationsverhalten untersucht hatten, überprüften wir das anti-angiogenetische Potential unserer α_v -gerichteten Antisense-ODN in zwei unterschiedlichen Zellkultur-Angiogenese-Modellen.

C.III.4.a. Hemmung der Bildung Kapillar-ähnlicher Strukturen im MatriGel-Test

Um die anti-angiogenen Effekte unserer α_v -gerichteter Antisense-ODN zu evaluieren, benutzten wir ein Modell, in dem die Fähigkeit zur Ausbildung von Kapillar-ähnlichen Gebilden in der extrazellulären-Matrix MatriGel untersucht wurde. MatriGel besteht aus extrazellulären Matrix-Proteinen und kann alle wichtigen Substrate zur Ausbildung von Kapillar-ähnlichen Strukturen bereitstellen⁹³.

Die Kultivierung von PMA-stimulierten HUVEC in der MatriGel-Präparation resultierte in einem Geflecht aus tubulären Strukturen (Abb. 16B). Nach Transfektion mit α_v3880 in PMA-stimulierte Zellen kam es zu einer signifikanten Hemmung der Ausbildung Kapillar-ähnlicher Strukturen um 44% im Vergleich zum Kontroll-ODN rs- α_v3880 (Abb. 16C-D / 17A/B). Folglich ist α_v3880 in der Lage, die über PMA-Stimulation induzierte Formation eines Netzwerks aus HUVEC im MatriGel zu unterdrücken. Die Hemmung nach Transfektion von α_v35 in PMA-stimulierte betrug im Vergleich zum Kontroll-ODN rs- α_v35 nur 37% (Abb. 17A/B).

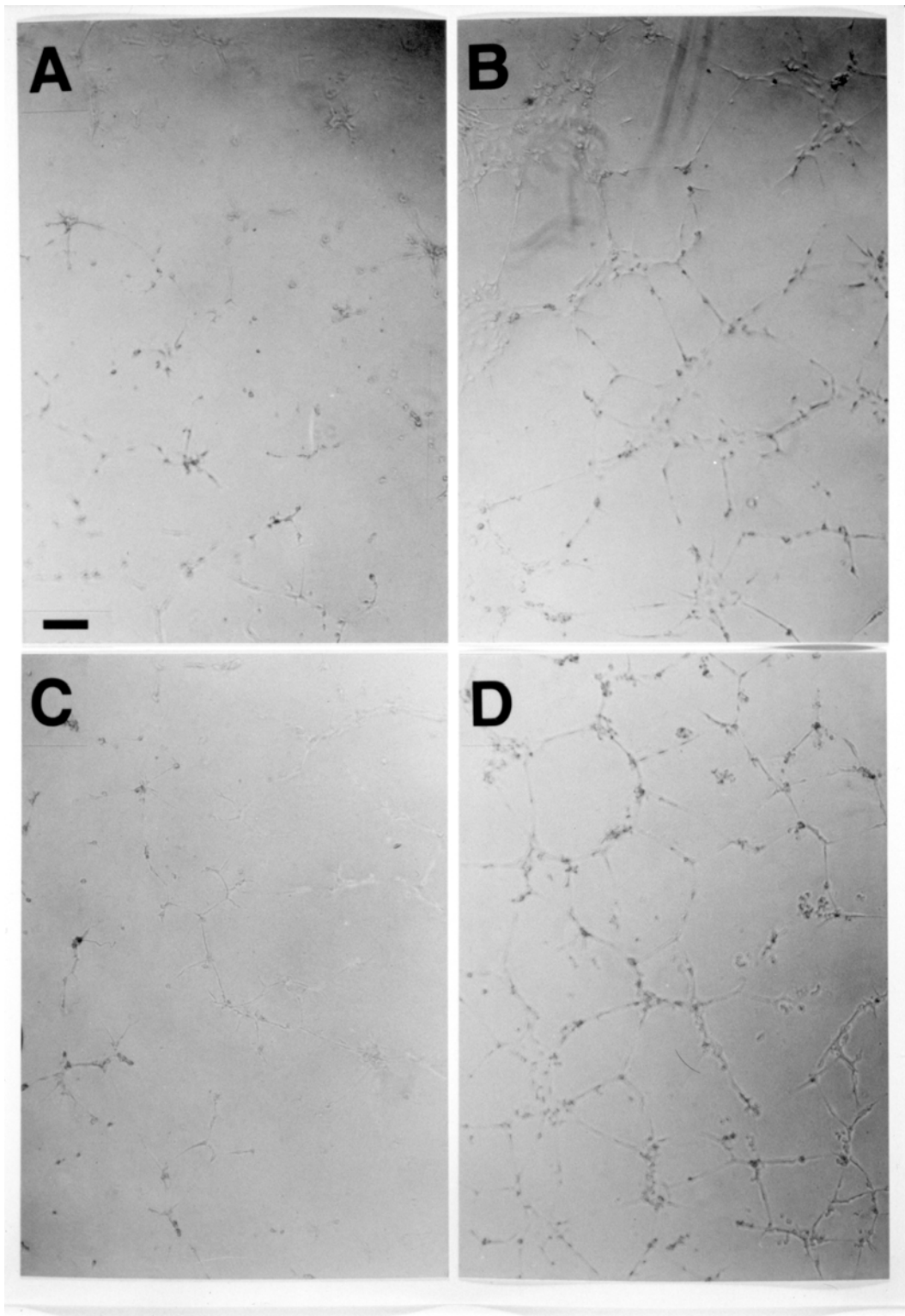


Abbildung 16. Abgelichtete Formationen der Kapillar-ähnlichen Strukturen, die die HUVEC auf der Unterlage des MatriGel Präparates ausbildeten. **(A)** Nicht-transfizierte unstimulierte Zellen, **(B)** nicht-transfizierte PMA-stimulierte Zellen, **(C)** Antisense-ODN $\alpha v3880$ -transfizierte PMA-stimulierte Zellen, **(D)** Kontroll-ODN rs- $\alpha v3880$ -transfizierte PMA-stimulierte Zellen. Der schwarze Balken repräsentiert die Länge von 700 μm .

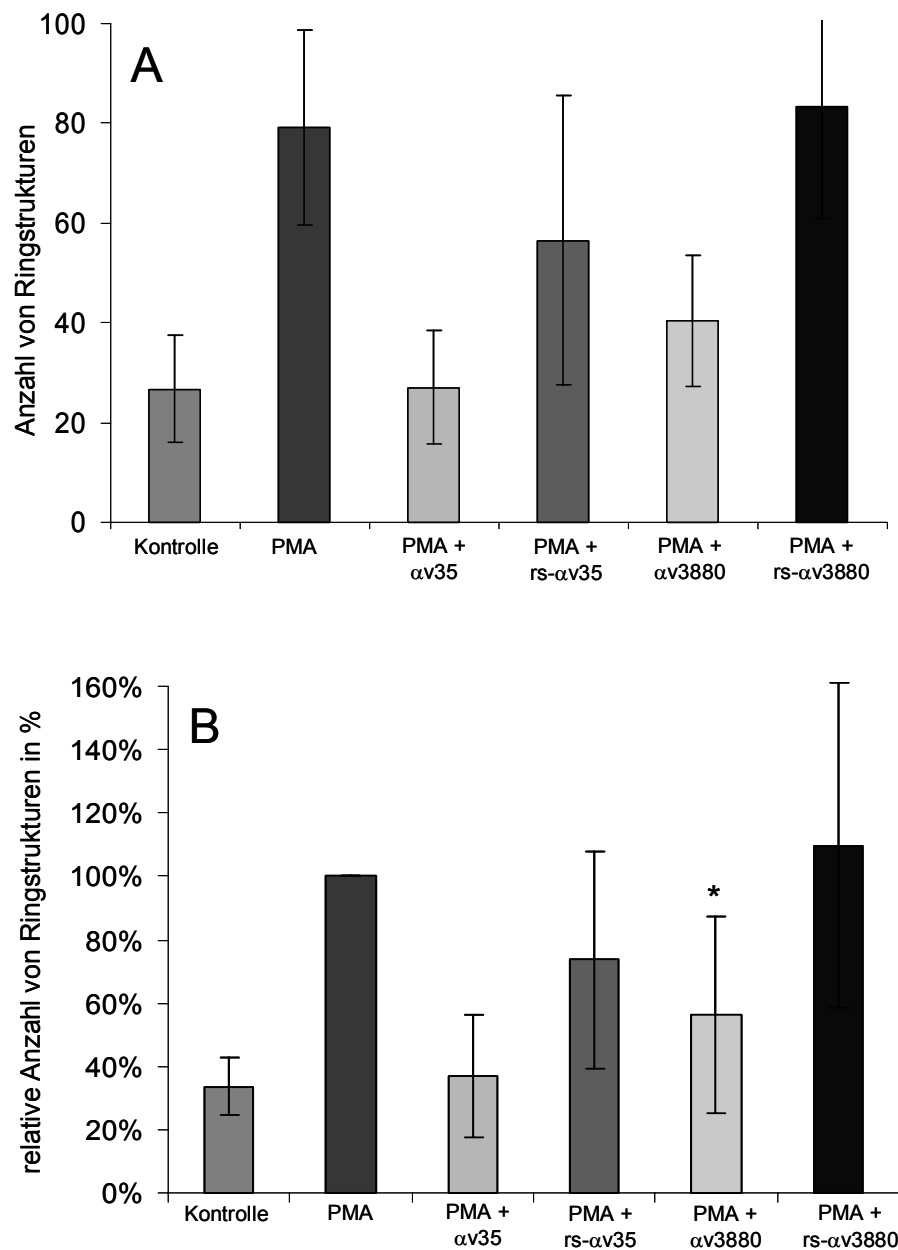


Abbildung 17. Inhibition der Formation von Kapillar-ähnlichen Strukturen in MatriGel. Die Netzwerke wurden 16 Stunden nach der Hinzugabe von HUVEC auf MatriGel fotografiert. Die Anzahl von geschlossenen Kreisen, die aus Kapillar-ähnlichen Strukturen gebildet wurden, wurden aus 6 verschiedenen Fotos pro Loch zusammenaddiert. Mittelwerte und Standardabweichungen von geschlossenen Kreisen aus vier unabhängigen Experimenten sind dargestellt. **(A)** Darstellung der absoluten Anzahl geschlossener Kreise nach Transfektion der ODN mit einer Konzentration von $0,05\mu\text{M}$. **(B)** Darstellung der relativen Anzahl geschlossener Kreise in [%] und der statistischen Signifikanz (* $p < 0,05$).

C.III.4.b. Hemmung Kapillar-ähnlicher- und Netzartiger-Strukturen in einem “Co-Kultur-Angiogenese-Assay“ aus menschlichen Zellen.

Im zweiten Schritt zur Evaluierung unserer Antisense-ODN verwendeten wir das Antisense-ODN $\alpha v3880$ in einem Zellkultur-Angiogenese-Test, der die Verhältnisse *in vivo* besser widerspiegelt als der MatriGel-Test. Dieser Test basiert auf einer Co-Kultur von HUVEC mit menschlichen diploiden Fibroblasten dermalen Ursprungs, die in der Lage sind, extrazelluläre Matrix-Proteine wie Kollagen I, Kollagen IV, Fibronectin, Elastin und Laminin sowie Wachstumsfaktoren selbst zu bilden⁹⁴. In diesem Zellkultur-Modell bildet sich ein Netzwerk von Kapillar-ähnlichen Gebilden aus, die von Endothelzellen abstammen. Dieses Netzwerk ähnelt stark einem Kapillarbett *in vivo*. Auf den Zusatz von PMA oder anderen externen Wachstumsfaktoren kann hier verzichtet werden.

In der Abbildung 18A sind die Kapillar-ähnlichen Strukturen von unbehandelten Zellen dargestellt. Die Transfektion der Fibroblasten/Endothelzell-Co-Kultur mit dem AS-ODN $\alpha v3880$ resultierte in einer signifikanten Hemmung der Ausbildung Kapillar-ähnlicher Formationen. Im Vergleich zu dem Kontroll-ODN rs- $\alpha v3880$ betrug die signifikante Hemmung durch $\alpha v3880$ 38% bei 0,035 μM und 64% bei einer Endkonzentration von 0,05 μM ODN (Abb. 18/19). Die Antisense-ODN waren somit fast genauso effizient wie Sumarin in einer Endkonzentration von 20 μM . Sumarin, ein bekannter anti-angiogenetischer Wirkstoff, reduzierte die relative Gesamtlänge der Kapillar-ähnlichen Formationen um 75%. Um die Verhältnisse einer klinisch systemischen Applikation von ODN nachzuahmen, bei der keine Transfektionshilfen verwendet werden können, wurde die Effektivität der αv -gerichteten Antisense-ODN auch ohne die Verwendung des Transfektionsreagens Lipofektin untersucht. Da die pure ODN Aufnahme in HUVEC schlechter ist, als bei der Verwendung von kationischen Liposomen, wurden die Zellen mit einer 10-fach höheren Konzentration an purer ODN behandelt. Nach einer Inkubationszeit von zwei Wochen mit $\alpha v3880$ bei 0,05 μM beobachteten wir eine signifikante Reduktion der Kapillar-ähnlichen Formationen um 55%. Dies ist ein wichtiger Hinweis auf die biologische Aktivität der αv -gerichteten Antisense-ODN, auch ohne den Einsatz von Transfektion-Reagenzien.

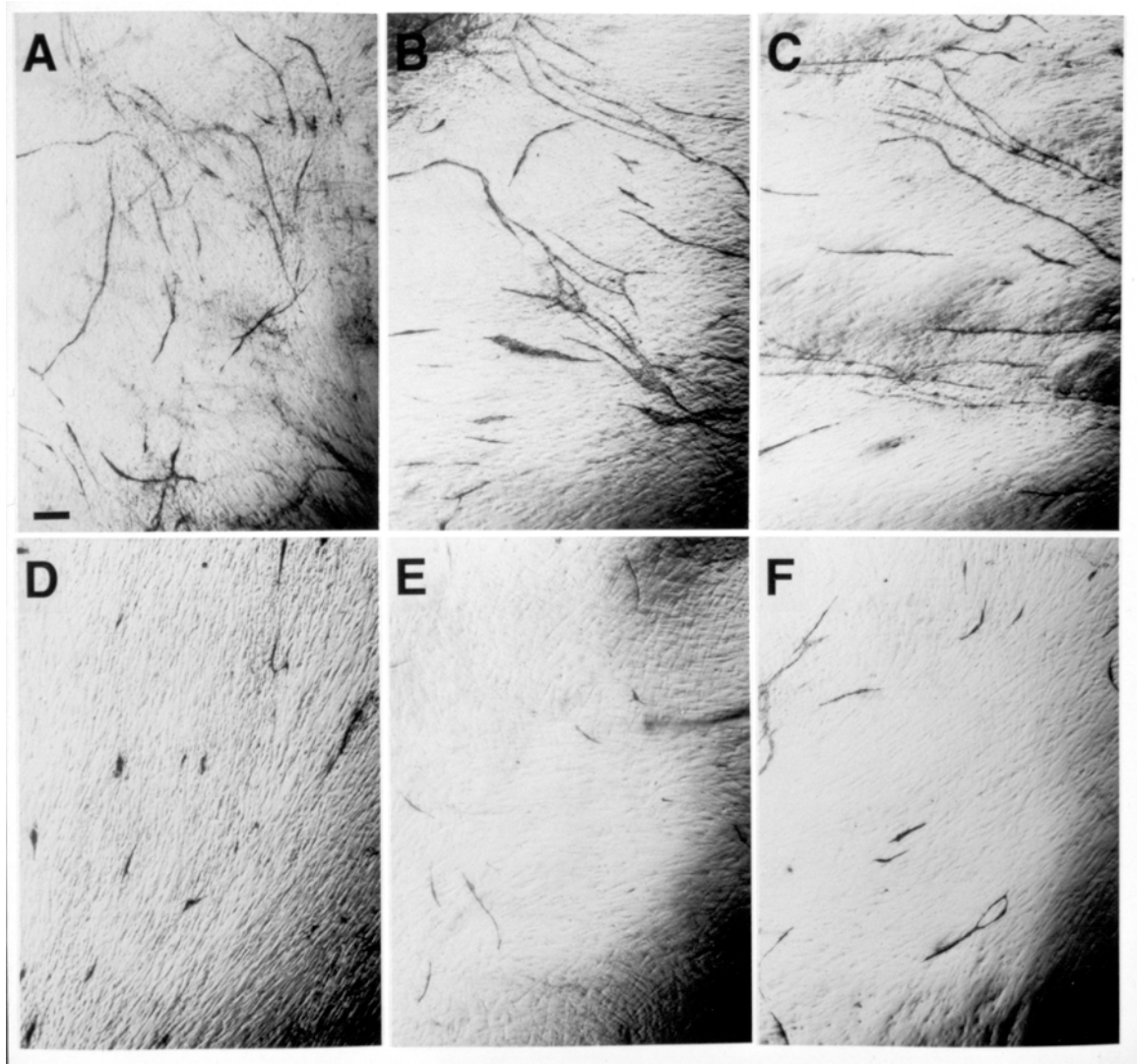


Abbildung 18. Transfektion der Fibroblasten/Endothelzell-Co-Kultur mit dem AS-ODN. Der *in vitro* Angiogenese-Test wurde hier von einem repräsentativen Experiment nach der immunozyochemische Färbung mit dem spezifischen Antikörper gegen den „von Willebrand“ Faktor fotografiert und die Ausbildung des Geflechtes aus Kapillar-ähnlichen anastomosierenden Strukturen dargestellt. **(A)** Unbehandelte Zellen, **(B)** 0,05 μM rs- α_v3880 ohne Lipofektin, **(C)** 0,05 μM rs- α_v3880 mit Lipofektin, **(D)** 20 μM Suramin, **(E)** 0,05 μM α_v3880 ohne Lipofektin, **(F)** 0,05 μM α_v3880 mit Lipofektin. Der schwarze Balken repräsentiert die Länge von 700 μm .

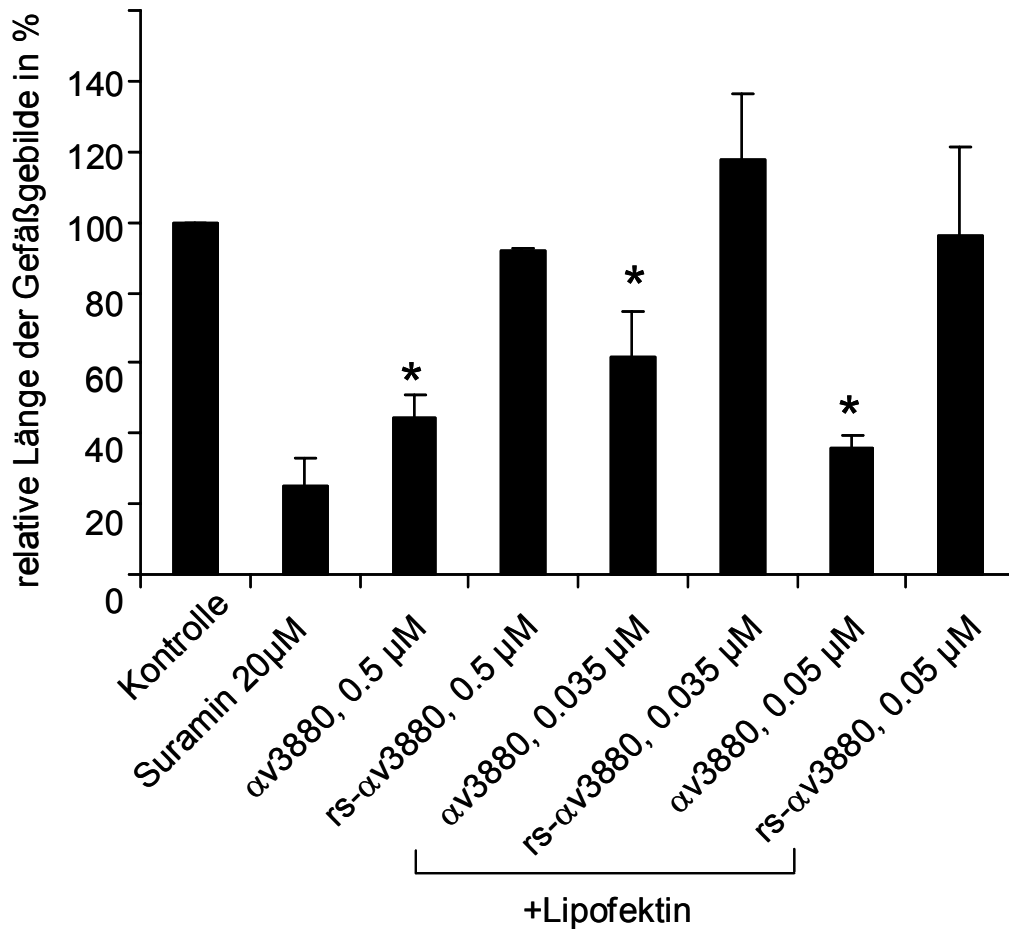


Abbildung 19. Hemmung der Kapillar-ähnlichen Strukturen *in vitro*. Die Immunzytochemisch gefärbten Kapillar-ähnlichen Strukturen wurden nach einer 14-tägigen Inkubation der Zellen mit den jeweiligen Test-Komponenten fotografiert. Die Gesamtlänge aller sichtbaren Kapillaren wurde aus fünf verschiedenen Fotos pro Loch zusammenaddiert. Als Längenmesser diente ein Distanzmesser für Straßenkarten. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen der relativen Gesamtlänge der Kapillar-ähnlichen Gebilde aus zwei unabhängigen Experimenten (* $p < 0,05$).

D. Diskussion

D.I. Hemmung der Expression von αv -Integrinen durch Computer-unterstützte Auswahl effektiver αv -gerichteter-Antisense-ODN

In dieser Arbeit konnten wir αv -Integrin-gerichtete Antisense-ODN identifizieren, welche in der Lage waren, die Hochregulation der αv -mRNA und des αv -Proteins in stimulierten Endothelzellen vollständig zu hemmen. In verschiedenen Modellen der menschlichen Angiogenese konnte außerdem nach Transfektion der AS-ODN die Entstehung von Kapillar-ähnlichen Strukturen in der Zellkultur verhindert werden.

Die Angiogenese ist ein Prozess in dem verschiedene Faktoren zusammenwirken. Sie ist abhängig von der Stimulation ruhender Endothelzellen durch verschiedene Wachstumsfaktoren wie dem "basic fibroblast growth factor" (bFGF) oder dem "vascular endothelial growth factor" (VEGF) sowie von den Interaktionen der Integrine $\alpha v\beta_3$ und $\alpha v\beta_5$ mit ihren Liganden^{30,44}. Die einzelnen Schritte auf dem Weg zur Bildung eines neuen Blutgefäßes sind die Hochregulation der verschiedenen Integrine, die Proliferation und Migration von Endothelzellen sowie die Entstehung von Kapillaren und deren Fähigkeit zur Anastomosensbildung. Im Rahmen dieser Arbeit untersuchten wir mit Hilfe verschiedener Zellkulturmodelle die Auswirkung αv -gerichteter Antisense-ODN auf die oben beschriebenen Schritte der Angiogenese. Zunächst untersuchten wir die Hemmwirkung der αv -Expression. Von den zehn AS-ODN-Sequenzen, die mit Hilfe von Computer-unterstützten mRNA-Sekundär-strukturanalysen ausgewählt wurden, konnten fünf die PMA-induzierte αv -Expression signifikant hemmen. Dieses Ergebnis zeigt, dass der von uns gewählte Computer-unterstützte Ansatz, die Wahrscheinlichkeit erhöht, effektive AS-ODN zu finden. Bei der zufälligen Auswahl von AS-ODN findet man durchschnittlich nur ein effektives AS-ODN innerhalb acht getesteter ODN-Sequenzen⁹⁶. Trotz der erhöhten Wahrscheinlichkeit, effektive Antisense-Sequenzen mit Hilfe Computer-unterstützter Methoden zu identifizieren, ist die Überprüfung der verschiedenen Antisense-Sequenzen in der Zellkultur immer noch notwendig.

Die Transfektion von αv -AS-ODN in unstimulierten Endothelzellen hatte nur einen geringfügigen Effekt auf die Basis-Expression von αv . Diese Beobachtung ist für eine mögliche klinische Applikation der αv -gerichteten Antisense-ODN relevant, da die ODN möglicherweise selektiv die aktivierten Endothelzellen in neu entstehenden

Blutgefäßen hemmen ohne die ruhenden Endothelzellen innerhalb der bereits vorhandenen Gefäße zu beeinflussen. Ähnliche Beobachtungen wurden bei der Studie von Brooks⁴⁸ gemacht, in der gezeigt wurde, dass ein $\alpha v\beta_3$ -gerichtetes Inhibitionspeptid lediglich die neu entstehenden Blutgefäße im “chick chorioallantoic membrane” Test hemmte, während es bereits vorhandene Gefäße unbeeinflusst ließ⁴⁸. Daher scheint das Überleben der Endothelzellen nur in einer bestimmten kritischen Phase während des Angiogenese-Prozesses $\alpha v\beta_3$ -abhängig zu sein.

D.II. Bedeutung der αv -Expressionsstärke für die Proliferation, Transmigration und Apoptose von HUVEC

Im nächsten Schritt untersuchten wir den Einfluss der αv -Expressionsstärke auf drei weitere Schritte der Angiogenese, nämlich Proliferation, Migration und Apoptosehemmung der Endothelzelle. Die Hemmung der PMA induzierten Hochregulierung von αv über Antisense-ODN hatte keinen signifikanten Effekt auf die Proliferationsrate aktivierter Endothelzellen. Dies zeigt, dass die Proliferationsrate der HUVEC unabhängig von der αv -Expressionsstärke ist. Daher findet die Hemmung der Angiogenese durch αv -Antagonisten wahrscheinlich nicht über eine direkte Hemmung der Proliferation statt. Andererseits fanden wir eine signifikante Suppression der Migration AS-ODN-transfizierter HUVEC. Die Anzahl der Zellen, die nach AS-ODN-Behandlung und PMA-Stimulation durch die Fibronectin-beschichteten Transwell-Membranen wanderten, war genauso groß, wie die der nicht stimulierten nicht transfizierten HUVEC, was auf eine komplette Hemmung der PMA-stimulierten Migration durch αv -gerichtete AS-ODN hinweist.

In unseren Untersuchungen beeinflusste die Hemmung der αv -Hochregulation durch das AS-ODN $\alpha v3880$ nicht die Apoptoserate. Die gegen die AUG-Region gerichteten AS-ODN zeigten dagegen eine deutliche Erhöhung der Apoptoserate im Vergleich zu Kontroll-ODN-transfizierten PMA-stimulierten HUVEC. Da alle drei AS-ODN die αv -Protein-Expression signifikant hemmen, aber nur die gegen die AUG-Region gerichteten AS-ODN $\alpha v32$ und $\alpha v35$ Apoptose induzierten, nehmen wir an, dass dieses Ergebnis eher ein unspezifische Effekte der gegen die AUG-Region gerichteten AS-ODN ist. Die selektive Herunterregulation der αv -Kette hat nach unseren Untersuchungen keinen Effekt auf die Einleitung der Apoptose in PMA-stimulierten HUVEC.

Dies steht im Gegensatz zu bisher publizierten Daten mit $\alpha v\beta_3$ -gerichteten Antikörpern oder Peptiden. Diese Antagonisten konnten selektiv Apoptose in neu entstehenden Blutgefäßen induzieren⁴⁸. Brooks und Montgomery schlußfolgerten, dass das Überleben der Endothelzellen während der Angiogenese von der $\alpha v\beta_3$ -Expression abhängig ist und eine Hemmung der Angiogenese durch $\alpha v\beta_3$ -Inhibitoren durch die Induktion der Apoptose der Gefäßzellen vermittelt wird^{4,48}. Eventuell basieren diese unterschiedlichen Ergebnisse auf einer Induktion von verschiedenen Signalkaskaden, die durch die Antikörper oder Peptide auf der Zelloberfläche ausgelöst werden. Die im nächsten Abschnitt beschriebene Hemmung der Angiogenese *in vitro* durch αv -gerichtete AS-ODN wird am ehesten durch die Hemmung der Migration der Endothelzellen und weniger durch eine Reduktion der Proliferationsrate oder durch Induktion von Apoptose bedingt.

D.III. Hemmung der Angiogenese *in vitro* durch αv -gerichtete AS-ODN

Die über AS-ODN vermittelte Hemmung der Ausbildung von Kapillar-ähnlichen Gebilden und deren Fähigkeit zur Anastomosenbildung wurde durch MatriGel-Tests und einem *in vitro* Test der Angiogenese untersucht.

Die Hemmung der αv -Expression und der Migration korrelieren mit der Hemmung der PMA-induzierten Ausbildung Kapillar-ähnlicher Strukturen im MatriGel-Test. Im Gegensatz zu unseren Daten, für die αv -gerichtete Antisense-Inhibitoren verwendet worden, konnte in einer anderen Arbeit, bei der die β_3 -Untereinheit durch Antisense-RNA selektiv gehemmt wurde, kein Einfluss auf die Ausbildung von Kapillar-ähnlichen Strukturen aus HUVEC auf einer MatriGel Schicht beobachtet werden⁹⁷. Dieser Unterschied kann über das Vorhandensein verschiedener Wege der Angiogenese erklärt werden⁴⁴. So sind $\alpha v\beta_3$ -Antagonisten in der Lage den über bFGF induzierten Angiogeneseweg zu blockieren, während $\alpha v\beta_5$ -Antagonisten den über VEGF induzierten Angiogeneseweg hemmen können. Das αv -ODN ist somit in der Lage, beide Wege zu blockieren. Möglicherweise ist die Ausbildung von Kapillar-ähnlichen Strukturen auch über das $\alpha v\beta_5$ -Integrin vermittelt, weshalb β_3 -Inhibitoren keine Wirkung zeigten. Diese Erklärung wird durch Daten mit β_3 - oder αv -“knock-out“ Mäusen unterstrichen⁹⁸. Die Entwicklung der Blutgefäße in β_3 -negativen Mäusen wurde nicht

beeinflusst, ein Hinweis darauf, dass eine fehlende $\alpha v\beta_3$ -Expression durch andere Integrine, wie z.B. $\alpha v\beta_5$ kompensiert werden kann. Im Gegensatz zu den β_3 -negativen Mäusen war ein Fehlen der αv -Untereinheit mit dem Überleben von Maus-Embryonen nicht vereinbar, da es zu keiner ausreichenden Entwicklung der Zerebralen-Blutgefäße kam³⁰. Daher ist der Vorteil einer selektiven Hemmung der αv -Untereinheit durch Antisense-ODN, dass somit alle αv -abhängigen Angiogenese-wege blockiert werden können.

Um eine möglichst große Annäherung an die *in vivo* Bedingungen der Angiogenese zu erreichen, verwendeten wir ein Zellkultur-Modell, bei dem Endothelzellen ein Netzwerk an tubulären Strukturen bilden, das an ein Kapillarnetz erinnert. In dem Zellkulturmodell wurden HUVEC mit diploiden menschlichen Fibroblasten co-kultiviert. Die Fibroblasten sind in der Lage, verschiedene extrazelluläre Matrix-Proteine und Wachstumsfaktoren zu produzieren, so dass auf eine Stimulierung der HUVEC mit PMA oder externen Wachstumsfaktoren verzichtet werden konnte. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen des Transmigrationstests und des MatriGel-Tests wurde auch hier eine signifikante Hemmung der Ausbildung von Kapillar-ähnlichen Strukturen beobachtet. Die Hemmwirkung des $\alpha v3880$ ODN betrug 64% und erreichte fast die ca. 75%-ige Hemmung durch Sumarin, einem bekannten Angiogenese-Inhibitor. Die Inkubation der HUVEC/Fibroblasten-Kultur mit ODN ohne die Verwendung von kationischen Liposomen als Transfektionshilfe ergab mit einer 55%-igen Hemmung einen ähnlich starken Effekt, wie die der mit kationischen Liposomen unterstützten Transfektion, bei der eine 10-fach niedrigere Konzentration an ODN eingesetzt wurde. Daher sind unsere αv -gerichteten AS-ODN ohne den Einsatz von kationischen Lipiden sehr effizient, auch wenn dafür höhere Konzentrationen nötig sind. Dieses Ergebnis ist für einen möglichen klinischen Einsatz der AS-ODN von großer Bedeutung, da die bisher vorhandenen Transfektion-Reagenzien nicht für eine systemische Applikation beim Menschen geeignet sind.

D.IV. Schlussfolgerung und Ausblick

Verschiedene Arten an αv -Integrin-Antagonisten werden derzeit in klinischen Studien an Patienten mit fortgeschrittenen Krebserkrankungen untersucht. Ein gegen $\alpha v\beta_3$ gerichteter menschlicher monoklonaler Antikörper (Vitaxin) hat die klinischen Phase I- und II-Tests gerade erfolgreich bestanden. Es zeigten sich keine nennenswerten To-

xizitäten die durch Vitaxin direkt ausgelöst wurden und in einigen Fällen wurde sogar eine Reduktion der Tumormasse beschrieben^{30,99}. Ein weiterer erfolgreich erscheinender Antagonist, das anti- α_v zyklische Peptid (EMD-121974), zeigte effektive anti-angiogenetische Wirkung sowohl in *in vitro* Tests, als auch in Tiermodellen und wird gerade in einer klinischen Phase II Studie geprüft³⁰. In Anbetracht der Ergebnisse dieser Studie und der Effektivität unseres AS-ODN α_v 3880 *in vitro*, ist unser auf Antisense-Wirkung basierender α_v -Inhibitor möglicherweise auch für einen klinischen Einsatz geeignet. Verschiedene klinische Studien zeigten, dass AS-ODN gegen Onkogene keine relevanten Nebenwirkungen hatten und teilweise auch wirksam waren^{100,101,102}. Der Vorteil unserer Antisense-vermittelten Hemmung der α_v -Untereinheit im Vergleich zu den $\alpha_v\beta_3$ -gerichteten Antikörpern oder Peptiden, besteht in der Spezifität gegen alle α_v -Integrine. Dies resultiert im günstigsten Fall in einer Hemmung aller α_v abhängigen Angiogenesewege und beschränkt sich daher nicht allein auf den von $\alpha_v\beta_3$ abhängigen Angiogeneseweg⁴⁴. Dieser Unterschied kann für die therapeutische Wirkung des α_v -Antagonisten relevant sein, da die verschiedenen Tumore mit ihrem unterschiedlichen biologischen Verhalten und ihren verschiedenen Entwicklungsstadien eine Heterogenität in den Mechanismen der Angiogenese erwarten lassen. Jedoch sind vor dem klinischen Einsatz zwei verschiedene Problempunkte zu berücksichtigen. Erstens wurden die Zellen in unserem *in vitro* Test der Angiogenese über 14 Tage mit Antisense-ODN behandelt. Folglich müsste die Anwedung der α_v -Antisense-ODN langfristig erfolgen, um mögliche anti-angiogenetische Effekte *in vivo* zu erzielen und um ein Wachstum von residualen Tumorzellen zu verhindern. Zweitens ist α_v auf verschiedenen Geweben exprimiert, die nicht in Verbindung mit einer malignen Erkrankung stehen³⁶. So könnte durch die Antisense-vermittelte Herunterregulierung von α_v z.B. die Funktion der Osteoklasten beeinträchtigen werden und eventuell Fehlbildungen an der Niere verursacht werden^{57,103}. Dies sind einige der theoretisch-möglichen Nebenwirkungen die durch den Einsatz von α_v -Inhibitoren auftreten könnten.

Jedoch wird das α_v -Integrin von einigen invasiven Tumoren wie z.B. dem malignem Melanom, dem Glioblastom im fortgeschrittenen Stadium und dem Mammakarzinom exprimiert und scheint eine entscheidende Rolle im Progreß dieser Erkrankungen zu spielen^{104,105,106,107,108,109}. Spezifische monoklonale-AK gegen $\alpha_v\beta_3$ können menschliche $\alpha_v\beta_3$ -positive maligne Melanome effektiv hemmen, die in die Maus transplantiert wurden¹¹⁰. Ferner wurden α_v gerichtete Antisense-ODN zur Herunterregulierung der

Integrinexpression bei Zell-Linien und Tumorzellen eingesetzt, wie z.B. bei transformierten B-Lymphozyten¹¹¹, sowie Zellen des Kolon-¹¹² und Mammakarzinoms^{111,113}. Antisense-ODN könnten daher auch einen direkten Antitumoreffekt ausüben. Erst vor kurzem konnte gezeigt werden, dass es im Vergleich zu gesunden Probanden bei Patienten mit malignen hämatologischen Erkrankungen, wie z.B. den akuten chronischen Leukämien oder dem myelodysplastischen Syndrom, zu einem Anstieg der Anzahl von Mikrogefäßen innerhalb des Knochenmarks kommt¹¹⁴. Die Hemmung der α_v -Expression könnte ein vielversprechender Ansatz zur Behandlung solcher Erkrankungen sein. Die Neovaskularisation von Geweben/Organen ist auch mit nicht-malignen Erkrankungen assoziiert. Dazu zählen die diabetische Retinopathie, die rheumatoide Arthritis und die Restenose nach Angioplastie^{115,116}. Auch hier könnten α_v -gerichtete Antagonisten, wie unsere Antisense-ODN von therapeutischem Nutzen sein.

Die Schlussfolgerung aus unserer Untersuchung ist, dass die Antisense-vermittelte Herunterregulierung von α_v in Endothelzellen eine Hemmung der Angiogenese *in vitro* bewirkt. Folglich eignen sich unsere α_v -gerichteten AS-ODN für funktionelle Studien zur Rolle des α_v -Integrins innerhalb der Neovaskularisation. Außerdem stellen unsere Ergebnisse die Grundlage für die Entwicklung eines auf AS-ODN basierenden Antagonisten der Neoangiogenese dar, welcher ein nützliches Therapeutikum zur Bekämpfung sowohl von chronisch-entzündlichen Erkrankungen als auch von malignen Tumoren und malignen hämatologischen Erkrankungen darstellen könnte.

E. Zusammenfassung

Das Integrin $\alpha v\beta_3$ spielt eine zentrale Rolle in der Angiogenese. In dieser Arbeit haben wir Antisense-Oligodesoxyribonukleotide (ODN) gegen die mRNA der αv -Kette des Integrin Rezeptors $\alpha v\beta_3$ verwendet, um die Proteinexpression zu hemmen. Um geeignete lokale Zielsequenzen zu ermitteln, wurde Computer-unterstützt die Sekundärstruktur der αv -mRNA errechnet. Basierend auf unseren Sekundärstrukturanalysen wählten wir neben zwei Antisense-ODN gegen das Translationsinitiationskodon AUG zehn verschiedene Antisense-ODN gegen fünf potentiell geeignete Zielregionen auf der αv -mRNA aus und transfizieren diese in "Human umbilical vein endothelial cells" (HUVEC) unter Verwendung eines kationischen Lipids als Carrier. Acht Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA) stimuliert, um die αv -Expression zu induzieren. Mit Hilfe der anschließenden Durchflußzytometrie und der quantitativen "Real-Time" RT-PCR wurde die Wirksamkeit der verschiedenen Antisense-ODN gemessen. Es zeigte sich, dass drei der zwölf Antisense-ODN die Hochregulierung der αv -Expression auf Protein- und mRNA-Ebene bei einer ODN-Konzentration von 0,05 μM komplett unterdrücken konnten. Vier der verwendeten Antisense-ODN zeigten eine Inhibition der αv -Expression zwischen 60% und 80%. Fünf Antisense-Sequenzen hatten keinen signifikanten Einfluss. Die Hemmung der αv Protein-Expression war mit einer Hemmung der Migrationsfähigkeit der HUVEC's von 48% assoziiert. Weiterhin zeigte sich, dass die Transfektion mit Antisense-ODN die Bildung von tubulären Strukturen der HUVEC in einer extrazellulären Matrix aus Matrigel um 44% im Vergleich zu Kontroll-ODN-transfizierten Zellen hemmen konnte. Zur weiteren Beurteilung des anti-angiogenetischen Potentials unserer Antisense-ODN verwendeten wir ein Zellkultur-Modell der menschlichen Angiogenese, welches aus einer Co-Kultur von Endothelzellen und dermalen Fibroblasten bestand. Verglichen mit unbehandelten Zellen, konnten wir die Bildung Kapillar-ähnlicher Strukturen in der Zellkultur durch Transfektion mit αv -gerichteten Antisense-ODN um 64% drosseln.

Die Schlussfolgerung aus unseren Experimenten ist, dass die von uns entwickelten Antisense-ODN gegen die αv -Kette des $\alpha v\beta_3$ Integrins eine potentielle Inhibition der Angiogenese *in vitro* darstellen. Sie sind möglicherweise eine nützliche Alternative oder Ergänzung zu Antagonisten, die direkt an das $\alpha v\beta_3$ -Integrin binden. Sie könnten daher therapeutisch bei der Bekämpfung von malignen Tumoren oder malignen hämatologischen Erkrankungen eingesetzt werden.

Curriculum vitae**Zur Person**

Name:	Thorsten Gräf
Adresse:	Max-Born-Straße 20 40591 Düsseldorf
Geburtstag:	29.11.1975
Geburtsort:	Leverkusen
Familienstand:	ledig
Konfession:	römisch-katholisch
Eltern:	Josef-Karl Gräf, Maschinenbau Ingenieur-grad Ursula Gräf, geborene Müller, Bilanzbuchhalterin

Schul Ausbildung

1981 – 1986	Grundschule Morsbroicher Straße, Leverkusen
1986 – 1995	Gymnasium Freiherr-vom-Stein, Leverkusen

Universitätsausbildung

April 1996	Beginn des Medizinstudiums an der Heinrich-Heine-Universität zu Düsseldorf
März 1998	Ärztliche Vorprüfung
März 1999	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
September 1999	Beginn der Doktorarbeit im Hämatologischen For- schungslabor, im Institut für Hämatologie, Onko- logie und Immunologie (Prof. Dr. R. Haas)
September 2001	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Oktober 2001	Beginn des Praktischen Jahres an dem Universitätsklinikum Düsseldorf
Dezember 2002	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Danksagung

Besonders danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Rainer Haas für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die ausgezeichneten Möglichkeiten, es zu bearbeiten, die ständige Diskussionsbereitschaft, die er mir trotz seiner Belastung in Klinik und Forschung entgegenbrachte.

Herrn Dr. med. Ralf Kronenwett danke ich für die hervorragende praktische Betreuung, die Einweisung in die Prinzipien und Methoden der molekularbiologischen und medizinischen Forschung, seine ständige Hilfsbereitschaft und seine immerwährende Diskussionsbereitschaft und Geduld bei der Beantwortung meiner vielen Fragen.

Mein besonderer Dank gilt Frau dipl. biol. Astrid Rong und Frau dipl. biol. Susanne Stahn sowie allen anderen Mitarbeitern des Hämatologischen/Molekularen Forschungslabor des Institutes der Hämatologie, Onkologie und klinischen Immunologie, der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Insbesondere danke ich meinen Eltern für die Förderung und Unterstützung, ohne die mir die Anfertigung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Diese Arbeit wurde mit der Unterstützung der Deutschen Krebshilfe (Nr. 10-1376) und der Leukämie Liga e.V., Düsseldorf angefertigt.

Literaturverzeichnis

¹ Noden DM. Embryonic origins and assembly of blood vessels.

Am Rev Respir Dis 1989 ;140(4):1097-103

² Folkman J, Shing Y. Angiogenesis.

J Biol Chem 1992 ;267(16):10931-4

³ Auerbach W, Auerbach R. Angiogenesis inhibition: a review.

Pharmacol Ther 1994 ;63(3):265-311

⁴ Brooks PC, Clark RA, Cheresh DA. Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis.

Science 1994;264(5158):569-71

⁵ Brooks PC. Role of integrins in angiogenesis.

Eur J Cancer 1996 ;32(14):2423-9

⁶ Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation.

Cell 1991 ;64(2):327-36

⁷ Hlatky L, Tsionou C, Hahnfeldt P, Coleman CN. Mammary fibroblasts may influence breast tumor angiogenesis via hypoxia-induced vascular endothelial growth factor up-regulation and protein expression.

Cancer Res 1994 ;54(23):6083-6

⁸ Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis.

Nature 1992 ;359(6398):843-5

⁹ Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease.

Nat Med 1995 ;1(1): 27-31

- ¹⁰ Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion.
Cell 1992 ;69(1): 11-25

- ¹¹ Nguyen M, Strubel NA, Bischoff J. A role for sialyl Lewis-X/A glycoconjugates in capillary morphogenesis.
Nature 1993 ;365(6443): 267-9

- ¹² Brooks PC, Stromblad S, Sanders LC, von Schalscha TL, Aimes RT, Stetler-Stevenson WG, Quigley JP, Cheresch DA. Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3.
Cell 1996 ;85(5): 683-93

- ¹³ Fisher C, Gilbertson-Beadling S, Powers EA, Petzold G, Poorman R, Mitchell MA. Interstitial collagenase is required for angiogenesis in vitro.
Dev Biol 1994 ;162(2): 499-510

- ¹⁴ Carey DJ. Control of growth and differentiation of vascular cells by extracellular matrix proteins.
Annu Rev Physiol 1991;53: 161-77

- ¹⁵ Nicosia RF, Madri JA. The microvascular extracellular matrix. Developmental changes during angiogenesis in the aortic ring-plasma clot model.
Am J Pathol 1987 ;128(1): 78-90

- ¹⁶ Chicurel ME, Singer RH, Meyer CJ, Ingber DE. Integrin binding and mechanical tension induce movement of mRNA and ribosomes to focal adhesions.
Nature 1998 ;392: 730-733.

- ¹⁷ Gumbiner, BM. Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis.
Cell 1996 ;84: 345–357.

- ¹⁸ Chothia, C and Jones EY. The molecular structure of cell adhesion molecules.
Ann. Rev. Biochem 1997 ; 66: 823–862.

- ¹⁹ Cheresh D. Integrins: Structure, function and biological properties. *Advances in Molecular and Cell Biology*; 6, 225-252.
- ²⁰ Guan JL, Shalloway D. Regulation of focal adhesion-associated protein tyrosine kinase by both cellular adhesion and oncogenic transformation. *Nature* 1992 ;358(6388): 690-2
- ²¹ Schwartz MA. Signaling by integrins: implications for tumorigenesis. *Cancer Res* 1993 ;53(7): 1503-6
- ²² Varner JA, Emerson DA, Juliano RL. Integrin alpha 5 beta 1 expression negatively regulates cell growth: reversal by attachment to fibronectin. *Mol Biol Cell* 1995 ;6(6): 725-40
- ²³ Meredith JE Jr, Fazeli B, Schwartz MA. The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Biol Cell* 1993 ;4(9): 953-61
- ²⁴ Angiogenese-Inhibitoren in ihren derzeitigen klinischen Studien, wurde aus "The National Cancer Institute CancerTrial™ (Web Site)", der Sektion "Angiogenesis Inhibitors in Clinical Trials", Stand Oktober 2001 zusammengefasst.
- ²⁵ Schwartz I, Seger D, Shaltiel S. Vitronectin. *Int J Biochem Cell Biol* 1999 ;31(5): 539-44
- ²⁶ Springer TA. Adhesion receptors of the immune system. *Nature* 1990;346(6283): 425-34
- ²⁷ Suzuki S, Argraves WS, Arai H, Languino LR, Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Amino acid sequence of the vitronectin receptor alpha subunit and comparative expression of adhesion receptor mRNAs. *J Biol Chem* 1987 ;262(29): 14080-5

- ²⁸ Ruoslahti E, Pierschbacher MD. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins.
Science 1987 Oct ;238(4826): 491-7
- ²⁹ Horton MA. The $\alpha_v\beta_3$ Integrin "Vitronectin Receptor".
Int. J. Biochem. Cell Biol ; 29(5): 721-725
- ³⁰ BP Eliceiri and DA Cheresh. The role of alpha integrins during angiogenesis.
Mol Med 1998 ; 4: 741-750.
- ³¹ Stupack DG, Cheresh DA. ECM remodeling regulates angiogenesis: endothelial integrins look for new ligands.
Sci STKE 2002 ;2002(119): PE7
- ³² Kerr JS, Slee AM, Mousa SA. Small molecule alpha(v) integrin antagonists: novel anticancer agents.
Expert Opin Investig Drugs 2000 ;9(6): 1271-9
- ³³ Hartman GD, Duggan ME. alpha(v)beta(3) Integrin antagonists as inhibitors of bone resorption.
Expert Opin Investig Drugs 2000 ;9(6): 1281-9
- ³⁴ Westlin WF. Integrins as targets of angiogenesis inhibition.
Cancer J 2001 ;7 Suppl 3: 139-43
- ³⁵ Mitjans F, Meyer T, Fittschen C, Goodman S, Jonczyk A, Marshall JF, Reyes G, Piulats J. In vivo therapy of malignant melanoma by means of antagonists of alphav integrins.
Int J Cancer 2000 1;87(5): 716-23
- ³⁶ Varner JA, Brooks PC, Cheresh DA. REVIEW: the integrin alpha V beta 3: angiogenesis and apoptosis.
Cell Adhes Commun 1995 ;3(4): 367-74

- ³⁷ Schwartz MA, Schaller MD, Ginsberg MH. Integrins: emerging paradigms of signal transduction.
Ann Rev Cell Dev Biol 1995 ;11: 549-599.
- ³⁸ Meredith JE, Schwartz M. Integrins, adhesion, and apoptosis.
Trend Cell Biol 1997 ;7: 146-150.
- ³⁹ Giancotti FG. Integrin signaling: specificity and control of cell survival and cell cycle progression.
Curr Opin Cell Biol 1997 ;9: 691-700.
- ⁴⁰ Gille J, Swerlick RA. Integrins: role in cell adhesion and communication.
Ann NY Acad Sci 1996 ;797: 93-107.
- ⁴¹ Friedlander M, Brooks PC, and Shaffer RW et al. Definition of two angiogenic pathways by distinct av integrins
Science 1995 ;27: 1500-1502.
- ⁴² Kieffer N, Phillips DR. Platelet membrane glycoproteins: functions in cellular interactions.
Annu Rev Cell Biol 1990 ;6: 329-5
- ⁴³ Enenstein J, Kramer RH. Confocal microscopy analysis of integrin expression on the microvasculature and its sprouts in the neonatal foreskin.
J Invest. Dermatol. 1994 ;103: 381-386
- ⁴⁴ Friedlander M, Brooks PC, Shaffer RW, Kincaid CM, Varner JA, Cheresh DA. Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins.
Science 1995 1;270(5241): 1500-2
- ⁴⁵ Nicosia RF, Bonanno E. Inhibition of angiogenesis in vitro by Arg-Gly-Asp-containing synthetic peptide.
Am J Pathol 1991 ;138(4):829-33.

- ⁴⁶ Cheresh DA, Berliner SA, Vicente V, Ruggeri ZM. Recognition of distinct adhesive sites on fibrinogen by related integrins on platelets and endothelial cells.
Cell 1989 ;58(5): 945-53
- ⁴⁷ Leavesley DI, Schwartz MA, Rosenfeld M, Cheresh DA. Integrin beta 1- and beta 3-mediated endothelial cell migration is triggered through distinct signaling mechanisms.
J Cell Biol 1993 ;121(1): 163-70
- ⁴⁸ Brooks PC, Montgomery AM, Rosenfeld M, Reisfeld RA, Hu T, Klier G, Cheresh DA. Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels.
Cell 1994 ;79(7): 1157-64
- ⁴⁹ Felding-Habermann B, Mueller BM, Romerdahl CA, Cheresh DA. Involvement of integrin alpha V gene expression in human melanoma tumorigenicity.
J Clin Invest 1992 ;89(6): 2018-22
- ⁵⁰ Bianchini PJ, Burd PR, Metcalfe DD. IL-3-dependent mast cells attach to plate-bound vitronectin. Demonstration of augmented proliferation in response to signals transduced via cell surface vitronectin receptors.
J Immunol 1992 ;149(11): 3665-71
- ⁵¹ Doi M, Shichiri M, Yoshida M, Marumo F, Hirata Y. Suppression of integrin alpha(v) expression by endothelin-1 in vascular smooth muscle cells.
Hypertens Res 2000 ;23(6): 643-9
- ⁵² Eliceiri BP, Cheresh DA. The role of alphav integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development.
J Clin Invest 1999 ;103(9): 1227-30
- ⁵³ Brooks PC. Role of integrins in angiogenesis.
Eur J Cancer 1996 ;32A(14): 2423-9

⁵⁴ Stromblad S, Becker JC, Yebra M, Brooks PC, Cheresch DA. Suppression of p53 activity and p21WAF1/CIP1 expression by vascular cell integrin α V β 3 during angiogenesis.

J Clin Invest 1996 ;98(2):426-33.

⁵⁵ Ash P, Loutit JF, Townsend KM. Osteoclasts derived from haematopoietic stem cells.

Nature 1980; 283: 669-670.

⁵⁶ Rodan SB, Rodan GA. Integrin function in osteoclasts.

J Endocrinol. 1997; 154 47-56.

⁵⁷ Villanova I, Townsend PA, Uhlmann E, Knolle J, Peyman A, Amling M, Baron R, Horton MA, Teti A. Oligodeoxynucleotide targeted to the α v gene inhibits α v integrin synthesis, impairs osteoclast function, and activates intracellular signals to apoptosis.

J Bone Miner Res 1999 ;14(11): 1867-79

⁵⁸ Faccio R, Grano M, Colucci S, Zallone AZ, Quaranta V, Pelletier AJ. Activation of α v β 3 integrin on human osteoclast-like cells stimulates adhesion and migration in response to osteopontin.

Biochem Biophys Res Commun 1998 ;249(2): 522-5

⁵⁹ Townsend PA, Villanova I, Teti A, Horton MA. Beta1 integrin antisense oligodeoxynucleotides: utility in controlling osteoclast function.

Eur J Cell Biol 1999 ;78(7): 485-96

⁶⁰ Miyamoto T, Arai F, Ohneda O, Takagi K, et al. An adherent condition is required for formation of multinuclear osteoclasts in the presence of macrophage colony-stimulating factor and receptor activator of nuclear factor κ B ligand.

Blood. 2000 ;96: 4335-4343.

- ⁶¹ Branch AD. A hitchhikers guide to antisense and nonantisense biochemical pathways.
Hepatology 1996 ;24: 1517-1529.
- ⁶² Kronenwett R, Steidl U, Kirsch M, Sczakiel G, Haas R. Oligodeoxyribonucleotide uptake in primary human hematopoietic cells is enhanced by cationic lipids and depends on the hematopoietic cell subset.
Blood 1998; 91(3): 852-862.
- ⁶³ Askari FK, McDonnell WM. Antisense-Oligonucleotide therapy.
New Engl J Med 1996; 334: 316-320.
- ⁶⁴ Nyce JW and Metzger WJ. DNA antisense therapy for asthma in an animal model.
Nature 1997; 385:721-725.
- ⁶⁵ Zamecnik PC, Stephenson ML. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide.
Proc Natl Acad Sci USA 1978; 75:280-4.
- ⁶⁶ Benimetskaya L, Loike JD, Khaled Z, et al. Mac-1 (cd11b/cd18) is an oligodeoxynucleotide binding protein.
Nat Med 1997 ;3: 414-420.
- ⁶⁷ Hartmann G, Bidlingmaier M, Jahrsdörfer B, Endres S. Playground of oligonucleotides: extrapolation from in vitro to in vivo?
Nat Med 1997 (letter); 3: 702.
- ⁶⁸ Stein CA. Does antisense exist ?
Nature Medicine 1995 ;1: 1119-1121.
- ⁶⁹ Kronenwett R, Haas R. Antisense strategies for the treatment of haematological malignancies and solid tumors.
Ann Hematol 1998 ;77: 1-12

- ⁷⁰ Agrawal S, Temsamani J, Galbraith W, Tang J . Pharmacokinetics of antisense oligonucleotides.
Clin Pharmacokinet 1995 ;28: 7-16
- ⁷¹ Hoke GD, Draper K, Freier SM, Gonzalez C, Driver VB, Zounes MC, Ecker DJ. Effects of phosphorothioate capping on antisense oligonucleotide stability, hybridization and antiviral efficacy versus herpes simplex virus infection.
Nucleic Acids Res 1991 ;19: 5743-5748
- ⁷² Loke SL, Stein CA, Zhang XH, Mori K, Nakanishi M, Subasinghe C, Cohen JS, Neckers LM. Characterization of oligonucleotide transport into living cells.
Proc Natl Acad Sci USA 1989 ;86: 3474-3478
- ⁷³ Yakubov LA, Deeva EA, Zarytova VF, Ivanova EM, Rytte AS, Yurchenko LV, Vlassov V. Mechanism of oligonucleotide uptake by cells: Involvement of specific receptors?
Proc Natl Acad Sci USA 1989 ;86: 6454-6458
- ⁷⁴ Beltinger C, Saragovi HU, Smith RM, LeSauter L, Shah N, DeDionisio L, Christensen L, Raible A, Jarett L, Gewirtz AM. Binding, uptake, and intracellular trafficking of phosphorothioate-modified oligodeoxynucleotides.
J Clin Invest 1995 ;95: 1814-1823
- ⁷⁵ Goodchild J. Oligodeoxynucleotides, antisense inhibitors of gene expression.
Macmillan, London, 1989 ;53-77
- ⁷⁶ Rose JK, Buonocore L, Whitt MA. A new cationic liposome reagent mediating nearly quantitative transfection of animal cells.
Biotechniques 1991 ;10(4):520-5.
- ⁷⁷ Rittner K, Burmester C, Sczakiel G. In vitro selection of fast-hybridizing and effective antisense RNAs directed against the human immunodeficiency virus type 1.
Nucleic Acids Res 1993 ;21: 1381-1387

- ⁷⁸ Kronenwett R, Sczakiel G . Selection of fast-hybridizing complementary RNA species in vitro.
Methods Mol Biol 1997 ;74: 281-288
- ⁷⁹ Patzel V, Sczakiel G. Theoretical design of antisense RNA structures substantially improves annealing kinetics and efficacy in human cells.
Nat Biotechnol 1998 ;16: 64-68
- ⁸⁰ Stein CA, Cheng YC . Antisense oligonucleotides as therapeutic agents: Is the bullet really magical?
Science 1993 ;261: 1004-1012
- ⁸¹ Eigler A, Sinha B, Hartmann G, Endres S: Taming TNF. Strategies to restrain this proinflammatory cytokine.
Immunol Today 1997; 18: 487-492.
- ⁸² Hartmann G, Krug A, Eigler A, et al. Specific suppression of human tumor necrosis factor- α synthesis by antisense oligodeoxynucleotides.
Antisense Nucleic Acid Drug Develop 1996; 6: 291-299.
- ⁸³ Steidl U, Haas R, Kronenwett R. Intercellular adhesion molecular 1 on monocytes mediates adhesion as well as trans-endothelial migration and can be downregulated using antisense oligonucleotides.
Ann Hematol 2000 ;79(8): 414-23
- ⁸⁴ Nesterova M, Cho-Chung YS. Oligonucleotide sequence-specific inhibition of gene expression, tumor growth inhibition, and modulation of cAMP signaling by an RNA-DNA hybrid antisense targeted to protein kinase A R1alpha subunit.
Antisense Nucleic Acid Drug Dev 2000 ;10(6): 423-33
- ⁸⁵ Nesterova M, Noguchi K, Park YG, Cho-Chung YS. Compensatory stabilization of R11beta protein, cell cycle deregulation, and growth arrest in colon and prostate carcinoma cells by antisense-directed down-regulation of protein kinase A R1alpha protein.

Clin Cancer Res 2000 ;6(9): 3434-41

⁸⁶ Cho-Chung YS, Nesterova M, Pepe S, Lee GR, Noguchi K, Srivastava RK, Srivastava AR, Alper O, Park YG, Lee YN. Antisense DNA-targeting protein kinase A-RIA subunit: a novel approach to cancer treatment. Front Biosci 1999 ;4: 898-907

⁸⁷ Milella M, Estrov Z, Kornblau SM, Carter BZ, Konopleva M, Tari A, Schober WD, Harris D, Leysath CE, Lopez-Berestein G, Huang Z, Andreeff M. Synergistic induction of apoptosis by simultaneous disruption of the Bcl-2 and MEK/MAPK pathways in acute myelogenous leukemia. Blood 2002 ;99(9): 3461-4

⁸⁸ Gutierrez-Puente Y, Zapata-Benavides P, Tari AM, Lopez-Berestein G. Bcl-2-related antisense therapy. Semin Oncol 2002 ;29(3 Suppl 11): 71-6

⁸⁹ Agrawal S, Jiang ZW, Zhao QY, et al. Mixed backbone oligonucleotides as second generation antisense oligonucleotides: in vitro and in vivo studies. Proc Nat Acad Sci USA 1997; 94:2620-2627.

⁹⁰ Patzel V, Steidl U, Kronenwett R, Haas R, Sczakiel G. A theoretical approach to select effective antisense oligodeoxyribonucleotides at high statistical probability. Nucleic Acids Res. 1999 ;27: 4328-4334.

⁹¹ Senger M, Glatting KH, Ritter O, Suhai S. X-HUSAR, an X-based graphical interface for the analysis of genomic sequences. Comput Methods Programs Biomed. 1995 ;46: 131-141.

⁹² Suzuki S, Argraves WS, Arai H, Languino LR, Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Amino acid sequence of the vitronectin receptor alpha subunit and comparative expression of adhesion receptor mRNAs. J Biol Chem. 1987 ;262: 14080-14085.

- ⁹³ Nicosia RF, Ottinetti A. Modulation of microvascular growth and morphogenesis by reconstituted basement membrane gel in three-dimensional cultures of rat aorta: a comparative study of angiogenesis in matrigel, collagen, fibrin, and plasma clot. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1990 ;26: 119-128.
- ⁹⁴ Bishop ET, Bell GT, Bloor S, Broom IJ, Hendry NFK, Wheatley DN. An in vitro model of angiogenesis: Basic features. *Angiogenesis.* 1999 ;3: 335-344.
- ⁹⁵ Gagliardi A, Hadd H, Collins DC. Inhibition of angiogenesis by suramin. *Cancer Res.* 1992 ;52: 5073-5075.
- ⁹⁶ Stein CA. The experimental use of antisense oligonucleotides: a guide for the perplexed. *J Clin Invest.* 2001 ;108: 641-644.
- ⁹⁷ Dallabrida SM, De Sousa MA, Farrell DH. Expression of antisense to integrin subunit beta 3 inhibits microvascular endothelial cell capillary tube formation in fibrin. *J Biol Chem.* 2000 ;275: 32281-32288.
- ⁹⁸ Hodivala-Dilke KM, McHugh KP, Tsakiris DA, et al. Beta3-integrin-deficient mice are a model for Glanzmann thrombasthenia showing placental defects and reduced survival. *J Clin Invest.* 1999 ;103: 229-238.
- ⁹⁹ Gutheil JC, Campbell TN, Pierce PR, et al. Targeted antiangiogenic therapy for cancer using Vitaxin: a humanized monoclonal antibody to the integrin alphavbeta3. *Clin Cancer Res.* 2000 ;6: 3056-3061.
- ¹⁰⁰ Waters JS, Webb A, Cunningham D, et al. Phase I clinical and pharmacokinetic study of bcl-2 antisense oligonucleotide therapy in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *J Clin Oncol.* 2000 ;18: 1812-1823.

¹⁰¹ Nemunaitis J, Holmlund JT, Kraynak M, et al. Phase I evaluation of ISIS 3521, an antisense oligodeoxynucleotide to protein kinase C- α , in patients with advanced cancer.

J Clin Oncol. 1999 ;17: 3586-3595.

¹⁰² Stevenson JP, Yao KS, Gallagher M, et al. Phase I clinical/pharmacokinetic and pharmacodynamic trial of the c-raf-1 antisense oligonucleotide ISIS 5132 (CGP 69846A).

J Clin Oncol. 1999 ;17: 2227-2236.

¹⁰³ Villanova I, Townsend PA, Uhlmann E, et al. Oligodeoxynucleotide targeted to the α v gene inhibits α v integrin synthesis, impairs osteoclast function, and activates intracellular signals to apoptosis.

J Bone Miner Res. 1999 ;14: 1867-1879.

¹⁰⁴ Gehlsen KR, Davis GE, Sriramaraio P. Integrin expression in human melanoma cells with differing invasive and metastatic properties.

Clin Exp Metastasis. 1992;10:111-120.

¹⁰⁵ Gladson CL, Cheresh DA. Glioblastoma expression of vitronectin and the α v β 3 integrin. Adhesion mechanism for transformed glial cells.

J Clin Invest. 1991 ;88: 1924-1932.

¹⁰⁶ Marshall JF, Hart IR. The role of α v-integrins in tumour progression and metastasis.

Semin Cancer Biol. 1996 ;7: 129-138.

¹⁰⁷ Meyer T, Marshall JF, Hart IR. Expression of α v integrins and vitronectin receptor identity in breast cancer cells.

Br J Cancer. 1998 ;77: 530-536.

¹⁰⁸ Albelda SM, Mente SA, Elder DE, et al. Integrin distribution in malignant melanoma: association of the β 3 subunit with tumor progression.

Cancer Res. 1990 ;50: 6757-6764.

- ¹⁰⁹ Petitsclerc E, Stromblad S, von Schalscha TL, et al. Integrin alpha(v)beta3 promotes M21 melanoma growth in human skin by regulating tumor cell survival. *Cancer Res.* 1999 ;59: 2724-2730.
- ¹¹⁰ Mitjans F, Meyer T, Fittschen C, et al. In vivo therapy of malignant melanoma by means of antagonists of alphav integrins. *Int J Cancer.* 2000 ;87: 716-723.
- ¹¹¹ Townsend PA, Villanova I, Uhlmann E, et al. An antisense oligonucleotide targeting the alphaV integrin gene inhibits adhesion and induces apoptosis in breast cancer cells. *Eur J Cancer.* 2000 ;36: 397-409.
- ¹¹² Kozlova NI, Morozevich GE, Chubukina AN, Berman AE. Integrin alphavbeta3 promotes anchorage-dependent apoptosis in human intestinal carcinoma cells. *Oncogene.* 2001 ;20: 4710-4717.
- ¹¹³ Townsend PA, Villanova I, Uhlmann E, et al. An antisense oligonucleotide targeting the alphaV integrin gene inhibits adhesion and induces apoptosis in breast cancer cells. *Eur J Cancer.* 2000 ;36: 397-409.
- ¹¹⁴ Aguayo A, Kantarjian H, Manshouri T, Gidel C, Estey E, Thomas D, Koller C, Estrov Z, O'Brien S, Keating M, Freireich E, Albitar M. Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood* 2000 ;96(6): 2240-5.
- ¹¹⁵ Storgard CM, Stupack DG, Jonczyk A, Goodman SL, Fox RI, Cheresch DA. Decreased angiogenesis and arthritic disease in rabbits treated with an alphavbeta3 antagonist. *J Clin Invest* 1999 ;103(1): 47-54.

- ¹¹⁶ Choi ET, Engel L, Callow AD, Sun S, Trachtenberg J, Santoro S, Ryan US.
Inhibition of neointimal hyperplasia by blocking alpha V beta 3 integrin with a small
peptide antagonist GpenGRGDSPCA.
J Vasc Surg 1994 ;19(1): 125-34.