

Medizinische Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. G. Ertl

Wirkung von A20 auf die durch oxidiertes low density lipoprotein induzierte Apoptose
bei Endothelzellen am Beispiel boviner Endothelzellen

Inaugural – Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät der

Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von

Wolfgang Leicht

aus Würzburg

Würzburg, Mai 2009

Referent: Prof. Dr. med. Jan Galle

Korreferent: Prof. Dr. med. Christoph Wanner

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 22.Dezember 2009

Der Promovent ist Arzt

Diese Arbeit widme ich meinen Eltern, die mir stets zur Seite stehen und mir ein Leben voller Freiheit, Freude und Glück ermöglichen. Ausserdem meiner Frau Pia, die mir täglich Kraft und Phantasie spendet und zwei wunderbare Kinder geschenkt hat. Ohne Euch wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Inhaltsverzeichnis:

Einleitung	S.1
I.1 Kontext der Doktorarbeit	
I.2 Apoptose und Nekrose	
I.3 Pathogenese der Atherosklerose	
I.4 Lipoproteine und Atherosklerose	
I.5 Morphologische Korrelate der Apoptose	
I.6 Apoptose bei Atherosklerose	
I.7 Biochemische und genetische Mechanismen der Apoptose	
I.8 A20, ein neuer Faktor in der Signalkette der Apoptose	
I.9 Zielsetzung	
Material und Methoden	S.14
II.1 Präparation der bovinen Pulmonalarterien aus den Thoraxorganen	
II.2 Die Präparation der Endothelzellen aus den Pulmonalarterien mittels Kollagenaseverdau	
II.3 Inkubation und Passage der Zellen	
II.4 Transformation von E. coli supercompetent cells	
II.5 Plasmidgewinnung nach dem Quiagen EndoFree Plasmid Maxi Protokoll	
II.6 Transfektion der bovinen Endothelzellen mittels FuGENE 6	
II.7 In situ beta-Galaktosidase Färbung	
II.8 Annexin-/Propidiumjodidfärbung	
II.9 Auswertung am FacScan	
II.10. Grafische Darstellung der Ergebnisse mittels SigmaPlot	
II.11 Kolonie-PCR	
II.12 RT-PCR	
II.13 Auswertung der RT-PCR mittels Gelelektrophorese	
II.14 Präparation und Oxidation von low density Lipoprotein	
II.15 Material in alphabetischer Reihenfolge	

Ergebnisse	S.29
III.1 oxidiertes LDL: Wirkung auf die Apoptoserate der bovinen pulmonalen endothelialen Endothelzellen (BPEC)	
III.2 Plasmidgewinnung	
III.3 Optimierung der Transfektionsrate	
III.4 Nachweis der Produkte in den transfizierten Zellen	
III.5 Messung der Apoptoserate mittels des Fluoreszenzzytometers	
Diskussion	S.38
IV.1 A20 ist ein protektiver Faktor gegen die durch oxidiertes LDL induzierte Apoptose	
IV.2 Vergleich mit weiteren synthetischen und natürlich vorkommenden Inhibitoren der Apoptose	
IV.3 Einfluß von A20 auf den Transkriptionsfaktor NFkappaB	
IV.4 Einsatzmöglichkeiten für A20 in der Therapie entzündlicher Erkrankungen und ungewünschter immunologischer Prozesse	
Zusammenfassung	S.46
Literaturverzeichnis	S.47
Danksagung	
Lebenslauf	

Verzeichnis der Abkürzungen:

APAF:	apoptotic protease activating factor
ABIN:	A20 binding inhibitor of nuclear factor kappa B
AT I/II:	Angiotensin I/II
bad:	bcl-2 associated protein d
bak:	bcl-2 associated protein k
bax:	bcl-2 associated protein x
bcl-2:	b-cell lymphoma 2
bcl-x(L):	bcl-2 member x (long splice)
BPEC:	bovine pulmonare endothelial cells
CD 40:	cluster of differentiation 40
DEPC:	Diethyl Pyrocarbonat
DMEM:	Dulbecco`s modified eagle medium
DMSO:	Dimethyl Sulfoxid
dNTP:	desoxy-ribo-nucleotide
EBV:	ebstein barr virus
EtOH:	Ethanol
FADD:	Fas associated death domain protein
FAS:	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6
FCS:	fetal calw serum
GMCSF:	granulocyte macrophage colony stimulating factor
HTLV1:	human T lymphotropic virus
HUVEC:	human umbilical vein endothelial cells
IAP:	inhibitor of apoptosis
ICAM:	intercellular cell adhesion molecule
ICE:	interleukin-1 β converting enzyme
IGF-1:	insuline like growth factor
IKK:	IkappaB kinase
IkappaB:	inhibitor of kappa B
IL1:	Interleukin 1
IL1-RAcP:	IL1-receptor associated cyclic phosphate
iNOS:	inducible NO-synthase

IRAK:	IL1-receptor associated kinase
LDL:	low density Lipoprotein
LPS:	Lipopolysaccharide
LMP-1:	latent membrane protein
MAP3K:	mitogen activated kinase kinase kinase
mRNA/RNA:	ribo nuclein acid
MyD88:	myeloid differentiation factor 88
NEMO:	NFkappaB essential modulator
NFkappaB:	nuclear factor kappa B
ox-LDL/n-LDL:	oxidiertes/ natives low density Lipoprotein
PBS:	phosphate puffered saline
PCR:	polymerase chain reaktion
PDGF:	platelet derived growing factor
RIP:	receptor interacting protein
RT:	reverse Transkriptase
Tax:	transactivator protein x (apotosis signaling protein)
TGF- β :	transforming growth factor- β
TLR-4:	toll like receptor-4
TNF:	tumor necrosis factor
TRADD:	TNF receptor associated death domain
TRAF:	tumor necrosis factor receptor associated factor
TXBP151:	tax binding protein 151
VCAM:	vascular cell adhesion molecule
VDAC:	voltage dependent annionchannel

EINLEITUNG

I.1. Kontext der Doktorarbeit

Herzinfarkt und Tumorerkrankungen gehören zu den häufigsten Todesursachen der Menschen in westlichen Industrienationen

In den letzten Jahrzehnten wurden enorme finanzielle und personelle Anstrengungen unternommen, um die Ursachen, die Pathophysiologie mit Regulationsstörungen auf allen möglichen Ebenen der Erkrankungen zu erkennen und zu begreifen. Dabei untersuchte man makroskopisch sichtbare Veränderungen bis hin zu elektronenmikroskopisch nicht mehr wahrnehmbaren Vorgängen in den beteiligten Zellen selbst.

Man weiß inzwischen, dass es innerhalb der Zellen Signalketten gibt, welche Anpassungen an veränderte äußere Umstände ermöglichen. Eine Möglichkeit der Anpassung ist in diesem Zusammenhang die Apoptose.

Apoptose ist eine Art der Zellregulation, welche schon bei der Embryogenese eine wichtige Rolle in Bezug auf die Organentwicklung und die Differenzierung der einzelnen Körperstrukturen spielt. Wie man am Einfluß z.B. des Alkohols, des Zigarettenrauchens, oder von viralen bzw. bakteriellen Infekten während der Schwangerschaft auf den Embryo sieht, unterliegt die Apoptose einem sensiblen Gleichgewicht, welches bei Störung mitunter zu fatalen Folgen für das Leben führen kann.

Da die Apoptose nicht nur auf die Embryonalzeit beschränkt ist, sondern auch im weiteren Leben eine wichtige Rolle in der Beibehaltung der Integrität und Funktion aller Organe spielt, unterliegt ihre Regulation auch hier stark den äußeren Einflüssen, aber auch genetisch programmierten individuellen Gegebenheiten.

Die Erforschung der Signalketten innerhalb der Zellen dient dem Verständnis der Regulationsmechanismen in den Zellen und wird in vielen Laboratorien mit großem Einsatz betrieben. Unser Ziel war es mit dieser Arbeit den Einfluß der Hypercholesterinämie auf die Endothelzellen der Gefäße darzustellen, einen einzelnen apoptoseregulierenden Faktor genauer unter die Lupe zu nehmen und seinen Einfluß

bezüglich der Zellregulation in diesem Zusammenhang genauer zu untersuchen. Diesbezüglich bot sich der in seiner Funktion noch recht wenig durchleuchtete Faktor A20 an, dem antiapoptotische Eigenschaften zugeschrieben werden, dessen Wirkung im Zusammenhang mit der Hypercholesterinämie aber noch völlig ungeklärt ist. Bei entsprechenden Ergebnissen wäre dann eventuell ein Werkzeug zur Einflußnahme auf Prozesse gegeben, die durch oxidiertes low density Lipoprotein (ox-LDL) induziert werden.

I.2. Apoptose und Nekrose

In den letzten Jahrzehnten wurden zwei Formen des Zelltodes, Nekrose und Apoptose, unterschieden. Nekrose bezieht sich auf eine Reihe von morphologischen Veränderungen, die durch enzymatische Verdauung der Zelle, Platzen von Zellmembranen und Denaturierung von Proteinen zum Zelltod führen. Apoptose dagegen ist eine programmierte, aktive und hoch selektive Art des Zelltodes, durch welche Zellen beseitigt werden können, die entweder stark geschädigt oder überflüssig sind. Es gibt eine Reihe verschiedener Stimuli zur Auslösung von Apoptose. Zum Beispiel Fehler in der DNA, intrazelluläre Veränderungen, Toxine und extrazelluläre Faktoren (79)(60). Apoptose spielt eine wichtige Rolle in der Organogenese und Zellregulation (31). Störungen der Regulation von Apoptose können zu Krebsgeschwüren oder Gewebsatrophien führen (23). Sowohl überschießende als auch reduzierte Apoptose ist pathologisch, so dass der Kontrolle von Apoptose ein therapeutischer Charakter zukommt.

Bei der Entstehung der koronaren Herzkrankheit hat man Apoptose in atherosklerotischen Veränderungen nachweisen können. Es wird gesteigerte Apoptose bei eingewanderten Makrophagen im lipidreichen Kern des Atheroms und bei den glatten Muskelzellen in fibrotisch veränderten Regionen gefunden. Den glatten Muskelzellen kommt eine tragende Rolle bei der Verdickung der Intima zu (30)(9). In atherosklerotischem Gewebe konnte eine gesteigerte Expression molekularer Marker der Apoptose wie Cystein Protease (CPP 32) gefunden werden. CPP 32 ist ein sensitiver

Marker der Apoptose und eine wichtige Effektorprotease innerhalb der Signalkette der Apoptose (44).

Dazu kommt eine Veränderung der Konzentration vasoaktiver Mediatoren, wie NO, Angiotensin (AT) II, Endothelin, die bei der Apoptose der glatten Muskulatur und des Endothels der Gefäße eine Rolle spielen. So konnte man für AT II eine Apoptosesteigerung bei human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) durch Aktivitätssteigerung der Caspase 3 nachweisen. Diese Wirkung konnte durch NO-Donoren bzw. durch AT I/II-Blocker aufgehoben werden. Endothelin wirkt auf autokrinen/parakrinen Weg über Endothelin-B Rezeptoren antiapoptotisch. NO wirkt über eine Hochregulation von FAS (Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6) Rezeptoren bei glatten Muskelzellen apoptosesteigernd (19)(63)(29).

Die Verbindung von kardiovaskulären Risikofaktoren wie Hypertonie und Hypercholesterinämie mit einer gesteigerten Apoptoserate legt die Beteiligung dieser Faktoren an der Entstehung der Atherosklerose nahe. Die genauen Mechanismen der Entstehung atherosklerotischer Veränderungen sind aber weiterhin nicht vollständig geklärt.

I.3. Pathogenese der Atherosklerose

Haupttrisikofaktoren der Atherosklerose sind Hypercholesterinämie, Bluthochdruck, Rauchen, Diabetes mellitus und andere Faktoren. Atherosklerose entsteht insbesondere an Stellen erhöhter Beanspruchung des Endothels der Gefäße durch mechanische und toxische Einflüsse (56), z.B. an Aufzweigungen der Gefäße, bei denen der Blutstrom mittels Verwirbelungen auf das Endothel der Bifurkation trifft. Der Schädigung entsprechen subendotheliale Ansammlungen von Lipoproteinen in den Arterien (50) und die Expression von Adhäsionsmolekülen an der Zelloberfläche. Monozyten und T-Lymphozyten binden an diese Moleküle und migrieren zwischen die Endothelzellen, unter dem Einfluss von chemotaktisch wirksamen Mediatoren, welche durch die veränderten Endothelzellen selbst und die darunterliegenden glatten Muskelzellen sezerniert werden (51)(16). Die eingewanderten Monozyten wandeln sich in Makrophagen um. Diese phagozytieren die vorhandenen Lipide und werden zu Schaumzellen. Mehrere Schichten dieser Schaumzellen bilden zusammen mit den

Lymphozyten und glatten Muskelzellen (73) den sogenannten fatty streak. Durch Zunahme der Veränderungen und die ins Gefäßlumen protrahierten Oberflächenveränderungen, bilden sich Lücken im Endothelzellverband. Die darunterliegenden Makrophagen und Wandbestandteile führen zur Aggregation von Thrombozyten. Auf diese Weise bildet sich der murale Thrombus (25)(26)(45)(46). Durch Sekretion einer Bindegewebsmatrix, bestehend aus Kollagen und Proteoglykanen durch die glatten Muskelzellen und die weitere Ansammlung von Lipiden schreitet die atherosklerotische Läsion fort (74) bis zur Bildung eines fibrösen Plaques.

I.4. Lipoproteine und Atherosklerose

Lipoproteine:

Mit dem Nachweis von low density Lipoprotein (LDL) in atherosklerotischen Plaques 1954 gab es schon erste Hinweise, dass erhöhte Plasma LDL Spiegel ein entscheidender Risikofaktor für die Atherosklerose darstellen (Esterbauer: 1992).

LDL gehört zur Stoffgruppe der Lipoproteine. Dies sind Mikroemulsionen, die dem Transport von Fetten und Cholesterin im wässrigen Milieu des Körpers dienen. Es handelt sich um kugelige Strukturen mit lipophilem Kern und hydrophiler Schale. Lipoproteine entstehen während verschiedener Phasen des Stoffwechsels und werden nach ihrer Dichte in Chylomikronen, very low density lipoprotein (VLDL), low density lipoprotein (LDL), und high density lipoprotein (HDL) eingeteilt. LDL wird als atherogen und HDL als atheroskleroseprotektiv eingestuft.

LDL:

Es entsteht durch intravasalen Abbau von VLDL. Von allen Lipoproteinen enthält es die höchste Konzentration an Cholesterin und dient als dessen Transporter zu den Zellen. Cholesterin ist ein essentieller Baustein für Zellmembranen und Steroidsynthese, sowie für die Bildung der Gallensäuren. LDL hat einen Durchmesser von 19-25 nm und ein Molekulargewicht von 2,5 Millionen Dalton. Der Lipidkern besteht aus mehreren Hundert Cholesterinester- und Triglyceridmolekülen und wird von einer einschichtigen hydrophilen Schale aus ca. 700 Phospholipid- und ca. 600 Cholesterinmolekülen umhüllt. Eingebettet in diese äußerer Hülle ist das aus mehreren Tausend Aminosäuren

bestehende Apolipoprotein Apo B, das den LDL-Partikel umschlingt. Zunächst hielt man LDL mit seiner Cholesterinmasse für den Hauptverursacher der Atherosklerose bis in den 80er Jahren ox-LDL in atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen werden konnte. Seit diesem Zeitpunkt gilt ox-LDL als das entscheidende Molekül im Pathomechanismus der Atherosklerose (Esterbauer: 1992)

Atherogene Eigenschaften von ox-LDL:

Ox-LDL wird über scavenger Rezeptoren in die Zellen aufgenommen. Dort akkumuliert es und bewirkt die Umwandlung dieser Zellen zu Schaumzellen. Es besitzt chemotaktische Eigenschaften für Monozyten und vermag die Gewebebeweglichkeit von Makrophagen zu hemmen (Quinn: 1985). Es wirkt zytotoxisch in der Zellkultur und inhibiert die NO vermittelte Vasodilatation (Kugiyama:1990). Ox-LDL besitzt immunstimulatorische Eigenschaften. Insgesamt sind 20 biologische Effekte von ox-LDL beschrieben worden (Steinberg: 1997). Ox-LDL wird für die Abnahme der Zellzahl und die Zunahme der Plaqueinstabilität in späten Stadien der Atherosklerose verantwortlich gemacht (Bjorkerud: 1996). An vielen verschiedenen Zellen in Kultur vermag ox-LDL Apoptose auszulösen.

I.5. Morphologische Anzeichen der Apoptose

Während der Apoptose kommt es zur Zellschrumpfung. Das Chromatin wird pyknotisch und kondensiert. Gleichzeitig kommt es zur Volumenabnahme, die cytoplasmatischen Organellen werden zusammengedrängt und die Zelldichte nimmt zu. Mikrovilli verschwinden, cytoplasmatische Einschlüsse formen sich an der Zelloberfläche und es bilden sich apoptotische Körperchen durch Abschnürung von Zellteilen ohne Erhöhung der Zellpermeabilität (77). Beim Abbau der Zellen sind kalziumabhängige Enzyme beteiligt, welche zur irreversiblen Zerstörung von Zellorganellen führen (27). Diese apoptotischen Körper werden entweder phagozytiert oder durchlaufen sekundäre Nekrose. Dabei kann es zu einer lokal abgegrenzten Entzündungsreaktion kommen, unter Beteiligung von Makrophagen.

Im Gegensatz zur Apoptose kommt es bei der Nekrose zu einer Volumenzunahme mit frühzeitiger Zerstörung der Plasmamembran, unkontrolliertem Abbau der DNA und

Platzen von Organellen. Durch diesen Verlust der Zellintegrität kommt es zu einer ausgebreiteten entzündlichen Reaktion.

I.6. Apoptose bei koronarer Herzkrankheit

Als das von den Apoptose induzierenden Faktoren als erstes betroffene Organ spielt das Endothel der Gefäße die entscheidende Rolle in der Atherogenese. Zunächst sah man das Gefäßendothel nur als eine semipermeable Membran an. In den letzten beiden Jahrzehnten hat man sehr viel über die vielfältigen Funktionen gelernt. Inzwischen kann man das Gefäßendothel als das größte endokrine Organ des Körpers bezeichnen, mit endokrinen, parakrinen und autokrinen Funktionen. Diese Funktionen beinhalten die Vasoregulation von Transport- und Widerstandsgefäßen, Gefäßwachstum, Aggregationshemmung von Thrombozyten, Hemmung der Adhäsion von Monozyten und Thromboseinhibition (75). Die Vasoregulation ist das Ergebnis der Balance zwischen relaxierenden und kontrahierenden Faktoren. Als relaxierender Faktor spielt das NO eine entscheidende Rolle. Dieses wird durch die Endothelzelle selbst durch die Aktivität der NO-Synthetase produziert (49). NO wirkt auf die umliegenden glatten Muskelzellen ein. Die wichtigsten kontraktile Faktoren sind Endothelin-1, Thromboxan und Prostaglandin H₂.

Zusätzlich besitzt das Endothel antiatherosklerotische und antithrombotische Funktion. Dagegen bildet das geschädigte Endothel chemotaktische und adhäsionsfördernde Moleküle für Monozyten und T-Lymphozyten und fördert die Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen, welche sich zu Schaumzellen umwandeln können. Eine erniedrigte NO-Konzentration führt zur stärkeren Bildung von Neointima, welche in atherosklerotischen Plaques vermehrt nachgewiesen werden kann (15). Ein funktionstüchtiges Endothel ist daher wichtig bei der Prävention von Atherosklerose.

Faktoren, welche die Endothelfunktion beeinträchtigen, die sogenannten koronaren Risikofaktoren, sind mannigfaltig. Zu ihnen gehören neben Bluthochdruck, Rauchen, Diabetes mellitus, fortgeschrittenem Alter, männlichem Geschlecht auch erhöhte Cholesterinspiegel im Blut. Insbesondere der oxidierten Form des LDL konnte ein atherogener Effekt nachgewiesen werden. Durch ox-LDL werden unter anderem Vasospasmen begünstigt, was evtl. mit der gesteigerten Produktion von Superoxid und

der damit verbundenen Inaktivierung des relaxierenden NO zusammenhängt (65) (52). Viele Studien konnten bereits Apoptose in atherosklerotisch veränderten Koronarien, Karotiden und Aorten nachweisen. Diese Studien zeigten, dass Makrophagen und glatte Muskelzellen, im intimalen Teil des atherosklerotischen Plaques gelegen, eine gesteigerte Apoptose aufweisen. Apoptose wird auch bei glatten Muskelzellen in der unterhalb der Atherosklerose liegenden Media in gesteigerter Zahl gefunden. Bisher ist noch unklar, ob Apoptose nur in einem späten Stadium der Atherosklerose auftritt, oder bereits in frühen Vorstufen.

I.7. Biochemische und genetische Kontrolle der Apoptose

Apoptose kann durch eine Vielzahl von Stimuli ausgelöst werden. Zum Beispiel durch Hitze, Toxine, Entzug von Wachstumsfaktoren, Zytokine wie transforming growth factor (TGF)- β , Glukokortikoide, Stickoxid (NO) und Strahlung. Zum Beispiel kommt es zu einem Anstieg der Apoptoserate von glatten Gefäßmuskelzellen bei Entzug von Wachstumsfaktoren wie insulin like growth factor (IGF)-1 und platelet derived growth factor (PDGF). Glatte Muskelzellen im Stadium der Apoptose durchlaufen diese weiter, auch bei Zugabe der genannten Wachstumsfaktoren (4). Zellart und Grundzustand der jeweiligen Zelle bestimmen in erheblichem Maße, ob eine Zelle Apoptose durchläuft oder nicht.

Ein Oberflächenmolekül, welches Apoptose induziert, ist das FAS-Protein. Es spielt eine wichtige Rolle in der Immunregulation und der Selbsterkennung von körpereigenem Gewebe (76)(70). FAS-induzierte Apoptose könnte durch den Sphingomyelin-Pathway vermittelt werden, welcher zu einer Akkumulation von Ceramid führt. Ceramid ist ein wichtiger Vermittler der Apoptose (6).

Ein weiteres gut beschriebenes Beispiel für die Apoptoseregulation ist das Protoonkogen c-myc, welches für ein DNA-bindendes Transkriptionsprotein kodiert. Dadurch spielt es eine Rolle in der Proliferation oder Apoptose von Zellen (24). Die Aktivität von c-myc ist abhängig von der zellulären Umgebung, sprich Cytokinen oder Onkogenen.

Caspasen sind eine Familie von Proteasen, die eine zentrale Rolle im Signalweg der Apoptoseinduktion spielen (84). Durch Caspaseinhibitoren können Zellen gegenüber Apoptose unempfindlich werden (11)(72)(48). Diese Erkenntnisse unterstützen die Theorie, dass die Apoptose letztendlich in einem oder wenigen zentralen Signalwegen mündet. Trotz einer zentralen Rolle der Caspasen in der Apoptose, ist die genaue Interaktion der einzelnen Glieder noch nicht vollständig geklärt.

Das b-cell lymphoma(bcl)-2 Protein, ein membranständiges Protein der Mitochondrien, der Kernmembran und des endoplasmatischen Retikulums, ist ein potenter Inhibitor des apoptotischen Zelltodes (35). Überexpression von bcl-2 in verschiedenen Experimenten unterdrückte die Wirkung einer Reihe Apoptose induzierender Stimuli, wie z.B. Strahlung, bestimmte Chemotherapeutika, virale Infektionen, Entzug von Wachstumsfaktoren und anderer (55).

Andere Mitglieder der bcl-Familie können Apoptose induzieren (5). Mitglieder der bcl-2 Familie sind wichtige Regulatoren der Apoptose, indem sie die Durchlässigkeit der mitochondrialen Membran regulieren, je nachdem ob pro- oder antiapoptotische Proteine dieser Familie überwiegen. Es scheint sich dabei um einen voltage-dependent anion channel (VDAC) zu handeln, der durch die proapoptotischen bcl-2 associated protein k (bak) und bcl-2 associated protein x (bax) geöffnet und durch das antiapoptotische bcl-x(L) geschlossen wird. Durch Öffnen dieses Kanals kommt es zur Freisetzung des apoptoseinduzierenden Cytochrom C (64). Im Cytosol bindet Cytochrom C wohl an apoptotic protease activating factor (APAF)-1. Durch diese Bindung kommt es ATP-abhängig zur Aktivierung der Caspase 9, welche in der Folge die weiteren Caspasen aktiviert. Auch andere Plasmamembran-Rezeptoren wie FAS haben über das FAS-associated protein with a Death Domain (FADD) Einfluß auf die Aktivierung der Effektor-Caspasen, wie zum Beispiel Caspase 3 (67)(68).

Hypercholesterinämie ist ein wichtiger Faktor der Atherosklerose. Insbesondere den oxidierten Formen von LDL wird eine hohe atherogene Potenz zugesprochen. Ox-LDL erhöht in in-vitro Versuchen dosisabhängig die Apoptoserate (42), verbunden mit einem Anstieg der Caspase 3, welche Aktin spaltet (18). ox-LDL hat regulierenden Einfluß auf antiapoptotische und proapoptotische Faktoren. So kommt es zum Beispiel unter dem

Einfluss von ox-LDL zu einer Steigerung der Aktivität der Proteinkinase C und von Protein Tyrosin Kinase, zu einer gesteigerten Expression von FAS und zu einer reduzierten bcl-2 Expression (41).

I.8. A20-ein neuer Faktor zur Regulation der Apoptose

A20 wird durch ein tumor necrosis factor (TNF) α -induzierbares Gen kodiert, welches zuerst in HUVECs identifiziert wurde (20). Die Induktion ist transient, was vielleicht dadurch zu erklären ist, dass die 3'-nicht translatierte Region der A20-mRNA vier Kopien der Sequenz ATTTA enthält, welche bei einer Reihe von kurzlebigen Transkripten für die Instabilität verantwortlich gemacht wird.

Dixit et al. fanden heraus, dass auch Interleukin (IL)-1 und Lipopolysaccharide (LPS) zu einer Hochregulation von A20 führen (20). Weiterhin konnten noch weitere Stimulatoren der A20-Induktion gefunden werden, wie z.B. cluster of differentiation (CD)40 (14), human t cell leukemia virus(HTLV)-1, transactivator protein x (Tax) (37) und Epstein Barr Virus Latent Membrane Protein (EBV-LMP)1 (47)(38).

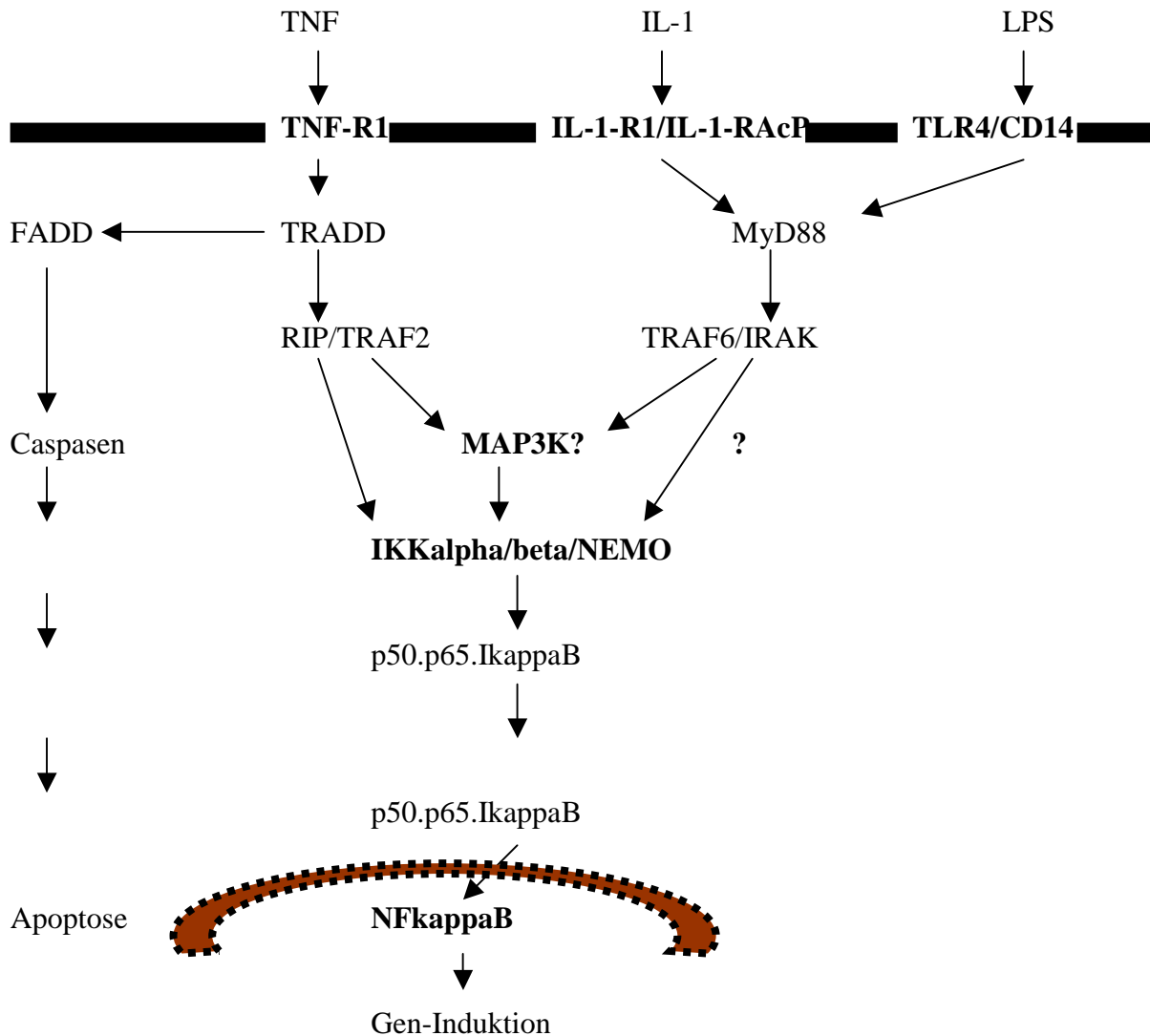
In Thymocyten und ruhenden peripheren T-Zellen konnte eine konstitutive Expression von A20 nachgewiesen werden (71). A20 spielt auch in der Entwicklung embryonaler Organe eine Rolle, wie z.B. des Lymphsystems, der Haut und Hautanhangsgebilde (71). Auch bei der Entwicklung verschiedener Tumoren scheint A20 eine zentrale Rolle zuzukommen. So konnte man A20 in hohen Konzentrationen im undifferenzierten Naso-Pharynx-Karzinom und im wenig differenzierten Plattenepithel-Karzinom nachweisen (13).

Das A20 Gen kodiert für ein 90 kDa-Protein, bestehend aus 790 Aminosäuren (71)(53). Die C-terminale Hälfte beinhaltet sieben Cys₂/Cys₂ Zink-Finger. Diese bestehen aus sechs Cys-X₄-Cys-X₁₁-Cys-X₂-Cys Zink-Finger Motiven und einem Cys-X₂-Cys-X₁₁-Cys-X₂-Cys Motiv. Aufgrund dieser unüblichen Anordnung des Cysteins wurde A20 als ein neuer Typ Zink-Finger Protein bezeichnet.

Primär wurde A20 als Inhibitor der TNF α -induzierten Apoptose bezeichnet (54). Dies konnte in einer Reihe von Zelllinien nachgewiesen werden. Diese Wirkung korreliert mit der Blockade der Phospholipase A₂ Aktivität, mit der verminderten Produktion

freier Sauerstoffradikale, einer erhöhten Stabilität des Membranpotentials der Mitochondrien und der geringeren Aktivierung von Kaspase 3 (34)(78). Neben der antiapoptotischen Funktion wirkt A20 auch als Inhibitor der nuclear factor kappa B (NFkappaB)-abhängigen Genexpression. Überexpression von A20 führte zur reduzierten Aktivierung von NFkappaB durch TNF, LPS, IL-1, Phorbol ester und Hydrogenperoxid in verschiedenen Zelllinien (34)(83)(33). Damit übereinstimmend verhindert A20 die TNF-induzierte Produktion NFkappaB-abhängiger Proteine wie E-Selektin, vascular cell adhesion molecule (VCAM), inhibitor of kappa B alpha (IkappaB alpha), Interleukin (IL)-6, IL-8, granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) (28)(33). Die A20 Expression selbst steht unter NFkappaB-Kontrolle, wobei dies durch einen negativen feedback von NFkappaB erfolgt (36). IkappaB alpha hält durch Bindung von NFkappaB dieses in einer inaktiven Form. Dieses Protein beinhaltet mehrere kappaB Sequenzen in seiner Promoter Region, so dass NFkappaB seine Synthese induziert. IkappaB alpha kann dann die Wirkung von NFkappaB beenden, indem es in den Nukleus eindringt und das aktive NFkappaB bindet und in das Zytoplasma transportiert (1). Die Funktion weiterer IkappaB-Familienmitglieder ist noch nicht geklärt. Man geht jedoch davon aus, dass sie an der Regulation der NFkappaB-Aktivität beteiligt sind.

Induktion der Apoptose durch TNF-, IL-1- und LPS-induzierte Signalwege



TNF-Bindung an TNF-R1 aktiviert den Kontakt von TRAF2 (TNF-receptor-associated factor 2) und RIP (receptor interacting protein) an TNF-R über Bindung an TRADD (TNF-receptor-associated death domain), welches auch FADD (Fas associated protein with a death domain) bindet, das wiederum die Kaspase Kaskade auslöst und zur Apoptose führt. IL-1 bindet an den IL-1R (IL-1 receptor), was zum Kontakt mit MyD88 (myeloid differentiation factor D88) und zur Aktivierung von TRAF6/IRAK. Dieser Signalweg wird auch durch LPS-Bindung aktiviert. Diese Signalwege treffen auf dem Level des IKK-Komplexes zusammen, welcher auch über die MAP3K (mitogen activated protein) reguliert wird. IKK (Ikappa B kinase) führt zur Phosphorylierung von IkappaB, welches proteolytisch zerstört wird. Das freie NFkappaB gelangt in den Nukleus und bindet an die entsprechenden Promotorregionen der Gene.

Da A20 in der Lage ist, sowohl TNF-induzierten Zelltod als auch NFkappaB-Aktivierung zu blockieren, könnte man spekulieren, dass sein Effekt im Bereich der TRADD-Bindung an TNF-R1 ansetzt.

Tatsächlich deutet alles darauf hin, dass A20 an einem frühen Punkt des TNF-Signalweges wirkt. Diesbezüglich ist es interessant die funktionelle Beziehung zwischen der TNF-Wirkungsblockade mit der nachgewiesenen Bindung von A20 an Proteine des TNF-R-Komplexes zu demonstrieren. Diese beinhalten TRAF1 und TRAF2, welche an der Blockierung und Aktivierung von NFkappaB, als auch an der negativen Regulation der TNF-Zytotoxizität beteiligt sind (12)(58)(81)(21). Kürzlich wurde auch die Interaktion zwischen A20 und IKK-gamma, das über eine Bindung mit RIP mit dem TNF-R-Komplex assoziiert ist, erläutert (83). Tatsächlich ist es wahrscheinlich, dass A20 die TNF-Wirkung über eine ganze Reihe von Mechanismen reguliert und damit auch die Aktivität von NFkappaB. Eine Reihe von Studien zeigten eine blockierende Wirkung von A20 auf die Phosphorylierung von I kappa B nach TNF Stimulation (83)(69). Es konnte aber auch eine Wirkung auf NFkappaB unterhalb der I kappa B-Degradierung gezeigt werden (33). Der inhibitorische Effekt von A20 auf NFkappaB kann durch Überexpression der IKK-aktivierenden Kinase NIK (NFkappaB induzierende Kinase) zunichte gemacht werden (33). Dies deutet auf einen Wirkungsmechanismus von A20 im Bereich der Verbindung von IKKs mit ihrer aktivierenden Kinase hin. Als Alternative könnte die A20-Bindung an den TNF-R1-Komplex die kompetitive Wirkung A20- assoziierter Proteine wie A20 binding inhibitor of nuclear factor kappa B (ABIN) und tax binding protein (TXBP)151 auf die IKK-Bindung an NIK vermitteln (17)(33). Bisher konnte noch kein blockierender Effekt von A20 auf den Signalweg über MAPK gezeigt werden, was eine Spezifität der A20-Wirkung auf den TRAF-IKK Signalweg wahrscheinlich werden läßt.

Wie A20 blockiert auch eine Überexpression von tax binding protein 151 (TXBP151) die TNF-induzierte Apoptose (17). Auch andere Proteine wie cIAPs können antiapoptotisch wirken. Diesbezüglich ist es interessant, dass A20 und cIAP mit einer gemeinsamen Region an TRAF2 interagieren (59).

I.9. Zielsetzung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob die Überexpression des als antiapoptotisch wirksam eingestuften Faktors A20 zu einer Reduktion der Apoptoserate in Endothelzellen führt, welche der oxidierten Form des low density lipoproteins in unterschiedlichen Konzentrationen ausgesetzt sind.

METHODEN

II.1. Präparation der Pulmonalarterien

Zur Gewinnung von bovinen pulmonalen Endothelzellen werden die Pulmonalarterien aus dem Zusammenhang der Thoraxorgane frisch geschlachteter Rinder gewonnen.

Durch Eröffnen des Herzbeutels in Längsrichtung wurde die A. pulmonalis freipräpariert.

Oberhalb des rechten Ventrikels und an der bifurkatio arteriae pulmonalis wurde diese abgesetzt und in einem sterilen Gefäß, das auf Eis lagert gekühlt aufbewahrt.

Nun erfolgte der Transport ins Labor und die sofortige Präparation der Endothelzellen aus den Arterien. Die Präparation erfolgte an der Sterilbank. Für eine ständige Kühlung der Arterien wurde durch Lagerung des Gefäßes auf Eis gesorgt.

II.2. Die Präparation der Endothelzellen aus den Pulmonalarterien mittels Kollagenaseverdau

Material: Flexibler Zellschaber; 70% Etoh; Phosphate puffered saline (PBS); DMEM mit 10% fötales Kälberserum (FCS); Kollagenase (0,1 %); Penicillin/Streptomycin Lsg. (PenStrep), Korkunterlage, Sterile Kanülen, Sterile Tupfer, Zellstoff;

Alle Arbeiten werden unter der Sterilbank durchgeführt.

Zunächst mischt man PBS mit Penicillin/Streptomycin, so dass eine 5%ige PBS-Antibiotikalösung entsteht. Üblicherweise werden 25 ml Penstrep zu 500 ml PBS zugegeben.

Nun Eröffnen einer Arterie in Längsrichtung. Diese wird mit Hilfe von Kanülen auf der mit sterilen Tupfern abgedeckten Korkunterlage fixiert.

Spülen der eröffneten Arterie mit der PBS-Antibiotikalösung, bis die Blutkoagel entfernt waren.

Anschließend wird Kollagenase (0,1 %) aufgetropfelt. Nach einer Einwirkzeit von

2 min wird vorsichtig mit PBS-Antibiotikalösung gespült, um die gelösten Endothelzellen nicht zu verlieren. Auf Zellstoff abtropfen lassen.

Mit einem flexiblen Schaber werden in kurzen Zügen die Zellen aufgenommen und in 5 ml DMEM gegeben. Die so gewonnenen Zellen werden zentrifugiert (1000 rpm, 5 min, 20°C).

Als nächster Schritt wird das Pellet in 2ml DMEM resuspendiert, auf, mit Gelatine beschichtete 6 well Platten, überführt und ca. 2 Tage kultiviert.

Allgemeines:

Alle BPECs werden in Brutschränken bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bebrütet, die 5 Volumenprozent CO₂ enthält. Die CO₂-Konzentration stabilisiert den pH-Wert des Mediums.

Je nach Zelldichte werden die Zellen nach 2-3 Tagen passagiert.

Hierzu löst man die Zellen durch die Einwirkung (30 s) von Trypsin ab und gibt nach ca. 30 s 2 ml, auf 37°C erwärmtes PBS zu, das mit 5% FCS ergänzt wurde. Anschließend zentrifugiert man die Zellen, wie oben angegeben und nimmt sie wiederum in 2 ml DMEM mit 10% FCS auf. Diese Suspension verteilt man gleichmäßig auf eine vorher mit Gelatine beschichtete 6 well Platte, deren wells mit je 2 ml DMEM/10% FCS gefüllt werden. Die Zellen läßt man wiederum 1 bis 2 Tage anwachsen, bis ein lockerer Zellrasen entsteht.

Sie sollten nicht konfluent werden. Anschließend werden die Zellen abgelöst und in DMSO mit 5% FCS aufgenommen und über -20°C (1.Tag), -80°C (2.Tag) in Flüssigstickstoff (3.Tag) eingefroren.

II.3. Inkubation und Passage der Zellen

Die in Flüssigstickstoff gelagerten Zellen werden bei 37°C schnell auf 0°C aufgetaut und auf mit 0,1% Gelatine beschichteten 75 cm²-Flaschen mit 8 ml Nährmedium (DMEM mit 10% FCS, 2mM L-Glutamin, 100U/ml Penicillin und 100µg/ml Streptomycin) wachsen gelassen. Am nächsten Tag wechselt man das Medium, um die

toxischen DMSO-Reste zu entfernen. Die Zellen lässt man 2-3 Tage dicht wachsen, ohne dass diese konfluieren. Anschliessend wird der Zellrasen mittels Trypsin abgelöst, zentrifugiert und die Zellen in der Neubauer-Kammer ausgezählt.

Auf mit Gelatine beschichtete 6 well-Platten werden 1×10^6 Zellen pro well ausgesät und über Nacht in 2 ml des vorher beschriebenen Nährmediums kultiviert.

II.4. Transformation von E.coli supercompetent cells

Zur Multiplikation des für die Versuche benötigten A20-Plasmids, werden superkompetente E.coli Zellen verwendet, die mit einer geringen Menge A20-Plasmid transformiert werden. Die E.coli werden bei -80°C gelagert, um Effektivitätsverluste zu vermeiden. Bei den verwendeten E. coli handelt es sich um den XL1-Blue Stamm der Firma Stratagene, dem es an Restriktionsenzymen mangelt, die sonst die methylierte DNA (hier das A20-Plasmid) spalten würden. Für die Vermehrung des A20-Plasmids ist die bakterielle Polymerase verantwortlich. Für die Transformation werden die Zellen auf Eis aufgetaut.

Allgemeines:

Bei den folgenden Arbeitsschritten ist darauf zu achten, dass die Zellen ständig auf Eis belassen werden, falls nicht anders angegeben. Nach vorsichtigem Mischen gibt man 100 μl der Suspension in ein vorgekühltes Falcon Tube (Polypropylen). 1,7 μl beta Mercaptoethanol werden zugeben, die Suspension vorsichtig gemischt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Beta Mercaptoethanol steigert die Transformationseffektivität um das 2-3 fache. Alle 2 min. wird vorsichtig gemischt.

Nach 10 Minuten gibt man 0,1-50 ng DNA dazu und inkubiert die Suspension 30 min auf Eis. Nach dieser Zeit wird für 45 s ein Hitzeimpuls von 42°C im Wasserbad gegeben. Dieser Zeitraum ist strikt einzuhalten, um eine optimale Effizienz zu erzielen.

Anschließend wird die Suspension 2 min. auf Eis inkubiert. 0,9 ml auf 42°C vorgeheiztes SOC-Medium wird zugeben und die Zellen in diesem Nährmedium 1 Stunde bei 37°C im Schüttler bei 225 rpm inkubiert.

Nun werden die E.coli auf zwei Ampicillin-Agar Platten ausgestrichen.

Dazu benutzt man einen Glasspatel, der vorher abgeflammt und abgekühlt wird.

Die beimpften Agar-Platten bebrütet man für 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C. Bei eingesetzten 5 µl Zellsuspension ist mit einer Koloniezahl von ca. 500 zu rechnen.

II.5. Plasmidreinigung nach dem Qiagen EndoFree Plasmid Maxi Protokoll

Zunächst eine Kolonie in 2 ml LB-Medium bei 37°C/250 rpm im Schüttelinkubator inkubieren. Anschließend in 250 ml Medium geben und für weitere 12-16 Stunden bei 37°C und 225 rpm inkubieren. Die Suspension auf 50 ml-Tubes verteilen. Danach erfolgt das Zentrifugieren der Bakteriensuspension bei 6000 x g, für 15 min., bei 4°C. Resuspendieren des Pellets in 10 ml Puffer P1, nachdem diesem RNase A zugesetzt wurde. 10 ml Lysispuffer P2 zugeben, 4-6 mal schütteln und bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubieren. Darauf achten, dass die Lysisreaktion nicht 5 Minuten überschreitet. Präparation des Qia Filter Cartridge, durch Verschließen der Auslaßöffnung mit einer Verschlusskappe. 10 ml auf 4°C gekühlten Neutralisationspuffer P3 dem Lysat zugeben und sofort 4-6 mal schütteln. Das Lysat sofort in den präparierten Filter geben und 10 min bei Raumtemperatur inkubieren. Die Verschlusskappe entfernen und mit dem Kolben das Lysat durchpressen und in einen 50 ml Tube filtern. 2,5 ml Endotoxinremoving (ER)-Puffer zugeben, Tube 10 mal schütteln und 30 min auf Eis inkubieren. Durch die Inkubation auf Eis klärt das Lysat auf. Die Lipopolysaccharide werden entfernt, was eine optimale DNA-Reinigung ermöglicht. Zum Equilibrieren des QIAGEN-Tip 500 gibt man 10 ml Puffer QBT zu und läßt die Säule sich mittels Schwerkraft entleeren. Nun gibt man das geklärte Lysat zum Qiagen tip zu und erlaubt ihm mittels Schwerkraft durchzulaufen. Anschließend wäscht man den Tip mit 2 mal 30 ml Waschpuffer QC.

Herauslösen der DNA mittels 15 ml QN Puffer:

Hierbei werden endotoxinfreie Tubes benutzt, um die DNA vor Kontamination zu schützen. 0,7 Volumen Isopropanol werden zugeben, um die DNA zu präzipitieren. Anschließend erfolgt das Zentrifugieren der DNA bei 11000 rpm bei Verwendung des Sorvall SS-34 Rotors, für 30min, bei 4°C. Der Überstand wird vorsichtig abgeschüttet.

Das Pellet mit 2,5 ml 70% EtOH waschen und wieder bei 11000 rpm, für 10min, bei 4°C zentrifugieren. Überstand vorsichtig wegschütten und das Pellet lufttrocknen. Zur Lagerung wird das Pellet in 3 ml TE-Puffer aufgenommen und bei -20°C gefroren. Die Massenbestimmung erfolgt über ein Gel mit einem Massenstandard als Vergleich.

Beschreibung der verwendeten Puffer:

P1> Resuspensionspuffer: 50mM Tris-Cl, pH 8,0; 10mM EDTA; 100µg/ml RNase A

P2> Lysispuffer: 200mM NaOH, 1% PDS

P3> Neutralisationspuffer: 3.0M Potassium acetat; pH 5.5

QBT> Equilibrierungspuffer: 750mM NaCl; 50mM MOPS, pH 7,0; 15% Isopropanol;
0,15% Triton X-100

QC> Waschpuffer: 1.0M NaCl; 50mM MOPS, pH 7,0; 15% Isopropanol

QN> Elutionspuffer: 1,6M NaCl; 50mM MOPS, pH 7,0

TE> Resuspensionspuffer: 10mM Tris-CL, pH 8,0; 1mM EDTA

ER> Endotoxin removal Puffer hindert LPS an der Bindung am Filter

II.6. Transfektion der bovinen Endothelzellen mittels FuGENE 6

Am ersten Tag bringt man 1×10^5 Zellen/well in der vierten bis fünften Passage auf 6 well Platten, in 2 ml Medium aus und lässt sie 18 bis 24 h anwachsen, so dass die Zellen am nächsten Tag 50-80% des Bodens bedecken. Am nächsten Tag erfolgt ein Mediumwechsel vor dem Beginn der Transfektion.

Präparation der FuGENE 6/DNA Komplexe:

Empfohlenes Verhältnis der Menge des Transfektionsmediums
zur Menge DNA: µl FuGENE/µg DNA = 5 zu 1.

In ein 10 ml fassendes Gefäß wird eine genügend große Menge serumfreien Mediums gegeben, um FuGENE 6 auf 100 µl pro well zu verdünnen. Die 5 µl FuGENE 6 sollen direkt in das Medium pipettiert werden, um ein Ablösung von Plastik aus der Gefäßwand zu verhindern.

Die Verdünnung lässt man 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren. In ein zweites Tube gibt man die zu transfizierende Menge DNA. Das totale Volumen der DNA sollte 10 µl nicht übersteigen. Das vorverdünnte FUGENE wird nun auf die DNA aufgetropft und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Transfektion der Zellen:

Tropfenweise wird nun die Mischung auf die Zellen gegeben, so dass die Komplexe gleichmäßig verteilt sind. Die so präparierten Zellen werden bis zur Messung am FacScan zurück in den Brutschrank gegeben.

II.7. In Situ beta-Galaktosidase Färbung

Allgemein:

Die beta-Galaktosidase Färbung dient der Detektion der beta-Galaktosidase-Aktivität in transfizierten Zellen. In diesem Fall dient sie der Findung des optimalen Verhältnisses zwischen eingesetztem Transfektionsmedium und eingesetzter DNA, um die höchstmögliche Transfektionsrate zu erzielen. Dieses Enzym ist kein natürlicher Bestandteil der Endothelzellen, sondern die für das Enzym kodierenden Gene müssen erst in die Zellen transfiziert werden, wo sie transkribiert werden. Damit dient der Nachweis dieses Enzyms als Erfolgskontrolle der Transfektion. Die genetische Information für das Enzym ist auf dem LacZ-Plasmid lokalisiert, das mit dem A20-Plasmid co-transfiziert wird. Mittels dieser Methodik kann die Rate transfizierter Endothelzellen ohne vorherige Manipulation in situ ermittelt werden.

Zunächst wird das Medium vom Zellrasen aspiriert und 4 ml 1mal Fixierungslösung zugegeben, die man sich aus einer 10-fach Konzentration durch Zugabe von 9 Teilen PBS vorverdünnt hat. Die Fixierung wird 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Man entfernt die Fixierungslösung und wäscht die Zellen 2mal mit 5 ml PBS.

Anschließend gibt man Färbungslösung zu, die mit 99 Teilen Färbungspuffer verdünnt wurde und inkubiert für mindestens 15 min. in einem 37°C warmen Brutschrank mit wassergesättigter Atmosphäre.

Als Färbungslösung dient X-Gal, das ein Substrat für die β -Galaktosidase darstellt und durch diese gespalten wird. Das Spaltprodukt ist der unlösliche Farbstoff, der die Zellen blau anfärbt, die erfolgreich transfiziert wurden.

Die Färbung wird entfernt und die fixierten und gefärbten Zellen 3-mal mit je 5 ml PBS gewaschen. Zur Analyse unter dem Lichtmikroskop werden 2 ml PBS zugegeben.

II.8. Annexinfärbung/Propidiumjodidfärbung

Allgemein:

Der Farbstoff Annexin bindet spezifisch an Phosphatidylcholin, ein Membranbestandteil, das während der Apoptose an die Membranaußenseite verlagert wird. Propidiumjodid bindet an Kernbestandteile nekrotischer Zellen und dient der Differenzierung zwischen Annexin gefärbten apoptotischen und Annexin- und Propidiumjodid gefärbten nekrotischen Zellen.

(Färbelsg.: >Inkubationspuffer: 150 μ l 10 mM HEPES/NaOH, pH 7,4;
ergänzt mit 140 mM NaCl, 5 mM CaCl_2
>Propidiumjodidlsg.: 1 μ g/ml
>Annexinlsg. : 20 μ l Annexinlsg. in 1000 μ l HEPES-Puffer aufnehmen
und 20 μ l Propidiumjodid-Lsg. zugeben.)

Zunächst werden die Zellen inklusive des alten Mediums aufgenommen und in 15 ml Falcon Tubes gegeben (ein Tube pro well). Die wells werden anschließend mit 37°C warmem PBS, zweimal mit je 2 ml gespült.

Nun gibt man je 1 ml 0,05% Trypsin/0,02% EDTA Lösung zu und löst so die Zellen ab. Mit 4 ml Annexinpuffer mit 5% FCS werden die gelösten Zellen gelöscht, d.h., Trypsin wird neutralisiert. Die abgelösten Zellen werden ebenfalls in die Tubes geben und diese Suspension bei 200 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abgekippt und das Pellet in der Färbelösung aufgenommen.

Die Zellen werden 15 min. bei 100 rpm im Schüttler inkubiert, so dass sich die Farbpartikel anlagern können. Wichtig ist, dass diese Inkubation lichtgeschützt abläuft,

so dass die Fluoreszenz nicht verloren geht. Die gefärbten Zellen werden in 200 µl Nährmedium aufgenommen und sofort abgedeckt zum FacScan zur Auswertung gebracht.

II.9. Auswertung am FacScan

Im FacScan werden die gefärbten Zellen durch einen Lichtstrahl definierter Wellenlänge (488 nm) geschickt. Der Lichtstrahl wird von Zellen vertikal gestreut und zwar je mehr, desto stärker die Granulation in den Zellen ausgeprägt ist (SSC). Das in horizontaler Richtung durch die Zellen gestreute Licht ist je nach Intensität ein Maß für die Zellgröße (FSC) und abhängig von der Querschnittsfläche der Zellen. Außerdem erfolgt eine Messung des von den gefärbten Zellen emittierten Lichtes (Fluoreszenz) mittels Optiken, von denen sie in rote (tote) und grüne (vital bzw. apoptotische) Zellen unterteilt werden.

Je nach Färbung besitzen die Zellen auch ein unterschiedliches Verhalten in der Fluoreszenz. Wichtig ist bei der Verwendung unterschiedlicher Farbstoffe, dass diese Stoffe die gleiche Anregungswellenlänge (488 nm), aber unterschiedliche Emissionsspektren besitzen. Dadurch wird eine Anregung bei gleicher Wellenlänge des auf die Zellen treffenden Lasers möglich, bei unterschiedlicher Fluoreszenz der zu messenden Zellen. Diese Unterschiede im Abstand der Anregungs- und Emissionswellenlänge werden als Stokes'scher shift bezeichnet.

Als Laser wird ein Argon-Laser mit einer 488 nm-Wellenlänge verwendet. Dieser Laser zeichnet sich durch eine genügend hohe Intensität aus, um ausreichend Fluoreszenz- und Streulichtsignale zu erzeugen. Sein Emissionsspektrum liegt im Absorptionsbereich der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe. Er besitzt eine konstante Strahlungsleistung.

Die Zentrierung der Zellen im Lichtstrahl erfolgt mittels hydrodynamischer Fokussierung. D.h., es entsteht ein laminarer Fluss von Zellen, indem diese innerhalb ihres Mediums in einer Trägerflüssigkeit durch den Laserstrahl geschleust werden. Die Geschwindigkeit, mit der sich die Trägerflüssigkeit durch den Laserstrahl bewegt kann

eingestellt werden. Die Zellen werden nach dem Transport aus dem Probenröhrchen in die Messkammer von ein paar cm/sec. auf ca. 7 m/sec beschleunigt.

Dies bewirkt, dass sich die Zellen nacheinander durch den fokussierten Laserstrahl bewegen. Bei zu hoher Geschwindigkeit wird die Zentrierung der Zellen im Lichtstrahl und damit die Messung ungenauer.

Bei schwer zu unterscheidenden Populationen ist somit eine geringe Flußgeschwindigkeit angebracht.

Die Messung erfolgt mittels Optiken, die das Licht auf Fotoröhren (SSC) bzw. Fotodioden (FSC) lenken, welche das Lichtsignal in ein elektrisches Signal umwandeln. Das elektrische Signal wird mittels einem Analog-/Digitalwandler konvertiert und dem Rechner zugänglich gemacht. Die Daten werden in einer Listendatei gespeichert.

Die Auswertung erfolgt durch eine korrelierte Zweiparameterdarstellung. Das heißt, es werden zwei Parameter gegeneinander aufgetragen, in deren Schnittpunkt die Zelle mit den aufgetragenen Werten liegt. Diese graphische Darstellung bezeichnet man als dot plot. Außerdem erfolgt eine Einparameterdarstellung in der gemessenen Zellpopulation, was eine Aussage über die Häufigkeitsverteilung der jeweils dargestellten Eigenschaft innerhalb der Zellpopulation zulässt.

Es handelt sich bei den Daten um Relativ-Werte und nicht um Absolut-Werte. D.h., Schwellenwerte müssen selbst eingegeben werden. Es erfolgt also eine Aufteilung nach Größe, Granulation und Fluoreszenz der Zellen. Die Populationen werden in Prozent der Gesamtzahl aller registrierter Zellen dargestellt.

II.10. Grafische Darstellung der Ergebnisse mittels SigmaPlot:

Zur Auswertung der Daten wurde das Graphik- und Statistikprogramm der Fam. Jandel Scientific Corporation verwendet. Da es sich bei jeder Annexin-Färbung um einen Dreifachansatz handelte, wurden die Daten der drei Einzelmessungen als arithmetisches Mittel in den Säulendiagrammen und der Standardfehler als vertikaler Fehlerbalken dargestellt.

II.11. Kolonie PCR:

Allgemein:

Komponenten der PCR:

- Oligos (Primer):

Mindestens 20-24 Nukleotide lang.

Sie binden schon bei 37°C an die Schablone.

Eingesetzte Konz.: 1µg

- Puffer:

MgCl²-Konz. wichtig für das einwandfreie Funktionieren der Polymerase.

Mischung aus KCl, Tris Cl, MgCl₂, pH 8,3.

- Taq Polymerase

mit 5`-3` Polymerisation abhängiger Exonuklease Aktivität

- dNTP(Deoxyribonukleosid Diphosphat)

Bausteine der DNA

auf pH 7,0 eingestellt durch Zugabe von NaOH

Prinzip der PCR:

1. Denaturieren der DNA durch Hitzeimpuls von 94°C
2. Abkühlen auf 50°C. Binden der Primer an die DNA, bestimmt die Genauigkeit der Polymerisation
3. Polymerisation bei 72°C

Kolonie PCR: > Sie dient dem Nachweis der durch Transformation in die E.coli eingebrachten Plasmide. Die Polymerisationsdauer ist abhängig von der Größe der nachzuweisenden DNA.

Zum Nachweis der A20 DNA wurden primer mit folgender Nukleotidsequenz eingesetzt.

>forward primer: 5` CCG GCA ACT TCA CGC CAG CC 3`

>reverse primer: 5` GGT TCG AGG CAC ATC TCT GC 3`

Zunächst stellt man den Mix für die PCR her:

Dazu pipettiert man folgende Substanzen in ein genügend großes für die PCR geeignetes Röhrchen:

Es werden 18,625 µl H₂O mit 2,5 µl 10-mal PCR-Puffer vermischt und 2 µl dNTP zugegeben. Dazu gibt man 1,5 µl MgCl₂ und je 0,125 µl forward bzw. reverse primer.

Mit Hilfe eines sterilen Zahnstochers wird eine kleine Menge der auf dem Agar gewachsenen Bakterienkolonie beigegeben. Letztlich wird noch die Taq-Polymerase zugegeben und der Mix bei folgender Einstellung in die PCR-Maschine gestellt. Denaturierung bei 94°C für 3 min.

30 Zyklen:

Denaturierung:	20 s 94°C
Anealing:	30 s 60°C
Polymerisation:	45 s 72°C

II.12. RT PCR:

Ziel: Umschreiben der einzelsträngigen mRNA, die vorher aus den Zellen mittels Phenolextraktion gewonnen wurde, in DNA, mit Hilfe einer reversen Transkriptase(M-MLV RT) und anschließende Amplifikation durch PCR. Dadurch ist eine qualitative Bestimmung der mRNA möglich. Zunächst wird die vorhandene RNA mit einer Phenol-/Ethanol-fällung nach der Methode von Chomzynski und Sacchi extrahiert. Die Konzentration der RNA wird in einem UV/VIS Spektrometer Lambda12 der Familie Perkin Elmer; Deutschland, bei 260 nm bestimmt. Die RNA Konzentration lässt sich bestimmen aus dem Messwert bei 260 nm der mit dem Verdünnungsfaktor der Messung (40), sowie deren Einheit µg/ml multipliziert wurde.

Für die Durchführung der RT-PCR ist es ratsam, sich drei Mixturen in genügend großen Röhrchen vorzubereiten.

- I:** 1µg der gereinigten RNA wird mit 50 pmol reverse primer versetzt und das Volumen mit Aqua dest auf 7µl ergänzt.
- II:** 2,5 µl von 5-mal Reverse Transkriptase Puffer wird mit 2,5 µl dNTP und 200 U M-MLV RT gemischt.
- III:** 25 µl 2-mal RT Puffer mit 18 µl Aqua dest., 1,8 µl MgCl₂ (25 mM) und 2 µl dNTP (2,5 mM/Nukleotid) mischen.

Zur Reaktion 50 pmol forward primer und 0,3 µl Taq pol geben.
Das Gesamtvolumen beträgt 60 µl.

Als erstes gibt man Mix I für 5 Minuten auf den 70°C warmen Heizblock, so dass sich der Primer an die Schablone binden kann. Danach gibt man die Suspension auf Eis und zentrifugiert kurz an, um die entstandene Kondensation wieder zur restlichen Lösung zu bringen. Nun gibt man den Mix II zu und stellt die Mischung für 90 min auf einen auf 45°C vorgeheizten Heizblock, wobei man alle 30 min kurz anzentrifugiert. Während dieser Reaktion kann die reverse Transkriptase den zur RNA komplementären DNA Strang synthetisieren. Zuletzt gibt man noch Mix III zu und startet die Reaktion:

Die PCR läuft für 3 min bei 94°C
und anschließend 25 *Cyclen* mit je:

- 30 sec bei 94°C
- 1 min bei 60°C
- 1 min bei 72°C

Zuletzt läuft die Reaktion noch bei 72°C für 5 Minuten.

Anschliessend wird die RT-PCR mittels Gelelektrophorese ausgewertet.

II.13. Auswertung der RT-PCR mittels Gelelektrophorese

Die RT-PCR Produkte werden mittels Elektrophorese (Gelelektrophorese System Lipidophor/Immuno, Wien, Österreich) auf 2% Agarose/TAE (4,84 g Tris-Base; 1,2 ml

Eisessig; 2 ml EDTA 0,5 M (pH 8,0=; ad 1l mit H₂O) Gel ausgewertet. Diesem wurde pro 10 ml Gelvolumen 0,5 µl Ethidium-Bromid 0,6% zugegeben, um vorhandene DNA unter UV-Licht sichtbar zu machen und fotografieren zu können. Jeder Charge wurde vor Ladung des Gels 10 µl loading puffer (0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylencyanol; 30% Glycerol) zugesetzt und in die Geltaschen ein Gesamtvolumen von 10 µl eingesetzt. Die Elektrophorese wurde bei 70 Volt Spannung bis zum Erreichen einer Laufstrecke von 3,5 cm durchgeführt. Anschließend wurden die Gele unter UV-Licht fotografiert.

II.14. Präparation und Oxidation von LDL

LDL wird aus gepooltem Frischplasma von Blutspendern gewonnen und sofort EDTA (2 mmol/l), NaCl (3 mmol/l), Aprotinin (1000 Kallikrein-Inaktivator-Einheiten), Gentamycin (16 mg/l) und Chloramphenicol (80 mg/l) zugesetzt. Die Lipoproteine werden durch sequentielle Ultrazentrifugation getrennt, nachdem die jeweilige Dichte mit KBr eingestellt wurde. Die Zentrifugation erfolgt mittels Beckmann Vti 50 Rotor. Um das gewonnene LDL von VLDL und Triglyceriden zu trennen, schließt sich ein zweiter Zentrifugationsschritt bei einer Dichte von 1,04 g/ml an. Die entstandene LDL-Bande wird gesammelt und durch Dialyse gegen PBS von den zuvor zugesetzten Salzen befreit. Als Oxidationsschutz wird EDTA 200 µM zugegeben. Das native LDL wird einer chemischen Oxidation unterworfen, um die Veränderungen des LDL im Organismus nachzuvollziehen. CuSO₄ dient als Oxidationsmittel.

Das nLDL wird in einer Konzentration von 1 mg/ml gegen einen Kalium-Phosphat-Puffer (10µM CuSO₄; 0,15M NaCl; 0,02M KH₂PO₄/KHPO₄ im Verhältnis 1:4, pH 7,4) für 18 Stunden bei Raumtemperatur und Dunkelheit dialysiert. Durch Zugabe von 10 µM EDTA wird der Oxidationsvorgang beendet. Das CuSO₄ wird durch Dialyse gegen kupfersulfatfreien Puffer entfernt.

Den Grad der Oxidation bestimmt man durch Messung der relativen Zunahme der Mobilität auf Agarosegel.

Vor der Verwendung der oxidierten LDL (ox-LDL) in Versuchen erfolgt eine Bestimmung ihres Proteingehaltes nach Lowry et al. 1951.

II.15. Material in alphabetischer Reihenfolge

LB-Agar: Gibco/BRL

Agarose: Gibco/BRL

Ampicillin: Boehringer, Mannheim

Annexin-V-Fluos: Boehringer, Mannheim

Annexinpuffer: HEPES-NaOH, ergänzt mit NaCl und CaCl₂

β-mercaptoethanol: Sigma, Steinheim

Chlorophorm (Trichlormethan): Roth, Karlsruhe

Competent cells (E.coli): Stratagene, La Jolla, USA

Deionisiertes Wasser aus MilliQ-Anlage

DEPC-Wasser

DMEM, ergänzt mit 10% FCS und 1% Penstrep, Biochrom, Berlin

DMSO (Dimethylsulfoxide), Sigma, Steinheim

dNTP, Gibco/BRL

Ethidiumbromid: Sigma, Steinheim

EtOH 70%: J.T.Baker, Holland

Fixing-solution: Statagene, La Jolla, USA

250 ml-Flaschen: Greiner Labortechnik, Frickenhausen

Gelatine: Merck, Darmstadt

Glutamin: Biochrom, Berlin

Kollagenase: Sigma, Steinheim

Lipofektamin Plus: Gibco/BRL

MgCl₂: Promega

M-MLV RT: Promega

NA acetat: Merck, Darmstadt

PBS Dulbecco: Biochrom, Berlin

26.10*PCR-Puffer: Promega, USA

Penicillin/Streptomycin: Biochrom, Berlin

Phenol: Gibco/BRL

Primer: Biosource

Propidiumjodid: Sigma, Steinheim

5*RT-Puffer: Promega, USA

SOC-Medium: Gibco/BRL

Solution D (250 mg Guanidinthiocyanat, ergänzt mit 293 ml Wasser;
17,6 ml 0,75M Na-Citrat, pH 7; 26,4 ml Sacrosyl bei 65°C; 0,36 ml
2-mercaptoethanol/50 ml stock solution): Sigma, Steinheim

Taq-Polymerase: Promega, USA

Trypsin/EDTA: Biochrom, Berlin

6 well-Platten: Nalgene

X-Gal: Stratagene, La Jolla, USA

ERGEBNISSE

III.1. Ox-LDL Wirkung auf die Apoptoserate

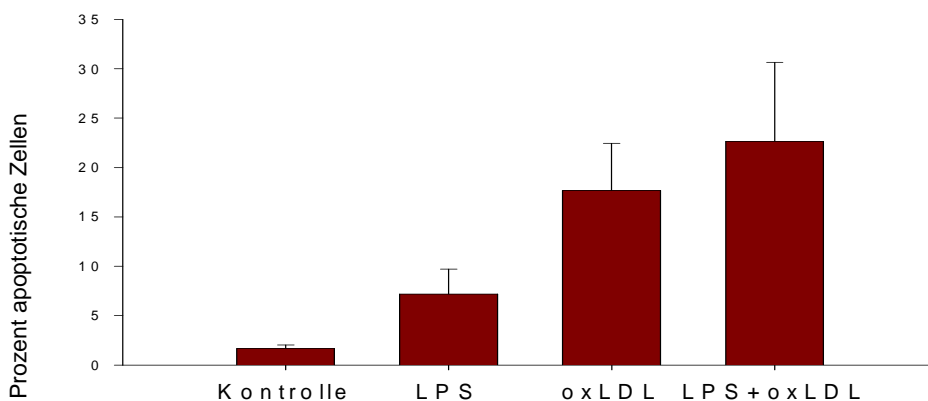
An humanen Endothelzellen (HUVEC) konnte bereits die apoptotische Wirkung oxidierten LDLs gezeigt werden. Hierbei wurde eine durch ox-LDL induzierte Steigerung der cytosolischen Kalziumkonzentration beschrieben, welche wiederum zu einer Aktivierung kalziumabhängiger Enzyme, wie z.B. Endonukleasen führte, die in der Induktion von Apoptose eine entscheidende Rolle spielen (Davies 1997)

Um diese Wirkung auch an den von uns verwendeten bovinen Endothelzellen überprüfen zu können, inkubierten wir die Zellen mit ox-LDL in einer Konzentration von 200 µg/ml für 18 Stunden im Brutschrank.

Als Kontrolle dienten unbehandelte bovine pulmonale Endothelzellen (BPECs) gleicher Passage und mit dem Entzündungsfaktor Lipopolysaccharide (LPS) (10µg/ml) vorbehandelte BPECs. Der Entzündungsfaktor induziert die Transkription antiapoptotischer Gene.

Die Zellen wurden mit Annexin/Propidiumjodid gefärbt und am Durchflusszytometer ausgewertet.

Abb.:1



Darstellung der Apoptoserate aus bovinen Pulmonalarterien gewonnener BPEC in Prozent nach 18h Inkubation mit 200µg/ml ox-LDL, 10µg LPS und Kombination beider. Die Säulen zeigen die Mittelwerte der im dreifach Ansatz gewonnenen Messwerte. Die Balken zeigen die zugehörigen Standardabweichungen der jeweiligen drei Messwerte.

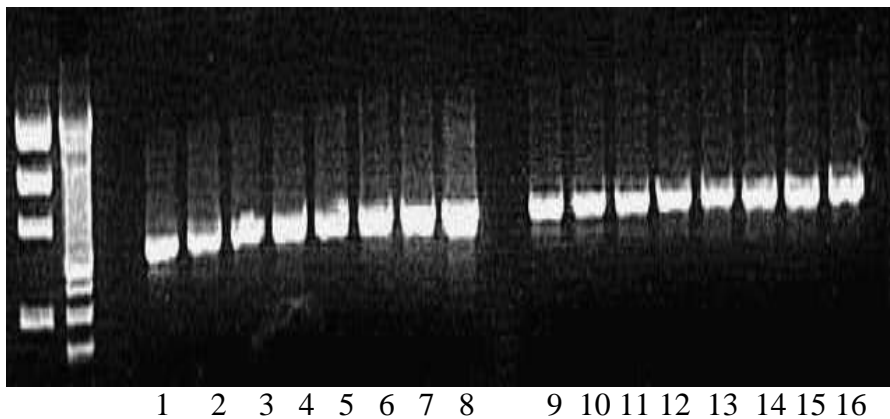
Als Ergebnis konnte man eine Verdoppelung der Apoptose unter ox-LDL-Gabe (18%) im Vergleich zu den mit LPS stimulierten Zellen (8%) sehen und eine neunfache Steigerung gegenüber den unbehandelten Zellen (2%).

Eine weitere Steigerung der Apoptose erfolgte bei Kombination von LPS und ox-LDL (23%).

III.2. Plasmidgewinnung

Die mit A20-Plasmid transformierten superkompetenten *E. coli* wurden nach dem Bebrüten auf selektivem Ampicillin-LB-Agar durch Kolonie-PCR auf Ihren Gehalt an A20-Plasmid kontrolliert.

Abb.:2

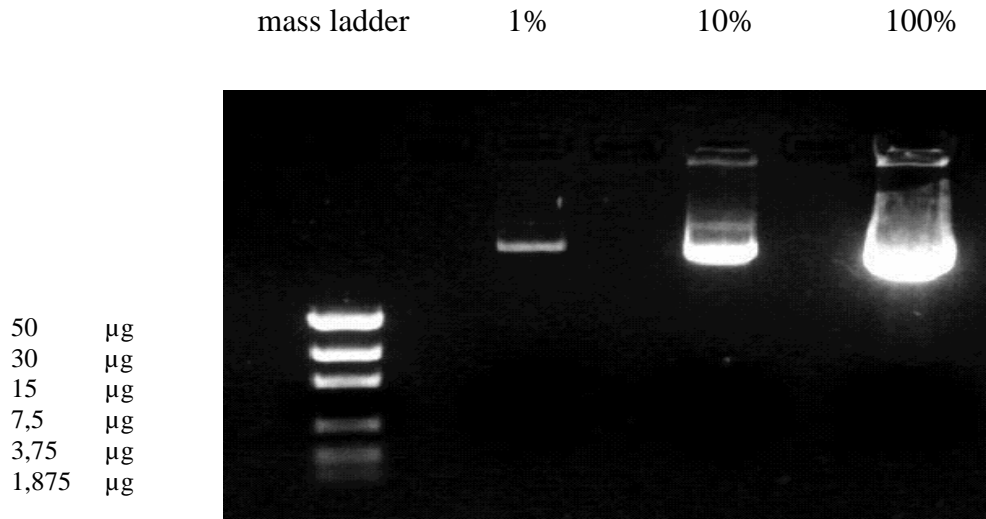


Die Transformationsrate war dabei sehr hoch und man konnte in jeder Bakterienkolonie (1 bis 16) das Plasmid nachweisen. Zum Massenvergleich links mass ladder aufgetragen.

Eine stark positive Kolonie wurde anschließend mit einem sterilen Holzzahnstocher gepickt und in Suspension über Nacht bebrütet.

Am nächsten Tag erfolgte die Plasmid Reinigung nach dem Endo Free Plasmid Maxi Protokoll. Zur Bestimmung der gewonnenen DNA-Menge wurde die DNA in einer Verdünnungsreihe von 100%, 10% und 1% gegen eine low mass ladder auf einem 2%igen Agarosegel aufgetragen.

Abb.:3



Ganz links low mass ladder als Vergleich der Verdünnungsreihe, von rechts nach links 100%, 10%, 1%.

Als Resultat erhielt man eine DNA-Konzentration von 6 µg/µl. Die DNA wurde anschließend in einer geeigneten Trägerlösung, in unserem Fall TE-Puffer aufgenommen.

III.3. Optimierung der Transfektionsrate

Das LacZ-Plasmid eignet sich als Marker der Transfektionsrate. Es kodiert für das Enzym β -Galactosidase, welches normalerweise nicht in Endothelzellen vorhanden ist. Die Aktivität des Enzyms kann mittels eines geeigneten Substrats nachgewiesen werden, bei dessen enzymatischer Spaltung ein blaues Produkt entsteht. Die erfolgreich transfizierten Zellen können unter dem Mikroskop nachgewiesen werden.

Durch Auszählen der gefärbten Zellen kann man die Prozentzahl transfizierter Zellen bestimmen.

Das eingesetzte Substrat ist X-Gal, das spezifisch durch die β -Galactosidase gespalten wird. Wir erreichten Transfektionsraten von 20 bis 25 % bei einem Einsatz von 5 μ l Transfektionsmedium pro 1 μ g eingesetzter DNA.

III.4. Nachweis der Transfektion von A20 als Erfolgskontrolle

Der Nachweis der Transfektion von A20 erfolgt mittels Nachweis der durch Transkription des Plasmids entstandenen mRNA.

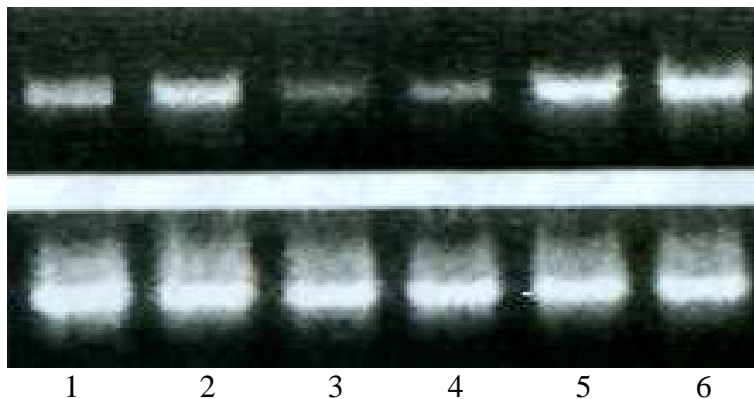
Zunächst wird die RNA aus den Zellen isoliert und der Gehalt an RNA mit Hilfe des Photometers bestimmt.

Der qualitative Nachweis erfolgt durch RT-PCR, wodurch die für das transfizierte Plasmid spezifische mRNA nachgewiesen werden kann.

Als Kontrolle dient der Nachweis des in allen Endothelzellen vorhandenen Aktins.

Abb.:4

ox-LDL(μ g/ml) 150 200 250 == == ==



Der obere Gelabschnitt zeigt A20, das untere Gelsegment Actin als Kontrolle.

Den Proben 1-3 wird oxLDL in steigender Konzentration zugegeben. 4-6 ohne oxLDL.

In der A20 transfizierten Gruppe kann man A20 und Aktin sowohl unter steigenden Konzentrationen von ox-LDL (1 bis 3) als auch ohne Zugabe von ox-LDL (4 bis 6) nachweisen.

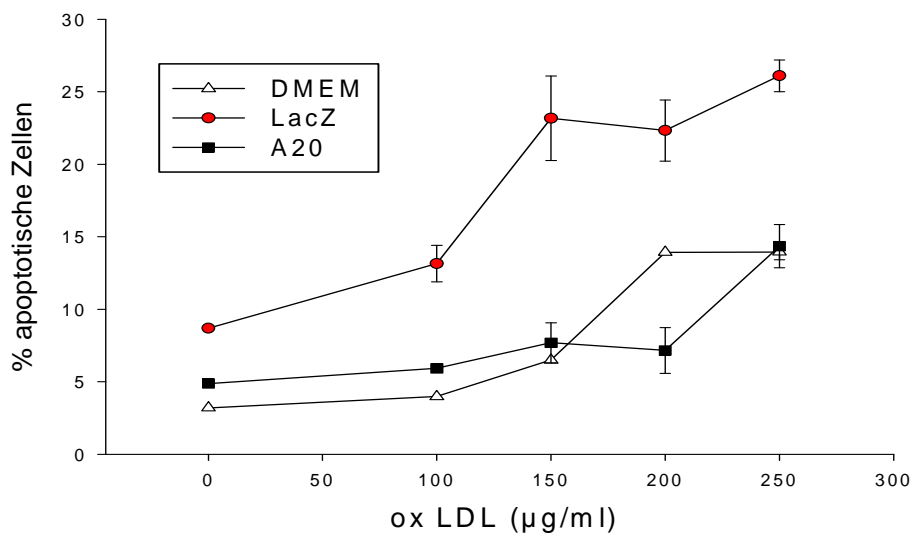
III.5. Messung der Apoptoserate mit dem Durchflusszytometer

24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit ox-LDL stimuliert.

Dabei wurden auf je 3 wells Konzentrationen von 0, 100, 150, 200 und 250 $\mu\text{g/ml}$ ox-LDL zugegeben.

Die so behandelten Zellen wurden nach 12 Stunden Inkubation mit Annexin/Propidiumjodid gefärbt und am FACScan ausgewertet.

Abb.5: Apoptosedaten



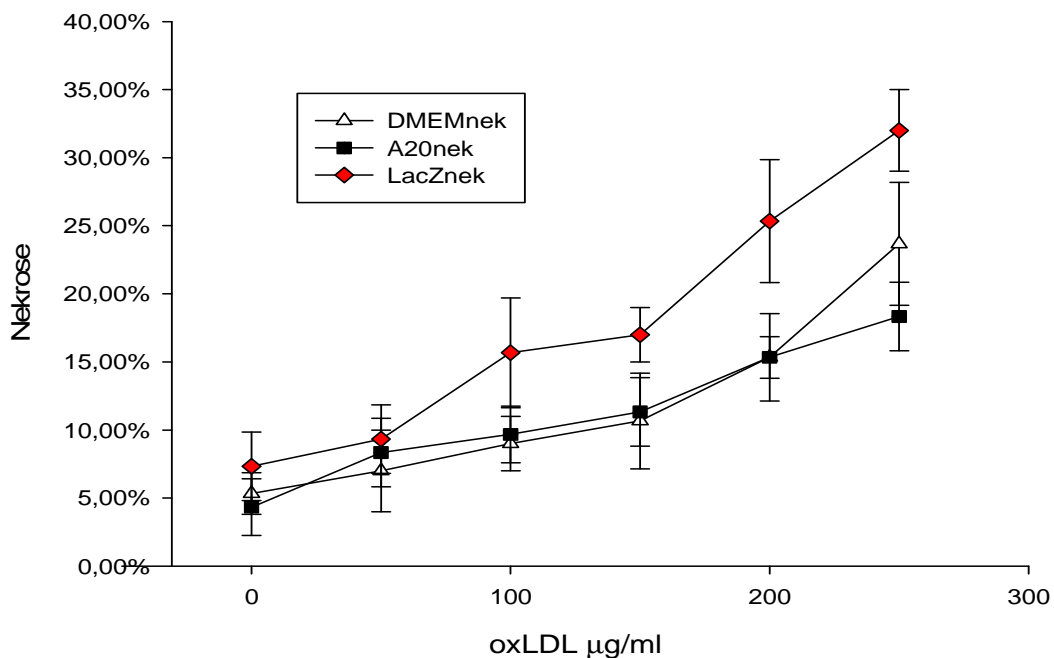
Darstellung der Apoptoseraten mittels im Dreifachansatz gewonnener Daten. X-Achse mit steigender Konzentration ox-LDL. Y-Achse mit Prozentangabe Apoptose. Ermittlung der Messwerte mittels Annexinfärbung und Durchflusszytometrie, Darstellung mit SigmaPlot. Gezeigt sind die Mittelwerte der im Dreifachansatz gewonnene Messwerte gleicher oxLDL-Konzentrationen sowie die Standardabweichungen der jeweils arithmetisch gemittelten drei Werte.

Die Apoptoserate betrug zwischen 5% ohne ox-LDL und 15% bei 250 $\mu\text{g/ml}$ ox-LDL bei den A20 transfizierten Zellen. Dagegen war bei den LacZ transfizierten Zellen die Apoptoserate schon initial bei 8%, welche dann bis auf 27% bei 250 $\mu\text{g/ml}$ ox-LDL

anstieg. Die mit LacZ transfizierten Zellen dienen als direkte Kontrolle, da sie wie die A20 transfizierten Zellen dem gleichen Transfektionsstress unterzogen sind. Die DMEM Gruppe dient als nicht manipulierte Vergleichsgruppe um den Einfluss der Transfektion auf die Apoptose-/Nekroserate wiederzugeben.

Bei der DMEM Kontrolle steigt die Apoptoserate von 3% ohne ox-LDL auf 15% mit 250 mg/ml ox-LDL.

Abb. 6: Nekrosedaten



Darstellung der Nekrosedaten mittels im Dreifachansatz gewonnener Daten. X-Achse mit steigender Konzentration ox-LDL. Y-Achse mit Prozentangabe Apoptose. Ermittlung der Messwerte mittels Annexinfärbung und Durchflusszytometrie, Darstellung mit SigmaPlot. Gezeigt sind die Mittelwerte der im Dreifachansatz gewonnene Messwerte gleicher oxLDL-Konzentrationen sowie die Standardabweichungen der jeweils arithmetisch gemittelten drei Werte.

Es zeigen sich Nekrosewerte zwischen 5 und 22% für DMEM. Ähnlich auch die Werte für die A20 transfizierte Gruppe zwischen 4 und 17%. Die LacZ-Gruppe zeigt im gesamten Bereich höhere Nekrosewerte zwischen 8 und 32%

Die oben gezeigten Daten konnten insgesamt 8-mal wiederholt werden.

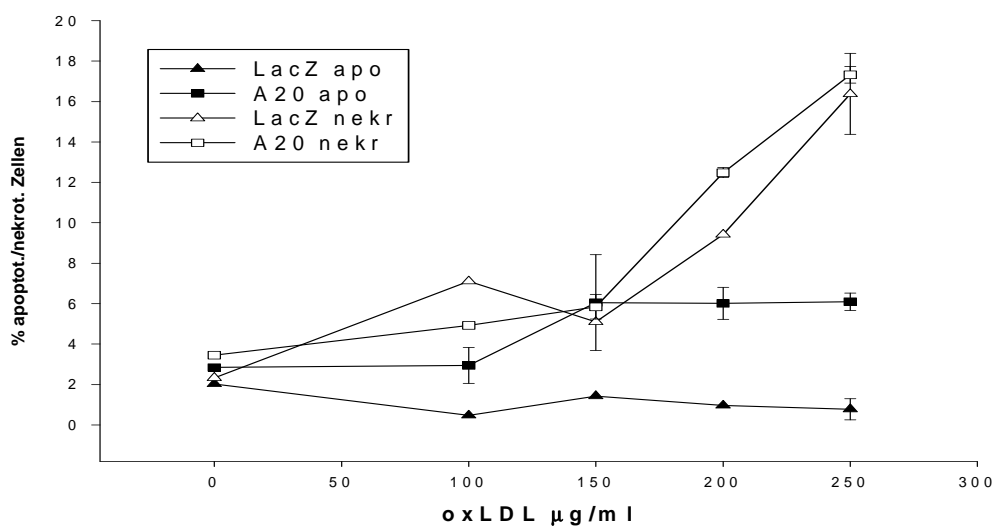
Abweichende Ergebnisse:

Bei den Messungen am Durchflusszytometer wurden mit verschiedenen ox-LDL-Chargen unterschiedliche und zum Teil widersprüchliche Ergebnisse erzielt. Die Mehrzahl der Ergebnisse zeigte jedoch den antiapoptotischen Effekt von A20 (siehe oben).

I.: So kam es zum Beispiel zu einer höheren Apoptoserate bei den A20 transfizierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle der LacZ transfizierten Zellen. Dies konnte in 3 Versuchen gezeigt werden, in denen die Apoptoserate insgesamt sehr niedrig war. (Abb.7).

II.: Zwei Chargen zeigten keine Veränderung der Apoptose- bzw. Nekroserate der Endothelzellen (Abb.8).

Abb.7: Vergleich von Apoptose und Nekrose der transfizierten Zellen



Gezeigt sind die Mittelwerte der im Dreifachansatz gewonnene Messwerte gleicher oxLDL-Konzentrationen sowie die Standardabweichungen der jeweils arithmetisch gemittelten drei Werte. Auf die Darstellung der DMEM-Kontrollgruppe wird aufgrund der Übersicht verzichtet.

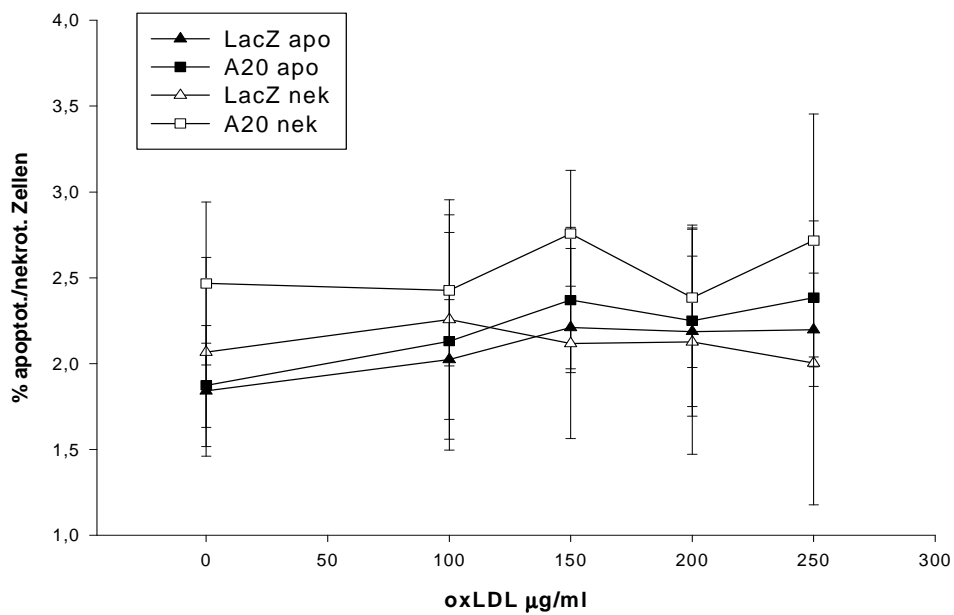
Ermittlung der Messwerte mittels Annexin/Propidiumjodidfärbung und Durchflusscytometrie, Darstellung mit SigmaPlot

Sowohl Apoptose als auch Nekrose sind bei den A20 transfizierten Zellen im Durchschnitt um 2 bis 4% im Vergleich zur LacZ Kontrollgruppe erhöht, wobei die Apoptoserate praktisch unverändert bleibt trotz steigender Konzentrationen an ox-LDL. Ox-LDL löst in diesem Versuch nur Nekrose aus.

Bezüglich der DMEM Kontrollgruppe zeigen sich im Wesentlichen gleiche Ergebnisse wie in der LacZ Kontrolle.

In 2 weiteren Versuchen kann die fehlende Wirkung einzelner ox-LDL Chargen gezeigt werden.

Abb.8: Vergleich von Apoptose und Nekrose in den transfizierten Zellen



Gezeigt sind die Mittelwerte der im Dreifachansatz gewonnene Messwerte gleicher oxLDL-Konzentrationen sowie die Standardabweichungen der jeweils arithmetisch gemittelten drei Werte. Ermittlung der Messwerte mittels Annexin/Propidiumjodidfärbung und Flowcytometrie, Darstellung der Apoptose und Nekrosedaten mit SigmaPlot.

Steigende Konzentrationen von ox-LDL zeigen keinen Einfluss auf die Apoptose- bzw. Nekroserate sowohl der A20 transfizierten als auch der LacZ transfizierten Zellen.

DISKUSSION

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Überexpression von A20 in nicht stimulierten bovinen Endothelzellen zu einer Reduktion der Apoptoserate nach Zugabe von ox-LDL führte. Bovine Endothelzellen eignen sich für Transfektionsversuche deutlich besser als HUVEC, da die Transfektionsrate um 20% liegt und somit eine Anreicherung transfizierter Zellen wie es bei HUVEC nötig wäre, die nur eine sehr geringe Transfektionsrate aufweisen, entfällt. Die transfizierten Zellen wurden mit nicht transfizierten verglichen. Das in der Arbeit verwendete ox-LDL wirkte hierbei in sehr unterschiedlicher Weise. In einigen Versuchen konnte kein Effekt nachgewiesen werden, in anderen war ein nekrotischer Effekt sowie eine apoptotische Wirkung zu sehen.

Augenscheinlich gab es Unterschiede in der Wirksamkeit der verwendeten ox-LDL Chargen. Mögliche Ursachen hierfür werden im Folgenden diskutiert. Chargen, die wirksam waren, zeigten unterschiedliche Effekte auf A20 transfizierte und nicht transfizierte Zellen. Diese Effekte werden diskutiert und in einen Zusammenhang mit der bekannten Literatur gebracht. Hier ist vor allem die Regulation inflammatorischer Prozesse in Mäusen, die eine A20 Deletionsmutante tragen von Bedeutung.

Die Wirkung von LDL und der modifizierten Form ox-LDL auf Endothelzellen wird schon seit mehr als 20 Jahren untersucht. Bereits 1977 fanden Goldstein et al. heraus, dass LDL die Entwicklung der Atherosklerose beeinflusst. Spezifischer wurde dann die oxidierte Form des LDL von Steinbrecher et al. 1990 sowie von Esterbauer 1992 unter die Lupe genommen.

ox-LDL ist dabei eine Partikelgruppe mit einem breiten Spektrum unterschiedlicher Oxidationsgrade und großen molekularen Unterschieden (Steinberg 1997).

Die Kupferionen katalysierte Oxidation von LDL:

In unserem Labor wurde die LDL-Oxidation mittels Kupferionen katalysiert.

Hierbei geht man davon aus, dass die katalytisch wirksamen Kupferionen zunächst oxidiert werden und anschließend an das LDL-Molekül binden. Als Bindungsstellen kommen hier sowohl die Protein- als auch die Phospholipidfraktion des Lipidmoleküls in Frage.

Das entstehende Lipidperoxid treibt dann die weitere Lipidoxidation voran.

Die weiteren Reaktionen laufen bei der Oxidation immer gleich und in drei Schritten ab, unabhängig von den initialen Prozessen der Oxidation.

In der ersten Phase (lag phase oder Verzögerungsphase) verliert das LDL-Molekül durch Oxidation kontinuierlich Antioxidantien wie α -Tocopherol und β -Karotin. Nach Verlust der Antioxidantien folgt die propagation phase (Fortpflanzungsphase) mit exponentieller autokatalytischer Lipidperoxidation. Dabei lösen sich die Kupferionen aus ihrer initialen Bindung und sorgen für die Oxidation von Fettsäuren zu reaktiven Lipidradikalen. Anschließend führt der Entzug der Kupferionen zum Stopp der Oxidation. Nach Überschreiten des Oxidationsmaximums geht die Reaktion in die decomposition phase (Zerlegungsphase) über. Fettsäuren werden zu Aldehyden oxidiert und es kommt zur Bildung von Epitopen, die von Makrophagen erkannt werden und zur ungesteuerten Aufnahme über den Scavenger-Rezeptor führen (Esterbauer: 1992).

Wirkkomponenten des ox-LDL:

Aus molekularer Sicht handelt es sich beim ox-LDL um einen sehr großen Partikel (Molekulargewicht von durchschnittlich 2,5 Millionen), welcher sich aus Protein- und Lipidkomponenten zusammensetzt.

Die apoptotische und nekrotische Wirkung versucht man bestimmten Molekülen innerhalb des Partikels zuzuordnen. An HUVEC konnte man den Oxysterolen eine apoptotische Wirkung zuordnen (Harada-Shiba: 1998). Diese sind Oxidationsprodukte von Cholesterin und Cholesterinestern. Nach Harada-Shiba besitzt die Lipidkomponente des ox-LDL auch zytotoxische Eigenschaften. Für die stärksten zytotoxischen Effekte des ox-LDL Partikels ist das 7β -Hydroxycholest-5-en- 3β -ol verantwortlich (Chisolm: 1994).

Das für diese Arbeit verwendete LDL wurde aus dem gepoolten Frischplasma verschiedener Spender gewonnen. Das gewonnene LDL wurde anschliessend durch Zugabe von Kupfersulfat für 18 h bei 23°C oxidiert. Überprüft wurde der Oxidationsgrad anschliessend mittels der Laufstrecke im Agarosegel nach der Methode nach Steinberg (Steinberg: 1987).

Die während der 18 h ablaufenden oxidativen Prozesse hängen sehr stark von der Dauer der einzelnen oben beschriebenen Phasen ab. Eine zeitliche Verschiebung der Phasen würde zu einer starken Veränderung der biologischen Eigenschaften des LDL-Partikels führen.

Beeinflussung der Oxidation durch andere Faktoren:

Individuelle Gewohnheiten wie die Art der aufgenommenen Nahrung oder Medikamenteneinnahme der jeweiligen Plasmaspender nehmen ebenfalls Einfluss auf die Oxidation von LDL (Westhuyzen: 1997). Folge dieser Gewohnheiten sind eine Veränderung der Dauer der Oxidation durch Einfluss auf die einzelnen Oxidationsphasen.

1. Ernährung

Bekanntermaßen ist die Inzidenz von koronaren Ereignissen in mediterranen Ländern, möglicherweise bedingt durch die Aufnahme von Früchten, Gemüse, Olivenöl und Rotwein weit niedriger als im mitteleuropäischen Durchschnitt. Mittels Versuchen konnte die Verringerung der Oxidation von LDL bei Zugabe von Oleuropein gezeigt werden (Visoli: 1994). Den Polyphenolen des Rotweins wird ebenso ein antioxidativer Effekt zugeschrieben (Frankel: 1993), was an Probanden nach zweiwöchigem Konsum von Rotwein durch Fuhrmann et al. gezeigt wurde.

2. Medikamente

Für verschiedene Medikamente konnte ein Einfluss auf die Oxidation von LDL nachgewiesen werden (Westhuyzen: 1997). Weit verbreitet sind in diesem Zusammenhang zum Beispiel ACE-Hemmer in der Behandlung der essentiellen Hypertonie sowie Östrogenpräparate in der Behandlung des Klimakteriums oder im Rahmen der Kontrazeption. Für Captopril wurde eine dosisabhängige Reduktion der Cu-katalysierten Oxidation von LDL nachgewiesen (Zeiden: 1995). Weitere Versuche mit Östrogenen konnten die antioxidative Wirkung auf LDL zeigen (Tanigucchi: 1994).

3. Vitamine

Insbesondere das Vitamin E (α -Tocopherol), aber auch Ascorbinsäure und β -Karotin reduzieren die Empfindlichkeit des LDL auf die Cu-Ionen katalysierte Oxidation (Gilligan: 1994) Die Zugabe von Vitamin E zur Nahrung über vier Wochen erbrachte eine Verdoppelung des Vitamin E-Gehaltes von LDL und über eine Verlängerung der lag phase eine Reduktion der LDL Oxidation (Suzukawa: 1995).

Da das von uns verwendete LDL jeder Charge von unterschiedlichen Spendern stammt ist die Variationsbreite bezüglich des Ausgangs-LDL und dessen Oxidationsprodukten sowie der biologischen Wirkung sehr weit, da hier Ernährungsgewohnheiten, Medikamenteneinnahme, Jahreszeit, und Alter eine Rolle spielen. Für jede Charge wurde Plasma verschiedener Spender gepoolt, um individuelle Unterschiede auszugleichen. Evtl. wurde dadurch die Heterogenität jeder Charge erhöht. Die zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse dieser Arbeit mit einerseits erhöhter Apoptose unter Zugabe von ox-LDL, andererseits ausbleibender Apoptose oder aber auch überschießender Nekrose der transfizierten Zellen ist in diesem Zusammenhang nicht überraschend. Warum die Apoptoserate in drei Versuchen in der Gruppe der A20 transfizierten Zellen im Vergleich zur LacZ Kontrolle höher ausfiel, lässt sich jedoch hiermit nicht erklären, da in diesen Versuchsanordnungen alle Endothelzellen dem Einfluss der Transfektion unterworfen waren und diese Zellen mit ox-LDL der gleichen Charge behandelt wurden. Da die Apotposerate in diesen Versuchen nicht oxLDL abhängig war (es gab keine Dosis-Wirkungsbeziehung), widersprechen sie nicht der Hypothese, das oxLDL induzierte Apoptose durch A20 gehemmt wird.

Einfluss von ox-LDL auf A20

Für ox-LDL wurde von Ares 1995, Takahara 1997 und Rajavashistu 1995 eine sowohl hemmende als auch aktivierende Wirkung auf NF κ B beschrieben.

Aus diesem Grund bestand die Annahme, dass sich ox-LDL und A20 in Ihrer Wirkung beeinflussen könnten. Heermeier et al. untersuchten diesbezüglich den Einfluss von ox-LDL auf NF κ B und A20. Es konnte eine verminderte Aktivität von NF κ B und eine Zunahme von I κ B α , welches an NF κ B bindet und dessen Aktivität als Transkriptionsfaktor hemmt, in Endothelzellen nach Inkubation mit ox-LDL nachgewiesen werden. Gleichzeitig konnten sie mittels RT-PCR eine vollständige Unterdrückung von A20 an zuvor mit Lipopolysacchariden (LPS) stimulierten HUVEC zeigen. Dabei waren jedoch die Konzentrationen von ox-LDL deutlich höher als zur Apoptoseinduktion nötig waren (Heermeier et al.: 2001).

Mittels unserer Versuche an den nicht aktivierten bovinen Endothelzellen (BPEC) konnten wir zeigen, dass eine Überexpression von A20 mittels Transfektion die Apoptoserate nach Inkubation mit ox-LDL im Vergleich zu LacZ transfizierten Zellen im Großteil der Versuche deutlich verringerte.

Weiterhin konnten wir einen Einfluss der Transfektion selbst auf die Endothelzellen feststellen. Bereits ohne Zugabe von ox-LDL war eine gesteigerte Apoptose wie auch Nekrose in den LacZ transfizierten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen in Nährlösung festzustellen. Die Rate an apoptotischen als auch nekrotischen Zellen bei der Gruppe der A20 transfizierten Zellen war stets niedriger als in der Gruppe der LacZ transfizierten Zellen.

Unter Zugabe steigender Konzentrationen oxLDL zeigt sich dann der protektive Effekt von A20 sowohl im Vergleich zur LacZ Kontrolle als auch zur nicht transfizierten DMEM Kontrolle.

Dies bestätigt, dass die Unterdrückung der Expression von A20 durch oxLDL zu einer erhöhten Apoptoserate führen kann. OxLDL hemmt die Aktivierung von NF κ B und damit die Transkription von A20. Diese Wirkung wird über die Bindung von I κ B α an NF κ B erreicht, also einem anderen Weg als A20 bei der negativen feedback-Regulation von NF κ B über ABIN einschlägt.

Diese Daten legen den Schluss nahe, dass oxLDL zur Apoptose und Nekrose endothelialer Zellen führt, indem es NFκB beeinflusst und die Expression protektiver Gene unterdrückt.

Die zentrale Rolle des NFκB:

Die Signalwege in der Zelle selbst werden seit langem untersucht. Hier ist insbesondere die Rolle des Transkriptionsfaktors NFκB hervorzuheben. Dieser reguliert sowohl proinflammatorische Reaktionen als auch die Expression protektiver Gene. Dabei unterliegt dieses einem negativen feedback Mechanismus, um einer Überaktivierung vorzubeugen (Bach 1997).

antiapoptotische Wirkung von A20

A20 wurde bereits 1992 von Krikos et al. als ein TNF-induzierbares Protein beschrieben, welches bezüglich seiner Expression NFκB abhängig ist. In der Folge wurde dann die antiapoptotische Wirkung in Bezug auf die Aktivierung von Endothelzellen durch TNFα und andere Cytokine nachgewiesen (Ferran 1998, Shane T.Grey 1999). Der mögliche protektive Wirkungsmechanismus von A20 gegenüber TNFα-Aktivierung von Endothelzellen wurde von K.Heyninck et al. 1999 durchleuchtet. Diese Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass A20 durch Bindung an ein neu entdecktes Protein (A20 bindender Inhibitor der NFκB-Aktivierung, ABIN) NFκB blockiert. Damit wird eine Überexpression von Entzündungsfaktoren gehemmt. Dabei wurde klar, dass A20 in seiner Expression von NFκB abhängig ist.

Die Überexpression des antiapoptotischen Gens A20 in unseren mit oxLDL aktivierten bovinen Endothelzellen führt, im Vergleich zu Kontrollen, zur Reduktion der Apoptoserate wie andere Gruppen schon bei Tumorzellen nachweisen konnten (53)(34). Diese Daten unterstreichen den protektiven Effekt von A20 gegenüber oxLDL (32).

Einfluß von A20 auf den Transkriptionsfaktor NFκB

A20 scheint an einem frühen Punkt der NFκB-Aktivierung anzugreifen, oberhalb von IKK, was eine Blockierung spezifischer Stimuli wahrscheinlich macht.

Obwohl die Blockierung von NFκB durch Überexpression von IκBα viele Zellen in die TNF-induzierte Apoptose führt, blockiert A20 NFκB in vielen Zelllinien ohne in diesen Apoptose hervorzurufen.

Bei Co-Expression der beiden Faktoren (IκBα und A20) überwiegt der Effekt von A20. Dieser dominante Effekt ist auch beim Einsatz von Antioxidantien zu sehen, was auf mögliche Ähnlichkeiten dieser Substanzen mit A20 hindeutet (28).

Der molekulare Mechanismus der A20-Wirkung konnte etwas besser durchleuchtet werden. Es konnte gezeigt werden, dass A20 die Translokation von NFκB in den Zellkern und die Bindung an die DNA nicht beeinflusst, obwohl es komplett die TNF induzierte Aktivierung blockiert. Ebenso wird durch A20 die Aktivierung von NFκB durch Überexpression der TNF-Rezeptor assoziierten Proteine TRADD, RIP, TRAF2 blockiert.

Dagegen ist die NFκB-Aktivierung durch Überexpression von NIK oder HTLV-1 Tax unbeeinflusst. Das deutet auf einen spezifischen Wirkmechanismus hin, der TNF induziert ist und unabhängig vom NIK-IκB-Kinase Signalweg ist.

Man konnte nachweisen, dass A20 an ein Protein bindet, welches zur Inaktivierung von NFκB führt und deshalb als A20-bindender Inhibitor der NFκB Aktivierung (ABIN) bezeichnet wird (33). Dies könnte, neben der Bindung an TRAF2 oder IKKγ, einen Weg der Beeinflussung der TNF induzierten Apoptose darstellen über den A20 wirkt.

Die Wirkung von A20 im Tierversuch

Zur Beurteilung der Funktion von A20 in vivo entwickelten Eric G. Lee et al. A20 defizitäre Mäuse. Wenige Wochen nach Geburt verstarben diese Mäuse, wohingegen die Kontrollgruppe überlebte. Histopathologische Untersuchungen zeigten schwere entzündliche Veränderungen vieler Organe, wie Leber, Nieren, Gastrointestinaltrakt, Gelenke und Knochenmark. Weiterhin konnte ein fehlerhafter Aufbau der Haut gezeigt werden mit einer verdickten epidermalen und dermalen Schichtung. Somit hat A20 einen essentiellen Einfluss auf die Regulation inflammatorischer Prozesse und die Hautdifferenzierung in vivo bei Mäusen.

Weiterhin wurde die Rolle von A20 auf die spezifische Regulation der Entzündungsreaktion, ausgelöst durch die Gabe von LPS untersucht. A20 defizitäre Mäuse starben in kurzer Zeit nach Gabe von LPS an massiven entzündlichen Veränderungen der Haut wie auch der inneren Organe im Rahmen eines toxischen Schockes, während A20 positive Mäuse ohne Zeichen einer Entzündung unbeschadet überlebten. Das selbe Ergebniss erbrachte die Gabe von TNF in niedriger Dosierung.

Die schnelle Expression des A20 Gens ist notwendig zur Hemmung von NFκB in vivo, um überschießende entzündliche Reaktionen und die damit einhergehenden Organerstörungen zu unterdrücken.

V: Zusammenfassung

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass oxLDL in bovinen endothelialen Zellen Apoptose auslöst. Durch Überexpression des als antiapoptotisch klassifizierten Gens A20 mittels Transfektion werden die verwendeten Endothelzellen vor der oxLDL induzierten Apoptose geschützt.

Den exakten Wirkmechanismus von A20 konnte man bis jetzt noch nicht bis ins letzte Detail klären. Man geht jedoch davon aus, dass A20 spezifisch auf einen TNF induzierbaren Mechanismus einwirkt, ohne dabei den bekannten NIK-IkappaB-Kinase Signalweg zu beeinflussen.

Verschiedene oxLDL Chargen verhielten sich in den Versuchen nicht gleich: sie lösten in den Endothelzellen unterschiedliche Raten von Apoptose und Nekrose aus; manche Chargen schienen inaktiv zu sein. Diese Ergebnisse sind vermutlich auf die beschriebenen Variablen zurückzuführen, die auf die chemische Zusammensetzung und den Oxidationsgrad des oxLDL Einfluss nehmen.

Insgesamt überwog der antiapoptotische Effekt des A20, der auch in der Zwischenzeit durch weitere Modelle, z.B. A20 defizitäre Mäuse reproduziert werden konnte.

Mit A20 steht somit evtl. ein in Zukunft einsetzbares Therapeutikum gegen Erkrankungen des entzündlichen Formenkreises zur Verfügung.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Arenzana-Seisdedos F. et al.: Inducible nuclear expression of newly synthesized IkappaBalpha negatively regulates DNA-binding and transcriptional activities of NFkappaB.: *Mol. Cell Biol.*, 15: 2689-2696, 1995
2. Arvelo M.B. et al.: A novel function for A20 in smooth muscle cells: Inhibition of activation and proliferation.: *Transplant Proc.*, 31: 858-859, 1999
3. Ballinger W.: Proceedings: Isolation and transplantation of islets of Langerhans in rat and monkey. *Ann. R. Coll. Surg. Engl.*: 58: 327-330, 1976
4. Bennet M.R.; Evan G.I.: Apoptosis of human vascular smooth muscle cells derived from normal vessels and coronary atherosclerotic plaques.: *J. clin. Invest.*, 95: 2266-2274, 1995
5. Boise L.H.; Gonzales-Garcia M.: bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death.: *Cell*, 74: 597-608, 1993
6. Bose R.; Verheij M.: Ceramide synthase mediates daunorubicin-induced apoptosis: an alternative mechanism for generating death signals.: *Cell*, 82: 405-14, 1995
7. Bach F.H., Ferran Chr. et al. Accomodation of vascularized xenografts: Expression of protective genes by donor endothelial cells in a host Th2 cytokine environment.: *Nat. Med.*, 3: 196-204, 1997
8. Beg A.A., Sha W.C., Bronson R.T. et al.: Embryonic lethality and liver degeneration in mice lacking the RelA component of NFkappaB. *Nature*: 376: 176-170, 1995
9. Bochaton-Piallat M.L. et al.: Apoptosis participates in cellular regulation during rat aortic intimal thickening.: *Am. J. Pathol.*, 146: 1059-1064, 1995

10. Bondeson J., Foxwell B., Brennan F., Feldmann M.: Defining therapeutic targets by using adenovirus: Blocking NFkappaB inhibits both inflammatory and destructive mechanisms in rheumatoid synovium but spares antiinflammatory mediators.: Proc.Natl.Acad.Sci.USA: 96: 5668-5673, 1999
11. Boudreau N.; Sympson C.J.: Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix.: Science, 267: 891-893, 1995
12. Carpentier I.; Beyaert R.: TRAF1 is a TNF inducible regulator of NFkappaB activation.: FEBS Lett., 460: 246-50, 1999
13. Codd J.D. et al.: A20 RNA expression is associated with undifferentiated nasopharyngeal carcinoma and poorly differentiated head and neck squamous cell carcinoma.: J. Pathol., 187: 549-555, 1999
14. Cooper J.M., Stroka D.M., Brostjan C., Palmetshofer A.: A20 blocks endothelial cell activation through a NFkappaB dependent mechanism.: J.Biol. Chem., 271: 18068-18073, 1996
15. Cyatte A.J., Palacino J.J., Horten K., Cohen R.A.: chronic inhibition of NO production accelerates neointimal formation and impairs endothelial function in hypercholesterolemic rabbits.: Arteriosclerosis Thrombosis, 14: 753-759; 1994
16. Davies P.F.: Vascular cell interactions with special reference to the pathogenesis of atherosclerosis.: Laboratory investigation, 55: 5-24. 1986
17. De Valck D. et al.: The zinc finger protein A20 interacts with a novel anti-apoptotic protein which is cleaved by specific caspases.: Oncogene, 18: 4182-90, 1999
18. Dimmeler S.; Haendeler, Galle J.: Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis of human endothelial cells by activation of CPP32-like proteases. A

- mechanistic clue to the `response to injuri`hypothesis.: *Circulation*, 95: 1760-3, 1997
19. Dimmler S., et alt.: AT II induces apoptosis of human endothelial cells: protective effect of NO.: *Circ. Res.*, 81: 970-976, 1997
 20. Dixit et alt.: Tumor necrosis factor-alpha induction of novel gene products in human endothelial cells including a macrophage specific chemotaxin.: *J. Biol. Chem.*, 265: 2973-2978, 1990
 21. Duckett C.S. et alt.: CD30-dependent degradation of TRAF2: implications for negative regulation of TRAF signaling and the control of cell survival.: *Genes Dev.*, 11: 2810-21, 1997
 22. Efrat S.: Prospects for gene therapy of insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetologia*: 41: 1401-1409, 1998
 23. Ellis P.A., Smith I.E., Dowsett M.: Apoptosis: its role in tumor growth and therapy.: *Cytopathology.*, 7: 201-203; 1996
 24. Evan G.I.; Wyllie AH.: Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein.: *Cell.*, 69:119-28; 1992
 25. Faggiotto A., Ross R., Harker L.: Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. I. Changes that lead to fatty streak formation.: *Arteriosclerosis*, 4: 323-340, 1984
 26. Faggiotto A., Ross R.: Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. II. Fatty streak conversion to fibrous plaque.: *Arteriosclerosis*, 4: 341-356, 1984
 27. Farber J.L., The role of calcium in lethal cell injury: *Chem. Res. Toxicology*, 3: 503-508, 1990

28. Ferran C., Stroka D.M., Badrichani A.Z., Cooper J.T. et al.: A20 inhibits NFkappaB activation in endothelial cells without sensitizing to tumor necrosis factor-mediated apoptosis.: *Blood*, 91: 2249-2258, 1998
29. Fukuo K., et al.: NO induces upregulation of Fas and apoptosis in vascular SMC: *Hypertension*, 27: 823-826, 1996
30. Geng Y.J., Libby P.: Evidence for apoptosis in advanced human atheroma: colocalization with interleukin-1 β -converting enzyme: *Am. J. Pathol.*, 147: 251-266, 1995
31. Haanen C., Vermes I.: Apoptosis: programmed cell death in fetal development: *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reproduct. Biol.*, 64: 129-133, 1996
32. Heermeier K., Leicht W., Palmetshofer A., Ullrich M., Wanner Chr., Galle J.: Oxidized LDL suppresses NFkappaB and overcomes protection from Apoptosis in activated endothelial cells: *J.Am.Soc.Nephrol.*, 12: 456-463, 2001
33. Heyninck K. et al.: The zinc finger protein A20 inhibits TNF-induced NFkappaB-dependent gene expression by interfering with an RIP- or TRAF2-mediated transactivation signal and directly binds to a novel NFkappaB-inhibiting protein ABIN.: *J. Cell Biol.*, 145: 1471-82, 1999
34. Jaattela M, Mouritzen H, Elling F, Bastholm L: A20 zinc finger protein inhibits TNF and IL-1 signaling. *J.Immunol.*, 156:1166-1173, 1996
35. Jacobson M..D.; Burne J.F.: bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA.: *Nature*, 361: 365-369, 1993

36. Krikos A et al.: Transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha-inducible zinc finger protein, A20, is mediated by kappa B elements.: *J. Biol. Chem.*, 267: 17971-17976, 1992
37. Laherty CD et al.: Human T cell leukemia virus type I Tax and phorbol 12-myristate 13-acetate induce expression of the A20 zinc finger protein by distinct mechanisms.: *J. Biol. Chem.*, 268: 5032-5039, 1993
38. Laherty et al.: The Epstein-Barr virus LMP1 gene product induces A20 zinc finger protein expression by activating nuclear factor kappa B.: *J. Biol. Chem.*, 267: 24157-24160, 1992
39. Lee H.S., Kim Y.S.: Identification of oxidized low density lipoprotein in human renal biopsies. *Kidney Int.*, 54: 848-856, 1998
40. Lee J.L., Burckart G.J., Nuclear factor kappa B: important transcription factor and therapeutic target.: *J. clin. pharmacol.* 38: 981-993, 1998
41. Li-D; Yang-B; Metha-JL: Ox-LDL induces apoptosis in human coronary artery endothelial cells: role of PKC, PTK, bcl-2, and Fas.: *American journal of physiology*, 272: H 568-576, 1998
42. Lizard G; Deckert V.: Induction of apoptosis in endothelial cells treated with cholesterol oxides.: *Am. J. Pathol.*, 148: 1625-1638, 1996
43. Magil A.B., Frohlich J.J., Innis S.M., Steinbrecher U.P.: Oxidized low density lipoprotein in experimental focal glomerulosclerosis.: *Kidney Int.* 51:1151-1159, 1997
44. Mallat Z, et al.: Colocalization of CPP32 with apoptotic cells in human atherosclerotic plaques.: *Circulation*, 96: 424-428, 1997

45. Masuda J., Ross R.: Atherogenesis during low level hypercholesterolemia in the nonhuman primate. I. fatty streak formation.: *Arteriosclerosis*, 10: 164-177, 1990
46. Masuda J., Ross R.: Atherogenesis during low level hypercholesterolemia in the nonhuman primate. II. fatty streak conversion to fibrous plaque.: *Arteriosclerosis*, 10: 178-187, 1990
47. Miller W.E. et al.: Epstein-Barr virus LMP-1 induction of the epidermal growth factor receptor is mediated through a TRAF signaling pathway distinct from NFkappa-B activation.: *J. Virol.*, 71: 586-594, 1997
48. Miura M., Friedlander R.M.: Tumor necrosis factor-induced apoptosis is mediated by a CrmA-sensitive cell death pathway.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 8318-8322, 1995
49. Moncada S., Higgs A.: The L-arginin-nitric-oxid pathway: *New english journal of medicin*, 329: 2002-2012, 1993
50. Mora R., Lupu F., Simionescu N.: Prelesional events in atherogenesis. Colocalization of apolipoprotein B, unesterified cholesterol and extracellular phospholipid liposomes in the aorta of hyperlipidemic rabbit. *Atherosclerosis*, 67: 143-154, 1987
51. Munro J.M., Cotran R.S.: The pathogenesis of atherosclerosis: atherogenesis and inflammation.: *Laboratory investigation*, 58: 249-261, 1988
52. Ohara Y., Peterson T.E., Harrison D.G.: Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *Journal of clinical investigation*, 91: 2546-2551, 1993
53. Opipari A.W. Jr. et al.: The A20 cDNA induced by tumor necrosis factor alpha encodes a novel type of zinc finger protein.: *J. Biol. Chem.*, 265: 14705-14708, 1990

54. Opipari A.W. Jr., Hu H.M., Yabkowitz R., Dixit VM.: The A20 zinc finger protein protects cell from tumor necrosis factor cytotoxicity; *J.Biol.Chem.*, 267: 12424-12427, 1992
55. Reed J.C., Cuddy M.: Oncogenic potential of bcl-2 demonstrated by gene transfer.: *Nature*, 336: 259-261, 1988
56. Ross, R.: The pathogenesis of atherosclerosis—an update.: *New english journal of medicin*, 314: 488-500, 1986
57. Rossi A., Kapahi P., Naroli G., Takahashi T., Chen Y., Karin M., Santoro M.G.: Antiinflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of IkappaB kinase.: *Nature* 403: 103-108, 2000
58. Rothe M. et alt.: TRAF-2 mediated activation of NFkappaB by TNF receptor 2 and CD40.: *Science*, 269: 1424-27, 1995
59. Rothe M. et alt.: The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins.: *Cell*, 83: 1243-52, 1995
60. Rowan S., Fisher D.E.: Mechanisms of apoptotic cell death. *Leukemia*, 11: 457-465, 1997
61. Sha W.C., Liu H.C., Tuomanan E.L., Baltimore D.: Targeted diruption of the p50 subunit of NFkappaB leads to multifocal defects in immune responses.: *Cell*: 80: 321-330, 1995
62. Shane T. Grey, Maria B. Arvelo et alt.: A20 inhibits cytokine-induced Apoptosis and Nuclear Factor kappa B-dependent Gene Activation in Islets. *J. Exp. Med*, 190: 1135-1146, 1999

63. Shichiri M., Kato H., et al.: Endothelin-1 as an autocrin/paracrin apoptosis survival factor for endothelial cells: *Hypertension*, 30: 1198-1203, 1997
64. Shimizu S., Narita M., Tsujimoto Y.: Bcl-2 family protein regulate the release of the apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC.: *Nature*, 399: 483-487, 1999
65. Simon B.C, Cunningham L.D., Cohen R.A.: oxLDLs cause contraction and inhibit endothelium dependent relaxation in pig coronary arteri: *Journal of clinical investigation*, 86: 915-924, 1990
66. Soares M.P., Muniappan A., Kaczmarek E., Koziak K., Wrighton C.J.,Steinhauslin F., Ferran C., Winkler H., Bach F.h., Anrather J.: Adenovirus mediated expression of a dominant negative mutant of p65/RelA inhibits proinflammatory gene expression in endothelial cells without sensitizing to apoptosis.: *J. Immunol.* 161: 4572-4582, 1998
67. Soengas M.S., Alarcon R.M., Yoshida H, Giacca A.J., Hakem R., Mak T.W., Lowe S.W.: Apaf-1 and caspase-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition.: *Science*, 284: 156-159, 1999
68. Solary E.: L`apoptose: mecanismes moleculaires.: *C. R. Seances Soc. Biol. Fil.*, 192: 1056-1076, 1998
69. Song H.Y. et al.: The tumor necrosis factor-inducible zinc finger protein A20 interacts with TRAF1/TRAF2 and inhibits NFkappaB activation.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93: 6721-6725, 1996
70. Takahashi T., Tanaka M.: Generalaized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand.: *Cell*, 76: 969-76, 1994

71. Tewari M., Wolf F.W., et alt.: Lymphoid expression and regulation of A20, an inhibitor of programmed cell death.: *J. Immunol.*, 154: 1699-705, 1995
72. Tewari M., Dixit V.M.: Fas- and tumor necrosis factor-induced apoptosis is inhibited by the poxvirus cmrA gene product.: *J. Biol. Chem.*, 270: 3255-3260, 1995
73. Thomas W.A., Lee K.T., Kim D.N.: Cell population kinetics in atherogenesis. Cell births and losses in intimal cell mass-derived lesions in the abdominal aorta of swine.: *Ann. New York Academic Science*, 454: 305-315, 1985
74. Tsukada T., Rosenfeld M.E., Ross R., Gown A.M.: Immunocytochemical analysis of cellular components in atherosclerotic lesions. Use of monoclonal antibodies with the Watanabe and fat-fed rabbit.: *Arteriosclerosis*, 6: 601-613, 1986
75. Vane J.R., Anggard E.E., Botting R.M.: Regulatory Funktionen of the vascular endothelium.: *New English Journal of Medicin*, 323: 27-36, 1990
76. Watanabe-Fukunaga R.; Brannan C.I.: Lymphoproliferative disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis.: *Nature*, 356: 314-317, 1992
77. Willye A.H.: Cell death: a new classification separating apoptosis from necrosis. *Cell death in Biology and Pathology*, London: Chapman and Hall, 9-34, 1981
78. Wissing et alt.: TNF-induced mitochondrial changes and activation of apoptotic proteases are inhibited by A20.: *Free Radic. Biol. Med.*, 25: 57-65, 1998
79. Wyllie A.H., Arends M.J., Morris R.G., Walker S.W., Evan G.: The apoptosis endonuclease and its regulation.: *Semin. Immunology.*, 4: 389-397, 1992
80. Xie Q., Nathan C.: The high output nitric oxide pathway: role and regulation.: *Leukocyte. biol.* 56: 576- 582, 1994

81. Yeh W.C. et al.: Early lethality, functional NF κ B activation, and increased sensitivity to TNF-induced cell death in TRAF2-deficient mice.: *Immunity*, 7: 715-25, 1997
82. Yin M.J., Yamamoto Y., Gaynor R.B.: The anti-inflammatory agents aspirin and salicylate inhibit the activity of IkappaB kinase- β .: *Nature* 396: 77-80, 1998
83. Zhang S.Q. et al.: Recruitment of the signalosome to the p55 TNF receptor: RIP and A20 bind to NEMO (IKK γ) upon receptor stimulation.: *Immunity*, 12: 301-11, 2
84. Zhu H., Fearnhead H.O.: An ICE-like protease is a common mediator of apoptosis induced by diverse stimuli in human monocytic THP.1 cells.: *FEBS Lett.*, 374: 303-308, 1995

Meinen Dank richte ich an Prof. Dr. med. Galle, der mir das Dissertationsthema zur Verfügung stellte und eine konstruktive Begleitung durch das Thema und während der Korrektur darstellte.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Heermeier, die mir während der experimentellen Phase im Labor stets hilfreich und erklärend zur Seite stand und ohne die die Erstellung der Dissertation nicht möglich gewesen wäre.

Den Kollegen im nephrologischen Labor der Universität Würzburg sei für die stetige Unterstützung und Beratung, sowie für die immer gute Stimmung im Labor gedankt. Das Arbeiten hat so sehr viel Spass gemacht und zum Gelingen beigetragen.

Lebenslauf

Wolfgang Leicht

Adresse:

Piemontstrasse 25

76149 Karlsruhe

Tel.: 0721-7880211

Dienst: 0721-974-4106

Geburtsdatum: 01.08.1972

Geburtsort: Würzburg

Konfession: röm.-kath.

Familienstand: verheiratet, 2 Kinder

Schule und Studium

- **Riemenschneider-Gymnasium Würzburg und Abitur**
 - Studium der Oboe am Konservatorium für Musik Würzburg während der Kollegialstufe
- **1992-1993 Zivildienst als Rettungssanitäter Würzburg**
- **1994-2001 Studium Humanmedizin Julius Maximilians Universität Würzburg**
 - 1996 ärztl. Vorprüfung
 - 1997 erster Abschnitt ärztl. Prüfung
 - 2000 zweiter Abschnitt ärztl. Prüfung
- **2001 3. Staatsexamen (Gesamtnote: 1,86)**

Berufsausbildung

- **2000-2001** **Praktisches Jahr**
- **10/2001-12/2003** **Chirurgischer und Urologischer Assistenzarzt am
Kantonsspital Münsterlingen**
- **2003** **Approbation als Arzt**
- **01/2004-10/2004** **Urologischer Assistenzarzt** Klinikum Lüdenscheid
- **Seit 11/2004** **Urologischer Assistenzarzt** Klinikum Karlsruhe
- **05/2007** **Facharzt Urologie**
 - Weiterbildungsbefugter der Klinik
 - Strahlenschutzbeauftragter
 - Transfusionsbeauftragter
- **seit 09/2007** **Oberarzt Urologie** Städt. Klinikum Karlsruhe
 - **Zusatzbezeichnungen:**
spezielle urologische Chirurgie (2008),
medikamentöse Tumorthherapie (2008),
Andrologie (2009)