

Aus dem Bereich Innere Medizin III
Klinische Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Redoxsensitive Signaltransduktion in VSMC am Beispiel der
differentiellen Regulation der Genexpression des Gut-enriched
Krüppel-like factor und des Inhibitor of DNA-binding 3 durch
reaktive Sauerstoffspezies**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2008

vorgelegt von
Christian Matthias Werner
geboren am 29.05.1977
in Trier

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Endotheliale Dysfunktion und Atherosklerose	3
2.2 Reaktive Sauerstoffspezies in biologischen Systemen	4
2.2.1 Klassifikation und allgemeine Eigenschaften von ROS	4
2.2.2 Die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies im kardiovaskulären System.....	5
2.2.3 Abbaumechanismen für reaktive Sauerstoffspezies.....	7
2.2.4 Divergierende Wirkungen von ROS – Ein dosisabhängiger Effekt.....	8
2.2.5 Wirkung von ROS als Signalmoleküle im kardiovaskulären System.....	10
2.3 Steuerung der Proliferation durch den Zellzyklus	11
2.3.1 Das Zusammenspiel von CDKs und CDK-Inhibitoren im Zellzyklus	11
2.3.2 Der Einfluss von Krueppel-Faktoren auf die Gentranskription	13
2.3.3 Die Inaktivierung von Transkriptionsfaktoren durch Id-Proteine.....	16
2.3.4 Die Bedeutung von GCLF und Id3 im kardiovaskulären System.....	18
2.4 Fragestellung und Ziel der Arbeit	19
3 Material und Methoden	20
3.1 Materialien	20
3.1.1 Verwendete Substanzen	20
3.1.2 Puffer und Lösungen.....	21
3.1.2.1 Allgemein verwendete Puffer und Stammlösungen	21
3.1.2.2 Speziell verwendete Puffer und Lösungen	22
3.1.3 Molekularbiologische Kits	22
3.1.4 Filter und Membranen.....	23
3.1.5 Geräte und Zubehör.....	23
3.1.6 Software	24
3.2 Methoden	25
3.2.1 Zellkultur.....	25
3.2.1.1 Zellisolation	25
3.2.1.2 Immunhistochemische Charakterisierung	25
3.2.1.3 Kulturbedingungen	26
3.2.1.4 Transfektion.....	26
3.2.1.5 Apoptose-Assay	27
3.2.1.6 Luciferase-Assay.....	28
3.2.2 Zellstimulation	28
3.2.2.1 Stimulation mit Sauerstoffradikalen.....	28
3.2.2.2 Stimulation mit Radikalscavengern	29
3.2.2.3 Stimulation mit Signaltransduktionsinhibitoren	29
3.2.3 RNA.....	30
3.2.3.1 Gesamt-RNA-Isolation	30
3.2.3.2 RNA-Gel	31
3.2.3.3 Northern Blot	31
3.2.3.4 Reverse Transkription	33
3.2.4 DNA.....	34
3.2.4.1 DNA-Gel	34
3.2.4.2 Semiquantitative PCR und Primer	34
3.2.4.3 Plasmidvermehrung in E.coli.....	35
3.2.4.4 Vektoren und Klonierungen.....	37
3.2.4.5 cDNA-Gewinnung für Northern Blots	39
3.2.4.6 DNase-Verdau	40
4 Ergebnisse	41
4.1 Der Einfluss von GCLF und Id3 auf Proliferation und Apoptose ..	41
4.1.1 Zellzählungen nach transienter Transfektion.....	41
4.1.2 Apoptose-Assay nach transienter Transfektion.....	42
4.2 Die Regulation von GCLF durch OH⁻ und Id3 durch O₂⁻ und Angiotensin II	44

4.2.1	mRNA-Regulation von GKLf nach Stimulation mit OH [•]	44
4.2.2	mRNA-Regulation von Id3 nach Stimulation mit O ₂ ^{•-} und Angiotensin II	46
4.3 Die Wirkung von Radikalscavengern auf die redoxsensitive Regulation von GKLf und Id3		47
4.3.1	mRNA-Regulation von GKLf nach Stimulation mit OH [•] und Scavengern	47
4.3.2	mRNA-Regulation von Id3 nach Stimulation mit O ₂ ^{•-} und Scavengern	49
4.4 Der Effekt von Signalwegsinhibitoren auf die Regulation von GKLf und Id3		52
4.4.1	mRNA-Regulation von GKLf nach Stimulation mit OH [•] und Inhibitoren	52
4.4.2	mRNA-Regulation von Id3 nach Stimulation mit O ₂ ^{•-} und Inhibitoren	56
4.5 Experimentelle Hinweise auf einen Zusammenhang der Regulation von GKLf und Id3		59
4.5.1	mRNA-Regulation von Id3 nach Stimulation mit Hydroxylradikalen	59
4.5.2	mRNA-Spiegel von GKLf und Id3 nach Transfektionsexperimenten	62
4.5.3	Zellzählung nach Kotransfektion mit GKLf und Id3	65
4.5.4	Luciferase-Assay nach transienter Transfektion	66
5	Diskussion	68
5.1 Mechanismen der Signaltransduktion zu GKLf und Id3 nach Stimulation mit OH[•], O₂^{•-} und Angiotensin II: Mitogen-aktivierte Proteinkinasen stehen im Vordergrund		69
5.1.1	Bedeutung von Angiotensin II und der NAD(P)H-Oxidase	69
5.1.2	Einfluss der extracellular signal-regulated kinases (ERK)	72
5.1.3	Funktion der p38 Mitogen-aktivierten Proteinkinase	74
5.2 Regulation des Zellzyklus und zellulärer Funktionen von VSMC unter dem Einfluss von GKLf, Id3 und ROS: Ein Schnittpunkt im Zentrum des p53-Netzwerks?		77
5.2.1	Zelluläre Regulationswege durch GKLf und andere Krüppel-Faktoren	77
5.2.2	Funktionen des Inhibitor of DNA-binding 3 in kardiovaskulären Zellen	79
5.2.3	GKLf und Id3 als Schnittpunkt redoxsensitiver Regulation in VSMC	81
5.3 Potentielle klinische Bedeutung der Ergebnisse und Ausblick		84
6	Literaturverzeichnis	86
7	Publikationen und Danksagung	103
8	Lebenslauf	104

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
c	centi (10^{-2})
ca.	circa
cDNA	copy DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
F	Farad
FeNTA	$\text{Fe}^{3+}\text{Cl}_3 \cdot \text{NTA}$
g	Gramm; Erdbeschleunigung (9.81 m/s^2)
GKLF	Gut-enriched Krüppel-like factor
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells / humane Endothelzellen
Id3	Inhibitor of DNA-binding 3
k	kilo (10^3)
l	Liter
m	milli (10^{-3}), Meter
M	Mol, molar
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
min	Minute(n)
mRNA	messenger RNA
n	Anzahl
OH^\bullet	Hydroxylradikal
$\text{O}_2^{\bullet-}$	Anionisches Superoxidradikal
NO^\bullet	Stickstoffmonoxidradikal
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
pH	negativer dekadischer Logarithmus d. H^+ -Ionenkonzentration
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
Rpm	rotations per minute – Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur, Reverse Transkription
s	Sekunde(n)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SP1	Specificity protein 1
ssDNA	Salmon Sperm DNA
u.	und
U	Units – Einheit der Enzymaktivität
V	Volt
vs.	versus
VSMC	Vascular smooth muscle cells / glatte Gefäßmuskelzellen
XO	Xanthinoxidase
z.B.	Zum Beispiel
μ	Mikro (10^{-6})

1 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit untersuchte die zur Regulation des Gut-enriched Krüppel-like factor (GKLF) und des Inhibitor of DNA-binding 3 (Id3) beitragenden Signaltransduktionswege nach Stimulation mit Hydroxylradikalen (OH^\bullet), Superoxidanionen ($\text{O}_2^{\bullet-}$) und Angiotensin II in kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC). Darüberhinaus wurden die Auswirkungen einer Überexpression oder Hemmung von GKLF und Id3 und eine mögliche Verbindung der transkriptionellen Regulationsmechanismen von GKLF und Id3 auf Proliferation und Apoptose der Zellen in Transfektionsexperimenten überprüft.

Stimulation mit OH^\bullet führte dosisabhängig zu einer Hochregulation von GKLF und einer Herabregulation von Id3. Superoxidanionen bewirkten dagegen eine dosiabhängige Heraufregulation von Id3.

Durch Koinkubation von VSMC mit reaktiven Sauerstoffspezies und Signaltransduktionsinhibitoren konnte gezeigt werden, dass die Regulation von GKLF durch OH^\bullet von der p38 Mitogen-aktivierten Proteinkinase, Kalziumionen und inhibitorischen G-Proteinen abhing. Für die hydroxylabhängige Herabregulation von Id3 fand sich ein vergleichbarer Signalweg.

Die Id3-Regulation durch $\text{O}_2^{\bullet-}$ konnte durch Blockade der ERK 1/2, p38 MAPK, zytoplasmatischen bzw. Rezeptortyrosinkinasen, $\text{G}_{i/o}$ -Proteinen, durch einen Kalziumchelator und durch Cholera toxin inhibiert werden.

Die Überexpression von GKLF führte zu einer reduzierten VSMC-Proliferation und zu einer deutlich erhöhten Apoptoserate. Die Hemmung von GKLF mit einem antisense-Konstrukt löste eine gesteigerte zelluläre Proliferation aus. Die Überexpression von Id3 bewirkte eine gesteigerte Proliferation, während die Unterdrückung dieses Faktors einen starken proapoptotischen Stimulus darstellte. GKLF und Id3 stellen somit in VSMC zentrale gegenläufige Regulatoren des zellulären Wachstums dar.

Weitere Experimente legten einen Zusammenhang zwischen der Regulation von GKLF und Id3 nahe. Die Verwendung eines pGL2-Id3-Promoter-Reporter-Konstrukts in Luciferase-Assays führte schließlich zu dem Erkenntnis, dass in Anwesenheit von GKLF die Aktivität des Id3-Promoters *in vitro* um fast 90% reduziert ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit erweitern das Wissen über die differentielle Regulation von GKLF und Id3 in VSMC und verdeutlichen die Bedeutung redoxsensitiver Mechanismen im kardiovaskulären System.

Differential regulation of the Gut-enriched Krueppel-like factor and the inhibitor of DNA-Binding 3 by reactive oxygen species as an example of redox sensitive signaling in vascular smooth muscle cells

The main issue of this study was the identification of the signaling pathways which govern the expression of Gut-enriched Krueppel-like factor (GKLF) and Inhibitor of DNA-binding 3 (Id3) following stimulation with hydroxyl radicals (OH^\bullet), superoxide anions ($\text{O}_2^{\bullet-}$) or Angiotensin II. Furthermore, a transfection model was used to examine the influence of GKLF and Id3 overexpression and suppression on cellular growth and apoptosis and to investigate a possible connection of the regulation of these factors on the transcriptional level.

Treatment of VSMC with OH^\bullet resulted in a dose-dependent upregulation of GKLF expression and downregulation of Id3 expression, correspondingly. Stimulation with superoxide anions which were generated by xanthine oxidase and purine or by Angiotensin II-mediated NAD(P)H-Oxidase activation, induced Id3 expression in a dose-dependent manner. Simultaneous treatment of VSMC with ROS and specific signal transduction inhibitors showed that the regulation of GKLF by OH^\bullet depended on the function of p38 mitogen-activated protein kinase, intracellular calcium and inhibitory G-Proteins. Id3 suppression by OH^\bullet was mediated by a comparable pathway. Id3 regulation by $\text{O}_2^{\bullet-}$ included ERK 1/2, p38 MAPK, cytoplasmatic and/or receptor tyrosine kinases, Calcium, $\text{G}_{i/o}$ proteins and $\text{G}_{s\alpha}$ proteins.

GKLF overexpression resulted in a reduced VSMC proliferation and increased apoptosis rate. The use of antisense constructs to suppress GKLF mRNA led to the increase of cellular proliferation. The overexpression of Id3 represented a proliferative stimulus, whereas the suppression of this factor conveyed a proapoptotic signal. These results point out, that GKLF and Id3 may be essential regulators of cellular growth processes in VSMC.

Further experiments pointed out a possible link between the mechanisms governing the regulation of GKLF and Id3. Luciferase assays using a pGL2-Id3-promoter-reporter-construct revealed a remarkable inhibition of Id3 promoter activity in the presence of GKLF.

The results of this study extend our current knowledge on the differential regulation of Id3 and GKLF and emphasize the importance of redox sensitive mechanisms in the cardiovascular system.

2 Einleitung

2.1 Endotheliale Dysfunktion und Atherosklerose

Die Atherosklerose ist als Erkrankung der Gefäßwände definiert, die sich morphologisch als plaqueförmige Verdickung und Verhärtung zeigt und durch die Zunahme fibrotischer Komponenten und Lipide in den betroffenen Arealen entsteht (ROSS, 1993; FAUCI et al., 1998; LUSIS 2000).

Epidemiologisch ist die Atherosklerose auf Grund ihrer Folgekrankheiten, insbesondere der koronaren Herzerkrankung, der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit und Komplikationen wie Myokardinfarkt und Schlaganfall die führende Todesursache in den westlichen Industrienationen (WHO-MONICA-PROJECT, 1994).

Ätiologisch gesehen handelt es sich um eine multifaktorielle Erkrankung, zu deren Manifestation verschiedene Risikofaktoren beitragen, darunter u.a. genetische Disposition, Alter, Rauchen, Diabetes Mellitus, arterielle Hypertonie, erhöhtes LDL-Cholesterin und erniedrigtes HDL-Cholesterin (SMITHIES & MAEDA, 1995; LIBBY, 1999).

Nach dem *response-to-injury*-Modell beginnt der pathogenetische Prozess mit der Endothelialen Dysfunktion. Diese zeichnet sich durch geänderte physiologische Eigenschaften des Endothels im Sinne einer Reduktion der endothelabhängigen Vasorelaxation aus (CAI & HARRISON, 2000).

In der Folge kommt es durch die Aufnahme von oxidierten Lipidpartikeln aus dem Plasma und Einwanderung von Monozyten zu einer Entzündungsreaktion. Diese initiale, als *fatty streak lesion* bezeichnete Läsion zeichnet sich durch die Ablagerung lipidbeladener Makrophagen (Schaumzellen) und verstärkte Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC) aus. Die eingewanderten VSMC bilden vermehrt extrazelluläre Matrix (ROSS, 1999). Im weiteren Verlauf entsteht eine fortgeschrittene atherosklerotische Läsion durch Ausbildung eines sich ins Gefäßlumen vorwölbenden Plaques, der unter einer fibrotischen Kappe einen lipidreichen Kern aus nekrotischen Schaumzellen enthält (LUSIS, 2000). Der Plaque wird zunehmend instabil und kann schließlich rupturieren. Die Freilegung thrombogener Oberflächen und Einengung der Gefäßlumens führt nach der Plaqueruptur zur Gefäßokklusion und durch die resultierende Organischämie beispielsweise zum Myokardinfarkt (ROSS, 1999).

Der Verlust der Kontrolle über das VSMC-Wachstum stellt einen entscheidenden Schritt in der Entstehung atherosklerotischer Läsionen dar und ist nach dem heutigen Kenntnisstand in besonderem Maße von der Einwirkung reaktiver Sauerstoffspezies abhängig (USHIO-FUKAI et al., 1998; IRANI, 2000).

2.2 Reaktive Sauerstoffspezies in biologischen Systemen

2.2.1 Klassifikation und allgemeine Eigenschaften von ROS

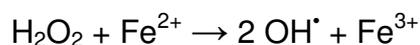
Sauerstoff und seine in allen aeroben Zellen produzierten Derivate bilden eine als reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bezeichnete Molekülfamilie (CAI & HARRISON, 2000).

Echte freie Radikale wie das Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$), das Hydroxylradikal (OH^{\cdot}) und das Stickstoffmonoxidradikal (NO^{\cdot}) zeichnen sich durch ein oder mehrere ungepaarte Elektronen aus und bilden eine eigene Gruppe von ROS. Sie sind zu unterscheiden von ROS wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Peroxynitrit ($ONOO^{\cdot}$) und hypochlorischer Säure ($HOCl$), die keine freien Elektronen besitzen (SHACKELFORD et al., 2000).

Als grundlegende Eigenschaft freier Radikale gilt, dass jede Reaktion dieser Moleküle mit anderen Molekülen wiederum freie Radikale hervorbringt. Diese Kettenreaktionen der sekundären Radikalbildung bedingen die biologische Wirksamkeit von ROS trotz ihrer kurzen Lebensdauer und werden nur beendet, wenn zwei freie Radikale aufeinandertreffen (BABIOR, 2000).

Superoxidanionen entstehen vor allem bei Autooxidationsvorgängen durch Elektronenreduktion aus molekularem Sauerstoff. Sie können jedoch auch von außen, beispielsweise durch Anionenkanäle (LI et al., 1997) oder Diffusion (GOMES et al., 1993), in die Zelle aufgenommen werden. $O_2^{\cdot-}$ ist selbst wenig reaktiv, trägt aber zur Bildung anderer Radikale bei (SHACKELFORD et al., 2000).

Eine weitere Elektronenreduktion von Sauerstoff führt zu H_2O_2 , welches als apolares, ungeladenes Molekül frei innerhalb und zwischen Zellen diffundieren kann und die stabilste Substanz in der genannten Gruppe darstellt (GRIENGLING & HARRISON, 1999). Es dient als Vorstufe zur Bildung von OH^{\cdot} , die überwiegend metallkatalysiert als sogenannte FENTON-Reaktion abläuft (STADTMAN, 1990; DUELL et al., 1995):



Das Hydroxylradikal ist mit einem Redoxpotential von über 1,35V extrem reaktiv und in seiner Wirkung auf biologische Moleküle nur durch die chemischen Grenzen der Diffusion und seine Kurzlebigkeit limitiert (HENSLEY et al., 2000; SHACKELFORD et al., 2000).

Das auch zu den reaktiven Stickstoffspezies (RNS) gezählte NO^{\cdot} ist ebenfalls reaktionsfreudig und bindet bevorzugt an O_2 , $O_2^{\cdot-}$ und Hämoproteine (MARNETT, 2000). Die Bindung an das Superoxidanion führt zur Bildung von Peroxynitrit ($ONOO^{\cdot}$), das ähnlich reaktiv wie OH^{\cdot} ist und vor allem für die Nitrosierung von Tyrosinresten verantwortlich gemacht wird (PRYOR & SQUADRITO, 1995).

2.2.2 Die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies im kardiovaskulären System

Das Herz-Kreislauf-System stellt eines der wichtigsten Felder der modernen Radikalforschung dar. Der bei traditionellen vaskulären Risikofaktoren verstärkt nachweisbare oxidative Stress konnte insbesondere mit der Pathogenese der Endothelialen Dysfunktion, Atherosklerose, ischämischen Herzerkrankung und Restenose nach Angioplastie in Verbindung gebracht werden (CAI & HARRISON, 2000; SHACKELFORD et al., 2000). Die Einwirkung reaktiver Sauerstoffspezies auf die Entstehung atherosklerotischer Läsionen beschränkt sich nicht nur auf die bereits intensiv erforschte Erzeugung von oxidierten LDL-Partikeln (CHISOLM & STEINBERG, 2000), sondern beeinflusst nach heutigem Kenntnisstand auch VSMC-Wachstum, -Migration, -Überleben, Endothelfunktion, Vasomotortonus, Adhäsionsmolekülexpression, Inflammation, *remodeling*-Prozesse u.v.m. (FUKAI et al., 1999; PATEL et al., 2000; MÜLLER et al., 2005). Ein Anstieg der vaskulären und myokardialen ROS-Produktion nach ischämischen Läsionen ist vielfach beobachtet worden (DE GROOT, 1994; BERK, 1999; DAS et al., 1999).

Für die Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies in Zellen und Geweben kommen eine Reihe potentieller Quellen in Frage, die im Folgenden beschrieben werden.

Die sequentiellen Redoxreaktionen der mitochondrialen Atmungskette transportieren Elektronen und reduzieren O_2 zu $O_2^{\cdot-}$, welches zu H_2O_2 weiter dismutieren kann (BERK, 1999). Die dadurch entstehende oxidative Belastung ist somit ein unvermeidbares Problem allen aeroben Lebens (MARNETT, 2000). Daneben tragen ionisierende und UV-Strahlung ebenfalls zur Bildung freier Radikale bei (SKOV, 1984). ROS entstehen jedoch nicht nur durch Atmung oder Umweltbedingungen, sondern insbesondere im kardiovaskulären System auch enzymatisch katalysiert. Auf die drei wichtigsten Enzymkomplexe wird im Anschluss näher eingegangen (siehe auch Abb. 2.1). Dies sind die vaskuläre NADH-/NADPH-Oxidase, die Xanthinoxidase und die entkoppelte endotheliale NO-Synthase (BERK, 1999; CAI & HARRISON, 2000).

In Gefäßen werden 90% der reaktiven Sauerstoffspezies von membran-assoziierten NADH-/NADPH-Oxidasen gebildet, deren Untereinheiten Homologien zu denen der im Rahmen der Abwehr von Mikroorganismen wichtigen NADPH-Oxidase in den Phagosomen von Leukozyten und Phagozyten besitzen (BABIOR, 1999). Diese Enzyme bilden nach einer Stimulation vorwiegend intrazellulär $O_2^{\cdot-}$ und in geringerem Ausmaß H_2O_2 . Inzwischen wurden eine Reihe von Aktivatoren der NAD(P)H-Oxidasen identifiziert, unter anderem Bradykinin (GREENE et al., 2000), $TNF\alpha$ (DE KEULENAER et

al., 1998), Thrombin (HOLLAND et al., 1998), PDGF (MARUMO et al., 1997) und Angiotensin II (GRIENGLING et al., 1994; ZAFARI et al., 1998).

Die zweite wichtige Quelle vaskulärer ROS-Produktion ist die Xanthinoxidoreduktase (XDH, XO), eine ubiquitäre molybdän- und eisenhaltige Oxidoreduktase, die während des Purinnucleotidabbaus die Reaktionen von Hypoxanthin zu Xanthin und von Xanthin zu Urat katalysiert. Dabei werden Superoxidanionen frei, die wiederum zu H_2O_2 umgewandelt werden können (CAI & HARRISON, 2000). In Endothelzellen wird dieses Enzym nicht gebildet, kann jedoch über Heparin-binding-sites aus der zellulären Umgebung aufgenommen werden (FUKUSHIMA et al., 1995). Die Xanthinoxidase kann, stimuliert durch die aktive NAD(P)H-Oxidase, besonders unter pathologischen Bedingungen vermehrt Superoxidradikale bilden (WASSMANN et al., 2004), was für die Hypercholesterinämie (OHARA et al., 1993), oszillatorischen Scherstress (MCNALLY et al., 2003), die chronische Herzinsuffizienz (LANDMESSER et al., 2002) und die KHK (SPIEKERMANN et al., 2003) beschrieben wurde. Die Hemmung der Xanthinoxidase mit Oxypurinol führt bei hypercholesterinämischen Patienten im Frühstadium der Arteriosklerose, Rauchern und Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz zu einer verbesserten Endothelfunktion (CARDILLO et al., 1997; FARQUHARSON et al., 2002; GUTHIKONDA et al., 2003;).

Die eNOS (NOS III) gehört zu den konstitutiven NO-Synthasen (HEVEL et al., 1991; MARLETTA, 1994). Sie produziert unter der Einwirkung verschiedener Kofaktoren wie Tetrahydrobiopterin aus L-Arginin NO als *second messenger*, der in der glatten Gefäßmuskulatur die lösliche Guanylatzyklase aktiviert (HEINZEL et al., 1992) und über cGMP zur Gefäßrelaxation führt (MURAD, 1994). Die Inaktivierung des vasoprotektiven Transmitters NO ist proatherogen und erfolgt rapide in der Gegenwart von $O_2^{\cdot-}$ unter der Bildung von $ONOO^-$ (PATEL et al., 2000). Bei Mangel von Substrat, Kofaktoren oder unter ROS-Einfluss kommt es zu einer Entkopplung der eNOS, die dann neben NO auch $O_2^{\cdot-}$ und H_2O_2 produziert und zum Peroxynitrit-Generator wird (VASQUEZ-VIVAR et al., 1998; CAI & HARRISON, 2000; LANDMESSER et al., 2003). Dieses „uncoupling“ begünstigt kardiovaskuläre Erkrankungen also zum einen durch den Wegfall der vasodilatierenden Wirkung von NO, zum anderen aber auch durch die aktive Bildung schädlicher Radikalspezies.

Weitere lösliche Enzyme, die zur oxidativen Belastung der Zelle beitragen, sind die Cytochrom P450-/ Cyclo- und Lipooxygenasen (KLONER et al., 1989; IRANI, 2000).

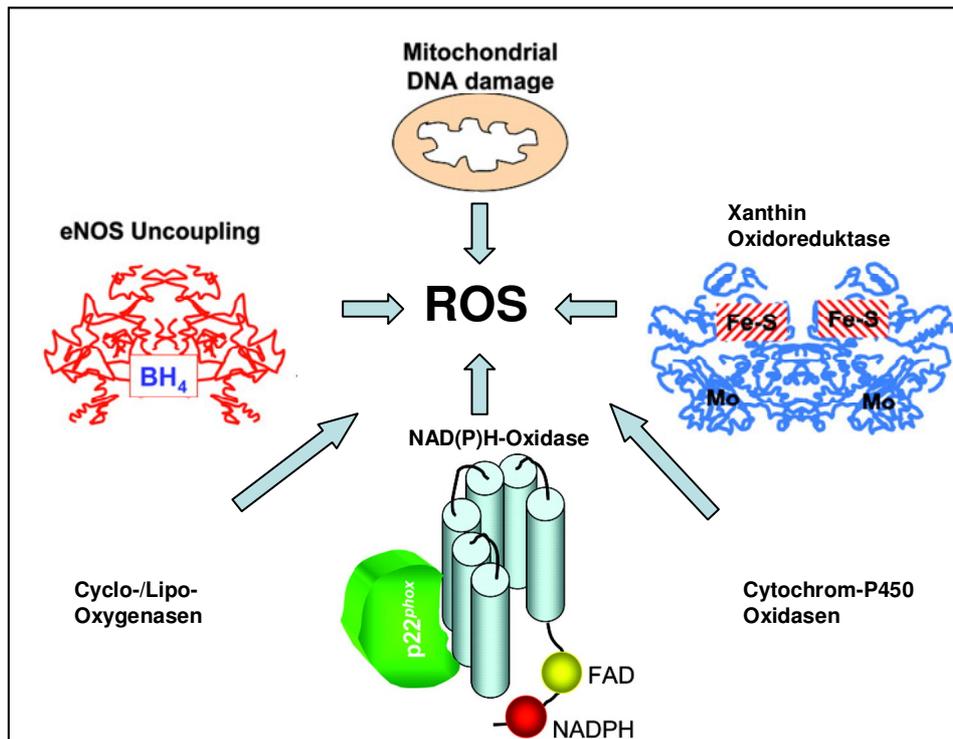
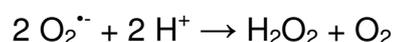


Abb. 2.1 Entstehungsmechanismen für ROS (nach Müller et al., 2005)

2.2.3 Abbaumechanismen für reaktive Sauerstoffspezies

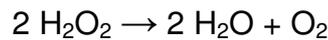
Um die Schädigung von zellulären Komponenten durch reaktive Sauerstoffspezies zu verhindern, haben sich verschiedene antioxidative Mechanismen entwickelt, die man grob in non-enzymatische und in enzymatische Radikalfänger (*Scavenger*) unterteilt (siehe Tab. 2.1). Zu den nicht enzymgebundenen Radikalscavengern zählen unter anderem die Vitamine Ascorbinsäure, β -Carotin sowie α -Tocopherol. Diese Stoffe können ROS binden und die radikalbildenden Kettenreaktionen verhindern (STAHL & SIES, 1997).

Die Superoxiddismutasen (SOD) sind die wichtigsten enzymatischen Radikalfänger. Man differenziert zwischen einer mitochondrialen SOD, die Mangan enthält (SOD-2, Mn-SOD) einer cytosolischen kupfer- und zinkhaltigen SOD (SOD-1, Cu/Zn-SOD) sowie einer zu 99% im Extrazellularraum befindlichen EC-SOD (SOD-3), die ebenfalls Kupfer- und Zinkatome enthält. In der Gefäßwand wird die EC-SOD von VSMC gebildet, sekretiert und dann an Glykosaminoglykane in der extrazellulären Matrix gebunden (WASSMANN et al., 2004). Die genannten Enzyme katalysieren die Dismutation von Superoxidanionen zu H_2O_2 (SIES, 1993):



Durch die effektive Kontrolle der basalen $O_2^{\cdot-}$ -Konzentration werden von der Tätigkeit der SOD die Spiegel von H_2O_2 , NO^{\cdot} und $ONOO^-$ mitbestimmt (PATEL et al., 2000). In gewisser Weise muß NO^{\cdot} auf Grund seiner hohen chemischen Affinität zu $O_2^{\cdot-}$ neben den Superoxiddismutasen ebenfalls als wichtiger Scavenger in der Gefäßwand genannt werden (MÜLLER et al., 2005).

Im aktiven Zentrum der aus vier Untereinheiten bestehenden Catalase sind zwei Fe^{3+} -Protoporphyringruppen gebunden. Dieses in praktisch allen Zellen vorkommende und überwiegend peroxisomal lokalisierte Enzym inaktiviert das bei Oxidationsvorgängen gebildete Wasserstoffperoxid (CHANCE et al., 1979):



Mit dem Glutathionperoxidase- und dem Thioredoxinreduktasesystem, die als Reduktionsmittel Glutathion (GSH) bzw. Thioredoxin (TRX) verwenden, finden sich weitere ubiquitär angelegte Radikalfängerkomplexe, die verschiedene ROS entgiften können und dabei Thiolgruppen verbrauchen, welche im Anschluss NADPH-abhängig wieder regeneriert werden (HENSLEY et al., 2000; NORDBERG & ARNES, 2001).

Die beschriebenen Scavenger-Mechanismen werden in Abbildung 2.2 dargestellt:

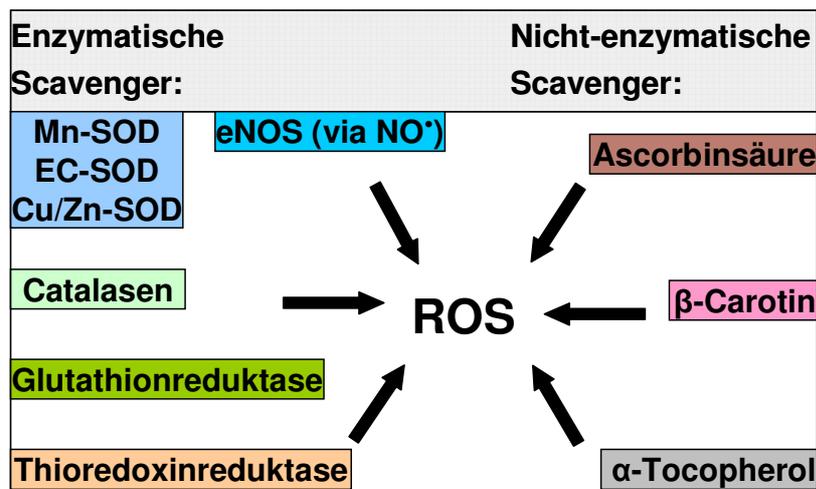


Abb. 2.2 Mechanismen zur Elimination von reaktiven Sauerstoffspezies

2.2.4 Divergierende Wirkungen von ROS – Ein dosisabhängiger Effekt

Wenn die antioxidative Abwehr infolge exzessiver ROS-Produktion überwunden wird, entsteht oxidativer Stress, der sich in der Oxidation biologischer Moleküle äußert (DREHER & JUNOD, 1995; CAI & HARRISON, 2000; ZALBA et al., 2000).

Reaktive Sauerstoffspezies und vor allem OH^{\cdot} führen zur Schädigung der zellulären Erbinformation. Dieser genotoxische Einfluss bezieht sich im Wesentlichen auf die

Erzeugung von DNA-Strangbrüchen (INOUE et al., 1987; HALLIWELL & ARUOMA, 1991; DUELL et al., 1995), Beschädigung des Desoxyribose-Gerüsts (MARNETT, 2000) und diverse Basenmodifikationen (SHACKELFORD et al., 2000).

Daneben werden bevorzugt die Fettsäuren der Membranphospholipide oxidiert (MELLO FILHO & MENEGHINI, 1985; MIN et al., 1999). Die entstehenden Lipid-Peroxyradikale durchlaufen Kettenreaktionen in der Zellmembran, deren Endprodukte zytotoxische und mutagene Eigenschaften haben können (HERBST et al., 1999).

Eine Oxidation zellulärer Proteine betrifft vorrangig die Sulfhydrylgruppen von Cysteinresten und kann über eine Konformationsänderung sowohl zu Funktionsgewinn als auch -einbuße dieser Moleküle führen (ALLEN & TRESINI, 2000).

ROS führen somit nach dem traditionellen Modell der stochastischen Zellschädigung als Begleiterscheinung des aeroben Metabolismus durch ihre hohe Reaktivität direkt oder indirekt zu genomischer Instabilität und zellulärer Dysfunktion (DART & SANDERS, 1988; HALLIWELL, 1991; HENSLEY et al., 2000; SHACKELFORD et al., 2000).

Zellen besitzen jedoch die Fähigkeit, ROS kontrolliert zu bilden und gezielt als biologische Stimuli einzusetzen (ALLEN & TRESINI, 2000).

Es ist mittlerweile bekannt, dass ROS in viele wesentliche zelluläre Signalwege, Prozesse und Ereignisse modulierend eingreifen. Dazu zählen unter anderen die Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Transformation, Seneszenz, und Stressantwort als wichtigste Einflussbereiche von ROS (LANDER, 1997; FINKEL, 1999; MATES et al., 1999; ALLEN & TRESINI, 2000; HENSLEY et al., 2000).

Eine der wesentlichen Wirkungen von ROS ist die Vermittlung und Verstärkung zur Zellproliferation führender mitogener Signale. Die Einwirkung von Zytokinen oder Wachstumsfaktoren verursacht eine deutliche Zunahme der intrazellulären ROS-Ausschüttung, die zur vermehrten Bildung von Lipidmediatoren und Freisetzung von Calcium führt. Die Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels aktiviert Proteinkinasen, die mitogene *second messenger* wie cAMP produzieren (SUZUKI et al., 1997; BERK, 1999; MASUTANI, 2000).

Das zweite wichtige Element ist die reversible Hemmung von Proteinphosphatasen, die eine verlängerte Phosphorylierung von Tyrosin- und Serin-/Threoninresten in (Rezeptor-) Tyrosinkinasen und Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) bewirkt (PUMIGALIA et al., 1992; FINKEL, 2000; HENSLEY et al., 2000).

Daneben ist die Protoonkogenaktivierung durch ROS von grundlegender Bedeutung, die im Fall des antiapoptotischen Transkriptionsfaktors NFκB unter anderem über die

verstärkte Degradation des inhibitorischen Faktors I κ B abläuft (BAAS & BERK, 1995; SPEIR et al., 1996; ALLEN & TRESINI, 2000).

Das Paradoxon zwischen Schaden und Nutzen von ROS für Zellen, Gewebe und den Organismus wird nur aufgeklärt, wenn eine genaue Differenzierung zwischen Radikalspezies, Zelltyp, Zeitpunkt der Einwirkung und vor allem Amplitude der ROS-Produktion in Relation zur Ausstattung mit Antioxidantien erfolgt (IRANI, 2000). So führen exogene Radikale in toxischer Dosierung zur Apoptose (JOHNSON et al., 1996), während subtoxisch konzentrierte und endogene ROS eher Wachstumsarrest oder auch Wachstumsmodulation bewirken können (BERK, 1999; MATES et al., 1999; SHACKELFORD et al., 2000).

2.2.5 Wirkung von ROS als Signalmoleküle im kardiovaskulären System

ROS haben vielfältige Wirkungen auf Signalprozesse und können wie bereits erwähnt auch in kardiovaskulären Zellen Wachstum und Apoptose über die Beeinflussung des Ca²⁺-Spiegels, der Proteinphosphataseaktivität und der Protoonkogenexpression steuern (BAAS & BERK, 1995). Durch die oben beschriebenen ROS-Generatoren und die vielfältigen antioxidativen Mechanismen findet sich in diesem System eine besonders fein abgestimmte Redoxregulation, da bestimmte ROS wie z.B. NO[•] für die normalen Zellfunktionen erforderlich sind und erst pathologische Stimuli zu oxidativem Stress, Dysbalance und kardiovaskulären Erkrankungen führen (WASSMANN et al., 2004).

O₂^{•-} und sein Dismutationsprodukt H₂O₂ werden als Signalmoleküle angesehen, da diese eine funktionelle Verbindung zwischen der Wachstumsfaktor-induzierten ROS-Ausschüttung und der nachfolgenden differentiellen Regulation intrazellulärer Signalwege herstellen (USHIO-FUKAI et al., 1998). Es wurde gezeigt, dass Superoxidanionen zu einer Stimulation der *Extracellular-Signal-Regulated*-Kinasen (ERK 1/2, p42/44-MAPK) führen, welche die Proliferation anregen (RAO & BERK, 1992; BAAS & BERK, 1995; LIAO et al., 2000). H₂O₂ induziert im Gegensatz dazu vorwiegend die redox-sensitive p38-MAPK, wobei je nach Dosis und Dauer der Einwirkung Proliferation, Wachstumsarrest oder Apoptose der Zellen resultiert (LI et al., 1997; GRIENDLING & HARRISON, 1999; IRANI, 2000). Darüber hinaus involvieren die von H₂O₂ beeinflussten Signalwege eine Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase, von Phospholipasen, Tyrosinkinasen, der Proteinkinasen A und C, aller anderen MAPK (GRIENDLING & USHIO-FUKAI, 1998) und eine Beeinflussung der Expression zahlreicher Gene (ALLEN & TRESINI, 2000).

2.3 Steuerung der Proliferation durch den Zellzyklus

2.3.1 Das Zusammenspiel von CDKs und CDK-Inhibitoren im Zellzyklus

Der Teilungszyklus eukaryotischer Zellen setzt sich nach erfolgter Mitose aus der Gap1- (G1-) Phase, der Synthese- (S-) Phase und der Gap2- (G2-) Phase zusammen (ALBERTS et al., 1994), wie in Abb. 2.3 schematisch gezeigt wird.

Das heute gültige Konzept des Zellteilungszyklus geht von einer ständigen engmaschigen Steuerung der einzelnen Phasen durch ein übergeordnetes Kontrollsystem aus, das mit dem restlichen intrazellulären Signalkontext in Verbindung steht und je nachdem die Zellzyklustransitionen initiiert (WEINBERG, 1996).

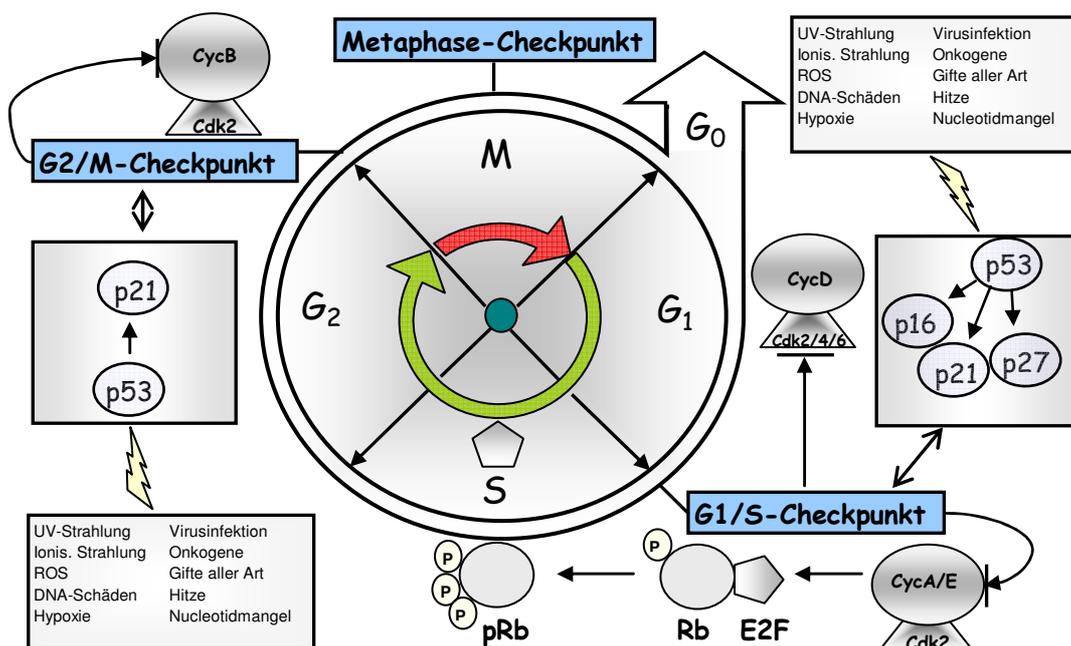


Abbildung 2.3 Schema des Zellzyklus und verschiedener Einflussfaktoren

M – Mitosephase, G₀/1/2 – Gap 0/1/2, S – Synthesephase; CycA/B/D/E – Zykline; Cdk 2/4/6 – Zyklin-abhängige Kinasen; p16/p21/p27/p53 – Inhibitoren der Zyklin-abhängigen Kinasen; Rb – Retinoblastomprotein, pRb – hyperphosphorylierte Form von Rb; E2F – Transkriptionsfaktor.

Bei diesem System handelt es sich um die evolutiv hoch konservierten Zykline (Cyc A-H) und ihre Interaktionspartner, die Zyklin-abhängigen Kinasen (Cdk's). Bestimmte Zykline sind durch zeitlich genau gesteuerte Gentranskription und fein abgestimmten Ubiquitin-medierten Abbau zu bestimmten Phasen des Zellzyklus besonders aktiv.

Am G₂/M-Übergang wirkt vor allem der CycB-Cdk2-Komplex, welcher auch als mitosepromovierender Faktor (MPF) bezeichnet wird (HARTWELL & KASTAN, 1994). Der zentrale Kontrollpunkt ist jedoch der G₁/S-Übergang, an dem Komplexe aus D-Zyklinen mit Cdk 2, 4, 5 oder 6 tätig sind (SHERR, 1995; SHACKELFORD et al., 2000).

Diese Heterodimere phosphorylieren das Retinoblastomgenprodukt pRb, welches im hypophosphorylierten Zustand für die S-Phase benötigte Transkriptionsfaktoren wie E2F bindet. Nachdem der Kontrollpunkt passiert ist, kommt es zur Hyperphosphorylierung von pRb durch den CycE-Cdk2-Komplex, Abspaltung der gebundenen TF und Einleitung der S-Phase (CHELLAPPAN et al., 1991; HARPER, 1993; WEINBERG, 1995).

Der komplex regulierte G1/S-Checkpunkt steht unter dem Einfluss der sogenannten Cdk-Inhibitoren, von denen p53 als der bekannteste Tumorsuppressor im Zentrum einer Kontrollmaschinerie steht, die auf eine Vielzahl zellschädigender Signale hin aktiviert werden kann. Zu diesen zählen eine Reihe zellulärer Stressoren wie Hypoxie, Hitze, Nukleotiddepletion, ionisierende oder UV-Strahlung, Einwirkung biologischer oder chemischer Gifte, Virusinfektion und reaktive Sauerstoffspezies (ZHAN et al., 1993; GRAEBER et al., 1994; NELSON & KASTAN, 1994; LEVINE, 1997; AGARWAL, 1998; EL-DEIRY, 1998). Die Schädigung der Erbinformation wird von p53 wahrscheinlich nicht selbst, sondern über die ATM- (*Ataxia teleangiectatica* mutated), und Chk-Kinasen wahrgenommen (VOGELSTEIN et al., 2000). In der Folge führen eine Azetylierung und andere Mechanismen zu einer posttranslationalen Stabilisierung und dadurch zur Verlängerung der Halbwertszeit des p53-Proteins (MAKI & HOWLEY, 1997; VOGELSTEIN et al., 2000). Weiterhin wird die Aktivität von p53 durch Phosphorylierung und Bindung an regulatorische Proteine gesteigert (AGARWAL, 1998). Das p53-Phosphoprotein erfüllt seine Hauptaufgabe, die Weitergabe geschädigter DNA zu verhindern, hauptsächlich durch seine Eigenschaft als Transkriptionsfaktor und die Aktivierung der sogenannten p53-response-Gene, zu denen u.a. Bax, GADD45, IGF-BP3, 14-3-3 σ und MDM2 gehören (KO & PRIVES, 1996; LEVINE, 1997).

Das am besten erforschte von p53 transaktivierte Gen kodiert für den Cdk-Inhibitor p21, der auch als wild type p53 activated fragment (WAF1), cdk-inhibiting protein 1 (CIP1) oder cdk associated protein (CAP20) bezeichnet wurde. Dieses Protein assoziiert mit einer Vielzahl von Zyklin-Cdk-Komplexen und reguliert deren Aktivität (EL-DEIRY et al., 1993; HARPER et al., 1993; CHEN et al., 1996). Dadurch wird vor allem die Kinasetätigkeit der Cdk's am G1/S-Checkpunkt, die zur Hyperphosphorylierung von pRb und E2F-Freisetzung führt, unterbunden (GU et al., 1993). Weitere mit p21 verwandte Cdk-Inhibitoren sind p16^{INK4} und p27^{KIP1} (HUNTER, 1993; SHERR & ROBERTS, 1995; TANNER et al., 2000).

Zumindest p21 und p27 können durch Mitogene und TGF β auch p53-unabhängig aktiviert werden und übernehmen dann z.B. Aufgaben bei der Regulation der terminalen Differenzierung und Zellalterung (MICHIELI et al., 1994; MACLEOD et al., 1995).

Durch das Zusammenwirken von p53 und den von ihm aktivierten Faktoren wird der Zellzyklus sehr effektiv kontrolliert. Am G2/M-Kontrollpunkt werden die Unversehrtheit der replizierten DNA und die Intaktheit des mechanischen Mitosespindel-/Zentrosomenapparates überprüft. Die Aktivierung von p53 führt durch die Funktion der Cdk-Inhibitoren wie oben beschrieben zu einem unweigerlichen Wachstumsarrest. Dieser dauert so lange, bis der DNA-Schaden entweder behoben ist oder die Apoptose der Zelle eingeleitet wird (LEVINE, 1997).

Veränderungen des p53-Netzwerkes bilden die Grundlage von Erkrankungen wie *Ataxia teleangiectatica*, FANCONI-Anämie und BLOOM-Syndrom (AGARWAL, 1998). Noch zentraler ist die Rolle von p53 als Tumorsuppressorprotein, da p53 in 50% der humanen Tumoren deletiert oder funktionslos und in den verbleibenden 50% eine der anderen zentralen Komponenten der p53-Maschinerie mutiert ist (AGARWAL, 1998).

Diese Entkopplung des Zellzyklus stellt den entscheidenden Schritt für eine maligne Entartung des zellulären Wachstums dar und ist beispielsweise auch durch die Mutation von Zyklin D1 (LOVEC et al., 1994) und E2F (SINGH et al., 1994) möglich. Aber auch für die Pathogenese von vaskulären Erkrankungen wird eine Beteiligung von p53 vermutet (GENG 1997). Es wurde herausgefunden, dass p53 vor allem in instabilen atherosklerotischen Plaques nachgewiesen werden kann (LAVEZZI et al., 2003). Darüber hinaus führt der adenovirale Transfer von p53 in Plaques in Apolipoprotein E^{-/-}-Mäusen zur Induktion einer Plaqueruptur (VON DER THUSEN et al., 2002).

Es ist bekannt, dass die p53-Aktivität vom intrazellulären Redoxstatus beeinflusst wird (SHACKELFORD et al., 2000) und p53 selbst die ROS-Ausschüttung in der Zelle gezielt erhöht, um die Apoptose einzuleiten (JOHNSON et al., 1996; HAINAUT & MANN, 2001).

2.3.2 Der Einfluss von Krueppel-Faktoren auf die Gentranskription

Der Ablauf des Zellzyklus in Eukaryonten unterliegt der Steuerung und Kontrolle durch eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren (TF) und ihre Koaktivatoren bzw. Korepressoren. Die Klassifikation dieser TF bezieht sich auf das DNA-Bindungsmotiv, wobei die Zinkfingerproteine, die basischen Helix-Loop-Helix-Proteine und die Leuzin-Zipper-Proteine die drei wichtigsten Gruppen darstellen (ALBERTS et al., 1994).

Prinzipiell werden in Zinkfinger-TF mehrere fingerförmige Domänen durch Zinkatome stabilisiert, die von vier bestimmten Aminosäureresten tetraederförmig koordiniert werden (SHIELDS et al., 1996). Eine Untergruppe der Zinkfingertranskriptionsfaktoren enthält strukturelle Homologien zu dem Segmentierungsprotein Krüppel in *Drosophila*

melanogaster (SCHUH et al., 1986). In diesen sogenannten Krüppel-like factors (KLF) finden sich 3 carboxyterminale Tandem-Zinkfinger, in denen die Zn^{2+} -Atome durch 2 Cystein- und 2 Histidinreste cheliiert werden (TURNER & CROSSLEY, 1999), wie in Abbildung 2.4 dargestellt:

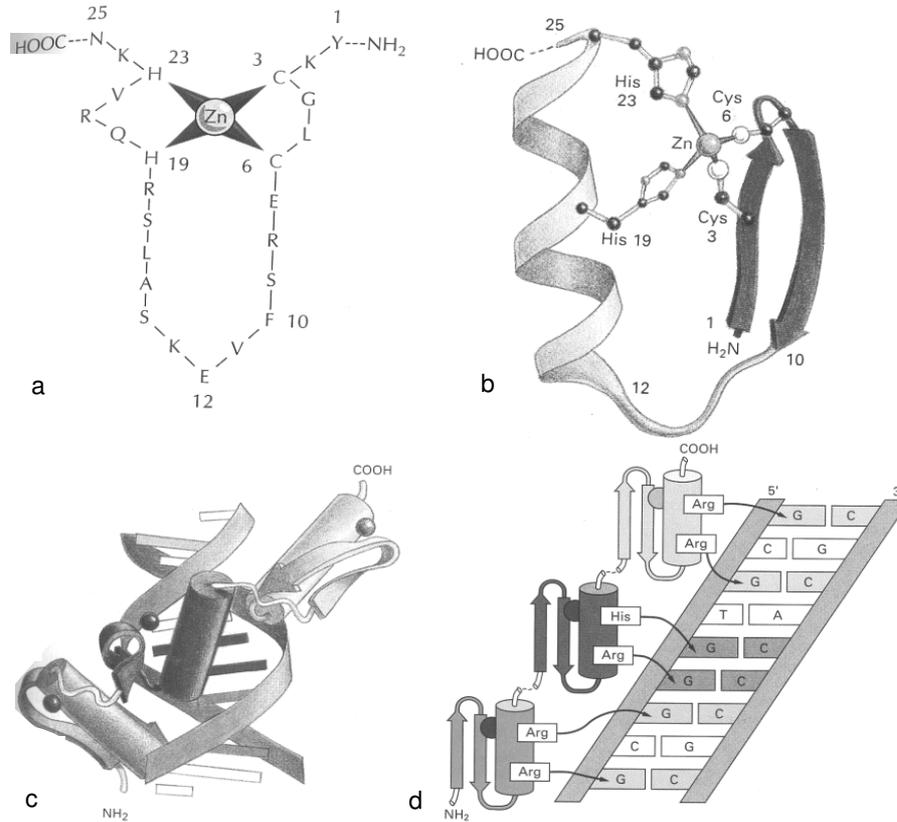


Abbildung 2.4 Der Carboxyterminus eines Krüppel-like factors

a) Schematische Darstellung der Primärstruktur des Zinkfingers; b) Dreidimensionale Struktur des Cys₂His₂-Zinkfingers – 2 antiparallele β-Faltblätter und eine α-Helix werden über ein Zn^{2+} -Atom räumlich koordiniert; c) Dreidimensionale Darstellung des Carboxyterminus mit 3 Zinkfingern bei der Anlagerung an die DNA; d) Schematische Darstellung der Bindung einer spezifischen GC-reichen DNA-Sequenz durch die Zinkfinger (aus: ALBERTS et al., 1994)

Die bislang 16 bekannten humanen KLF sind mit dem ubiquitär exprimierten Faktor SP1 (KADONAGA et al., 1987) verwandt und werden auch als SP1-like TF bezeichnet, da sie zum Teil an CACCC-Boxen, die Erkennungssequenz für SP1, binden können (VAN VLIET et al., 2000). Der mit KLF1 bezeichnete TF ist EKLF, der 1993 von MILLER und BIEKER aus erythroiden Blutzellen isoliert wurde. Dieses Protein bindet an die CACCC-Box des β-Globingens und wird zur normalen Hämoglobinproduktion benötigt (PERKINS 1999; TURNER & CROSSLEY 1999; BIEKER 2001).

Der Gut-enriched Krüppel-like-factor (GKLF)/ Epithelial zinc finger protein (EZFP)/ KLF4 ist der neben EKLF am besten untersuchte KLF und wurde von SHIELDS et al. 1996 als der den zellulären Wachstumsarrest in Darmepithelien regulierende Faktor isoliert.

Mittlerweile ist die GKLf-Expression auch in der Epidermis, den Schleimhäuten des restlichen Gastrointestinaltraktes (GARRET-SINHA et al., 1996), den männlichen Keimdrüsen, sowie im Thymus (PANIGADA et al., 1999), im Gefäßendothel (YET et al., 1998) und in vaskulären glatten Gefäßmuskelzellen (ADAM et al., 2000) nachgewiesen worden. Der Einfluss dieses Transkriptionsfaktors auf Proliferation und Differenzierung wurde allerdings am erfolgreichsten in Kolonepithelzellen und daraus abgeleiteten Tumorzellreihen erforscht. GKLf findet sich vor allem entfernt von den basalen proliferierenden Kryptenepithelien in den apikalen differenzierten Villuszellen (SHIELDS et al., 1996). Das Protein ist auf Grund potenter Kernlokalisierungssignale im Zellkern zu finden (GARRET-SINHA et al., 1996; SHIELDS & YANG, 1997). Als pleiotroper TF besitzt GKLf eine N-terminale Aktivierungsdomäne und eine im Zinkfingerbereich liegende Repressionsdomäne (GEIMAN et al., 2000). Die Bindung erfolgt an der Konsensussequenz 5'-G^G/A^G/A^GGG^C/T^G^C/T-3' (SHIELDS & YANG, 1998).

Über eine Suppression des Cyclin D1-Promoters (SHIE et al., 2000) und die mit p53 synergistische rapide Aktivierung des p21-Promoters nach ungezielter DNA-Schädigung (ZHANG et al., 2000) wirkt GKLf in Darmepithelien als wichtiger negativer Regulator des G1/S-Checkpunktes und führt proliferierende Zellen in einen Wachstumsarrest (CHEN et al., 2001; YOON et al., 2002). Darüberhinaus konnte GKLf als Tumorsuppressorgen in Kolon- und Ösophagusepithelien etabliert werden, da seine Herabregulation zu Hyperproliferation und vermehrter maligner Transformation (TON-THAT et al., 1997; LUO et al., 2004) und eine Hochregulation durch IFN γ zur Tumorzellapoptose führt (CHEN et al., 2000). Ferner konnte die Bedeutung von GKLf bei der Kontrolle des G2/M-Checkpunktes gezeigt werden (YOON & YANG, 2004).

Inzwischen wurden komplexe positive und negative Interaktionen mit anderen KLF wie mit IKLF/KLF5 im Darmepithel (DANG et al., 2002) und eine enge Verknüpfung mit Koaktivatorproteinen wie p300/CBP und den Histondeacetylasen HDAC 1 und 2 (GEIMAN et al., 2000; NOTI et al., 2005) nachgewiesen.

Auch die Differenzierung epidermaler Gewebe wird von GKLf ermöglicht, da ohne diesen Faktor der kurz vor der Geburt von epidermal differenzierten Epithelien gebildete Proteolipid-Schutzmantel der Haut gänzlich fehlt, was zum Tod von KLF4^{-/-}-Knockout-Mäusen führt (JENKINS et al., 1998; SEGRE et al., 1999).

Diese beispielhaft angeführten Befunde zeigen, dass GKLf in verschiedenen embryonalen und adulten Geweben wichtige Differenzierungswege steuert und durch die zentrale Stellung als Zellzyklusregulator und Mitglied des p53-Netzwerkes von

Tumorsuppressoren auch für die Kontrolle der Proliferation bzw. für die Ermöglichung von Reparaturvorgängen nach Einwirkung exogener Noxen essentiell ist.

Die Tatsache, dass GCLF in wachstumsarretierten Zellen am höchsten exprimiert ist, im gesunden Gefäß in vivo fast nicht nachgewiesen werden kann und in Scherstress ausgesetzten vaskulären Zellen wiederum eine gesteigerte Expression zeigt, legt eine Bedeutung dieses Faktors für kardiovaskuläre Erkrankungen nahe (McCORMICK et al., 2001; SUZUKI et al., 2005; vgl. Kap. 2.3.4). Für andere KLF wie 2, 5 und 6 konnte gezeigt werden, dass sie entweder bei der embryonalen Angiogenese oder der Neointimaformation nach vaskulären Verletzungen eine Rolle spielen (SUZUKI et al., 2005).

2.3.3 Die Inaktivierung von Transkriptionsfaktoren durch Id-Proteine

Im Folgenden soll auf ein anderes Netzwerk von Transkriptionsfaktoren eingegangen werden, das aus ubiquitär exprimierten und gewebespezifischen Faktoren besteht und in vielen Geweben in Proliferation und Differenzierung eingreift.

Es handelt sich dabei um das System der basic helix-loop-helix- (bHLH-) Proteine, das zunächst in hämatopoetischen Zellen charakterisiert wurde (LANGLANDS et al., 1997). Die dort gefundenen E-Proteine binden in Enhancer-Elementen der Immunglobulingene an so genannten E-Boxen mit der Konsensussequenz CA-NN-TG (BLACKWELL et al., 1990). Erst später wurde herausgefunden, dass diese Faktoren Teil eines viel weiter reichenden multifunktionalen Netzwerks sind. Man unterscheidet mittlerweile zwischen den ubiquitären Klasse A E-Proteinen (E2-2, die E2A-Genprodukte E12 und E47, HEB) und den gewebespezifischen Klasse B bHLH-Proteinen. Letztere steuern als myogenic regulatory factors (MRF, z.B. MyoD, myf-5, MRF4/myf-6 und Myogenin) beispielsweise die Differenzierung myogener Stammzellen zu Muskelzellen (PETROPOULOS & SKERJANC, 2000). Daneben spielen bHLH-Transkriptionsfaktoren in der Hämatopoese, neuronalen Differenzierung, pankreatischen Insulingenexpression sowie in der Embryonalentwicklung eine Rolle (LANGLANDS et al., 1997).

Das gemeinsame Funktionsprinzip der bHLH-Proteine beruht auf der evolutiv hochkonservierten N-terminalen Dimerisierungsdomäne. Diese besteht aus zwei von einem *Spacer loop* getrennten α -Helices und ermöglicht die Bildung funktionsfähiger Homo- und Heterodimere, welche durch hydrophobe und elektrostatische Wechselwirkungen stabilisiert werden und eine komplette DNA-Bindungsdomäne besitzen (MURRE et al., 1989; BENEZRA et al., 1990). Je nach den am Dimer beteiligten

bHLH-Faktoren ergeben sich Bindungspräferenzen für bestimmte Enhancer oder Promoter (LANGLANDS et al., 1997). Am Carboxyterminus befinden sich Phosphorylierungsstellen, die eine Modulation der Bindung durch verschiedene Kinasen erlauben (CHU & KOHTZ, 2000; NEUFELD et al., 2000).

Inhibitor of DNA-binding- (Id-) Proteine sind die dominant negativen Regulatoren des bHLH-Systems. Diese Proteine vermissen die N-terminale basische DNA-Bindungsdomäne und bilden bevorzugt mit den E-Proteinen Dimere, die die ursprüngliche Funktion nicht mehr ausüben können (NORTON et al., 1998). Durch die Sequestrierung von bHLH-Faktoren wirken Id-Proteine hemmend auf Differenzierungswege verschiedener Gewebe (LANGLANDS et al., 1997). Die in terminal differenzierten Geweben normalerweise niedrigen ID-Spiegel werden durch die Einwirkung von Mitogenen stark stimuliert (BENEZRA et al., 1990; CHRISTY et al., 1991; LOVEYS et al., 1996; NORTON & ATHERTON, 1998).

Mittlerweile ist gesichert, dass das bHLH-Netzwerk und die Id-Proteine als seine Regulatoren auch direkt in die Zellzyklusmaschinerie eingebunden sind. So besitzt das für p21 kodierende Gen im Promoterbereich 3 E-Boxen, die der bHLH-Bindung dienen, wodurch das p21-Gen p53-unabhängig aktiviert werden kann (PARKER et al., 1995; PRABHU et al., 1997; PURI et al., 1997). Die Konsequenz einer Hemmung dieser Wirkung ist ein beschleunigter G1/S-Übergang und damit verstärkte Proliferation (NORTON & ATHERTON, 1998). Auch eine direkte Interaktion von Id-Proteinen mit den Faktoren der Retinoblastomproteinfamilie sowie die Regulation der Aktivität von Id3 über eine C-terminale Phosphorylierung von Id3, z.B. durch verschiedene Cdk's, sind bekannt (NORTON & ATHERTON, 1998; FORREST et al., 2004¹). Die genauen Modalitäten der Zellzyklusbeschleunigung durch Id-Proteine sind also wahrscheinlich nicht nur durch die Sequestrierung von bHLH-Proteinen zu erklären, sondern auch auf ihre zusätzlichen Funktionen zurückzuführen. Beispiele hierfür sind die Möglichkeit einer Zellimmortalisierung bzw. Einleitung der Apoptose bei Überexpression von Id3 unter bestimmten Umständen und der Einfluss von ROS auf diese Prozesse (NORTON & ATHERTON, 1998; TANAKA et al., 1998).

Auf Grund der durch Id3 ausgelösten Dedifferenzierung und Anregung der Proliferation ist auf Grund der Vergleichbarkeit der pathogenetischen Vorgänge auch eine Beteiligung dieses Faktors an kardiovaskulären Erkrankungen wahrscheinlich, da diese meist mit einer Dysregulation des Wachstums und der Differenzierung von Gefäßzellen einhergehen (siehe auch Kap. 2.3.4). In Experimenten mit Knockout-Mäusen konnte gezeigt werden, dass ein komplettes Fehlen von Id1 und Id3 zu einer gestörten

Neurogenese und Angiogenese mit der Folge einer letalen intrazerebralen Hämorrhagie führt. Ist nur eines der vier Allele vorhanden, wird bemerkenswerterweise eine stark reduzierte Tumorangio-genese beobachtet (LYDEN et al., 1999).

2.3.4 Die Bedeutung von GKLf und Id3 im kardiovaskulären System

In einem Knockdown-Modell für Id1 und Id3 mittels small hair pin-RNA in HUVEC wurde gezeigt, dass diese Proteine für die Steigerung der Proliferation und die Aktivierung der Endothelzellen durch den Vascular endothelial growth factor (VEGF) benötigt werden (SAKURAI et al., 2004). Erhöhte Id3-Spiegel können in frühen atherosklerotischen Läsionen in VSMC nachgewiesen werden, einhergehend mit stark erhöhten Proliferationsindices. Im Rahmen der weiteren Atherogenese kommt es zu einer posttranskriptionellen Regulation im Sinne eines alternativen Splice-Mechanismus, so dass sich in späten atherosklerotischen Läsionen eine inaktive Form von Id3, bezeichnet als Id3a, findet (MATSUMURA et al., 2001; FORREST et al., 2004²). Das Vorhandensein dieses Kompensationsmechanismus weist auf eine mögliche pathogenetische Rolle von Id3 bei Erkrankungen mit erhöhter VSMC-Proliferation hin. Nach einer Stimulation mit dem Platelet-derived growth factor (PDGF) wird GKLf in VSMC hochreguliert und konnte als bedeutsamer Faktor bei der durch PDGF ausgelösten Dedifferenzierung identifiziert werden (LIU et al., 2005). Über einen ähnlichen Mechanismus, die Repression des TGF β -control-elements (TCE), vermindert GKLf auch nach TGF β -Stimulation die Genexpression spezifischer Differenzierungsmarker wie Smooth muscle α -Aktin und Smooth muscle 22 α (ADAM et al., 2000). Während die Bedeutung von GKLf für die VSMC-Differenzierung bereits teilweise erforscht ist, ist sein Einfluss auf Proliferation und Überleben dieser Zellen bislang noch unklar.

In den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurden mit Hilfe der Differential Display-Methodik GKLf und Id3 als redox-sensitive Gene in VSMC identifiziert. Es wurde unter anderem herausgefunden, dass die GKLf-Expression durch Hydroxylradikale induziert wird, jedoch nicht durch Superoxidanionen. Die Id3-Expression hingegen wird durch OH \cdot vermindert und durch O $_2^{\cdot-}$ erhöht. Eine Stimulation mit O $_2^{\cdot-}$, Transfektion mit Id3 sense oder Inhibition von GKLf führen zu einer Zunahme der VSMC-Proliferation, einer Hyperphosphorylierung von Rb und einer Abnahme der Expression von p21, p53 und in geringerem Ausmaß p27. Im Gegensatz dazu führt eine Stimulation mit OH \cdot , Transfektion mit GKLf sense oder Inhibition von Id3 mit Antisense-Konstrukten zu einer Abnahme des VSMC-Wachstums, einer Hypophosphorylierung von Rb und einer

Zunahme der Expression der Cdk-Inhibitoren. Aus diesen Ergebnissen ergibt sich die Auffassung, dass es in VSMC eine differentielle Wachstumsregulation durch reaktive Sauerstoffspezies gibt, die über die Aktivität von GKLf und Id3 vermittelt wird.

Ferner folgt aus der Tatsache, dass der Id3-Promoter (YEH & LIM, 2000) über potentielle Bindungsstellen für GKLf verfügt, die Möglichkeit einer Beeinflussung der Id3-Transkription durch GKLf. Diese Hypothese wurde durch Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA) untermauert, in denen gezeigt wurde, dass der Konsensussequenz für die GKLf-Bindung entsprechende Oligonukleotide spezifisch an den Id3-Promoter binden.

2.4 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Um weitere Erkenntnisse über die Bedeutung von GKLf und Id3 im Zusammenhang mit redoxsensitiven Signalwegen und Wachstumsprozessen in VSMC zu gewinnen, wurde in der vorliegenden Arbeit folgenden Fragestellungen nachgegangen:

1. Wie wirkt sich eine Überexpression von GKLf und Id3 sense/antisense auf Proliferation und Apoptose in VSMC aus?
2. Welche Signalwege mediieren die ROS-abhängige Expression von GKLf und Id3?
3. Gibt es Hinweise auf direkte Interaktion von GKLf mit Id3 auf transkriptioneller Ebene?

Zur Beantwortung dieser Fragen dienten folgende experimentelle Ansätze:

1. Transiente Transfektion von VSMC mit GKLf, Id3, p53 und p21 sense/antisense, anschließend Zellzählungen, Apoptoseassays und RT-PCRs.
2. Stimulation von VSMC mit Hydroxylradikalen, Superoxidanionen, verschiedenen Radikalscavengern und Signaltransduktionsinhibitoren und Überprüfung der mRNA-Level von GKLf und Id3 durch RT-PCRs und Northern Blots.
3. Zur Bestimmung der direkten Interaktion von GKLf und Id3-Promoter Transfektion von VSMC mit pGL2-Id3-Promoter-Reporter-Konstrukten mit oder ohne GKLf sense und Durchführung von Luciferase-Assays.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Verwendete Substanzen

1kb Plus DNA Ladder™ (Gibco BRL Life Technologies™, Karlsruhe, Deutschland)
2/β-Mercaptoethanol (Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg, Deutschland)
2-Propanol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
5x First Strand Buffer (Gibco BRL Life Technologies™, Karlsruhe, Deutschland)
Aceton (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland)
Actinomycin D (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland)
α-[³²P]-dCTP (ICN Biomedicals Inc., Eschwege, Deutschland)
Aminoethylcarbazol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland)
Ampicillin 5g (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland)
Ampuwa für Spülzwecke (Fresenius, Bad Homburg)
Ammoniumacetat (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Angiotensin II (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland)
Anti-α-Actin (Monoklonal, murin) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland)
Atorvastatin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland)
Bacto-Agar (DIFCO, Detroit, MI, USA)
Bovines Serumalbumin (BSA) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland)
Catalase (CAT, bovin) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland)
Cell Culture Lysis Reagent 5x (Promega)
Chloroform (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Cholera Toxin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland)
Cycloheximid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland)
Denhardt's Solution (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland)
Diethylpyrocarbonat (DEPC) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO, reinst) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
di-Natriumhydrogenphosphat (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Diphenyliodonium (DPI) (Sigma-Aldrich GmbH Chemie, Deisenhofen, Deutschland)
Dithiothreitol (Sigma-Aldrich GmbH Chemie, Deisenhofen, Deutschland)
DNase I, RNase-free (10-50x10³U/ml) (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland)
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, without sodium pyruvate) (Gibco BRL)
Eisen-III-chlorid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland)
Elastase (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland)
Essigsäure zur Analyse (Eisessig) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Ethanol (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
Ethidiumbromid (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Ethylendiamidtetraessigsäure (EDTA) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland)
Ficoll 400 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland)
Fötales Kälberserum(FKS) (Gibco BRL Life Technologies™, Karlsruhe, Deutschland)
Formaldehyd 37% (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland)
Formamid (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland)
Genistein (Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden, Deutschland)
Glucose (D+) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland)
Glycerol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland)
H₂O₂ 30% (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Hämatoxylin (Gill Nr.3) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland)
Kaliumacetat (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Kaliumchlorid (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Kaliumdihydrogenphosphat (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Kollagenase Typ I (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland)
Lithiumchlorid (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
L.M.P. Agarose (Low Melting Point) (Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland)
Lysozyme (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland)
Manganchlorid Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland)
Mannitol (D-) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland)
MAPTAM (Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden, Deutschland)

Mineral oil (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland)
Mo-MLV Reverse Transkriptase (Gibco BRL Life Technologies™, Karlsruhe, Deutschland)
Morpholinopropane sulfonic acid (MOPS) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland)
Natriumazetat (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Natriumchlorid (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
Natriumhydroxyd-Plättchen (Merck, Darmstadt, Deutschland)
Nitrilotriacetic Acid (NTA) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland)
ω-N-Nitro-L-Arginin (L-NNA) (Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden, Deutschland)
Optimem I (Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland)
PCR-Nucleotide-Mix (10mM) (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland)
PCR-Reaction Buffer (10x) (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland)
PD 98059 (Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden, Deutschland)
(pdN₆) Random Primer (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland)
PEG-Catalase (PEG-CAT) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland)
PEG-Superoxiddismutase (PEG-SOD) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland)
Penicillin/Streptomycin (Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland)
peqGold RNAPure (Peqlab, Erlangen, Deutschland)
peqGold dNTP-Mix 10 mM (Peqlab, Erlangen, Deutschland)
peqGold Universal-Agarose (Peqlab, Erlangen, Deutschland)
Pertussistoxin (PTX, 200µg/ml) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland)
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol 25:24:1 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen)
Polyvinylpyrrolidone (PVP) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland)
Purin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland)
Refobacin (40,80,120mg Gentamycinsulfat) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
RNase A, DNase-free (500µg/ml) (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland)
RNasin (RNase Inhibitor) (Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland)
Salmon Sperm DNA (10,4mg/ml) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland)
Salzsäure (rauchend, 37%) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
SB 203580 (Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden, Deutschland)
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) (Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg, Deutschland)
Streptavidin-Peroxidase-Conjugate (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland)
Superoxiddismutase (SOD, bovin) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland)
Superscript II Reverse Transkriptase (Gibco BRL Life Technologies™, Karlsruhe, Deutschland)
Taq DNA Polymerase (5U/µl, mit 10xPuffer) (Roche Molecular Biochemicals)
Tiron (4,5-Dihydroxy-1,3-benzene-Disulfonsäure) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)
Tris / Trizma Base (Tris-[hydroxy-methyl]-aminomethan) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)
Tris-HCl (Tris-[hydroxy-methyl]-aminomethan-hydrochlorid) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH)
Trypsin-EDTA (Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland)
Trypsin-Inhibitor (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland)
Trypton/Pepton aus Casein (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
Wortmannin (Calbiochem-Novabiochem GmbH, Bad Soden, Deutschland)
Xanthin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland)
Xanthinoxidase (10U/ml) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland)
Xylene-Cyanol F (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland)
Yeast Extract (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland)

3.1.2 Puffer und Lösungen

3.1.2.1 Allgemein verwendete Puffer und Stammlösungen

50xTAE (2000 ml)

484 g NaCl (4,14 M/l)
 37,2 g EDTA (64 mM/l)
 116 ml Eisessig (10 mM/l)
 (pH 8.4; ad 2l mit A.dest)

10xPBS (1000 ml)

80 g NaCl (1,37 M/l)
 2 g KCl (27 mM/l)
 2,4 g KH₂PO₄ (18 mM/l)
 14,4 g Na₂HPO₄ (101 mM/l)
 (pH 7.4)

20xMOPS (1000 ml)

83,6 g MOPS (400 mM/l)
 13,61 g Natriumacetat (166 mM/l)
 7,45 g EDTA (25 mM/l)
 (pH 8.0; ad 1l mit DEPC-H₂O)

50xDenhardt´s Solution (500 ml)

5 g BSA (15 mM/l)
 5 g Ficoll (25 mM/l)
 5 g PVP (1 mM/l)
 (ad 500ml mit DEPC-Wasser
 gelagert bei -20°C in 50ml-Aliquots)

20xSSC (1000 ml)

100,5 g NaCitrat (340 mM/l)
 175 g NaCl (3 M/l)
 ad 1l mit A.dest.
 (pH 7.0, autoklaviert)

3.1.2.2 Speziell verwendete Puffer und Lösungen

Molaritäten der Stammlösungen sind [Kapitel 3.1.2.1](#) zu entnehmen.

RNA-Gel:

RNA-Gel (100 ml)

1,2 g Universalagarose
92,5 ml DEPC-Wasser
5 ml 20 x MOPS
1,8 ml Formaldehyd 37%

Vorbereitung der RNA-Probe

10µg RNA, ad 10 µl mit DEPC-Wasser
+19 µl RNA-Ladepuffer: 10 µl Formamid
4,4 µl Formaldehyd 37%
2,5 µl 10x MOPS
2 µl RNA Loading Dye
0,1 µl Ethidiumbromid

Northern Blot:

Prähybridisierungslösung (500 ml)

250 ml Formamid
150 ml 20xSSC
25 ml 10% SDS
50 ml 50xDenhardt's Solution
25 ml DEPC-Wasser

Hybridisierungslösung (500 ml)

250 ml Formamid
150 ml 20xSSC
25 ml 10%SDS
75 ml DEPC-Wasser

STE-Puffer (100 ml)

5,84 g NaCl (0,1M/l)
1,21 g Tris (10mM/l)
0,29 g EDTA (1mM/l)
(ad 100 ml mit DEPC-Wasser, pH 8.0)

DNA-Gel:

DNA-Gel (100 ml)

1,2 g Universalagarose
100 ml 1x TAE-Puffer
4 µl Ethidiumbromid

DNA-Ladepuffer (10 ml)

3 ml Glycerol
7 ml Aqua dest
0,5g Xylen Cyanol F

Bakterienkulturmedien:

2*YT-Medium (1000 ml)

10 g NaCl (171 mM/l)
10 g Yeast Extract
16 g Trypton
(pH 7.5 ; autoklaviert)

LB-Medium (1000 ml)

10 g NaCl (171 mM/l)
5 g Yeast Extract
10 g Trypton
(pH 7.0 ; autoklaviert)

LargePrep:

Solution 1: GET/Lysozym-Buffer (1000 ml)

9 g Glucose (50mM/l)
3,94 g Tris-HCl (25mM/l, pH 8.0)
2,92 g EDTA (10 mM/l, pH 8.0)
(Autoklaviert, gekühlt)

Solution 2: NaOH/SDS-Alkaline-Lysis-Buffer

49 ml 1% SDS + 1 ml 10 N NaOH
(nicht gekühlt, immer frisch)

Solution 3: Kaliumacetatlösung (eisgekühlt)

60 ml 5 M/l Kaliumacetat
12 ml Eisessig
28 ml Aqua dest.

TE/Elutionspuffer

10 mM/l Tris-HCl, pH 8.5

10 M/l Ammonium-Acetat-Lsg.

5M/l Lithiumchlorid-Lösung

(eisgekühlt)

Lysozym-Lösung

50 mg Lysozym in 5 ml
Tris-HCl pH 8.0 (immer frisch)

3.1.3 Molekularbiologische Kits

Cell Death Detection ELISA^{PLUS} (Roche)

One Shot INValphaF' Competent Cells (Invitrogen, Groningen NL)

Prime It II Random Primer Kit (Stratagene, CA; USA)

QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden)

Quick gel extraxtion kit (Qiagen, Hilden)

TA Cloning Kit (Invitrogen, Groningen NL)

3.1.4 Filter und Membranen

Hybond™-N Nylon Membran (Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland)

Whatman 3MM Chromatography Paper (Whatman International Ltd., Maidstone, UK)

3.1.5 Geräte und Zubehör

a) Allgemein:

- **Autoklav:** - Tuttnauer Systec 3050EL
- **Gelfotospeicherung:** - UVP Image Store 7500 (Ultra Violet Products, CA, USA)
- **Heizblöcke/Thermomixer:** - Eppendorf Thermomixer Comfort
- Boekel Industries Model 110001
- Unitek HB-130/
- **Kontamaten:** - ESM Contamat FHT 111M
- Berthold β+γ Monitor LB145
- **Magnetrührer:** - IKA Combimac RCH (Janke und Kunkel, IKA Labortechnik)
- **pH-Meter:** - WTW pH-Meter 527 (WTW, Weilheim)
- **Photometer:** - Eppendorf Biophotometer 6131
- **Tischzentrifugen:** - Heraeus Biofuge Pico
- Eppendorf Centrifuge 5415 C und D
- **UV-Schirm:** - UVP Transilluminator7500 (Ultra Violet Products, CA, USA)
- **Vortexer:** - Vortex Genie 2 (Scientific Industries)
- **Weißlichtschirm:** - UVP White (Ultra Violet Products, CA, USA)
- **Waagen:** - Kern EW, Kern 770 (Feinwaage)

b) Zellkultur:

- **Brutschränke:** - Heraeus Hera Cell, Sanyo MCO 17 AIC
- **Elektroporator:** - Bio-Rad Gene Pulser® II (Bio-Rad Laboratories, München)
- Einmalküvetten (Bio-Rad Laboratories, München)
- **Lichtmikroskop:** - Olympus Ck2 (Olympus GmbH, Deutschland)
- **Luminometer:** - Berthold Lumat LB 9507
- **ELISA-Reader:** - Microplate Reader Model 550 (Bio-Rad Laboratories, München)
- **Wasserbad:** - GFL 1086 (Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel)
- **Workbenches:** - Heraeus Hera Safe, Kojair Safety KR
- **Zentrifuge:** - Heraeus Laborfuge 400R

c) DNA / RNA:

- **Autoradiografiefilm:** - Hyperfilm™-MP High Performance autoradiography film
- **Bakterienbrutschrank:** - Heraeus Kelvitron®
- **Entwickler:** - Agfa Curix 60
- **Inkubatoren/Schüttler:** - Innova 4000 Incubator Shaker
(New Brunswick Scientific Co. , NJ, USA)
- Heraeus Instruments Incubator Oven
- Hybaid Mini Oven
- **Northern Blot:** - Stratagene Push Column Beta Shield Device
- Stratagene Nucltrap® Probe Purification Columns
(Stratagene, la Jolla, CA, USA)
- **PCR:** - Perkin Elmer DNA Thermal Cycler
- GeneAmp™ thin-walled reaction tubes
(Perkin Elmer, Connecticut, USA)
- **Stromquelle:** - Biorad Power-Pac 300 (Bio-Rad Laboratories, München)
- **UV-Crosslinker:** - UV Stratalinker® 1800 (Stratagene, la Jolla, CA, USA)
- **Zentrifugen:** - Heraeus Biofuge Fresco
- Napco Kühlzentrifuge 2019R
- Sigma Laborzentrifuge 1K15

3.1.6 Software

Zur Fotografie von Gelbildern auf dem UV-Transilluminator und Blots auf dem Weißlichtschirm diente das Geldokumentationssystem Image Store 7500 von UVP (CA, USA).

Die Bildbearbeitung erfolgte mit den Programmen Paint Shop Pro 5.0 und Adobe Photo Deluxe 2.0 und beschränkte sich auf die Auswahl des Bildausschnittes sowie die Beschriftung der Banden.

Alle densitometrischen Auswertungen von RNA-/DNA-Gelen bzw. Northern-Blots wurden mit dem Programm Labworks™ Analysis Software von UVP (CA, USA) Version 3.0 durchgeführt.

Die statistische Auswertung der densitometrisch gemessenen integrierten optischen Dichten der Banden erfolgte mit den Programmen Microsoft Excel 2003 und Graph Pad Prism Version 3.02.

Die angegebenen Daten wurden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben, die statistische Signifikanz mittels des ANOVA-Testes bestimmt.

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

3.2.1.1 Zellisolation

Die Isolierung glatter Gefäßmuskelzellen (VSMC) erfolgte aus männlichen Sprague-Dawley-Ratten (Charles River Wega GmbH, Sulzfeld, Deutschland) im Lebensalter von 6-10 Wochen nach einer leicht modifizierten Methode von CHAMLEY-CAMPBELL et al. (1979).

Das Tier wurde zunächst durch zervikale Dislokation getötet und die thorakale Aorta steril explantiert. Das Gefäß wurde dann in eiskalte phosphate buffered saline (PBS) überführt, welche 100 µg/ml Penicillin und Streptomycin enthielt, und vom Bindegewebe befreit. Die enzymatische Dispersion fand in einem Gemisch aus Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco BRL), 1,5 mg/ml Kollagenase Typ I, 0,5 mg/ml Elastase und 0,5 mg/ml Trypsininhibitor bei 37 °C statt. Nach Entfernung der Adventitia wurde das Gefäß in ca. 1 mm³ große Stücke geschnitten und über mehrere Stunden in der Enzymlösung inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation mit 1000 rpm pelletiert und in DMEM mit 20 % Fetalem Kälberserum (FKS; Gibco BRL) und Penicillin-/Streptomycin-Zusatz überführt. Danach erfolgte die Aussaat in Gewebekulturflaschen. Da VSMC sich langsamer absiedeln als Endothelzellen und Fibroblasten, wurde eine Umfüllung des Mediums in neue Flaschen nach 5 Stunden vorgenommen. Nach 5-8 Tagen folgte schließlich die Ablösung der Zellen durch Trypsinierung und Verteilung auf Zellkulturplatten mit 10 cm Durchmesser.

3.2.1.2 Immunhistochemische Charakterisierung

Zunächst wurden die über einen Glasobjektträger gewachsenen Zellen in einer Ethanol/Aceton (1:1) – Lösung fixiert und für 60 min mit bovinem Serumalbumin inkubiert. Die Standardmethode zur immunhistochemischen Charakterisierung der glatten Gefäßmuskelzellen bzw. zum Ausschluss der Kontamination der Kultur mit anderen Zelltypen wie Endothelzellen und Fibroblasten ist die antikörper-vermittelte Anfärbung des für VSMC spezifischen α -Actins. Diese erfolgte durch Markierung des α -Actins mit einem spezifischen Antikörper sowie nachfolgender Inkubation mit einem an Peroxidase gekoppelten zweiten Antikörper. Nach Zugabe eines Streptavidin-Biotin-Konjugates (1:500 in PBS) sowie des Peroxidase-Substrates (0,32 mM Aminoethyl-

carbazol, 0,00002 % H₂O₂ in 50 mM Tris-HCl, pH 7.3) bildete sich ein wasserunlöslicher roter Farbstoff.

Nach Kerngegenfärbung mit Hämatoxylin und Einbettung der Präparate in Glycerin-Gelatine wurde die lichtmikroskopische Auswertung durchgeführt.

3.2.1.3 Kulturbedingungen

Die weitere Kultivierung der Zellen erfolgte in einer 5% CO₂ Atmosphäre bei 37°C ebenfalls mit DMEM, sowie unter Zusatz von 10 % FKS, 100 µg/ml Penicillin und Streptomycin (Gibco) sowie 80 µg/ml Gentamycin (Merck).

Je nach Bedarf erfolgte die Passagierung auf 5 cm-, 10 cm- oder 15 cm-Kulturplatten: Dazu wurde der Zellverband nach Medientfernung durch Trypsinierung (37°C, 3 Minuten, 2-4 ml Trypsin-EDTA) aufgelöst. Die Einzelzellen wurden in Kulturmedium aufgenommen und für 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde resuspendiert und fraktioniert zur Subkultivierung ausgesät.

Alle Experimente wurden mit VSMC der 6.-16.Passage durchgeführt.

Zur Untersuchung der Effekte von ROS, Scavengern und Signalwegsinhibitoren auf die GKLf- und Id3-Expression in den Stimulationsreihen wurden die einschichtig konfluent gewachsenen Zellen 12-24 Stunden durch Serumentzug in DMEM ohne FKS (Hungermedium) wachstumsarrestiert.

3.2.1.4 Transfektion

Die Transfektion ist ein molekularbiologisches Verfahren, um rekombinante DNA-Sequenzen in Zielzellen oder Zielorganismen zu exprimieren. Man spricht von rekombinanter DNA, nachdem ein gewünschtes Gen in ein Träger-DNA-Molekül, welches als Vektor bezeichnet wird, kloniert wurde. Alle transienten Transfektionsexperimente der vorliegenden Arbeit wurden mittels Elektroporation durchgeführt. Die grundlegenden Arbeiten zu diesem Verfahren stammen von NEUMANN et al. (1982).

Die Zielzellen wurden dazu in ein hypoosmolares Medium gegeben und mit der in den Vektor klonierten DNA (vgl. Kapitel 3.2.4.4) in einer Elektroporationskuvette in Kontakt gebracht. Während des folgenden kurzen Hochspannungsimpulses formierten sich in der Zellmembran Poren im Nanometer-Größenbereich, durch die die DNA in die Zelle gelangte.

Einschichtig konfluent gewachsene VSMC wurden durch Trypsinierung von den Zellkulturplatten abgelöst und durch Zentrifugation pelletiert. Die Resuspension erfolgte nach Absaugen des Trypsins in PBS-Lösung. Anschließend erfolgte die Zellzählung in einer Neubauerzählkammer. Dabei wurden 10 µl der Zellsuspension unverdünnt in die Kammer gegeben. Die Auszählung eines großen Eckquadrates entsprach einem ausgezählten Volumen von 0,1 µl. Das Ergebnis der Zählung wurde mit dem Faktor 10000 multipliziert, um die Zellzahl in 1 ml zu erhalten. Zwischenzeitlich wurde die Suspension mit den restlichen VSMC erneut durch Zentrifugation pelletiert. Das Zellpellet wurde nun in Optimum (Gibco) resuspendiert, so dass sich als Konzentration ca. 10^6 Zellen / 200µl Optimum ergaben. In den Elektroporationsküvetten (Bio-Rad) wurden nun jeweils 200 µl Zellsuspension in Optimum mit 20 µg der Vektor-DNA für 15 Minuten auf Eis in Kontakt gebracht. Nach einer Erwärmung für 30 Sekunden auf 37°C im Wasserbad erfolgte die Elektroporation bei 0,3 kV und 500 µF. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für weitere 15 Minuten erfolgte die Ausplattierung gleicher Mengen des Küvetteninhaltes auf 6 cm-Platten in DMEM mit 10 % FKS.

Die transfizierten Zellen wurden nach 48 Stunden durch Trypsinierung abgelöst und nach der Zentrifugation bei 1000 rpm für 3 Minuten in 1 ml 1 x PBS resuspendiert. Anschließend erfolgte eine Zellzählung nach dem geschilderten Muster.

Nach der Zellzählung wurden die restlichen Zellen nach erneuter Zentrifugation für 3 Minuten bei 1000 rpm entweder für einen Apoptose-Assay oder Luciferase-Assay angeimpft. Für die Experimente, bei denen mittels RT und PCR die transkriptionellen Level von Id3 und GKLf nach Transfektion untersucht wurden, wurde die RNA der transfizierten VSMC nach dem in Abschnitt [3.2.3.1](#) beschriebenen Protokoll isoliert und ein DNase-Verdau ([3.2.4.6](#)) durchgeführt.

3.2.1.5 Apoptose-Assay

Die Apoptoserate von transfizierten VSMC wurde mit dem Cell Death Detection ELISA^{PLUS}-System (Roche) ermittelt. Das Testprinzip beruht auf dem Nachweis nukleosomaler Proteine, die bei der apoptotischen DNA-Fragmentierung entstehen.

Zunächst wurden nach Zellzählung 10^4 transfizierte Zellen pro well auf einem 96-wellplate ausgesät. Nach 24 Stunden Kultivierung wurde das Medium abgesaugt und durch 200 µl Lysepuffer ersetzt. Nach der halbstündigen Lyse erfolgte eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 1000 rpm (Napco 2019R). 20 µl des Überstandes wurden in Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatten überführt. Die Inkubation mit 80

μl /well des Immunoreagenz (Inkubationspuffer, Anti-Histon-Biotin-Antikörper, Anti-DNA-POD-Antikörper im Verhältnis 18:1:1) auf dem Schüttler dauerte 120 Minuten. Nach dreimaligem Waschen wurden 100 μl der ABTS-Lösung (Peroxidase-Substrat) hinzugegeben und die Farbentwicklung in den nächsten 5 bis 20 Minuten bei 405 nm im Microplate-Reader bestimmt. Als Positivkontrolle diente ein im Kit enthaltener DNA-Histon-Komplex, als Negativkontrolle zur Nullwertbestimmung Inkubationspuffer.

3.2.1.6 Luciferase-Assay

Prinzipiell wird in Luciferase-Assays das Firefly-Luciferase-Gen als Reporter gen für die Expressionsrate vorgeschalteter Promoterkonstrukte verwendet. Zur Durchführung dieser Assays wurden VSMC mit dem Vektor pGL2 basic (Vgl. Abbildung 3.6) und mit aus ihm hergestellten Reporterkonstrukten (vgl. Abschnitt [3.2.4.4](#)) transfiziert.

Nach 48 Stunden Wachstum wurde das Kulturmedium abgesaugt und eine Waschung der Kulturplatten mit 1 x PBS durchgeführt. Nach Zugabe von 500 μl 1 x Cell Culture Lysis Reagent (CCLR, Promega) erfolgte die Ernte mit einem Zellschaber. Nach gründlichem Vortexen wurde durch einminütige Zentrifugation mit 12000 rpm (Heraeus Biofuge Pico) Zelldebris pelletiert und verworfen. Der Überstand wurde bei -80°C aufbewahrt oder direkt experimentell genutzt.

Dazu wurden 20 μl des aus Transfektionsexperimenten gewonnenen Zelllysates und 80 μl des Luciferase Assay Reagenzes (Promega) durch Pipettieren in einem Luminometerröhrchen gemischt und die mit Beginn der Reaktion entstehenden Leuchtsignale zu verschiedenen Zeitpunkten für jeweils 10 Sekunden in einem Luminometer bestimmt. Als Einheit wurde RLU (=Relative Luciferase Activity Units) ausgegeben, wobei die gemessene Firefly Luciferase-Aktivität auf die standardisierte Renilla Luciferase-Aktivität bezogen wurde. Als Hintergrundkontrolle diente ein leeres Luminometerröhrchen und als Leerwert ein Gemisch von 20 μl CCLR und 80 μl Luciferase Assay Reagenz.

3.2.2 Zellstimulation

3.2.2.1 Stimulation mit Sauerstoffradikalen

Reaktive Sauerstoffspezies wurden in den Gefäßmuskelzellen nach folgenden Verfahren generiert: Als Hydroxylradikal- (OH^{\bullet}) -erzeugendes System wurde das FENTON-Reagenz (vgl. [Kap. 2.2.1](#)) verwendet, das als potenter Erzeuger von

Hydroxylradikalen gilt (STADTMAN, 1990; DUELL et al., 1995; MIN et al., 1999). Dazu erfolgte die Stimulation der VSMC mit 100 $\mu\text{M/l}$ H_2O_2 , 10 $\mu\text{M/l}$ Fe(III)-Cl_3 und 20 $\mu\text{M/l}$ NTA. Superoxidanionen ($\text{O}_2^{\cdot-}$) wurden direkt über Zugabe von $1,6 \cdot 10^{-3}$ U/ml Xanthinoxidase (XO) aus 100 $\mu\text{M/l}$ Purin gewonnen (KLONER et al., 1989; MAKI et al., 1992; RAO & BERK, 1992; DREHER & JUNOD, 1995;). Indirekt erfolgte eine Stimulation mit 1 $\mu\text{M/l}$ Angiotensin II, das über Aktivierung der membranassoziierten NADPH-Oxidase die Bildung von $\text{O}_2^{\cdot-}$ bewirkt (GRIENGLING et al. 1994, BAAS & BERK 1995, ZAFARI et al. 1998). Jede Stimulation mit ROS wurde über drei Stunden durchgeführt.

3.2.2.2 Stimulation mit Radikalscavengern

Die Elimination extra- und intrazellulärer Sauerstoffradikale erfolgte durch Zugabe von Antioxidanzien bzw. Radikalfängern (Scavengern).

Dabei wurden D-Mannitol (20 mM/l), Catalase (100-500 U/ml) und Polyethylenglykolgekoppelte Catalase (PEG-CAT, 100-200 U/ml) verwendet, um Hydroxylradikale zu binden.

Superoxidanionen wurden direkt mit Hilfe von Superoxiddismutase (100-500 U/ml), PEG-SOD (100-200 U/ml) und Tiron (4,5-dihydroxy-1,3-benzene-Disulfonsäure; 10 mM/l) abgefangen. Indirekt wurde der NADH-/NADPH-Oxidase-Komplex durch Diphenyleniodonium (DPI, 10 $\mu\text{M/l}$) unspezifisch gehemmt, um die $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Bildung zu unterbinden.

3.2.2.3 Stimulation mit Signaltransduktionsinhibitoren

Bei der Untersuchung der zur Regulation von GSK3 und Id3 beitragenden Signaltransduktionsmechanismen wurden verschiedene Signalwege in der Zelle blockiert und die GSK3- bzw. Id3-Expression auf mRNA-Ebene untersucht.

Dabei dienten in jeder Stimulation mit 1 $\mu\text{l/ml}$ Hungermedium Dimethylsulfoxid (DMSO), dem Lösungsmedium der meisten Inhibitoren, inkubierte VSMC als Kontrolle. Zur Kontrolle der Wirksamkeit der ROS-Stimulation gab es in jeder Stimulationsreihe Zellen, die lediglich mit OH^{\cdot} oder $\text{O}_2^{\cdot-}$ stimuliert waren. Die Stimulation mit Inhibitoren erfolgte immer in Form von Pärchen und dabei mit dem Inhibitor alleine oder dem Inhibitor und den entsprechenden reaktiven Sauerstoffspezies nach halbstündiger Vorinkubation des Inhibitors.

Ein Überblick über die verwendeten Inhibitoren gibt Tabelle 3.1:

Inhibitor	Konzentration	Wirkmechanismus		Literaturangabe
Molekulargewicht	Lösungsmittel			
Actinomycin D	20 µg/ml	DNA-Komplexbildner und Inhibitor der		Wu & Yung, 1994
1255Da	= 15 µMl	RNA-Polymerase: Transkriptionsblocker		
	DMSO	und RNA-Synthese-Hemmstoff.		
Atorvastatin	10 µMl	HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor mit		Wassmann et al., 2002
	Ampuwa	antioxidativen Effekten		
Cholera Toxin	10 nMl	Erhöhung des intracellulären cAMP-Spiegels		Gill & Meren, 1978
87kDa	Ampuwa	durch das Exotoxin v. <i>Vibrio cholerae</i> , das die		
		ADP-Ribosylierung des G α -Proteins bewirkt.		
Cycloheximid	10 µg/ml	Translokase- und damit Translationshemmer,		Obrig et al., 1971
281Da	= 35 µMl	der zu Wachstumsstillstand führt und die		
	DMSO	Apoptose fördert.		
Genistein	0,2 µMl	Tyrosinkinaseinhibitor, ATP-Kompetitor.		Akiyama et et al., 1987
270Da	DMSO			
LNNA	10 µMl	Spezifischer Hemmstoff der NO-Synthase.		Pou et al., 1992
220Da	Ampuwa			
MAPTAM	20 µMl	Potenter extra- und intrazellulärer pH-		Lefkowitz et al., 1992
618Da	DMSO	unabhängiger Calciumchelator.		
PD98059	10 µMl	Spezifischer Hemmstoff der p42/p44-(ERK)-		Alessi et al., 1995
267Da	DMSO	Mitogen-aktivierten Proteinkinase.		
Pertussistoxin	200 ng/ml	Exotoxin aus <i>Bordetella pertussis</i> , das die		Hewlett et al., 1983
117 kDa	= 1.7 nMl	ADP-Ribosylierung des Gi-Proteins bewirkt		
	Glycerol	und die Hemmung Adenylylzyklase verhindert.		
SB203580	10 µMl	Spezifischer Hemmstoff der p38-MAPK und		Cuenda et al., 1995
377Da	DMSO	MAPKAP kinase-2, jedoch nicht von ERK/JNK.		
Wortmannin	0,1 µMl	Inhibition der PI3-Kinase und Akt-Signaltrans-		Bai et al., 1999
428Da	DMSO	duktion, Verstärkung d. proapoptotischen		
		Effekte zellulärer Stressoren.		

Tabelle 3.1 Überblick über die verwendeten Signalwegsinhibitoren

3.2.3 RNA

3.2.3.1 Gesamt-RNA-Isolation

Die Isolation der RNA aus VSMC erfolgte 3 Stunden nach der Stimulation mit ROS, Scavengern oder Inhibitoren bzw. 48 Stunden nach Transfektion.

Dabei wurde nach folgendem Procedere vorgegangen:

Nach gründlicher Absaugung des Kulturmediums wurden die Zellen mit 1 ml RNA-Pure (Peqlab) lysiert, mit einem Zellschaber gelöst und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die

Proteine wurden durch Zugabe von 300 µl Chloroform entfernt. Bei der anschließenden Zentrifugation bei 4 °C für 15 min mit 14000 rpm bildeten sich 3 Phasen aus, von denen die wässrige Oberphase in ein neues Eppendorfgefäß überführt wurde. Nach der Zugabe von 400 µl eisgekühltem Isopropanol wurde die Probe für mindestens 1 Stunde auf -20 °C gekühlt und anschließend für 30 min bei 4 °C mit 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 300 µl eisgekühltem Ethanol (70 % in DEPC-Wasser) gewaschen. Eine letzte Zentrifugation bei 4 °C für 15 min mit 14000 rpm pelletierte die gewaschene RNA erneut. Nach gründlichem Absaugen des Überstandes erfolgte das Trocknen des Pellets bei Raumtemperatur für mindestens 30 min. Schließlich wurde die isolierte Gesamt-RNA in 15-30 µl DEPC-H₂O gründlich resuspendiert und am UV-Photometer quantifiziert.

3.2.3.2 RNA-Gel

Auf dem RNA-Gel wurden jeweils 10 µg der isolierten Gesamt-RNA aufgetragen, die mit 19 µl RNA-Ladepuffer versetzt und für 10 Minuten auf 65 °C erwärmt worden waren. Die Elektrophorese erfolgte für 60 min bei 90 V in 1 x MOPS als Laufpuffer. Durch die Anfärbung mit dem interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid konnte die RNA anschließend auf dem UV-Transilluminator sichtbar gemacht und fotografiert werden (vgl. Abb. 3.1).

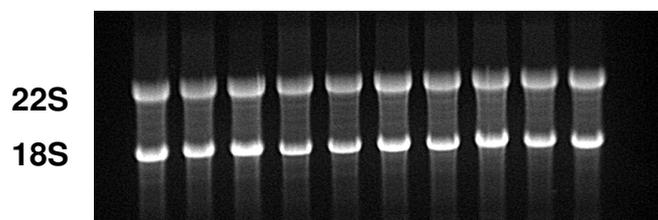


Abbildung 3.1 Repräsentatives RNA-Gel einer Stimulationsreihe

3.2.3.3 Northern Blot

Die Northern-Blot-Technik stellt eine Methode zum quantitativen Nachweis von Expressionsunterschieden von Genen dar.

Um eine Vergleichbarkeit der Banden zu erreichen, wurden alle Proben auf die 18S-Bande des RNA-Gels normalisiert. Die Expression des untersuchten Gens in Ruhe wurde bei der späteren Auswertung als 100%-Wert eingesetzt.

1. Überführen der RNA auf eine Hybond™N – Membran:

Vom fotografierten RNA-Gel wurden überschüssige Teile großflächig abgeschnitten und verworfen. Das verbleibende Gelstück wurde umgedreht und in einen Kapillarblot eingesetzt (nach SAMBROOK et al., 1989).

Die RNA diffundiert durch die Sogwirkung des Blots über Nacht nach oben auf die Hybond™ N-Membran. Am folgenden Tag wurde die RNA durch UV-Exposition für 30 Sekunden in einem UV-Crosslinker (Stratagene, La Jolla, CA, USA) mit der Membran quervernetzt. Die Qualität des Blots ließ sich wiederum im UV-Durchlicht beurteilen (vgl. Abb. 3.2):

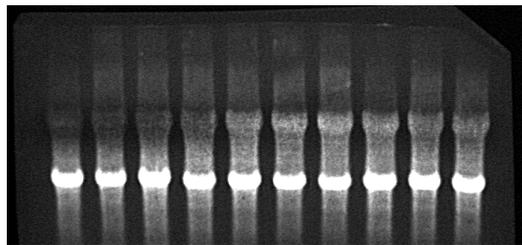


Abbildung 3.2 Repräsentatives Bild einer Hybond-Membran nach dem Blotvorgang

Die Membran wurde luftdicht versiegelt und bei -20°C aufbewahrt oder sofort verwendet.

2. Radioaktive Markierung der cDNA-Sonde und Hybridisierung

Zur Gewinnung der benötigten Mengen an copy-DNA (cDNA) von GKLf und Id3 sense wurde nach dem in Abschnitt 3.2.4.5 beschriebenen Prinzip vorgegangen.

Die cDNA wurde nach der Methode des „random prime labelling“ (FEINBERG und VOGELSTEIN, 1983) mit α -[³²P]-dCTP radioaktiv markiert. Dazu wurde das Prime It II Random Primer Kit (Stratagene, La Jolla, CA; USA) verwendet.

Zunächst wurde das Lowmelt-Gelstück mit der gewünschten cDNA für 10 min bei 70°C geschmolzen. 5 μ l der cDNA, 19 μ l DEPC-Wasser und 10 μ l Random Primer wurden für 5 Minuten auf 95°C erhitzt. Dann erfolgte die Zugabe von 10 μ l dCTP-Puffer und 5 μ l α -[³²P]-dCTP sowie 1 μ l Exo-Klenow Polymerase (5 U/ μ l). Die Reaktion fand 20 Minuten lang bei 37°C statt und wurde durch Zugabe von 2 μ l Stop-Mix beendet. Die Sonde wurde auf eine mit 100 μ l STE-Puffer equilibrierte NucTrap-Säule (Stratagene) gegeben und durch die Filtersäule gepresst. Uninkorporierte radioaktive Nukleotide banden an das Säulenmaterial, so dass der unspezifische Hintergrund vermindert wurde. Die radioaktive Sonde wurde in einem Eppendorfgefäß mit 100 μ l Salmon Sperm DNA (ssDNA, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, vorher für 5 min bei 95°C denaturiert) aufgefangen und die Säule nochmals mit 100 μ l STE-Puffer durchgespült.

Das Gemisch aus Sonde und ssDNA wurde dann für 5 min auf 95°C erhitzt und im Anschluss in 10 ml 42°C warme Hybridisierungslösung gegeben.

Die Prähybridisierung der Hybond™ N Membran erfolgte in einer Röhre mit 10 ml Prähybridisierungslösung und 100 µl für 5 min bei 95°C denaturierter ssDNA bei 42°C für mindestens 1 Stunde.

Nach Verwerfen dieser Lösung erfolgte die eigentliche Hybridisierung durch Zugabe des Gemisches aus Hybridisierungslösung und radioaktiver Sonde und Inkubation bei 42°C über Nacht. Dabei band die radioaktiv markierte DNA an die zu ihr komplementäre RNA-Sequenz auf der Membran.

Im Anschluss wurde die Membran 2 x 10 Minuten mit 2 x SSC-Lösung bei 50°C gewaschen. Nach Versiegelung in einer Plastiktüte wurde sie in eine Autoradiografiekassette gelegt und mit einem Film zunächst für 24 Stunden belichtet.

Beim Entwickeln zeigten sich Banden, deren Intensität proportional zur Menge der mRNA des untersuchten Gens auf dem RNA-Gel war (vgl. Abb. 3.3):

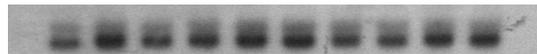


Abb. 3.3 Repräsentativer Ausschnitt eines Autoradiografiefilms nach Northern Blotting

3.2.3.4 Reverse Transkription

Die Mo-MLV-RT (Reverse Transkriptase des Moloney Stammes des murinen Leukämievirus, Gibco BRL) und Superscript II (eine Variante der Mo-MLV-RT ohne Ribonuklease H-Aktivität, Gibco BRL) wurden dazu verwendet, aus 2 µg der Gesamt-RNA stimulierter oder transfizierter Zellen copy-DNA herzustellen. Als Primer wurden dabei 100 pmol zufällige Hexamere verwendet. Der Ansatz sah wie folgt aus:

2 µg Gesamt-RNA (ad 5 µl mit DEPC-Wasser) wurden mit 1 µl Random Primer für 5 Minuten auf 95°C gebracht, wobei die Sekundärstrukturen der RNA denaturierten und die Primer banden. Nach 5 Minuten Abkühlung auf Eis erfolgte die Zugabe des Mastermixes (5,5 µl DEPC-Wasser + 4 µl 5 x First Strand Buffer + 1,5 µl dNTP 10 mM + 1,5 µl DTT 0,1 M + 0,5 µl RNasin + 1 µl Enzym) und die Inkubation der Reaktion für 1 Stunde bei 42°C. Eine Erhitzung des Ansatzes auf 70°C für 10 Minuten inaktivierte die Reverse Transkriptase.

3.2.4 DNA

3.2.4.1 DNA-Gel

Die DNA-Gelelektrophorese erfolgte in 1 x TAE als Laufpuffer bei 90 V für 1 Stunde. Als DNA-Längenstandard dienten dabei jeweils 5 µl 1kb Plus DNA Ladder (Gibco BRL). Anschließend erfolgte die Beurteilung der Banden auf dem UV-Transilluminator und Gel-Fotografie mit Hilfe des Image Store 7500 Systems (UVP).

3.2.4.2 Semiquantitative PCR und Primer

Die Entdeckung thermostabiler DNA-Polymerasen Anfang der Achtziger Jahre (MULLIS KB et al., 1986) bildete die Grundlage der Polymerase-Kettenreaktion (PCR).

In der vorliegenden Arbeit wurde die PCR dazu verwendet, Fragmente von GKLF und Id3 nach Stimulation von VSMC mit Radikalen, Scavengern und Inhibitoren oder nach Transfektionsexperimenten aus der durch reverse Transkription (RT) gewonnenen cDNA zu amplifizieren. Expressionsunterschiede dieser beiden Gene ließen sich dann auf einem DNA-Gel beurteilen und densitometrisch bestimmen.

Die Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) als nicht reguliertes Housekeeping-Gen (SOLCH et al., 1996) wurde zur Kontrolle ebenfalls aus jeder RT amplifiziert.

Standardmäßig kamen zu 2 µl RT-Produkt 48 µl Mastermix (1 µl Forward Primer, 1 µl Reverse Primer, 1 µl dNTP-Mix, 5 µl 10 x Reaction Buffer, 1 U bzw. 0,2 µl Taq DNA Polymerase, 39,8 µl Ampuwa) und 1 Tropfen Mineralöl als Verdunstungsschutz.

Ein typischer PCR-Lauf enthielt folgende Schritte:

- Initialer Denaturierungsschritt für 5 min bei 95 °C
- PCR-Zyklus aus 60 sec bei Primer-Annealing-Temperatur (s.u.), 90 sec bei 72 °C (Taq-Polymerase-Arbeitstemperatur) und 60 sec bei 95 °C (Denaturierung)
- Nach Ablauf der eingestellten Zyklenzahl 10 min bei 72 °C
- Abschließend Abkühlung auf 4 °C (Ende des Laufes)

Für GAPDH-PCRs wurden 23 Zyklen bei 57 °C Primeranlagerungstemperatur verwendet, für GKLF 26 Zyklen bei ebenfalls 57 °C und für Id3 26 Zyklen bei 54 °C.

Folgende Oligonukleotide wurden als Primer für PCRs nach Stimulationen verwendet:

1. GKLF-PCR (PCR-Fragment 691 bp):

GKLF sense: 5'-CAA CGA CCT CCT GGA CCT AGA-3' (100 pmol/l)

GKLF antisense: 5'-TTC CTC GGG ACT CAG TGT AGG-3' (100 pmol/l)

2. Id3-PCR (PCR-Fragment 237 bp):

Id3 sense: 5'-CGA CAT GAA CCA CTG CTA CTC-3' (50 pmol/l)

Id3 antisense : 5'-GGT CAG TGG CTA AAG CTG CTC-3' (50 pmol/l)

3. GAPDH-PCR (PCR-Fragment 220 bp):

GAPDH sense: 5'-CGG AAT TCC GGA AAC CCT GGA CCA CCC AGC CCA G-3'

GAPDH as.: 5'-GCT CTA GAG CGA GGG TGC AGC GAA CTT TAT TGA T-3'

Alle Primer wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg, Deutschland) bezogen.

3.2.4.3 Plasmidvermehrung in E.coli

3.2.4.3.1 Bakterienkultur

Zur Vermehrung der für Transfektionen und Klonierungen benötigten Plasmide dienten ausschließlich kompetente E.coli (Invitrogen), die in obigen Kulturmedien angeimpft und auf einem Innova 4000 Incubator Shaker (New Brunswick Scientific Co.) horizontal geschüttelt wurden.

Zur Anlage von Glycerolstocks wurden 500 µl Bakteriensuspension mit demselben Volumen an Glycerol versehen, in flüssigem Stickstoff kurz schockgefroren und dann bei -80 °C dauerhaft aufbewahrt.

Das Gießen von Nähragarplatten wurde durchgeführt, indem vor dem Autoklavieren zu obigen Medien 15 g/l Bacto-Agar (Difco) gegeben und das Gemisch in abgekühltem Zustand zum Erhärten in 100 mm Bakterienkulturplatten gegossen wurde.

Dabei wurden die Platten zur Selektion jeweils mit dem Antibiotikum versehen, gegen die der verwendete Stamm eine Resistenz durch Transformation mit Plasmiden gewonnen hatte. In den meisten Fällen handelte es sich dabei um Ampicillin, das bei einer Konzentration von 100 µg/ml wirksam ist.

3.2.4.3.2 Transformation

Zur Transformation wurden One Shot INValphaF' Competent Cells (Invitrogen, Groningen NL) verwendet.

Zunächst wurde ein 50 µl Aliquot der bei -80 °C in Glycerol gelagerten kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut. 50-100 ng der gewünschten Plasmid-DNA wurden hinzugegeben, ferner 1 µl einer 1 M Mercaptoethanol-Lösung. Danach erfolgte die Inkubation dieses Ansatzes für 30 Minuten auf Eis (Anlagerung der Plasmide an die Bakterienwand). Anschließend erfolgte ein 45-sekündiger Hitzeschock im Wasserbad bei 42 °C. Nach einer 90-sekündigen Abkühlung auf Eis wurden 250 µl SOC-Medium (im Kit enthalten) hinzugegeben und der Ansatz bei Raumtemperatur für 1 Stunde mit

220 rpm inkubiert. Schließlich erfolgte das Ausplattieren auf 100 mm Agarplatten, die mit dem entsprechenden Antibiotikum, für das durch die Transformation eine Resistenz erworben wurde, versehen worden waren. Dabei wurde eine Platte nur mit SOC-Medium beimpft (Ausschluß der Kontamination mit resistenten Fremdbakterien), die anderen mit 50 µl- bzw. mit 100 µl-Chargen des Transformationsansatzes.

Nach erfolgreicher Transformation wurden Glycerolstocks nach dem oben angeführten Verfahren hergestellt und Einzelkolonien zur weiteren Vermehrung in größere Kulturgefäße überimpft.

3.2.4.3.3 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Das Verfahren der Plasmid-Mini-Präparation dient zur Isolierung von transformierten Plasmiden aus E.Coli. Es wurde das QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden) verwendet. Nach erfolgreicher Transformation wurden einzelne Kolonien mit abgeflammtten Ösen aufgenommen und in 6-8 Bakterienkulturröhrchen gegeben, in denen sich je 3 ml 2*YT-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin befanden. Diese wurden für 12-18 Stunden mittels Rüttler bei 37°C und 250 rpm inkubiert. Die eigentliche Präparation erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Die Menge an isolierter Plasmid-DNA wurde mittels UV-Photometer überprüft.

3.2.4.3.4 Large-Prep

Die large scale plasmid preparation ist eine Methode zur Gewinnung großer Mengen an Plasmid-DNA. Verwendet wurde ein Protokoll von BIRNBOIM & DOLY (1979):

Die über Nacht in 400ml 2*YT-Medium (100 µg/ml Ampicillin) angewachsenen Bakterien wurden zunächst durch Zentrifugation (10 min, 4°C, 4500 rpm) pelletiert und zum Waschen in STE-Puffer resuspendiert. Nach erneuter Pelletierung durch Zentrifugation erfolgte die Bakterienwandlyse in 10 ml Solution 1 und 1 ml frischer LysozymbLösung. Durch Zugabe von 20 ml Solution 2 und 15 ml Solution 3 (dann auf Eis) erfolgte die alkalische Lyse der Bakterienbestandteile und Ausfällung der genomischen DNA, die durch einen weiteren Zentrifugationsschritt pelletiert wurden. Der gefilterte Überstand enthielt nun die Plasmidringe und wurde ebenfalls zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml Elutionspuffer (TE-Puffer) resuspendiert, und mit 1 ml 5 M/l LiCl versehen (auf Eis), um verbliebene Reste hochmolekularer DNA auszufällen. Nach Zentrifugation (10 min, 4°C, 14000 rpm) wurde der Überstand wiederum in neue Eppendorfgefäße überführt und 1 ml Isopropanol zum Waschen der Plasmide zugegeben. Nach einer weiteren Zentrifugation wurden die so gewonnenen Pellets in

500 µl TE-Puffer resuspendiert und dabei gepoolt. Nun erfolgte der RNase-Verdau (25 µl RNase-DNase-free, 30 min RT). Durch Zugabe von 1 ml Isopropanol wurde die Reaktion gestoppt und das Pellet nach Zentrifugation getrocknet. Im weiteren Verlauf erfolgten die Resuspension des Pellets in TE-Puffer sowie die Entfernung restlicher Proteine durch Phenol-Chloroform-Extraktion, Zentrifugation und Überführung der wässrigen Phase in ein neues Eppendorfgefäß. Schließlich wurde die Plasmid-DNA in 100 µl 10 M/l Ammoniumacetat und 1 ml 100% Ethanol gefällt, pelletiert und nach Trocknung in 250 µl sterilem Wasser resuspendiert. Die Menge an isolierter Plasmid-DNA wurde mittels UV-Photometer überprüft.

3.2.4.4 Vektoren und Klonierungen

Zur Überführung von DNA-Sequenzen in Plasmide wurde die Technik der TA-Klonierung unter Verwendung des TA Cloning Kits (Invitrogen) eingesetzt. Dabei wurde die per PCR hergestellte DNA mittels einer Ligationsreaktion in den Vektor pCR2.1 (Abb. 3.4) eingebaut. Dies war auf Grund der 3'-T-Überhänge des vorlinearisierten Plasmides und der von der Taq-Polymerase

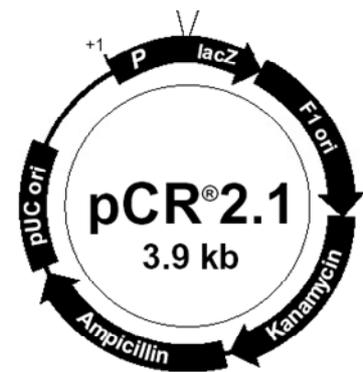


Abb. 3.4 Der pCR2.1-Vektor

synthetisierten 3'-A-Überhänge des PCR-Produkts möglich. Der Ligationsansatz bestand aus 2 µl pCR2.1, 1 µl 10 x Ligationspuffer, 1 µl T4 DNA-Ligase und 6 µl PCR-Produkt und wurde über Nacht bei 14°C inkubiert. Anschließend erfolgte zur Vermehrung der Plasmide die Transformation und Mini-Präparation (vgl. Kap. 3.2.4.3). Die Kontrolle des erfolgreichen Einbaus wurde durch Darstellung auf einem DNA-Gel im Vergleich zum Leerplasmid durchgeführt. Zur weiteren Kontrolle und Verarbeitung der DNA wurden im Anschluss gezielt Restriktionsendonukleasen eingesetzt. Dabei wurde wie folgt verfahren:

0,5 µg der Plasmid-DNA wurden mit 0,5 µl der entsprechenden Enzyme und 2 µl des passenden zehnfach konzentrierten Standardpuffers versetzt und der Ansatz mit Wasser auf 20 µl aufgefüllt. Die Reaktion fand über eine Stunde bei 37°C statt. Der Erfolg des Verdauens wurde wiederum auf einem DNA-Gel im Vergleich zum unverdauten Plasmid kontrolliert. Bei positivem Ergebnis wurde die ausgeschnittene Bande mit Hilfe des Quick Gel extraction kits (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers eluiert. Danach wurde mit dem Plasmid pcDNA3 (Abb. 3.5), dem Zielvektor für die meisten Transfektionsexperimente, ein Verdau mit denselben Restriktionsenzymen durchgeführt und dieser ebenfalls wie oben erklärt aus dem

DNA-Gel eluiert. Die Klonierung der DNA-Sequenz in den so eröffneten pcDNA3-Vektor erfolgte über eine Ligationsreaktion wie oben angeführt.

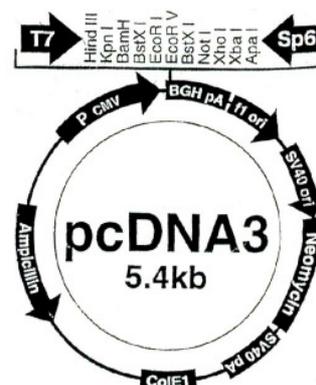
Der fertiggestellte Transfektionsvektor wurde nun wiederum in E.coli vermehrt und dann Klone aus mehreren Ansätzen der ursprünglichen TA-Klonierung

Zur Sequenzierung an das humangenetische Labor der Universitätskliniken des Saarlandes geschickt. Dies

war notwendig, da beim TA-Cloning ein Einbau entweder **Abb. 3.5 Der pcDNA3-Vektor**

in sense- oder in antisense-Richtung möglich ist. So wurden zum einen die gewünschten Klone, die das Zielgen in sense- oder antisense-Orientierung inkorporiert hatten, voneinander differenziert und zum anderen zwischenzeitliche Punktmutationen ausgeschlossen. Abschließend wurden von repräsentativen Klonen Glycerolstocks angelegt und bei Bedarf daraus zur Gewinnung der für die Transfektionen benötigten Plasmidmengen Bakterienkulturen angeimpft (siehe Kap. 3.2.4.3).

Einen Überblick der in der vorliegenden Arbeit für Transfektionen verwendeten Vektoren, die wie oben erklärt aus pcDNA3 hergestellt wurden, gibt Tab. 3.2. Die entsprechenden Konstrukte waren aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe teilweise bereits vorhanden (MÜLLER C et al. 2002).



GKLF	Forward Primer (FP)	5'-ATGAGGCAGCCACCTGGCGA-3'		
in pcDNA3	Reverse Primer (RP)	5'-TTAAAAGTGCCTCTTCATGTGTAAGG-3'		
Fragment	Sense-Klonierung	5' - Not I	3' - Xho I	Referenzsequenz:
1452bp	Antisense Klonierung	5' - Hind III	3' - Not I	NM_053713
Id3	FP	5'-CTCCAACCTCCAACATGAAGG-3'		
in pcDNA3	RP	5'-GTTCAAAAATGGTTTATTATGCAAAATGTT-3'		
Fragment	Sense-Klonierung	5' - BamH I	3' - EcoRV	Referenzsequenz:
941bp	Antisense Klonierung	5' - BamH I	3' - EcoRV	NM_013058
p53	Im Vektor pCMV-Neo-Bam zur Verfügung gestellt von Dr. Vogelstein			
in pcDNA3	(Johns Hopkins Oncology Center, Baltimore, MD, USA) und daraus			
	entsprechend umklontiert.			
Fragment	Sense-Klonierung	5' - BamH I	3' - BamH I	Referenzsequenz:
1,8kbp	Antisense Klonierung	5' - BamH I	3' - BamH I	
p21	Im Vektor pCEP zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. Bert Vogelstein			
in pcDNA3	(Johns Hopkins Oncology Center, Baltimore, MD, USA) und daraus			
	entsprechend umklontiert.			
Fragment	Sense-Klonierung	5' - Hind III	3' - BamH I	Referenzsequenz:
2,1kbp	Antisense Klonierung	5' - Hind III	3' - BamH I	U_24174

Tabelle 3.2 Übersicht der eingesetzten und aus pcDNA3 abgeleiteten Vektoren

Zur Durchführung der Luciferase-Assays nach Transfektion (siehe Kap. 3.2.1.6) wurde der Vektor pGL2-basic (Promega) verwendet. Zunächst wurde der Id3-Promoter aus dem Plasmid pcDNA3 (Id3 sense full length) mittels PCR (Forward Primer: 5'-AGCTTTCTTCTTTTCCCTGTTGCTCAAATAAATAG-3'; Reverse Primer: 5'-CAGCCGCGACCGGGCTCAGCGCCTTCGTGCTGGGG-3'; Fragment: 768bp) amplifiziert. Unter Einsatz der TA-Klonierung und der Restriktionsendonukleasen Xho I und Sac I wurde der Id3-Promoter wie in Kap. 3.2.4.4 beschrieben und wie in Abbildung 3.6 schematisch dargestellt in die Polyklonierungsstelle des pGL2-Plasmids eingeführt. Damit entstand ein funktionsfähiges Promoter-Reporter-System, in dem der Id3-Promoter die Ablesung des Firefly-Luciferase-Gens kontrollierte. Die Aktivität des Promoters und etwaige Einflüsse darauf konnten nun nach Transfektion in VSMC über einen Luciferase-Assay bestimmt werden.

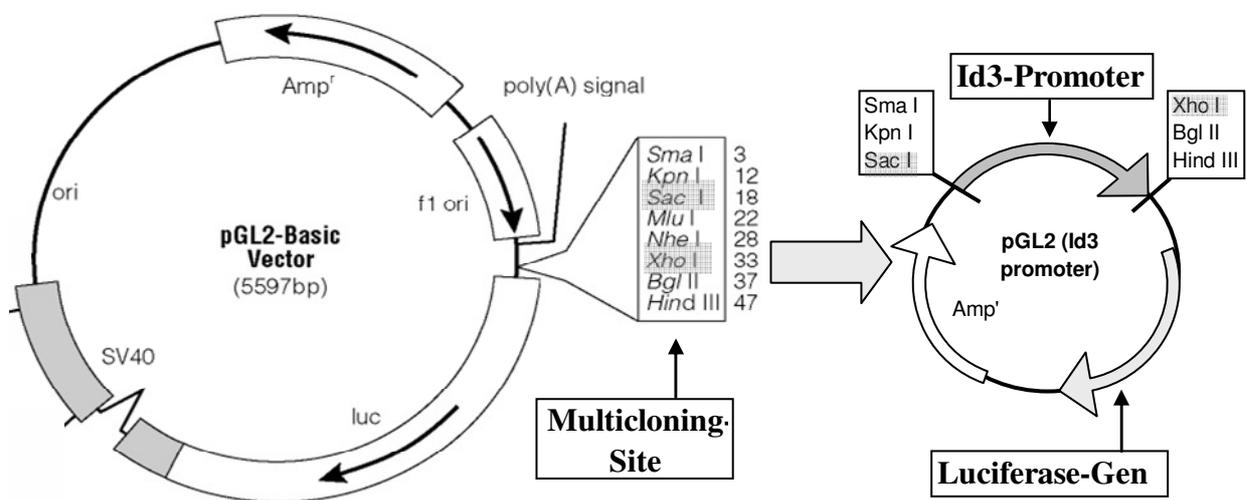


Abbildung 3.6 Vektorkarte des pGL2-Basic-Vektors (Promega) und schematische Vektorkarte des daraus hergestellten Vektorkonstrukts pGL2 (Id3 promoter)

3.2.4.5 cDNA-Gewinnung für Northern Blots

Zunächst wurde mit 1µg der Plasmide pcDNA3 (GKLF sense full length) und pcDNA3 (Id3 sense full length) eine PCR-Reaktion mit den in Kap. 3.2.4.2 beschriebenen Primern und Bedingungen für GKLF und Id3 über 35 Zyklen durchgeführt. Nach Kontrolle des Erfolgs der Reaktion auf einem DNA-Gel erfolgte die Eluation der DNA aus dem übrigen Ansatz nach Pooling der Proben.

Dazu wurde Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol im Verhältnis 1:1 zugegeben. Nach kräftigem Vortexen und Zentrifugation bei 12000rpm in der Kühlzentrifuge wurde die Oberphase in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit 100 %igem Ethanol im

Verhältnis 1:2 und 5 M/l Ammoniumacetatlösung (10 % des Gesamtvolumens) versetzt und 30 Minuten bei -20°C inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation für 15 min bei 12000 rpm und Waschung des so gewonnenen Pellets mit 70%igem Alkohol wurden die Resuspension in Wasser und Konzentrationsbestimmung durchgeführt.

Das DNA-Eluat wurde schließlich zusammen mit einem DNA-Längenstandard auf einem Low Melt DNA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt, die Bande sauber ausgeschnitten und bei -20°C gelagert oder sofort eluiert.

3.2.4.6 DNase-Verdau

Der DNase-Verdau wurde in der vorliegenden Arbeit dazu eingesetzt, um nach der RNA-Isolation transfizierter Zellen (3.2.1.4) diese von eventuell mitisolierten Plasmiden aus der Transfektion zu befreien, die bei den anschließenden Experimenten eine Fehlerquelle darstellen würden.

Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes von 20 µl bestand aus 1 µl DNase I RNase-free (Roche), 2 µl 10 x Reaktionspuffer (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 10 mM MnCl₂) und 2 µg Gesamt-RNA bei einem Gesamtvolumen von 20 µl. Die Reaktion fand bei 25°C für 30 Minuten statt. Die verwendete Endonuklease verursachte dabei in Anwesenheit von Mn²⁺-Kationen Doppelstrangbrüche in der unerwünschten DNA. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte für 5 Minuten bei 75°C.

4 Ergebnisse

4.1 *Der Einfluss von GKLf und Id3 auf Proliferation und Apoptose*

Zunächst wurde durch Transfektionsexperimente (siehe Kapitel 3.2.1.4) der Frage nachgegangen, welche Auswirkungen eine Erhöhung oder Verminderung der Expression von GKLf oder Id3 auf die Teilungsrate und Apoptose von VSMC hat. Dazu wurden die VSMC nach der Transfektion entweder einer Zellzählung unterzogen oder die Apoptoserate mit dem Cell Death Detection ELISA^{PLUS}-System (Roche) gemessen.

4.1.1 Zellzählungen nach transientscher Transfektion

Die Zellzählungen erfolgten 48 Stunden nach Elektroporation von 10^6 VSMC in einer Neubauer-Zählkammer (siehe Abschnitt 3.2.1.4). Dabei zeigten sich die in Abbildung 4.1 grafisch dargestellten Ergebnisse.

Die Proliferation der mit GKLf und Id3 transfizierten Zellen wurde in Bezug zu den nur mit dem Leerplasmid pcDNA3 transfizierten Zellen gesetzt. Die Überexpression von Id3 sense führte in Relation zum Ausgangsniveau zu einer Zunahme der Zellzahl auf $212 \pm 18\%$, während Id3 antisense tendenziell die Proliferation inhibierte ($68 \pm 23\%$, nicht signifikant). GKLf sense reduzierte im Mittel das Zellwachstum auf 34% des Kontrollwertes, wohingegen GKLf antisense über die Blockade der zelleigenen GKLf-mRNA indirekt eine Zunahme der Proliferation bewirkte ($169 \pm 30\%$). Kontrollversuche mit den Zellzyklusinhibitoren (vgl. Abschnitt 2.3.1) p21 sense ($31 \pm 14\%$) und p53 sense ($30 \pm 10\%$), die jeweils in pcDNA3 kloniert waren (siehe Abschnitt 3.2.4.4), zeigten erwartungsgemäß eine signifikante Hemmung der Teilungsrate der transfizierten Zellen. Die Blockade mit den entsprechenden Antisense-Sequenzen führte im Gegensatz zu GKLf in den durchgeführten Transfektionen aber nicht zu einer verstärkten Zellteilung (p21 antisense: $92 \pm 15\%$; p53 antisense: $112 \pm 11\%$). Die Ergebnisse der Ko-Transfektion von GKLf mit Id3 werden in Kap. 4.5.3 näher besprochen.

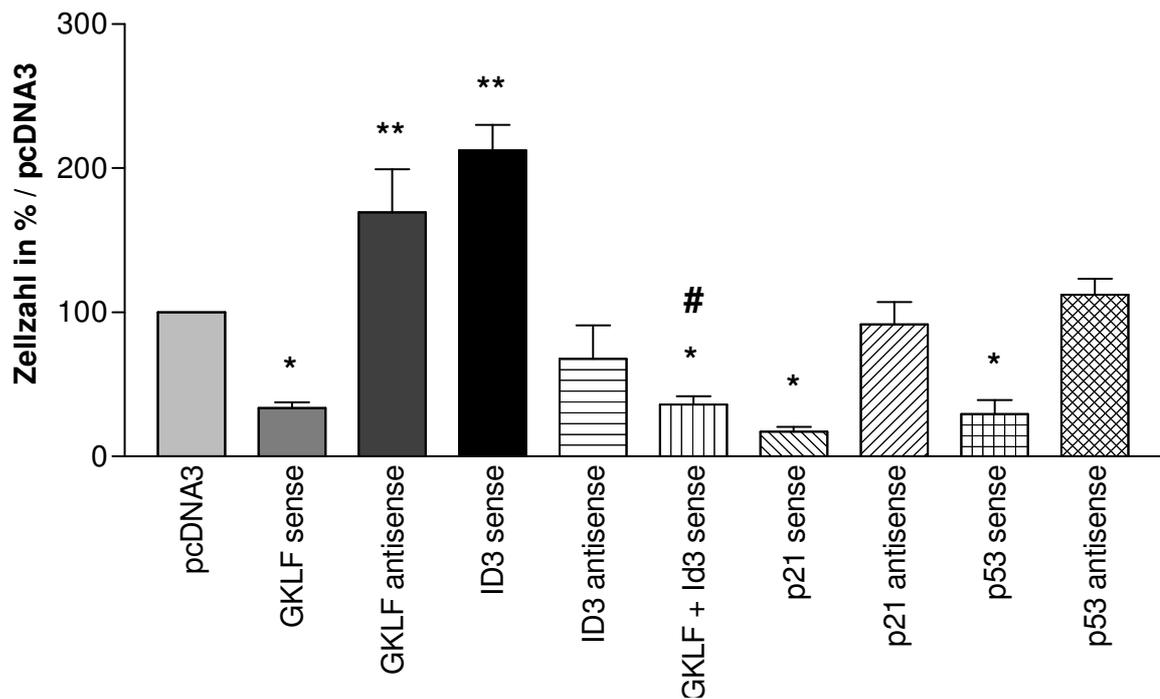


Abbildung 4.1 Zellzählung von VSMC nach Transfektion

Die Transfektion erfolgte mit jeweils 20 µg der folgenden, in pcDNA3 klonierten Konstrukte durch Elektroporation mit 0,3 kV und 500 µF: **pcDNA3** (Leervektor), **GKLF sense**, **GKLF antisense**, **Id3 sense**, **Id3 antisense**, **GKLF sense + Id3 sense**, **p21 sense**, **p21 antisense**, **p53 sense**, **p53 antisense**. Die Zellzählung erfolgte 48 Stunden nach Transfektion. Fehlerindikator = SEM, *p<0.05 vs. pcDNA3, **p<0.001 vs. pcDNA3, #p>0.05 vs. GKLF sense, n ≥3.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Id3 die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen stark stimulierte, während GKLF, p21 und p53 die Zellteilung hemmten. Diese Erkenntnisse sind mit Beobachtungen anderer Forschungsgruppen in Einklang zu bringen (vgl. Kapitel 2.3). Bemerkenswert ist auch die Tatsache, dass die Suppression der zelleigenen GKLF-mRNA mittels GKLF antisense die Proliferation förderte. Daraus kann geschlossen werden, dass GKLF in VSMC zumindest im Zusammenhang mit zellulären Stressoren wie der Elektroporation die Zellproliferation hemmt, was die Bedeutung dieses Faktors im Rahmen der Zellzyklusregulation und Kontrolle der genomischen Integrität verdeutlicht.

4.1.2 Apoptose-Assay nach transients Transfektion

Nach der Untersuchung der Wirkung von GKLF und Id3 auf die Zellteilung in VSMC wurde im nächsten Schritt deren Einfluss auf die Apoptoserate in diesen Zellen gemessen. Zur Durchführung der Apoptoseassays wurde das Cell Death Detection ELISA^{PLUS}-System (Roche) verwendet (Kap. 3.2.1.5).

Als Kontrollniveau bei der Auswertung diene die Apoptoserate nur dem Elektroschock ausgesetzter Zellen. Der Inkubationspuffer des Assays diene als Hintergrundkontrolle, das Immunoreagenz als Leerwert. Die positive Kontroll-DNA des Kits bestätigte eine effektive Messung der Apoptose-Partikel ($289 \pm 41\%$).

Zellen, die weder gepulst noch transfiziert waren, zeigten im Vergleich zu nur elektroporierten Zellen eine niedrige Apoptoserate (nicht gezeigt, $17 \pm 6\%$).

Die Transfektion mit dem Leerplasmid pcDNA3 führte im Mittel zu keiner gesteigerten VSMC-Apoptose ($123 \pm 32\%$). Id3 sense führte zu keiner signifikanten Beeinflussung der Apoptoserate (76%), während Id3 antisense ($603 \pm 53\%$) ebenso wie GKLF sense ($693 \pm 77\%$) als starke Stimulatoren des Zelltods fungierten. GKLF antisense wirkte im Gegensatz dazu leicht antiapoptotisch (nicht statistisch signifikant, $57 \pm 7\%$).

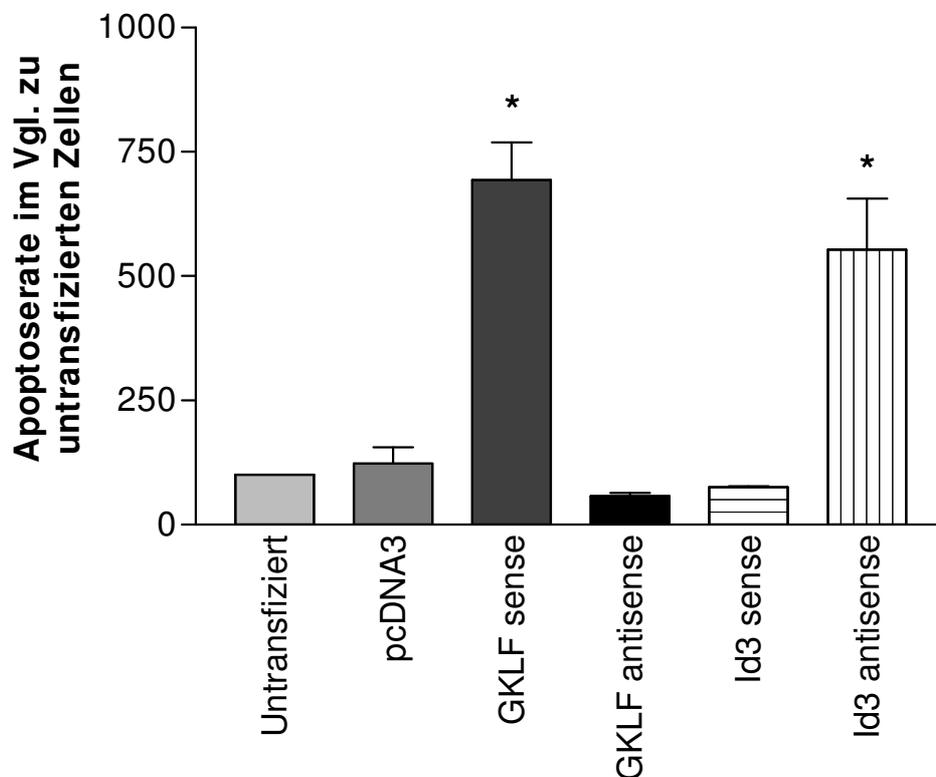


Abbildung 4.2 Apoptose-Assay von VSMC nach transientscher Transfektion

Die Transfektion erfolgte mit jeweils 20 µg der folgenden, in pcDNA3 klonierten Konstrukte durch Elektroporation mit 0,3 kV und 500 µF: **pcDNA3** (Leervektor), **GKLF sense**, **GKLF antisense**, **Id3 sense**, **Id3 antisense**. Dann wurden 10^4 Zellen/well in ein 96-Wellplate ausgesät und nach 48 Stunden der Apoptose-Assay durchgeführt. Dabei dienten untransfizierte Zellen als Kontrolle, das Immunoreagenz als Leerwert und positive Kontroll-DNA aus dem Kit der Überprüfung der erfolgreichen Messung der Apoptosepartikel. Fehlerindikator = SEM, *p < 0.001 vs. untransfiziert, n = 3.

Die Überexpression von Id3 wird in der Literatur in Fibroblasten für eine verstärkte Apoptose verantwortlich gemacht (NORTON & ATHERTON, 1998). In der vorliegenden Arbeit konnte dieser Sachverhalt für VSMC nicht nachgewiesen werden. Die Blockade

der intrazellulären GKLf-mRNA durch entsprechende Antisense-Nukleotide hatte ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die Apoptoserate, sondern es zeigte sich nur ein Trend zugunsten einer verminderten Apoptose.

Hervorzuheben ist, dass eine Überexpression von GKLf in VSMC einen starken proapoptotischen Faktor darstellt, was in Kolontumorzellen bereits nachgewiesen wurde (CHEN et al., 2000). Es wurde gezeigt, dass auch die Transfektion mit Id3 antisense Ergebnisse in vergleichbarer Größenordnung erbrachte.

4.2 Die Regulation von GKLf durch OH[•] und Id3 durch O₂^{•-} und Angiotensin II

Nachdem in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe GKLf und Id3 als durch ROS in VSMC differentiell regulierte Faktoren identifiziert worden waren, wurden die zugrunde liegenden Regulationsmechanismen im Rahmen dieser Arbeit durch Stimulationsexperimente näher charakterisiert.

Zum Stimulationszeitpunkt waren alle Zellkulturplatten einschichtig konfluent bewachsen und die glatten Gefäßmuskelzellen durch zwölfstündigen Serumentzug synchronisiert. Die Stimulation mit reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) dauerte 3 Stunden, und radikalfangende Scavenger oder Signaltransduktionsinhibitoren wurden 30 Minuten vor der ROS-Stimulation vorinkubiert.

Anschließend erfolgte die RNA-Isolation (Kap. 3.2.3.1), Reverse Transkription (Kap. 3.2.3.4) und PCR (Kap. 3.2.4.2) oder Northern Blot (Kap. 3.2.3.3).

Bei der densitometrischen Auswertung erfolgte bei PCRs immer eine Verrechnung mit der GAPDH-Bande und bei Northern Blots eine Normalisierung auf die 18S-Bande des RNA-Gels, um Beladungsunterschiede auszugleichen. Das Kontrollniveau in jeder Stimulation bildeten gehungerte, unstimulierte Zellen.

4.2.1 mRNA-Regulation von GKLf nach Stimulation mit OH[•]

Im ersten Schritt wurde zur Ermittlung der effektiven Wirkkonzentration von OH[•] auf GKLf eine Dosiswirkungskurve erstellt, die in Abbildung 4.3 dargestellt ist.

Zur Erzeugung von Hydroxylradikalen (OH[•]) in den stimulierten Zellen diente die Fenton-Reaktion, in der die Kombination aus H₂O₂ und Fe³⁺Cl₃ und NTA (Fe³⁺NTA) eingesetzt wurde (Abschnitt 3.2.2.1). Die Stimulation mit 10 µM/l H₂O₂ und 2 µM/l Fe³⁺NTA bewirkte keine Änderung des GKLf-Spiegels (98 ± 5%), während die Stimulation mit 100 µM/l H₂O₂ und 20 µM/l Fe³⁺NTA im Mittel einen Anstieg auf 183 ±

6% des Kontrollwerts auslöste. Eine weitere Verzehnfachung dieser Dosis auf 1 mM/ H_2O_2 und 200 $\mu\text{M}/\text{l}$ Fe^{3+}NTA bewirkte hingegen nur eine Hochregulation von $176 \pm 5\%$. Eine Stimulation mit Superoxidanionen ($\text{O}_2^{\cdot-}$) durch Inkubation mit 100 $\mu\text{M}/\text{l}$ Purin und $1,6 \cdot 10^{-3}$ U/ml Hungermedium Xanthinoxidase bewirkte letztendlich keine signifikante Regulation der GKLf-mRNA ($88 \pm 15\%$, nicht gezeigt). Die Koinkubation der Zellen mit Hydroxylradikalen und 1 $\mu\text{M}/\text{l}$ Angiotensin II oder dem NO-Donor Nitroprussid-Natrium (SNP) hatte keinen Einfluss auf die Hochregulation von GKLf (im Mittel 177% bzw. 178%). Die alleinige Stimulation mit Angiotensin II und SNP führte zu keiner Veränderung des basalen GKLf-Spiegels ($103 \pm 4\%$ bzw. $96 \pm 12\%$, nicht dargestellt).

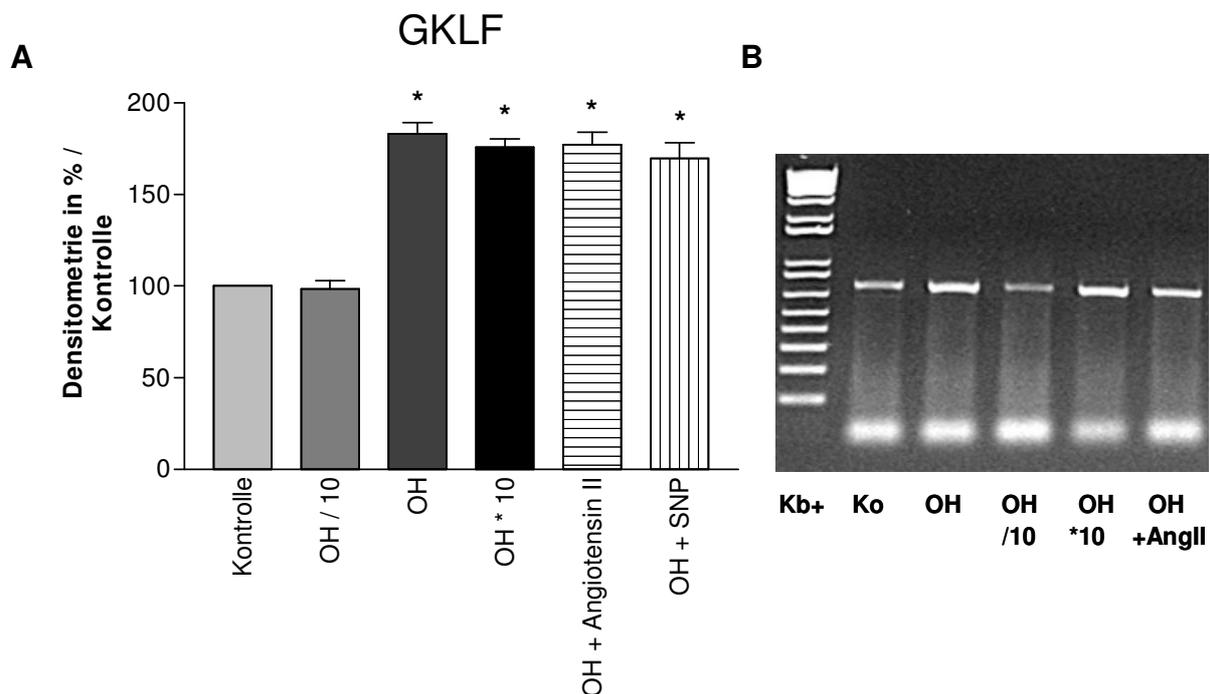


Abbildung 4.3 GKLf-Regulation durch Hydroxylradikale

A: Auswertung der densitometrischen Ergebnisse; **B:** Repräsentative GKLf-PCR. Stimulation 12 Stunden gehungerter VSMC über drei Stunden, danach RNA-Isolation und RT-PCR oder Northern Blot. **Angiotensin II** (1 $\mu\text{M}/\text{l}$) und Nitroprussid-Natrium (**SNP**, 1 $\mu\text{M}/\text{l}$) waren 30 Minuten vorinkubiert. **Kontrolle** (unstimulierte Zellen), **OH / 10** (10 $\mu\text{M}/\text{l}$ H_2O_2 + 2 $\mu\text{M}/\text{l}$ Fe^{3+}NTA), **OH** (100 $\mu\text{M}/\text{l}$ H_2O_2 + 20 $\mu\text{M}/\text{l}$ Fe^{3+}NTA), **OH * 10** (1 mM H_2O_2 + 200 $\mu\text{M}/\text{l}$ Fe^{3+}NTA). Fehlerindikator = SEM, * $p < 0.001$ vs. Kontrolle, $n \geq 3$.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die stärkste GKLf-Hochregulation durch Hydroxylradikale bei einer Stimulation mit 100 $\mu\text{M}/\text{l}$ H_2O_2 und 20 $\mu\text{M}/\text{l}$ NTA • 10 $\mu\text{M}/\text{l}$ $\text{Fe}^{3+}\text{Cl}_3$ fand. Diese Konzentration wurde daher auch bei allen weiteren Stimulationen die für Hydroxylstimulation verwendet.

$\text{O}_2^{\cdot-}$ aus dem XO-Purin-System, Angiotensin II und SNP hingegen hatten keinen statistisch signifikanten Effekt auf den GKLf-Spiegel.

4.2.2 mRNA-Regulation von Id3 nach Stimulation mit O₂⁻ und Angiotensin II

Die Stimulation mit Superoxidanionen wurde mit drei Konzentrationsstufen der Xanthinoxidase bzw. von Purin und Angiotensin II durchgeführt. Die resultierende Dosiswirkungskurve findet sich in Abbildung 4.4. 10 µM/l Purin und 1,6*10⁻⁴ U/ml XO bewirkten keine Regulation von Id3 (96 ± 5%). Die Stimulation mit 100 µM/l Purin und 1,6*10⁻³ U/ml XO regulierte Id3 auf 177 ± 7% der Kontrolle hoch. Die zehnfache O₂⁻-Dosis konnte diesen Effekt nicht wesentlich steigern (184 ± 16%). Wurden O₂⁻ über Angiotensin II produziert, kam es bei 0,1 µM/l zu einer Hochregulation auf 152 ± 13%, bei 1 µM/l auf 162 ± 4% und bei 10 µM/l auf 165 ± 10% des Ausgangswertes von Id3.

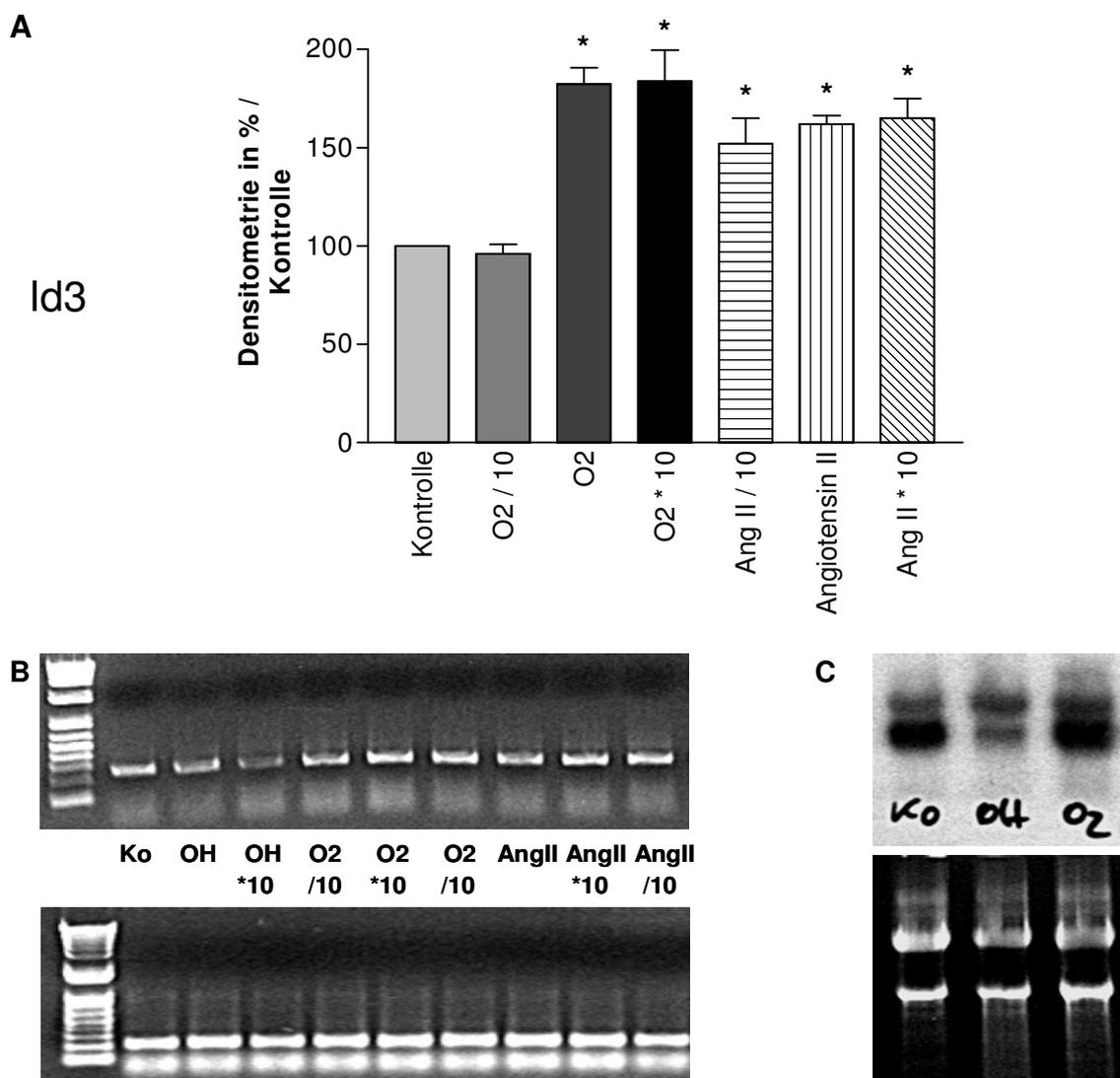


Abbildung 4.4 Id3-Regulation durch Superoxidanionen und Angiotensin II

A: Auswertung der densitometrischen Ergebnisse; **B:** Repräsentative PCR (oben: Id3, unten: GAPDH); **C:** Northern Blot (unten: RNA-Gel). Stimulation 12 Stunden gehungerter VSMC über drei Stunden, danach RNA-Isolation und RT-PCR oder Northern Blot. **Kontrolle** (unstimulierte Zellen), **O₂/10** (10 µM/l Purin + 1,6*10⁻⁴ U/ml XO), **O₂** (100 µM/l Purin + 1,6*10⁻³ U/ml XO), **O₂*10** (1 mM/l Purin + 1,6*10⁻² U/ml XO), **Ang II / 10** (0,1 µM/l), **Angiotensin II** (1 µM/l), **Ang II * 10** (10 µM/l), Fehlerindikator = SEM, *p < 0.01 vs. Kontrolle, n ≥ 3.

Die Stimulation mit Superoxidanionen führte zu einer reproduzierbaren und dosisabhängigen Induktion von Id3. Für alle weiteren Stimulationen wurden 100 µM/I Purin und $1,6 \cdot 10^{-3}$ U/ml XO verwendet. Die indirekte $O_2^{\cdot-}$ -Produktion über die AT_{1-} -Rezeptor-medierte Aktivierung der NADPH-Oxidase durch Angiotensin II (GRIENGLING et al., 1994) hatte im Vergleich zu Radikalen aus dem XO-Purin-System zwar eine tendenziell schwächere, dafür jedoch weniger konzentrationsabhängige Wirkung.

4.3 Die Wirkung von Radikalscavengern auf die redoxensitive Regulation von GKLF und Id3

Ein möglicher Kritikpunkt an der Radikalstimulation wie z.B. mit Hilfe der Fenton-Reaktion ist die Tatsache, dass zum einen durch die Reaktivität der ROS und zum anderen auf Grund der vorhandenen zellulären oxidativen und antioxidativen Enzymkomplexe möglicherweise mehrere reaktive Sauerstoffspezies gleichzeitig entstehen und die beobachteten Effekte somit nicht mehr zu differenzieren wären. Ferner stellte sich die Frage, ob die beobachteten Regulationen überhaupt ein direkter Effekt von ROS waren. Im nächsten Schritt sollte daher die Auswirkung einer Koinkubation mit verschiedenen Radikalfängern auf die GKLF- und Id3-Regulation durch reaktive Sauerstoffspezies untersucht werden. Die Mittelwerte der so gewonnenen Ergebnisse sind in den Abbildungen 4.5 und 4.6 zusammengestellt.

4.3.1 mRNA-Regulation von GKLF nach Stimulation mit OH^{\cdot} und Scavengern

Als Kontrolle der Effektivität der jeweiligen ROS-Stimulation waren in jeder Stimulationsreihe nur mit OH^{\cdot} , $O_2^{\cdot-}$ oder Angiotensin II stimulierte Zellen vorhanden. Um substanzspezifische Effekte der Scavenger zu detektieren, erfolgte zur Kontrolle stets auch die Inkubation mit dem jeweiligen Scavenger ohne gleichzeitige ROS-Gabe. Die Catalase stellt einen essentiellen zellulären Schutz vor Sauerstoffradikalen dar, und fängt in vivo während des Stoffwechsels gebildete Peroxidmoleküle durch Katalyse der Reaktion zu H_2O und O_2 ab, um die zelluläre DNA vor Radikalschäden zu bewahren (TILLY & TILLY, 1995). Bei alleiniger Stimulation hatte Catalase keinen Effekt auf GKLF ($99 \pm 4\%$), blockierte jedoch die durch OH^{\cdot} induzierte GKLF-Hochregulation vollständig ($92 \pm 8\%$). Mannitol als weiterer Hydroxylscavenger zeigte ein ähnliches Ergebnis ($91 \pm 9\%$ bzw. mit OH^{\cdot} $98 \pm 13\%$).

Die Superoxiddismutase (SOD) ist ebenfalls ein zelluläres Scavengersystem und katalysiert die Dismutation von $O_2^{\cdot-}$ und Protonen zu H_2O_2 und O_2 . Wurde SOD als Radikalfänger eingesetzt, konnte die OH^{\cdot} -abhängige GKLF-Regulation auf $170 \pm 8\%$ nicht gehemmt werden. Dasselbe Resultat zeigte sich bei Tiron, einem künstlich hergestellten zellpermeablen Superoxidradikalscavenger (LEDENEV et al., 1986). Bei alleiniger Inkubation ergaben sich bei der densitometrischen Auswertung der Northern Blots für GKLF $94 \pm 14\%$ des Kontrollniveaus, zusammen mit OH^{\cdot} ergaben sich $183 \pm 12\%$ des Ausgangswertes.

Der unspezifische Hemmstoff flavoproteinhaltiger Enzyme wie z.B. der membran-gebundenen NADPH-Oxidase DPI (STUEHR et al., 1991) beeinflusste allein GKLF nicht ($107 \pm 4\%$) und blockierte den Hydroxyleffekt nicht ($173 \pm 6\%$).

Auch Atorvastatin, einem klinisch eingesetzten HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor, wird nach neueren Erkenntnissen das Potential zugeschrieben, Radikale abzufangen (WASSMANN et al., 2002). Diese Substanz hatte in einer Dosierung von $10\mu M/l$ ($104 \pm 17\%$) auf die Induktion von GKLF keinen signifikanten Effekt ($156 \pm 7\%$).

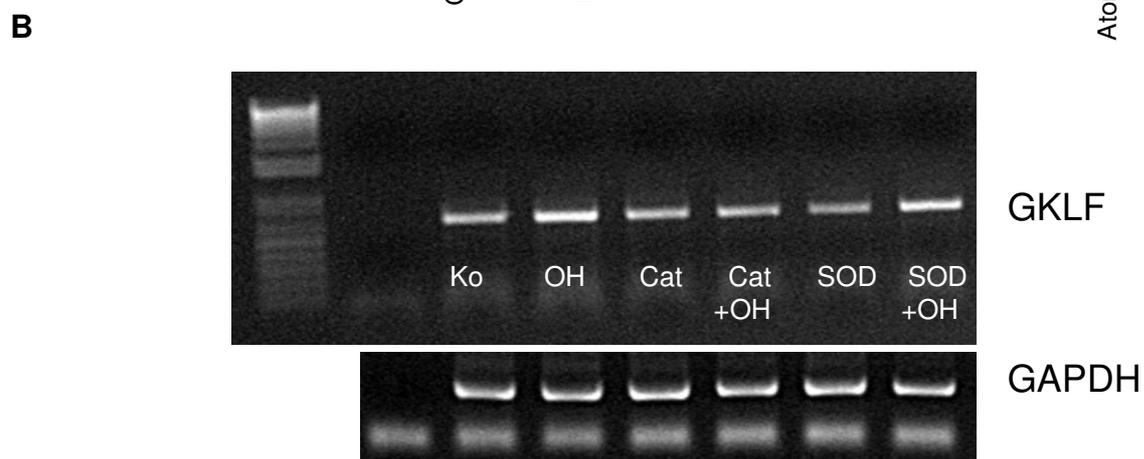
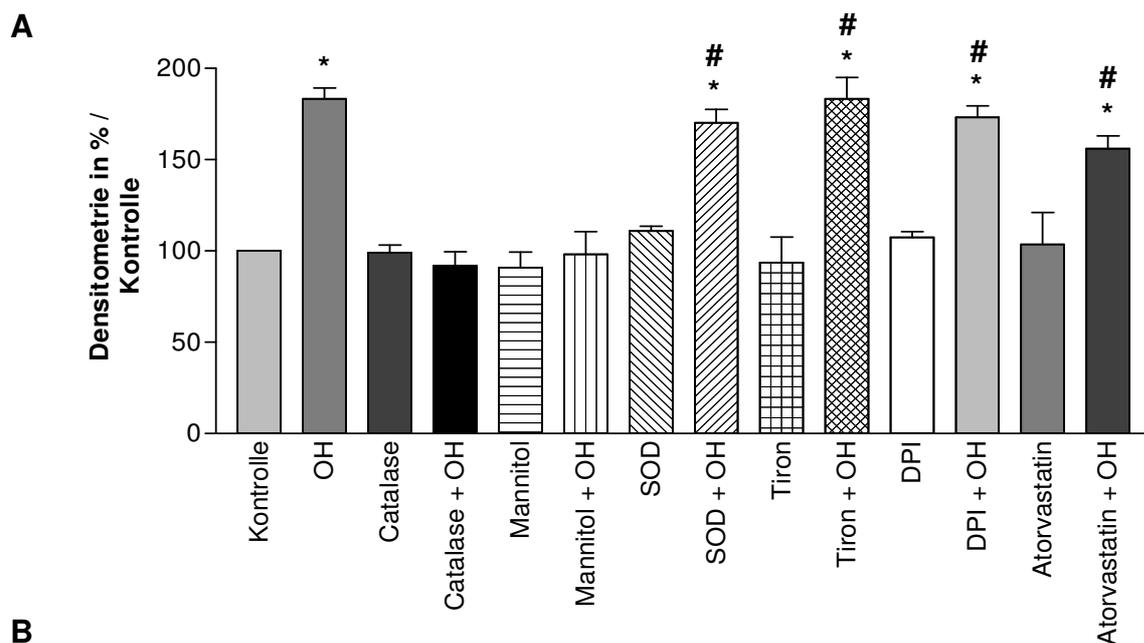


Abbildung 4.5 GKLF-Regulation nach Inkubation mit OH[•] und Radikalscavengern

A: Auswertung der densitometrischen Ergebnisse; **B:** Repräsentative PCR auf GKLF- und GAPDH. Stimulation 12 Stunden gehungerter VSMC über drei Stunden, danach RNA-Isolation und RT-PCR oder Northern Blot. **Kontrolle** (unstimulierte Zellen), **OH** (100 µM/l H₂O₂ + 20 µM/l Fe³⁺NTA). Folgende Radikalscavenger waren jeweils 30 Minuten vorinkubiert: **Catalase** (200 U/ml), **Mannitol** (20 mM/l), **SOD** (150 U/ml), **Tiron** (4,5-Dihydroxy-1,3-benzene-disulfonsäure, 10 mM/l), **DPI** (100 µM/l) und **Atorvastatin** (10 µM/l). Fehlerindikator = SEM, *p < 0.001 vs. Kontrolle, #p > 0.05 vs. OH, n ≥ 3.

Die hydroxylabhängige Expressionssteigerung des GKLF-Gens konnte durch Catalase und Mannitol, nicht jedoch durch SOD, Tiron oder DPI gehemmt werden. Die superoxidabhängige Herabregulation konnte durch SOD, Tiron und DPI, aber nicht durch Catalase oder Atorvastatin verhindert werden.

Durch die Stimulationsexperimente mit obigen Radikalfängern konnte gezeigt werden, dass die gesteigerte Expression von GKLF bei Stimulation mit H₂O₂ und Fe³⁺NTA ein rein durch OH[•] bestimmter Effekt ist, da nur Hydroxylscavenger diese Regulation verhinderten. Drei Superoxidscavenger mit verschiedenen Angriffspunkten hatten auf die GKLF-Induktion keine Wirkung, so dass eine Rolle von O₂^{•-} mit großer Sicherheit auszuschließen ist. Diese Differenzierung der Radikalwirkungen und Radikalspezies bildet die Grundlage aller Erklärungsversuche des komplexen redoxsensitiven intrazellulären Signalnetzwerks. Während eine Vielzahl verschiedener und zum Teil gegensätzlicher Wirkungen der Sauerstoffradikale in einer Reihe von Zelltypen beschrieben wurden (ALLEN & TRESINI, 2000), wurde für VSMC herausgefunden, dass H₂O₂ eher hemmend auf das Zellwachstum und O₂^{•-} eher stimulierend wirkt (BAAS & BERK, 1995). Dies stimmt damit überein, dass der antiproliferative Transkriptionsfaktor GKLF auf Grund einer spezifischen Hydroxylwirkung verstärkt gebildet wurde.

4.3.2 mRNA-Regulation von Id3 nach Stimulation mit O₂^{•-} und Scavengern

Im nächsten Schritt wurden wie bei GKLF die Auswirkungen einer Koinkubation von ROS und verschiedenen Radikalfängern auf die Id3-Regulation beobachtet.

Der Hydroxylscavenger Catalase bewirkte allein keine Veränderung des Id3-Spiegels (100 ± 5%) und hatte keine Wirkung auf die Heraufregulation durch O₂^{•-} aus dem XO-Purin-System (161 ± 5%) oder durch die durch Angiotensin II produzierten Radikale (157 ± 7%). Eine Kopplung an Polyethylenglykol (PEG) bewirkt bei Substanzen, die die Zellmembran schwer passieren, eine verbesserte Aufnahme in die Zellen (BECKMAN et al., 1988). Die Stimulation mit PEG-Catalase führte zu vergleichbaren Resultaten (99 ± 6% und 166 ± 23%, Ergebnisse nicht grafisch gezeigt).

Superoxiddismutase ($105 \pm 4\%$ bei alleiniger Stimulation) konnte die Wirkung von XO-Purin ($102 \pm 5\%$) und AngII ($101 \pm 4\%$) aufheben, was durch die Stimulation mit PEG-SOD bestätigt wurde. Der Superoxidscavenger Tiron ($96 \pm 8\%$) konnte die Heraufregulation von Id3 durch $O_2^{\cdot -}$ ebenso inhibieren (XO-Purin: $106 \pm 9\%$; Angiotensin II: $103 \pm 5\%$). Der Flavoproteininhibitor DPI ($99 \pm 12\%$) hob sowohl den Effekt von Angiotensin II ($97 \pm 3\%$) als auch die Wirkung von durch die XO produzierten $O_2^{\cdot -}$ auf ($103 \pm 6\%$).

Schließlich zeigte der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor Atorvastatin ($106 \pm 5\%$) eine deutliche Wirkung auf die Id3-Induktion durch $O_2^{\cdot -}$ ($100 \pm 8\%$).

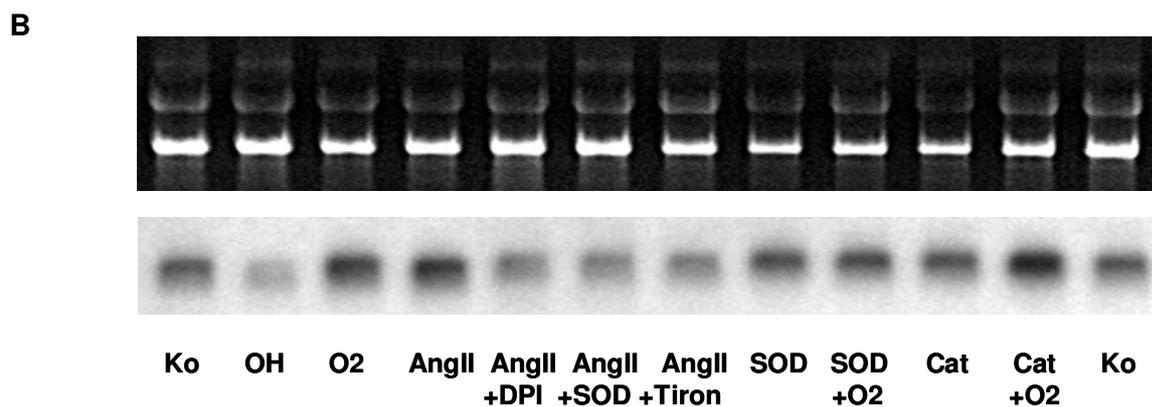
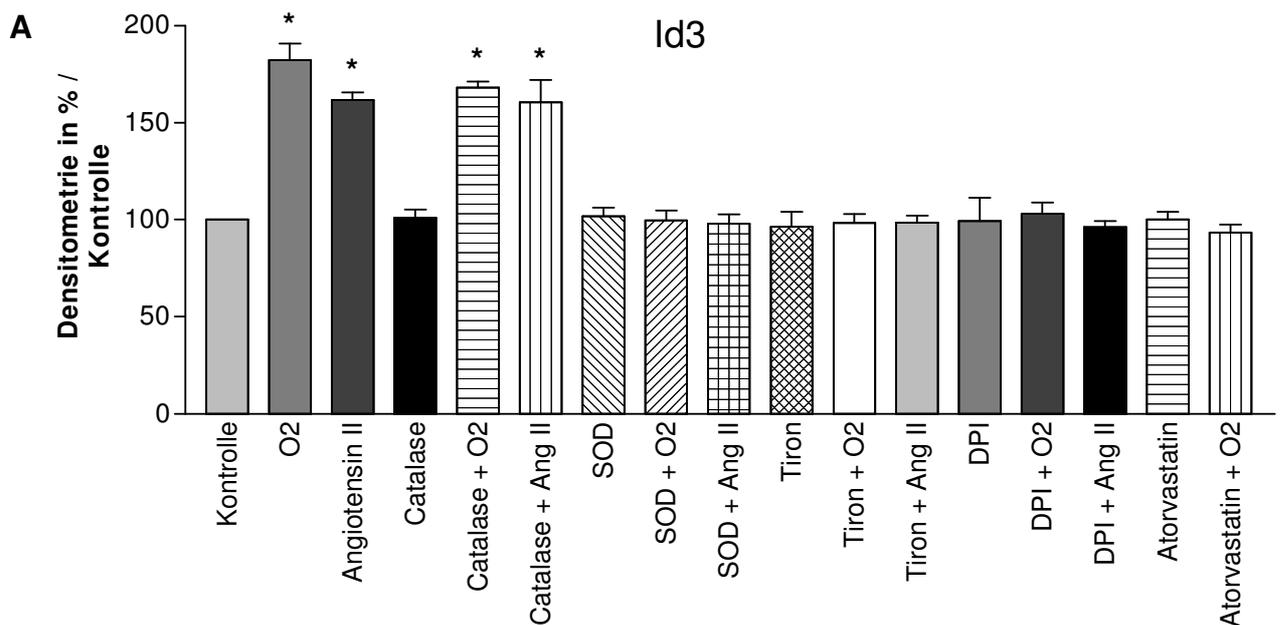


Abbildung 4.6 Id3-Regulation nach Inkubation mit $O_2^{\cdot -}$, Ang II und Radikalscavengern

A: Auswertung der densitometrischen Ergebnisse; **B:** Repräsentativer Id3-Northern Blot (und RNA-Gel). Stimulation 12 Stunden gehungerter VSMC über drei Stunden, danach RNA-Isolation und RT-PCR oder Northern Blot. **Kontrolle** (unstimulierte Zellen), **O₂** (100 μ M/ Purin + $1,6 \cdot 10^{-3}$ U/ml XO), **Angiotensin II** (1 μ M/l). Folgende Radikalscavenger waren jeweils 30 Minuten vorinkubiert: **Catalase** (200 U/ml), **SOD** (150 U/ml), **Tiron** (4,5-Dihydroxy-1,3-benzene-disulfonsäure, 10 mM/l), **DPI** (100 μ M/l) und **Atorvastatin** (10 μ M/l). Fehlerindikator = SEM, *p < 0.01 vs. Kontrolle, n \geq 3.

Die in Abbildung 4.6 dargestellten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Hochregulation der Id3-mRNA durch Superoxidradikale bei Koinkubation mit SOD, PEG-SOD, Tiron, DPI und Atorvastatin gehemmt wurde. Der Hydroxylscavenger Catalase bzw. dessen mit PEG gekoppelte Form zeigte keinen Effekt.

Die Tatsache, dass Atorvastatin die Id3-Regulation durch $O_2^{\cdot -}$ in der vorliegenden Arbeit verhindern konnte, unterstützt die vielfältigen Beobachtungen pleiotroper Effekte dieser Substanz, die über die Wirkung als Hemmstoff der Cholesterinbiosynthese hinausgehen (WASSMANN et al., 2002).

Bemerkenswert ist die Tatsache, dass DPI auch die Wirkung von $O_2^{\cdot -}$ aus dem XO-Purin-System blockierte. Dies lässt sich am ehesten dadurch erklären, dass die katalytische Aktivität der Xanthinoxidase ebenfalls flavinabhängig ist (SKIBO, 1986)

Die aufgeführten Befunde zeigen erneut einen radikalspezifischen Einfluss auf einen für die Proliferation und Apoptose von VSMC bedeutsamen Faktor. Die Beobachtung, dass die Expression von Id3 durch $O_2^{\cdot -}$ induziert wird, passt gut zu den in anderen Arbeiten erlangten Erkenntnissen, dass Superoxidradikale in vaskulären Zellen Proliferationssignale vermitteln (BAAS & BERK, 1995).

4.4 Der Effekt von Signalwegsinhibitoren auf die Regulation von GSKF und Id3

Im Folgenden wurden bestimmte intrazelluläre Signalwege mit spezifischen Inhibitoren und Toxinen (vgl. Kap. 3.2.2.3, Tab. 3.1) gehemmt, um die Mechanismen der GSKF-Regulation durch Hydroxylradikale und der Id3-Regulation durch Superoxidanionen in VSMC offenzulegen. Abb. 4.7 skizziert die die inhibierten Signalwege. Die Mittelwerte der entsprechenden densitometrischen Auswertungen sind in Abb. 4.8 und 4.9 gezeigt.

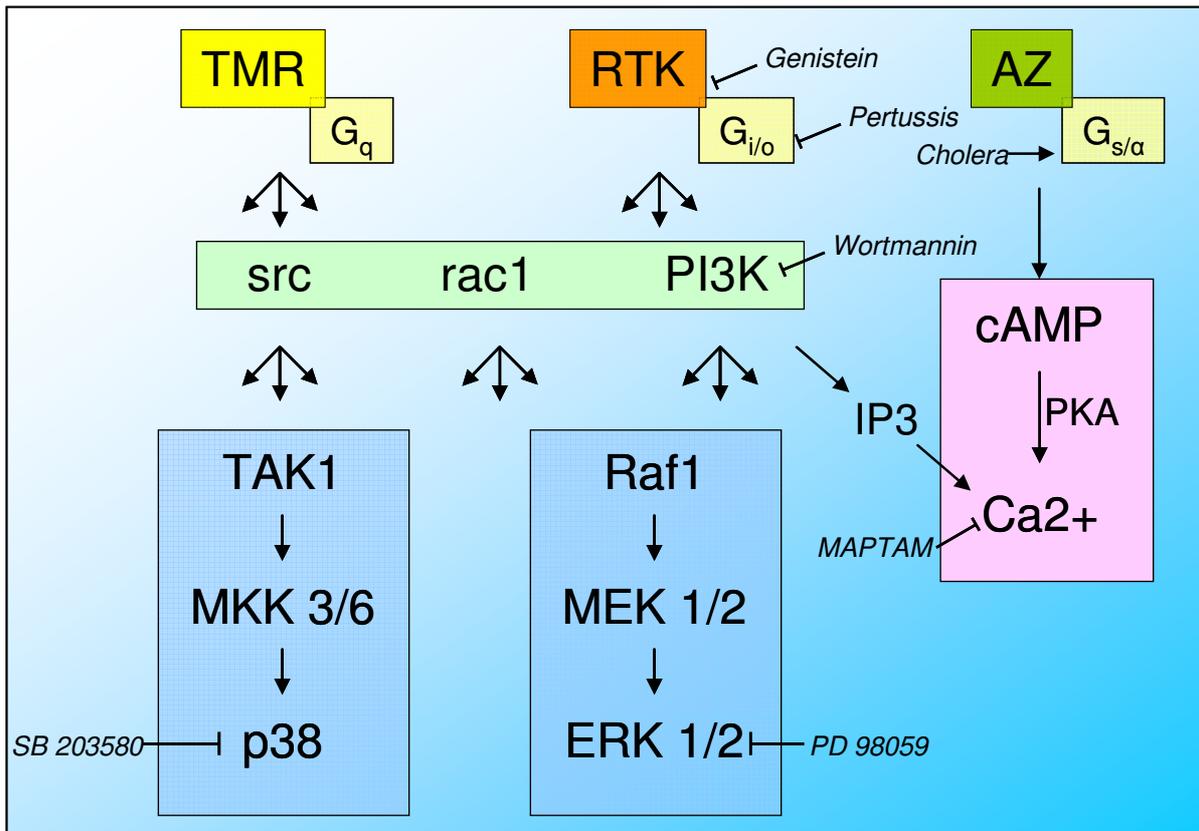


Abbildung 4.7 Schematische Darstellung der wichtigsten inhibierten Signalwege

Abkürzungen: TMR – Transmembranrezeptor (z.B. Angiotensin II – Rezeptor); RTK – Rezeptor-tyrosinkinase (z.B. Rezeptor für Platelet-derived Growth Factor); AZ – Adenylylzyklase; G_q, G_{i/o} und G_{s/α} – G-Proteine; src – Zytoplasmatische Tyrosinkinase; PI3K – Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase; cAMP – zyklisches AMP; PKA – Proteinkinase A; Ca²⁺ – Kalziumionen; TAK1 und Raf1 – MAP Kinase Early Kinase Kinase; MKK 3/6 und MEK 1/2 - MAP Kinase Early Kinase; p38 – p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase; ERK 1/2 – Extracellular signal-related Kinase.

4.4.1 mRNA-Regulation von GSKF nach Stimulation mit OH⁻ und Inhibitoren

Mit Genistein wurde die Funktion der zellulären (z.B. src-Kinase) und rezeptor-gebundenen tyrosinabhängigen Proteinkinasen, deren Tätigkeit ein wichtiges Element der durch Wachstumsfaktoren wie IGF, TGFβ und EGF ausgelösten Signalkaskaden

darstellt, spezifisch gehemmt, während Serin- und Threoninkinasen (z.B. Proteinkinase C, Adenylat-zyklase) unbeeinträchtigt blieben (AKIYAMA et al., 1987). Genistein allein hatte keinen Effekt auf die GKLf-Expression ($96 \pm 3\%$) und konnte die hydroxylabhängige Hochregulation auf $175 \pm 12\%$ nicht verhindern.

Im kaskadenartig angeordneten System der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) konnte der spezifische Hemmstoff der p38 MAPK SB 203580 ($100 \pm 8\%$) die Wirkung von OH[•] auf GKLf verhindern ($93 \pm 6\%$), während der p42/p44 MAPK-Hemmer PD 98059 ($96 \pm 6\%$) dies nicht vermochte ($208 \pm 21\%$). Zu unterscheiden ist dabei zwischen der für die Wirkung von Mitogenen wie PDGF, FGF, AngII (EGUCHI et al., 1996) und Insulin (GOETZE et al., 2000) verantwortlichen ERK und der durch andere Faktoren wie Hypoxie, proinflammatorische Zytokine und Sauerstoffradikale aktivierten p38 MAPK (HASHIMOTO et al., 1999; ROBINSON et al., 1999; ALLEN & TRESINI, 2000).

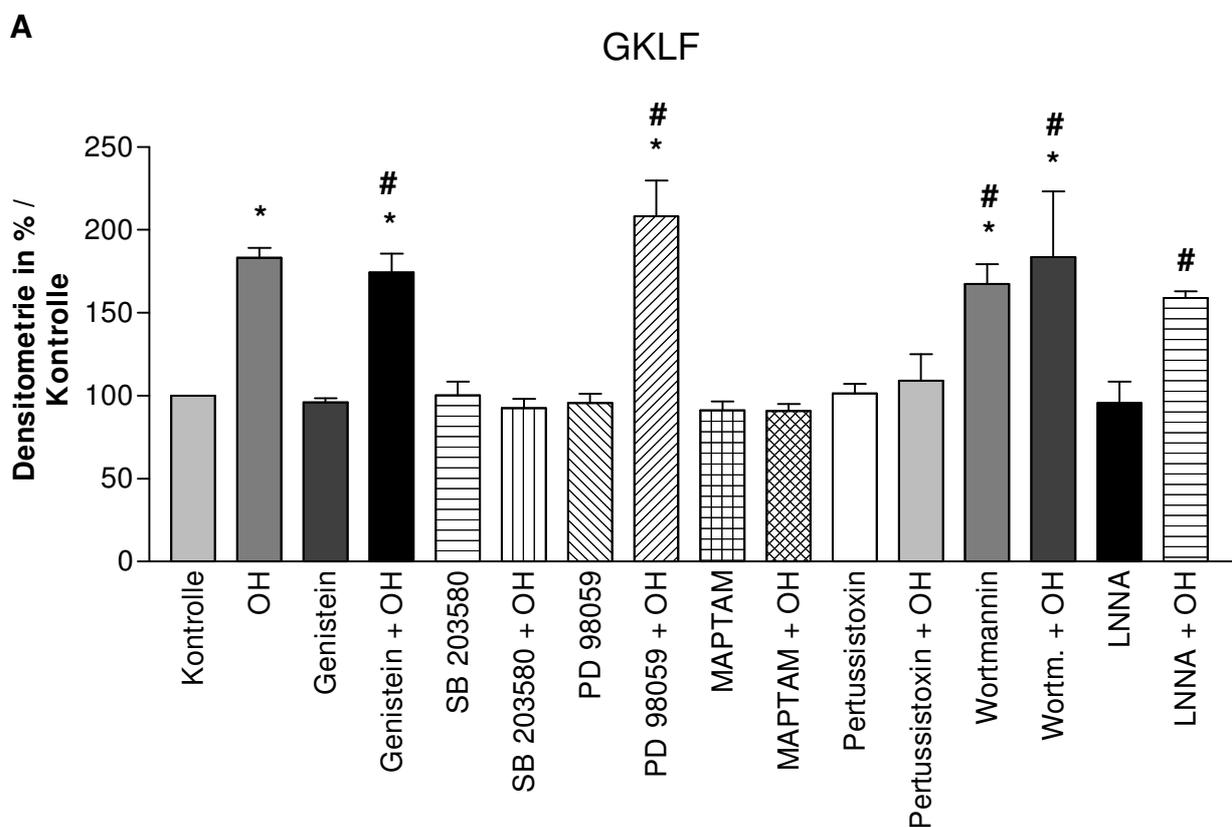
Signale, die von der Bindung von Calcium an Ca²⁺-bindende Proteine wie Calmodulin abhängig sind, beispielsweise der Weg der Adenylatzyklase über cAMP und die Proteinkinase A zum cAMP-response element (CRE), wurden mit Hilfe von MAPTAM, einem potenten extra- und intrazellulären Calcium-Chelator (LEFKOWITH et al., 1992), gehemmt. In VSMC spielen Calciumionen zum Beispiel auch für die Auslösung der Konstriktion und die Transduktion proliferativer Signale eine Rolle (DREHER & JUNOD, 1995). Ihre Ausschüttung erfolgt beispielsweise nach Einwirkung von Lipidbotenstoffen wie IP₃ aus dem sarkoplasmatischen Retikulum der Gefäßmuskelzelle (TOKER, 2000). MAPTAM (92 ± 5) konnte den Hydroxyleffekt auf GKLf vollständig aufheben ($91 \pm 4\%$). Pertussistoxin, das Endotoxin von *Bordetella pertussis*, spaltet aus NAD die ADP-Ribose ab und überträgt sie auf die α -Seitenketten inhibitorischer G_{i/o}-Proteine (HEWLETT et al., 1983). Damit wird die Funktion des Heterotrimers irreversibel blockiert, was zu einem Verlust inaktivierender Signale der Adenylatzyklase führt. Solche G-Proteine sind beispielsweise an Angiotensin-, Prostaglandin- und Opiatrezeptoren gekoppelt (KAZIRO et al., 1991). Bei alleiniger Inkubation mit Pertussistoxin fand sich kein Einfluss auf den mRNA-Level von GKLf ($102 \pm 6\%$). Die Koinkubation mit OH[•] zeigte eine deutliche Blockade der GKLf-Induktion (109 ± 16).

Der Signalweg von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu Inositol-Trisphosphat (IP₃), Diacylglycerin (DAG) und weiteren Lipidmediatoren wird durch die Phospholipasen β und γ und über die Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3-Kinase) gesteuert. Die Spaltprodukte membranständiger Phospholipide steuern viele Signale, die für Zellfunktion, -proliferation und -überleben unerlässlich sind (TOKER, 2000). Die Aktivität der PI3-Kinase wird vor allem durch Rezeptortyrosinkinasen wie den

PDGF-Rezeptor reguliert (RAMEH & CANTLEY, 1999). und durch Substanzen wie Wortmannin blockiert (BAI et al., 1999). Dieser Inhibitor zeigte auch bei alleiniger Inkubation eine Hochregulation von GKLF auf $167 \pm 12\%$ des Kontrollniveaus. Die zusätzliche OH⁻-Stimulation führte zu einem mittleren GKLF-Spiegel von $187 \pm 38\%$.

Das mit L-Arginin strukturell verwandte ω-N-Nitro-L-Arginin (LNNA) ist ein Hemmstoff der NO-Synthase, die in bestimmten Situation nicht nur NO, sondern auch O₂⁻ bildet (CAI & HARRISON, 2000). Dieser Inhibitor konnte die GKLF-Hochregulation durch OH⁻ nicht signifikant vermindern ($156 \pm 7\%$).

Das antifungale Antibiotikum Cycloheximid verhindert in Eukaryoten die Translation durch direkte Interaktion mit der Translokase (OBRIG et al., 1971). Bei alleiniger Stimulation mit diesem Inhibitor fand sich für GKLF im Mittel mit $212 \pm 11\%$ ein hoher Spiegel im Vergleich zum Kontrollniveau und bei Koinkubation mit OH⁻ $239 \pm 28\%$ (nicht gezeigt). Der Transkriptionshemmer Actinomycin D komplexiert über desoxy-Guanosin-Reste mit doppelsträngiger DNA und verhindert so die Funktion der DNA-abhängigen RNA-Polymerase (WU & YUNG, 1993). Sowohl bei alleiniger Inkubation mit Actinomycin D ($52 \pm 14\%$) als auch bei Koinkubation mit OH⁻ ($39 \pm 8\%$) fanden sich stark erniedrigte GKLF-Werte.



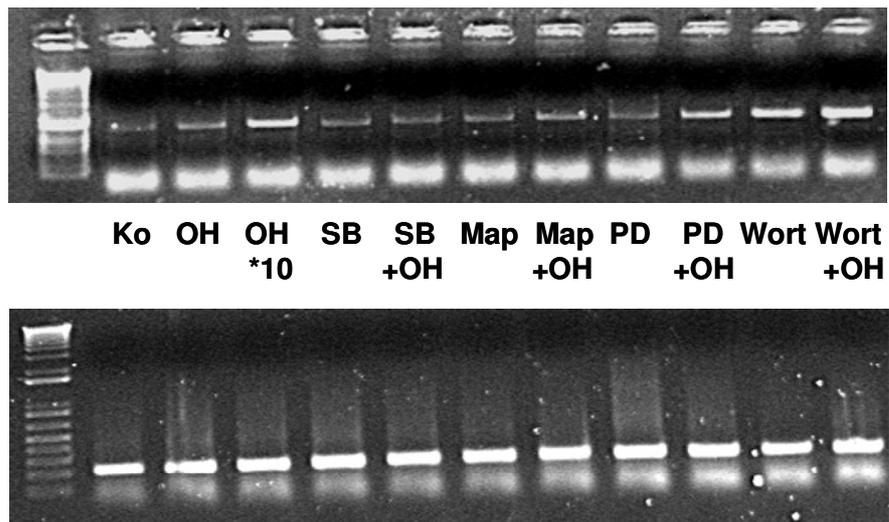
B

Abbildung 4.8 GKLf-Regulation nach Inkubation mit OH[•] und Signalwegsinhibitoren

A: Auswertung der densitometrischen Ergebnisse; **B:** Repräsentative GKLf- und GAPDH-PCR. Stimulation 12 Stunden gehungerter VSMC über drei Stunden, danach RNA-Isolation und RT-PCR oder Northern Blot. **Kontrolle** (unstimulierte Zellen), **OH** (100 μ M/l H₂O₂ + 20 μ M/l Fe³⁺NTA). Folgende Inhibitoren waren jeweils 30 Minuten vorinkubiert: **Genistein** (0,2 μ M/l), **SB 203580** (10 μ M/l), **PD 98059** (20 μ M/l), **MAPTAM** = 1,2-bis(2-amino-5-methylphenoxyethan)-NNN'-N'-tetraacetic acid-tetraacetoxymethylester (20 μ M/l), **Pertussistoxin** (200ng/ml). Fehlerindikator = SEM, *p < 0.001 vs. Kontrolle, #p > 0.05 vs. OH, n \geq 3.

Zusammenfassend lassen sich in Bezug auf die GKLf-Regulation folgende Ergebnisse aus den Stimulationen mit ROS und Signaltransduktionsinhibitoren festhalten:

Genistein, PD 98059 und LNNA hatten keinen Effekt auf die GKLf-Regulation durch Hydroxylradikale.

Die reproduzierbare Hochregulation von GKLf durch Wortmannin lässt sich möglicherweise durch die Beobachtung erklären, dass die Apoptose in VSMC durch einen PI3K-abhängigen Weg verhindert wird. Eine Blockade dieses Weges führt bei zellulärer Belastung wie z.B. Serumentzug zu einer erhöhten Apoptoserate (BAI et al., 1999).

Der Induktion von GKLf durch den Translationshemmstoff Cycloheximid lässt sich beispielsweise durch einen Feedback-Mechanismus zu erklären, der bei Abfall der Konzentration eines kurzlebigen Proteins die Transkription des entsprechenden Genes erhöht, um die Menge des Genproduktes konstant zu halten. Andererseits ist Cycloheximid ein starkes Zellgift, so dass GKLf als negativer Zellzyklusregulator im Rahmen der Zellschädigung positiv reguliert werden könnte.

Eine Transkriptionshemmung mittels Actinomycin D führte durch die Degradation der GKLf-mRNA ohne Chance auf Neubildung unabhängig von der Radikalstimulation zu stark erniedrigten GKLf-Werten.

Auf Grund der Blockade der OH[•]-medierten GKLf-Hochregulation durch SB 203580, MAPTAM und Pertussistoxin lässt sich feststellen, dass die redox-sensitive Regulation dieses Faktors von der Funktion der p38 MAPK, dem intrazellulären Ca²⁺-Spiegel und der Funktion inhibitorischer G-Proteine bestimmt wird.

4.4.2 mRNA-Regulation von Id3 nach Stimulation mit O₂^{•-} und Inhibitoren

Im Anschluss wurde für Id3 analog versucht, mit Hilfe verschiedener Signaltransduktionsinhibitoren Einsicht in die an der superoxidabhängigen Regulation beteiligten Signalwege zu erlangen.

Genistein (108 ± 15%) konnte den induzierenden Effekt von O₂^{•-} auf die Id3-Expression blockieren (103 ± 7%). Der PI3-Kinase-Hemmstoff Wortmannin wirkte sich bei alleiniger Inkubation nicht auf die Id3-Regulation aus (106 ± 14%) und hatte auf die Wirkung von O₂^{•-} keinen Einfluss (163 ± 2%).

SB 203580 (allein 101 ± 3%) hemmte die Heraufregulation durch O₂^{•-} (97 ± 5%) und Angiotensin II (nicht gezeigt, 95 ± 6%). Wurden Zellen mit dem p42/p44 MAPK-Inhibitor PD 98059 stimuliert, ergab die Auswertung im Mittel 96 ± 7% des Kontrollniveaus. Wie SB 203580 konnte PD 98059 die Induktion von Id3 durch O₂^{•-} aus dem XO-Purin-System (104 ± 7%) und nach AngII-Stimulation (nicht gezeigt, 96 ± 5%) verhindern.

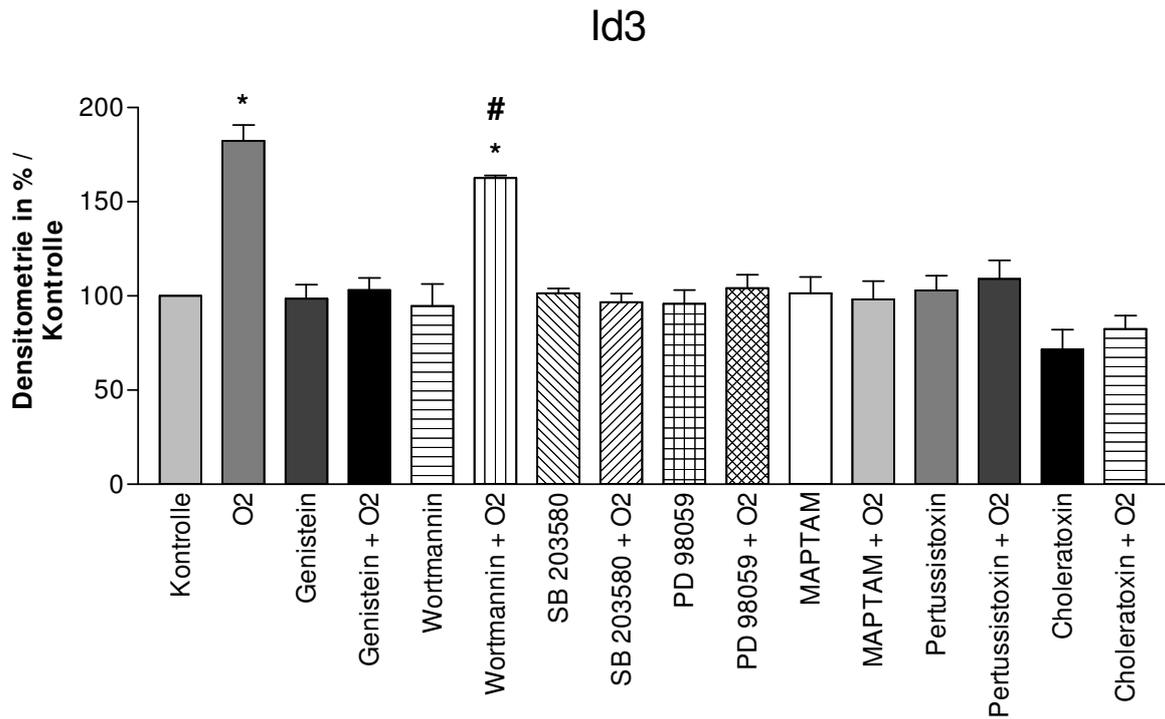
Auch MAPTAM (104 ± 11%) verhinderte den Anstieg von Id3 durch O₂^{•-} (103 ± 10%).

Bei Stimulation mit Pertussistoxin (101 ± 8) wurde die Heraufregulation von Id3 inhibiert (109 ± 10%).

Die irreversible Aktivierung der Adenylatzyklase durch Cholera-toxin (95 ± 3%), das Exotoxin aus *Vibrio cholerae*, welches die ADP-Ribosylierung stimulatorischer G_{sα}-Proteine katalysiert (GILL & MEREN, 1978; VAN HEYNINGEN, 1982), blockierte die Induktion der Id3-Expression durch O₂^{•-} (82 ± 7%).

Cycloheximid (nicht gezeigt) regulierte die Id3-mRNA unter Basalbedingungen (209 ± 21%) und bei Koinkubation mit O₂^{•-} (239 ± 33%) stark hoch. Actinomycin D (nicht gezeigt) senkte Id3 bei alleiniger (46 ± 2%) und Koinkubation mit O₂^{•-} (26 ± 6%) ab.

A



B

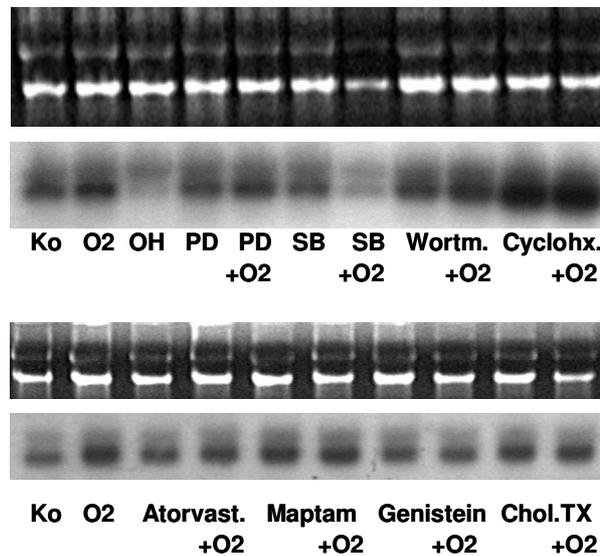


Abbildung 4.9 Id3-Regulation nach Inkubation mit O₂^{•-}, Angiotensin II und Inhibitoren

A: Auswertung der densitometrischen Ergebnisse; **B:** Zwei repräsentative Id3-Northern Blots (oben jeweils RNA-Gel). Stimulation 12 Stunden gehungerter VSMC über drei Stunden, danach RNA-Isolation und RT-PCR oder Northern Blot. **Kontrolle** (unstimulierte Zellen), **O₂** (100 μM/l Purin + 1,6*10⁻³ U/ml XO). Folgende Inhibitoren waren jeweils 30 Minuten vorinkubiert: **Genistein** (0,2 μM/l), **Wortmannin** (0,1 μM/l), **SB 203580** (10 μM/l), **PD 98059** (20 μM/l), **MAPTAM** = 1,2-bis(2-amino-5-methylphenoxyethan)-NNN'N'-tetraacetic acid-tetraacetoxymethylester (20 μM/l), **Pertussistoxin** (200 ng/ml), **Cholera toxin** (100 ng/ml). Fehlerindikator = SEM, *p < 0.01 vs. Kontrolle, #p > 0.05 vs. O₂, n ≥ 3.

Zusammenfassend zeichnet sich somit für die Regulation der verstärkten Id3-Expression nach Superoxidradikalstimulation ein Signalweg ab, der auf Rezeptorebene $G_{i\alpha}$ - und $G_{s\alpha}$ -Proteine sowie Tyrosinkinase involviert, im weiteren Verlauf von MAPK wie p38 und ERK abhängt und der in seiner Funktion vom cytosolischen Calciumspiegel beeinflusst wird. Für die PI3-Kinase konnte in diesem Kontext keine Bedeutung gezeigt werden.

Bei Hemmung der Translation mit Cycloheximid fanden sich radikalunabhängig hohe Id3-mRNA-Spiegel, was wiederum auf einen Feedback-Mechanismus wie in Kap. 4.4.1 beschrieben hindeutet. Der Transkriptionsblocker Actinomycin D führte zu niedrigen und durch Stimulation nicht induzierbaren Id3-Spiegeln.

4.5 Experimentelle Hinweise auf einen Zusammenhang der Regulation von GKLf und Id3

In den Vorarbeiten der Arbeitsgruppe (Vgl. Kapitel 2.3.4) bzw. aus den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen (BAAS & BERK, 1995) ist bekannt, dass OH[•] in VSMC antiproliferativ wirken. In den bisher gezeigten Ergebnissen wurde GKLf als möglicher Vermittler dieses Radikaleffekts präsentiert. Auf der anderen Seite besteht auch die Möglichkeit, dass durch OH[•] die Expression wachstumsfördernder Faktoren wie z.B. Id3 gehemmt wird.

4.5.1 mRNA-Regulation von Id3 nach Stimulation mit Hydroxylradikalen

Daher wurde in weiteren Stimulationsexperimenten und aus den vorhandenen Proben aus Abschnitt 4.2.1, 4.3.1 und 4.4.1 der Id3-mRNA-Spiegel mittels RT-PCR oder Northern Blot ermittelt, um den Einfluss von Hydroxylradikalen auf die Id3-Expression zu untersuchen (Abbildung 4.10 und 4.11).

Die Stimulation mit 10 µM/l H₂O₂ und 2 µM/l Fe³⁺NTA bewirkte keine statistisch signifikante Änderung des Id3-Spiegels (76 ± 4%), während die Stimulation mit 100 µM/l H₂O₂ und 20 µM/l Fe³⁺NTA im Mittel einen Abfall auf 47 ± 3% des Kontrollwerts auslöste (siehe z.B. Abb. 4.11 B). Eine Verzehnfachung der Dosis auf 1 mM/l H₂O₂ und 200 µM/l Fe³⁺NTA verstärkte diesen Effekt noch weiter (27 ± 4%).

Die Koinkubation der Zellen mit Hydroxylradikalen und dem NO-Donor Nitroprussid-Natrium (111 ± 6%, nicht gezeigt) hatte keinen Einfluss auf den Abfall von Id3 (53 ± 8%), während 1 µM/l Angiotensin II die Herabregulation auf 65 ± 5% begrenzte.

Die durch OH[•]-induzierte Verminderung der Id3-Expression konnte durch Hydroxylscavenger wie Catalase (96 ± 7%) blockiert werden, nicht jedoch durch O₂^{•-}-Scavenger wie SOD, DPI oder den HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor Atorvastatin (grafisch nicht dargestellt).

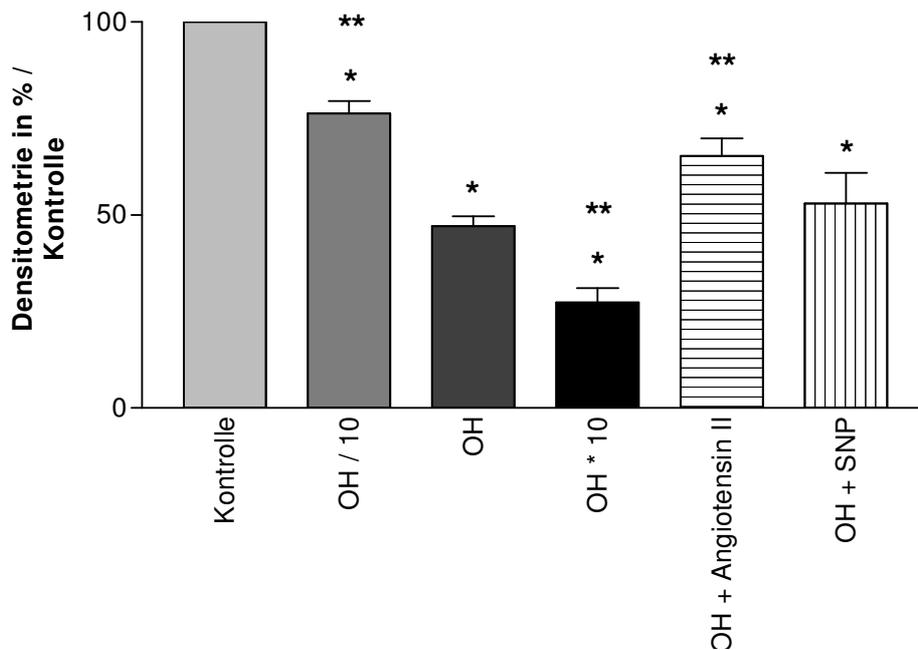


Abbildung 4.10 Id3-Regulation durch Hydroxylradikale

Auswertung der densitometrischen Ergebnisse. Stimulation 12 Stunden gehungerter VSMC über drei Stunden, danach RNA-Isolation und RT-PCR oder Northern Blot. **Angiotensin** II (1µM/l) und Nitroprussid-Natrium (**SNP**, 1 µM/l) waren 30 Minuten vorinkubiert. **Kontrolle** (unstimulierte Zellen), **OH / 10** (10µM/l H₂O₂ + 2 µM/l Fe³⁺NTA), **OH** (100 µM/l H₂O₂ + 20 µM/l Fe³⁺NTA), **OH * 10** (1 mM/l H₂O₂ + 200 µM/l Fe³⁺NTA). Fehlerindikator = SEM, *p < 0.01 vs. Kontrolle, ** p < 0.01 vs. OH, n ≥ 3.

Zusammenfassend kann man sagen, dass in der vorliegenden Arbeit das Helix-Loop-Helix-Protein Id3 einer dosisabhängigen Regulation durch Hydroxylradikale unterlag, die durch gleichzeitige Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase und des Ras-ERK-MAPK-Weges durch Angiotensin II signifikant reduziert werden konnte.

Der NO-Donor SNP hingegen, welcher in vitro über die Abspaltung vasoaktiven Stickstoffmonoxids zu stark erhöhten cGMP-Spiegeln (AZULA et al., 1996) und in vivo zur Vasodilatation führt (ROOS et al., 1994) hatte keinen signifikanten Einfluss auf den hydroxylinduzierten Abfall von Id3.

Der OH[•]-Effekt auf Id3 ließ sich nur durch Hydroxylscavenger wie Catalase spezifisch blockieren, so dass erneut ein radikalspezifischer Effekt vorlag. Damit stellte sich die Frage, ob für die differentielle Id3-Regulation durch OH[•] und O₂^{•-} verschiedene Signalwege verantwortlich sind. Abbildung 4.11. zeigt die Wirkung verschiedener Signaltransduktionsinhibitoren auf diese Regulation.

Der Tyrosinkinasehemmer Genistein (allein 99 ± 7%) hatte auf die Wirkung von OH[•] keinen Einfluss (56 ± 11%). Auch Wortmannin (109 ± 9%) konnte den inhibierenden Effekt von OH[•] auf die Id3-Expression nicht blockieren (42 ± 7%).

Der p38 MAPK-Inhibitor SB 203580 hatte allein keinen Einfluss auf Id3 ($101 \pm 3\%$) und hemmte die Herabregulation durch OH^{*} ($91 \pm 2\%$). PD 98059 ($95 \pm 6\%$) konnte die Herabregulation von Id3 auf $52 \pm 4\%$ hingegen nicht verhindern.

Der Calciumchelator MAPTAM ($109 \pm 6\%$) verhinderte die Absenkung des Id3-mRNA-Spiegels durch Hydroxylradikale (im Mittel 95%), während Pertussistoxin ($107 \pm 8\%$) und Cholera toxin ($72 \pm 11\%$) keinen Effekt zeigten ($43 \pm 7\%$ bzw. $31 \pm 4\%$).

Die Hemmung der NO-Synthase mittels LNNA ($90 \pm 9\%$) blieb ebenfalls ohne Wirkung auf den Hydroxyleffekt ($51 \pm 4\%$, nicht gezeigt).

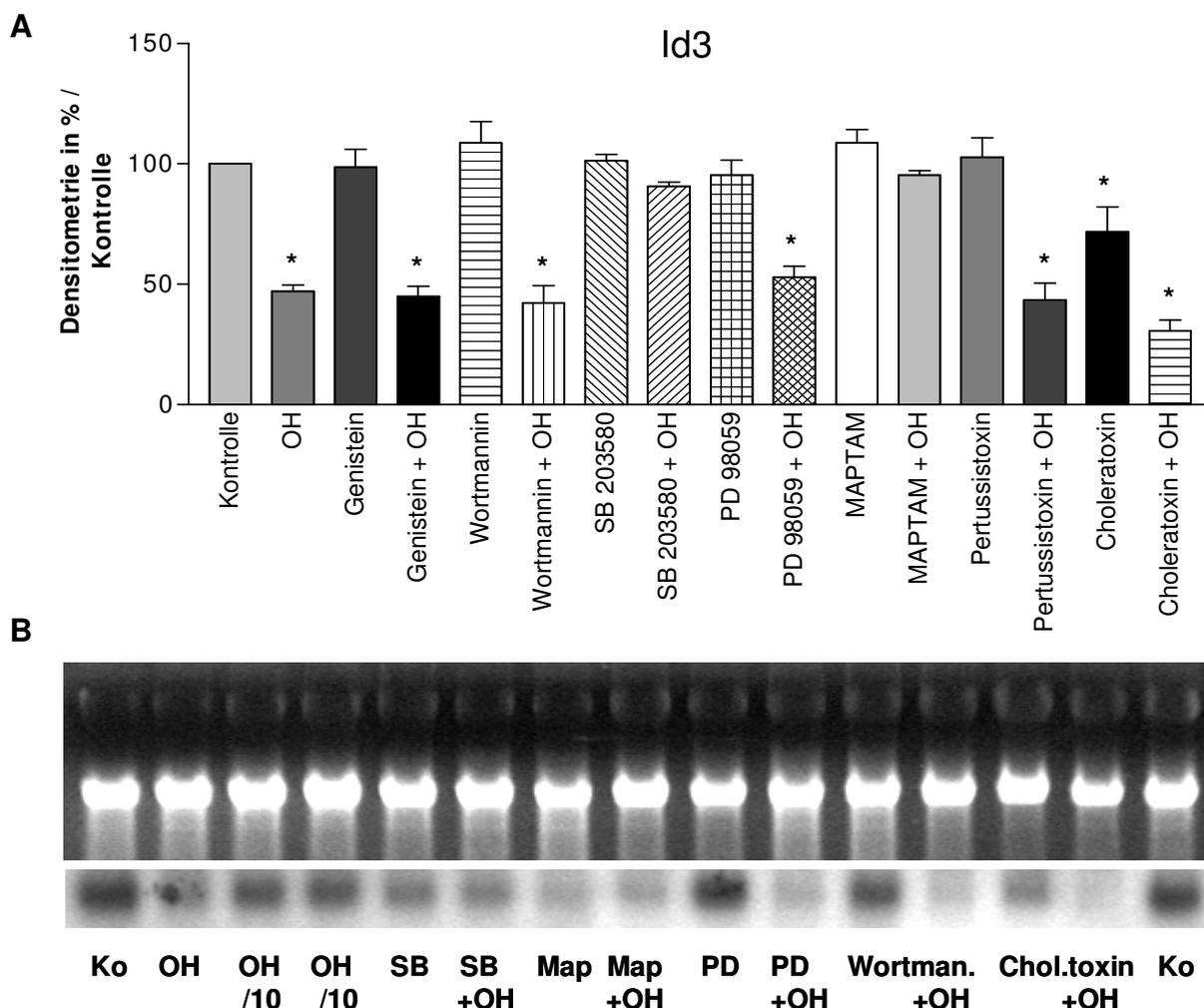


Abbildung 4.11 Id3-Regulation nach Inkubation mit OH^{*} und Signalwegsinhibitoren

A: Auswertung der densitometrischen Ergebnisse; **B:** Repräsentativer Id3-Northern Blot (oben RNA-Gel). Stimulation 12 Stunden gehungerter VSMC über drei Stunden, danach RNA-Isolation und RT-PCR oder Northern Blot. **Kontrolle** (unstimulierte Zellen), **OH** ($100 \mu\text{M/l H}_2\text{O}_2 + 20 \mu\text{M/l Fe}^{3+}\text{NTA}$). Folgende Inhibitoren waren jeweils 30 Minuten vorinkubiert: **Genistein** ($0,2\mu\text{M/l}$), **Wortmannin** ($0,1 \mu\text{M/l}$), **SB 203580** ($10 \mu\text{M/l}$), **PD 98059** ($20 \mu\text{M/l}$), **MAPTAM** = 1,2-bis(2-amino-5-methylphenoxyethan)-NNN'N'-tetraacetic acid-tetraacetoxymethylester ($20 \mu\text{M/l}$), **Pertussistoxin** (200 ng/ml), **Cholera toxin** (100 ng/ml). Fehlerindikator = SEM, * $p < 0.01$ vs. Kontrolle, $n \geq 3$.

Für den Abfall der Id3-Expression nach dreistündiger Stimulation von VSMC mit Hydroxylradikalen war somit die p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase verantwortlich. Ferner spielte der intrazelluläre Calciumspiegel eine wichtige Rolle, wie der blockierende Effekt von MAPTAM auf diesen Regulationsmechanismus beweist. Im Gegensatz zur Id3-Regulation durch Superoxidanionen, die durch eine Reihe von Signalwegsinhibitoren inhibiert werden konnte, fand sich bei den OH⁻-Stimulationen ein abweichender Signalweg, der im Wesentlichen dem Mechanismus der GKLf-Hochregulation durch OH⁻ entspricht.

4.5.2 mRNA-Spiegel von GKLf und Id3 nach Transfektionsexperimenten

Auf Grund der Beobachtung, dass GKLf nur durch OH⁻ und Id3 sowohl durch OH⁻ als auch durch O₂⁻ reguliert wird, wurde die Expression beider Faktoren nach Transfektionsexperimenten bestimmt, um der Frage nach gegenseitiger Beeinflussung in diesem Modell nachzugehen. Dazu wurde die Gesamt-RNA transfizierter Zellen nach 48 Stunden isoliert, um nach Reverser Transkription in einer PCR die mRNA-Spiegel von GKLf und Id3 semiquantitativ zu überprüfen. Zur Elimination von mitisolierten Plasmiden, die in der PCR als Template dienen könnten, wurde ein DNase-Verdau nach dem in Kap. 3.2.4.6 beschriebenen Protokoll durchgeführt. Bei der densitometrischen Analyse der Banden wurden alle PCRs mit der zugehörigen GAPDH-Bande verrechnet und die GKLf-/ Id3-Expression in Bezug zu nur mit dem Leervektor pcDNA3 transfizierten Zellen gesetzt. Die Ergebnisse dieser PCRs sind in den Abbildungen 4.12 und 4.13 zusammengestellt.

Bei der Transfektion mit GKLf sense wurde die GKLf-mRNA auf $249 \pm 12\%$ des Ausgangswertes hochreguliert, während Id3 auf $33 \pm 8\%$ absank. GKLf antisense hatte keinen signifikanten Effekt (GKLf: $89 \pm 35\%$; Id3: $106 \pm 9\%$).

Id3 sense senkte den GKLf-Spiegel ebenfalls ab ($61 \pm 6\%$), während Id3 auf $198 \pm 12\%$ hochreguliert wurde. Die Transfektion mit Id3 antisense hob GKLf tendentiell auf $135 \pm 22\%$ an. Der Id3-mRNA-Spiegel blieb auf Kontrollniveau ($84 \pm 9\%$).

Die Einschleusung des Cdk-Inhibitors p21 hatte in diesen Experimenten keine statistisch signifikante Wirkung auf GKLf und Id3 (nicht abgebildet). Die Transfektion mit p53 sense hatte auf GKLf jedoch einen steigernden Effekt ($156 \pm 5\%$), wohingegen die Blockade der intrazellulären p53-mRNA durch ein p53 antisense-Konstrukt eher auf den Id3-Spiegel wirkte ($156 \pm 41\%$, nicht dargestellt).

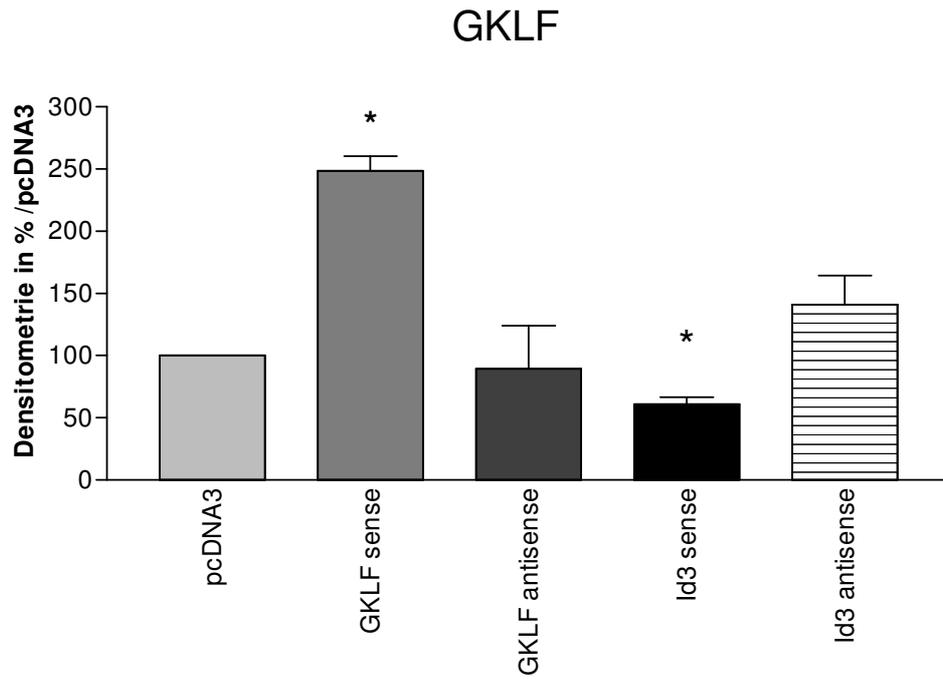
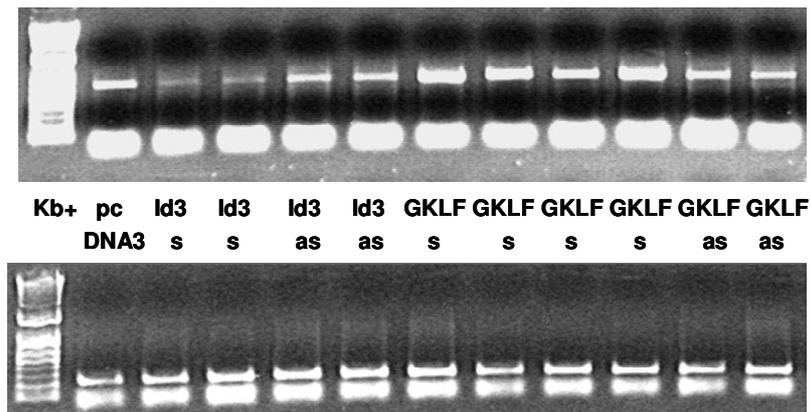
A**B**

Abbildung 4.12 GKLF-PCR nach transienter Transfektion von VSMC

A: Auswertung der densitometrischen Ergebnisse; **B:** Repräsentative GKLF-PCR (unten GAPDH-PCR). Die Transfektion erfolgte mit jeweils 20 µg der folgenden, in pcDNA3 klonierten Konstrukte durch Elektroporation mit 0,3 kV und 500 µF: **pcDNA3** (Leervektor), **GKLF sense**, **GKLF antisense**, **Id3 sense**, **Id3 antisense**. Ernte und RNA-Isolation wurden 48 Stunden nach Transfektion durchgeführt, anschließend DNase-Verdau, RT und PCR. Fehlerindikator = SEM, *p < 0.01 vs. pcDNA3, n = 3.

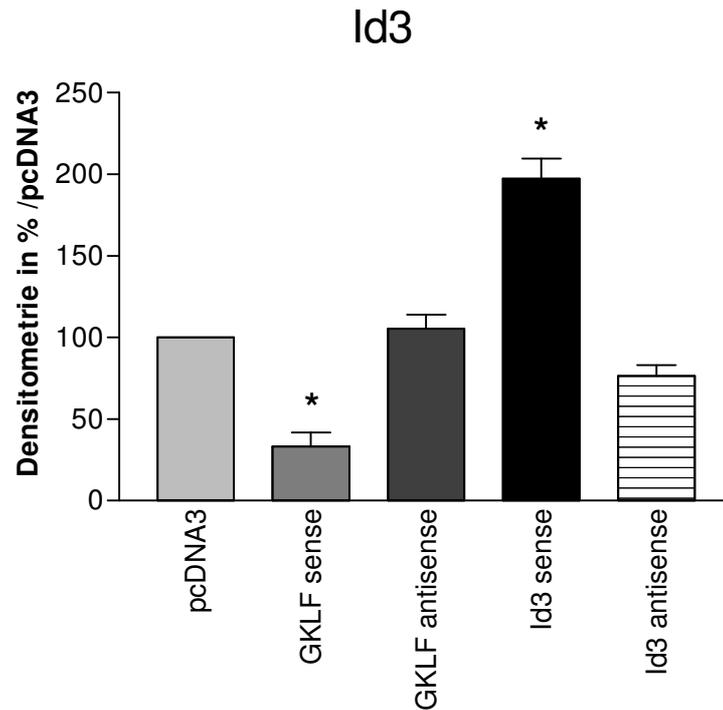
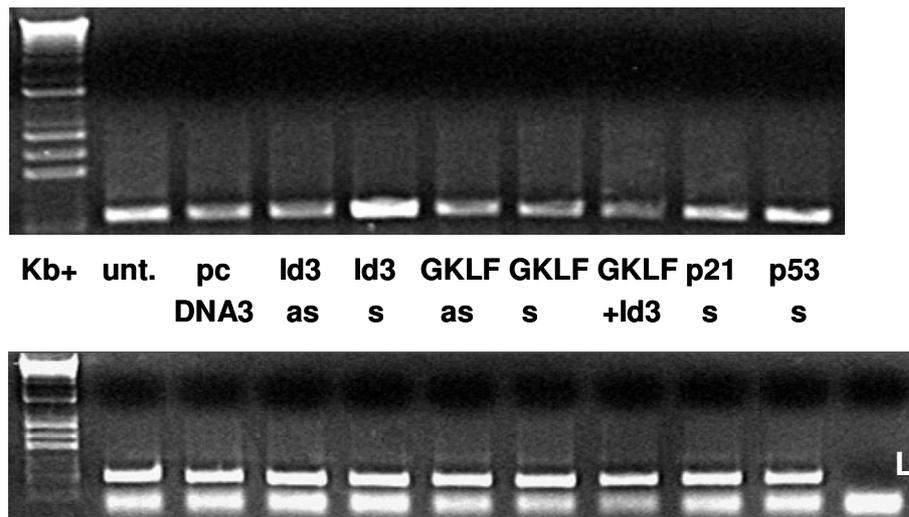
A**B**

Abbildung 4.13 Id3-PCR nach transienter Transfektion von VSMC

A: Auswertung der densitometrischen Ergebnisse; **B:** Repräsentative Id3-PCR (unten GAPDH-PCR). Die Transfektion erfolgte mit jeweils 20 µg der folgenden, in pcDNA3 klonierten Konstrukte durch Elektroporation mit 0,3 kV und 500 µF: **pcDNA3** (Leervektor), **GKLF sense**, **GKLF antisense**, **Id3 sense**, **Id3 antisense**. Ernte und RNA-Isolation wurden 48 Stunden nach Transfektion durchgeführt, anschließend DNase-Verdau, RT und PCR. Fehlerindikator = SEM, *p < 0.05 vs. pcDNA3, n = 3.

Bei der Analyse der PCR-Ergebnisse fällt zum einen auf, dass die Transfektion mit GKLF sense den Id3-Spiegel signifikant beeinflusst. Diese Absenkung der Id3-mRNA lässt sich z.B. durch einen direkten oder indirekten hemmenden Einfluss auf der Ebene

der Id3-Transkription erklären. Die Regulation der GKLf-Spiegel nach Überexpression von Id3-Konstrukten legt einen ähnlichen Zusammenhang andererseits auch umgekehrt nahe.

Die positive Wirkung des Zellzyklusinhibitors p53 auf GKLf ist mit den Ergebnissen anderer Forschungsgruppen vereinbar, die herausgefunden haben, dass p53 GKLf induziert und über diesen Weg den p21-Promotor transaktiviert (ZHANG et al., 2000). Es konnte wiederum ein gegenteiliger Effekt auf die Id3-Regulation beobachtet werden.

4.5.3 Zellzählung nach Ko-Transfektion mit GKLf und Id3

Nachdem im Rahmen der RT-PCRs nach Transfektionsexperimenten der Einfluss einer GKLf-Überexpression auf den Id3-mRNA-Spiegel und umgekehrt gezeigt worden war, stellte sich die Frage, ob die Interaktion dieser beiden Faktoren auch funktionell von Bedeutung ist. In den Zellzählungen nach Transfektion (vgl. Abbildung 4.1) wurde beobachtet, dass eine Ko-Transfektion von GKLf sense und Id3 sense in pcDNA3 den Id3-Effekt auf die Proliferation fast vollkommen aufhebt ($36 \pm 6\%$). Dieser Sachverhalt ist zur Verdeutlichung in Abb. 4.14 nochmals dargestellt.

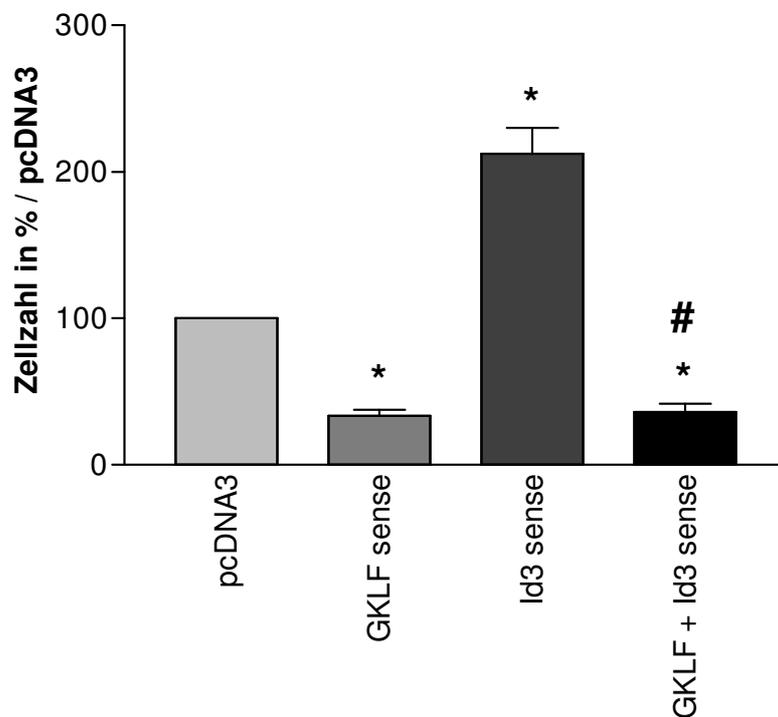


Abbildung 4.14 Zellzählung von VSMC nach Transfektion

Die Transfektion erfolgte mit jeweils 20 µg der folgenden, in pcDNA3 klonierten Konstrukte durch Elektroporation mit 0,3 kV und 500 µF: **pcDNA3** (Leervektor), **GKLf sense**, **GKLf antisense**, **Id3 sense**, **Id3 antisense**, **GKLf sense + Id3 sense**. Die Zellzählung erfolgte 48 Stunden nach Transfektion. Fehlerindikator = SEM, *p < 0.01 vs. pcDNA3, **p < 0.001 vs. pcDNA3, #p > 0.05 vs. GKLf sense, n = 3.

Als Erklärungsmöglichkeiten für diese neue Erkenntnis kommen z.B. eine stärkere Induktion der Cdk-Inhibitoren durch GKLf als deren Hemmung durch Id3 oder eine direkte Interaktion von GKLf und Id3 auf Protein- oder Nukleinsäureebene in Frage.

4.5.4 Luciferase-Assay nach transienter Transfektion

Abschließend wurde daher in Ko-Transfektionsexperimenten von VSMC mit Promotor-Reporter-Konstrukten untersucht, ob die vermutete direkte Interaktion von GKLf und Id3 auf der transkriptionellen Ebene stattfindet bzw. ob GKLf einen inhibierenden Effekt auf den Id3-Promoter ausübt.

Die Klonierung des Id3-Promoters in pGL2 wurde in Kap. 3.2.4.4 bereits ausführlich beschrieben. In dem so hergestellten Promoter-Reporter-Konstrukt lag das Firefly-Luciferase-Gen downstream des Id3-Promoters, der somit dessen Ablesung kontrollierte. Die dadurch bei Zugabe der Assay-Reagenzien entstehenden Leuchtsignale waren proportional der Promoteraktivität und konnten mit Hilfe eines Luminometers (Berthold Lumat) detektiert werden.

Die so gewonnenen Messdaten sind in Abbildung 4.15 dargestellt. Als Hintergrundkontrolle diente bei der Messung ein leeres Probenröhrchen und als Leerwert eine Probe mit Zellysepuffer und Luciferase Assay-Reagenz. Als Kontrolle diente die Transfektion von Zellen mit dem Leerplasmid pGL2basic (3848 ± 213 RLU). Die Transfektion mit dem pGL2(Id3-Promoter)-Konstrukt bewirkte durch die Ablesung des Id3-Promoters eine Steigerung der Lumineszenz auf im Mittel 66462 RLU. Die alleinige Transfektion von pcDNA3(GKLf sense) bewirkte mangels Luciferase-Gen praktisch keine Lumineszenz (283 ± 54 RLU). Bei der Kotransfektion von pGL2(Id3-Promoter) und pcDNA3(GKLf sense) ergab sich eine deutliche Blockade des Id3-Effektes (7986 ± 913 RLU) bis fast auf Kontrollniveau.

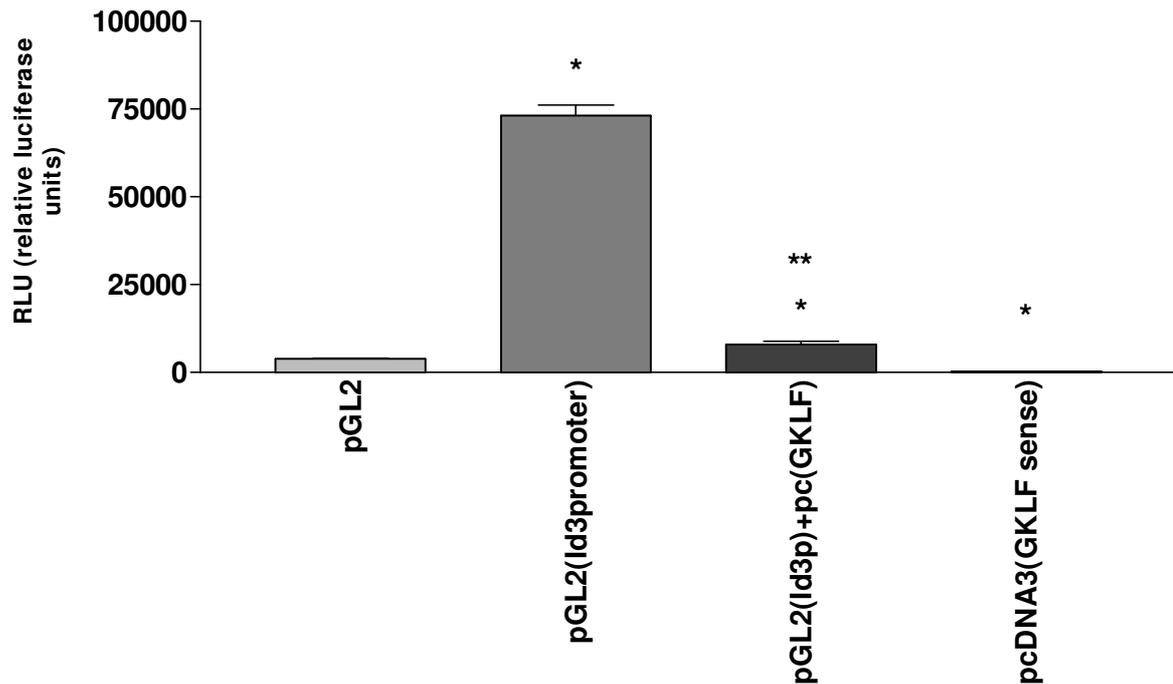


Abbildung 4.15 Luciferase-Assay von VSMC nach Transfektion

Die Transfektion erfolgte mit jeweils 20 µg der folgenden Plasmide durch Elektroporation mit 0,3 kV und 500 µF: **pGL2** (Leervektor), **pGL2 (Id3promoter)**, **pGL2 (Id3promoter) + pcDNA3 (GKLF sense)**, **pcDNA3 (GKLF sense)**. Der Assay erfolgte 48 Stunden nach Transfektion. Fehlerindikator = SEM, *p < 0.001 vs. pGL2, **p < 0.001 vs. pGL2 (Id3promoter), n = 3.

Die in den Luciferase-Assays gewonnenen Daten unterstützen die Beweislage für einen hemmenden Effekt von GKLF auf die Transkription des Id3-Promoters, da nur ein Angriffspunkt auf dieser Ebene einen Abfall der im Zelllysat einer mit dem Id3-Promoter und GKLF sense kotransfizierten Probe gemessenen Luciferase-Aktivität um 89% auf das Niveau von pGL2 erklären kann. Diese Evidenz gibt neue Einblicke in die offensichtlich zusammenhängende intrazelluläre Regulation des die VSMC-Proliferation steigernden Faktors Id3 und des antiproliferativ wirkenden Transkriptionsfaktors GKLF.

5 Diskussion

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der transkriptionellen Regulation und den zellulären Funktionen der redoxsensitiven Faktoren Gut-enriched Krüppel-like factor (GKLF) und Inhibitor of DNA-binding 3 (Id3) in glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC).

Die Stimulation mit OH^\bullet führte dosisabhängig zu einer Hochregulation von GKLF und einer Herabregulation von Id3. Superoxidanionen bewirkten eine dosisabhängige Hochregulation von Id3. Die Effekte waren jeweils spezifisch für die Art der eingesetzten reaktiven Sauerstoffspezies. Die Stimulationsexperimente mit ROS und Signaltransduktionsinhibitoren zeigten für die Regulation von GKLF durch OH^\bullet einen von p38, Ca^{2+} und $\text{G}_{i/o}$ abhängigen Signalweg. Die hydroxylabhängige Regulation von Id3 war mit diesen Ergebnissen vergleichbar. Die durch Stimulation mit $\text{O}_2^{\bullet-}$ ausgelöste Id3-Regulation ist von ERK 1/2, p38 MAPK, zytoplasmatischen bzw. Rezeptortyrosinkinasen, $\text{G}_{i/o}$ -Proteinen, Ca^{2+} und stimulatorischen $\text{G}_{s\alpha}$ -Proteinen abhängig.

Transfektionsexperimente zeigten bei Überexpression von GKLF eine reduzierte VSMC-Proliferation und deutlich erhöhte Apoptoserate. Die Unterdrückung von GKLF mit einem antisense-Konstrukt löste eine gesteigerte zelluläre Proliferation aus. Die Überexpression von Id3 bewirkte eine stark gesteigerte Proliferation, während die Unterdrückung dieses Faktors wahrscheinlich einen proapoptotischen Stimulus in ähnlichem Ausmaß wie GKLF darstellte. In weiteren Experimenten fanden sich Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Regulation von GKLF und Id3 auf transkriptioneller Ebene. So wurde nach GKLF-Überexpression eine signifikante Abnahme der Id3-mRNA beobachtet. Darüberhinaus wurde der proliferationssteigernde Effekt von Id3 durch Ko-Transfektion mit GKLF komplett aufgehoben. Die Verwendung eines pGL2-Id3-Promoter-Reporter-Konstrukts in Luciferase-Assays führte zu der Erkenntnis, dass in Anwesenheit von GKLF die Aktivität des Id3-Promoters zumindest *in vitro* um fast 90% reduziert ist.

5.1 Mechanismen der Signaltransduktion zu GKLf und Id3 nach Stimulation mit OH[•], O₂^{•-} und Angiotensin II: Mitogen-aktivierte Proteinkinase stehen im Vordergrund

Zur besseren Übersicht sind die im Folgenden angesprochenen Signalwege in Abbildung 5.1 schematisch dargestellt.

5.1.1 Bedeutung von Angiotensin II und der NAD(P)H-Oxidase

H₂O₂ besitzt wesentliche Kriterien eines Signalmoleküls, weil ungeladen, diffusibel und relativ stabil ist (GRIENGLING & HARRISON, 1999). Bei der intrazellulären Signaltransduktion spielt H₂O₂ nach exogener Applikation oder als Dismutationsprodukt von O₂^{•-} eine Rolle. Außerhalb der Zelle generierte Superoxidanionen erreichen das Zellinnere über Anionenkanäle oder per diffusionem (GOMES et al., 1993).

Wesentlich für das Verständnis ist eine Differenzierung zwischen dem durch die Funktion der Superoxiddismutase aus O₂^{•-} entstehenden H₂O₂ und exogen hinzugegebenem Wasserstoffperoxid. Man muss davon ausgehen, dass in Kombination mit Fe•NTA vorwiegend eine durch die das normale Eisenangebot der Zelle übersteigende Zahl an Metallionen katalysierte OH[•]-Genese für die vorwiegend negative intrazellulären RSO-Effekte verantwortlich ist (LI et al., 1997; GRIENGLING & HARRISON, 1999). Intrazellulär dosiert gebildetes H₂O₂ stellt einen *second messenger* auf dem Signalweg von z.B. der Angiotensin II-Wirkung am AT₁-Rezeptor bis zur Auslösung der VSMC-Proliferation dar (IRANI, 2000).

GKLf wird durch OH[•], die durch eine Kombination von H₂O₂ und Fe•NTA generiert wurden, dosisabhängig auf mRNA-Ebene heraufreguliert. Superoxidanionen hatten keinen signifikanten Effekt auf GKLf. Im Gegensatz dazu wurde Id3 dosisabhängig durch Superoxidanionen, die durch das Xanthinoxidase/Purin-System oder über Angiotensin II generiert wurden, hochreguliert. Der Flavoproteininhibitor Diphenyleniodonium (DPI) hatte auf den Spiegel von GKLf keinen Einfluss, vermochte aber sowohl die Id3-Regulation durch Xanthinoxidase/Purin als auch durch Angiotensin II zu verhindern. Es ist bekannt, dass DPI neben der NAD(P)H-Oxidase auch die Xanthinoxidase hemmen kann, weil diese ebenfalls flavinabhängig ist (SKIBO, 1986). Somit zeigen die Ergebnisse einerseits, dass Angiotensin II Id3 über die NAD(P)H-Oxidase heraufreguliert, und dass die Superoxidanionen aus dem Xanthinoxidase/Purin-System dies möglicherweise unabhängig von der NAD(P)H-

Oxidase bewirken. GKLf auf der anderen Seite wurde durch $O_2^{\cdot-}$ nicht signifikant in seiner Expression beeinflusst, und die GKLf-Regulation durch OH^{\cdot} war nicht an die Funktion der NAD(P)H-Oxidase gebunden.

Die proatherogene Wirkung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) lässt sich vor allem auf den Einfluss seines vasokonstriktorisches Effektors Angiotensin II zurückführen (VIEDT et al., 2000). Dieses Peptidhormon bindet an mehrere Rezeptoren, von denen der AT_1 -Rezeptor der bedeutsamste ist (BERK, 1999; NICKENIG & Harrison, 2002^{1,2}). Die Bindung von Angiotensin II an den AT_1 -Rezeptor führt zur G_q -vermittelten Transaktivierung von Rezeptortyrosinkinasen wie dem EGF-Rezeptor (EGUCHI et al., 1996; MÜLLER et al., 2005) oder von zytoplasmatischen Tyrosinkinasen wie c-src. Diesem Vorgang folgt über das Zytoskelett die Translokation kleiner monomerer GTPasen (Rho-Proteine) wie GDP-rac1 an die Membran (ENDRES & LAUFS, 2004). Über *Guanine nucleotide exchange factors* (GEF) erfolgt die Aktivierung zu GTP-rac1, welches einen wichtigen Assoziationsfaktor des NAD(P)H-Oxidase-Komplexes darstellt. Nach diesem Stimulus werden die membranständigen Einheiten nox1 (homolog zu der katalytischen Untereinheit gp91phox in Phagozyten) und p22phox, die zusammen das *Cytochrom b558* bilden, um die cytosolischen Untereinheiten p47phox, p67phox und rac1 ergänzt, so dass das funktionsfähige Holoenzym entsteht (KYAW et al., 2004; WASSMANN et al., 2004). Der vollständige NAD(P)H-Oxidase-Enzymkomplex generiert dann Superoxidanionen, die zu einer Phosphorylierung der ERK1/2 führen (GRIENDLING & USHIO-FUKAI, 1998). Für die Aktivierung der ERK1/2 wird neben $O_2^{\cdot-}$ jedoch auch ein direkt rezeptorabhängiger Signalweg über Ca^{2+} -abhängige Tyrosinkinasen, das ras-Protein, die Raf1-Kinase und die MEK1/2 verantwortlich gemacht (siehe Kap. 5.1.2). Die Stimulation mit Genistein, einem spezifischen Hemmstoff für zytoplasmatische und Rezeptortyrosinkinasen, konnte die GKLf-Hochregulation durch Hydroxylradikale nicht signifikant beeinflussen, während die Id3-Regulation durch Superoxidanionen aufgehoben wurde. Dies spricht wiederum dafür, dass die soeben beschriebene Signaltransduktion, welche das Angiotensin II-Signal mit ERK 1/2 verbindet, für GKLf nicht von Bedeutung ist.

Es ist bekannt, dass eine akute Stimulation mit Angiotensin II innerhalb von Minuten eine Enzymaktivierung wie soeben beschrieben bewirkt, während eine chronische Aktivierung des RAAS zu einer Hochregulation der Genexpression aller Untereinheiten der NAD(P)H-Oxidase und somit per se zu einem gesteigerten oxidativen Stress führt (Wassmann et al., 2004). Angiotensin II löst bei alleiniger Stimulation VSMC-

Hypertrophie und im Zusammenhang mit anderen Wachstumsfaktoren wie PDGF eine ROS-abhängige Proliferation in VSMC aus (RAO, 1999; SERVANT et al., 2000).

Bemerkenswert ist auch die Tatsache, dass von der NAD(P)H-Oxidase $O_2^{\cdot-}$ sowohl intra- als auch extrazellulär sezerniert werden. Zusammen mit der EC-SOD kontrollieren diese Superoxidanionen im Extrazellularraum die Konzentration von NO^{\cdot} auf seinem Diffusionsweg in der Gefäßwand (FUKAI et al., 1999). Damit werden die atheroprotektiven Effekte von Stickstoffmonoxid wesentlich von der NAD(P)H-Oxidase mitbestimmt. Die Blockade der NO-Synthase mit dem L-Arginin-Analogen LNNA und die Stimulation mit dem NO-Donor Nitroprussidnatrium (SNP) hatten in den durchgeführten Stimulationsexperimenten auf die Regulation von GSK3 β und Id3 durch reaktive Sauerstoffspezies keinen Einfluss, so dass die NO-Synthase bei der Regulation der untersuchten Faktoren in diesem Kontext keine Rolle zu spielen scheint.

Die NAD(P)H-Oxidase steht im Zentrum der vaskulären ROS-Produktion. Die Wirkung der unter basalen Bedingungen gebildeten Sauerstoffradikale werden im Kontext der zellulären Ausstattung mit Antioxidantien (siehe Kap. 2.2.3) genau kontrolliert (PATEL et al., 2000). Verschiedene Studien konnten zeigen, dass eine Elimination dieser ROS durch exogen zugeführte Radikalfänger die Zellfunktionen empfindlich stört und über die Blockade von Wachstumssignalen zum Zelltod führt (USHIO-FUKAI et al., 1998). Die von der NAD(P)H-Oxidase gebildeten ROS tragen über mehrere Feedforward-Mechanismen zu einer oxidativen Signalverstärkung bei. Ein solcher Verstärkermechanismus beruht auf der Hemmung von Tyrosinphosphatasen durch $O_2^{\cdot-}$ und H_2O_2 . Dies bewirkt eine verstärkte Phosphorylierung der Tyrosinkinase bzw. erhöhte Aktivität der nachgeschalteten Kinasen, die wiederum über die oben erwähnte Transaktivierung der NAD(P)H-Oxidase eine vermehrte ROS-Produktion zur Folge hat (USHIO-FUKAI & ALEXANDER, 2004). Es ist ferner bekannt, dass durch die NAD(P)H-Oxidase die Xanthinoxidase aktiviert wird, die vor allem unter pathologischen Bedingungen eine signifikante Superoxidausschüttung verursacht (MÜLLER et al., 2005). Drittens tragen die von der NAD(P)H-Oxidase produzierten ROS zur Oxidation des NO-Synthase-Kofaktors Tetrahydrobiopterin bei. Dies führt über die Entkopplung des Enzyms ebenfalls zu einer verstärkten Radikalbildung. Die Dismutation der Superoxidanionen zu H_2O_2 bewirkt in Abhängigkeit der zellulär verfügbaren Fe^{+3} -Ionen über die FENTON-Reaktion eine Generierung von Hydroxylradikalen. Diese Radikalspezies führt über Kettenreaktionen u.a. zur Bildung von Membranperoxiden, welche genauso wie H_2O_2 selbst wiederum die NAD(P)H-Oxidase aktivieren können

(MÜLLER et al., 2005). Einer überschießenden Radikalbildung stehen die enzymatischen Radikalscavenger gegenüber. Die letztendlich aus der Stimulation der NAD(P)H-Oxidase resultierenden zellulären Effekte bzw. Änderungen der Gentranskription werden von der Dynamik dieser komplex regulierten Interaktion bestimmt (PATEL et al., 2000; MÜLLER et al., 2005).

5.1.2 Einfluss der extracellular signal-regulated kinases (ERK)

In Abschnitt 4.4.2 wurde gezeigt, dass die spezifische Hemmung der MEK 1/2 und ERK 1/2 mittels PD 98059 eine Blockade der Hochregulation von Id3 durch $O_2^{\cdot-}$ und Angiotensin II bewirkte. Auf die GSK-3 β -Regulation fand sich keine Auswirkung. Die Regulation von Id3 durch die Ras-ERK-Kaskade wurde in Thymozyten nach Stimulation des T-Zell-Rezeptors und in HUVEC bereits beobachtet (BAIN et al., 2001; SAKURAI et al., 2004). Eine analoge Regulation wurde für Id1 in Prostatatumoren gefunden (LING et al., 2002). Für den genauen Ablauf der Signaltransduktion zu Id3 ergeben sich aus der Literatur verschiedene Möglichkeiten, die im Folgenden beschrieben werden.

Die Familie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) transduziert nach Einwirkung verschiedener externer Stimuli Signale in Richtung des Zellkerns und führt zu einer geänderten Gentranskription und Proteinsynthese. Die Aktivierung dieser Kinasen erfordert typischerweise eine duale Phosphorylierung an einem spezifischen Serin- und Threoninrest. Der Aufbau der MAPK-Signalkaskade folgt dem Grundprinzip des Drei-Kinasen-Moduls: Eine MEKK (MAPK *early kinase kinase*) phosphoryliert eine MEK (MKK, MAPK *early kinase*), welche schließlich das Signal auf die MAPK überträgt (ALBERTS et al., 1995). Die drei wichtigsten MAPK in VSMC sind die *extracellular signal-regulated kinase* (ERK), die p38 MAPK (Unterform α -6) und die *c-Jun N-terminal kinase* (JNK) (GRIENGLING & USHIO-FUKAI, 1998; IRANI, 2000).

Die mit der Raf1-MEK1/2-ERK1/2-Kaskade verbundenen Rezeptoren zählen zu den Rezeptortyrosinkinasen (z.B. für PDGF), G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (z.B. für Angiotensin), Hormonrezeptoren (z.B. für Östrogen) und Zytokinrezeptoren (z.B. für Bradykinin). Neben Wachstumsfaktoren, Botenstoffen des vegetativen Nervensystems, (Peptid-)Hormonen und inflammatorischen Botenstoffen können auch reaktive Sauerstoffspezies und mechanische Reize die ERK aktivieren (MICHEL et al., 2001). Downstream folgt die Aktivierung von Protoonkogenen wie c-fos und c-myc, die zur gesteigerten Transkription verschiedener Zielgene über Transkriptionsfaktoren wie AP-

1 und NFκB führt. Bedeutend ist auch die Inaktivierung proapoptotischer Faktoren wie *bad* (VANTLER et al., 2005). Eine ERK-Aktivierung hat ein erhöhtes Zellwachstum und Überleben bzw. eine verminderte Apoptose zur Folge. Im kardiovaskulären System trägt dieser Prozess zu einer unkontrollierten VSMC-Proliferation und dem vaskulären *remodeling* bei (GRIENDLING & USHIO-FUKAI, 1998).

Angiotensin II ist wie oben erläutert einer der wichtigsten Aktivatoren der vaskulären NAD(P)H-Oxidase. Die nach einer Stimulation entstehenden Superoxidanionen und H_2O_2 als ihr Dismutationsprodukt bewirken zum einen über die intrazelluläre Calciumausschüttung eine Aktivierung der Ca^{2+} -Calmodulin-abhängigen ERK (YANG et al., 2001). Zum anderen verlängert H_2O_2 die ERK-Aktivierung durch die Oxidation redoxsensitiver Cysteinreste in Proteinphosphatasen wie MKP-1 (vgl. Kap. 2.2.4).

Die Bedeutung von Calcium für die beschriebene Regulation von GKLf und Id3 wird durch die Wirksamkeit des unspezifischen Calciumchelators MAPTAM unterstrichen. Die Calcium-Ausschüttung kann z.B. durch die ROS-vermittelte Aktivierung der Phospholipase C und nachfolgende IP3-Bildung erfolgen, weil IP3 über den sarkoplasmatischen Ryanodinrezeptor den cytoplasmatischen Calciumspiegel erhöht (SUZUKI et al., 1997). Dieser Rezeptor wurde auch als selbst redoxsensitiv beschrieben (KAWAKAMI & OKABE, 1998). Weiterhin wurde ein erhöhter Calciumeinstrom aus dem Extrazellularraum und ein erhöhter mitochondrialer Ca^{2+} -Ausstrom durch ROS beobachtet (BERK, 1999).

Ein weiterer Weg der ERK-Aktivierung durch Angiotensin II stellt wie oben bereits erwähnt die direkte rezeptorabhängige Aktivierung des kleinen G-Proteins $p21^{Ras}$ über die mit den Tyrosinkinase verbundenen Adapterproteine Grb2 und SOS dar, die zur Phosphorylierung der Raf1-Kinase führt, welche die MEKK für MEK 1 und 2 darstellt (COBB et al., 1995; OKUDA et al., 1996; VIEDT et al., 2000). Auf Grund der Wirksamkeit der Scavenger SOD und Tiron auf die Id3-Regulation scheint dieser in geringerem Ausmaß von ROS abhängige Weg dafür nicht entscheidend zu sein.

Es ist aus der Literatur bekannt, dass $O_2^{\cdot-}$ als *2nd messenger* direkt wie oben beschrieben über Tyrosinkinase die Ras-ERK-Kaskade aktivieren können (GRIENDLING & USHIO-FUKAI, 1998). Dabei spielt neben G_q auch die Funktionsfähigkeit der α -Untereinheiten anderer heterotrimerer G-Proteine für die ERK-Aktivierung eine Rolle (LOPEZ-ILASACA et al., 1998). Bemerkenswerterweise war die Id3-Regulation durch $O_2^{\cdot-}$ über die irreversible Aktivierung von $G_{s\alpha}$ oder die Hemmung von $G_{i\alpha}$ -Proteinen über Cholera- bzw. Pertussistoxin blockierbar (Abb. 4.8). Dies ist am ehesten dadurch erklärbar, dass eine Aktivitätssteigerung der Adenylylzyklase zu einer cAMP-

Erhöhung führt, die die CAK (*cdk activating kinase*) hemmt und somit eine p27-Erhöhung mit Blockade proliferativer Signale bewirkt (KATO et al., 1994; THORIN-TRESCASES et al., 2001).

Da die GKLf-Hochregulation durch OH[•] durch Koinkubation mit Mannitol und Catalase vollständig verhindert wurde, aber nicht durch SOD oder Tiron, ist ein indirekter Effekt von Superoxidanionen auf die GKLf-Regulation unwahrscheinlich.

Die Tatsache, dass Atorvastatin die Id3-Regulation durch Superoxidradikale verhindern konnte, unterstützt die Hypothese, dass auch bei diesem Regulationsweg die NAD(P)H-Oxidase eine Rolle spielt, z.B. durch eine Amplifikation des ROS-Signals wie oben beschrieben. Es gibt mittlerweile viele Belege pleiotroper Effekte der HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren, die sich in Form einer antioxidativen, antiinflammatorischen und antiproliferativen Wirkung im Gefäß entfalten (MAACK et al., 2003; LIAO & LAUFS, 2005). Neben anderen Effekten wie der eNOS-Aktivierung wird als Hauptmechanismus dieser Wirkungen die Hemmung der Membrantranslokation von Rac1 angesehen, was zu einer reduzierten NAD(P)H-Oxidase-Aktivität führt (NICKENIG & HARRISON, 2002¹; ENDRES & LAUFS, 2004; USHIO-FUKAI & ALEXANDER 2004; WASSMANN et al., 2004). Hinsichtlich der GKLf-Regulation durch OH[•] hatten Statine keinen Effekt. Dies bestätigt indirekt wiederum, dass die GKLf-Expression nicht über den NAD(P)H-Oxidase-ERK-Signalweg reguliert wird.

5.1.3 Funktion der p38 Mitogen-aktivierten Proteinkinase

In der vorliegenden Arbeit wurde durch die Anwendung des spezifischen p38 MAPK-Inhibitors SB 203580 gezeigt, dass sowohl die Id3-Hochregulation durch O₂^{•-} und Angiotensin II als auch die differentielle Regulation von GKLf und Id3 durch Hydroxylradikale entscheidend von der Funktion dieses Enzyms abhängt.

Die p38 MAPK wird vor allem durch zelluläre Stressoren wie UV-Strahlung, Hitzeeinwirkung und Zytokine wie TNF α angesprochen. P38 ist nach heutigem Kenntnisstand die hauptsächliche redox-sensitive MAPK, da dieses Enzym in einer Reihe von Zelltypen durch ROS (v.a. H₂O₂) aktiviert wird (USHIO-FUKAI et al., 1998; ALLEN & TRESINI, 2000). Zusammen mit der JNK gehört p38 zu den *stress-activated protein kinases* (SAPK). Die p38-Familie teilt sich in die ubiquitären p38 α und β sowie die gewebespezifischen p38 γ und δ auf. Die MEKK dieser Kaskade werden im Wesentlichen durch die kleinen G-Proteine Rac1 und Cdc42 sowie deren direkten *downstream* Effektor PAK (*p21-activated kinase*) phosphoryliert und heißen vermutlich

TAK und ASK1. Zwischen diesen Faktoren und p38 finden sich die MKK 3 und 6. Die p38 MAPK steht im Fokus zentraler zellulärer Signalwege und spricht *downstream* Proteinkinasen wie die MAPK-aktivierten Proteinkinasen (MAPKAPK) 2 und 3 und z.T. über diese oder direkt Transkriptionsfaktoren wie ATF-1 (*activating transcription factor 1*), AP-1 (*Activating protein 1*), SRF (*Serum response factor*), CREB (*cAMP-response element binding*), *heat shock*-Proteine u.v.m. an. Die von der p38 MAPK aktivierten Gene entsprechen zu 50% Transkriptionsfaktoren (ZARUBIN & HAN, 2005). Der Phosphorylierungsstatus des Enzyms wird wie bei der ERK von der redoxsensitiven MAPK-Phosphatase 1 (MKP-1) kontrolliert (MICHEL et al., 2001).

Die biologischen Konsequenzen einer p38-Aktivierung bestehen in Form von Inflammationsreaktionen (z.B. bei Morbus Alzheimer und rheumatoider Arthritis), Apoptose (V.a. im Kontext von ROS und Serumentzug) und Einflüssen auf den Zellzyklus, entweder in Form eines Wachstumsarrests oder gesteigerter Proliferation (AIKAWA et al., 1997; IGARASHI et al., 2000; ZARUBIN & HAN, 2005). Im kardiovaskulären System konnte eine Korrelation zwischen der ANF-vermittelten MKK3/6-Hochregulation und der Kardiomyozytenhypertrophie bei der Herzinsuffizienz hergestellt werden (USHIO-FUKAI et al., 1998). Weiterhin wird durch p38 die vaskuläre Hypertrophie, VSMC-Migration und Expression von Adhäsionsmolekülen wie MCP-1 und ICAM-1 gesteuert (IRANI, 2000).

Es erscheint zunächst unklar, warum die Id3-Regulation sowohl von p38 als auch von ERK abhängt. Außerdem stellt sich die Frage, wie p38 sowohl die Id3-Herabregulation durch OH^\bullet als auch die Hochregulation durch $\text{O}_2^{\bullet-}$ auslösen kann. Dieses vermeintliche Paradoxon lässt sich erklären, wenn in Betracht gezogen wird, dass je nach Art, Intensität und Dauer der ROS-Stimulation zellulär völlig verschiedene Effekte beobachtet werden (IRANI, 2000; vgl. Abschnitt 2.2.4).

Subtoxisch konzentrierte ROS wie $\text{O}_2^{\bullet-}$ und H_2O_2 fungieren als Signalmoleküle, z.B. im Kontext einer Wachstumsfaktorstimulation, und aktivieren in aller Regel sowohl die ERK als auch die p38 MAPK (VIEDT et al., 2000; KIM et al., 2002; BLANE et al., 2003). Dies liegt nahe, da verschiedene Faktoren wie Rac1 upstream von beiden Kaskaden stehen.

Im kardiovaskulären System konnte gezeigt werden, dass vor allem die Aktivierung der p38 MAPK durch Angiotensin II auf Grund ihrer Hemmbarkeit durch DPI mit der Aktivität der NAD(P)H-Oxidase in kausaler Beziehung verknüpft ist (VIEDT et al., 2000), während die ERK-Aktivierung auch von Tyrosinkinasen abhängt. Für die durch Angiotensin II ausgelöste vaskuläre Hypertrophie wurde allerdings die Notwendigkeit

beider MAPK-Kaskaden im Sinne eines additiven Kinaseneffektes nachgewiesen (USHIO-FUKAI et al., 1998). Dies erklärt wahrscheinlich, warum sowohl PD 98059 als auch SB 203580 den Effekt von $O_2^{\cdot-}$ und Angiotensin II auf die Id3-Regulation komplett aufhoben.

Damit nicht zu vergleichen ist die exogene Peroxidstimulation in toxischer Konzentration, vor allem in Kombination mit $Fe\cdot NTA$ in Form des FENTON-Reagenz, die zu einer Belastung der Zelle mit aggressiven OH^{\cdot} -Radikalen führt (MIN et al., 1999). Die daraus resultierende Zellschädigung bewirkt einen Wachstumsarrest und je nach Ausmaß der Schäden die Einleitung der Apoptose (AIKAWA et al., 1997; USHIO-FUKAI et al., 1998). Einer der verantwortlichen Mechanismen ist die p38-Aktivierung durch H_2O_2 , die zum einen über die Rac1-Aktivierung durch vorgeschaltete Aktivierung von Tyrosinkinase wie oben beschrieben und zum anderen über die transiente Hemmung von MKP-1 erfolgt (BAAS & BERK, 1995; ALLEN & TRESINI, 2000). Einzelne Arbeiten konnten zeigen, dass es auf MAPK-Ebene auch eine gegenseitige Beeinflussung der verschiedenen Kaskaden gibt. H_2O_2 aktiviert zwar über die oben aufgeführten Mechanismen beide MAPK, aber die p38 MAPK inhibiert ERK durch Hemmung von MEK 1/2, was als MAPK-*crosstalk* bezeichnet wird (MICHEL et al., 2001). Es lässt sich festhalten, dass eine Stimulation mit H_2O_2 in hoher Dosierung über p38 zu einem Wachstumsarrest in der G1-Phase und zu einer Apoptose von VSMC führt (IRANI, 2000). Sowohl p38 als auch Peroxid können p53 direkt aktivieren (HUANG et al., 1999; HAINAUT & MANN, 2001; ZARUBIN & HAN, 2005). Es wurde gezeigt, dass p38 über die von ihm aktivierten Proteine weitere antiproliferative und proapoptotische Faktoren ansprechen kann. In Kolonzellen wurde die Hochregulation von GSK3 durch p38 über den *homeobox*-Transkriptionsfaktor Cdx2 nachgewiesen (DANG et al., 2001, HOUDE et al., 2001), so dass in VSMC ein ähnlicher Signalweg vorliegen könnte. Ferner ist eine GSK3-Hochregulation durch p53 direkt möglich (ZHANG et al., 2000).

Die von einer Ligandbindung unabhängige p38-Aktivierung durch H_2O_2 über $G_{i\alpha}$ in VSMC ist ebenfalls bekannt (NISHIDA et al., 2000; GOUNI-BERTHOLD et al., 2004). SCHMITZ et al. fanden 2002 einen analogen Signalweg für die Wirkung von Lipopolysaccharid auf p38 in VSMC. Dieser Sachverhalt erklärt wahrscheinlich die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Blockade der GSK3-Hochregulation durch OH^{\cdot} bei Koinkubation mit Pertussistoxin.

Zusammenfassend kann man sagen, dass nach den hier vorgelegten Ergebnissen in VSMC das kaskadenförmig angeordnete System der ERK und p38 MAPK unter dem

Einfluss der NAD(P)H-Oxidase im Zentrum der Wirkung von ROS auf die Expression von Id3 und GKLf steht. Die Tatsache, dass ERK eher das mitogene Signal nach Superoxidstimulation fortleitet, während p38 vorwiegend für das antiproliferative Signal nach OH⁻-Stimulation zuständig erscheint, passt in das mittlerweile etablierte Konzept ROS-assoziiierter Wirkungen im kardiovaskulären System (IRANI, 2000).

Obwohl ROS non-enzymatisch oder enzymatisch ineinander umwandelbar sind und es viele Querverbindungen zwischen den einzelnen Signalkaskaden gibt, erfolgt upstream dennoch eine Differenzierung der Signale, so dass im Zellkern schließlich völlig unterschiedliche Antworten ausgelöst werden können.

5.2 Regulation des Zellzyklus und zellulärer Funktionen von VSMC unter dem Einfluss von GKLf, Id3 und ROS: Ein Schnittpunkt im Zentrum des p53-Netzwerks?

5.2.1 Zelluläre Regulationswege durch GKLf und andere Krüppel-Faktoren

In den Transfektionsexperimenten mit GKLf sense / antisense und Id3 sense / antisense (Kap. 4.1.1 und 4.1.2) konnte eine gegensätzliche Rolle des Krüppel-like factor 4 und des Inhibitor of DNA-binding 3 für zentrale VSMC-Funktionen wie Proliferation und Apoptose nachgewiesen werden.

Es wurde gezeigt, dass GKLf sense die Zellteilung in VSMC signifikant inhibierte. Da GKLf antisense die Proliferation hochregulierte, lässt sich vermuten, dass GKLf im Zusammenhang mit zellulären Stressoren wie der Transfektion die Proliferation hemmt, um eine Überprüfung der genomischen Integrität sicherzustellen. Passend dazu wirkte sich die GKLf-Überexpression im Sinne einer erhöhten Apoptoserate aus, während die GKLf antisense-Transfektion zu einer Reduktion der VSMC-Apoptose führte. Die Beobachtung, dass in den Stimulationsexperimenten Wortmannin bereits ohne zusätzliche Gabe von ROS eine Hochregulation der GKLf-Expression auslöste (Abb. 4.7), spricht in Anbetracht der Tatsache, dass die Hemmung der PI3-Kinase vor allem unter serumfreien Kulturbedingungen einen programmierten Zelltod begünstigt (BAI et al., 1999), ebenfalls für eine Bedeutung von GKLf bei Reparaturvorgängen. Im Gegensatz dazu hatte in den hier durchgeführten Experimenten die Hemmung der PI3-Kinase keine Auswirkung auf die Regulation von Id3 (Abb. 4.8 und 4.10).

In den letzten 10 Jahren wurde durch die Arbeitsgruppe um V.W. YANG eine Reihe von Ergebnissen publiziert, die vor allem auf Untersuchungen in Darmgewebe und davon

abgeleiteten malignen Zelllinien basieren. Dabei wurde Schritt für Schritt GKLf als essentieller Tumorsuppressor im direkten Kontext von p53 etabliert. Wesentliche Funktionen von GKLf sind die negative Regulation des G1/S-Checkpunkts durch Aktivierung des p21^{WAF1/CIP1}-Promoters (ZHANG et al., 2000) bzw. Suppression des Cyclin D1-Promoters (SHIE et al., 2000) und die Regulation des G2/M-Checkpunkts durch Aktivierung der p53 *response factors* 14-3-3 σ und GADD45 bzw. Suppression des Cyclin B1-Promoters (YOON & YANG, 2004). Ferner wurde eine Bedeutung von GKLf für die Zentrosomenduplikation (z.B. über die Hemmung von Cyclin E; YOON et al., 2005) und die Überprüfung des Spindelapparates nachgewiesen (GHALEB et al., 2005). CHEN et al. konnten 2000 in Kolontumorzellen die von p53 unabhängige Einleitung der Apoptose durch GKLf dokumentieren.

Demnach hat GKLf nach der gegenwärtigen Auffassung die Funktion, nach Einfluss schädigender Noxen den Zellzyklus zugunsten einer möglichen DNA-Reparatur anzuhalten und ist daher als wichtiges Mitglied des umfassenden p53-Netzwerks einzustufen.

Im kardiovaskulären System gibt es in Bezug auf GKLf weniger Daten. Wie in Kapitel 2.3.4 erwähnt, führt die Stimulation von VSMC mit PDGF, einem der stärksten Proliferations- bzw. Dedifferenzierungsreize für diese Zellen, zu einer Hochregulation der GKLf-Expression. In der Folge wird die Bindung des Differenzierungsfaktors Myokardin an bestimmte Kontrollelemente durch GKLf verhindert und die Myokardinexpression reduziert. Daraus resultiert eine verminderte Expression von VSMC-Markern wie *smooth muscle* α -Aktin und *smooth muscle* 22 α (LIU et al., 2005). Unabhängig davon wurde bereits früher gezeigt, dass GKLf die Wirkung von TGF β auf das TCE (*TGF β -control-element*) reprimiert, was ebenfalls einen Dedifferenzierungsreiz für VSMC darstellt (ADAM et al., 2000). Die beiden genannten Mechanismen spielen eine Rolle beim sogenannten *phenotype switching* von VSMC nach vaskulären Läsionen wie z.B. der Ballonangioplastie (SUZUKI et al., 2005). Im Gegensatz dazu wird GKLf in Endothelzellen durch Scherstress induziert. Dies ist beispielhaft für die Assoziation der GKLf-Expression mit einem bekannten Risikofaktor für die Atherogenese (McCORMICK et al., 2001). Für andere KLF wie 2 und 6 konnte gezeigt werden, dass sie entweder bei der embryonalen Angiogenese oder der Neointimaformation nach vaskulären Läsionen eine Rolle spielen (SUZUKI et al., 2005). Hinsichtlich der Bedeutung im kardiovaskulären System liegen bislang vor allem Ergebnisse zu Krüppel-like factor 5 (= IKLF, BTEB2; CONKRIGHT et al., 1999) vor. In *knock out*-Experimenten wurde gezeigt, dass KLF5 ein wichtiger Mediator im Prozess

des vaskulären *remodeling* ist, da nach einem konditionalen Verlust dieses Faktors eine reduzierte VSMC-Proliferation, verminderte Angiogenese, reduzierte interstitielle Fibrose und eine Abnahme der kardialen Hypertrophie beobachtet wurde (SHINDO et al., 2002). KLF5 wird in der Gefäßintima nach vaskulären Läsionen hochreguliert (KAWAI-KOWASE et al., 1999). Es gibt verschiedene Beispiele für eine direkte Konkurrenz von KLF4 und KLF5 an denselben Bindungselementen, z.B. am *smooth muscle* α -Aktin-Promoter, am TCE (siehe oben) und am Laminin-1-Promoter. Ferner konkurrieren KLF4 und KLF5 am KLF4-Promoter selbst, wobei KLF4 aktivierend und KLF5 reprimierend wirkt (DANG et al., 2002). Allgemein ist zu sagen, dass KLF4 eher in gehungerten und wachstumsarretierten Zellen nachweisbar ist, während KLF5 durch Proliferationsreize angesprochen wird (SUZUKI et al., 2005).

Die hier vorgelegten experimentellen Befunde lassen sich mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen dahingehend in Einklang bringen, dass KLF4 als antiproliferativer und unter Umständen proapoptotischer Faktor in VSMC wirkt, der darüber hinaus Dedifferenzierungsreize vermitteln kann. KLF5 wurde als Gegenspieler von KLF4 charakterisiert, der einen essentiellen Regulator des vaskulären *remodeling* darstellt und somit als proatherogen einzustufen ist (GHALEB et al., 2005). Die Bedeutung von KLF4 wäre infolgedessen eher vasoprotektiv durch Wachstumshemmung der VSMC, aber die klinische Bedeutung hinsichtlich des atherogenetischen Prozesses kann zu diesem Zeitpunkt noch nicht abschließend beurteilt werden. Es liegt jedoch nahe, dass KLF4 auch in VSMC eine Schlüsselstellung im p53-Netzwerk innehat.

5.2.2 Funktionen des Inhibitor of DNA-binding 3 in kardiovaskulären Zellen

Die Transfektionen dieser Arbeit zeigten weiterhin, dass eine Überexpression des Inhibitor of DNA-binding 3 die VSMC-Proliferation signifikant stimulierte und dass eine Transfektion mit dem antisense-Konstrukt die Proliferation zumindest dem Trend nach inhibierte. Hinsichtlich der Apoptose wurde genau das Gegenteil beobachtet. Ein ähnliches Ergebnis wurde in humanen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) bereits gesehen (SAKURAI et al., 2004). Im Gegensatz dazu wurde von NORTON & ATHERTON 1998 in Mausfibroblasten nachgewiesen, dass unter Serumentzug die Id3-Überexpression zur Apoptose führen kann. Dies wird damit erklärt, dass unter längerfristigem Serumentzug (über 12 Stunden) eine Hypophosphorylierung von Id3 durch Inaktivierung der Cdk2 erfolgt. Diese Id3-Form löst im Gegensatz zu der normal phosphorylierten Form von Id3 eher Apoptose als Proliferation aus. Daneben kann

auch die Überexpression von Id1 nach den Ergebnissen von TANAKA und Mitarbeitern (1998) über die Ausschüttung von ROS aus den Mitochondrien zur Apoptose von kardialen Myozyten führen. Es wurde vermutet, dass die Id-Proteine neben ihrer Funktion des Scavenging von Differenzierungsfaktoren (siehe Kap. 2.3.3) auch in einen grundsätzlichen Signalweg involviert sind, der Zellzyklusprogression und Apoptose steuert und unter bestimmten Umständen eine zelluläre Entartung zulässt.

Da Id3 über die im p21-Promoter enthaltenen E-Boxen als bHLH-Scavenger dessen Expression negativ beeinflusst (PRABHU et al., 1997), hat Id3 eine kontrollierende Wirkung auf die wachstumshemmenden und proapoptotischen Funktionen dieses Cdk-Inhibitors. Die erhöhte Apoptose unter Id3 antisense könnte sich also durch eine Enthemmung des p53-Netzwerks erklären lassen. Andererseits besteht die Möglichkeit, dass Id3 unter physiologischen Bedingungen noch andere proapoptotische Faktoren binden könnte.

Die Id-Proteine sind teilweise hinsichtlich ihrer Bedeutung für das vaskuläre System und vaskuläre Erkrankungen bereits untersucht worden (vgl. Kap. 2.3.4). Zunächst zeigten LYDEN et al. 1999 im *knock out*-Modell, dass Mäuse ohne Allel für Id1 und Id3 auf Grund einer gestörten embryonalen Angiogenese nicht lebensfähig sind. Bemerkenswerterweise überleben Mäuse mit nur einem Allel für Id1 oder Id3 und wiesen eine stark reduzierte Tumorangio-genese auf, da z.B. die Regulation der Matrix-Metalloproteinasen Funktionsdefizite aufweist. In HUVEC wurde durch Anwendung von RNA-Interferenz ebenfalls festgestellt, dass Id1 und Id3 sich gegenseitig kompensieren können, und dass ein *knock down* der Id-Proteine zu einer reduzierten Endothelzellaktivierung durch VEGF und Dysregulation der extrazellulären Matrixmetalloproteinasen führt (SAKURAI et al., 2004).

Bereits 1996 wurde von DEED et al. publiziert, dass die für die humanen Id-Proteine kodierenden Gene eine konservierte Position für alternatives Splicing besitzen. Im Fall von Id3 konnte dann auf Proteinebene das größere Id3-L mit 17kDa anstatt 14kDa nachgewiesen werden, was hinsichtlich der E47-Bindungskapazität eine *loss of function*-Variante darstellt. Weitere Arbeitsgruppen zeigten, dass die alternativen Splicevarianten der Id-Faktoren nicht nur antiproliferativ und proapoptotisch wirken können, sondern auch im Sinne eines Kompensationsmechanismus im mittelfristigen Verlauf (> 1 Woche) nach Ballonangioplastie oder in späteren atherosklerotischen Läsionen nachzuweisen sind (MATSUMURA et al., 2001; FORREST et al., 2004²). Da diese Isoformen in kultivierten VSMC, Endothelzellen und Fibroblasten von den o.g. Gruppen quasi nicht nachweisbar waren, kann allerdings weitgehend ausgeschlossen

werden, dass in der vorliegenden Arbeit alternatives Splicing eine Rolle gespielt hat. Eine pathogenetische Rolle der Inhibitor of DNA-binding Proteine bei vaskulären Erkrankungen ist aber auf Grund der Einflüsse auf die Proliferation und Apoptose kardiovaskulärer Zellen anzunehmen.

5.2.3 GKLf und Id3 als Schnittpunkt redoxsensitiver Regulation in VSMC

Wie in Kapitel 5.1 beschrieben, konnte für GKLf und Id3 eine differentielle Regulation durch Hydroxylradikale, Superoxidanionen und Angiotensin II nachgewiesen werden. Weiterhin wurden die damit assoziierten intrazellulären Signalwege, der Einfluss von GKLf und Id3 auf Proliferation und Apoptose der VSMC und ein möglicher Zusammenhang zwischen der Regulation dieser beiden Faktoren untersucht.

Die Id3-PCRs oder Id3-Northern Blots von Stimulationen mit Hydroxylradikalen lieferten erste Hinweise (Abb. 4.9 und 4.10) für eine solche Verknüpfung, da Id3 durch Hydroxylradikale dosisabhängig herabreguliert wurde, was Peroxidscavenger wie Catalase verhinderten. Da nur SB 203580 und MAPTAM die Id3-Regulation durch OH[•] beeinflussten, scheint im Vergleich zur Id3-Regulation durch Superoxidanionen ein anderer Signalweg vorzuliegen, der größtenteils der Regulation von GKLf durch OH[•] entspricht.

Weitere Anhaltspunkte ließen sich aus der Durchführung von RT-PCRs nach RNA-Isolation transfizierter VSMC gewinnen (Abb. 4.11 und 4.12). Es konnte eine signifikante Reduktion der Id3-mRNA unter Transfektion mit GKLf sense gesehen werden. Zu bedenken ist allerdings, dass in Anbetracht der gegensätzlichen Auswirkungen der oben beschriebenen Transfektionen auf Zellwachstum und Apoptose die gewonnenen RNA-Mengen aus den Kulturen stark variierten und somit die Verlässlichkeit einer Aussage hinsichtlich der mRNA-Spiegel bei einer *real time* PCR mit integrierter Standardkurve für das Amplicon größer wäre.

Daher wurden ebenfalls Ko-Transfektionen mit GKLf und Id3 sense durchgeführt (Abb. 4.13), die eine Aufhebung des wachstumsfördernden Effektes von Id3 sense zeigten. Weiterhin wurden die in Kap. 4.5.4 aufgeführten Luciferase-Assays unter Verwendung eines pGL2(Id3-Promoter)-Konstrukts etabliert. Dabei konnte man nachweisen, dass die Aktivität des Id3-Promoters bei Kotransfektion mit GKLf sense um ca. 90% reduziert wird (Abb. 4.14). Auf diese Weise gelang erstmals der Nachweis einer Hemmung von Id3 durch GKLf auf transkriptioneller Ebene. Im Id3-Promoter (YEH & LIM, 2000; NIH Blast accession number X74428) befinden sich an Position 377, 612

und 741 bp. potentielle Bindungsstellen für den Gut-enriched Krüppel-like factor laut Konsensussequenz (SHIELDS & YANG, 1998).

Passend dazu konnte in den Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe bereits beobachtet werden, dass eine Transfektion mit GKLf sense die durch Serum oder $O_2^{\cdot-}$ herbeigeführte Induktion der Proliferation aufhebt, während die Transfektion mit GKLf antisense die Hemmung der DNA-Synthese durch OH^{\cdot} verhindert. Die Transfektion mit Id3 sense verstärkt die DNA-Synthese zusätzlich zu Serum und $O_2^{\cdot-}$, während die Transfektion mit Id3 antisense die Wirkung von Serum und $O_2^{\cdot-}$ auf die Proliferation aufhebt. Analog dazu werden die Cdk-Inhibitoren p21, p27 und p53 durch GKLf sense, Id3 antisense und OH^{\cdot} hochreguliert, während unter Id3 sense, GKLf antisense und $O_2^{\cdot-}$ die hyperphosphorylierte Form von Rb verstärkt nachweisbar ist. Mit NF κ B ist ein weiterer redoxsensitiver Faktor bekannt, der die Funktion eines redoxsensitiven Protoonkogens besitzt. Über die Oxidation und damit den verstärkten Abbau von I κ B trägt H_2O_2 direkt zur Aktivierung von NF κ B bei. Dieser Signalweg spielt bei der Vermittlung der proproliferativen und antiapoptotischen Wirkung von Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle (MARUMO et al., 1997).

Verschiedene Arbeiten zeigen die Verknüpfung regulatorischer Proteine des Zellzyklus mit der kardiovaskulären Pathophysiologie. Von TANNER und Kollegen konnte in VSMC gezeigt werden, dass die Cdk-Inhibitoren p21^{CIP1/WAF1} und p27^{KIP1} bei verschiedenen Erkrankungen mit pathologischem VSMC-Wachstum differentiell reguliert werden. Während p21 vor allem in atherosklerotischen Plaques vermehrt exprimiert wird, wurde p27 vor allem nach Ballonläsionen in Gefäßen verstärkt nachgewiesen (TANNER et al., 2000). Eine Angiotensinstimulation hingegen bewirkt eine starke Herabregulation dieses Faktors, was eine Bedeutung bei der vaskulären Hypertrophie hat (SERVANT et al., 2000). Auch p53 scheint an der Pathogenese von vaskulären Erkrankungen beteiligt zu sein (GENG, 1997). Es wurde herausgefunden, dass p53 vor allem in instabilen atherosklerotischen Plaques nachgewiesen werden kann (LAVEZZI et al., 2003). Darüber hinaus führt der adenovirale Transfer von p53 in Plaques von Apolipoprotein E^{-/-}-Mäusen zur Induktion einer Plaqueruptur (VON DER THUSEN et al., 2002). Die Bedeutung von NF κ B bei der ischämischen Präkonditionierung des Myokards wurde 1999 von DAS et al. gezeigt.

Die Tatsache, dass die Gabe verschiedener Antioxidantien zur VSMC-Apoptose führen kann, deutet darauf hin, dass eine basale Rate der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies für das normale Zellwachstum notwendig ist (GRIENDLING & USHIO-FUKAI, 1998). Ferner werden ROS von allen vaskulären Zellen in autokriner und parakriner Weise gebildet

(MÜLLER et al., 2005). In den Kapiteln 2.2 und 5.1 wurden bereits die wesentlichen Quellen, Eliminationsmechanismen und Effekte von ROS im kardiovaskulären System besprochen. Die Art, Dosis und Dauer der Einwirkung der reaktiven Sauerstoffspezies bestimmen letztlich den Summeneffekt in der Zelle (GRIENDLING & HARRISON, 1999; IRANI, 2000). Die Grundlage kardiovaskulärer Erkrankungen ist in der Folge eine Dysbalance antioxidativer und prooxidativer Faktoren (CAI & HARRISON, 2000). Somit erscheint das Vorliegen von Querverbindungen zwischen pro- und antiproliferativen Signalwegen sinnvoll, da die Zellen im Falle einer oxidativen Schädigung möglichst schnell ihr Wachstum stoppen müssen, um die DNA-Reparatur zu ermöglichen.

In den vorhergehenden Kapiteln wurde verdeutlicht, dass die Stimulation mit reaktiven Sauerstoffspezies in VSMC zu einer komplexen Signaltransduktion führt, die letztlich auf der Ebene des Zellzyklus mit der Steuerung zentraler zellulärer Funktionen eng verknüpft ist. Mit GCLF und Id3 wurden zwei redoxsensitive Faktoren untersucht, die durch unterschiedliche reaktive Sauerstoffspezies reguliert werden und welche auf den Zellzyklus gegensätzliche Auswirkungen haben. Diese Regulatoren bilden ein Bindeglied für die Transduktion redoxabhängiger Signale zwischen Zellmembran und Nukleus. Auf dem Boden der in der vorliegenden Arbeit untersuchten redoxsensitiven Signalwege eröffnet sich vor dem Hintergrund der momentan gültigen Vorstellung von ROS-abhängigen Mechanismen in VSMC ein möglicherweise wichtiger regulatorischer Schnittpunkt auf der Ebene des G1/S-Checkpunkts des Zellzyklus, weshalb ein Anlass zur weiteren Forschung mit dem Ziel, die pathophysiologische Bedeutung der Interaktion von GCLF und Id3 zu entschlüsseln, besteht.

5.3 Potentielle klinische Bedeutung der Ergebnisse und Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden experimentellen Arbeit führten zu neuen Erkenntnissen im Bereich der Wirkmechanismen reaktiver Sauerstoffspezies in glatten Gefäßmuskelzellen.

Zum einen konnten im Rahmen der Stimulationsexperimente bisher unbekannte Aspekte der mit der Expression von GKLf und Id3 assoziierten intrazellulären Signalwege offengelegt werden. Zum anderen zeigten die Transfektionsexperimente die Bedeutung der beiden untersuchten Faktoren für die Proliferation und Apoptose von VSMC. Hier konnte erstmals nachgewiesen werden, dass zwischen GKLf und Id3 auf transkriptioneller Ebene eine direkte Interaktion stattfindet.

In Einklang mit dem gegenwärtigen Stand der Literatur lässt sich vermuten, dass es sich um zwei Schlüsselfaktoren handelt, die im Kontext des komplex regulierten Zellzyklus eine zentrale Position besitzen.

Id3 ist ein proliferativer und proangiogenetischer Faktor, der von Mitogenen und ROS angesprochen wird. Das Vorliegen eines alternativen Splice-Mechanismus im Rahmen der Atherogenese wie oben beschrieben lässt darauf schließen, dass die Attenuierung der Id3-Funktion einer Plaqueentstehung entgegenwirken könnte. Die genauen physiologischen und pathophysiologischen Funktionen der nativen und attenuierten Form in Beziehung zum atherosklerotischen Krankheitsprozess sind jedoch noch nicht hinreichend aufgeklärt und bedürfen weiterer Forschung. Da der durch klassische kardiovaskuläre Risikofaktoren ausgelöste oxidative Stress in der Gefäßwand zu einem pathologischen Wachstum von VSMC als wesentlicher pathogenetischer Faktor führt, könnte die Antagonisierung des redoxsensitiven HLH-Faktors Id3 oder der zu seiner Aktivierung führenden Signalwege eine therapeutische Relevanz bei praktisch allen vaskulären Erkrankungen haben.

Ein möglicher Weg zur Durchführung dieser Id3-Inhibition wäre nach den vorgelegten Ergebnissen auch eine therapeutische Hochregulation von GKLf, z.B. durch lokale Applikation im Bereich atherosklerotischer Läsionen. Die vorgelegten experimentellen Befunde bilden die Grundlage für weitere Forschung hinsichtlich der pathophysiologischen Relevanz der Interaktion von GKLf und Id3 im Menschen und für die Entwicklung von neuen antiatherosklerotischen Therapiestrategien.

Die hier gesammelten Erkenntnisse unterstreichen die zentrale Bedeutung der durch reaktive Sauerstoffspezies im kardiovaskulären System ausgelösten Effekte und unterstützen damit das aktuelle Konzept der Atherogenese.

6 Literaturverzeichnis

1. Adam PJ, Regan CP, Hautmann MB, Owens GK (2000) Positive- and negative-acting Kruppel-like transcription factors bind a transforming growth factor beta control element required for expression of the smooth muscle cell differentiation marker SM22alpha in vivo. *J Biol Chem* 275:37798-37806
2. Agarwal ML, Taylor WR, Chernov MV, Chernova OB, Stark GR (1998) The p53 network. *J Biol Chem* 273:1-4
3. Aikawa R, Komuro I, Yamazaki I, Zou Y, Kudoh S, Tanak M, Shiojima I, Hiroi Y, Yazaki Y (1997) Oxidative stress activates extracellular signal-regulated kinases through src and ras in cultured cardiac myocytes of neonatal rats. *J Clin Invest* 100:1813-1821
4. Akiyama T, Ichida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibaya M, Fukami Y (1987) Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem* 262:5592-5596
5. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (1995) *Molecular biology of the cell*. 3rd ed. Garland Publishing, New York
6. Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, Saltiel AR (1995) PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 270:27489-27494
7. Allen RG, Tresini M (2000) Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med* 28:463-499
8. Azula FJ, Alzola ES, Conde M, Trueba M, Macarulla JM, Marino A (1996) Thrombin-stimulated phospholipase C activity is inhibited without visible delay by a rapid increase in the cyclic GMP levels induced by sodium nitroprusside. *Mol Pharmacol* 50:367-379
9. Baas AS, Berk BC (1995) Differential activation of mitogen-activated protein kinases by H₂O₂ and O₂⁻ in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 77:29-36
10. Babior BM (1999) NADPH-Oxidase: an update. *Blood* 93:1464-1476
11. Babior BM (2000) Phagocytes and oxidative stress. *Am J Med* 109: 33 -44
12. Bai H, Pollman MJ, Inishi Y, Gibbons GH (1999) Regulation of vascular smooth muscle cell apoptosis. Modulation of bad by a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *Circ Res* 85:229-237
13. Bain G, Cravatt CB, Loomans C, Alberola-Ila J, Hedrick SM, Murre C (2001) Regulation of the helix-loop-helix proteins, E2A and ID3, by the Ras-ERK MAPK cascade. *Nat Immunol* 2:165-171
14. Beckman JS, Minor RL Jr, White CW, Repine JE, Rosen GM, Freeman BA (1988) Superoxide dismutase and catalase conjugated to polyethylene glycol

increases endothelial enzyme activity and oxidant resistance. *J Biol Chem* 263:6884-6992

15. Benezra R, Davis RL, Lockshon D, Turner DL, Weintraub H (1990) The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell* 61:49-59
16. Berk BC (1999) Redox signals that regulate the vascular response to injury. *Thromb Haemost* 82:810-817
17. Bieker JJ (2001) Krüppel-like Factors: Three Fingers in Many Pies. *J Biol Chem* 276:34355-34358
18. Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* 7:1513-1523
19. Blackwell TK, Weintraub H (1990) Differences and similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection. *Science* 250:1104-1110
20. Blane A, Pandey NR, Srivastava AK (2003) Synchronous activation of ERK 1/2, p38 MAPK and PKB / Akt signaling by H₂O₂ in vascular smooth muscle cells: potential involvement in vascular disease. *Int J Mol Med* 11:229-234
21. Cai H, Harrison DG (2000) Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 87:840-844
22. Cardillo C, Kilcoyne CM, Cannon RO, III, Quyyumi AA, Panza JA (1997) Xanthine oxidase inhibition with oxypurinol improves endothelial vasodilator function in hypercholesterolemic but not in hypertensive patients. *Hypertension* 30:57-63
23. Chamley-Campbell J, Campbell GR, Ross R (1979) The smooth muscle cell in culture. *Physiol Rev* 59:1-61.
24. Chance B, Sies H, Boveris A (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 59:527-605
25. Chellappan SP, Hiebert S, Mudryj M, Horowitz JM, Nevins JR (1991) The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. *Cell* 65:1053-1061
26. Chen X, Ko LJ, Jayaraman L, Prives C (1996) p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes Dev* 10:2438-2451
27. Chen ZY, Shie JL, Tseng CC (2000) Up-regulation of gut-enriched kruppel-like factor by interferon-gamma in human colon carcinoma cells. *FEBS Lett* 477:67-72
28. Chen X, Johns DC, Geiman DE, Marban E, Dang DT, Hamlin G, Sun R, Yang VW (2001) Krüppel-like factor 4 (Gut-enriched Krüppel-like factor) inhibits cell proliferation by blocking G1/S progression of the cell cycle. *J Biol Chem* 276:30423-30428

29. Chisolm GM, Steinberg D (2000) The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radic Biol Med* 28:1815-1826
30. Christy BA, Sanders LK, Lau LF, Copeland NG, Jenkins NA, Nathans D (1991) An Id-related helix-loop-helix protein encoded by a growth factor-inducible gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:1815-1819
31. Chu C, Kohtz DS (2000) Identification of the E2A gene products as regulatory targets of the G1 cyclin-dependent kinases. *J Biol Chem* 276:8524-8534
32. Cobb MH, Goldsmith EJ (1995) How MAP Kinases are regulated. *J Biol Chem* 270:14843-14846
33. Conkright MD, Wani MA, Anderson KP, Lingrel JB (1999) A gene encoding an intestinal-enriched member of the Kruppel-like factor family expressed in intestinal epithelial cells. *Nucl Acids Res* 27:1263-1270
34. Cuenda A, Rouse J, Doza YN, Meier R, Cohen P, Gallagher TF, Young PR, Lee JC (1995) SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett* 364:229-233
35. Dang DT, Mahatan CS, Dang LH, Agboula LA, Yang VW (2001) Expression of the gut-enriched Kruppel-like factor (Kruppel-like factor 4) gene in the human colon cancer cell line RKO is dependent on CDX2. *Oncogene* 20:4884-4890
36. Dang DT, Zhao W, Mahatan CS, Geiman DE, Yang VW (2002) Opposing effects of the Kruppel-like factor 4 (gut-enriched Kruppel-like factor) and Kruppel-like factor 5 (intestinal-enriched Kruppel-like factor) on the promoter of the Kruppel-like factor 4 gene. *Nucl Acids Res* 30:2736-2741
37. Dart RC, Sanders AB (1988) Oxygen free radicals and myocardial reperfusion injury. *Ann Emerg Med* 17:53-58
38. Das DK, Engelman RM, Maulik N (1999) Oxygen free radical signaling in ischemic preconditioning. *Ann NY Acad Sci* 874:49-65
39. Deed RW, Jasiok M, Norton JD (1996) Attenuated function of a variant form of the helix-loop-helix protein, Id-3, generated by an alternative splicing mechanism. *FEBS Lett* 393:113-116
40. De Groot H (1994) Reactive oxygen species in tissue injury. *Hepatogastroenterology* 41:328-332
41. De Keulenaer GW, Alexander RW, Ushio-Fukai M, Ishizaka N, Griending KK (1998) Tumour necrosis factor alpha activates a p22phox-based NADH oxidase in vascular smooth muscle. *Biochem J* 329:653-657
42. Dreher D, Junod AF (1995) Differential effects of superoxide, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical on intracellular calcium in human endothelial cells. *J Cell Physiol* 1995; 162:147-153

43. Duell T, Lengfelder E, Fink R, Giesen R, Bauchinger M (1995) Effect of activated oxygen species in human lymphocytes. *Mutat Res* 336: 29-38
44. Eguchi S, Matsumoto T, Motley ED, Utsunomiya H, Inagami T (1996) Identification of an essential signaling cascade for mitogen-activated protein kinase activation by angiotensin II in cultured rat vascular smooth muscle cells. Possible requirement of Gq-mediated p21ras activation coupled to a Ca²⁺/calmodulin-sensitive tyrosine kinase. *J Biol Chem* 271:14169-14175
45. El-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B (1993) WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 75:817-825
46. El-Deiry WS (1998) Regulation of p53 downstream genes. *Semin Cancer Biol* 8:345-357
47. Endres M, Laufs U (2005) Effects of statins on endothelium and signaling mechanisms. *Stroke* 35:2708-2711
48. Farquharson CA, Butler R, Hill A, Belch JJ, Struthers AD (2002) Allopurinol improves endothelial dysfunction in chronic heart failure. *Circulation* 106:221-226
49. Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL (eds) (1998) *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 14th ed. McGraw-Hill, New York
50. Feinberg AP, Vogelstein B (1983) A technique for radiolabeling DNA restrictive endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132:6-13
51. Finkel T (1999) Signal transduction by reactive oxygen species in non-phagocytic cells. *J Leukoc Biol* 65:337-340
52. Forrest ST, Tylor AM, Sarembock IJ, Perlegas D, McNamara CA (2004¹) Phosphorylation regulates Id3 function in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 95:557-559
53. Forrest ST, Barringhaus KG, Perlegas D, Hammarskjold ML, McNamara CA (2004²) Intron retention generates a novel Id3 isoform that inhibits vascular lesion formation. *J Biol Chem* 279:32897-32903
54. Fukai T, Siegfried MR, Ushio-Fukai M, Griending KK, Harrison DG (1999) Modulation of extracellular superoxide dismutase by angiotensin II and hypertension. *Circ Res* 85:23-28
55. Fukushima T, Adachi T, Hirano K (1995) The heparin-binding-site of human xanthine oxidase. *Biol Pharm Bull* 18:156-158
56. Garrett-Sinha LA, Eberspaecher H, Seldin MF, de CB (1996) A gene for a novel zinc-finger protein expressed in differentiated epithelial cells and transiently in certain mesenchymal cells. *J Biol Chem* 271:31384-31390

57. Geiman DE, Ton-That H, Johnson JM, Yang VW (2000) Transactivation and growth suppression by the gut-enriched Krüppel-like factor (Krüppel-like factor 4) are dependent on acidic amino acid residues and protein-protein interaction. *Nucleic Acids Res* 28:1106-1113
58. Geng YJ (1997) Regulation of programmed cell death or apoptosis in atherosclerosis. *Heart vessels* 12:76-80
59. Ghaleb AM, Nandan MO, Chanchevalap S, Dalton WB, Hisamuddin IM, Yang VW (2005) Krüppel-like factors 4 and 5: the yin and yang regulators of cellular proliferation. *Cell Res.* 12:92-96
60. Gill DM, Meren R (1978) ADP-ribosylation of membrane proteins catalyzed by cholera toxin: basis of the activation of adenylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:3050-3054
61. Goetze S, Kintscher U, Kawano H, Kawano Y, Wakino S, Fleck E, Hsueh WA, Law RE (2000) Tumor necrosis factor alpha inhibits insulin-induced mitogenic signaling in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 275:18279-18283
62. Gomes LF, Cuccovia IM, Chaimovich H, Barbieri DH, Politi MJ (1993) Permeation of superoxide anion through the bilayer of vesicles of a synthetic amphiphile. *Biochem Biophys Acta* 1152:78-82
63. Gouni-Berthold I, Seewald S, Hescheler J, Scchinidis A (2004) Regulation of mitogen-activated protein kinase cascade by low density lipoprotein and lysophosphatidic acid. *Cell Physiol Biochem* 14:167-176
64. Graeber TG, Peterson JF, Tsai M, Monica K, Fornace AJ, Jr., Giaccia AJ (1994) Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a G1-phase checkpoint by low-oxygen conditions is independent of p53 status. *Mol Cell Biol* 14:6264-6277
65. Greene EL, Velarde V, Jaffa AA (2000) Role of reactive oxygen species in bradykinin-induced mitogen-activated protein kinase and c-fos induction in vascular cells. *Hypertension* 35:942-947
66. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW (1994) Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 74:1141-1148
67. Griendling KK, Ushio-Fukai M (1998) Redox control of vascular smooth muscle proliferation. *J Lab Clin Med* 132:9-15
68. Griendling KK, Harrison DG (1999) Dual role of reactive oxygen species in vascular growth. *Circ Res* 85:562-563
69. Gu Y, Turck CW, Morgan DO (1993) Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit. *Nature* 366:707-710

70. Guthikonda S, Sinkey C, Barenz T, Haynes WG (2003) Xanthine oxidase inhibition reverses endothelial dysfunction in heavy smokers. *Circulation* 107:416-421
71. Hainaut P, Mann K (2001) Zinc binding and redox control of p53 structure and function. *Antioxid Redox Signal* 3:611-623
72. Halliwell B (1991) Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med* 91:14-22
73. Halliwell B, Aruoma OI (1991) DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Lett* 281:9-19
74. Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ (1993) The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 75:805-816
75. Harrison DG (1997) Endothelial function and oxidant stress. *Clin Cardiol* 20:11 Suppl 2
76. Hartwell LH, Kastan MB (1994) Cell cycle control and cancer. *Science* 266:1821-1828
77. Hashimoto S, Matsumoto K, Gon Y, Furuichi S, Maruoka S, Takeshita I, Hirota K, Yodoi Y, Horie T (1999) Thioredoxin negatively regulates p38 MAP-kinase activation and IL-6 production by tumor necrosis factor- α . *Biochem Biophys Res Comm* 258:443-447
78. Heinzl B, John M, Klatt P, Bohme E, Mayer B (1992) Ca²⁺/calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase. *Biochem J* 281:627-630
79. Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA (2000) Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. *Free Radic Biol Med* 28:1456-1462
80. Herbst U, Toborek M, Kaiser S, Mattson MP, Hennig B (1999) 4-Hydroxynonenal induces dysfunction and apoptosis of cultured endothelial cells. *J Cell Physiol* 181:295-303
81. Hevel JM, White KA, Marletta MA (1991) Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. *J Biol Chem* 266:22789-22791
82. Hewlett EL, Sauer KT, Myers GA, Cowell JL, Guerrant AL (1983) Induction of a novel morphological response in Chinese hamster ovary cells by pertussis toxin. *Infect Immun* 40:1198-1203
83. Holland JA, Meyer JW, Chang MM, O'Donnell RW, Johnson DK, Ziegler LM (1998) Thrombin stimulated reactive oxygen species production in cultured human endothelial cells. *Endothelium* 6:113-121

84. Houde M, Laprise P, Jean D, Blais M, Asselin C, Rivard N (2001) Intestinal epithelial cell differentiation involves activation of p38 mitogen-activated protein kinase that regulates the homeobox transcription factor CDX2. *J Biol Chem* 276:21885-21894
85. Huang C, Ma WY, Maxiner A, Sun Y, Donz Z (1999) p38 kinase mediates UV-induced phosphorylation of p53 protein at serine 389. *J Biol Chem* 274:12229-12235
86. Hunter T (1993) Braking the cycle. *Cell* 75:839-841
87. Igarashi M, Yamaguchi H, Hirata A, Daimon M, Tominaga M, Kato T (2000) Insulin activates p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase via a MAP kinase kinase (MKK) 3/MKK 6 pathway in vascular smooth muscle cells. *Eur J Clin Invest* 30:668-777
88. Inoue S, Kawanishi S (1987) Hydroxyl radical production and human DNA damage and hydrogen peroxide. *Cancer Res* 47: 6522-6527
89. Irani K (2000) Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival: A review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ Res* 87:179-183
90. Jenkins TD, Opitz OG, Okano J, Rustgi AK (1998) Transactivation of the human keratin 4 and Epstein-Barr Virus ED-L2 promoters by gut-enriched Krüppel-like factor. *J Biol Chem* 273:10747-10754
91. Johnson TM, Yu ZX, Ferrans VJ, Lowenstein RA, Finkel T (1996) Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis. *PNAS* 93:11848-11852
92. Kadonaga JT, Carner KR, Masiarz FR, Tjian R (1987) Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell* 51:1079-1090
93. Kato JY, Matsuoka M, Polyak K, Massague J, Sherr CJ (1994) Cyclic AMP-induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor (p27Kip1) of cyclin-dependent kinase 4 activation. *Cell* 79:487-496
94. Kawai-Kowase K, Kurabayashi M, Hoshino Y, Ohyama Y, Nagai R (1999) Transcriptional activation of the zinc finger transcription factor BTEB2 gene by Egr-1 through mitogen-activated protein kinase pathways in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 85):787-795
95. Kawakami M, Okabe E (1998) Superoxide anion radical-triggered Ca²⁺ release from cardiac sarcoplasmic reticulum through ryanodine receptor Ca²⁺ channel. *Mol Pharmacol* 53:497-503
96. Kaziro Y, Itoh H, Kozasa T, Nakafuku M, Satoh T (1991) Structure and function of signal-transducing GTPase-binding proteins. *Annu Rev Biochem* 60:349-400

97. Kim SJ, Ju JW, Oh CD, Yoon YM, Song WK, Kim JH, Yoo YJ, Bang OS, Kang SS, Chun JS (2002) ERK-1/2 and p38 kinase oppositely regulate nitric oxide-induced apoptosis of chondrocytes in association with p53, caspase-3, and differentiation status. *J Biol Chem* 277:1332-1339
98. Kloner RA, Przyklenk K, Whittaker P (1989) Deleterious effects of oxygen radicals in ischemia/reperfusion. Resolved and unresolved issues. *Circulation* 80:1115-1127
99. Ko LJ, Prives C (1996) p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* 10:1054-1072
100. Kyaw M, Yoshizumi M, Tsuchiya K, Izawa Y, Kanematsu Y, Tamaki T (2004) Atheroprotective effects of antioxidants through inhibition of mitogen-activated protein kinases. *Acta Pharmacol Sin* 25: 977-985
101. Landmesser U, Spiekermann S, Dikalov S, Tatge H, Wilke R, Kohler C, Harrison DG, Hornig B, Drexler H (2002) Vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in patients with chronic heart failure: role of xanthine-oxidase and extracellular superoxide dismutase. *Circulation* 106:3073-3078
102. Landmesser U, Dikalov S, Price SR, McCann L, Fukai T, Holland SM, Mitch WE, Harrison DG (2003) Oxidation of tetrahydrobiopterin leads to uncoupling of endothelial nitric oxide synthase in hypertension. *Circulation* 111:1201-1209
103. Lander HM (1997) An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *FASEB J* 11:118-124
104. Langlands K, Yin X, Anand G, Prochownik EV (1997) Differential interactions of Id proteins with basic-helix-loop-helix transcription factors. *J Biol Chem* 272:19785-19793
105. Lavezzi AM, Milei J, Grana DR, Flenda F, Basellini A, Maturri L (2003) Expression of c-fos, p53 and PCNA in the unstable atherosclerotic carotid plaque. *Int J Cardiol* 92:59-63
106. Ledenev AN, Konstantinov AA, Popova E, Ruuge EK (1986) A simple assay of the superoxide generation rate with Tiron as an EPR-visible radical scavenger. *Biochem Int* 13:391-396
107. Lefkowitz JB, Lennartz MR, Rogers M, Morrison AR, Brown EJ (1992) Phospholipase activation during monocyte adherence and spreading. *J Immunol* 149:1729-1735
108. Levine AJ (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88:323-331
109. Li PF, Dietz R, von HR (1997) Differential effect of hydrogen peroxide and superoxide anion on apoptosis and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circulation* 96:3602-3609

110. Liao DF, Zheng-Gen J, Baas AS, Daum G, Gygi SP, Aebersold R, Berk BC (2000) Purification of secreted oxidative stress-induced factors from vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 275:189-203
111. Liao JK, Laufs U (2005) Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45:89-118
112. Libby P (1999) Changing concepts of atherogenesis. *J Intern Med* 247:349-358
113. Ling MT, Wang X, Ouyang XS, Lee TK, Fan TY, Xu K, Tsao SW, Wong YC (2002) Activation of MAPK signaling pathway is essential for Id-1 induced serum independent prostate cancer cell growth. *Oncogene* 21:8498-8505
114. Liu Y, Sinha S, McDonald OG, Shang Y, Hoofnagle MH, Owens GK (2005) Kruppel-like factor 4 abrogates Myokardin-induced activation of smooth muscle gene expression. *J Biol Chem* 280:9719-9727
115. Lopez-Illasaca M (1998) Signaling from G-protein-coupled receptors to mitogen-activated protein (MAP)-kinase cascades. *Biochem Pharmacol* 56:269-277
116. Lovec H, Sewing F, Lucibello FC, Muller R, Moroy T (1994) Oncogenic activity of cyclin D1 revealed through cooperation with Hras: link between cell cycle control and oncogenic transformation. *Oncogene* 9:323-326
117. Loveys DA, Streiff MB, Kato GJ (1996) E2A basic-helix-loop-helix transcription factors are negatively regulated by serum growth factors and by the Id3 protein. *Nucleic Acids Res* 24:2813-2820
118. Luo A, Kong J, Hu G, Liew CC, Xiong M, Wang X, Ji J, Wang T, Zhi H, Wu M, Liu Z (2004) Discovery of Ca²⁺-relevant and differentiation-associated genes downregulated in esophageal squamous cell carcinoma using cDNA microarray. *Oncogene* 23:1291-1299
119. Lusis AJ (2000) Atherosclerosis. *Nature* 407:233-241
120. Lyden D, Young AZ, Zagzag D, Yan W, Gerald W, O'Reilly R, Bader BL, Hynes RO, Zhuang Y, Manova K, Benezra R (1999) Id1 and Id3 are required for neurogenesis, angiogenesis and vascularization of tumour xenografts. *Nature* 401:670-677
121. Maack C, Kartes T, Kilter H, Schäfers HJ, Nickenig G, Böhm M, Laufs U (2003) Oxygen free radical release in human failing myocardium is associated with increased activity of rac1-GTPase and represents a target for statin treatment. *Circulation* 108:1567-1574
122. Macleod KF, Sherry N, Hannon G, Beach D, Tokino T, Kinzler K, Vogelstein B, Jacks T (1995) p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. *Genes Dev* 9:935-944
123. Maki A, Berezesky IK, Fargnoli J, Holbrook NJ, Trump BF (1992) Role of [Ca²⁺]_i in induction of c-fos, c-jun, and c-myc mRNA in rat PTE after oxidative stress. *FASEB J* 6:919-924

124. Maki CG, Howley PM (1997) Ubiquitination of p53 and p21 is differentially affected by ionizing and UV radiation. *Mol Cell Biol* 17:355-363
125. Marletta MA (1994) Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell* 78:927-930
126. Marnett LJ (2000) Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 21:361-370
127. Marumo T, Schini-Kerth VB, Fisslthaler B, Busse R (1997) Platelet-derived growth factor-stimulated superoxide anion production modulates activation of transcription factor NF-kappaB and expression of monocyte chemoattractant protein 1 in human aortic smooth muscle cells. *Circulation* 96:2361-2367
128. Masutani H (2000) Oxidative stress response and signaling in hematological malignancies and HIV infection. *Int J Hematol* 71:25-32
129. Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I (1999) Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 32:595-603
130. Matsumura ME, Li F, Berthoux L, Wei B, Lobe DR, Jeon C, McNamara CA (2001) Vascular injury induces posttranscriptional regulation of the ID3 gene - Cloning of a novel Id3 isoform expressed during vascular lesion formation in rat and human atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*;21:752-758
131. McCormick SM, Eskin SG, McIntire LV, Teng CL, Lu CM, Russell CG, Chittur KK (2001) DNA microarray analysis reveals changes in gene expression of shear stressed human umbilical vein cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:8955-8960
132. McNally JS, Davis ME, Giddens DP, Saha A, Hwang J, Dikalov S, Jo H, Harrison DG (2003) Role of xanthine oxidoreductase and NAD(P)H oxidase in endothelial superoxide production in response to oscillatory shear stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 285:2290-2297
133. Mello Filho AC, Meneghini R (1985) Protection of mammalian cells by ophenanthroline from lethal and DNA-damaging effects produced by active oxygen species. *Biochem Biophys Acta* 847:82-89
134. Michel MC, Li Y, Heusch G (2001) Mitogen-activated protein kinases in the heart. *Arch Pharmacol* 363:245-266
135. Michieli P, Chedid M, Lin D, Pierce JH, Mercer WE, Givol D (1994) Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway. *Cancer Res* 1994; 54:3391-3395
136. Miller IJ, Bieker JJ (1993) A novel, erythroid cell-specific murine transcription factor that binds to the CACC C element and is related to the Kruppel family of nuclear proteins. *Mol Cell Biol* 13:2776-2786
137. Min KS, Nishida K, Onosaka S (1999) Protective effect of metallothionein to ras DNA damage induced by hydrogen peroxide and ferric ion-nitrilotriacetic acid. *Chem Biol Interact* 122:137-152

138. Müller C, Baudler S, Welzel H, Böhm M, Nickenig G (2002) Identification of a novel redox-sensitive gene, *Id3*, which mediates angiotensin II-induced cell growth. *Circulation* 105:2423-2428
139. Müller CF, Laude K, McNally S, Harrison DG (2005) Redox mechanisms in blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:274-278
140. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51:263-273
141. Murad F (1994) Regulation of cytosolic guanylyl cyclase by nitric oxide: the Nocyclic GMP signal transduction system. *Adv Pharmacol* 26:19-33
142. Murre C, McCaw PS, Baltimore D (1989) A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* 56:777-783
143. Nelson WG, Kastan MB (1994) DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways. *Mol Cell Biol* 14:1815-1823
144. Neufeld B, Grosse-Wilde A, Hoffmeyer A, Jordan BWM, Chen P, Dinev D, Ludwig S, Rapp UR (2000) Serine/Threonine kinases 3pK and MAPK-activated protein kinase 2 interact with the basic helix-loop-helix transcription factor E47 and repress its transcriptional activity. *J Biol Chem* 275:20239-20242
145. Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH (1982) Gene transfer in mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J* 1:841-845
146. Nickenig G, Harrison DG (2002 ¹) The AT₁-type angiotensin receptor in oxidative stress and atherogenesis - Part I: Oxidative stress and atherogenesis. *Circulation* 105:393-396
147. Nickenig G, Harrison DG (2002 ²) The AT₁-type angiotensin receptor in oxidative stress and atherogenesis - Part II: AT₁-receptor regulation. *Circulation* 105:530-536
148. Nishida M, Maruyama Y, Tanaka R, Kontani K, Nagao T, Kurose H (2000) G_{α(i)} and G_{α(o)} are target proteins of reactive oxygen species. *Nature* 408:492-495
149. Nordberg J, Arner ES (2001) Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 31:1287-1312
150. Norton JD, Deed RW, Craggs G, Sablitzky F (1998) *Id* helix-loop-helix proteins in cell growth and differentiation. *Trends Cell Biol* 8:58-65
151. Norton JD, Atherton GT (1998) Coupling of cell growth control and apoptosis functions of *Id* proteins. *Mol Cell Biol* 18:2371-2381

152. Noti JD, Johnson AK, Dillon JD (2005) The leukocyte integrin gene Cd11d is repressed by gut-enriched Kruppel-like factor 4 in myeloid cells. *J Biol Chem* 280:3449-3457
153. Obrig TG, Culp WJ, McKeehan WL, Hardesty B (1971) The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes. *J Biol Chem* 246:174-181
154. Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG (1993) Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest* 91:2546-2551
155. Okuda M, Kawahara Y, Yokohama M (1996) Angiotensin II type 1 receptor-mediated activation of Ras in cultured vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 271:595-601
156. Panigada M, Porcellini S, Sutti F, Doneda L, Pozzoli O, Consalez GG, Guttinger M, Grassi F (1999) GKLF in thymus epithelium as a developmentally regulated element of thymocyte-stroma cross-talk. *Mech Dev* 81:103-113
157. Parker SB, Eichele G, Zhang P, Rawls A, Sands AT, Bradley A, Olson EN, Harper JW, Elledge SJ (1995) p53-independent expression of p21Cip1 in muscle and other terminally differentiating cells. *Science* 267:1024-1027
158. Patel RP, Moellering D, Murphy-Ullrich J, Jo H, Beckman JS, Darley-Usmar VM (2000) Cell signaling by reactive nitrogen and oxygen species in atherosclerosis. *Free Radic Biol Med* 28:1780-1794
159. Perkins A (1999) Erythroid Kruppel like factor: from fishing expedition to gourmet meal. *Int J Biochem Cell Biol* 31:1175-1192
160. Petropoulos H, Skerjanc IS (2000) Analysis of the inhibition of MyoD activity by ITF-2B and full-length E12/E47. *J Biol Chem* 275:25095-25101
161. Pou S, Pou WS, Bredt DS, Snyder SH, Rosen GM (1992) Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 267:24173-24176
162. Prabhu S, Ignatova A, Park ST, Sun XH (1997) Regulation of the expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 by E2A and Id proteins. *Mol Cell Biol* 17:5888-5896
163. Pryor WA, Squadrito GL (1995) The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol* 268:699-722
164. Pumigalia KM, Lau LF, Huang CK, Burroughs S, Feinstein MB (1992) Activation of signal transduction in platelets by the tyrosine phosphatase inhibitor pervanadate (vanadyl hydroperoxide). *Biochem J* 286:441-449
165. Puri PL, Avantaggiati ML, Balsano C, Sang N, Graessmann A, Giordano A, Levrero M (1997) p300 is required for MyoD-dependent cell cycle arrest and muscle-specific gene transcription. *EMBO J* 16:369-383

166. Rameh LE, Cantley LC (1999) The role of phosphoinositide 3-kinase lipid products in cell function. *J Biol Chem* 274:8347-8350
167. Rao GN, Berk BC (1992) Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ Res* 70:593-599
168. Rao GN (1999) Differential regulation of p27/kip1 levels and CDK activities by hypertrophic and hyperplastic agents in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Acta* 1448:525-532
169. Robinson KA, Stewart CA, Pye QN, Nguyen X, Kenney L, Salzman S, Floyd RA, Hensley K (1999) Redox-sensitive protein phosphatase activity regulates the phosphorylation state of p38 protein kinase in primary astrocyte culture. *J Neurosci Res* 55:724-732
170. Roos CM, Rich GF, Uncles DR, Daugherty MO, Frank DU (1994) Sites of vasodilatation by inhaled nitric oxide vs. sodium nitroprusside in endothelin-constricted isolated rat lungs. *J Appl Physiol* 77:51-57
171. Ross R (1993) The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990's. *Nature* 362:801-809
172. Ross R (1999) Atherosclerosis - An inflammatory disease. *NEJM* 340:115-126
173. Sakurai D, Tsuchiya N, Yamaguchi A, Okaji Y, Tsuno NH, Kobata T, Takahashi K, Tokunaga K (2004) Crucial role of inhibitor of DNA binding/differentiation in the vascular endothelial growth factor-induced activation and angiogenic processes of human endothelial cells. *J Immunol* 174:5801-5809
174. Sambrook J & Russell D in: *Molecular Cloning - A laboratory Manual* (third edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001 (NY, USA).
175. Schmitz U, Thommes K, Beier I, Vetter H (2002) Lysophosphatidic acid stimulates p21-activated kinase in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 292:687-691
176. Schuh R, Aicher W, Gaul U, Cote S, Preiss A, Maier D, Seifert E, Nauber U, Schroder C, Kemler R (1986) A conserved family of nuclear proteins containing structural elements of the finger protein encoded by Kruppel, a Drosophila segmentation gene. *Cell* 47:1025-1032
177. Segre JA, Bauer C, Fuchs E (1999) Klf4 is a transcription factor required for establishing the barrier function of the skin. *Nat Genet* 22:356-360
178. Servant MJ, Coulombe P, Turgeon B, Meloche S (2000) Differential regulation of p27(Kip1) expression by mitogenic and hypertrophic factors: Involvement of transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *J Cell Biol* 148:543-556
179. Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS (2000) Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radic Biol Med* 28:1387-1404

180. Sherr CJ (1995) Mammalian G1 cyclins and cell cycle progression. *Proc Assoc Am Physicians* 107:181-186
181. Sherr CJ, Roberts JM (1995) Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 9:1149-1163
182. Shie JL, Chen ZY, Fu M, Pestell RG, Tseng CC (2000) Gut-enriched Kruppel-like factor represses cyclin D1 promoter activity through Sp1 motif. *Nucleic Acids Res* 28: 2969-2976
183. Shields JM, Christy RJ, Yang VW (1996) Identification and characterization of a gene encoding a gut-enriched Kruppel-like factor expressed during growth arrest. *J Biol Chem* 271:20009-20017
184. Shields JM, Yang VW (1997) Two potent nuclear localization signals in the gut-enriched Kruppel-like factor define a subfamily of closely related Kruppel proteins. *J Biol Chem* 272:18504-18507
185. Shields JM, Yang VW (1998) Identification of the DNA sequence that interacts with the gut-enriched Kruppel-like factor. *Nucleic Acids Res* 26:796-802
186. Shindo T, Manabe I, Fukushima Y et al. (2002) Kruppel-like zinc-finger transcription factor KLF5/BTEB2 is a target for angiotensin II signaling and an essential regulator of cardiovascular remodeling. *Nat med* 8:856-863
187. Sies H (1993) Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 215:213-219
188. Singh P, Wong SH, Hong W (1994) Overexpression of E2F-1 in rat embryo fibroblasts leads to neoplastic transformation. *EMBO J* 13:3329-3338
189. Skibo EB (1986) Noncompetitive and irreversible inhibition of xanthine oxidase by benzimidazole analogues acting at the functional flavin adenin dinucleotide cofactor. *Biochemistry* 25:4189-4194
190. Skov KA (1984) The contribution of hydroxyl radical to radiosensitization: a study of DNA damage. *Radiat Res* 99:502-510
191. Smithies O, Maeda N (1995) Gene targeting approaches to complex diseases: atherosclerosis and essential hypertension. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:5266-5272
192. Solch JP, Arnold GJ (1996) Multiplex reverse transcription polymerase chain reaction combined with temperature gradient gel electrophoresis as a tool for the normalized quantitation of intrinsic factor mRNA. *Electrophoresis* 17:30-39
193. Speir E, Shibutani T, Yu ZX, Ferrans V, Epstein SE (1996) Role of reactive oxygen intermediates in cytomegalovirus gene expression and in the response of human smooth muscle cells to viral infection. *Circ Res* 79:1143-1152
194. Spiekermann S, Landmesser U, Dikalov S, Brecht M, Gamz G, Tatge H, Reepschlager N, Hornig N, Drexler H, Harrison DG (2003) Electron spin resonance characterization of vascular xanthine and NAD(P)H oxidase activity in

patients with coronary artery disease: relation to endothelium-dependent vasodilation. *Circulation* 107:1383-1389

195. Stadtman ER (1990) Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Radic Biol Med* 9:315-325
196. Stahl W, Sies H (1997) Antioxidant defenses: vitamins E and C and carotenoids. *Diabetes* 46:14-18
197. Stuehr DJ, Fasehun OA, Kwon NS, Gross SS, Gonzales JA, Levi R, Nathan CF (1991) Inhibition of macrophage and endothelial nitric oxide synthase by diphenyleneiodonium and its analogs. *FASEB J* 5:98-103
198. Suzuki YJ, Forman HJ, Sevanian A (1997) Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic Biol Med* 22:269-285
199. Suzuki T, Aizawa K, Matsumura T, Nagai R (2005) Vascular implications of the Krüppel-Like Family of Transcription Factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:1135-1141
200. Tanaka K, Pracyk JB, Takeda K, Yu ZX, Ferrans VJ, Deshpande SS, Oyaki M, Hwang PM, Lowenstein CJ, Irani K, Finkel T (1998) Expression of Id1 results in apoptosis of cardiac myocytes through a redox-dependent mechanism. *J Biol Chem* 273:25922-25928
201. Tanner FC, Boehm M, Akyurek LM, San H, Yang ZY, Tashiro J, Nabel GJ, Nabel EG (2000) Differential effects of the cyclin-dependent kinase inhibitors p27(Kip1), p21(Cip1) and p16(Ink4) in vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation* 101:2022-2025
202. Thorin-Trescases N, Orlov SN, Taurin S, Dulin NO, Allen BG, deBlois D, Tremblay J, Pshezhetsky AV, Hamet P (2001). Antiproliferative effect of brief exposure to cholera toxin in vascular smooth muscle cells: role of cAMP and protein kinase A. *Can J Physiol Pharmacol* 79:471-480
203. Tilly JL, Tilly KI (1995) Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle-stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles. *Endocrinology* 136:242-252
204. Toker A (2000) Protein kinases as mediators of phosphoinositide 3-kinase signaling. *Mol Pharmacol* 57:652-58
205. Ton-That H, Kaestner KH, Shields JM, Mahatanankoon CY, Yang VW (1997) Expression of the gut-enriched Kruppel-factor gene during development and intestinal tumorigenesis. *FEBS Lett* 419:239-243
206. Turner J, Crossley M (1999) Mammalian Krüppel-like transcription factors: more than just a pretty finger. *Trends Biochem Sci* 24:236-240
207. Ushio-Fukai M, Alexander RW, Akers M, Griending KK (1998) P38 mitogen-activated protein kinase is a critical component of the redox-sensitive signaling pathways activated by Angiotensin II. *J Biol Chem* 273:15022-15029

208. Ushio-Fukai M, Alexander RW (2004) Reactive oxygen species as mediators of angiogenesis signaling - role of NAD(P)H oxidase. *Mol Cell Biochem* 264:85-97
209. Van Heyningen S (1982) Cholera toxin. *Biosci Rep* 2:135-146
210. Vantler M, Caglayan E, Zimmermann WH, Baumer AT, Rosenkranz S (2005) Systematic evaluation of anti-apoptotic growth factor signaling in vascular smooth muscle cells: Only phosphatidylinositol 3'-kinase is important. *J Biol Chem* 280:14168-14176.
211. Van Vliet J, Turner J, Crossley (2000) Human Krüppel-like Factor 8: a CACCC-box binding protein that associates with CtBP and represses transcription. *Nuc Acids Res* 9:1955-1962
212. Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, Tordo P, Pritchard KA, Jr (1998) Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:9220-9225
213. Viedt C, Soto U, Krieger-Brauer HI, Fei J, Elsing C, Kübler W, Kreuzer J (2000) Differential activation of mitogen-activated protein kinases in smooth muscle cells by Angiotensin II. Involvement of p22phox and reactive oxygen species. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:940-948
214. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ (2000) Surfing the p53 network. *Nature* 408:307-310
215. Von der Thusen JH, van Vlijmen BJ, Hoeben RC, Kockx MM, Havekes LM, van Berkel TJ, Biessen EA (2002) Induction of atherosclerotic plaque rupture in apolipoprotein E-/- mice after adenovirus-mediated transfer of p53. *Circulation* 105:2064-2070
216. Wassmann S, Laufs U, Müller K, Konkol C, Ahlbory K, Baumer AT, Linz W, Böhm M, Nickenig G (2002) Cellular antioxidant effects of Atorvastatin in vitro and in vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:300-305
217. Wassmann S, Wassmann K, Nickenig G (2004) Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells. *Hypertension* 44:381-386
218. Weinberg RA (1996) The molecular basis of carcinogenesis: understanding the cell cycle clock. *Cytokines Mol Ther* 2:105-110
219. WHO-MONICA Project (1994) Myocardial infarction and coronary deaths in the World Health Organization project: Registration procedures, event rates and case-fatality rates in 38 populations from 21 countries in four continents. *Circulation* 90:583-612
220. Wu MH, Yung BY (1994) Cell cycle phase-dependent cytotoxicity of actinomycin D in HeLa cells. *Eur J Pharmacol* 270:203-212

221. Yang J, Kawai Y, Hanson RW, Arinze IJ (2001) Sodium butyrate induces transcription from the *Gid2* gene promoter through multiple Sp1 sites in the promoter and by activating the MEK-ERK signal transduction pathway. *J Biol Chem* 276:25742-25752
222. Yeh K, Lim RW (2000) Genomic organization and promoter analysis of the murine *Id3* gene. *Gene* 254:163-171
223. Yet SF, McA'Nulty MM, Folta SC, Yen HW, Yoshizumi M, Hsieh CM, Layne MD, Chin MT, Wang H, Perrella MA, Jain MK, Lee ME (1998) Human EZF, a Kruppel-like zinc finger protein, is expressed in vascular endothelial cells and contains transcriptional activation and repression domains. *J Biol Chem* 273:1026-1031
224. Yoon HS, Chen X, Yang VW (2002) Kruppel-like factor 4 mediates p53-dependent G1/S cell cycle arrest in response to DNA damage. *J Biol Chem* 278:2101-2105
225. Yoon HS, Yang VW (2004) Requirement of Kruppel-like factor 4 in preventing entry into mitosis following DNA damage. *J Biol Chem* 279:5035-5041
226. Yoon HS, Ghaleb AM, Nandan MO, Hisamuddin IM, Dalton WB, Yang VW (2005) Kruppel-like factor 4 prevents centrosome following γ -irradiation-induced DNA damage. *Oncogene* 24:4017-4025
227. Zafari AM, Ushio-Fukai M, Akers M, Yin Q, Shah A, Harrison DG, Taylor WR, Griendling KK (1998) Role of NADH/NADPH oxidase-derived H₂O₂ in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. *Hypertension* 32:488-495
228. Zalba G, Beaumont J, San Jose G, Fortuno A, Fortuno MA, Diez J (2000) Vascular oxidant stress: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *J Physiol Biochem* 56:57-64
229. Zarubin T, Han J (2005) Activation and signaling pathways of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res* 15:11-18
230. Zhan Q, Carrier F, Fornace AJ, Jr (1993) Induction of cellular p53 activity by DNA-damaging agents and growth arrest. *Mol Cell Biol* 13:4242-4250
231. Zhang W, Geiman DE, Shields JM, Dang DT, Mahatan CS, Kaestner KH, Biggs JR, Kraft AS, Yang VW (2000) The gut-enriched Kruppel-like factor (Kruppelle like factor 4) mediates the transactivating effect of p53 on the p21WAF1/Cip1 promoter. *J Biol Chem* 275:18391-18398

7 Publikationen und Danksagung

Mit Hilfe der Ergebnisse dieser Arbeit ist folgende Publikation entstanden:

Nickenig G, Baudler S, Müller C, Werner C, Werner N, Welzel H, Strehlow K, Böhm M (2002) Redox-sensitive vascular smooth muscle cell proliferation is mediated by GRLF and ID3 in vitro and in vivo. FASEB J 16:1077-1086

Danksagung:

Herrn Prof. Dr. med. M. Böhm danke ich für die Möglichkeit, die experimentellen Arbeiten dieser Dissertation in den Räumlichkeiten des Forschungslabors der Klinik für Innere Medizin III des Universitätsklinikums des Saarlandes durchzuführen.

Zu besonderem Dank bin ich Herrn Prof. Dr. med. G. Nickenig verpflichtet für die Überlassung des spannenden Themas, sein stets freundliches und motivierendes Engagement bei allen Aspekten dieser Arbeit und vor allem für die herausragende wissenschaftliche Unterstützung.

Ebenso möchte ich Herrn Dr. med. Cornelius Müller für die Einarbeitung in die molekularbiologische Methodik, seine hervorragende menschliche und wissenschaftliche Betreuung und die Korrektur der Arbeit danken, die entscheidend zum Gelingen beitrugen.

Weiterhin danke ich allen Doktoranden und technischen Assistentinnen des Labors für die Gelegenheit, in einem menschlich wertvollen Team sowie einer hochqualifizierten wissenschaftlichen Arbeitsgruppe forschen zu dürfen. Besonders hervorheben möchte ich meine Frau Bianca, die ich im Rahmen meiner Dissertation kennenlernen durfte. Ihre Zuversicht, ihre Geduld und ihre Motivation in allen Belangen waren stets der Motor meines Durchhaltevermögens.

8 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name, Vorname: WERNER, Christian Matthias
Geburtsdatum: 29.05.1977
Geburtsort: Trier
Familienstand: Verheiratet mit Bianca Werner geb. Klöckner
Konfession: Römisch-katholisch
Eltern: Frau Petra Rohrbaugh (geb. Roth), Fremdsprachen-
sekretärin und Herr Wilfried Werner, Bauzeichner

Schulbildung

1983-1987 Grundschole St. Johann, Konz
1987-1991 Gymnasium Konz
1991-1996 Wilhelm-Erb-Gymnasium Winnweiler
1996 Abitur

Zivildienst

1996-1997 Westpfalz-Klinikum Kaiserslautern, Abteilung für
Herz-/Gefäß-/Thoraxchirurgie

Studium

1997-2004 Studium der Humanmedizin, Universität d. Saarlandes
1999 Physikum
2000 Erstes Staatsexamen
2002 Zweites Staatsexamen
04/2003-04/2004 Praktisches Jahr (Wahlfach: Pädiatrie)
April 2004 Drittes Staatsexamen

Berufliche Erfahrung

Seit Juni 2004 Ärztliche Tätigkeit in der Klinik für Innere Medizin III –
Kardiologie, Angiologie und Internistische
Intensivmedizin (Direktor: Prof. Dr. med. M. Böhm)