

**Untersuchungen zur induzierbaren Expression
des Adhäsionsmoleküls
E-Selektin und dessen potentieller Bedeutung
bei der Tumormetastasierung**

D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am
Fachbereich Biologie der
Johannes Gutenberg-Universität
Mainz

vorgelegt von
Tobias Nübel
Geboren am 27.04.1973 in Darmstadt

Mainz, 2004

Tag der mündlichen Prüfung:

20.07.2004

Die vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung für Angewandte Toxikologie des Institutes für Toxikologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz vom 01.05.2000 bis zum 30.06.2004 angefertigt.

Danksagungen

Ich möchte mich bei allen Mitgliedern der Abteilung „Angewandte Toxikologie“ für die Hilfsbereitschaft im Labor und die Unterstützung bei arbeitstechnischen Schwierigkeiten und bei Motivationsproblemen bedanken. Das mehr oder weniger harmonische Arbeitsklima im Labor unterstützte das Fortkommen meiner Arbeit.

Ganz, ganz vielen Dank für Eure fortwährende seelische und moralische Unterstützung und die ständige Bereitschaft, Euch meine Laborprobleme anzuhören und mir zu helfen, Mutti und Esther!! Ohne Euch hätte ich diese Arbeit nie geschafft!!

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	S. XI
-----------------------	-------

1. Einleitung

1.1. Die Superfamilie der Adhäsionsmoleküle	S. 1
1.2. Die vier Familien der Zelladhäsionsmoleküle	S. 2
1.2.1. Die Immunglobulin-Superfamilie	S. 3
1.2.2. Die Cadherine	S. 3
1.2.3. Die Integrine	S. 4
1.2.4. Die Selektine	S. 4
1.2.4.1. Das „platelet“-Selektin	S. 5
1.2.4.2. Das „leukocyte“-Selektin	S. 5
1.2.4.3. Das „endothelial“-Selektin	S. 5
1.2.4.4. Der strukturelle Aufbau der Selektine	S. 7
1.2.4.5. Die Liganden der Selektine	S. 8
1.3. Endothel und Zelladhäsion	S. 9
1.4. Zelladhäsion, Krebs und Metastasierung	S. 9
1.4.1. Zelladhäsionsmoleküle bei der malignen Progression	S. 10
1.4.2. Selektine bei der malignen Progression	S. 11
1.5. Kleine GTP-bindende Proteine	S. 13
1.6. Die Familie der Rho-Proteine	S. 17
1.7. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	S. 19

2. Material und Methoden

2.1. Material	S. 20
2.1.1. Feinchemikalien und Chemikalien	S. 20
2.1.2. Medien, Lösungen und Puffer	S. 21
2.1.3. Kits	S. 23
2.1.4. Antikörper	S. 23
2.1.5. Enzyme	S. 23

2.1.6. Oligonukleotide	S. 24
2.1.7. Expressionsvektoren	S. 25
2.1.8. Zellsysteme	S. 25
2.1.8.1. Bakterienstämme	S. 25
2.1.8.2. Säugerzelllinien und primäre Zellsysteme	S. 25
2.1.9. Zellkulturmedien	S. 26
2.1.10. Medienzusätze	S. 26
2.1.11. Plastikware zur Zellkultivierung	S. 26
2.1.12. Geräte	S. 26
2.2. Methoden	S. 28
2.2.1. Zellbiologische Methoden	S. 28
2.2.1.1. Kultivierung von Bakterien und eukaryontischen Zellsystemen	S. 28
a) Kultivierung von Bakterien (<i>Escherichia coli</i>)	S. 28
b) Kultivierung eukaryontischer Zellen	S. 28
2.2.1.2. Bestimmung der NO-Konzentration	S. 29
2.2.1.3. Analyse der Tumorzelladhäsion	S. 29
2.2.1.4. Tumorzell-Transmigrations Assay	S. 29
2.2.1.5. Zytotoxizitätstests	S. 30
a) Bestimmung der Apoptosefrequenz durch sub-G1- Messung	S. 30
b) Analyse metabolischer Zellaktivität	S. 30
c) Bestimmung der DNA-Syntheserate	S. 31
2.2.1.6. Transfektion von DNA in Säugerzellen	S. 31
2.2.2. Proteinbiochemische Methoden	S. 32
2.2.2.1. Herstellung von Gesamtproteinextrakten	S. 32
2.2.2.2. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	S. 32
2.2.2.3. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) zur Auftrennung von Proteingemischen	S. 32
2.2.2.4. Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen (Western-Blot)	S. 33
2.2.3. Immunologische Methoden	S. 33
2.2.3.1. ELISA-Analysen	S. 33

2.2.3.2	Immunologischer Nachweis von Proteinen (Western-Blot)	S. 34
2.2.3.3	FACS-Analysen	S. 35
a)	Bestimmung der Oberflächenexpression von Proteinen auf Endothelzellen	S. 35
b)	Bestimmung der Apoptosefrequenz, Annexin-V-Färbung	S. 35
2.2.4.	Molekularbiologische Arbeitsmethoden	S. 35
2.2.4.1	Präparation von Nukleinsäuren	S. 35
a)	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	S. 35
b)	Isolierung genomischer DNA aus Säugerzellen und Mausschwanzbiopsien	S. 36
c)	Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugerzellen	S. 37
2.2.4.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	S. 37
2.2.4.3	Transformation von DNA in <i>E. coli</i>	S. 37
a)	Herstellung kompetenter Bakterien	S. 37
b)	Transformation	S. 38
2.2.4.4	Synthese von Nukleinsäuren <i>in vitro</i>	S. 38
a)	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	S. 38
b)	Reverse Transcriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	S. 39
c)	Primerdesign	S. 40
2.2.4.5	Aufreinigung von DNA-Fragmenten	S. 40
a)	über Gelelektrophorese	S. 40
b)	über Spin-Columns	S. 40
2.2.4.6	Auftrennung von DNA-Gemischen	S. 40
2.2.4.7	Klonierung von DNA-Fragmenten	S. 41
a)	Restriktionsverdau von DNA	S. 41
b)	Präparation von Vektoren für die Ligation	S. 41
c)	Auffüllen rezessiver 3'-Termini mit Klenow-Polymerase	S. 41
d)	Klonierung von PCR-Fragmenten	S. 42
e)	Ligation	S. 42

2.2.4.8	Klonierung des E-Selektin-Promotor-Luziferasekonstrukts	S. 42
2.2.4.9	DNA-Sequenzierung	S. 43
2.2.5.	Reportergenanalysen	S. 43
2.2.5.1.	Analyse der E-Selektin-Promotor-Aktivität	S. 43
2.2.5.2.	Quantifizierung der β -Galaktosidase in Säugerzellen	S. 43
	a) Quantitative Bestimmung der β -Galaktosidase in NIH-3T3-Mausfibroblasten	S. 43
	b) Quantitative Bestimmung der β -Galaktosidase in murinen Organlysaten	S. 44
2.2.6.	Tierexperimentelle Arbeiten	S. 44
2.2.6.1.	Mikroinjektion von DNA in Maus-Oozyten	S. 44
2.2.6.2.	Genotypisierung und Charakterisierung transgener Tiere	S. 45
2.2.6.3.	Kreuzung transgener Tiere mit anderen Mausstämmen	S. 45
3.	Ergebnisse	
3.1.	Induktion von E-Selektin durch Zytokine	S. 46
3.1.1.	Zytokine stimulieren E-Selektin-Expression in humanen Endothelzellen	S. 46
3.1.2.	Einfluss von Statinen auf die TNF α -induzierte E-Selektin-Expression	S. 51
3.1.3.	Einfluss zytoskelettaler Veränderungen auf E-Selektin-Expression	S. 53
3.1.4.	Einfluss von Statinen auf die TNF-Rezeptor-Expression in Endothelzellen	S. 56
3.1.5.	Beteiligung von Rho-GTPasen an der TNF α -induzierten E-Selektin-Expression	S. 58
3.1.6.	9-cis-Retinsäure hemmt TNF α -induzierte E-Selektin-Expression	S. 61
3.1.7.	Lovastatin und 9-cis-Retinsäure hemmen Tumorzelladhäsion	S. 62
3.1.8.	Hemmung der E-Selektin-Expression führt zu verminderter Tumorzellapedese	S. 65

3.2. Ionisierende γ -Strahlung induziert E-Selektin in humanen Endothelzellen	S. 67
3.2.1. γ -Strahlung vermittelt E-Selektin-Expression in Endothelzellen über den PI-3-Kinase-Signalweg	S. 68
3.2.2. Hemmung der NF- κ B-Aktivierung durch Lovastatin blockiert γ -Strahlen-induzierte E-Selektin-Expression in humanen Endothelzellen	S. 69
3.2.3. Lovastatin beeinflusst γ -Strahlen-induzierte E-Selektin-Expression durch Hemmung von Rho-Proteinen und Inhibierung der Akt-Kinase	S. 71
3.2.4. All-trans-Retinsäure hemmt durch Beeinflussung von NF- κ B und AP-1 γ -Strahlen-induzierte E-Selektin-Expression in Endothelzellen	S. 73
3.2.5. Ionisierende Strahlung stimuliert die Adhäsion humaner Tumorzellen an Endothelien	S. 76
3.2.6. All-trans-Retinsäure und Lovastatin hemmen γ -Strahlen-induzierte Tumorzelladhäsion an Endothelien	S. 77
3.2.7. Lovastatin schützt Endothelzellen vor der zytotoxischen Wirkung von γ -Strahlen	S. 77
3.3. Etablierung eines transgenen Mausmodells zur Untersuchung der Rolle von Rho-GTPasen im E-Selektin-vermittelten Metastasierungs-geschehen <i>in vivo</i>	S. 84
3.3.1. Klonierung der Expressionsvektoren für dominant-negatives Rac1 und wildtyp-RhoB	S. 84
a) Strategie	S. 85
b) Klonierung des UbiquitinC-Promotors	S. 85
c) Klonierung des loxP-lacZ-Fragments	S. 86
d) Synthese des dnRac1-Expressionsvektors	S. 88
e) Synthese des RhoB-Expressionsvektors	S. 88
3.3.2. <i>in vitro</i> -Funktionsüberprüfung der Rho-Protein-Expressions-vektoren	S. 89
a) Nachweis der Rho-Protein-Fremdexpression in COS-7-Zellen	S. 89
b) Nachweis der β -Galaktosidase-Überexpression in NIH-3T3-Zellen	S. 91

3.3.3. Generierung und Charakterisierung transgener Mäuse	S. 92
4. Diskussion	S. 96
4.1. TNF α und γ -Strahlung induzieren endotheliale E-Selektin-Expression und Tumorzelladhäsion	S. 97
4.2. Pharmakologische Modulation der E-Selektin-Expression in Endothelzellen	S. 99
4.2.1. Statine sind potente Inhibitoren der Expression von E-Selektin	S. 99
4.2.2. Retinsäuren sind potente Inhibitoren der E-Selektin-Expression in Endothelzellen	S. 103
4.3. Hemmung der E-Selektin-Expression führt zu verminderter Tumorzelladhäsion und γ -diapedese	S. 105
4.4. Lovastatin schützt Endothelzellen vor der Zytotoxizität von γ -Strahlung	S. 110
4.5. Tierexperimentelle Bestätigung der <i>in vitro</i> -Befunde	S. 113
5. Zusammenfassung	S. 116
6. Literaturverzeichnis	S. 118
Publikationen	S. 134
Tagungsbeiträge	S. 134

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A. bidest	deionisiertes Wasser
Abb.	Abbildung
Abs.	Absorption
Ac	Acetat
ADP	Adenosin - 5' - Diphosphat
Amp	Ampicillin
AP-1	Aktivatorprotein - 1
APS	Ammoniumpersulfat
Arf	ADP - Ribosylierungsfaktor
ATF2	aktivierender Transkriptionsfaktor 2
ATP	Adenosin - 5' - Triphosphat
at-RA	all - trans - Retinsäure
AS	Aminosäure
Bax	Bcl - 2 associated protein X
Bcl-2	B cell lymphoma 2 / B cell leukemia 2
-Gal/beta-Gal	beta - Galaktosidase
Bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BrdU	5 - Bromo - 2' - Desoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celcius
ca.	zirka
Caspase	Cystein - abhängiges, Aspartat - spezifisches Enzym
CD 95	Cluster of differentiation 95
Cdc42	cell division cycle gene 42
cDNA	“copy” - Desoxyribonukleinsäure
CHO	Chinese hamster ovary
c-myc	zelluläres Homologes zu Onkogen, welches in Hühnern <u>Myelocytomatose</u> hervorruft
9c-RA	9 - cis - Retinsäure
CRD	carbohydrate recognition domain
Cre	cyclization recombination
d	day, Tag
	Differenz
Da	Dalton

dCTP	Desoxycytidin - 5' - Triphosphat
d.h.	das heißt
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
(D)MEM	(Dulbeccos) modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dn	dominant - negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
Doxo	Doxorubicin
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
ECs	endothelial cells (Endothelzellen)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGM	endothelial growth medium
ELAM-1	endothelial leukocyte adhesion molecule - 1
ELISA	enzyme linked immuno sorbent assay
eNOS	endotheliale NO - Synthase
EGF	epidermal growth factor
ERK-2	extracellular signal regulated kinase 2
E-Selektin	endothelial selectin
EtBr	Ethidiumbromid
f	femto
FACS	fluorescence activated cell sorter
Fas	Fibroblasten assoziiert
FBS / FCS	fetal bovine / calf serum (fötales Rinder- / Kälberserum)
FITC	Fluorescein - Isothiocyanat
FPP	Farnesylpyrophosphat
FTI	Farnesyltransferase - Inhibitor
FVB-Maus	<i>Fv1^b</i> - Allel tragende Maus (sensitiv für den B-Stamm des "Friend leukaemia virus")
g	Gramm
G	Guanin
GAP	GTPase - activating protein
GAPDH	Glycerinaldehyd - 3 - Phosphat - Dehydrogenase
GDP	Guanosin - 5' - Diphosphat
GEF	guanin nucleotide exchange factor
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
GGTI	Geranylgeranyltransferase - Inhibitor Typ I
-Strahlung	siehe IR
GTP	Guanosin - 5' - Triphosphat
Gy	Gray

h	Stunde(n) oder human
HEPES	N - 2 - Hydroxyethylpiperazin - N - 2 - Ethansulfonsäure
HMG-CoA	Hydroxymethylglutaryl - CoenzymA
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettich Peroxidase)
HUVEC	human umbilical vein endothelial cells
ICAM-1	intercellular adhesion molecule - 1
IgG	Immunglobulin G
I B (-)	inhibitor of kappaB (alpha)
IKK	I B - Kinase
IL-1 /	Interleukin - 1 alpha/beta
iNOS	induzierbare NO - Synthase
IR	ionizing radiation (ionisierende Strahlung, = 0,05 - 0,5 pm)
J	Joule
JNK	c - Jun - NH ₂ - terminal kinase
k	Kilo
kB	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
Kon	Kontrolle
l	Liter
	Wellenlänge
LMP-Agarose	low melting point Agarose (Agarose mit niederem Schmelzpunkt)
Lova	Lovastatin
loxP	locus of crossover P1
LPA	lysophosphatidic acid (Lysophosphatidsäure)
L-Selektin	leukocyte selectin
m	milli / Meter
M	molar
MAPK	mitogen - activated protein kinase
MCS	multiple cloning site
MEK	mitogen - activated ERK activating kinase
min	Minute(n)
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
MNNG	N - Methyl - N' - Nitro - N - Nitrosoguanidin
MOPS	3 - [N - Morpholino]propan - Sulfonsäure
mRNA	messenger RNA
n	nano
NaAc	Natriumacetat
NaOH	Natronlauge
NF- B	nuclear factor kappaB

NO	Stickstoffmonoxid
OD	optische Dichte
p	pico / phospho
PAA	Polyacrylamid (38 %) / Bispolyacrylamid (2 %)
PAGE	Polyacrylamid - Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	polymerase chain reaction
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PI	Propidiumiodid
PI-3-Kinase	Phosphatidylinositol - 3 - Kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
P-Selektin	platelet selectin
Rac	Ras - related C3 - botulinum toxin substrate
RAR	retinoic - acid - receptor
Ras	rat sarcoma virus
Rho	Ras homolog
Rho-GDI	Rho - GDP - dissociation inhibitor
RLU	relative light units
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Zimmertemperatur / Reverse Transkriptase
RXR	retinoic - X - receptor
SAPK	stress - activated protein kinase
SDS	Natrium(Sodium)dodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
SPF	spezifiziert pathogenfrei
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris - Borat - EDTA - Puffer
TE	Tris - EDTA - Puffer
TEMED	N,N,N',N' - Tetramethylethylendiamin
TNF	Tumornekrosefaktor alpha
TNF-R	TNF - Rezeptor
TPA	12 - O - Tetradecanoylphorbol 13 - acetate
Tris	Tris - (Hydroxymethyl) - Aminoethan
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
ü.N./üN	über Nacht
UV-C	Ultraviolette Strahlung, $\lambda = 200 - 280 \text{ nm}$
V	Volt

(v/v)	volume per volume
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule - 1
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen
WST	4-[3-(4-Iodophenyl)-2-(4-Nitrophenyl)-2H-5-Tetrazolio]-1,3-Benzendisulfonat
wt / WT	Wildtyp
(w/v)	weight per volume
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

1.1 Die Superfamilie der Adhäsionsmoleküle

Im Verlauf der Evolution vielzelliger Organismen haben sich spezialisierte Zellen und Gewebe gebildet. Ein wesentliches Merkmal beim Aufbau von Geweben ist die Adhäsion von Zellen gleichen oder verschiedenen Typs, wobei feste Zell-Zellkontakte gebildet werden. Außerdem stehen Zellen mit einem komplexen Netzwerk sezernierter Proteine wie Kollagen oder Fibronectin und Kohlenhydraten in Verbindung, die als extrazelluläre Matrix (ECM) den Interzellularraum ausfüllen und so den zellulären Zusammenhalt in Geweben unterstützen. Sowohl Zell-Zell- als auch Zell-Matrixkontakte basieren auf verschiedensten Wechselwirkungen, die durch die Eigenschaften einer bestimmten Gruppe von Oberflächenmolekülen - den Adhäsionsproteinen - bestimmt werden. Zelladhäsionsproteine regulieren die dynamischen Prozesse der Morphogenese im Verlauf der Embryonalentwicklung und der Regeneration von Organen. Sie bestimmen ferner die Gewebs- und Organarchitektur und spielen bei inflammatorischen Reaktionen eine bedeutende Rolle (Carlos und Harlan, 1994).

Im Rahmen von Zell-Zellkontakten können Adhäsionsmoleküle an identische Moleküle der Partnerzelle binden. Eine Bindung, bei der Ligand und Rezeptor gleich sind, bezeichnet man als homophile Bindung. Sind Ligand und Rezeptor verschieden, handelt es sich um eine heterophile Bindung. Eine weitere Unterscheidung der Zell-Zellinteraktionen betrifft die Art der beteiligten Zellen. Die Adhärenz von Zellen der gleichen Zellart wird homotypisch, die Adhärenz verschiedener Zelltypen heterotypisch genannt. Bei Adhäsionsereignissen kann es demnach zu homophil-homotypischen, zu homophil-heterotypischen, zu heterophil-homotypischen und zu heterophil-heterotypischen Interaktionen kommen. Sowohl für die homo- als auch die heterotypische Anheftung einer einzelnen Zelle an die Nachbarzelle werden meist mehrere Adhäsionsmoleküle benötigt, die im Zusammenspiel zu festem Zell-Zellkontakt führen. Abbildung 1 zeigt schematisch die durch Adhäsionsmoleküle vermittelten Formen zellulärer Interaktionen.

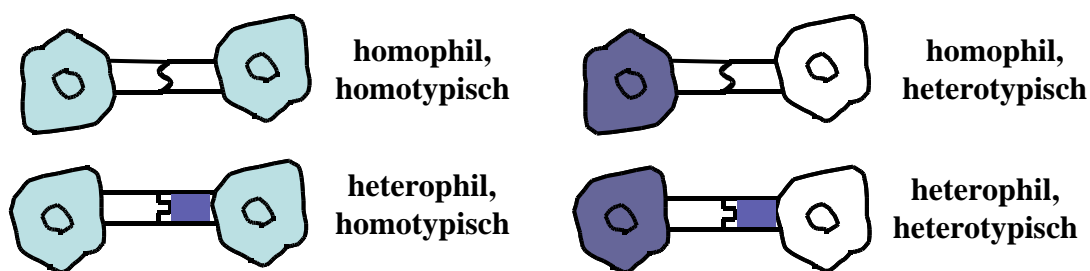


Abb.1 Formen der durch Zelladhäsionsmoleküle vermittelten Zell-Zellinteraktionen (nach Wagener, 1999)

1.2 Die vier Familien der Zelladhäsionsmoleküle

Aufgrund struktureller Unterschiede werden Zelladhäsionsmoleküle in vier Familien gegliedert (Tabelle 1). Alle ihre Vertreter sind Transmembrannglykoproteine, deren Spezifität durch eine extrazelluläre Domäne festgelegt wird, während ein intrazellulärer Anteil die Verbindung zum Zytoskelett herstellt.

Tabelle 1 Die Superfamilie der Adhäsionsmoleküle

Adhäsionsmolekülfamilie	Vermittelte Kontakte	Funktion	Wichtige Vertreter
Immunoglobulin-superfamilie	homo- und heterophile Zell-Zell-Kontakte	Immunabwehr Zell-Zell-Erkennung	N-CAM ICAM-1 VCAM-1
Cadherine	homophile, dynamische Zell-Zell-Kontakte	Desmosomen; Zell-Zell-Kommunikation	N-Cadherin E-Cadherin
Integrine	Adhäsion zur ECM heterophile Zell-Zell-Kontakte	Signaltransduktion Zell-Substrat-Adhäsion	α_3 -Integrin $\alpha_2\beta_1$ -Integrin
Selektine	heterophile, heterotypische Zell-Zell-Kontakte	Immunantwort Inflammatorische Reaktionen	L-Selektin E-Selektin P-Selektin

1.2.1 Die Immunglobulin-Superfamilie

Alle Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie sind direkt oder indirekt an der Immunabwehr und an Prozessen der Zell-Zellerkennung beteiligt. Das gemeinsame Strukturmerkmal dieser Familie ist der sogenannte „Immunglobulin-Fold“, dessen dreidimensionale Struktur zuerst in Immunglobulinen aufgeklärt wurde (Abbas et al., 1996) und dem diese Superfamilie ihren Namen verdankt. Das erste Oberflächenmolekül, welches als Zelladhäsionsmolekül beschrieben wurde (Rutishauser et al., 1978a - c; Brackenbury et al., 1981; Cunningham et al., 1987), gehört der Immunglobulin-Superfamilie (Ig-Superfamilie) an und wird als neurales Zell-Adhäsionsmolekül (N-CAM) bezeichnet. N-CAM vermittelt homophile Bindungen und weist, ebenso wie die anderen Vertreter dieser Familie, extrazellulär mehrere Wiederholungen immunglobulinähnlicher Domänen auf. Seine Bindungsfunktion ist unabhängig von bivalenten Kationen. Die Bindung anderer Mitglieder der Ig-Superfamilie wie ICAM-1, ICAM-2 und VCAM-1, die von Endothelzellen, Leukozyten, Fibroblasten und Epithelzellen exprimiert werden, gestaltet sich hingegen ausschließlich heterophil (Wagener, 1999).

1.2.2 Die Cadherine

Cadherine sind Transmembranglykoproteine, die extrazellulär kalziumabhängig einen direkten, dynamischen Zell-Zellkontakt zu Cadherinen der Nachbarzelle vermitteln (Hyafil et al., 1981; Overduin et al., 1995). Sie stellen das typische Strukturelement von Desmosomen, d.h. punktförmigen „Nietstellen“ zwischen Zellen, dar. Die Bezeichnung „Cadherin“ resultiert aus der Kombination von „calcium dependend“ und „adherin“. Vertreter sind neben dem epithelial/embryonal exprimierten E-Cadherin (Ringwald et al., 1987) das neuronal exprimierte N-Cadherin (Hatta et al., 1988; Miyatani et al., 1989; Detrick et al., 1990) und das aus Myoblasten stammende T-Cadherin. Im Zusammenhang mit ihrer gewebspezifischen Verteilung sind in der Vergangenheit noch weitere Vertreter charakterisiert worden, wie z.B. retinales R-Cadherin (Inuzuka et al., 1991), B-Cadherin aus dem Hirn (Napolitano et al., 1991), M-Cadherin aus Muskeln (Donalies et al., 1991) und P-Cadherin aus der Plazenta (Geiger und Ayalon, 1992).

1.2.3 Die Integrine

Die dritte Familie der Adhäsionsmoleküle stellen die Integrine dar, die in allen Körperzellen vorkommen (Springer, 1990). Integrine bilden eine funktionell variable Familie heterodimerer Transmembranglykoproteinrezeptoren (Hynes, 1992). Sie vermitteln nicht nur die Zell-Substratadhäsion zu Fibronectin und anderen Proteinen der ECM, sondern sind auch an adhäsionsabhängiger Signalvermittlung beteiligt (Wagener, 1999). So besteht über den direkten Kontakt von Integrinen zur Tyrosinkinase „fokale Adhäsionskinase“ (FAK)(Clark und Brugge, 1995) unter anderem eine Verbindung zu den bedeutenden Signaltransduktoren PI-3-Kinase, Ras oder zu MAP-Kinasen. Die häufigsten Liganden der Integrinfamilie sind Proteine der extrazellulären Matrix wie Fibronectin, Typ I-Kollagen, Laminin oder Fibrinogen. Einige β -Integrine erkennen jedoch auch integrale Membranproteine der Ig-Superfamilie wie ICAM-1/2/3 und VCAM-1 und vermitteln somit Zell-Zelladhäsion (Hynes, 1992).

1.2.4 Die Selektine

Die Adhäsionsmolekülfamilie der Selektine wurde erst Ende der 1980er Jahre entdeckt und charakterisiert (Bevilacqua et al., 1989; Tedder et al. 1989; Johnston 1989; Krause und Turner, 1999). Es konnte gezeigt werden, dass Selektine die Adhäsion zwischen Leukozyten und den blutgefäßauskleidenden Endothelzellen, sowie den Kontakt von Leukozyten und Thrombozyten vermitteln (Mayrovitz et al., 1992; Bienvenu et al., 1993). Sie werden inzwischen als Moleküle betrachtet, die den initialen Schritt der Immunantwort bei inflammatorischen Reaktionen steuern (Springer, 1990; Harlan et al., 1992; Lasky, 1995; Tedder et al., 1995; McEver, 1997). Des Weiteren ist der Ablauf der hämatogenen Metastasierung, beginnend mit der Adhäsion von Tumorzellen an vaskuläre Endothelien bis hin zu deren Invasion in umliegendes Gewebe, von Selektinen abhängig - insbesondere von E-Selektin (Bevilacqua et al., 1993; Krause und Turner, 1999). Selektine binden Kohlenhydrate und gehören somit zur Gruppe der Lektine, wobei ihre Bindungsaktivität von der Anwesenheit von Ca^{2+} -Ionen abhängt. Der Begriff „Selektin“ steht dementsprechend für „Selective lectin-dependend cell adhesion molecule“ (Wagener, 1999).

Die Selektin-Familie umfasst drei strukturell verwandte Mitglieder, die entsprechend ihrem Vorkommen als P („platelet“, Blutplättchen)-, L („leukocyte“, Leukozyten)- und E („endothelial“, endotheliales)- Selektin bezeichnet werden (Lasky, 1995).

1.2.4.1 Das „platelet“- Selektin

P-Selektin ist vesikulär in Endothelzellen und in α -Granula der Blutplättchen gespeichert (de Leeuw et al., 1999) und gelangt nach Stimulierung durch Thrombin, Histamin, Fibrin oder dem vaskulären Permeabilitätsfaktor innerhalb von Minuten an die Zelloberfläche (Iwamura et al. 1997; Stone et al. 1993; Wagner, 1993). Unter Zytokineinfluss oder nach LPS-Stimulierung wird, ähnlich wie bei E-Selektin, die Genexpression von P-Selektin durch Aktivierung von NF- κ B induziert (vgl. Kapitel 1.2.4.3; Weller et al., 1992; Bendas, 1999). Das Blutplättchen-Selektin spielt eine wichtige Rolle in der Leukozyten-Extravasation in Bereichen von Gefäßverletzungen, wobei es das „Rollen“ (vgl. Kapitel 1.2.4.3 und 1.4) von Granulozyten und Monozyten auf Endothelzellen vermittelt. Darüber hinaus ist P-Selektin für die Anheftung von Blutplättchen an Phagozyten verantwortlich und spielt somit sowohl im Rahmen von Entzündungen, als auch bei der Blutgerinnung eine wichtige Rolle (Iwamura et al. 1997; Pottratz et al. 1996; Wagener, 1999).

1.2.4.2 Das „leukocyte“- Selektin

L-Selektin wird konstitutiv von den meisten Leukozyten (Granulozyten, Monozyten und den meisten T- und B-Zellen) exprimiert (Bird, 1997) und nach seiner Ligandenbindung schnell abgespalten und ins Blut freigesetzt („shedding“)(Kishimoto et al., 1995). L-Selektin vermittelt das Lymphozyten-Homing in periphere Lymphknoten und die Bindung von Neutrophilen an Endothelzellen in entzündetem Gewebe (van Zante und Rosen, 2003; Luscinskas et al., 1996).

1.2.4.3 Das „endothelial“- Selektin

E-Selektin, früher auch als ELAM-1 bezeichnet, wird transient von Gefäßendothelzellen exprimiert, nachdem diese durch inflammatorische Zytokine wie z.B. TNF α , IL-1 oder IL-10, durch Neuropeptide wie die Substanz P oder durch bakterielle Endotoxine (z.B. Lipopolysaccharid LPS) stimuliert wurden (Bevilacqua et al., 1987; Bevilacqua et al., 1989;

Vora et al., 1996; Walz et al., 1990; Iwamura et al. 1997; Ye et al. 1995). Durch eine zytoplasmatische Serin-Phosphorylierung (Smeets et al., 1993) kommt es nach 12 - 20 Stunden zu einer ligandenunabhängigen Internalisierung und zu schneller lysosomenvermittelter Proteindegradation. Dies bedingt eine nur transiente Zelloberflächenexpression von E-Selektin (Yoshida et al., 1996; Bendas, 1999). Die geringe mRNA-Stabilität von E-Selektin ist Ursache für eine auf maximal 10 Stunden nach Stimulation begrenzte Proteinexpression. Das Maximum der Zelloberflächenpräsentation wird bereits nach 3 Stunden erreicht (Bevilacqua et al., 1987; Ye et al., 1995). Die E-Selektin-Genexpression wird durch den Transkriptionsfaktor nuklearer Faktor κ B (NF- κ B) kontrolliert (Montgomery et al., 1991; Schindler et al., 1994). Die Bezeichnung „nuclear factor kappaB“ (NF- κ B) steht für eine wichtige Familie aktivierbarer Transkriptionsfaktoren, die für die Regulation stressinduzierter Genexpression von großer Bedeutung ist. Die häufigste biologisch aktive Form des Transkriptionsfaktors ist ein Heterodimer bestehend aus den zwei Familienmitgliedern p50 und p65 (Ghosh und Karin, 2002; Li und Verma, 2002; Vermeulen et al., 2003). In unstimulierten Zellen wird NF- κ B im Zytoplasma in inaktiver Form gehalten, indem es im Komplex mit dem inhibitorischen Protein „inhibitor of kappaB“ (I κ B) vorliegt (Siebenlist et al., 1994). Nach Stimulation durch Induktoren, wie unter anderem dem Tumornekrosefaktor alpha (TNF α), Interleukin - 1 (IL-1), ionisierende Strahlung oder Zytostatika (Doxorubicin, Taxol, Vinblastin (Das und White, 1997)), wird das inhibitorische I κ B - genauer gesagt seine Isoform I κ B β - durch die I κ B-Kinase (IKK) phosphoryliert und abgespalten (DiDonato et al., 1997). Das freigesetzte NF- κ B kann jetzt als Dimer in den Zellkern gelangen und die Expression verschiedener Zielgene aktivieren (Vermeulen et al., 2003). Im Fall von E-Selektin existieren mindestens drei NF- κ B-Bindungsstellen, die in Kombination aktiviert werden müssen, um eine maximale Genexpression zu erreichen (Montgomery et al., 1991; Schindler et al., 1994; Whitley et al., 1994). Es konnte gezeigt werden, dass IL-1 die Kerntranslokation von NF- κ B in humanen Endothelzellen (HUVEC) induziert, was von einer Stimulation der Zelloberflächenexpression von E-Selektin gefolgt ist (Tozawa et al., 1995; Ray et al., 1997). E-Selektin vermittelt reversibel die als „Rollen“ bezeichnete schwache Adhäsion von Neutrophilen, Monozyten und T-Zellen auf dem Endothel, wodurch die Extravasation dieser weißen Blutzellen in inflammatorische Bereiche initiiert wird (vgl. Kapitel 1.2.4.1 und 1.4). Zytokinkombinationen von IFN γ mit TNF α oder INF γ mit LPS können die Expressionszeit von E-Selektin verlängern, wohingegen IL-4 alleine oder in Kombination mit TGF β - die TNF α - oder LPS-Induktion verhindert (Carlos und Harlan, 1994, Thornhill und Haskard, 1990). Wie bei L-Selektin lässt sich das sogenannte

„shedding“ nachweisen (vgl. 1.2.4.2), bei dem E-Selektin in einer löslichen Form in den Blutstrom abgegeben wird. Lösliches E-Selektin ist vor allem bei Erkrankungen mit Gefäßbeteiligung, aber auch beim metastasierenden Kolonkarzinom im Serum in erhöhter Konzentration nachweisbar (Gearing und Newman, 1993; Wittig et al., 1996). Als spezifische Liganden von E-Selektin sind das „cutaneous lymphocyte antigen“ (CLA) (Rosen und Bertozzi, 1994), der E-Selektin-Ligand-1 (ESL-1)(Stegmaier et al., 1995) sowie die Tetrasaccharide sialyl-LewisX und sialyl-LewisA (sLe^x, sLe^a)(Walz et al., 1990; Tiemeyer et al., 1991; Takada et al., 1993; Bird et al., 1997; Renkonen et al., 1997a,b) beschrieben. Die Schlüsselaminosäuren von E-Selektin für die Bindung insbesondere von sLe^x und sLe^a sind Tyrosin 48, Tyrosin 94, Lysin 111 und Lysin 113 (Erbe et al., 1992; Erbe et al., 1993; Rosen und Bertozzi, 1994). E-Selektin-vermittelte Signaltransduktionsmechanismen sind kaum charakterisiert. Bekannt ist lediglich, dass die direkt mit dem Aktinzytoskelett in Kontakt stehende zytoplasmatische Domäne für die initiale Bindung von Leukozyten nicht benötigt wird und dementsprechend nicht jede Ligandenbindung an E-Selektin Signalkaskaden auslösen muss (Yoshida et al., 1996; Kansas et al., 1996). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass E-Selektin in seiner zytoplasmatischen Domäne, die neben Zytoskelettkontakten auch mit der fokalen Adhäsionskinase (FAK) in Kontakt steht (Yoshida et al., 1996), mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen - sechs Serin- und zwei Tyrosinreste - besitzt. Die Bindung von E-Selektin an Liganden führt zu erhöhten zytosolischen Kalziumionenkonzentrationen (Kaplanski et al., 1994; Schmid et al., 1995).

1.2.4.4 Der strukturelle Aufbau der Selektine

Die Gene aller drei Selektine liegen auf Chromosom 1 geclustert vor (Watson et al., 1990) und weisen auf Nukleotidebene ein hohes Maß an Homologie auf (40 - 60 %)(Lasky, 1992; Krause und Turner, 1999). Die Selektine sind Typ-I-Transmembranproteine, die folgende Sequenzcharakteristika aufweisen (vgl. dazu auch Abbildung 2):

Der N-Terminus besteht aus einer kalziumabhängigen C-Typ-Lektindomäne und geht in einen Bereich über, der Homologie zum epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) aufweist. Dieser Teil ist gefolgt von einer variierenden Anzahl sich wiederholender Domänen, identisch zu jenen, die in Komplement-regulatorischen Proteinen beschrieben wurden. Die sich anschließende Transmembrandomäne wird von einem kurzen, zytoplasmatischen Bereich abgeschlossen (Bevilacqua und Nelson, 1993; McEver, 1994). Sowohl die Lektin- als auch die EGF-Domänen scheinen bei der Ligandenbindung beteiligt zu sein. Die als „carbohydrate

recognition domains“ (CRDs) bezeichneten Lektindomänen bestimmen die Bindungsspezifität und sind Ort der Ca^{2+} -Bindung. Im Gegensatz zu den extrazellulären Bereichen weisen die intrazellulären Anteile der einzelnen Selektine keine Homologien auf und bedingen so vermutlich die funktionellen Unterschiede der drei Selektinformen. Für die zytoplasmatischen Bereiche der Selektine ist in allen drei Fällen eine konstitutive Interaktion mit Zytoskelettbestandteilen beschrieben (Pavalko et al., 1995; Yoshida et al., 1996; Leid et al., 2002; Kansas und Pavalko, 1996).

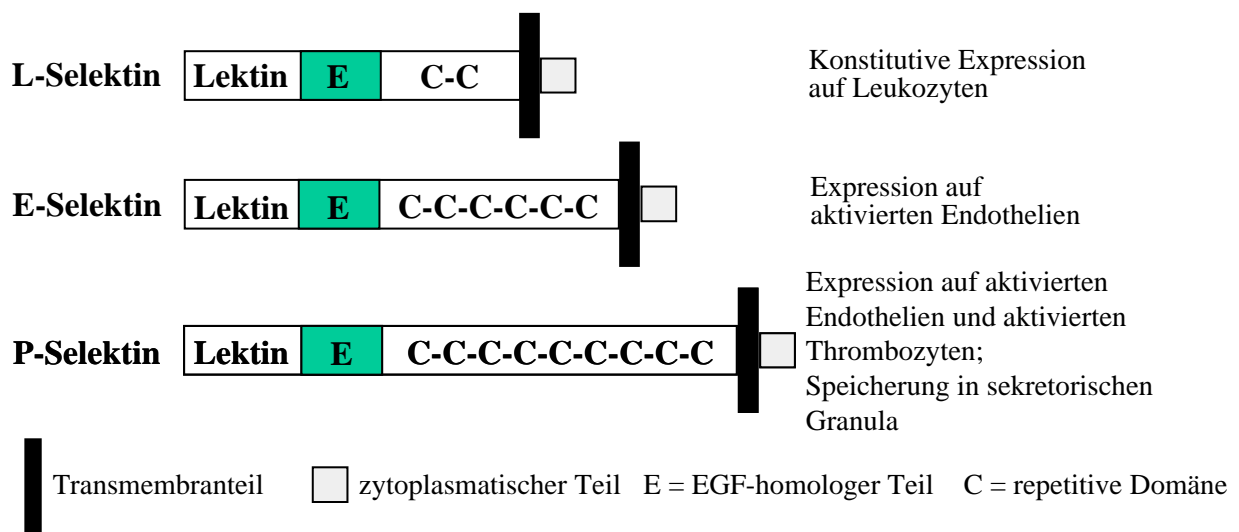


Abb.2 Selektine: Struktur und Vorkommen (nach Lasky, 1992)

1.2.4.5 Die Liganden der Selektine

Selektine binden im Allgemeinen an sialylierte, glykosylierte, sulfatierte und/oder fukosylierte Tetrasaccharid-Glykane von Glykoproteinen, Glycolipiden oder Proteoglykanen (McEver, 1997; Rosen und Bertozzi, 1994; Needham und Schnaar, 1993). Die Tetrasaccharide sLe^x (Neu5Ac 2,3Gal 1,4(Fuc 1,3)GlcNAc) und sLe^a (Neu5Ac 2,3Gal 1,3(Fuc 1,4)GlcNAc) wurden als minimale Liganden für alle drei Typen von Selektinen identifiziert (Walz et al., 1990; Tiemeyer et al., 1991; Takada et al., 1993; Bird, 1997; Renkonen et al., 1997)(Abbildung 3). Die monovalenten Kohlehydratstrukturen haben normalerweise nur geringe Bindungsaffinität zu Selektinen und erst die clusterartige Anordnung vieler dieser Oligosaccharide bewirkt die hohe Affinität (Rosen und Bertozzi, 1994; Varki, 1994). Für die Bindung an Selektine ist die Fukosylgruppe der Liganden von größter funktioneller Bedeutung.

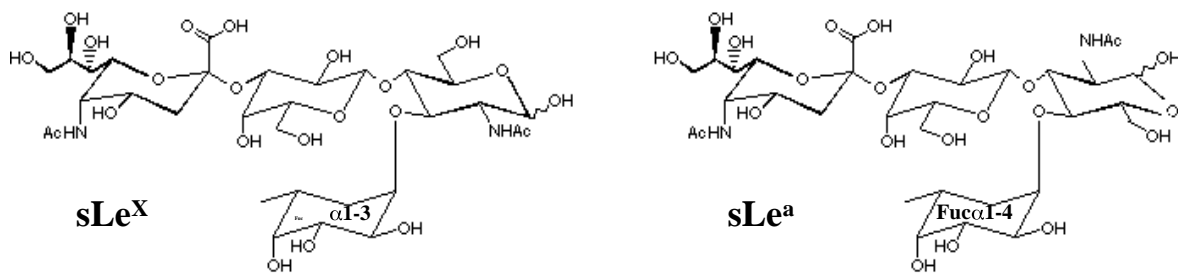


Abb.3 E-Selektin-Liganden: sialyl-LewisX (sLe^X) und sialyl-LewisA (sLe^a)

1.3 Endothel und Zelladhäsion

Endothelzellen sind stark abgeflachte Zellen, die als Monolayer das gesamte System der Blutgefäße auskleiden und so den Stoffaustausch zwischen Blutstrom und umgebendem Gewebe kontrollieren. Des Weiteren sind Endothelzellen in der Lage, das Netz der Blutgefäße zu erweitern und zu regenerieren, was die Grundlage von Wachstum und Reparatur von Gewebe darstellt. Dieser als Angiogenese bezeichnete Vorgang wird insbesondere vom vaskulären Endothel-Wachstumsfaktor VEGF gesteuert, der selektiv die Endothelzellproliferation stimuliert (Alberts et al., 1994). Verbunden mit der Barrierefunktion des Endothels ist seine Eigenschaft, die Adhäsion von Zellen zu verhindern oder zu initiieren. Unter physiologischen Bedingungen kommt es zu keinem Anheften von Zellen an der Endothelzelloberfläche. Nach Stimulation der Endothelzellen durch inflammatorische Zytokine, Chemokine oder Stickstoffmonoxid (NO) exprimieren sie auf ihrer Oberfläche Adhäsionsmoleküle, wie VCAM-1, ICAM-1/2 und Selektine, die das Adhären und Transmigrieren von Zellen ermöglichen (Schwarzacher, 2002).

1.4 Zelladhäsion, Krebs und Metastasierung

Unter den synonym verwendeten Begriffen „Neoplasie“ (Neubildung) und „Tumor“ versteht man im Allgemeinen die abnorme Vergrößerung eines Gewebes, welche durch autonome, progressive und überschießende Proliferation körpereigener Zellen entsteht. Der Begriff „Krebs“ steht für maligne Tumore, wobei die Fähigkeit zur Invasion und zur Metastasierung

die entscheidenden Kriterien sind, in denen sich ein maligner von einem benignen Tumor unterscheidet (Wagener, 1999). Metastasierung kann als ein sekundäres Wachstum und eine sekundäre Verbreitung eines malignen Tumors an einem Ort, der nicht seinem Ursprungsort entspricht, definiert werden (Hakomori et al., 1996).

Zelladhäsionsmoleküle sind an allen Schritten der malignen Progression und der Tumormetastasierung beteiligt (Brodt, 1991). Durch Verlust und Dysregulation von Zelladhäsionsmolekülen geht die geordnete Gewebsstruktur verloren, Tumorzellen lösen sich aus dem Gewebsverband und dringen zunächst in die Lymphabflusswege ein. Über die dort infiltrierten Blutgefäße können die malignen Zellen in die Blutbahn gelangen. Nach selektinvermittelter Interaktion mit der Gefäßwand, die als „Rollen“ bezeichnet wird, durchdringen sie das Endothel und die endotheliale Basalmembran (Spertini et al., 1992; Schadendorf et al., 1995). Beim „Rollen“ haften Tumorzellen, ähnlich wie Leukozyten im Rahmen der Immunantwort (vgl. Kapitel 1.2.4.3), über so schwache Interaktionen am Endothel an, dass sie vom vorbeiströmenden Blut mitgerissen werden. Sofort nach diesem Ereignis kommt es zur erneuten Adhäsion und der beschriebene Vorgang wiederholt sich mehrfach, was unter dem Mikroskop betrachtet als Entlangrollen am Endothel wahrgenommen wird (Herlyn und Malkowicz, 1991; Folkman, 1995). Der Ort dieser Adhäsionskaskade ist im Wesentlichen die postkapillare Venole (Ley und Gaethgens, 1991). Nach ihrer Extravasation wandern die Tumorzellen in das subendotheliale, bindegewebige Stroma und im weiteren Verlauf in das Parenchym des betreffenden Organs ein. Hier bilden sich schließlich solide Metastasen (Wagener, 1999).

1.4.1 Zelladhäsionsmoleküle bei der malignen Progression

Der Verlust adhäsiven Potentials ist ursächlich für invasive Wachstumseigenschaften und Loslösung entarteter Zellen aus dem primären Tumorzellverband. So weisen beispielsweise Zellen mit starker E-Cadherin-Expression im Allgemeinen nur geringe invasive Tendenz auf, während der Verlust von E-Cadherin mit Erhöhung des Invasionspotentials einhergeht (Behrens et al., 1989; Vleminckx et al., 1991; Frixen et al., 1991; Zetter, 1993). Auch die Dysregulation von Integrinen beeinflusst die maligne Progression, wobei sowohl Zugewinn als auch Verlust bestimmter Integrine invasives Wachstum und Metastasierung fördern (Felding-Habermann et al., 1992; Gehlsen et al., 1988; Mitjans et al., 1995; Ruitz et al., 1993;

Zutter et al., 1995; Qian et al., 1994). Im Fall der Immunglobulin-Superfamilie gibt es nur für wenige Mitglieder überzeugende experimentelle Hinweise auf eine kausale Beteiligung an maligner Progression (Hsieh et al., 1995; Kunath et al., 1995; Kleinerman et al., 1996; Xie et al., 1997). Es wird davon ausgegangen, dass Tumorzellen direkt oder indirekt die Expression von Selektinen und anderen Adhäsionsmolekülen auf Blutplättchen und Endothelzellen stimulieren, die es ihnen dann ermöglichen, an diese zu binden, was Grundvoraussetzung der Metastasierung ist (Hakomori et al., 1994).

1.4.2 Selektine bei der malignen Progression

Selektinliganden sind nicht nur auf Leukozyten exprimiert, sondern finden sich auch auf der Oberfläche einer ganzen Reihe von Tumorzellen. Das Pankreaskarzinom ist der klassische sLe^a-exprimierende Tumor (Kannagi et al., 1986), wohingegen sLe^x vor allem auf Adenokarzinomzellen des Verdauungstraktes zu finden ist (Iwai et al., 1995). Offensichtlich bedienen sich Tumorzellen desselben Mechanismus wie Leukozyten, um die Blutbahn zu verlassen und in angrenzendes Gewebe einzudringen und so auf „physiologischem Wege“ zu metastasieren (Takada et al., 1991; Lauri et al., 1991; Aruffo et al., 1991). Einer der frühesten Schritte bei der Extravasation von Tumorzellen aus dem Blutgefäßsystem in subendotheliales Gewebe ist die Interaktion von sLe^x- und sLe^a-Gruppen mit dem von Endothelzellen exprimierten E-Selektin (Renkonen et al., 1997; Kannagi, 1997). Damit ist E-Selektin direkt in den Metastasierungsprozess involviert und sLe^x und sLe^a erlangen funktionelle Bedeutung bei der Entstehung von Sekundärtumoren (Walz et al., 1990). Die Rolle von E-Selektin im Metastasierungs geschehen bei Kolonkarzinomen (Dejana et al., 1992; Sato et al., 1997; Yamada et al., 1995; Bresalier et al., 1996; Yamada et al., 1997; Cho et al., 1997; Nakamori et al., 1997; Brodt et al., 1997; Bresalier et al., 1998) ist inzwischen ebenso unbestritten wie im Fall von Metastasierungsprozessen bei Leukämie (Lafrenie et al., 1994), bei Lymphdrüsenkrebs (Yoneda et al., 1994) und bei Magenkrebs (Nakashio et al., 1997). Ob E-Selektin in Brustkrebs- (Toezeren et al., 1995) und Melanom-Metastasierungen (Nguyen et al., 1997) involviert ist, bleibt widersprüchlich (Miller et al., 1996; Kunzendorf et al., 1994). In Tabelle 2 wird ein zusammenfassender Überblick zu Studien über die E-Selektin-Expression in humanen Tumoren gegeben. Da sich eine Adhäsion von Tumorzellen der genannten Krebsformen an Endothelien nur mit anti-sLe^x-Antikörpern blockieren lässt, geht

man von der Annahme aus, dass sLe^X der primäre und pathophysiologisch bedeutsamste Bindungspartner von E-Selektin beim Metastasierungsgeschehen ist.

Neben der E-Selektin-vermittelten Bindung von Tumorzellen an Endothelien könnte die Beteiligung des endothelialen Selektinvertreter an der für einen wachsenden Tumor unabdingbar notwendigen Neovaskularisierung ein weiterer Mechanismus sein, über den dieses Adhäsionsmolekül Metastasierungsprozesse fördert (Nguyen et al., 1993; Kraling et al., 1996; Hebbar et al. 1998).

Tabelle 2 Studien zur Expression von E-Selektin und seinen Liganden in humanen Tumoren

Tumortyp	gefundenes Resultat	Referenzen
Mammakarzinom	Erhöhte Expression von E-Selektin auf Tumorendothelzellen Positive Korrelation zwischen E-Selektin-Expressionslevel und Östrogenrezeptorverlust	Matsuura et al., 1997; Fox et al., 1995; Nguyen et al., 1997;
Kolorektal-Karzinom	Erhöhte sLe ^X - und sLe ^a -Expression führt zu höherem Metastasierungspotential Erhöhte sLe ^X - Expression in Lebermetastasen Erhöhte sLe ^X - Expression ist begleitet von erhöhtem Tumorstadium und geringerer Überlebensrate von Patienten	Dejana et al., 1992; Hoff et al., 1989; Nakamori et al., 1997;
Magen-Karzinom	Erhöhte sLe ^a -Expression im Primärtumor führt zu mehr Lebermetastasen; erhöhte sLe ^X -Expression hat keine Auswirkungen	Nakamori et al., 1997a;
Pankreas-Karzinom	Erhöhte sLe ^X -Expression im Primärtumor führt zu verstärkter Metastasenbildung	Kishimoto et al., 1996;
Melanom	Erhöhte E- und P-Selektin-Expression korreliert mit höherer Metastasierungsrate, vermehrter Tumorbildung und geringerer Lebenserwartung	Schadendorf et al., 1995;

Einige wenige Studien schreiben P-Selektin eine sehr ähnliche Funktion wie dem E-Selektin-Molekül zu. So korreliert das vermehrte Anheften von Lungenkrebszellen an Endothelien mit einer erhöhten Expression von P-Selektin auf der endothelialen Zelloberfläche (Pottratz et al., 1996). In einer anderen Studie wiesen humane Kolonkarzinomzellen unter Fließbedingungen eine deutliche Adhäsion an P-Selektin auf (Goetz et al., 1996). Für den „Lymphozyten-Homing-Rezeptor“ L-Selektin gibt es bisher allerdings keine Hinweise darauf, dass er am Metastasierungsgeschehen beteiligt sein könnte.

1.5 Kleine GTP-bindende Proteine

In Publikationen der letzten Jahre, die sich mit der Regulation von Zell-Zelladhäsion und der dabei zu Grunde liegenden Signaltransduktion beschäftigten, wurden Vertreter der Superfamilie kleiner GTP-bindender Proteine als regulatorische Komponenten der Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle wie E-Cadherin (Evers et al., 2000a,b; Braga et al., 1999), Integrine (Clark et al., 1998), E-Selektin (Wojciak-Stathard et al., 1999) oder P-Selektin (de Leeuw et al., 1999) beschrieben. Kleine GTP-bindende Proteine sind monomere G-Proteine mit einer molekularen Masse von 20 - 40 kDa und werden strukturabhängig in fünf Familien unterteilt: die Ras-, Rho-, Rab-, Arf („ADP-ribosylation factor“)- und die Ran-Familie (Takai et al., 2001; Bourne et al., 1990; Hall et al., 1990; Takai et al., 1993; Garcia-Ranea und Valencia, 1998; Lazar et al., 1997). Abbildung 4 gibt hierzu einen schematischen Überblick.

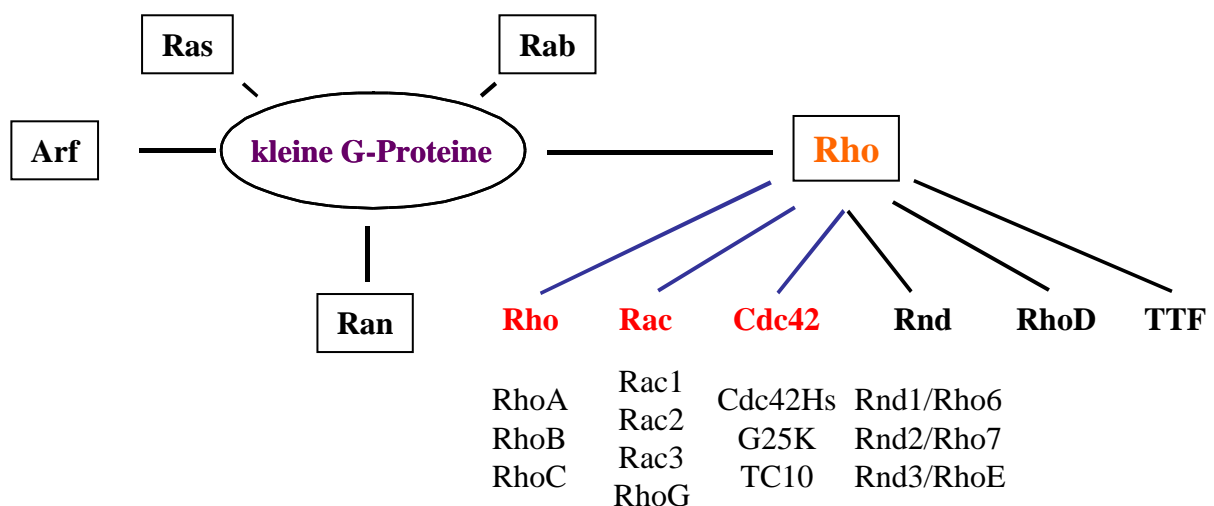


Abb.4 Die Superfamilie der kleinen GTP-bindenden Proteine

Die Mitglieder der Ras-, Rho- und der Rab-Familie gehören zu den 0,5 % der Proteine tierischer Zellen, die durch Isoprenylierung modifiziert werden (Marshall, 1993). Ras, Rho und Rab werden an ihrem C-Terminus durch Anfügen von C15-Farnesyl-, C20-Geranylgeranyl-, Palmitoyl- oder Methyleinheiten modifiziert (Bourne et al., 1991; Casey und Seabra, 1996; Glomset und Farnsworth, 1994; Takai et al., 1993). Diese Modifikation findet an der C-terminalen sogenannten „CAAX-Box“ statt, wobei C für die Aminosäure (AS) Cystein, A für eine aliphatische AS und X für eine beliebige AS steht. Im Fall von Ras-Proteinen ist X ein Serin, Alanin oder Methionin (Marshall, 1993), was eine C15-

Farnesylierung des Cysteins (Cys186) der Konsensus-Sequenz zur Folge hat (Gutierrez et al., 1989). Eine spezifische Farnesyltransferase katalysiert diese posttranslationale Proteinmodifikation. Anschließend erfolgt eine Carboxypeptidase-vermittelte proteolytische Abspaltung des C-terminalen Tripeptids „AAX“, so dass die Isoprenmodifikation im murenen Ras-Protein am terminalen Cystein vorliegt (Gutierrez et al., 1989). Eine „CAAX-Box“ der Form „CAAL/F“ findet sich unter anderem bei Vertretern der Rho-Familie und führt hier zu einer Geranylgeranylierung (Hancock et al., 1989; Kawata et al., 1990). Auch bei Rho-Proteinen erfolgt nach Übertragung der C20-Isopreneinheit auf das „CAAX-Box“-Cystein durch spezifische Geranylgeranyltransferasen eine proteolytische Entfernung der drei carboxyterminalen Aminosäuren (Takai et al., 2001). Die GTPase RhoB kann sowohl C15- als auch C20-isoprenyliert vorliegen, was diesem Molekül eine Ausnahmestellung unter den Rho-Proteinen verleiht (Adamson et al., 1992; Lebowitz et al., 1995). Auf Modifikationen anderer C-terminaler Sequenzen soll im Rahmen dieser Arbeit nicht näher eingegangen werden. Proteinisoprenylierungen kleiner G-Proteine sind für deren Membranfixierung und damit für ihre biologische Aktivität essentiell (Glomset et al., 1990).

Wie in Abbildung 5 dargestellt, sind Statine (Endo, 1988; Goldstein und Brown, 1990) und spezifische Inhibitoren der Farnesyl- beziehungsweise Geranylgeranyltransferasen geeignete Verbindungen, isoprenylierte Ras/Rho-Proteine und die durch sie vermittelten Signalwege zu hemmen. So wird diskutiert, dass Lovastatin durch Hemmung von Ras- und RhoB-vermittelten Mechanismen, wie beispielsweise der Aktivierung von „extracellular-signal-regulated kinases“ (ERKs), Einfluss auf die zelluläre Sensitivität gegenüber γ -Strahlung nimmt (Fritz et al., 2003; Miller et al., 1993). Des Weiteren wurden für Lovastatin inhibitorische Eigenschaften bezüglich UV-Licht-induzierter Aktivierung von stressaktivierbaren Proteinkinasen/c-Jun-NH₂-terminalen Kinasen (SAPK/JNK) und UV-vermitteltem apoptotischem Zelltod berichtet (Gnad et al., 2000; von Bardeleben et al., 2003). Pharmakologische Hemmung der Ras/Rho-Isoprenylierung durch Farnesyltransferase-Inhibitoren oder Statine führt zu veränderten zellulären Antworten auf anti-neoplastisch wirkende Pharmaka und Bestrahlung (von Bardeleben et al., 2002; Fokstuen et al., 1997; Liu et al., 2001b). Statine gehören als Cholesterin-Synthese-Hemmer zu den wichtigsten lipidsenkenden Medikamenten auf dem Weltmarkt. Diese ursprünglich aus Pilzen isolierten Wirkstoffe blockieren die Bildung von Farnesylpyrophosphat und damit von Cholesterin in der Leber, indem sie als spezifische Inhibitoren das Schrittmacherenzym dieses Biosyntheseweges, nämlich die HMG-CoA-Reduktase, hemmen (Goldstein und Brown,

1990). In den letzten Jahren häufen sich Berichte über pleiotrope Wirkungen von Statinen, die unabhängig ihres lipidsenkenden Potentials auftreten und u.a. von anti-thrombotischer, anti-inflammatorischer und anti-neoplastischer Natur sind (Metha, 2003). Der Einsatz von Farnesyltransferase-Inhibitoren in klinischen Phase I- und Phase II-Studien an Patienten erwies sich bisher als vielversprechende Therapie-Strategie, Ras-Proteine in malignen Zellen bei ansonsten schlecht chemotherapierbaren Krebsformen zu hemmen (Cohen et al., 2004; Alsina et al., 2004). Auch Geranylgeranyltransferase-Inhibitoren werden im Hinblick auf ihren potentiellen therapeutischen Einsatz in der Chemotherapie bestimmter Krebsformen wie Kolon- und Mammakarzinomen *in vivo* in transgenen Mausmodellen getestet. Sie zeigen ebenfalls durch Hemmung bestimmter Ras-Formen anti-tumorigene Eigenschaften (Kusama et al., 2003; Sun et al., 2003). Sowohl für Farnesyltransferase- als auch für Geranylgeranyltransferase-Inhibitoren wird eine Hemmung weiterer kleiner G-Proteine - wie RhoA oder RhoB - unabhängig von Ras diskutiert, die zu den beobachteten Effekten dieser Verbindungen beitragen könnten (Kusama et al., 2003; Sun et al., 2003; Lebowitz und Prendergast, 1998; Du et al., 1999; Gnad et al., 2000).

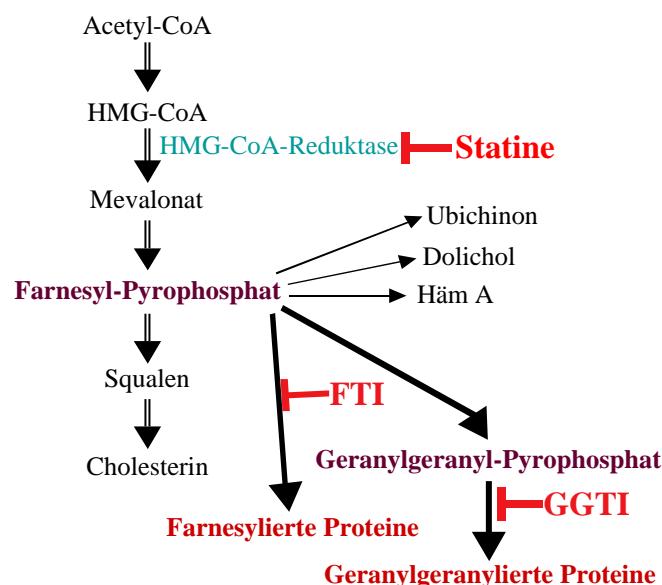


Abb.5 Angriffspunkte von Statinen und Isoprentransferase-Inhibitoren
 (CoA=CoenzymA; HMG-CoA=3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-CoA;
 FTI=Farnesyltransferase-Inhibitor; GGTI=Geranylgeranyltransferase-
 Inhibitor)

Gemäß ihrer Struktur besitzen kleine G-Proteine zwei interkonvertierbare Formen, eine GDP-gebundene inaktive und eine GTP-gebundene aktive Form (Bourne et al., 1990; Hall et al., 1990; Takai et al., 1993). Ein übergeordnetes exogenes Signal, welches über verschiedene Oberflächenrezeptoren wie z.B. G-Protein gekoppelte Rezeptoren, Rezeptortyrosinkinasen

oder auch Zytokinrezeptoren in die Zelle gelangt, veranlasst die Dissoziation des GDP von der GDP-gebundenen Form des G-Proteins. Dieser für die Aktivierung der kleinen GTPasen geschwindigkeitsbestimmende Schritt wird durch sogenannte „guanine nucleotide exchange proteins“ (GEPs) stimuliert, die auch als „guanine nucleotide releasing factors“ bezeichnet werden (Wada et al., 1997, Buday und Downward, 1993; Hart et al., 1991; Yaku et al., 1994). Weiterhin sind die GDP/GTP-Austauschreaktionen der Rho- und der Rab-Familie durch einen „GDP dissociation inhibitor“ (GDI) reguliert, der mit der inaktiven Form der kleinen GTPase einen Komplex bildet und so die Abdissoziation des GDP verhindert (Fukumoto et al., 1990). Folge einer GEP-vermittelten GDP-Freisetzung ist die Bindung von GTP, was die Interaktion der kleinen G-Proteine mit Effektormolekülen ermöglicht, die typischerweise Proteinkinasen oder Adapterproteine für Proteinkinasen darstellen (Takai et al., 2001). Die aktive Form des G-Proteins wird durch Hydrolyse von GTP zu GDP inaktiviert. Die Abdissoziation der Effektoren ist Folge dieser Inaktivierung. Die intrinsische GTPase-Aktivität, die alle kleinen G-Proteine besitzen, ist ziemlich gering und wird durch „GTPase activating proteins“ (GAPs) stimuliert (Boguski und McCormick, 1993; Fukui et al., 1997; Trahey und McCormick, 1987; Settleman et al., 1992). Das Durchlaufen eines Zyklus von Aktivierung und Inaktivierung ermöglicht den kleinen G-Proteinen auf diese Art und Weise als molekulare Schalter zu dienen, die ein übergeordnetes Signal für eine bestimmte Zeit auf einen „downstream“-Effektor übertragen. Abbildung 6 gibt einen schematischen Überblick über die Regulation der kleinen G-Proteine.

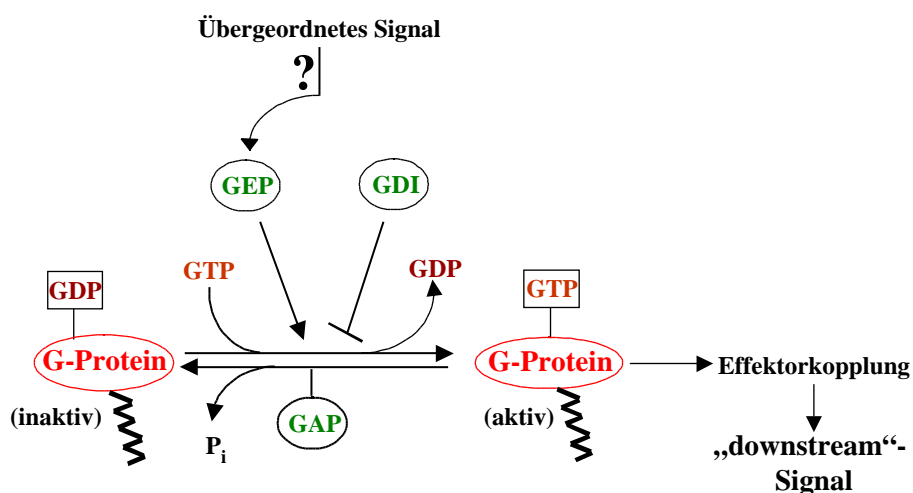



Abb.6 Regulation der Aktivität kleiner G-Proteine (nach Takai et al., 2001)
 (GEP = GDP/GTP exchange protein; GDI = GDP dissociation inhibitor;
 GAP = GTPase activating protein;  = Isoprenrest)

1.6 Die Familie der Rho-Proteine

Mitglieder der Familie Ras-homologer (Rho-) Proteine (vgl. Abbildung 4) sind an zytoskelettalen Reorganisationen als Antwort auf extrazelluläre Signale (Ridley und Hall, 1992 und 1994; Kozma et al., 1995; Ridley et al., 1992), bei der Regulation der Genexpression (Coso et al., 1995; Hill et al., 1995; Sulciner et al., 1996; Westwick et al., 1997), der Differenzierung und der Apoptose (Fritz et al., 1994; Fritz und Kaina, 2000; Esteve et al., 1998) sowie am Zellwachstum (Clark et al., 1998) und der Regulation des sekretorischen Vesikelmembrantransports beteiligt (Olson et al., 1995; Adam et al., 1996; Glise und Noselli, 1997). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass einige Rho-Proteine (d.h. Rho, Rac und Cdc42) für die G₁-Zellzyklusprogression unabdingbar sind (Mackay und Hall, 1998; Olson et al., 1995; Yamamoto et al., 1993). Ihre Beteiligung an der Regulation einer solchen Vielzahl essentieller Zellfunktionen macht verständlich, dass Störungen der natürlichen Balance Rho-vermittelter Ereignisse in Zellen zu dem charakteristischen Phänotyp eines Tumors mit invasiven und metastatischen Eigenschaften führen können (Westwick et al., 1997; Cleverley et al., 2000; Suwa et al., 1998; Boettner und Van Aelst, 2002). Insbesondere ihre zentrale Stellung bei der Kontrolle der Zellmotilität (Lauffenburger und Horwitz, 1996; Mitchison und Cramer, 1996; Anand-Apte et al., 1997; Evers et al., 2000a,b), der Zelladhäsion (Takaishi et al., 1997; Jou und Nelson, 1998; Braga et al., 1999; Evers et al., 2000a,b), der Organisation des Aktinzytoskeletts und der Transkriptionskontrolle macht Rho-GTPasen zu onkologisch relevanten Signaltransduktoren (Schmitz et al., 2000; Evers et al., 2000a). Regulatorische Komponenten, die im Zusammenhang mit der Kontrolle der Expression und Funktion von Adhäsionsmolekülen diskutiert werden, stammen interessanterweise alle aus der Rho-Protein-Familie (Braga et al., 1999; Clark et al., 1998; Evers et al., 2000a,b; Wojciak-Stothard et al., 1999). Eine ganze Reihe von *in vitro*-Studien mit Tumorzelllinien konnten eine Beteiligung von Rho-GTPasen an der Tumorprogression und der Tumorinvasivität belegen (Schmitz et al., 2000; Price und Collard, 2001). In *in vivo*-Experimenten an Mausmodellen wurde für RhoA und RhoC eine zentrale Rolle bei tumorigenen Invasionsprozessen und bei der Metastasierung diskutiert (Imamura et al., 2000; Del Peso et al., 1997; Itoh et al., 1999; Clark et al., 2000). Bei Untersuchungen der Rho-Proteinexpression in humanen Tumoren zeigte sich, dass die Tumormalignität mit der Rho-Protein-Überexpression in den entarteten Zellen korreliert (Fritz et al., 2002; Suwa et al., 1998). Die Gesamtheit der verfügbaren Daten spricht somit für eine bedeutende,

regulatorische Funktion der Rho-GTPasen bei Tumorentwicklung und -progression (Price und Collard, 2001; Schmitz et al., 2000).

Wichtige Effektormoleküle Rho-regulierter Mechanismen sind Proteinkinasen wie z.B. „MAP-Kinasen“ („mitogen activated protein kinases“)(Bagrodia et al., 1995a; von Bardeleben et al., 2003; Canman und Kastan, 1996), die Rho-Kinase (Redowicz, 1999; Narumiya et al., 1997; Alberts et al., 1998) oder „p21(Cdc42/Rac)-activated kinase“ (PAK)(Bagrodia et al., 1995a, b; Leung et al., 1995; Lian und Badwey, 1997; Manser et al., 1995). MAP-Kinasen bilden ihrerseits eine aus drei Gruppen bestehende Familie, den „extracellular regulated kinases“ (ERKs), den „stressactivated protein kinases/c-Jun-NH₂-terminal kinases“ (SAPK/JNK) und der p38-Kinase (Canman und Kastan, 1996; Minden et al., 1994 und 1995; Rosette und Karin, 1996). Für Rac1 und Cdc42 konnte gezeigt werden, dass sie die Aktivierung der c-Jun-NH₂-terminalen Kinase (JNK) und der p38-MAP Kinase regulieren (Minden et al., 1995; Coso et al., 1995). Für RhoA wurde die Serin/Threonin-Kinase Rho-Kinase als „downstream“-Effektor beschrieben (Madaule et al., 1998; Redowicz, 1999; Segain et al., 2003). Cdc42 konnte als Aktivator sowohl der Rho-Kinase (Alberts et al., 1998) als auch der PAK identifiziert werden (Bagrodia et al., 1995a; Manser et al., 1995). PAK wird außerdem als Effektormolekül von Rac1 (Bagrodia et al., 1995b) und RhoA (Leung et al., 1995) diskutiert. Einige Mitglieder der Rho-Familie sind befähigt, Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B (Perona et al., 1997; Sulciner et al., 1996) oder AP-1 (Chang et al., 1998) zu aktivieren und entfalten auf diesem Weg ihre genregulatorischen Eigenschaften. Alles in allem liegt der großen Bandbreite Rho-vermittelter zellulärer Prozesse ein extrem kompliziertes Zusammenspiel verschiedener Rho-Proteine und Rho-Effektormoleküle zu Grunde. Die Komplexität besteht vor allem darin, dass durchaus verschiedene Rho-GTPasen mit demselben Effektor interagieren und dabei möglicherweise auch antagonistische Wirkungen aufweisen können. Welche Rho-GTPase im Zusammenspiel mit welchem Rho-Protein über welchen Effektor seine Wirkung ausübt, ist oft unklar und bedarf im Bezug auf die jeweilige Fragestellung einer gezielten Analyse.

1.7 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

E-Selektin vermittelt neben der Leukozytenadhäsion bei Entzündungen auch die Bindung von Tumorzellen an vaskuläres Endothel und leitet damit die Fernmetastasierung ein (Dejana et al., 1992; Mannori et al., 1997; Biancone et al., 1996; Brodt et al., 1997).

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob über eine gezielte Beeinflussung der Expression des endothelialen Adhäsionsmoleküls E-Selektin in das Metastasierungs-geschehen hämatogen metastasierender Krebsformen eingegriffen werden könnte. Hierzu wurden die molekularen Regulationsmechanismen der Gen- und Proteinexpression des endothelzellspezifischen Selektinvertreters *in vitro* in humanen Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVEC) näher charakterisiert. Neben der Suche nach Signalmolekülen, die an der Regulation der E-Selektin-Genexpression beteiligt sind, umfasste die Zielsetzung der Arbeit die Identifizierung und Charakterisierung von Modulatoren, mit denen gezielt in die Genexpression von E-Selektin eingegriffen werden kann. Die Frage, ob durch eine spezifische pharmakologische Hemmung der E-Selektin-Expression in Endothelzellen die initialen Schritte im Metastasierungs-geschehen wie Adhäsion und Diapedese von Tumorzellen an bzw. durch Endothelzellmonolayer verhindert werden könnten, stand im Mittelpunkt der im Folgenden beschriebenen Studien. Die erzielten Ergebnisse könnten als molekulare Grundlage zur Konzeption neuer therapeutischer Strategien zur Inhibition der Tumormetastasierung dienen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Feinchemikalien und Chemikalien

Lovastatin, Simvastatin, Geranylgeranyltransferase-Inhibitor Typ I (GGTI), Farnesyltransferase-Inhibitor (FTI)	Calbiochem, Bad Soden
Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP), Farnesylpyrophosphat (FPP), TNF α , Calcein AM, ESCORT III Transfection Reagent, Lysophosphatidsäure, Cytochalasin D, IL-1 β , Lipopolysaccharid (LPS)(<i>E. coli</i>), Ampicillin, Ponceau S, Proteinmarker Dalton VII, 14-70 kDa, Proteinmarker High Molecular Weight, 29-205 kDa, Triton X-100, Tween-20, RNase A, PMSF, Dithiothreitol (DTT), Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München
<i>Clostridium difficile</i> Toxin A (ToxA)	Hannover
Retinsäurederivate (all-trans- und 9-cis-)	ICN, Eschwege
Phosphate buffered saline (PBS), Trypsin/EDTA-Konzentrat	Biochrom, Berlin
Bovine serum albumin (BSA), Acrylamid/Bisacrylamid, TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyldiamin), -Mercaptoethanol, Glycerin, Tween-20	Roth, Karlsruhe
Protran [®] BA Nitrocellulose Transfer Membrane	Schleicher&Schuell, Dassel
Complete Mini, EDTA-free Proteasen-Inhibitor-Cocktail, RNase-Inhibitor, Deoxynukleosid-Triphosphat Set, PCR Grade	Roche Diagnostics, Mannheim
Prestained Protein Molecular Weight Marker, pBR322 DNA/ <i>AluI</i> Marker, Lambda DNA/ <i>EcoRI/HindIII</i> Marker 3	MBI Fermentas, St. Leon-Roth
Agarose	GibcoLifeTechnologies, Karlsruhe
Annexin-V-FITC	BD Pharmingen, Heidelberg
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck, Darmstadt

Bradford-Reagenz, Comassie Blue G-250, Natriumdodecylsulfat (SDS)	Bio-Rad, München
DMSO, Nonidet P40	Fluka, Neu Ulm
LMP-Agarose	Appligene, Heidelberg
Magermilchpulver	Reformhaus, Mainz
Propidiumjodid, Serva Brillant Blue, Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Bacto Agar, Bacto Yeast Extract, Bacto Tryptone	Difco Laboratories, Detroit

Hier nicht erwähnte Chemikalien stammten von den Firmen Roth (Karlsruhe), Roche Diagnostics (Mannheim), Bio-Rad (München), Serva (Heidelberg), Merck (Darmstadt) und Sigma-Aldrich (München).

2.1.2 Medien, Lösungen und Puffer

Agar-Platten	15 g Agar-Agar ad 1000 ml mit LB-Medium
Amp-Platten	15 g Agar-Agar ad 1000 ml mit LB-Medium + Ampicillin (50 µg/ml)
LB-Medium	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1000 ml A. bidest
PBS (pH 7,4)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 0,7 mM CaCl ₂ 0,6 mM MgCl ₂
10 x TBE (pH 8,2)	900 mM Tris 900 mM Borsäure 12,5 mM EDTA
TE (pH 8,0)	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA
Protein-Transfer-Puffer	25 mM Tris-HCl, pH 8,0 100 mM Glycin 25 % Methanol

SDS-Laufpuffer	57,6 g Glycin 12 g Tris 10 ml 20 % SDS ad 2000 ml mit A. bidest
FACS-Bindepuffer (10x)	100 mM Hepes, pH 7,4 1,4 M NaCl 25 mM CaCl ₂ 1 % BSA
Bradford Reagenz	0,01 % Serva Brillant Blue 25 ml Ethanol 50 ml H ₃ PO ₄ 85 %ig ad 500 ml A. bidest
Ultraschallpuffer	20 mM Tris-HCl, pH 8,5 1 mM EDTA 1 mM β -Mercaptoethanol 5 % Glycerin 1 mM PMSF
P1-Puffer	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 10 mM EDTA 100 μ g/ml RNase A
P2-Puffer	200 mM NaOH, 1 % SDS
P3-Puffer	2,55 M KOAc, pH 4,8
Klenow-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 8,0 60 mM NaCl 6,6 mM MgCl ₂ , 2 mM DTT
Blockierungslösung	5 % Magermilchpulver in PBS 0,2 % Tween-20
Transformationspuffer Tbf I-Puffer	30 mM KAc 50 mM MnCl ₂ 100 mM KCl 15 % (v/v) Glycerin, pH 5,8 mit HAc einstellen
Transformationspuffer Tbf II-Puffer	10 mM MOPS/NaOH 75 mM CaCl ₂ 10 mM KCl 15 % (v/v) Glycerin, pH 7,0 sterilfiltrieren
Oozyten-Injektionspuffer	5 mM Tris/HCl, pH 7,4 0,1 mM EDTA

2.1.3 Kits

Titan™One Tube RT-PCR System	Roche Diagnostics, Mannheim
Luciferase Assay System	Promega, Mannheim
GenElute™Mammalian Total RNA Kit	Sigma-Aldrich, München
LightCycler-FastStartDNA Master SYBR-GreenI	Roche Diagnostics, Mannheim
DNeasy®-Tissue Kit	Qiagen, Hilden
Effektene™ Transfection Reagent Kit	Qiagen, Hilden
QCM™ 96-Well Cell Invasion Assay	Chemicon, Hofheim
Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	Roche Diagnostics, Mannheim
WST-1 Cell Proliferation Reagent	Roche Diagnostics, Mannheim
ECL™-/ ECL-Plus™-Western blotting detection reagent	Amersham, Freiburg
EndoFree®Plasmid Mega Kit	Qiagen, Hilden
E.N.Z.A.®Tissue DNA Mini Kit	PeqLab, Erlangen
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
SIGMA FAST™ pNPP Substrate Tablet Set	Sigma-Aldrich, München
Beta-Glo™ Assay System	Promega, Mannheim

2.1.4 Antikörper

Anti-E-Selektin-Antikörper	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-Maus-IgG-Antikörper (POD-konjugiert)	Promega, Mannheim
Anti-Maus-IgG-Antikörper (FITC-konjugiert)	Dako, Hamburg
IgG2a, kappa	Sigma-Aldrich, München
Anti-Phospho-I B- (Ser32)-Antikörper	Biolabs, Frankfurt a. M.
Anti-myc-HRP-Antikörper	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-P-Selektin-Antikörper	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-I B- -Antikörper	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-TNF-R2-Antikörper	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-TNF-R1-Antikörper	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-human-ICAM-1-Antikörper	R&D Systems, Wiesbaden
Anti-Bcl-2-Antikörper	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-Bax-Antikörper	Santa Cruz, Heidelberg
Anti-Fas-Antikörper, aktivierend	Upstate, Hamburg
Anti-p21/(Waf-1)-Antikörper	Calbiochem, Bad Soden
Anti-IgG-Kaninchen-Antikörper (HRP-konjugiert)	Amersham, Braunschweig
Anti-IgG-Maus-Antikörper (HRP-konjugiert)	Amersham, Braunschweig

2.1.5 Enzyme

PowerScript DNA Polymerase Mix	PAN Biotech, Aidenbach
Alkalische Schrimps Phosphatase	Roche Diagnostics, Mannheim
REDTaq™ReadyMix™PCR Reaction Mix	Sigma-Aldrich, München
Taq-DNA-Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim
T ₄ -DNA-Ligase	Roche Diagnostics, Mannheim
Restriktionsendonukleasen (EcoR I, BamH I, Not I, Hind III, Bgl II, Kpn I, Apa I, Taq I, Acc I, Dra I, Dpn I, Sca I)	Roche Diagnostics, Mannheim

2.1.6 Oligonukleotide

Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von Sigma-Genosys, Steinheim bezogen.

E-Selektin-Primer

RT-PCR: 5'-Primer: 5'-TCTCTCAGCTCTCACTTTG-3'
3'-Primer: 5'-TTCTTCTTGCTGCACCTCT-3'

Promotorisolierung: 5'-Primer: 5'-AGGCTGGTCTTGAACCTCCG-3'
3'-Primer: 5'-GACTTCAAGAGTTCTTTTCACCC-3'

GAPDH-Primer

RT-PCR: 5'-Primer: 5'-GTCTTCACCACCATGGAGAAGGCT-3'
3'-Primer: 5'-CATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCA-3'

RhoB-Primer

PCR-Klonierung: 5'-Primer: 5'-GGGGTACCCCATGGCATCAATGCAGAAGCTGAT
CTCAGAGGAGGACATGGCGGCCATCCGCAAGAA
GCTG-3'
3'-Primer: 5'-CTGTCTACCGAGAAGCACATAAGG-3'

Sequenzierung/
Genotypisierung: 5'-Primer: 5'-GGGGTACCCCATGGCATCAATGCAGAAGCTGAT
CTCAGAGGAGGACATGGCGGCCATCCGCAAGAA
GCTG-3'
3'-Primer: 5'-TTTTCCTTTTGGCGGCCGCTTTTTTTCCTTCATAGC
ACCTTGCAGCAGTTGATGC-3'

Rac1-Primer

PCR-Klonierung: 5'-Primer: 5'-CGGGATCCCGATGGCATCAATGCAGAAGCTG
ATCTCAGAGGAGGACCTGATGCAGGCCATCAAG
TGTGTGGTGGTGGGAGACGGAGCTGTAGGTA
AATTGCC-3'
3'-Primer: 5'-GGAATTCCTTACAACAGCAGGCATTTTC
TCTTCC-3'

Sequenzierung/
Genotypisierung: 5'-Primer: 5'-CGGGATCCCGATGGCATCAATGCAGAAGCTG
ATCTCAGAGGAGGACCTGATGCAGGCCATCAAG
TGTGTGGTGGTGGGAGACGGAGCTGTAGGTA
AATTGCC-3'
3'-Primer: 5'-TTAAGAACACATCTGTTTGGCGG-3'

LoxP-Primer

PCR-Klonierung/
Sequenzierung: 5'-Primer: 5'-CCCAAGCTTGGGATAACTTCGTATAGCATAACAT
TATACGAAGTTATGTCGGAGGCCACCATGGCTC
GCG-3'

3'-Primer: 5'-GGGGTACCCCATAACTTCGTATAATGTATGCTAT
ACGAAGTTATCGGATCCAGACATGATAAGATAC
AT-3'

UbiquitinC-Promotor-Primer

Sequenzierung: 5'-Primer: 5'-TAGGGTAGGCTCTCCTGAATCGACAG-3'
5'-Primer: 5'-GAAAAGTGCCACCTGACGTC-3'

lacZ-Primer

Sequenzierung: 5'-Primer: 5'-TTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAAT-3'

2.1.7 Expressionsvektoren

Rho-Expressionsvektoren	Institut für Toxikologie, Mainz
pGL3-Basic	Promega, Mannheim
NF- B-Minimal-Promotor-Konstrukt	Stratagene, Amsterdam
AP-1-Minimal-Promotor-Konstrukt	Stratagene, Amsterdam
pGlac	Institut für Toxikologie, Mainz
pcDNA3.1	Invitrogen, Karlsruhe
pUB6/V5-HisC	Invitrogen, Karlsruhe
pPGKcreSV40pA	Institut für Toxikologie, Mainz

2.1.8 Zellsysteme

2.1.8.1 Bakterienstämme

E. coli DH5 :

F- / endA1 / hsdR17 (rk⁻; mk⁺) / supE44 / thi-1 / recA1 / gyrA96 / relA1 / β(argF-lacZya) / U169 / 80dLacZβM15

2.1.8.2 Säugerzelllinien und primäre Zellsysteme

Endothelzelllinie EA.hy-926	North Carolina
Humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVEC)	Cambrex, Verviers
Humane Kolonkarzinomzelllinie DLD1	ATCC (*)
Humane Kolonkarzinomzelllinie HT-29	ATCC (*)
Humane Mammakarzinomzelllinie MCF-7	ATCC (*)
p53-profiziente fibroblastoide Zellen der Maus BK4	Institut für Toxikologie, Mainz
Affennierenzelllinie COS-7	ATCC (*)
Mausfibroblasten NIH-3T3	ATCC (*)

(*) diese Zelllinien waren in der Abteilung „Angewandte Toxikologie“ verfügbar.
Ursprünglich stammen diese Zelllinien von „American Type Culture Collection“ (ATCC).

2.1.9 Zellkulturmedien

Dulbeccos modified eagle medium (DMEM)	Cambrex, Verviers
Modified eagle medium (MEM)	Cambrex, Verviers
Endothelial Growth Medium 2 (EGM-2)	Cambrex, Verviers
RPMI-Medium	Cambrex, Verviers

2.1.10 Medien-Zusätze

Fötales Rinderserum (FCS)	Biochrom, Berlin
HAT-Medium-Supplement	Sigma-Aldrich, München
Natrium-Pyruvat	GibcoLifeTechnologies, Karlsruhe
Glutamin	GibcoLifeTechnologies, Karlsruhe

2.1.11 Plastikware zur Zellkultivierung

96-well Microtiter-Platten	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturflaschen Easy Flask 25 V/C	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturflaschen TC Flask 80CM2 VE	Nunc, Wiesbaden
Zellkulturschalen (Ø 9 cm, Ø 5 cm, Ø 2,5 cm)	Greiner, Frickenhausen
PP-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner, Frickenhausen
Kryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden

2.1.12 Geräte

Bakterien-Brutschrank	Heraeus, München
Bakterienplatten	Greiner, Frickenhausen
Bio-Rad, iCycler IQ	Bio-Rad, München
Blot-Kammer, Trans-Blot Cell	Bio-Rad, München
Brutschrank NUAIRE (NU-4500E)	Zapf, Sarstedt
Brutschrank (B5060 EK/CO2)	Heraeus, München
⁶⁰ Co- -Strahlungsquelle	Atomic Energy of Canada Ltd.
ECL-Filme	Amersham, Braunschweig
Elektrophoreseapparaturen	Biometra, Göttingen
Elektrophoreseapparatur	PeqLab, Nürnberg
Elektroporationsgerät	Bio-Rad, München
FACScalibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Feinwaage	Satorius, Göttingen
Fluoreszenz-ELISA-Plate reader SpectraMAX	Molecular Devices, Albertville
Fluorezenzeinrichtung BX-FLA	Olympus, Hamburg
Geltrockner	Bio-Rad, München
Lumineszenzphotometer	Berthold, Pforzheim
Mikroskop BX 50	Olympus, Hamburg
Neubauer-Zählkammer	Roth, Karlsruhe
Polaroid-Kamera MP4 Standard	Polaroid, Offenbach
Röntgenfilme (Hyperfilm MP)	Kodak, Stuttgart
Schüttelinkubator	Braun Biotech. Int., Melsungen
Spannungsquelle Power PAC 200/2.0	Bio-Rad, München

Spannungsquelle Power PAC 3000	Bio-Rad, München
Spektralphotometer Titertek Multiscan Plus	Labsystems, Finnland
Sterilbank CLASSII A/B3, NUAIR	Zapf, Sarstedt
Tischzentrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler	Biometra, Göttingen
Trans-Blot [®] SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad, München
Transilluminator	Bachhofer, Reutlingen
Turboblotter [™] Downward Transfer Systems	Schleicher & Schuell, Dassel
Überkopfschüttler REAX2	Heidolph, Schwabach
Ultraschallstab 250	Branson, Danbury, USA
Ultra Turrax T25 basic	IKA [®] -Werke, Staufen
Ultra Turrax T25 basic	IKA [®] -Werke, Staufen
Vakuumpumpe	Brandt, Wertheim
Whatman 3 MM Filterpapier	Schleicher & Schuell, Dassel
Zentrifuge Megafuge 1.0, Rotor 3360	Heraeus, München
Zentrifuge Sorvall RC513, Rotor GSA	Heraeus, München

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung von Bakterien und eukaryontischen Zellsystemen

a) Kultivierung von Bakterien (*Escherichia coli*)

Flüssige Bakterienkulturen wurden in LB-Medium mit oder ohne Ampicillin (100 µg/ml) bei 37°C unter Schütteln (180 U/min) kultiviert. Des Weiteren erfolgte die Kultivierung von *E. coli* auf Agarplatten (LB + 50 - 100 µg/ml Ampicillin) bei 37°C. Zum Anlegen von Dauerkulturen wurden 1,5 ml einer Über-Nacht-Kultur abzentrifugiert (5 min bei 14000 U/min, RT), das Zellpellet in 500 µl des entsprechenden Mediums resuspendiert, mit 500 µl (1 Volumen = 50 %) sterilem Glycerin versetzt und gut gemischt. Die Suspension wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

b) Kultivierung eukaryontischer Zellen

EA.hy-926-Zellen und humane Kolonkarzinomzellen (DLD1, HT-29) sowie Mausfibroblasten (BK4) wurden in DMEM mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS kultiviert. EA.hy-926-Kulturen enthielten zusätzlich 1 % HAT-Medium-Supplement. MCF-7 Karzinomzellen wuchsen in RPMI-Medium mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS. HUVEC wurden gemäß den Vorgaben des Herstellers (Cambrex) in Endothelzellmedium EGM-2, welches 2 % FCS beinhaltet, gezogen. Die Kultivierung aller Zellen erfolgte bei 37°C in Plastikkulturflaschen bzw. Plastikkulturschalen in CO₂-Inkubatoren unter wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 7 % CO₂. HUVEC wurden von der vierten bis zur siebten Passage in Experimenten eingesetzt. Alle Zellen wurden zweimal wöchentlich passagiert. Hierzu wurde zunächst das Medium abgenommen und die Zellen mit Trypsin (0,25 %)/EDTA (0,025 %) für ca. 5 min bei RT inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in frischem, 37°C - warmen Medium aufgenommen, in einer Neubauer-Zählkammer gezählt und in der gewünschten Zellzahl ausgesät. Zum Einfrieren wurden exponentiell wachsende Zellen einer Plastikkulturschale geerntet (Trypsin/EDTA), in Medium aufgenommen und bei 1000 U/min für 4 min abzentrifugiert. Das Medium wurde entfernt, das verbleibende Zellpellet in Einfriermedium (FCS + 10 % DMSO) resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. Nach einer Verweildauer von 5 min bei 4°C wurden die Röhrchen in Zellstoff verpackt und in einer Styroporbox bei -80°C eingefroren. Nach 2 - 3 Tagen wurden die Zellen in flüssigen

Stickstoff überführt. Die tiefgefrorenen Zellen wurden bei 37°C in einem Wasserbad aufgetaut und anschließend mit Kulturmedium gewaschen (1000 U/min, 4 min, RT), um das verbleibende DMSO zu entfernen. Die Zellen wurden in 5 ml Medium aufgenommen und in eine Kulturflasche überführt.

2.2.1.2 Bestimmung der NO-Konzentration

Für die Bestimmung der NO-Freisetzung durch iNOS und eNOS in Endothelzellen wurde die Konzentration von Nitrit im Mediumüberstand mit Hilfe des kolorimetrischen Griess-Assays (Green et al., 1982) oder eines auf Chemolumineszenz basierenden Nachweisverfahrens im Sievers-NO-Analyzer bestimmt (Dunham et al., 1995).

2.2.1.3 Analyse der Tumorzelladhäsion

Die Adhäsion von humanen Kolonkarzinomzellen (DLD1) und humanen Mammakarzinomzellen (MCF-7) an konfluente Endothelzellmonolayer wurde durch eine Fluoreszenzmarkierung der Tumorzellen unter Verwendung des Farbstoffes Calcein AM (Anregung: 495 nm; Emission: 517 nm) quantifiziert. Hierzu wurden Karzinomzellen mit 5 µM Calcein AM für 30 min bei 37°C inkubiert. 5×10^5 der so markierten Zellen wurden anschließend auf einen konfluenten HUVEC-Zellmonolayer gegeben. Die Adhäsion der Tumorzellen erfolgte während einer zweistündigen Inkubation bei 37°C. Nicht adhärierte Tumorzellen wurden durch viermaliges Spülen mit PBS entfernt, bevor die adhärierte Fluoreszenz im Fluoreszenz-Photometer bestimmt wurde. Die Zunahme der Tumorzelladhäsion nach TNF - bzw. IR-Stimulation der HUVEC wurde relativ zur spontanen Adhäsion an unbehandelte HUVEC berechnet, die als Bezugswert gleich 1 gesetzt wurde.

2.2.1.4 Tumorzell-Transmigrations Assay

Zur Bestimmung der Tumorzell-Invasivität wurde die Transmigrationsrate von Tumorzellen durch einen konfluenten HUVEC-Monolayer unter Verwendung von „96-well Cell Invasion Chamber plates“ (Chemicon) bestimmt. HUVEC wurden in hoher Dichte (5×10^4 /well) in die ECM (Kollagen)-beschichteten Einsätze der „96-well Cell Invasion Chamber plates“ eingesät und über Nacht kultiviert. Nach Lovastatinvorbehandlung für ca. 16 Stunden wurde das

Medium ersetzt und die Zellen 3 Stunden mit TNF (1 ng/ml) stimuliert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 3×10^5 Kolonkarzinomzellen (HT-29) pro well. Nach Über-Nacht-Inkubation wurde die Analyse der Anzahl transmigrierter Tumorzellen durch DNA-Färbung entsprechend dem Protokoll des Herstellers (Chemicon) durchgeführt. Die basale Migration von HT-29-Zellen durch unbehandelte Endothelzellen wurde als Bezugswert für die Auswertung herangezogen und gleich 1 gesetzt.

2.2.1.5 Zytotoxizitätstests

a) Bestimmung der Apoptosefrequenz durch sub-G1-Messung

Die Apoptosefrequenz wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die Messung der sub-G1-Zellfraktion basiert auf der Tatsache, dass der DNA-Gehalt apoptotischer Zellen unterhalb des DNA-Gehalts einer Zelle in der G1-Phase liegt (Nicoletti et al., 1991; Fraker et al., 1995). Entsprechend behandelte oder unbehandelte Zellen wurden durch Trypsin/EDTA abgelöst, mit den nicht adhären Zellen im Zellkulturüberstand vereinigt und abzentrifugiert (1000 U/min; 4°C). Nach einmaligem Waschen mit PBS (1000 U/min; 4 min; RT) erfolgte für mindestens 30 min die Fixierung der Zellen in 70 %igem Ethanol bei -20°C. Nach erneuter Zentrifugation (1500 U/min; 6 min; 4°C) wurde das Zellsediment an der Luft getrocknet und in 150 µl RNase A (0,1 mg/ml in PBS) und 0,5 ml Propidiumjodid (PI; 20 µg/ml in PBS) aufgenommen. Nach Inkubation für ca. 10 min bei Zimmertemperatur wurden die Zellen mit dem Durchflusszytometer mittels CellQuest Software (Becton Dickinson) vermessen.

b) Analyse metabolischer Zellaktivität

Mit Hilfe von WST-1-Reagenz (Roche Diagnostics, Mannheim) kann die Proliferationsaktivität (Vitalität) von Zellen bestimmt werden. Grundlage dieses Assays ist, dass das Tetrazoliumsalz WST-1 von zellulären Enzymen je nach metabolischer Aktivität (Vitalität) der Zellen zu dunkelrotem Formazan umgesetzt wird, welches photometrisch detektiert werden kann. Entsprechend behandelte, subkonfluente HUVEC wurden mit WST-1/Medium-Mix (1 : 10) überschichtet und nach 30 - 120-minütiger Inkubation bei 37°C erfolgte die Bestimmung der Absorption bei 420 nm.

c) Bestimmung der DNA-Syntheserate

Zur Quantifizierung der DNA-Syntheserate wurde ein immunologisch-kolorimetrischer Test (Cell Proliferation ELISA, BrdU (Roche)) verwendet. Dieser Test basiert auf der Messung der Inkorporation des Thymidinanalogons Bromodesoxyuridin (BrdU) während der DNA-Synthese und repräsentiert eine nicht-radioaktive Alternative zum ^3H -Thymidin-Einbau. 2 - 5 x 10³ Zellen wurden pro well in eine 96-well-Mikrotiterplatte ausgesät und der BrdU-Einbau nach entsprechender Behandlung analysiert. Hierzu wurde 100 µl BrdU-Lösung zu den Zellen gegeben (Endkonzentration: 10 µM BrdU) und drei Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Ethanol bei RT fixiert und mit anti-BrdU-POD-Antikörper für 90 min inkubiert. Nach wiederholtem Spülen des Zellrasens (3 x 10 min bei RT) erfolgte die Detektion des in die DNA inkorporierten BrdU mit Hilfe eines entsprechenden kolorimetrischen Substrats. Die Absorption wurde nach 5 - 30 min bei 492 nm gemessen.

2.2.1.6 Transfektion von DNA in Säugerzellen

Die Transfektion von DNA in Säugerzellen erfolgte mittels Lipofektion mit Hilfe des Effectene™ Transfection Reagent Kits (Qiagen) oder des ESCORT™III Transfection Reagents (Sigma-Aldrich, München). Es wurden 3 - 4 x 10⁵ Endothelzellen pro 5-cm-Schale ausgesät und nach 24 h (bei einer Konfluenz von 60 - 80 %) transfiziert. Hierzu wurden 1 - 2 µg Plasmid-DNA gemäß des Protokolls der Herstellerfirma mit Lipofektionsreagenz (Effectene bzw. ESCORT™III) versetzt und nach 30-minütiger Inkubation bei RT mit serumfreiem Medium auf 1 ml Endvolumen aufgefüllt. Nach Spülen der Zellen mit serumfreiem Medium wurden sie mit 4 ml frischem, ebenfalls serumfreiem Medium überschichtet und der DNA-Lipofektionsreagenz-Mix wurde tropfenweise zugegeben. Nach 8 - 16 h wurde das Medium gewechselt. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und im Anschluss entsprechend behandelt und analysiert.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten

Der Zellrasen exponentiell wachsender sowie konfluenten Zellen wurde zweimal mit kaltem PBS gespült und aus einer Plastik Kulturschale mit einem Gummischaber oder nach Ablösung durch Trypsin/EDTA in 1 ml PBS überführt. Die Zellen wurden pelletiert (4 min, 1000 U/min, RT) und in 200 - 400 µl Ultraschallpuffer (20 mM Tris-HCl, pH 8,5, 1 mM EDTA, 1 mM β -Mercaptoethanol, 5 % Glycerin, 1 mM PMSF) aufgenommen und durch Ultraschallbehandlung aufgebrochen (Branson Sonifier 250; Duty cycle: 40 %, Output control: 4 x 10 sec auf Eis). Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (14000 U/min; 4°C; 20 min) abgetrennt. Der Überstand wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren, und bei -20°C gelagert.

2.2.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration beruht auf der Bindung des Farbstoffs Coomassie Blue G-250 an die Aminogruppe der Proteine (Bradford, 1976). Hierbei verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs in phosphorsaurer Lösung von 465 nm nach 595 nm. Zuerst wurde eine Eichkurve mittels BSA-Standardlösung erstellt. Für die Proteinbestimmung der Versuchsproben wurden 2 - 5 µl der jeweiligen Proteinextrakte mit 200 µl Bradfordlösung versetzt. Nach 15-minütiger Inkubation erfolgte die Messung der Absorption bei 600 nm. Die Proteinkonzentration der Zellextrakte wurde anhand der Eichkurve bestimmt.

2.2.2.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) zur Auftrennung von Proteingemischen

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte wie von Laemmli 1970 beschrieben mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese. Bei den verwendeten Polyacrylamidgelen handelte es sich um denaturierende Gele, die aus einem 7 - 12 %igen Trenngel und einem 5 %igen Sammelgel bestehen. Die Trenngellösung (7 - 15 % Polyacrylamid/Bisacrylamid, 30 : 1, 375 mM Tris-HCl, pH 8,8, 0,1 % SDS, 0,05 % APS, 0,005 % TEMED) wurde zwischen die vorbereiteten Glasplatten gegossen und mit n-Butanol überschichtet, um einen geraden Gelabschluss ohne Luftblasen zu erreichen. Nach Entfernen

des n-Butanols wurde das Sammelgel (5 % Polyacrylamid/Bisacrylamid, 30 : 1, 125 mM Tris-HCl, pH 6,8, 0,1 % SDS, 0,05 % APS, 0,005 % TEMED) auf das Trenngel gegossen und ein Kamm zur Aussparung von Taschen eingesteckt. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm entfernt und die Taschen mit A. bidest nachgespült. Jeweils 20 - 30 µg aufzutrennendes, zelluläres Gesamtprotein wurden mit 1/4 Volumen Ladepuffer (Sigma-Aldrich, München) versetzt, 5 min bei 95°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Die gelelektrophoretische Auftrennung erfolgte in SDS-Laufpuffer bei 30 mA/Gel. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend aus dem Gel auf einen Nitrozellulosefilter übertragen.

2.2.2.4 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen (Western Blot)

Nach Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE wurden die Proteine aus dem Gel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Das Polyacrylamidgel wurde zuerst in Protein-Transfer-Puffer (25 mM Tris-HCl, pH 8, 100 mM Glycin, 25 % Methanol) überführt und auf eine Nitrozellulosemembran gelegt, welche dann zwischen je eine Doppellage in Puffer getränktes 3 MM-Papier gelegt wurde. Anschließend wurde das Gel in einem mit zwei angefeuchteten Schwämmen versehenen Gelhalter fixiert und vertikal in eine mit Protein-Transfer-Puffer gefüllte Transferkammer (Bio-Rad, München) eingesetzt, so dass der Nitrozellulosefilter zur Anode orientiert war. Die Überführung der Proteine auf die Membran erfolgte bei 180 mA über Nacht oder bei 350 mA für 1 Stunde. Nach Beendigung des Transfers erfolgte eine Verifizierung der Proteinübertragung durch Anfärben des Filters mit Ponceau S - Lösung (Sigma-Aldrich, München).

2.2.3 Immunologische Methoden

2.2.3.1 ELISA-Analysen

Zur Quantifizierung der E-Selektin-, P-Selektin-, ICAM-1-, TNF-R1- und der TNF-R2-Proteinexpression wurde ein „enzyme linked immuno sorbent assay“ (ELISA) verwendet. 4×10^4 Endothelzellen wurden in 96-well Mikrotiterplatten ausgesät und über Nacht kultiviert. Nach Mediumwechsel erfolgte die Vorbehandlung mit Statinen und anschließend die Stimulation mit TNF oder ionisierender Strahlung (IR). 4 - 5 h später wurden die Platten

10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Entfernung des Mediums wurde der Zellmonolayer zweimal mit eiskaltem PBS/1 % BSA gespült. Im Anschluss erfolgte eine Inkubation mit dem jeweiligen ersten Antikörper (1 : 100 in PBS/1 % BSA) für 90 Minuten auf Eis. Nach dreimaligem Spülen mit eiskaltem PBS/1 % BSA, wurde der POD-gekoppelte sekundäre Antikörper (1 : 1000 in PBS/1 % BSA) für 60 Minuten zugegeben und auf Eis inkubiert. Nach dreimaligem Spülen mit eiskaltem PBS wurde mit der Zugabe von para-Nitrophenyl-Phosphat-Lösung (pNPP) die enzymatische Nachweisreaktion zur Quantifizierung des entsprechenden Oberflächenmarkers gestartet. Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur (RT) erfolgte die Bestimmung der optischen Dichte der pNPP-Lösung bei 405 nm im Photometer. Für die Berechnung der spezifischen Bindung des jeweiligen primären Antikörpers wurde die unspezifische Bindung der IgG_{2a}-Isoform abgezogen (= 405 nm). Für eine statistische Auswertung der Daten (Mittelwerte \pm Standardabweichung) wurden mindestens zwei unabhängige Versuche mit jeweils $n = 3$ zu Grunde gelegt.

2.2.3.2 Immunologischer Nachweis von Proteinen (Western Blot)

Zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindungen wurde der Nitrozellulosefilter nach Proteintransfer für 3 h in Blockierungslösung (5 % Magermilchpulver in PBS, 0,2 % Tween-20) inkubiert. Der Filter wurde dann mit dem primären Antikörper (1 : 500 oder 1 : 1000) in Blockierungslösung für 2 h bei RT oder bei 4°C über Nacht inkubiert und anschließend 3 x 10 min mit PBS/0,2 % Tween-20 gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Im Anschluss wurde die Membran mit dem entsprechenden HRP-konjugierten Sekundärantikörper (1 : 5000 in Blockierungslösung, 1 h, RT) inkubiert und erneut gewaschen (3 x 10 min in PBS/0,2 % Tween-20, RT). Die gebundenen Antikörper-Antigen Komplexe wurden mittels ECL-Kit (Amersham, Freiburg) und High performance chemiluminescence Film (Amersham, Freiburg) detektiert. Um eine weitere Inkubation desselben Filters mit anderen Primärantikörpern zu ermöglichen, erfolgte ein Waschvorgang mit 100 mM Glycin-Lösung (pH 2,8)(2 x 10 min, RT) um gebundene Antikörper zu entfernen (membrane stripping). Bei der Verwendung phosphospezifischer Antikörper ist die vom Antikörper erkannte Proteinphosphorylierung eine Indikation für die Aktivierung dieses Proteins (I B- , Akt-Kinase, ERK-2).

2.2.3.3 FACS-Analysen

a) Bestimmung der Oberflächenexpression von Proteinen auf Endothelzellen

Hierzu wurden Endothelzellen unter Verwendung von Trypsin/EDTA geerntet, einmal in PBS gewaschen (1000 U/min, 4 min, RT) und 15 Minuten mit dem jeweiligen Antikörper (1 : 50 in PBS) auf Eis inkubiert. Nach Waschen mit PBS wurde der FITC-gekoppelte sekundäre Antikörper (1 : 1000 in PBS) zugegeben. Nach 15 minütiger Inkubation auf Eis erfolgte die Analyse der gefärbten Zellen im FACS-Gerät (FACS = fluorescence activated cell sorter). Pro Probe wurde eine Gesamtzahl von 20000 Zellen analysiert.

b) Bestimmung der Apoptosefrequenz, Annexin-V-Färbung

Diese Methode von Vermes et al., 1995 basiert auf der Bindung von Annexin-V-FITC an Phosphatidylserin-Reste, die während der frühen Apoptose von der Innenseite der Zellmembran auf die Außenseite gelangen. Behandelte bzw. unbehandelte Zellen wurden geerntet, in kaltem PBS gewaschen (1000 U/min, 4 min, 4°C) und auf Eis in 50 µl FACS-Bindepuffer (10 mM Hepes, pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂, 1 % BSA) aufgenommen. Es wurden 2,5 µl Annexin-V-FITC zugegeben und die Zellen 15 min auf Eis im Dunklen inkubiert. Danach wurden pro Ansatz etwa 440 µl Bindepuffer und 10 µl Propidiumiodid (PI) zugegeben. Innerhalb einer Stunde wurden die Proben durchflusszytometrisch vermessen und mittels CellQuest Software (Becton Dickinson, Heidelberg) der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen quantifiziert.

2.2.4 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

2.2.4.1 Präparation von Nukleinsäuren

a) Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Präparation kleiner Plasmid-Mengen (Mini-Präp ohne Säulen)

3 ml *E. coli* Über-Nacht-Kultur, die das gewünschte Plasmid enthält, wurde 2 - 5 min bei 14000 U/min abzentrifugiert, das Zellpellet in 200 µl Tris-Puffer P1 (50 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A) resuspendiert, zur alkalischen Lyse der Zellen mit 200 µl Lysepuffer P2 (200 mM NaOH, 1 % SDS) versetzt und kräftig gemischt. Nach fünfminütiger Inkubation bei RT erfolgte die Zugabe von 200 µl kaltem Neutralisationspuffer

P3 (2,55 M KAc, pH 4,8). Nach vorsichtigem Mischen wurde die Probe 10 min auf Eis gehalten und dann 15 min bei 4°C mit 14000 U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 1 Volumen eiskaltem Isopropanol versetzt und gut gemischt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation der Mischung (30 min, 4°C, 14000 U/min). Das erhaltene DNA-Pellet wurde mit eiskaltem 70 %igem EtOH gewaschen, 5 min bei 37°C getrocknet und anschließend in TE-Puffer + RNase A (100 µg/ml) aufgenommen. Die Ausbeute bei 3 ml Übernachtskultur lag bei ca. 15 µg Plasmid-DNA.

Präparation großer Mengen an Plasmid-DNA (Maxi-Präp)

Zur Sequenzierung, Mikroinjektion oder Transfektion geeignete, hochreine DNA wurde säulenchromatographisch mittels Plasmid Maxi Kit (Qiagen) oder EndoFree® Plasmid Mega Kit (Qiagen) nach Angaben der Herstellerfirma isoliert. Bakterien aus einem Kulturvolumen von 500 ml wurden durch Zentrifugation (5000 U/min, 4°C, 10 min) sedimentiert und in 10 ml Tris-Puffer P1 (50 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A) aufgenommen. Zur alkalischen Lyse wurde die Zellsuspension mit 10 ml Lysepuffer P2 (200 mM NaOH, 1 % SDS) versetzt, vermischt und 5 min bei RT inkubiert. Durch Zugabe von 10 ml Puffer P3 (2,55 M KAc, pH 4,8) wurde die Lösung neutralisiert. Die Plasmid-DNA konnte nun als löslicher Bestandteil von der unlöslichen, an Zelltrümmer gebundenen denaturierten chromosomalen DNA durch Zentrifugation (4300 U/min, 4°C, 45 min) abgetrennt werden. Der Überstand wurde auf ein DNA-Bindesäulchen geladen. Nach zweimaligem Waschen und anschließender Elution wurde die Plasmid-DNA mit 0,7 Volumen Isopropanol zur Aufkonzentrierung präzipitiert, mit 70 % Ethanol gewaschen und in TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen.

b) Isolierung genomischer DNA aus Säugerzellen und Mausschwanzbiopsien

Die Isolierung genomischer DNA erfolgte mit Hilfe des DNeasy®-Tissue Kits (Qiagen) oder des E.N.Z.A.® Tissue DNA Mini Kits (PeqLab). Exponentiell wachsende Zellen wurden wie beschrieben geerntet, in 200 µl PBS suspendiert und mit 40 µl RNase A (Stocklösung: 20 mg/ml) behandelt (10 min, RT). Im Fall der Schwanzbiopsien wurden 0,5 - 1 cm lange Schwanzstücke in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Danach wurden zur Zellsuspension oder den Biopsien 25 µl Proteinase K-Stocklösung und 200 µl AL-Puffer zugegeben und für 15 sec gut gemischt. Nach Über-Nacht-Inkubation bei 55°C unter Schütteln, wurden die Proben bei 70°C für 10 min inkubiert. Nach Zugabe von 210 µl absolutem Ethanol wurden die Proben auf QIAamp-Säulchen aufgetragen. Durch eine Zentrifugation der Säulchen (8000

U/min; RT; 1 min) wurden die Proben durch die Membran dieser Ionenaustauschersäulen gefiltert, wobei die DNA gebunden blieb. Die Säulchen wurden nun zweimal mit 500 µl AW-Puffer gewaschen, um Proteinreste zu entfernen. Im Anschluß wurde die DNA aus dem Säulchen mit 200 µl vorgewärmten (70°C) AE-Puffers eluiert. Im Fall der Mausschwanzbiopsien erfolgte ein Über-Nacht-Verdau mit OBTM-Protease (PeqLab) unter Schütteln bei 55°C. Nach einem 5 minütigen RNase A-Verdau bei RT wurde das Lysat mit Bindungspuffer und Ethanol vermischt, 10 min bei 70°C inkubiert und auf die HiBind[®]DNA-Säule gegeben. Nach Waschen und Elution wurde die DNA photometrisch (OD_{260nm}) quantifiziert und bei -20°C gelagert.

c) Isolierung von Gesamt-RNA aus Säugerzellen

Gesamt-RNA wurde mittels des GenEluteTM Mammalian Total RNA Kits (Sigma-Aldrich, München) nach Angaben der Herstellerfirma isoliert. Nach Entfernung des Mediumüberstandes wurden die Zellen durch Zugabe von Lysepuffer (im Kit enthalten) auf der Platte lysiert. Das Zelllysate wurde mit gleichem Volumen 70 %igem Ethanol versetzt und auf die mitgelieferte Säule geladen. Nach 3 Waschschrritten erfolgte die Elution der Gesamt-RNA mit RNase-freiem Wasser. Nach photometrischer Quantifizierung bei 260 nm wurde die RNA bei -20°C gelagert.

2.2.4.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren in wässriger Lösung oder in TE wurde die Absorption bei 260 nm, 280 nm und 320 nm bestimmt. Einer OD_{260} von 1 entspricht 50 µg/ml DNA, 40 µg/ml RNA bzw. 20 µg/ml Oligonukleotide. Das Verhältnis OD_{260}/OD_{280} gibt Aufschluss über Reinheit der DNA-Lösung. Sie beträgt bei reiner DNA 1,8 und bei RNA 2,0. Verunreinigung durch Proteine können bei einer Wellenlänge von 320 nm detektiert werden.

2.2.4.3 Transformation von DNA in *E. coli*

a) Herstellung kompetenter Bakterien

Aus einer Über-Nacht-Kultur von *E. coli* DH5 wurden 50 ml LB-Medium entsprechend einer Dichte von $OD_{600nm} = 0,05$ angeimpft und die Bakterien bis zu einer Dichte von $OD_{600nm} = 0,5$ bei 37°C geschüttelt. Nach Abzentrifugieren der Bakterien (10 min; 3000 U/min; 4°C)

wurden die Zellen in 15 ml TfbI-Puffer (30 mM KAc, 50 mM MnCl₂, 100 mM KCl, 15 % Glycerin, pH 5,8 mit HAc) aufgenommen und 10 min auf Eis inkubiert. Das nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (3000 U/min; 10 min; 4°C) erhaltene Pellet wurde unter leichtem Schütteln in Eiswasser in 2 ml TfbII-Puffer (10 mM MOPS/NaOH, 75 mM CaCl₂, 10 mM KCl, 15 % Glycerin, pH 7,0) resuspendiert, in Eppendorfreaktionsgefäße aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Diese kompetenten Zellen wurden bei -80°C gelagert.

b) Transformation

Die Transformation erfolgte mit 50 µl der aufgetauten, kompetenten Bakteriensuspension und 3 - 5 µl des Ligationsansatzes. Nach Zugabe der ligierten DNA wurden die Zellen 20 min auf Eis gehalten, danach 2 min bei 42°C und anschließend 2 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 300 µl LB-Medium wurde der Ansatz 30 min bei 37°C geschüttelt (in dieser Zeit kommt es zur Expression des Ampicillin-Resistenzgens). Anschließend erfolgte die Ausplattierung von 100 µl der Transformationsansätze auf je eine LB_{amp}-Agarplatte, wonach diese bei 37°C über Nacht inkubiert wurden. Einzeln gewachsene Bakterienkolonien wurden mit Hilfe sterilisierter Zahnstocher von der Platte in LB-Medium überführt und zur Plasmidisolierung über Nacht bei 37°C unter Schütteln (180 U/min) kultiviert.

2.2.4.4 Synthese von Nukleinsäuren *in vitro*

a) Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (Mullis et al., 1986) besteht in einer mehrfachen Replikation eines DNA-Fragments, welche durch eine Denaturierung der neu entstandenen Doppelstränge beliebig oft wiederholt werden kann. Bei der PCR verwendet man Oligonukleotide (Primer), die auf komplementären Strängen der DNA binden und mit ihren 3'-Enden aufeinanderzuweisen. Diese werden durch die thermostabile Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus* verlängert, wodurch die dazwischenliegenden Sequenzen vervielfältigt werden. Die neu synthetisierten Stränge dienen im nächsten Zyklus wieder als Vorlage (Template), an welche die Primer hybridisieren können. Dadurch wächst die Anzahl an DNA-Fragmenten exponentiell an. Ein Zyklus der 25 - 35 Zyklen zur Amplifikation eines gewünschten DNA-Fragments aus Plasmid-DNA bzw. genomischer DNA umfasste: Denaturierung: 1 min 94°C; Annealing: 60 - 120 sec 57°C, Elongation: 2 min 72°C oder 68°C. Für die PCR wurden 100 ng bis 1 µg Template-DNA mit 1 x Taq-Puffer, je 500 ng

Primer, 0,2 mM dNTPs und 2,5 U Taq-Polymerase in einem 50 µl Ansatz amplifiziert. Anschließend wurde ein Aliquot der Probe gelelektrophoretisch aufgetrennt, um die Effektivität und Spezifität der PCR zu überprüfen. Bei erfolgreicher Amplifikation wurde das erhaltene DNA-Fragment aufgereinigt und zur Klonierung verwendet.

Im Fall einer „Hot-Start-PCR“ wurde vor Zugabe der Taq-Polymerase der PCR-Ansatz 5 - 10 min auf 95°C erhitzt und die Taq-Polymerase in den heißen Ansatz pipettiert.

Bei der sogenannten „Touch-down-PCR“ sind die ersten 18 Zyklen der PCR von einer kontinuierlichen Temperaturabnahme hin zur korrekten Annealing-Temperatur der Primer gekennzeichnet. Die Temperaturabnahme erfolgt in 4°C-Schritten nach jeweils 6 Zyklen. Man beginnt 12°C über der ermittelten Annealing-Temperatur der Primer und setzt die PCR nach 18 Zyklen mit dieser spezifischen Temperatur mit 15 - 30 weiteren Zyklen fort.

b) Reverse Transcriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

semiquantitative RT-PCR

Mit Hilfe des RNA Purification Kits von Sigma-Aldrich wurde die Gesamt-RNA aus Endothelzellen isoliert (vgl. Vorschrift des Herstellers Sigma-Aldrich, München). Die RT-PCR Reaktion wurde als Ein-Schritt RT-PCR mit Hilfe des Titan™ One Tube RT-PCR System Kits (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. cDNA Synthese und PCR wurden mit einem optimierten Puffer und entsprechenden Enzymen zwar nacheinander, aber ohne erneute Zugabe von Reagenzien durchgeführt. 1 µg aufgereinigter RNA wurde in eine RT-PCR-Reaktion eingesetzt. Die cDNA-Synthese erfolgte für 40 min bei 50°C und die sich anschließende PCR-Reaktion umfasste 25 Amplifikationszyklen zur Vervielfältigung des gewünschten DNA-Fragments (Denaturierung: 95°C, 1 min; Annealing: 60°C, 2 min; Polymerisation: 68°C, 2 min). Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte über 1 %-Agarose-Gele, die Visualisierung der DNA mit Hilfe von Ethidiumbromidfärbung.

quantitative RT-PCR

Eine Quantifizierung der RNA-Expression erfolgte mittels „real time-PCR“, wobei „SYBR-green“ (Roche Diagnostics, Mannheim) als Fluoreszenzfarbstoff verwendet wurde. 18 µl-PCR-Ansätze wurden im Bio-Rad-iCycler™ IQ in 45 Zyklen einer Hot-Start-PCR unterzogen (Hot-Start: 95°C, 10 min; Denaturierung: 95°C, 10 sec; Annealing: 60°C, 10 sec; Polymerisation: 72°C, 20 sec). Zur internen Normierung wurde unter Verwendung geeigneter Primer ein DNA-Fragment des GAPDH-Gens parallel mitamplifiziert. Die Analyse erfolgte

mit Hilfe der iCycler™-Software von Bio-Rad und zusätzlich durch gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte.

c) Primerdesign

Alle Primerpaare wurden auf der Basis publizierter cDNA-Sequenzen designt. Hierfür wurde auf die NCBI Nukleotide GenBank zugegriffen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

2.2.4.5 Aufreinigung von DNA-Fragmenten

a) über Gelelektrophorese

Die Gewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mittels des High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers. Die DNA-Bande wurde aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit 5 Volumen des chaotropen Agens Guanidiniumhydrochlorid bei 55°C inkubiert, bis das Gel geschmolzen war. Die Suspension wurde gut gemischt, quantitativ in Spin-Columns überführt und 1 - 2 min bei 14000 U/min abzentrifugiert. Die Columns wurden zweimal mit Waschlösung des Herstellers (> 70 % EtOH) gewaschen und im Anschluss erfolgte die Elution des aufgereinigten DNA-Fragments mit mindestens 20 µl sterilen Wassers oder TE-Puffer/RNase A.

b) über Spin-Columns

Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten (PCR-Produkte) oder Plasmiden (Mini-Präp) erfolgte mittels des High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) nach Angaben des Herstellers. Die DNA wurde mit 5 Volumen des chaotropen Agens Guanidiniumhydrochlorid gut vermischt, quantitativ in Spin-Columns überführt und 1 - 2 min bei 14000 U/min abzentrifugiert. Die Columns wurden zweimal mit Waschlösung des Herstellers (> 70 % EtOH) gewaschen und im Anschluss erfolgt die Elution der gereinigten DNA mit mindestens 20 µl sterilen Wassers oder TE-Puffer/RNase A.

2.2.4.6 Auftrennung von DNA-Gemischen

Um DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge aufzutrennen und zu analysieren, wurden Agarosegele verwendet. Die DNA wandert hierbei mit einer Geschwindigkeit durch die Agarose-Matrix, die proportional zum negativen Logarithmus der Länge des DNA-Fragments ist. Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte auf 1 - 2 %igen

Agarosegelen. Die Agarose wurde in TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst und abgekühlt. TBE-Puffer diente als Laufpuffer bei der elektrophoretischen Auftrennung. Vor dem Auftragen der Proben wurden diese mit 6 x Ladepuffer (MBI Fermentas) versetzt. Als Molekulargewichtsstandards wurden EcoR I/Hind III-geschnittene λ -Phagen-DNA oder Alu I-geschnittene pBR322-DNA verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 V. Die elektrophoretisch aufzutrennende DNA wurde mit Ethidiumbromid (5 $\mu\text{g/ml}$) gefärbt und unter UV-Licht visualisiert.

2.2.4.7 Klonierung von DNA-Fragmenten

a) Restriktionsverdau von DNA

Standardmäßig wurde der Restriktionsverdau in einem Reaktionsansatz von 20 μl durchgeführt. Die DNA sollte möglichst frei von Salzen oder Alkohol sein, da sonst die enzymatische Reaktion gehemmt wird. Für die Restriktion wurden 1 μg bis 15 μg DNA eingesetzt, die mit 2 μl 10 x Restriktionspuffer und 5 - 10 U des entsprechenden Enzyms gemischt und mit A. bidest auf 20 μl aufgefüllt wurden. Die Puffer für die jeweiligen Restriktionsenzyme wurden nach Angaben des Herstellers (Roche Diagnostics, Mannheim) ausgewählt. Die Restriktion bei 37°C dauerte abhängig von der DNA-Menge 2 - 3 h oder über Nacht.

b) Präparation von Vektoren für die Ligation

1 - 15 μg Vektor-DNA wurden in Konzentrationen von 100 - 200 $\mu\text{g/ml}$ mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (5 U/ μg DNA) verdaut und über Spin-Columns gemäß 2.2.5.6 und der Anleitung des Herstellers gereinigt. Der Erfolg des Verdaus wurde durch gelelektrophoretische Auftrennung der Verdauungsfragmente überprüft.

c) Auffüllen rezessiver 3'-Termini mit Klenow-Polymerase

Die Taq-Polymerase hat die Eigenschaft, am 3'-Ende der synthetisierten Stränge zusätzliche Nukleotide anzuhängen (zumeist Adenin), die nicht von der Matrize kodiert werden. Diese Überhänge müssen für die Klonierung der PCR-Produkte zu einer glatten Schnittstelle aufgefüllt werden. Dasselbe trifft für verdaute DNA mit nicht kompatiblen Enden zu. Bei diesem als „Endfilling“ bezeichneten Verfahren werden durch das Klenow-Fragment 5' - überhängende Enden aufgefüllt und 3' - überhängende Enden abgebaut. 1 - 10 μg über Agarosegelelektrophorese gereinigte DNA (2.2.4.5) wurde in 13,5 μl A. bidest verdünnt.

Nach Zugabe von 1,5 µl Klenow-Puffer, je 1 µl dNTPs (je 0,4 mM) und 4 bis 8 U Klenow-Polymerase wird der Ansatz für 30 - 45 min bei RT oder bei 37°C inkubiert.

d) Klonierung von PCR-Fragmenten

Zur Synthese von Expressionsvektorsystemen wurden cDNA-Fragmente mittels PCR isoliert und über die verwendeten Oligonucleotidprimer zugleich entsprechende Restriktionsschnittstellen für die Klonierung in den Klonierungs- bzw. Expressionsvektor 5' und 3' angefügt. 1 - 15 µg der PCR-Fragmente wurden in Konzentrationen von 100 µg/ml bis 200 µg/ml mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (5 U/µg DNA) verdaut, über Spin-Columns gemäss 2.2.4.5 und der Anleitung des Herstellers gereinigt, in TE-Puffer aufgenommen und standen dann zur Ligation zur Verfügung. Eine Lagerung bei -20°C war möglich.

e) Ligation

Unter einer Ligation versteht man die Verknüpfung zwischen dem 3'-OH- und dem 5'-Phosphat-Ende freier DNA-Moleküle. Hierbei kann es sich entweder um überhängende oder um glatte Enden handeln. Die T₄-DNA-Ligase (Roche Diagnostics, Mannheim) schließt die entstehenden Lücken im Phosphat-Rückgrat bei überhängenden Enden und ligiert auch glatte DNA-Enden. Grundsätzlich sollte das molare Verhältnis zwischen Insert und Vektor-DNA zwischen 2 : 1 und 5 : 1 betragen. Die Ligation von Insert und Vektor erfolgte jedoch bei kohäsiven Enden mit äquimolaren Mengen, bei bündigen Enden mit einem 2 - 3-fachen Überschuss an zu inserierender DNA. Eingesetzt wurden 10 - 100 ng Vektor-DNA. Die Reaktion erfolgte in allen Fällen in 1 x Ligase-Puffer des Herstellers (Roche Diagnostics, Mannheim) mit 2 - 4 U T₄-Ligase bei 16°C über Nacht oder 2 h bei RT oder 48 h bei 4°C.

2.2.4.8 Klonierung des E-Selektin-Promotor-Luziferasekonstrukts

Die genomische Gesamt-DNA aus EA.hy-926-Zellen wurde mit dem DNeasy -Tissue Kit (Qiagen, Hilden) gewonnen. Mit den entsprechenden Primern wurde an 2 µg Gesamt-DNA eine Touch-down-PCR mit 30 Zyklen von 66°C bis 54°C durchgeführt. Das erhaltene 1,24 kB-E-Selektin-Promotor-Fragment wurde über die Schnittstellen Xho I und Hind III in den Expressionsvektor pGL3.1-Basic (Promega, Mannheim) eingesetzt, welcher Luziferase als Reporter enthält. Die erfolgreiche Klonierung des E-Selektin-Promotor-Fragments wurde durch Sequenzierung (Firma GENterprise) überprüft.

2.2.4.9 DNA-Sequenzierung

Die enzymatische Sequenzierung beruht auf dem Prinzip der Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977). Die Sequenzierungen wurden von der Firma GENterprise (Institut für Molekulargenetik, gentechnische Sicherheitsforschung und Beratung, Universität Mainz) durchgeführt.

2.2.5 Reporteranalysen

2.2.5.1 Analyse der E-Selektin-Promotor-Aktivität

Für E-Selektin-Promotoranalysen wurden 2 µg des E-Selektin-Reportergenkonstrukts in Endothelzellen transfiziert (8 h)(2.2.1.6) und im Anschluss erfolgte nach Mediumwechsel die Vorbehandlung und Stimulierung der Zellen. Nach weiteren 10 h Inkubation wurden die Zellen geerntet und homogenisiert. Die Luziferaseaktivität der Zelllysate wurde gemäß Herstellerprotokoll (Promega, Mannheim) im Luminometer bestimmt, wobei die Luziferaseaktivität von unbehandelten Zellen gleich 1 gesetzt und als Bezugswert herangezogen wurde.

2.2.5.2 Quantifizierung der β -Galaktosidase in Säugerzellen

a) Quantitative Bestimmung der β -Galaktosidase in NIH-3T3-Mausfibroblasten

Kolorimetrische Quantifizierung von β -Galaktosidase

Zur Quantifizierung des Reporterproteins β -Galaktosidase (β -Gal) wurde ein kolorimetrischer β -Gal ELISA Kit (Roche Diagnostics, Mannheim) verwendet. Mit dem lacZ-Gen transfizierte NIH-3T3-Zellen wurden in der Zellkulturschale mit Lysepuffer (1 ml, 30 min, RT) lysiert. 200 µl des Gesamtzelllysats wurden mit einem Anti- β -Gal-Antikörper inkubiert (1 h, 37°C) und anschließend erfolgte unter Verwendung eines POD-gekoppelten sekundären Antikörpers die Detektion der β -Gal-Proteinmenge. Die POD-vermittelte Farbreaktion erlaubte die photometrische Konzentrationsbestimmung bei 405 nm. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe einer Eichgerade, die aus dem mitgelieferten β -Gal-Proteinstandard resultierte.

Bestimmung der enzymatischen Aktivität der β -Galaktosidase

Für die Aktivitätsbestimmung des Enzyms β -Galaktosidase wurde der β -Gal Assay Kit (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Entsprechend transfizierte NIH-3T3-Mausfibroblasten wurden zunächst mit Lysepuffer aufgeschlossen und nach Zentrifugation (5 min, 4°C, 14000 U/min) wurden je 10 μ l Gesamtzellysate mit 70 μ l des β -Gal-Substrat ONPG (Ortho-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid) im „cleavage buffer“ (Invitrogen, Karlsruhe) 30 min bei 37°C inkubiert und das entstandene gelbe Produkt anschließend im Photometer bei 420 nm quantifiziert.

b) Quantitative Bestimmung der β -Galaktosidase in murinen Organlysaten

Die Bestimmung der β -Gal-Aktivität in Maus-Geweben erfolgte mit Hilfe des Beta-Glo™ Assay Systems (Promega, Mannheim). Bei dieser Methode ist das Substrat der β -Gal mit Luziferin gekoppelt, welches im Verlauf der enzymatischen Reaktion freigesetzt wird und so der Luziferase als Substrat dienen kann. Die organspezifischen Gewebestücke der Maus wurden mechanisch in Ultraschallpuffer auf Eis homogenisiert (Ultra-Turrax) und im Anschluss per Ultraschall (Duty cycle: 40 %, Output control: 4 x 10 sec auf Eis) sonifiziert. 100 μ l der Lysate wurden mit 100 μ l Beta-Glo™-Reagent gut vermischt und 30 min bei RT inkubiert. Das Gesamtvolumen von 200 μ l wurde im Luminometer vermessen. Die Auswertung erfolgte relativ zu Geweben aus Wildtyp-Mäusen, deren Basallumineszenz jeweils gleich 1 gesetzt wurde.

2.2.6 Tierexperimentelle Arbeiten

2.2.6.1 Mikroinjektion von DNA in Maus-Oozyten

Die Mikroinjektion des klonierten Fremdgenkonstrukts in Maus-Oozyten zur Generierung transgener Mäuse erfolgte im SPF-Bereich der zentralen Tierversuchsanstalt der Universität Mainz. Die Zucht zur Stammerhaltung der erhaltenen transgenen Tiere wurde von der zentralen Tierversuchsanstalt der Universität Mainz übernommen.

2.2.6.2 Genotypisierung und Charakterisierung transgener Tiere

Zur Genotypisierung der erhaltenen transgenen Mäuse wurden Schwanzbiopsien entnommen. Die aus den Biopsien gewonnene genomische DNA (2.2.4.1) wurde in eine Hot-Start-PCR (2.2.4.4) eingesetzt, die mit Transgen-spezifischen Primern durchgeführt wurde. Aus dem SPF-Bereich an uns übergebene Tiere wurden unter Standard-Zuchtbedingungen in Tierställen gehalten und zur Proben- bzw. Organentnahme durch Genickbruch abgetötet. Die Organe wurden unter semisterilen Bedingungen entnommen, bei -80°C zwischengelagert und dann zur β -Gal-Analyse (2.2.5.2) und zur Herstellung von Paraffin- und Kryoschnitt-Präparaten verwendet.

2.2.6.3 Kreuzung transgener Tiere mit anderen Mausstämmen

Zur Entfernung der lacZ-Reportergen-kassette aus dem transgenen DNA-Bereich wurden die RhoB- bzw. dnRac1-Mäuse mit „Aktin-Cre“-transgenen Mäusen (vgl. Kapitel 3.3. ff) verpaart. Diese Verpaarung erfolgte unter Standard-Zuchtbedingungen in eigens dafür ausgestatteten Tierställen.

3. Ergebnisse

3.1 Induktion von E-Selektin durch Zytokine

3.1.1 Zytokine stimulieren E-Selektin-Expression in humanen Endothelzellen

Inflammatorische Zytokine sind klassische Induktoren des Adhäsionsmoleküls E-Selektin in Endothelzellen. Die bestuntersuchteten E-Selektin-Induktoren, die sowohl *in vitro* als auch *in vivo* sehr potent die Expression des endothelialen Selektinvertreters aktivieren, sind der Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) und Interleukin-1 (IL-1) (Bevilacqua et al., 1987; Bevilacqua et al., 1989; Laferriere et al., 2001). Um den Mechanismus der Expressionskontrolle von E-Selektin näher aufzuklären, bedarf es eines geeigneten Zellsystems für *in vitro*-Untersuchungen. Daher wurde zunächst überprüft, ob die zur Verfügung stehenden Zellsysteme in Form primärer humaner Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVEC) und der davon abgeleiteten Zelllinie EA.hy-926 zur Untersuchung der E-Selektin-Expression geeignet sind. Wie in Abbildung 7 dargestellt, führt eine Stimulation sowohl primärer HUVEC als auch der Zelllinie EA.hy-926 mit dem Zytokin TNF α zu einer konzentrationsabhängigen Induktion der E-Selektin-Expression. TNF α induziert in Endothelzellen die E-Selektin-Proteinexpression (Abbildung 7A), der eine gesteigerte mRNA-Synthese (Abbildung 7B) zu Grunde liegt.

Um zu überprüfen, ob eine Zunahme der E-Selektin-Genaktivität Ursache der erhöhten Protein- und mRNA-Expression ist, wurden Reporteranalysen mit Hilfe eines selbst klonierten Reportergenkonstrukts vorgenommen. Hierzu wurde ein 1,242 kB großes Promotorfragment des humanen E-Selektin-Gens aus EA.hy-926 isoliert und vor das Glühwürmchen-Luziferasegen in einen Expressionsvektor kloniert (Abbildung 8A). Die Sequenzierung des mittels PCR erhaltenen Promotorbereiches bestätigte eine 100 %ige Übereinstimmung mit der bereits veröffentlichten 5'-nichtkodierenden Sequenzen des E-Selektin-Gens (Montgomery et al., 1991). Die Reporteranalysen zeigten, dass TNF α die Transkription des E-Selektin-Gens stimuliert (Abbildung 8B).

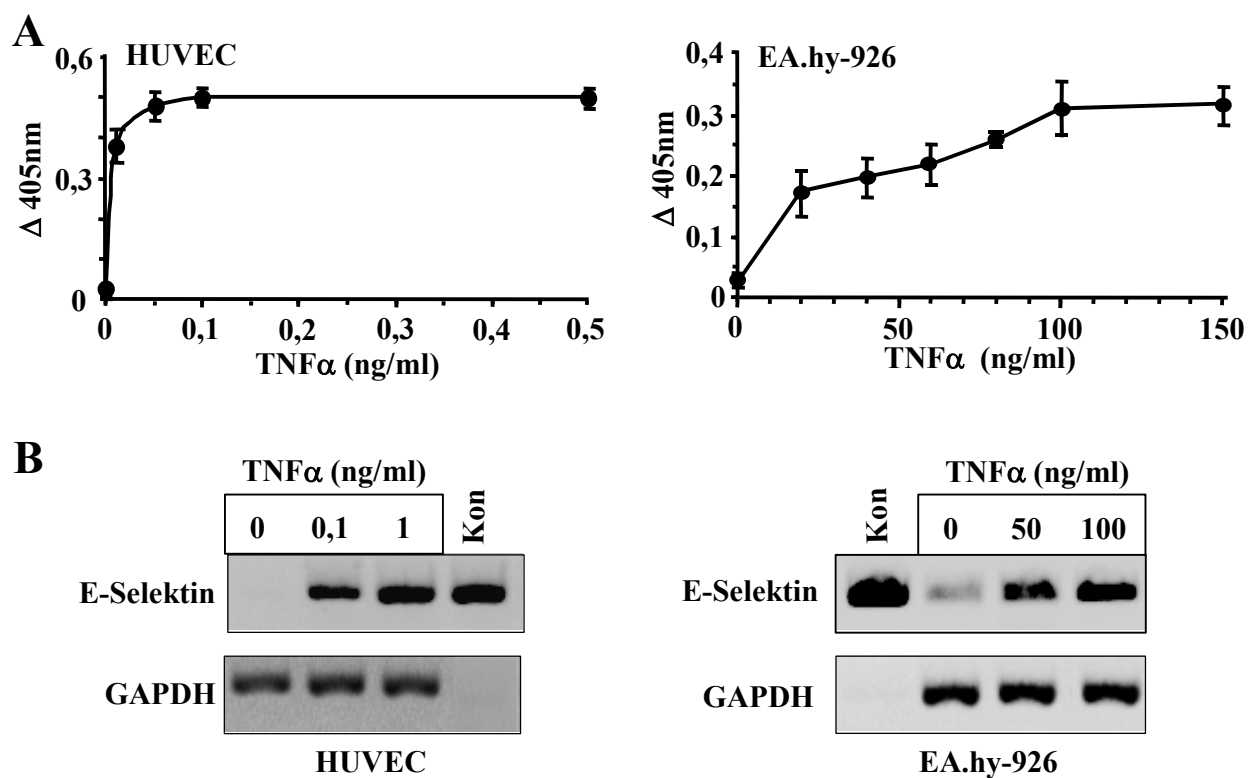


Abb.7 TNF α induziert E-Selektin-mRNA- und -Proteinexpression in humanen Endothelzellen.

A: Subkonfluente HUVEC und EA.hy-926 wurden mit verschiedenen Konzentrationen an TNF α behandelt. Die E-Selektin-Proteinexpression wurde 5 h später per ELISA wie im Methodenteil beschrieben ermittelt. Die gezeigten Mittelwerte \pm Standardabweichung ergaben sich aus mindestens drei unabhängigen Experimenten (jeweils $n = 3$).

B: Die Analyse der E-Selektin-mRNA-Expression erfolgte 3 h nach TNF α -Behandlung mittels semi-quantitativer RT-PCR. In der Kontrolle (Kon) diente E-Selektin-cDNA als Template für die PCR.

Untersuchungen des zeitlichen Verlaufs der E-Selektin-Expression nach TNF α -Behandlung von Endothelzellen sind in Abbildung 9 am Beispiel der Zelllinie EA.hy-926 gezeigt. Drei bis fünf Stunden nach Stimulation mit 100 ng/ml TNF α ist das Maximum der Proteinexpression erreicht. Nach 8 h fällt die E-Selektin-Oberflächenpräsentation wieder ab (Abbildung 9).

Neben TNF α sind auch andere Zytokine und darüber hinaus Verbindungen aus verschiedensten Stoffklassen als Induktoren von E-Selektin beschrieben (Vora et al., 1996; Bevilacqua et al., 1989; Iwamura et al., 1997). Tabelle 3 gibt einen vergleichenden Überblick über die E-Selektin-Proteininduktion durch verschiedene Agenzien in EA.hy-926 und HUVEC.

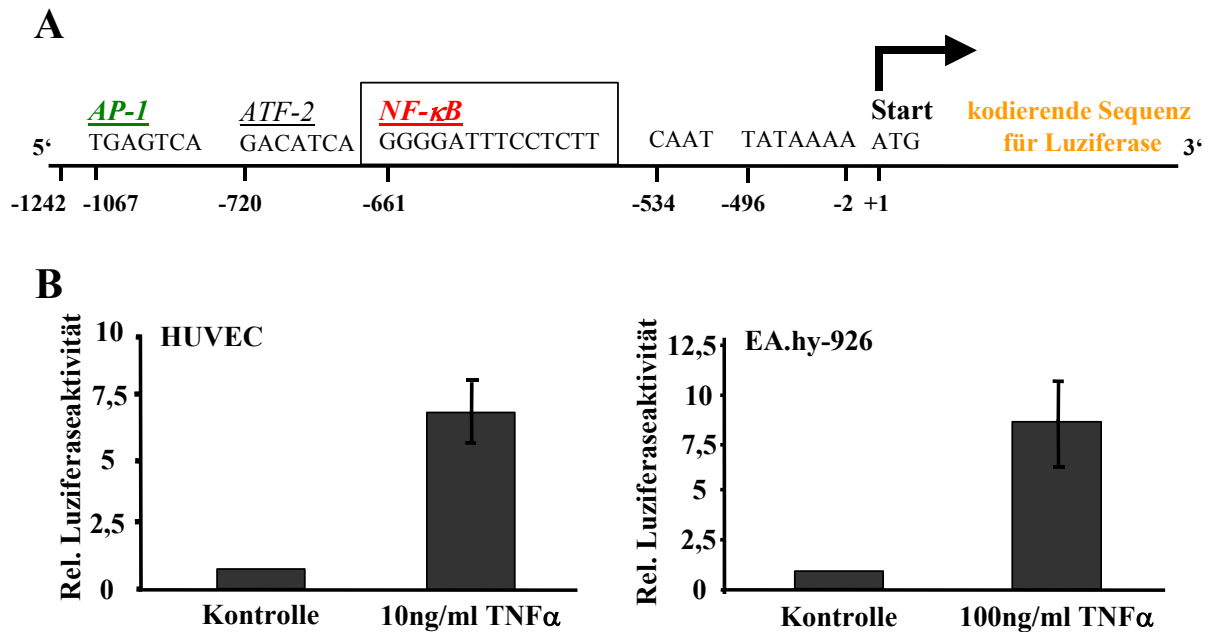
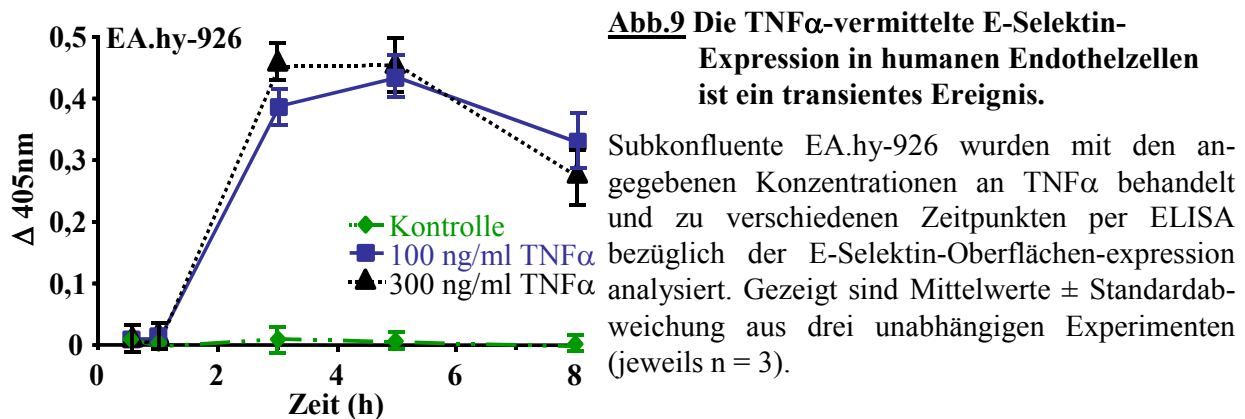


Abb.8 TNF α induziert die E-Selektin-Genexpression: Reporteranalysen mit einem 1,24 kB E-Selektin-Promotorfragment.

A: Aus subkonfluenten humanen Endothelzellen (EA.hy-926) wurde Gesamt-RNA isoliert und mittels RT-PCR ein 1,242 kB großes 5'-nichtkodierendes E-Selektin-Promotorfragment gewonnen. Dieses wurde über Xho I- und Hind III-Schnittstellen in den Luziferase-Expressionsvektor pGL3-Basic (GenBank®/EMBL Accession Number U47295) vor die kodierende Sequenz des Luziferasegens kloniert. Dementsprechend wird die Expression der Luziferase durch die regulatorischen DNA-Bereiche innerhalb des E-Selektin-Promotors kontrolliert.

B: Um die E-Selektin-Expression auf Promotorebene zu bestimmen, wurden Endothelzellen (HUVEC und EA.hy-926) mit dem E-Selektin-Promotor-Luziferasekonstrukt (A) transfiziert. 24 h später erfolgte die TNF α -Behandlung. Weitere 10 h später wurden die Zellen geerntet und die Luziferaseaktivität der Lysate bestimmt. Die Luziferaseaktivität der transfizierten, unbehandelten Kontrolle wurde gleich 1 gesetzt. Mittelwerte \pm Standardabweichung ergaben sich aus mindestens drei unabhängigen Experimenten (jeweils n = 3).



In Übereinstimmung mit Literaturdaten erfolgt in HUVEC eine erhöhte E-Selektin-Expression nach Behandlung mit IL-1 α und IL-1 β (Bevilacqua et al., 1989; Bevilacqua et al., 1987) sowie mit dem zellulären Phospholipid Lysophosphatidsäure (LPA)(Rizza et al., 1999; Palmetshofer et al., 1999) und dem Tumorpromotor TPA (Melrose et al., 1998; Stuhlmeier et al., 1996). Im Gegensatz hierzu reagiert die Zelllinie EA.hy-926 auf diese Agenzien nicht mit einer gesteigerten E-Selektin-Expression (Tabelle 3). Ionisierende γ -Strahlung (IR) induziert in beiden Zelltypen das endotheliale Selektin in ähnlichem Ausmaß wie TNF α (vgl. auch Kapitel 3.2 ff). Genotoxische Verbindungen, wie die Tumorthapeutika Doxorubicin und Bleomycin, das oxidativ-reaktive Wasserstoffperoxid und das alkylierende Agenz N-Methy-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin (MNNG) sowie UV-C-Licht sind nicht in der Lage, in den untersuchten Zellsystemen E-Selektin zu induzieren (Tabelle 3).

Agenz	E-Selektin-Proteinexpression in		Tabelle 3 E-Selektin-Proteinexpression nach verschiedenen Behandlungen in HUVEC und EA.hy-926 im Vergleich.
	EA.hy-926	HUVEC	
TNF α	+++	+++	Subkonfluente Endothelzellen wurden mit der angegebenen Konzentration der jeweiligen Agenzien behandelt. 5 h später wurde die E-Selektin-Expression mittels ELISA detektiert. TNF α : 0,1 μ g/ml, IL-1 α / β : 0,2 μ g/ml, LPA: 0,1 mM, TPA: 0,3 μ M, Lektin: 0,3 mg/ml, LDL: 0,1 g/ml, LPS: 0,5 μ g/ml, Triiodo-L-Thyronin: 10 nM, ionisierende Strahlung: 10 Gy, Bleomycin: 1 mg/ml, Doxorubicin: 90 μ M, MNNG: 30 μ M, H ₂ O ₂ : 0,01 %. +++ starke Induktion (> 8 - fach) ++ schwache Induktion (6 bis 8 - fach) + sehr schwache Induktion (2 bis 6 - fach) - keine Induktion (< 2 - fach) n.d. nicht ermittelt
IL-1 α	-	+++	
IL-1 β	-	+++	
LPA	-	++	
TPA	-	+	
Lektin	-	n.d.	
LDL	-	-	
LPS	-	n.d.	
Ionisierende Strahlung	+++	+++	
Bleomycin	-	-	
Doxorubicin	-	-	
UV-C-Licht	-	-	
MNNG	-	-	
H ₂ O ₂	-	-	

Die zytokinabhängige Geninduktion von E-Selektin erfolgt über die Aktivierung des nuklearen Faktors κ B (NF- κ B)(Schindler et al., 1994; Montgomery et al., 1991; Whitley et al., 1994). Interessanterweise sind die in der Literatur beschriebenen NF- κ B-Aktivatoren Doxorubicin (Das und White, 1997) oder UV-C-Licht (Li und Karin, 1998) nicht in der Lage, E-Selektin in Endothelzellen zu induzieren (Tabelle 3).

Um zu zeigen, dass diese Agenzien unter den gewählten Bedingungen jedoch NF- κ B in humanen Endothelzellen aktivieren, wurde ein transient transfiziertes NF- κ B-Minimalpromotor-Luziferase-Konstrukt verwendet. Am Beispiel der Zelllinie EA.hy-926 konnte demonstriert werden, dass neben den E-Selektin-induzierenden Agenzien TNF α und IR (Abbildung 10A) auch Doxorubicin und UV-C-Licht in der Lage sind, NF- κ B in Endothelzellen zu aktivieren (Abbildung 10B). Abbildung 10C bestätigt die Ergebnisse der Promotorstudien aus Abbildung 10B: eine Behandlung mit TNF α , IR, Doxorubicin und UV-C-Licht führt in Endothelzellen zur I κ B- α -Degradation, die ein direktes Maß für die NF- κ B-Aktivierung ist. Auf Grund der Tatsache, dass UV-C und Doxorubicin trotz der Stimulierung von NF- κ B (Abbildung 10B) keinerlei E-Selektin-Expression (Abbildung 10A) in Endothelzellen auslösen, lässt sich die Hypothese aufstellen, dass für die E-Selektin-Expression die Aktivierung von NF- κ B eine notwendige, aber keine hinreichende Bedingung ist.

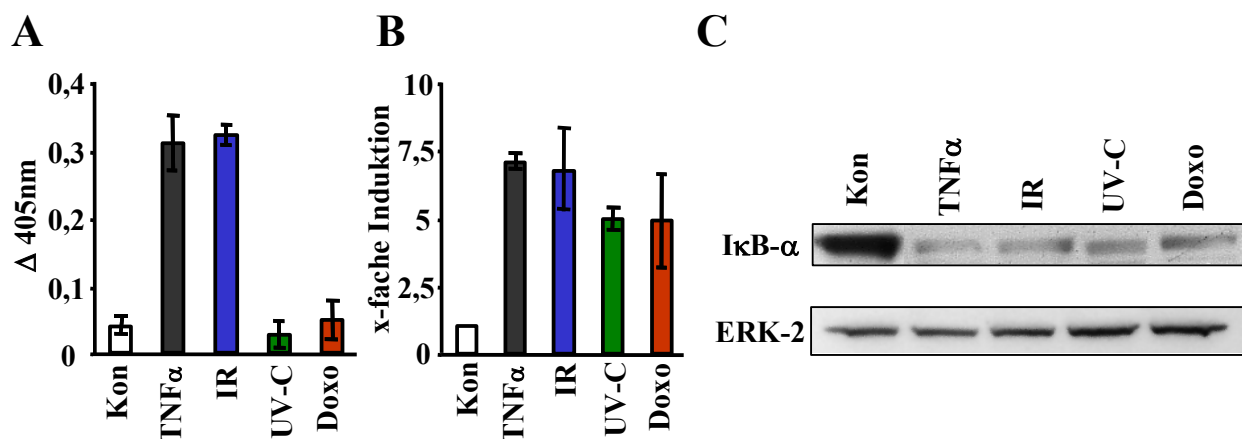


Abb.10 Die Aktivierung von NF- κ B durch gentoxische Noxen ist nicht ausreichend, E-Selektin-Expression in humanen Endothelzellen zu induzieren.

A: Endothelzellen (EA.hy-926) wurden mit TNF α (100 ng/ml), ionisierender Strahlung (IR)(10 Gy), UV-C-Licht (40 J/m²) und Doxorubicin (Doxo)(3 μ M) behandelt und nach 5 h per ELISA auf E-Selektin-Oberflächenexpression analysiert. Kon bezeichnet die basale E-Selektin-Expression in unbehandelten Endothelzellen. Die gezeigten Daten sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten (jeweils n = 3).

B: Endothelzellen (EA.hy-926) wurden mit einem NF- κ B-spezifischen Reporter-genkonstrukt (3 x NF- κ B-Luziferase) transfiziert und 24 h später wie unter A beschrieben behandelt. 16 h später wurde die Luziferase-Aktivität der Zellextrakte im Luminometer bestimmt. Kon bezeichnet die basale Fluoreszenz transfizierter, aber unbehandelter Endothelzellen. Gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten (jeweils n = 3).

C: Endothelzellen (HUVEC) wurden wie unter A beschrieben behandelt. Anschließend wurde mittels Western-Blot-Analyse die I κ B- α -Proteinmenge untersucht. Proteinextrakte wurden im Fall von TNF α 20 min, für IR 60 min und für UV-C und Doxo 3 h nach Behandlung gewonnen. Die Rehybridisierung des Blots mit anti-ERK-2-Antikörper diente als Ladekontrolle. Kon: unbehandelte Endothelzellen.

3.1.2 Einfluss von Statinen auf die TNF α -induzierte E-Selektin-Expression

Einige wenige Hinweise aus der Literatur bringen die Familie der Rho-GTPasen in Zusammenhang mit der Expressionsregulation von Adhäsionsmolekülen (Braga et al., 1997; Clark et al., 1998; Evers et al., 2000), unter anderem auch von E-Selektin (Wojciak-Stothard et al., 1999). Um zu überprüfen, ob im Fall der TNF α -induzierten E-Selektin-Expression Rho-GTPasen eine Rolle spielen, kamen zunächst Statine als Inhibitoren dieser kleinen G-Proteine zum Einsatz. Für die Stoffklasse der Statine wurde eine inhibierende Wirkung auf stressinduzierte Aktivierung von NF- κ B gezeigt, wobei die Hemmung von Rho-GTPasen als ursächliches Ereignis diskutiert wird (Gnad et al., 2000; Gnad et al., 2001; Laufs und Liao, 1998). Abbildung 11A zeigt den Einfluß von zwei verschiedenen Statinformen, Lovastatin und Simvastatin, auf TNF α -induzierte E-Selektin-Expression. Beide Statine hemmen konzentrationsabhängig die E-Selektin-Proteinexpression in logarithmisch wachsenden Endothelzellen (ECs) (Abbildung 11A). Diese auf ELISA-Studien basierenden Ergebnisse konnten durch FACS-Analysen bestätigt werden (Abbildung 11B). Mit Hilfe von RT-PCR-Analysen konnte nach Lovastatinvorbehandlung und TNF α -Stimulierung eine im Vergleich zu unbehandelten Zellen um 70 - 80 % verminderte E-Selektin-mRNA-Expression festgestellt werden (Abbildung 11C). Als Ursache hierfür wurde mittels E-Selektin-Promotoranalysen gezeigt, dass Statine zytokininduzierte E-Selektin-Genexpression blockieren (Abbildung 11D). Diese Ergebnisse lassen auf eine Beteiligung von Rho-GTPasen an der TNF α -vermittelten E-Selektin-Geninduktion schließen

Da die bisher verwendeten Statinkonzentrationen über dem therapeutisch relevanten, im Serum von Patienten erreichten Konzentrationsbereich von 0,1 - 3 μ M (Thibault et al., 1996) liegen, stellte sich die Frage nach der niedrigsten effektiven Konzentration von Statin, bei der noch eine Hemmung der E-Selektin-Induktion auftritt. Hierfür wurden nicht proliferierende, konfluente HUVEC verwendet, die als *in vitro*-Modell den natürlichen Bedingungen am nächsten kamen. Nach Statinvorbehandlung wurden die konfluenten Endothelzellen mit geringen Konzentrationen an TNF α (5 pg/ml und 10 pg/ml) stimuliert und dann per FACS-

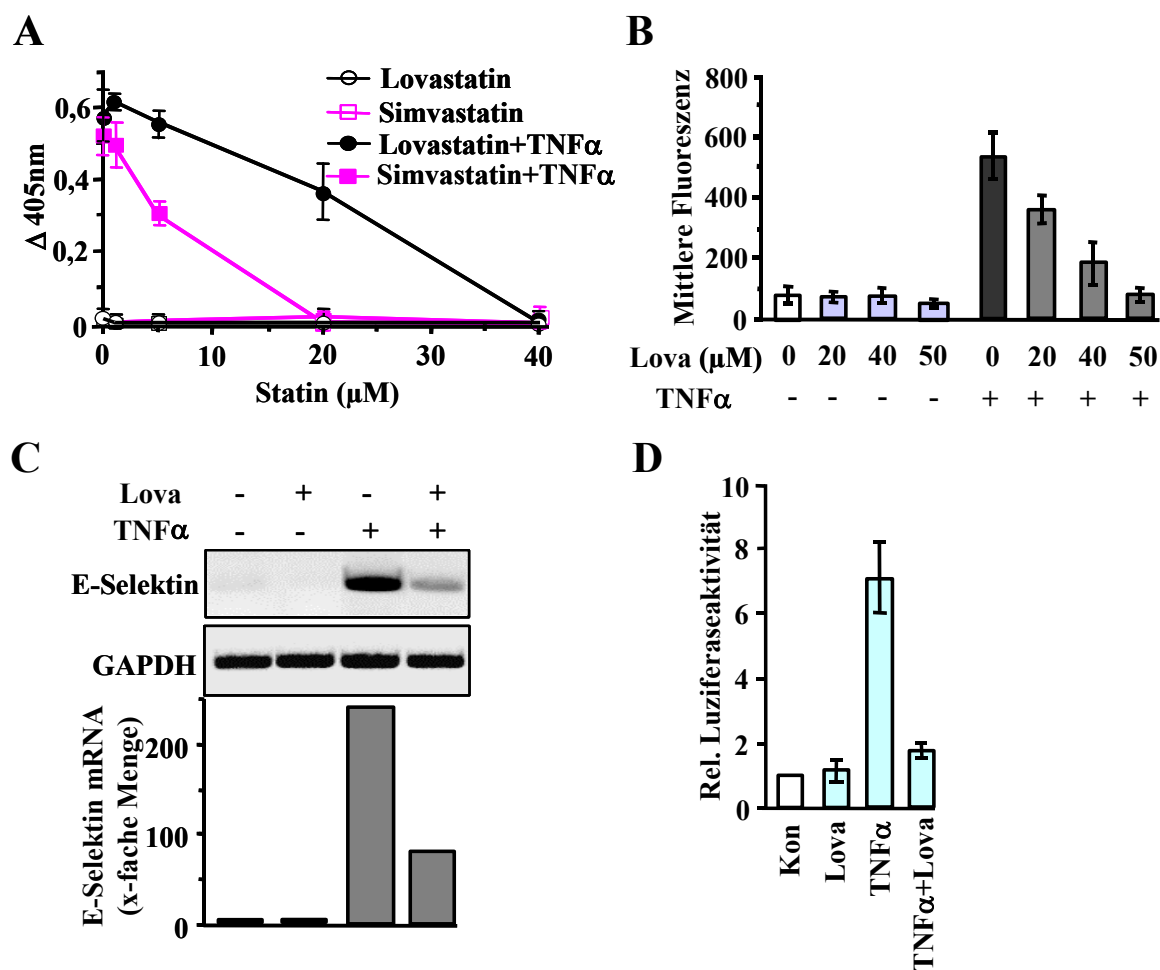


Abb.11 Statine hemmen die TNF α -induzierte E-Selektin-Expression in humanen Endothelzellen.

A, B: Subkonfluente HUVEC wurden über Nacht mit verschiedenen Konzentrationen an Lovastatin (Lova) oder Simvastatin vorbehandelt. Im Anschluss wurde TNF α (1 ng/ml) zugegeben und 5 h später erfolgte die Bestimmung der E-Selektin-Proteinexpression durch ELISA (A) und FACS (B). Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Messungen (jeweils n = 3).

C: Nach Vorbehandlung mit Lovastatin (Lova)(20 μ M, über Nacht) wurden HUVEC mit TNF α (1 ng/ml) behandelt. 3 h später wurde die mRNA-Expression per RT-PCR detektiert. GAPDH-mRNA diente als interne Kontrolle. Dargestellt ist die inverse Form des Ethidiumbromid-gefärbeten Gels der semi-quantitativen RT-PCR. Die Quantifizierung der mRNA-Mengen erfolgte mit Hilfe von „real-time-PCR“ und ist im Histogramm dargestellt.

D: 24 h nach Transfektion von HUVEC mit dem E-Selektin-Promotor-Luziferasekonstrukt (Abbildung 8A) wurden die Zellen mit Lovastatin (Lova)(20 μ M, über Nacht) vorbehandelt. Im Anschluss an eine 8-stündige TNF α -Stimulation (1 ng/ml), wurde die Luziferaseaktivität im Luminometer bestimmt. Die Luziferaseaktivität transfizierter, aber un behandelter Zellen (Kon) wurde als Bezugswert gleich 1 gesetzt. Die gezeigten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Messungen (jeweils n = 2).

Analyse auf E-Selektin-Expression untersucht. Abbildung 12 zeigt, dass bereits bei einer Konzentration von 100 nM Lovastatin die TNF α -induzierte E-Selektin-Expression um 60 - 80 % gehemmt ist. Bei Einsatz von 1 μ M Lovastatin zeigte sich eine Hemmung von ca. 90 % (Abbildung 12A, B).

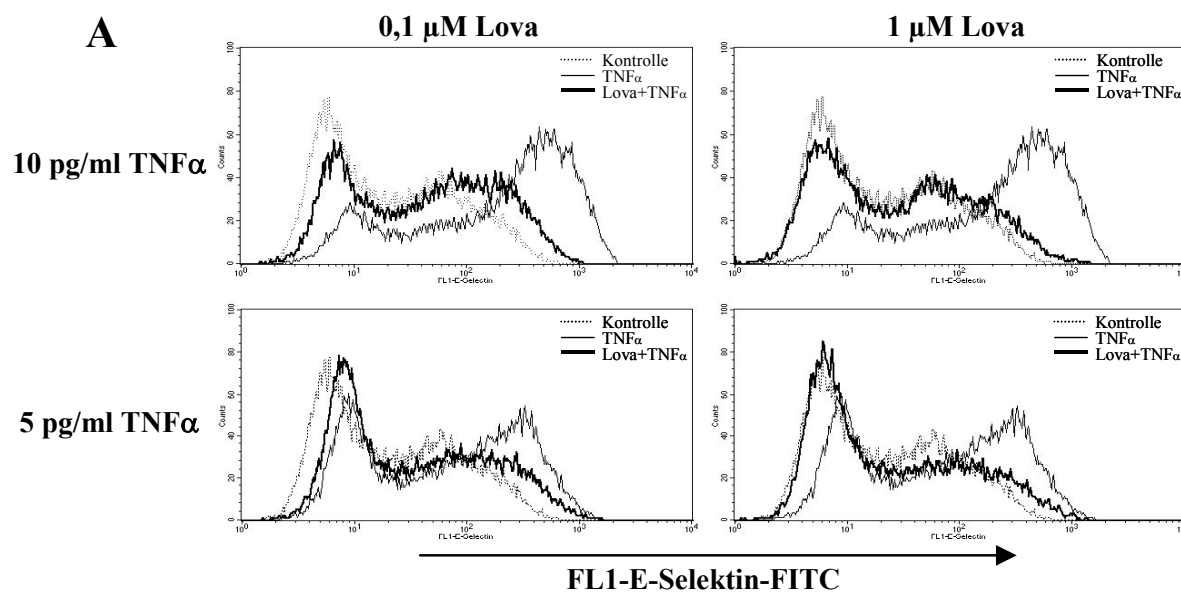
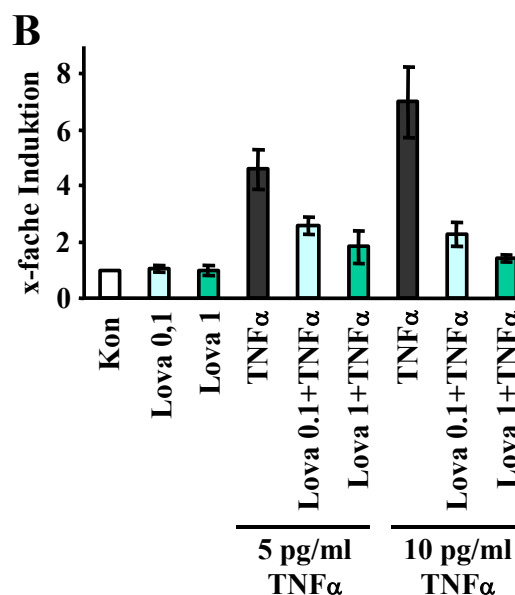


Abb.12 Physiologisch relevante Dosen an Lovastatin verhindern die $\text{TNF}\alpha$ -induzierte E-Selektin-Expression in konfluenten HUVEC.

A: Konfluente HUVEC wurden mit Lovastatin (Lova) (0,1 μM , 1 μM) über Nacht vorbehandelt. Nach 5-stündiger Exposition mit 5 pg/ml bzw. 10 pg/ml $\text{TNF}\alpha$ erfolgte die Analyse der E-Selektin-Oberflächenexpression per FACS. Das Ergebnis eines repräsentativen Experiments ist dargestellt. Kontrolle = nur mit Lova vorbehandelte Zellen.

B: Konfluente HUVEC wurden wie unter A beschrieben behandelt und per FACS auf E-Selektin-Expression analysiert. Die Eigenfluoreszenz un behandelter Endothelzellen (Kon) wurde als Bezugswert gleich 1 gesetzt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten.



3.1.3 Einfluss zytoskelettaler Veränderungen auf die E-Selektin-Expression

Statine nehmen durch Hemmung von Rho-GTPasen Einfluss auf die Aktinzytoskelettorganisation (Laufs et al., 2000; Eberlein et al., 2001; Patel und Corbett, 2003; Ruiz-Velasco et al., 2004). Da E-Selektin über seinen zytoplasmatischen Teil mit dem zellulären Aktinfilamentsystem in Verbindung steht (Yoshida et al., 1996), könnten aktinzytoskelettale Veränderungen oder Umorganisationen mit einer veränderten E-Selektin-Oberflächenpräsentation einhergehen. Die beobachtete Hemmung der E-Selektin-Expression durch Statine könnte demnach über eine statinbedingte Umstrukturierungen des Zytoskeletts vermittelt sein.

Um dem nachzugehen, wurden Endothelzellen mit CytochalasinD vorbehandelt, mit $\text{TNF}\alpha$ stimuliert und dann per ELISA auf die Oberflächenexpression von E-Selektin hin untersucht. Das zellpermeable Mycotoxin CytochalasinD führt rasch zur völligen Depolymerisation des Aktinzytoskeletts (Goddette und Frieden, 1986). Es wurde auf Grund von Literaturdaten davon ausgegangen, dass CytochalasinD nicht als Inhibitor von Signaltransduktoren des TNF-Rezeptor-, „Signalings“ wirkt (d'Alessio et al., 1998; VandenBerg et al., 2004), so dass es der Einsatz dieses Toxins ermöglicht, Zytoskeletteffekte von signaltransduktionsvermittelten Wirkungen zu differenzieren. Wie in Abbildung 13A dargestellt, führt CytochalasinD bereits bei Konzentrationen $\leq 0,2 \mu\text{g/ml}$ zu massiven Veränderungen der endothelialen Zellmorphologie. Die $\text{TNF}\alpha$ -induzierte E-Selektin-Oberflächenexpression erfolgt in diesem Konzentrationsbereich trotz Zytoskelettschädigung in nahezu identischem Ausmaß wie in morphologisch nicht veränderten Zellen (Abbildung 13A, B). Erst CytochalasinD-Konzentrationen $\geq 0,5 \mu\text{g/ml}$ inhibieren die zytokinvermittelte E-Selektin-Induktion deutlich (Abbildung 13A, B).

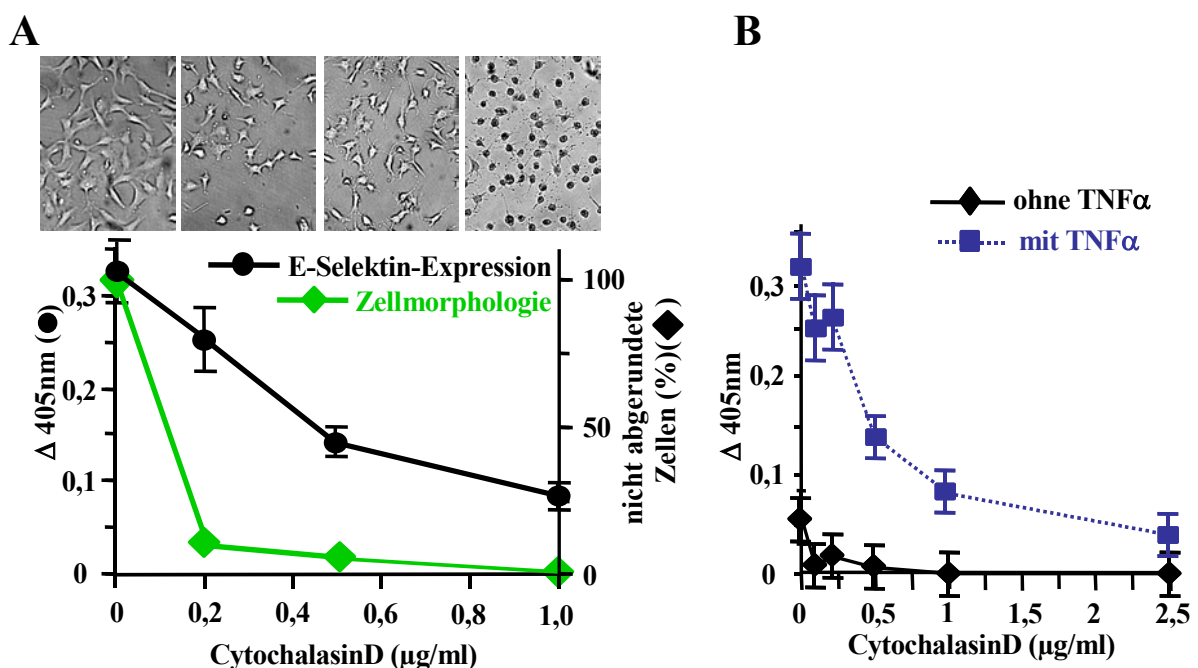


Abb.13 Einfluss von CytochalasinD auf $\text{TNF}\alpha$ -induzierte E-Selektin-Expression in humanen Endothelzellen.

A: EA.hy-926 wurden mit CytochalasinD in angegebenen Konzentrationen über Nacht vorbehandelt und anschließend mit $\text{TNF}\alpha$ (100 ng/ml) stimuliert. 5 h später erfolgte die mikroskopische Analyse der Zellmorphologie (Abbildungen (Vergrößerung: 1 : 400) und Diagramm (◆)) und Bestimmung der E-Selektin-Oberflächenexpression mittels ELISA (Diagramm (●)). Gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten (jeweils $n = 3$).

B: EA.hy-926 wurden über Nacht mit CytochalasinD in unterschiedlicher Konzentration vorbehandelt und im Anschluss mit $\text{TNF}\alpha$ (100 ng/ml) stimuliert. 5 h später erfolgte die Analyse der E-Selektin-Expression mittels ELISA. Mittelwerte \pm Standardabweichung stammen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten (jeweils $n = 3$).

Weiterhin wurden in parallelen Ansätzen Endothelzellen entweder mit 1 $\mu\text{g/ml}$ CytochalasinD (Abbildung 14A) oder mit 20 μM Lovastatin (Abbildung 14B) über Nacht vorbehandelt und nach Entfernung der Mediumüberstände drei Stunden unter Normbedingungen in Standardmedium kultiviert. In diesen drei Stunden kam es zur sichtbaren Reorganisation des Zytoskeletts und zur Erholung der Zellen, wobei die klassische Endothelzellmorphologie wieder erreicht wurde (Abbildung 14C). Zu diesem Zeitpunkt erfolgte eine Stimulation der E-Selektin-Expression durch $\text{TNF}\alpha$ und nach 5 Stunden wurde die Oberflächenexpression des endothelialen Selektins per ELISA analysiert. Wie in Abbildung 14A und Abbildung 14B

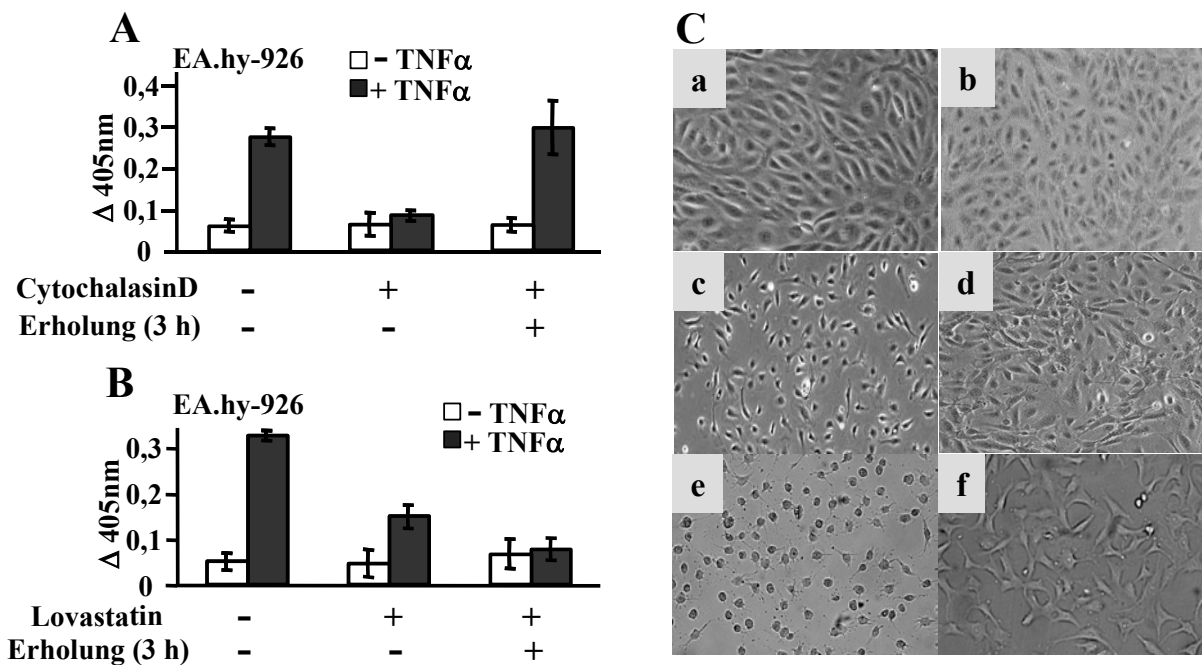


Abb.14 Statinvermittelte Hemmung der $\text{TNF}\alpha$ -induzierten E-Selektin-Expression erfolgt nicht über Zerstörung des Aktinzytoskeletts.

A: Subkonfluente EA.hy-926 wurden über Nacht mit CytochalasinD (1 $\mu\text{g/ml}$) vorbehandelt und im Anschluss oder erst 3 h nach Entfernen von CytochalasinD mit $\text{TNF}\alpha$ (100 ng/ml) stimuliert. 5 h später erfolgte die Analyse der E-Selektin-Oberflächenexpression mittels ELISA. Mittelwerte \pm Standardabweichung stammen aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten (jeweils $n = 3$).

B: Subkonfluente EA.hy-926 wurden mit Lovastatin (20 μM , über Nacht) vorbehandelt und anschließend oder erst 3 h nach Entfernen von Lova mit $\text{TNF}\alpha$ (100 ng/ml) stimuliert. 5 h später erfolgte die Analyse der E-Selektin-Oberflächenexpression durch ELISA. Gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten (jeweils $n = 3$).

C: Illustration des Einflusses von Lovastatin und CytochalasinD auf die Morphologie humaner Endothelzellen. a: Unbehandelte konfluente HUVEC. b: HUVEC mit Lovastatin (0,1 μM) über Nacht behandelt. c: HUVEC mit Lovastatin (20 μM) über Nacht behandelt. d: HUVEC mit Lovastatin (20 μM) über Nacht behandelt, 3 h nach Entfernung von Lovastatin. e: HUVEC mit CytochalasinD (1 $\mu\text{g/ml}$) über Nacht behandelt. f: HUVEC mit CytochalasinD (1 $\mu\text{g/ml}$) über Nacht behandelt, 3 h nach Entfernung von CytochalasinD; Vergrößerung: 1 : 400.

dargestellt ist, wird E-Selektin nach drei Stunden Erholungsphase in vollem Ausmaß in CytochalasinD-vorbehandelten Zellen exprimiert (Abbildung 14A), während statinvorbehandelte Endothelzellen zum selben Zeitpunkt noch keinerlei E-Selektin-Induktion nach TNF-Stimulation aufweisen (Abbildung 14B). Auf Grund dieser Befunde kann angenommen werden, dass die Hemmung der E-Selektin-Expression durch Statine nicht Folge statininduzierter aktinzytoskelettaler Umstrukturierungen ist, sondern über inhibitorische Beeinflussung TNF α -induzierter Signaltransduktionsmechanismen vermittelt wird. Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass bei „low-dose“-Statinbehandlungen der endothelialen Zellen keine Zytoskelettveränderungen detektierbar waren, obwohl bereits eine deutliche Hemmung der E-Selektin-Expression auftritt (Abbildung 12 und Abbildung 14C).

3.1.4 Einfluss von Statinen auf die TNF-Rezeptor-Expression in Endothelzellen

Neben einer Hemmung TNF α -induzierter Signalmechanismen als Ursache einer Inhibierung der E-Selektin-Expression wäre auch vorstellbar, dass Statine die TNF-Rezeptordichte auf der Endothelzelloberfläche reduzieren und damit die Zellen gegenüber einer TNF α -Wirkung desensibilisieren. Um auszuschließen, dass Statine über diesen Weg Einfluss auf die E-Selektin-Expression nehmen, wurde die Expression der zwei beschriebenen TNF-Rezeptoren TNF-R1 und TNF-R2 (Wajant et al., 2001; MacEwan, 2002) untersucht. Mit Hilfe einer auf ELISA basierenden Methode konnte gezeigt werden, dass TNF-R1 konstitutiv vorhanden ist und quantitativ weder durch TNF α - noch durch Lovastatinbehandlung beeinflusst wird (Abbildung 15A). Die TNF-R2-Konzentration hingegen ist nach TNF α -Behandlung um das Vierfache erhöht (Abbildung 15A). Eine Inkubation von Endothelzellen mit 20 μ M Lovastatin bewirkt eine Steigerung der TNF-R2-Expression ebenfalls um den Faktor vier (Abbildung 15A). TNF α in Kombination mit Lovastatin führt wie erwartet zu einer weiteren Steigerung der TNF-R2-Expression (Abbildung 15A). Die Induktion von TNF-R2 und die Tatsache, dass die TNF-R1-Expression von TNF α - und Lovastatinbehandlungen nicht verändert wird, konnte per FACS-Analyse bestätigt werden (Abbildung 15B, C).

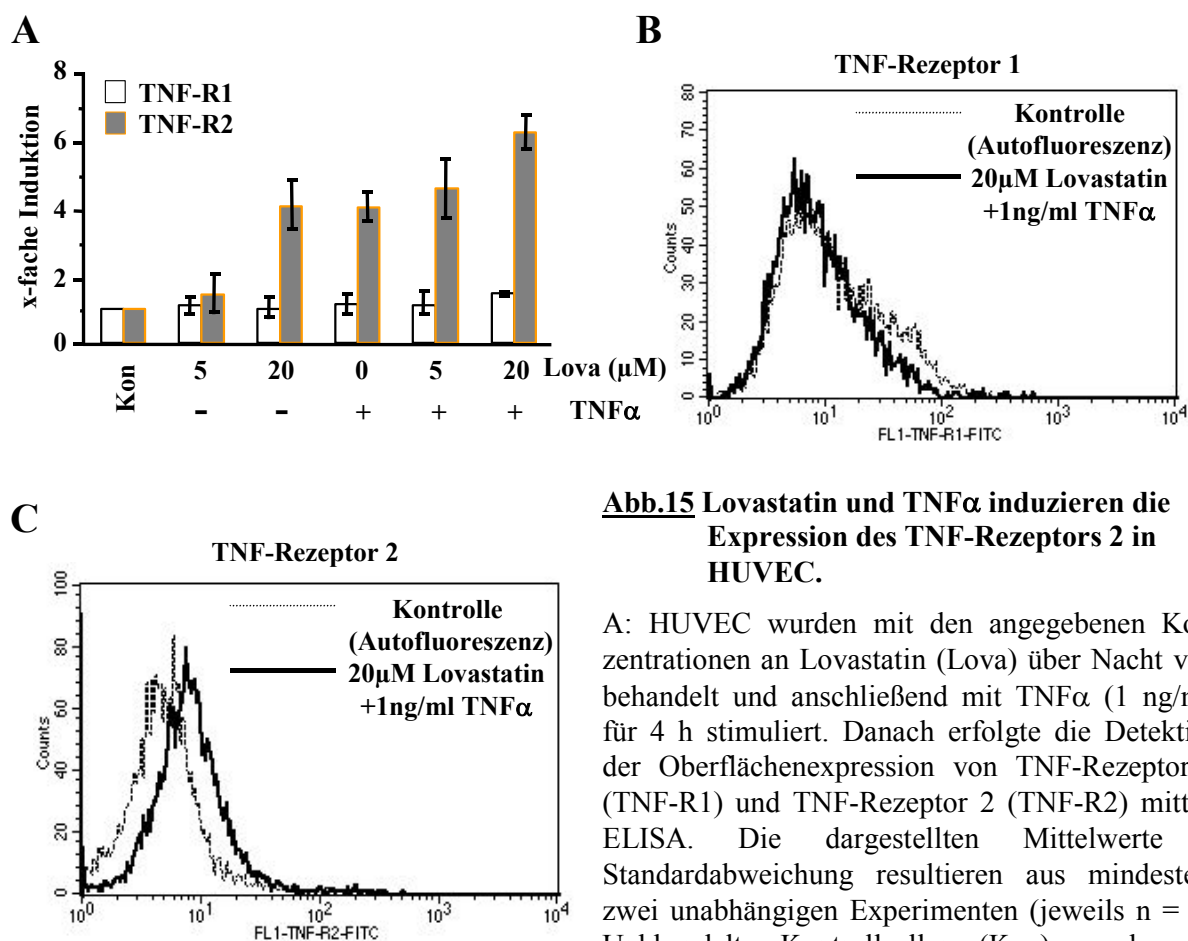
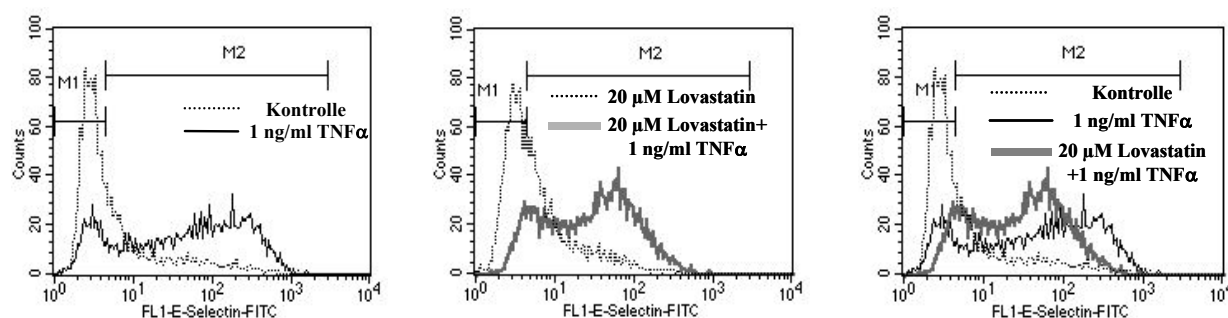


Abb.15 Lovastatin und $\text{TNF}\alpha$ induzieren die Expression des TNF-Rezeptors 2 in HUVEC.

A: HUVEC wurden mit den angegebenen Konzentrationen an Lovastatin (Lova) über Nacht vorbehandelt und anschließend mit $\text{TNF}\alpha$ (1 ng/ml) für 4 h stimuliert. Danach erfolgte die Detektion der Oberflächenexpression von TNF-Rezeptor 1 (TNF-R1) und TNF-Rezeptor 2 (TNF-R2) mittels ELISA. Die dargestellten Mittelwerte \pm Standardabweichung resultieren aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten (jeweils $n = 3$). Unbehandelte Kontrollzellen (Kon) wurden als Bezugswert gleich 1 gesetzt.

B, C: HUVEC wurden wie unter A beschrieben behandelt und per FACS analysiert. Repräsentative FACS-Resultate sind dargestellt. Kontrolle = Autofluoreszenz unbehandelter Zellen.

Die Fähigkeit von Lovastatin bei Konzentrationen größer als 5 μM TNF-R2 zu induzieren führt dazu, dass statinbehandelte Endothelzellen sensitiver auf $\text{TNF}\alpha$ reagieren. Dadurch kommt es nach $\text{TNF}\alpha$ -Stimulierung prozentual gesehen zu einer leichten Zunahme der Zahl E-Selektin-positiver Zellen in Statin-vorbehandelten Zellpopulationen (Abbildung 16A, B; Tabelle „%Gated“). Betrachtet man jedoch die mittlere Fluoreszenz der E-Selektin-positiven Zellen nach Lovastatin- und $\text{TNF}\alpha$ -Behandlung, so findet man die bereits in Abbildung 11 beschriebene Lovastatin-vermittelte Reduktion der E-Selektin-Expression pro Zelle (Abbildung 16C; Tabelle „%Gated“).



— 1 ng/ml TNF α				— 20 μ M Lovastatin+1 ng/ml TNF α			
Marker	Ereignisse	%Gated	MF	Marker	Ereignisse	%Gated	MF
All	9003	100.00	120.33	All	9003	100.00	49.30
M1	921	41.36	2.93	M1	921	22.34	3.57
M2	8108	58.64	144.43	M2	8108	77.66	54.35

Abb.16 Analyse des Einflusses von Lovastatin auf TNF α -induzierte E-Selektin-Expression in humanen Endothelzellen.

Subkonfluente HUVEC wurden mit Lovastatin (20 μ M, über Nacht) vorbehandelt und anschließend mit TNF α (1 ng/ml) stimuliert. 5 h später erfolgte die Inkubation mit anti-E-Selektin-Antikörper und die Analyse per FACS. M1 bezeichnet E-Selektin-negative, M2 E-Selektin-positive Zellen. %Gated = betrachtete Zellpopulation. MF = mittlere Fluoreszenz. Unbehandelte Zellen dienen als „Kontrolle“. A, B und C sind representative Ergebnisse aus mindestens 3 unabhängigen Messungen.

3.1.5 Beteiligung von Rho-GTPasen an der TNF α -induzierten E-Selektin-Expression

Es wird vermutet, dass die Hemmung der zytokinvermittelten E-Selektin-Expression durch Statine auf eine Blockierung der Lipidmodifikationen von Rho-GTPasen zurückzuführen ist (vgl. 3.1.2). Daher sollte aufgeklärt werden, welche Isoprenylierungen für die Zytokininduktion von E-Selektin essentiell sind. Abbildung 17A zeigt, dass Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) die Lovastatin-vermittelte Hemmung der E-Selektin-Expression nach TNF α -Exposition revertiert. Farnesylpyrophosphat (FPP) zeigt keine derartige Wirkung (Abbildung 17A). Darüber hinaus konnte mit Geranylgeranyltransferase-Inhibitor Typ I (GGTI), nicht aber mit dem Farnesyltransferase-Inhibitor (FTI), die Statinwirkung imitiert und die E-Selektin-Expression unterbunden werden (Abbildung 17B). Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass geranylgeranyierte Proteine für die zytokininduzierte E-Selektin-Expression essentiell sind.

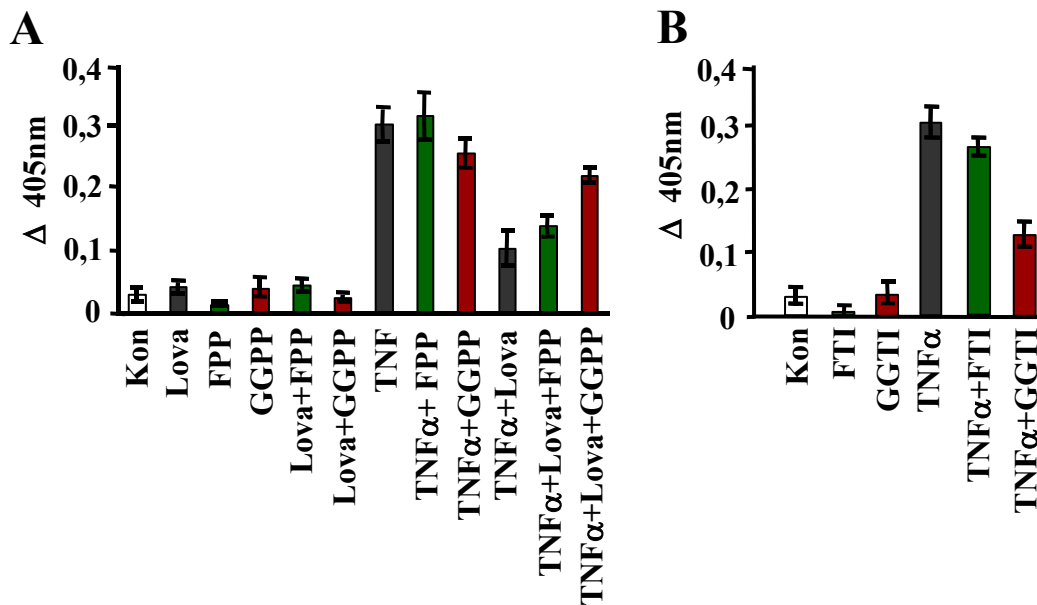


Abb.17 Geranylgeranylierte Proteine sind für die TNF α -vermittelte E-Selektin-Expression essentiell.

A: Subkonfluente EA.hy-926 wurden mit Lovastatin (Lova)(20 μ M, über Nacht) in An- oder Abwesenheit von GGPP (50 μ M) oder FPP (50 μ M) vorbehandelt. Anschließend erfolgte eine Stimulation der Zellen mit TNF α (100 ng/ml). Nach weiteren 5 h Inkubation wurde die E-Selektin-Proteinexpression mittels ELISA analysiert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (Kon). Die gezeigten Mittelwerte \pm Standardabweichung resultieren aus drei unabhängigen Experimenten (jeweils n = 3).

B: Endothelzellen, die für 72 h mit Farnesyltransferase-Inhibitor (FTI, 50 μ M) oder Geranylgeranyltransferase-Inhibitor Typ I (GGTI, 50 μ M) vorbehandelt waren, wurden 5 h mit TNF α (100 ng/ml) stimuliert und anschließend per ELISA auf die E-Selektin-Oberflächenexpression untersucht. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (Kon). Die gezeigten Mittelwerte \pm Standardabweichung resultieren aus drei unabhängigen Experimenten (jeweils n = 3).

Bakterielle Toxine aus verschiedenen Clostridien-Arten stellen Hemmstoffe von Rho-GTPasen dar, die durch kovalente Modifikation der kleinen G-Proteine letztendlich zu einer Hemmung der Rho-Effektorkopplung führen (Aktories et al., 1988). Das clostridiale Toxin A (ToxA) aus *Clostridium difficile*, welches spezifisch drei Vertreter (Rac1, Cdc42 und RhoA) der Rho-GTPasen-Familie hemmt (Genth et al., 1999), zeigte in HUVEC keinen Einfluss auf die TNF α -vermittelte E-Selektin-Genexpression (Abbildung 18B). Dementsprechend beeinflusst ToxA-vermitteltes, gleichzeitiges Ausschalten von RhoA, Rac und Cdc42 die E-Selektin-Oberflächenexpression nach TNF α -Stimulation nicht (Abbildung 18A).

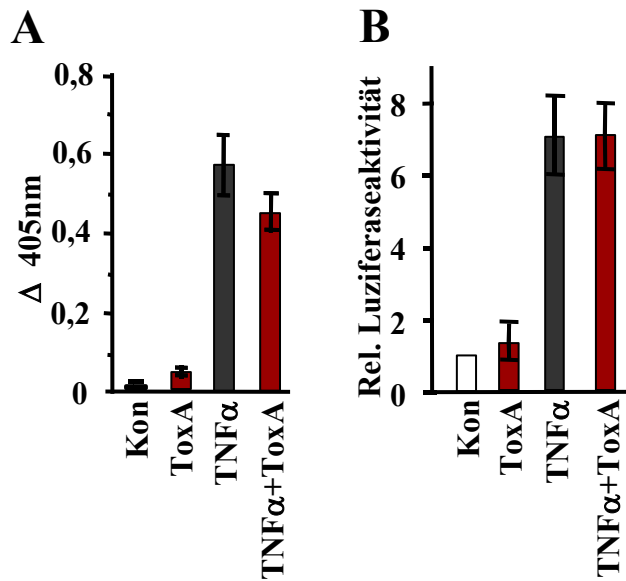


Abb.18 Einfluss von Rho-inaktivierendem Toxin A auf die TNF α -vermittelte E-Selektin-Expression.

A: Subkonfluente HUVEC wurden mit Toxin A (ToxA)(175 ng/ml) über Nacht vorbehandelt und anschließend mit TNF α (1 ng/ml) für 5 h stimuliert. Danach erfolgte die Analyse der E-Selektin-Oberflächenexpression mittels ELISA. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (Kon).

B: Subkonfluente HUVEC wurden mit dem E-Selektin-Promotor-Luziferasekonstrukt transfiziert und nach 24 h einer 16-stündigen Toxin A-Behandlung (ToxA)(175 ng/ml) unterzogen. Nach weiteren 12 h TNF α -Exposition wurde die Luciferaseaktivität bestimmt. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle (Kon).

Die in A und B dargestellten Werte sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten (jeweils n = 2).

Um eine mögliche Beteiligung von Rho-GTPasen bei der Regulation der E-Selektin-Induktion nach TNF α -Exposition auf andere Weise zu untersuchen, wurden dominant-negative Formen von RhoA, RhoB und Rac1 transient mit den E-Selektin-Promotor-Luziferasekonstrukten co-transfiziert. 16 Stunden später erfolgte die Detektion der Genaktivität von E-Selektin anhand der in den Zellen vorhandenen Luciferaseaktivität. Das spezifische, separate Ausschalten von RhoA, RhoB oder Rac1 führt zur Hemmung der TNF α -vermittelten E-Selektin-Genexpression in HUVEC (Abbildung 19). Dies bedeutet, dass die untersuchten Rho-GTPasen entscheidend an der Regulation des E-Selektin-Gens beteiligt sind.

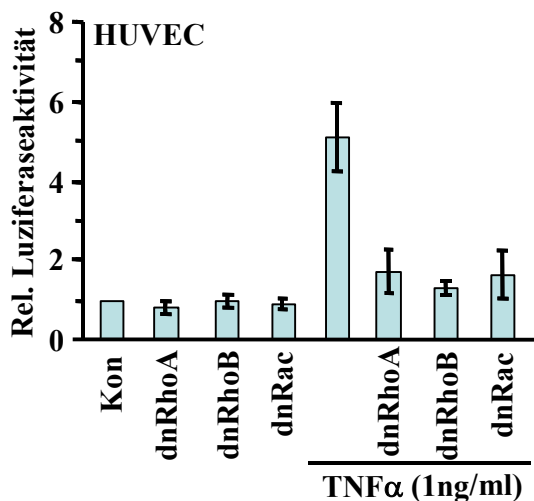


Abb.19 RhoA, RhoB und Rac1 sind für die TNF α -induzierte E-Selektin-Genexpression essentiell.

HUVEC wurden mit dem E-Selektin-Promotor-Luziferasekonstrukt sowie Expressionsvektoren für dominant-negatives RhoA (dnRhoA), dominant-negatives RhoB (dnRhoB) oder dominant-negatives Rac1 (dnRac) co-transfiziert. 16 h nach Transfektion wurden die Zellen für weitere 8 h mit TNF α (1 ng/ml) behandelt. Im Anschluss wurde die Luciferaseaktivität bestimmt. Die Luciferaseaktivität in der nicht mit dnRho-Mutanten co-transfizierten Kontrolle (Kon) wurde gleich 1 gesetzt. Dargestellte Mittelwerte \pm Standardabweichung stammen aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten (jeweils n = 2).

3.1.6 9-cis-Retinsäure hemmt die TNF α -induzierte E-Selektin-Expression

Mitte der 1990er Jahre wurden für die Retinsäure inhibitorische Effekte auf die zytokinvermittelte Expression von Adhäsionsmolekülen wie z.B. VCAM-1 nachgewiesen (Di Noto et al., 1996; Gille et al., 1997). Deshalb wurden die beiden häufigsten Derivate der Retinsäure, all-trans-Retinsäure (at-RA) und 9-cis-Retinsäure (9c-RA), bezüglich ihres Einflusses auf die TNF α -induzierte E-Selektin-Expression untersucht. Abbildung 20 zeigt, dass nur 9-cis- nicht jedoch all-trans-Retinsäure den Anstieg der E-Selektin-Proteinexpression nach TNF α -Behandlung von EA.hy-926-Zellen dosisabhängig verhindern kann (Abbildung 20A). Identische Ergebnisse wurden mit primären HUVEC erhalten (Abbildung 20B).

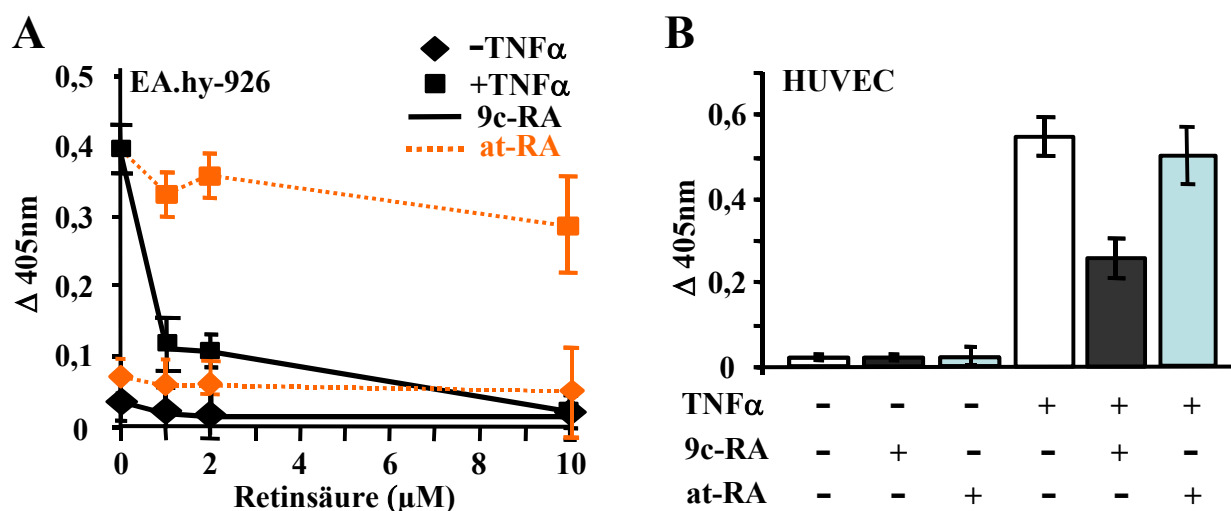


Abb.20 Wirkung von all-trans- (at-RA) und 9-cis-Retinsäure (9c-RA) auf die E-Selektin-Induktion durch TNF α in Endothelzellen.

Subkonfluente EA.hy-926 (A) bzw. HUVEC (B) wurden mit TNF α (100 ng/ml (A), 1 ng/ml (B)) und mit den angegebenen Konzentrationen (A) bzw. mit je 2 μ M (B) 9c-RA oder at-RA für 5 h behandelt. Im Anschluss erfolgte die Analyse der E-Selektin-Oberflächenexpression per ELISA. Die gezeigten Mittelwerte \pm Standardabweichung stammen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten (jeweils n = 3).

3.1.7 Lovastatin und 9-cis-Retinsäure hemmen Tumorzelladhäsion

Es wird angenommen, dass E-Selektin am Metastasierungsgeschehen beteiligt ist, indem es den Kontakt zwischen Selektinliganden-präsentierenden Tumorzellen und vaskulären Endothelzellen vermittelt (Krause und Turner, 1999). Es stellte sich demnach die Frage, ob eine Hemmung der endothelialen E-Selektin-Expression eine Tumorzelladhäsion am Endothel zu verhindern vermag. Zu diesem Zweck wurde die Adhäsion fluoreszenzmarkierter humaner Kolonkarzinomzellen (DLD1) an einen entsprechend behandelten Endothelzellmonolayer untersucht. Wie in Abbildung 21A gezeigt, führt TNF α in konzentrationsabhängiger Weise zu einer Erhöhung der Tumorzelladhäsion von DLD1 an HUVEC. Bereits Konzentrationen von 0,1 - 1 μ M Lovastatin vermindern die zytokininduzierte Tumorzelladhäsion um 40 - 50 % (Abbildung 21B, D). Auch 9c-RA (2 μ M) führt zu einer massiven Hemmung der Tumorzelladhäsion, während at-RA keinerlei inhibitorischen Effekt aufweist (Abbildung 21C). Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass eine durch Lovastatin- oder 9-cis-Retinsäure-Behandlung reduzierte Induktion TNF α -vermittelter E-Selektin-Expression mit einer verminderten Tumorzelladhäsion einhergeht. Die basale Tumorzelladhäsion wird weder durch Lovastatin (Abbildung 21D) noch durch 9c-RA beeinflusst.

Um zu untersuchen, ob die durch Statine vermittelte Reduktion der Tumorzelladhäsion primär auf einer verminderten E-Selektin-Expression beruht, oder ob auch die Expressionshemmung anderer Adhäsionsmoleküle hierzu beiträgt, wurde der Effekt von TNF α und Lovastatin exemplarisch auf P-Selektin- und ICAM-1-Expression in Endothelzellen untersucht. Unter den gewählten Bedingungen ist TNF α nicht in der Lage P-Selektin in HUVEC zu induzieren, während eine fünffache Induktion des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 beobachtet wird (Abbildung 22A). Niedrige Dosen von Lovastatin (0,1 μ M bzw. 1 μ M) beeinflussen die zytokininduzierte ICAM-1-Expression nicht (Abbildung 22A), obwohl unter diesen Bedingungen die TNF α -induzierte E-Selektin-Expression bereits sehr deutlich gehemmt wird (Abbildung 22A). Nur sehr hohe Statindosen (\geq 50 μ M) hemmen die ICAM-1-Expression um ca. 40 % (Abbildung 22B). Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Hemmung der Tumorzelladhäsion durch physiologisch relevante Konzentrationen an Lovastatin primär durch Herabsenkung der E-Selektin-Oberflächenexpression bedingt ist.

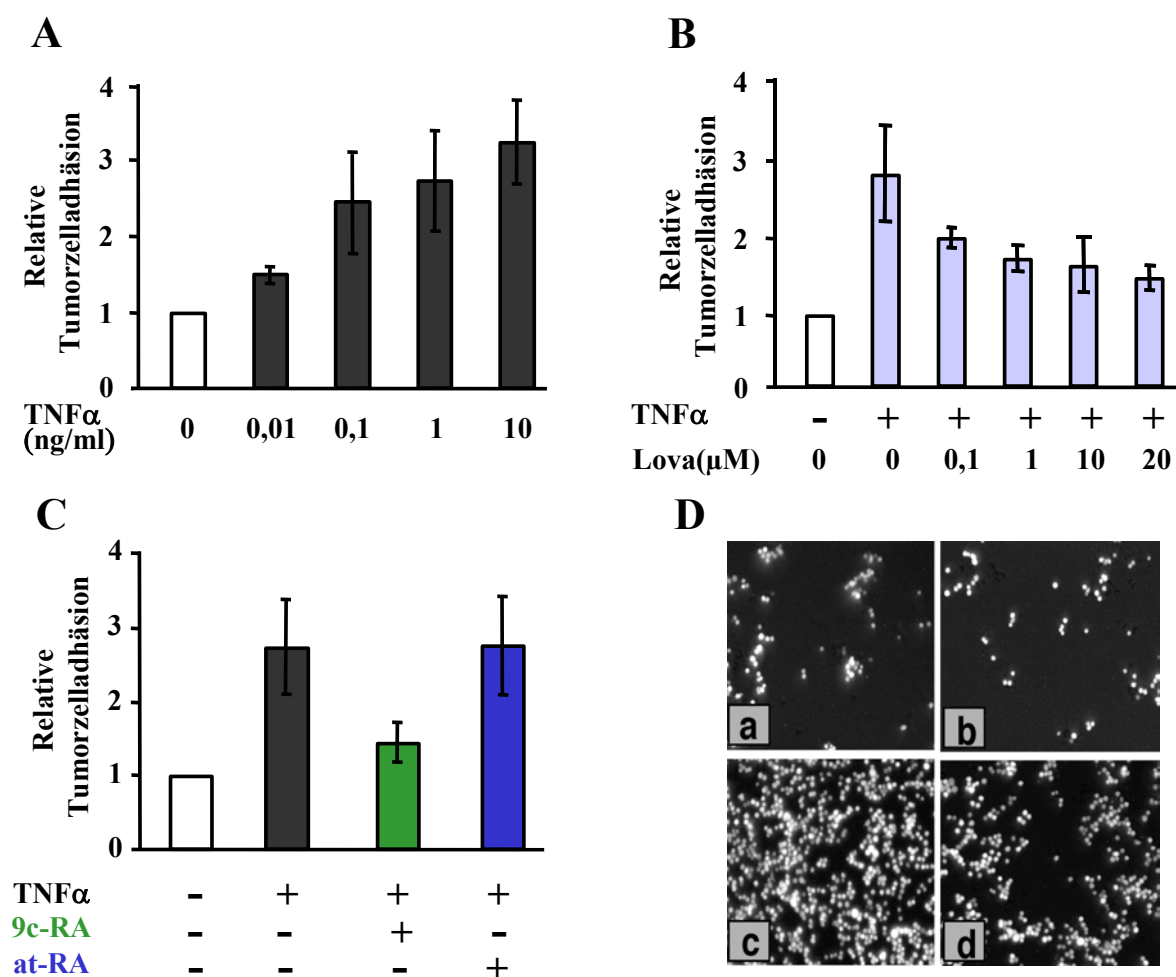


Abb.21 Lovastatin und 9-cis-Retinsäure hemmen die TNF α -induzierte Tumorzelladhäsion an HUVEC.

A: Konfluente HUVEC wurden mit den angegebenen Konzentrationen an TNF α behandelt. Nach 5 h wurden 5×10^5 fluoreszenzmarkierte Kolonkarzinomzellen (DLD1) auf die Endothelzellen gegeben und nach weiteren 2 h wurde die Tumorzelladhäsion photometrisch quantifiziert. Die Fluoreszenz adhärerter DLD1 an unbehandelte Endothelzellen wurde als Bezugswert gleich 1 gesetzt.

B: Konfluente HUVEC wurden 24 h mit den angegebenen Lovastatinkonzentrationen (Lova) vorbehandelt und anschließend für 5 h mit TNF α (1 ng/ml) stimuliert. Die Adhäsion fluoreszenzmarkierter DLD1 erfolgte in weiteren 2 h und die Detektion wie unter A beschrieben.

C: Konfluente HUVEC wurden 5 h mit TNF α (1 ng/ml) allein oder in Kombination mit 9-cis- (9c-RA)(2 μ M) oder all-trans-Retinsäure (at-RA)(2 μ M) behandelt und anschließend mit fluoreszierenden DLD1-Zellen für 2 h inkubiert. Die Adhäsion der Tumorzellen an die Endothelien wurde wie unter A beschrieben quantifiziert.

D: Illustration des inhibitorischen Effektes von Lovastatin auf die TNF α -induzierte Adhäsion von DLD1 an HUVEC. a: unstimulierte HUVEC+DLD1; b: Lovastatin-vorbehandelte HUVEC+DLD1; c: TNF α -stimulierte HUVEC+DLD1; d: Lovastatin-vorbehandelte, TNF α -stimulierte HUVEC+DLD1; Vergrößerung: 1 : 400. Gezeigte Mittelwerte \pm Standardabweichung (A, B, C) stammen aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten (jeweils n = 3).

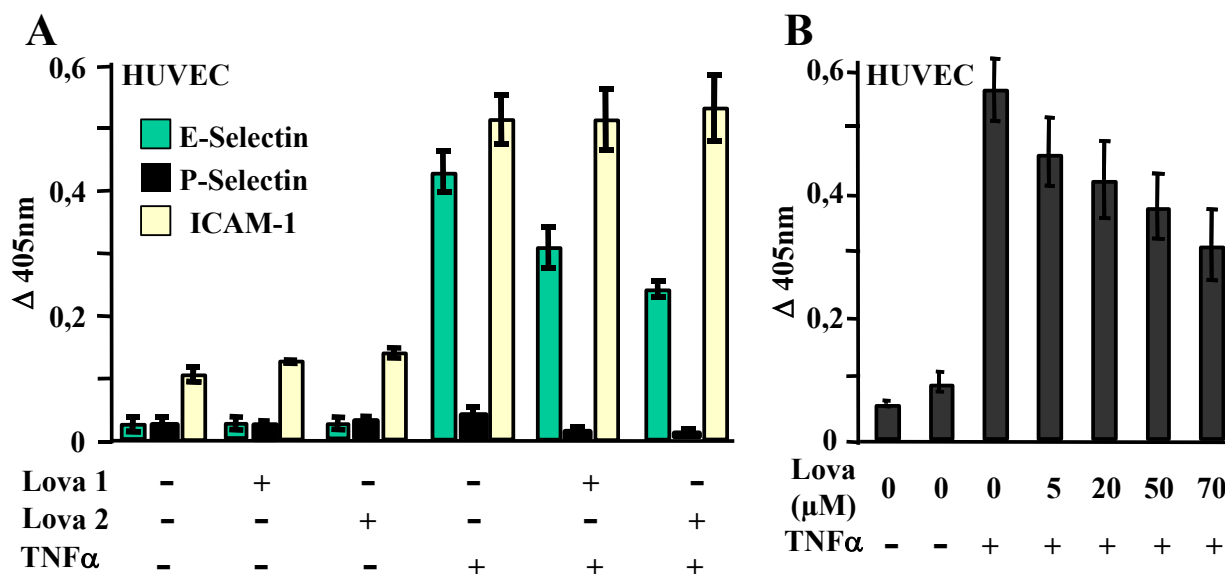


Abb.22 Effekt von TNFα und Lovastatin auf ICAM-1- und P-Selektin-Expression in HUVEC.

A: Konfluente HUVEC wurden 24 h mit 0,1 μM (Lova 1) oder mit 1 μM Lovastatin (Lova 2) vorbehandelt und anschließend 5 h mit TNFα (10 pg/ml) stimuliert. Die Oberflächenexpression von E-Selektin, P-Selektin und ICAM-1 wurde per ELISA ermittelt. Mittelwerte ± Standardabweichung ergaben sich aus mindestens drei unabhängigen Experimenten (jeweils n = 3).

B: Hohe Lovastatin-Konzentrationen hemmen die TNFα-induzierte ICAM-1-Expression.

Konfluente HUVEC wurden 24 h mit angegebenen Konzentrationen an Lovastatin (Lova) vorbehandelt und im Anschluss mit TNFα (10 pg/ml) stimuliert. 5 h später erfolgte die Bestimmung der Oberflächenexpression von ICAM-1. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten (jeweils n = 3).

Ein bekannter Effekt von Statinen ist die Induktion der endothelialen NO-Synthase (eNOS) und damit eine Erhöhung der NO-Freisetzung in Endothelzellen (Dobrucki et al., 2001; Laufs et al., 2002). Eine veränderte Adhäsion von Leukozyten an das Gefäßendothel wurde als ein NO-vermitteltes Phänomen beschrieben (Benjamim et al., 2002, Hickey et al., 2001). Dementsprechend stellte sich die Frage, ob die beobachteten Statineffekte auf die Tumorzelladhäsion durch eine Induktion der NO-Synthase vermittelt sein könnten. Weder TNFα noch Lovastatin beeinflussen jedoch unter den gewählten Bedingungen die NO-Synthase in Endothelzellen (Abbildung 23). Dieses mit dem Griess-Assay, einer kolorimetrischen NO-Detektionsmethode, erhaltene Ergebnis (Abbildung 23A) konnte mit einem weiteren Nitrit-Nachweisverfahren (NO-Analyzer nach Sievers) bestätigt werden (Abbildung 23B). Es ist deshalb davon auszugehen, dass der beschriebene Effekt von Lovastatin, TNFα-induzierte Tumorzelladhäsion zu hemmen, unabhängig von NO-regulierten Mechanismen vermittelt ist.

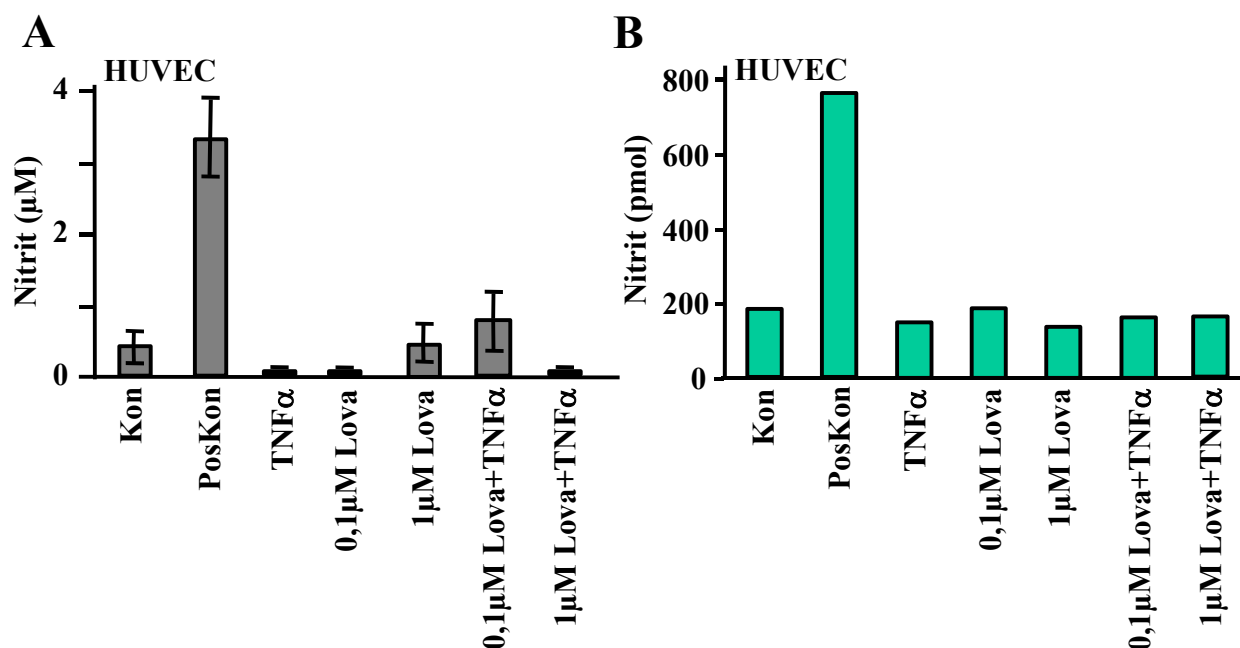


Abb.23 TNF α und Lovastatin haben keinen Einfluss auf die NO-Synthese in HUVEC.

Subkonfluente HUVEC wurden mit 0,1 μ M bzw. 1 μ M Lovastatin (Lova) 24 h vorbehandelt und anschließend 5 h mit TNF α (1 ng/ml) stimuliert. Der Mediumüberstand der Zellen wurde im Anschluss daran auf seinen Nitrit-Gehalt mit Hilfe des kolorimetrischen Griess-Assays (A) und mittels eines auf Chemilumineszenz basierenden NO-Analysators nach Sievers (B) vermessen. Mittelwerte \pm Standardabweichung in A basieren auf mindestens zwei unabhängigen Experimenten (jeweils n = 2). Die Werte in B sind Mittelwerte von Doppelbestimmungen. Als Positivkontrolle (PosKon) wurden HUVEC mit einem Zytokin-Mix aus INF γ (10 U/ml), TNF α (1 ng/ml) und IL-1 α (1 ng/ml) für 5 h behandelt.

3.1.8 Hemmung der E-Selektin-Expression führt zu verminderter Tumorzelladiapedese

Die oben dargestellten Ergebnisse führen zu der Frage, ob eine Verminderung der Adhäsion von Tumorzellen auch eine verminderte Transmigration durch endotheliale Barrieren zur Folge hat. Um dies zu überprüfen, wurde mit Hilfe eines *in vitro*-Zell-Invasions-Assays die Diapedeserate von HT-29-Kolonkarzinomzellen durch endotheliale Monolayer bestimmt. TNF α -Behandlung (1 ng/ml) eines endothelialen Zellmonolayers führt zu einer um ca. den Faktor 10 gesteigerten Transmigration von Tumorzellen (Abbildung 24A). Diese zytokinstimulierte Tumorzell-Diapedeserate lässt sich konzentrationsabhängig durch Lovastatinvorbehandlung des endothelialen Monolayers vermindern (Abbildung 24A). Bereits 1 μ M Lovastatin vermindert die Tumorzell-Transmigration um 60 - 70 % (Abbildung 24A). 9c-RA vermindert ebenso wie at-RA die Diapedeserate der HT-29-Tumorzellen nahezu auf Basalniveau (Abbildung 24B). Die Hemmung zytokinvermittelter E-Selektin-Expression durch Lovastatin und Retinsäure korreliert dementsprechend nicht nur mit einer verminderten

Tumorzelladhäsion an das Endothel, sondern auch mit einer geringeren Tumorzell-Diapedeserate.

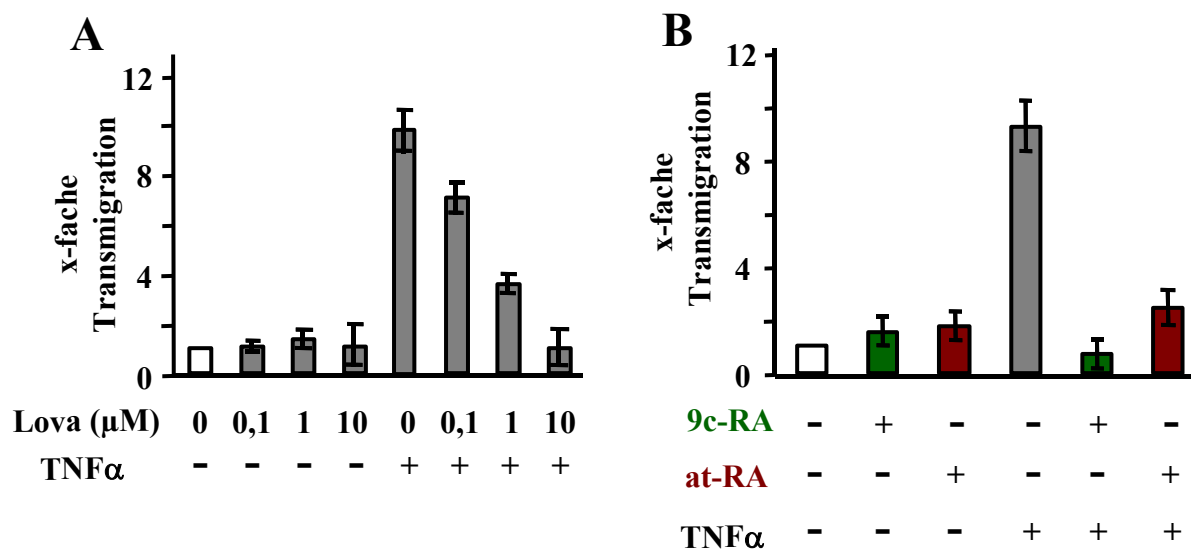


Abb.24 Lovastatin und Retinsäure hemmen die Diapedese von Tumorzellen durch TNF α -stimulierte Endothelzellmonolayer.

A: Konfluente HUVEC wurden mit den angegebenen Lovastatin-Konzentrationen für 24 h vorbehandelt und anschließend 4 h mit TNF α (1 ng/ml) stimuliert. Die so behandelten Endothelzellen wurden mit 3×10^5 HT-29-Zellen überschichtet und über Nacht bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Transmigrationsrate wie im Methodenteil beschrieben bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten (jeweils n = 3). Die spontane Transmigration der HT-29-Zellen durch unbehandelte Endothelzellen wurde als Bezugswert gleich 1 gesetzt.

B: Konfluente HUVEC wurden für 3 h mit TNF α (1 ng/ml) stimuliert. Unmittelbar nach TNF α -Zugabe zum Medium erfolgte die Behandlung mit 9-cis- (9c-RA)(2 µM) oder all-trans-Retinsäure (at-RA)(2 µM). Im Anschluss wurden die so behandelten Endothelzellen mit 3×10^5 HT-29-Zellen überschichtet und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Transmigrationsrate wurde wie im Methodenteil beschrieben bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten (jeweils n = 3). Die spontane Diapedese der HT-29-Zellen durch unbehandelte Endothelzellmonolayer wurde als Bezugswert gleich 1 gesetzt.

3.2 Ionisierende γ -Strahlung induziert E-Selektin in humanen Endothelzellen

Verschiedenste Agenzien wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit getestet, E-Selektin-Expression in humanen Endothelzellen (HUVEC und EA.hy-926) zu induzieren. Neben Zytokinen (vgl. Kap 3.1ff) ist unter anderem γ -Strahlung in der Lage, die endotheliale E-Selektin-Expression zu stimulieren (Tabelle 3). Abbildung 25 zeigt, dass Bestrahlung von HUVEC (Abbildung 25A) und EA.hy-926 (Abbildung 25B) mit ionisierender γ -Strahlung dosisabhängig zu einem Anstieg der E-Selektin-Oberflächenexpression führt. Interessanterweise ist schon bei niedrigen Strahlendosen von 2 Gray (Gy) eine deutliche E-Selektin-Proteinexpression detektierbar (Abbildung 25A, B). Semiquantitative RT-PCR-Analysen ergaben, dass nach IR-Behandlung von Endothelzellen erhöhte Mengen an E-Selektin-mRNA vorliegen (Abbildung 25C). Die Verwendung des E-Selektin-Promotor-Luziferasekonstrukts im Rahmen von

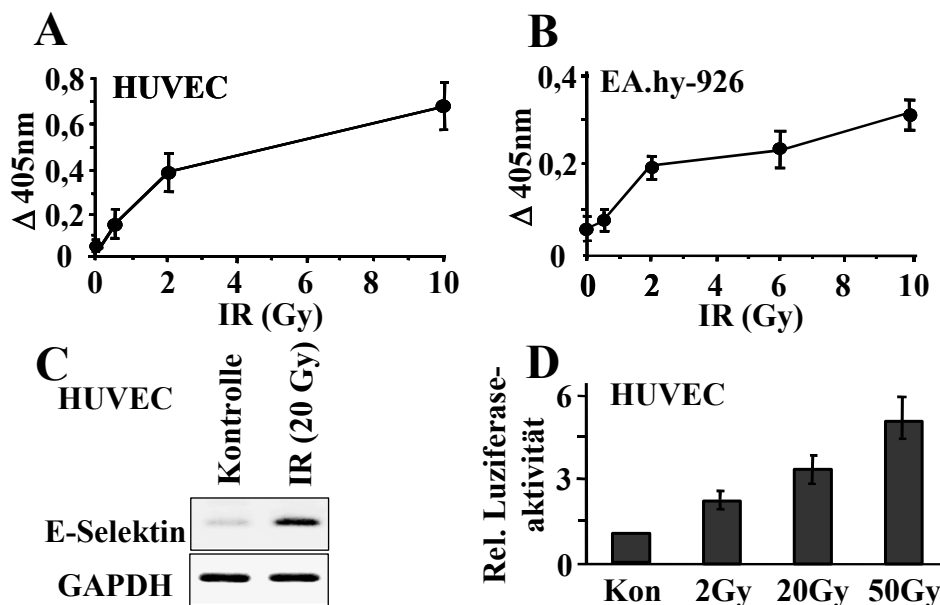


Abb.25 Ionisierende Strahlung induziert E-Selektin-Expression in humanen Endothelzellen.

A, B: 5 h nach Exposition der Endothelzellen (HUVEC (A) und EA.hy-926 (B)) mit den angegebenen Dosen ionisierender Strahlung (IR) wurde die E-Selektin-Proteinexpression mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten (jeweils $n = 3$).

C: Subkonfluente HUVEC wurden mit 20 Gy bestrahlt und 45 min später die Gesamt-RNA isoliert. Die E-Selektin-mRNA-Expression wurde mittels semiquantitativer RT-PCR analysiert, wobei GAPDH als interner Standard verwendet wurde.

D: Endothelzellen (HUVEC) wurden mit dem E-Selektin-Promotor-Luziferasekonstrukt transfiziert, 24 h später mit den angegebenen Dosen IR behandelt und weitere 12 h später die Luziferaseaktivität ihrer Zelllysate bestimmt. Die Luziferaseaktivität in unbehandelten, transfizierten Zellen wurde gleich 1 gesetzt. Die dargestellten Mittelwerte \pm Standardabweichung stammen aus drei unabhängigen Experimenten (jeweils $n = 2$).

Reportergenanalysen (vgl. Kapitel 3.1.1; Abbildung 8A) führte zu dem Ergebnis, dass ionisierende Strahlung die Genexpression des Adhäsionsmoleküls E-Selektin in Endothelzellen aktiviert (Abbildung 25D).

3.2.1 γ -Strahlung vermittelt E-Selektin-Expression in Endothelzellen über den PI-3-Kinase-Signalweg

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B spielt sowohl bei zytokininduzierter (Schindler und Baichwal, 1994; Whitley et al., 1994) als auch bei strahlenvermittelter E-Selektin-Expression (Hallahan et al., 1998) in Endothelzellen eine entscheidende Rolle. Über die dem NF- κ B vorgeschaltete „up-stream“-Signaltransduktion sind bisher keine Daten verfügbar. Deshalb wurden subkonfluente HUVEC mit Wortmannin oder PD98059 behandelt und nach γ -Bestrahlung auf Proteinexpression von E-Selektin per ELISA vermessen. In Abbildung 26 ist deutlich zu erkennen, dass der Phosphatidylinositol-3-Phosphat (PI-3)-Kinase-Inhibitor Wortmannin die strahleninduzierte E-Selektin-Expression vollständig hemmt, während eine Blockade der MEK1/2-vermittelten Signalwege durch den Hemmstoff PD98059 keinerlei Auswirkung auf die E-Selektin-Induktion hat (Abbildung 26). Es ist daher davon auszugehen, dass Röntgenstrahlung unter anderem durch Aktivierung des PI-3-Kinase-Signaltransduktionsweges die E-Selektin-Expression in Endothelzellen induziert.

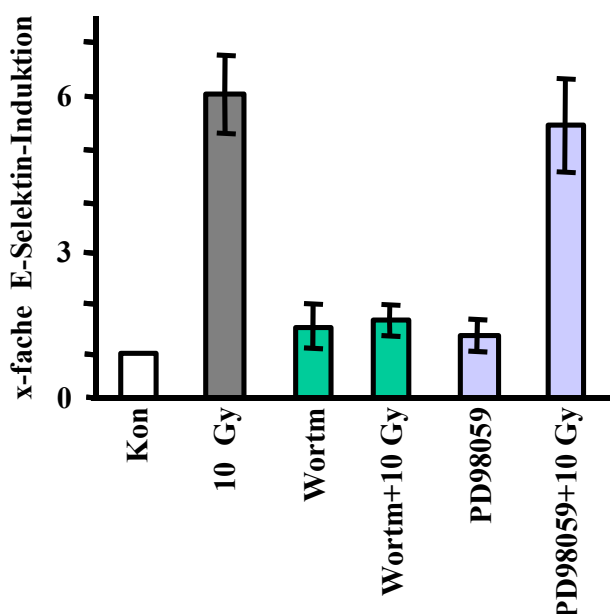


Abb.26 IR vermittelt E-Selektin-Expression durch Aktivierung des PI-3-Kinase-Signalweges.

Subkonfluente HUVEC wurden mit PI-3-Kinase-Inhibitor Wortmannin (Wortm)(100 nM) bzw. mit MEK1/2-Inhibitor PD98059 (50 μ M) für 3 h behandelt und im Anschluss mit 10 Gy IR bestrahlt. Nach weiteren 4 h wurde die E-Selektin-Oberflächenexpression mittels ELISA bestimmt. Die basale E-Selektin-Oberflächenexpression (Kon) wurde als Bezugswert gleich 1 gesetzt. Die gezeigten Mittelwerte \pm Standardabweichung ergaben sich aus zwei unabhängigen Experimenten (jeweils n = 2).

3.2.2 Hemmung der NF- κ B-Aktivierung durch Lovastatin blockiert γ -Strahlen-induzierte E-Selektin-Expression in humanen Endothelzellen

Die Tatsache, dass Statine im Fall der zytokinvermittelten Induktion von E-Selektin potente Inhibitoren darstellen (vgl. Kapitel 3.1.2) und ihre Eigenschaft die Aktivierung des nuklearen Faktors κ B zu verhindern (Gnad et al., 2001) legen nahe, ihre Wirkung auch auf die strahleninduzierte E-Selektin-Expression zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde der Einfluss von Lovastatin auf die Aktivierung von NF- κ B durch IR mit Hilfe eines phosphospezifischen I κ B- α -Antikörpers näher betrachtet. Die Phosphorylierung von I κ B- α an Serin 32 ist ein direktes Maß für die NF- κ B-Aktivierung. Lovastatin ist in der Lage, die γ -strahlenvermittelte Phosphorylierung von I κ B- α und damit die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B zu hemmen (Abbildung 27A). Weiterhin führt eine Vorbehandlung von Endothelzellen mit Lovastatin zur Hemmung der E-Selektin-Genexpression nach IR-Behandlung, was mittels Reportergenanalysen gezeigt werden konnte (Abbildung 27B). Wie auf Grund dieser Befunde zu erwarten, wird auch die strahleninduzierte Expression der E-Selektin-mRNA (Abbildung 27C) sowie des E-Selektin-Proteins (Abbildung 27D) durch Lovastatinvorbehandlung in Endothelzellen vermindert.

Alle Daten zusammengenommen zeigen, dass Statine auch sehr potente Inhibitoren der strahleninduzierten E-Selektin-Expression in Endothelzellen darstellen. Sie entfalten ihre inhibitorischen Eigenschaften unter anderem durch Hemmung der durch γ -Strahlen hervorgerufenen Aktivierung von NF- κ B. Eine Beeinflussung anderer Signaltransduktionsmoleküle wie z.B. Akt-Kinase (vgl. Kapitel 3.2.3) könnte durchaus ebenfalls zu der beschriebenen Wirkung von Statinen beitragen.

Wie in Kapitel 3.1 erwähnt, ist eine Aktivierung von NF- κ B durch genotoxische Noxen nicht ausreichend, um E-Selektin-Expression in Endothelzellen zu induzieren (Abbildung 10). Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass eine durch TNF α -Behandlung ($\geq 0,5$ ng/ml) maximal erreichte E-Selektin-Expression in Endothelzellen durch Bestrahlung mit IR (2 Gy) weiter gesteigert werden kann (Abbildung 28). Es findet sich ein nahezu additiver Effekt, der vermuten lässt, dass strahleninduzierte und zytokinvermittelte E-Selektin-Geninduktion auf unterschiedliche Art und Weise reguliert sind.

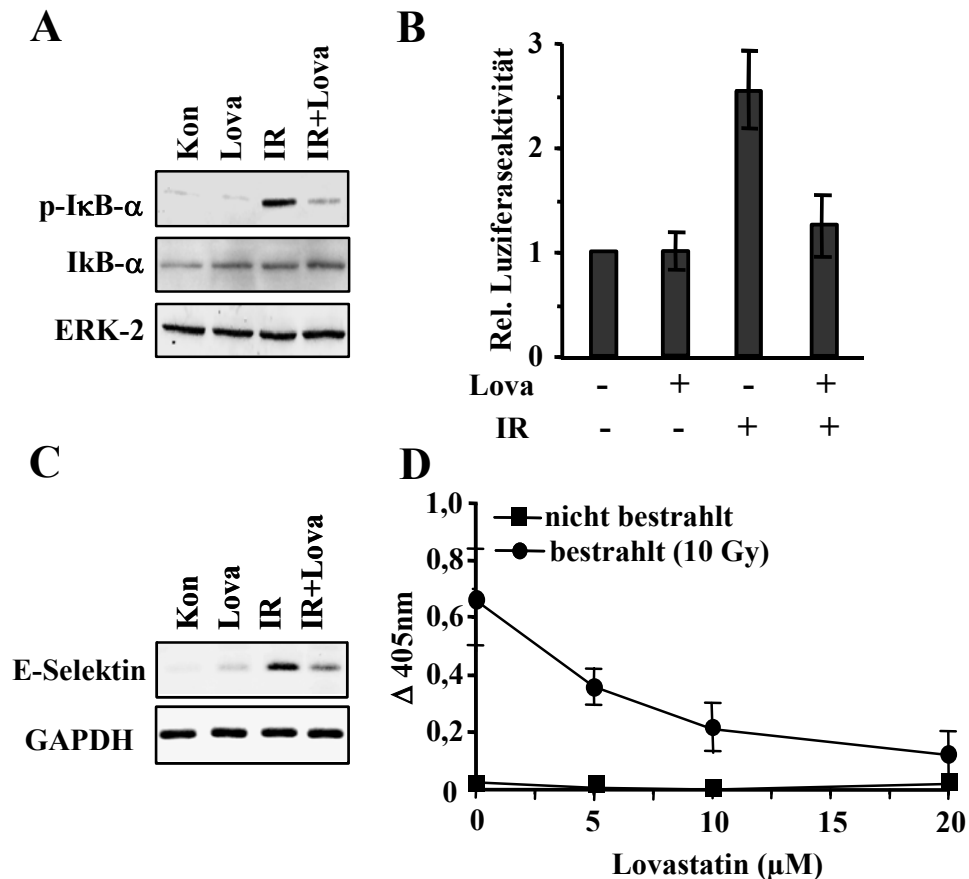


Abb.27 Lovastatin hemmt die IR-induzierte E-Selektin-Protein- und -Genexpression.

A: 15 min nach Bestrahlung (20 Gy) Lovastatin-vorbehandelter (Lova)(20 μM) oder unbehandelter HUVEC (Kon) wurde der Phosphorylierungsstatus von IκB-α mit Hilfe eines phosphospezifischen Antikörpers (Ser32) bestimmt. Phosphorylierung an dieser Position korreliert mit NF-κB-Aktivierung. Zur Kontrolle wurde der Blot mit IκB-α- und ERK-2-Antikörpern rehybridisiert.

B: Mit dem E-Selektin-Promotor-Luziferasekonstrukt transfizierte HUVEC wurden mit Lovastatin (20 μM, über Nacht) vorbehandelt und anschließend mit IR (20 Gy) stimuliert. 16 h später erfolgte die Bestimmung der Luziferaseaktivität in den Zelllysaten. Die Luziferaseaktivität unbehandelter, transfizierter HUVEC wurde als Bezugswert gleich 1 gesetzt. Gezeigt sind Mittelwerte ± Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten (jeweils n = 2).

C: Subkonfluente HUVEC wurden mit Lovastatin (20 μM, über Nacht) vorbehandelt und mit 20 Gy bestrahlt. 45 min später erfolgte die Isolierung der Gesamt-RNA. Die E-Selektin-mRNA-Expression wurde mittels semiquantitativer RT-PCR analysiert, wobei GAPDH als interner Standard gesehen wurde.

D: HUVEC wurden über Nacht mit den angegebenen Lovastatinkonzentrationen vorbehandelt und 5 h nach Bestrahlung (10 Gy) mittels ELISA auf E-Selektin-Oberflächenexpression analysiert. Die gezeigten Mittelwerte ± Standardabweichung stammen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten (jeweils n = 3).

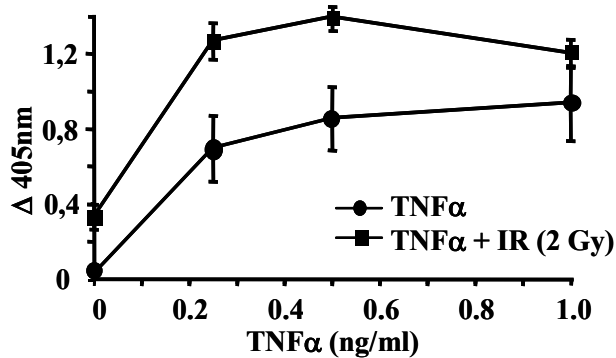


Abb.28 IR potenziert die stimulierende Wirkung von TNF α auf E-Selektin-Expression in humanen Endothelzellen.

Subkonfluente HUVEC wurden mit den angegebenen Konzentrationen an TNF α behandelt und sofort im Anschluss mit IR (2 Gy) bestrahlt. 5 h später wurde die E-Selektin-Oberflächenexpression mittels ELISA analysiert. Gezeigte Mittelwerte \pm Standardabweichung stammen aus zwei unabhängigen Experimenten (jeweils n = 3).

3.2.3 Lovastatin beeinflusst γ -Strahlen-induzierte E-Selektin-Expression durch Hemmung von Rho-Proteinen und Inhibierung der Akt-Kinase

Es stellt sich die Frage, wie Statine Einfluss auf die NF- κ B-Aktivierung und die E-Selektin-Expression nach γ -Strahlenexposition nehmen. Um herauszufinden, ob von Statinen beeinflusste Rho-GTPasen (vgl. Kapitel 3.1.2) bei der strahleninduzierten E-Selektin-Expression von Bedeutung sind, wurde der Effekt des *Clostridium difficile* Toxins A (ToxA) und der Co-Expression von dominant-negativen Rho-Proteinen auf die E-Selektin-Expression in Endothelzellen nach γ -Strahlen-Behandlung untersucht. Wie in Abbildung 29 gezeigt, hemmt ToxA die strahleninduzierte E-Selektin-Protein- (Abbildung 29A) und -Genexpression (Abbildung 29B). Desweiteren zeigte sich, dass spezifisches Ausschalten der Rho-Proteine RhoB oder Rac1 durch Co-Transfektion ihrer dominant-negativer (dn) Formen zu vollständiger Blockierung der E-Selektin-Genexpression nach γ -Bestrahlung führt (Abbildung 29C). Spezifische Hemmung von RhoA hatte keinerlei Einfluss (Abbildung 29C). Dies führt zu der Annahme, dass auch bei strahlenvermittelter E-Selektin-Genexpression Rho-GTPasen, insbesondere RhoB und Rac1, essentiell sind.

Auf Grund der in Abbildung 26 dargestellten Befunde, kann angenommen werden, dass Röntgenstrahlung die E-Selektin-Expression unter anderem durch Aktivierung der PI-3-Kinase vermittelt. Um zu untersuchen, ob Statine Einfluß auf die strahlenvermittelte Aktivierung dieser oder anderer Kinasen nehmen, wurde in Western-Blot-Analysen bestrahlter HUVEC die Wirkung von Lovastatin auf die Aktivität der PI-3-Kinase und der MAP-Kinase ERK-2 untersucht. Hierzu wurde zum einen der Phosphorylierungszustand der Akt-Kinase, eines direkten Effektors der Phosphatidylinositol-3-Phosphat-Kinase, mit einem phosphospezifischen Antikörper bestimmt. Zum anderen erfolgte ebenfalls mittels

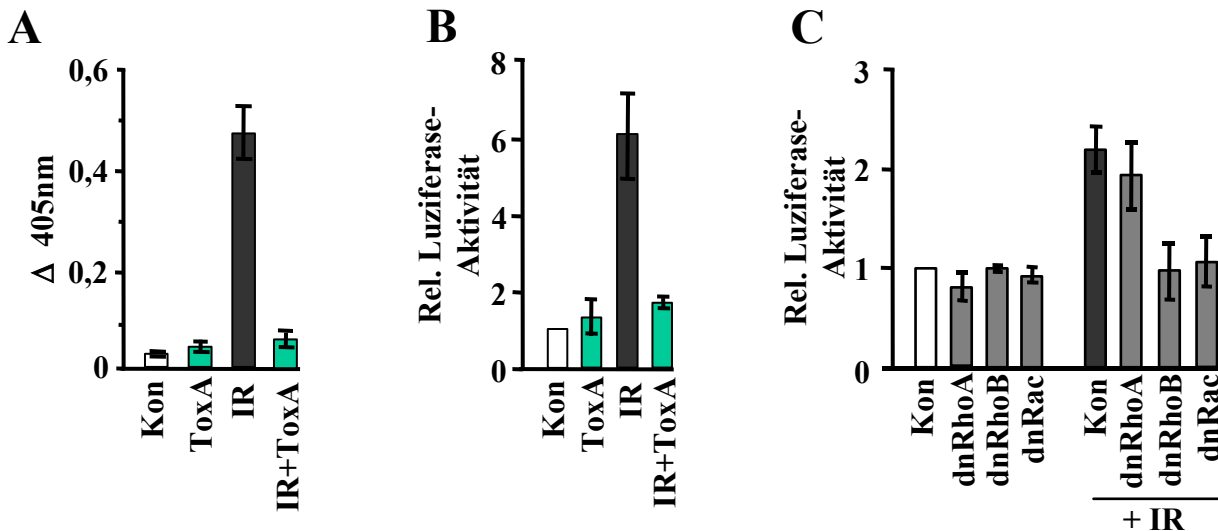


Abb.29 Rho-GTPasen sind für die Aktivierung der E-Selektin-Genexpression nach IR-Exposition essentiell.

A: Humane Endothelzellen (HUVEC) wurden über Nacht mit Rho-inaktivierendem clostridialen Toxin A (ToxA)(175 ng/ml) vorbehandelt. 5 h nach IR-Behandlung (2 Gy) wurde die E-Selektin-Oberflächenexpression mittels ELISA analysiert. Kon bezeichnet die basale E-Selektin-Expression un behandelter Zellen. Gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten (jeweils n = 3).

B: 24 h nach Transfektion von humanen Endothelzellen (EA.hy-926) mit dem E-Selektin-Promotor-Luziferasekonstrukt wurden diese mit ToxA (175 ng/ml, über Nacht) vorbehandelt und im Anschluss mit 10 Gy stimuliert. Nach 16 h wurden die Zellen lysiert und auf Luziferaseaktivität analysiert. Die basale Luziferaseaktivität un behandelter Zellen wurde als Bezugswert gleich 1 gesetzt. Die gezeigten Mittelwerte \pm Standardabweichung ergeben sich aus mindestens drei unan hängigen Experimenten (jeweils n = 3).

C: Endothelzellen (HUVEC) wurden mit dem E-Selektin-Promotor-Luziferasekonstrukt zusammen mit Expressionsvektoren für dominant-negative Formen der Rho-GTPasen RhoA (dnRhoA), RhoB (dnRhoB) und Rac1 (dnRac1) co-transfiziert. Nach Über-Nacht-Inkubation erfolgte die Behandlung mit 2 Gy. Nach weiteren 16 h wurden die Zelllysate bezüglich ihrer Luziferaseaktivität analysiert. Die relative Luziferaseaktivität in Luziferase-transfizierten, aber un behandelten Zellen (Kon) wurde gleich 1 gesetzt. Gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten (jeweils n = 2).

phosphospezifischem Antikörper die Analyse des Phosphorylierungszustands der ERK-2. Abbildung 30A zeigt, dass ionisierende Strahlung in Endothelzellen die Phosphorylierung der Akt-Kinase stimuliert. Behandlung der Zellen mit Lovastatin hat eine deutlich verminderte Aktivierung des PI-3-Kinase-Effektors zur Folge (Abbildung 30A). Abbildung 30B bestätigt die Aussage von Abbildung 26: mitogen aktivierbare Proteinkinasen wie z.B. ERK-2 werden durch γ -Strahlen in HUVEC nicht aktiviert. Darüber hinaus führt Lovastatin basal zu einem reduzierten Phosphorylierungszustand der ERK-2 (Abbildung 30B).

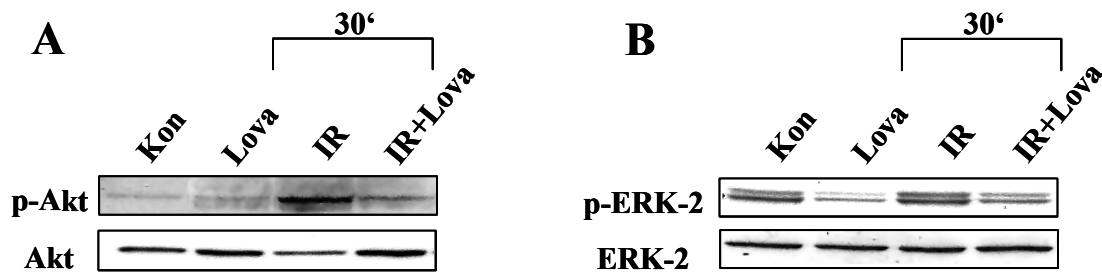


Abb.30 Lovastatin hemmt die strahleninduzierte Aktivierung der Akt-Kinase.

A, B: Subkonfluente humane Endothelzellen (HUVEC) wurden mit Lovastatin (20 μ M, über Nacht) vorbehandelt und anschließend bestrahlt (10 Gy). Nach 30 min erfolgte die Analyse des Phosphorylierungsstatus der Akt-Kinase (A) und ERK-2 (B) in den Zelllysaten mittels Western-Blot-Analyse unter Verwendung phosphospezifischer Antikörper. Zur internen Kontrolle wurden die Filter mit anti-Akt- bzw. anti-ERK-2-Antikörpern rehybridisiert. Gezeigt sind repräsentative Ergebnisse.

3.2.4 All-trans-Retinsäure hemmt durch Beeinflussung von NF- κ B und AP-1 γ -Strahlen-induzierte E-Selektin-Expression in Endothelzellen

Aus Literaturdaten geht hervor, dass Retinsäurederivate mit dem Transkriptionsfaktor NF- κ B (Na et al., 1998; Na et al., 1999) und anderen stressinduzierbaren Transkriptionsfaktoren wie AP-1 (Zhou et al., 1999; Manna und Aggarwal, 2000; Benkoussa et al., 2002) interagieren können und dadurch Einfluss auf deren Aktivität nehmen. Es ist deshalb zu vermuten, dass Retinsäure bei strahleninduzierter E-Selektin-Expression regulierend eingreifen könnte. Wie Abbildung 31 zeigt, ist das all-trans-Isomer der Retinsäure in der Lage, in Endothelzellen die strahleninduzierte E-Selektin-Protein- (Abbildung 31A), -mRNA- (Abbildung 31B) und -Genexpression (Abbildung 31C) zu hemmen, während das 9-cis-Isomer keinerlei inhibitorische Wirkung zeigt.

Um die Frage zu beantworten, ob all-trans-Retinsäure über Interaktionen mit NF- κ B oder anderen Transkriptionsfaktoren wie AP-1 die E-Selektin-Synthese nach γ -Bestrahlung verhindert, wurden Studien unter Verwendung von NF- κ B- und AP-1-Minimalpromotoren durchgeführt. Promotorfragmente mit DNA-Bindestellen für NF- κ B und AP-1 kontrollieren in den verwendeten Reportergen-Konstrukten die Expression der Luziferase, welche somit als Reporter für die jeweilige Promotoraktivität fungiert. Abbildung 32A zeigt, dass ionisierende Strahlung dosisabhängig den Transkriptionsfaktor NF- κ B im endothelialen Zellsystem induzieren kann. Des Weiteren lässt sich zeigen, dass eine Behandlung mit 2 μ M 9-cis-

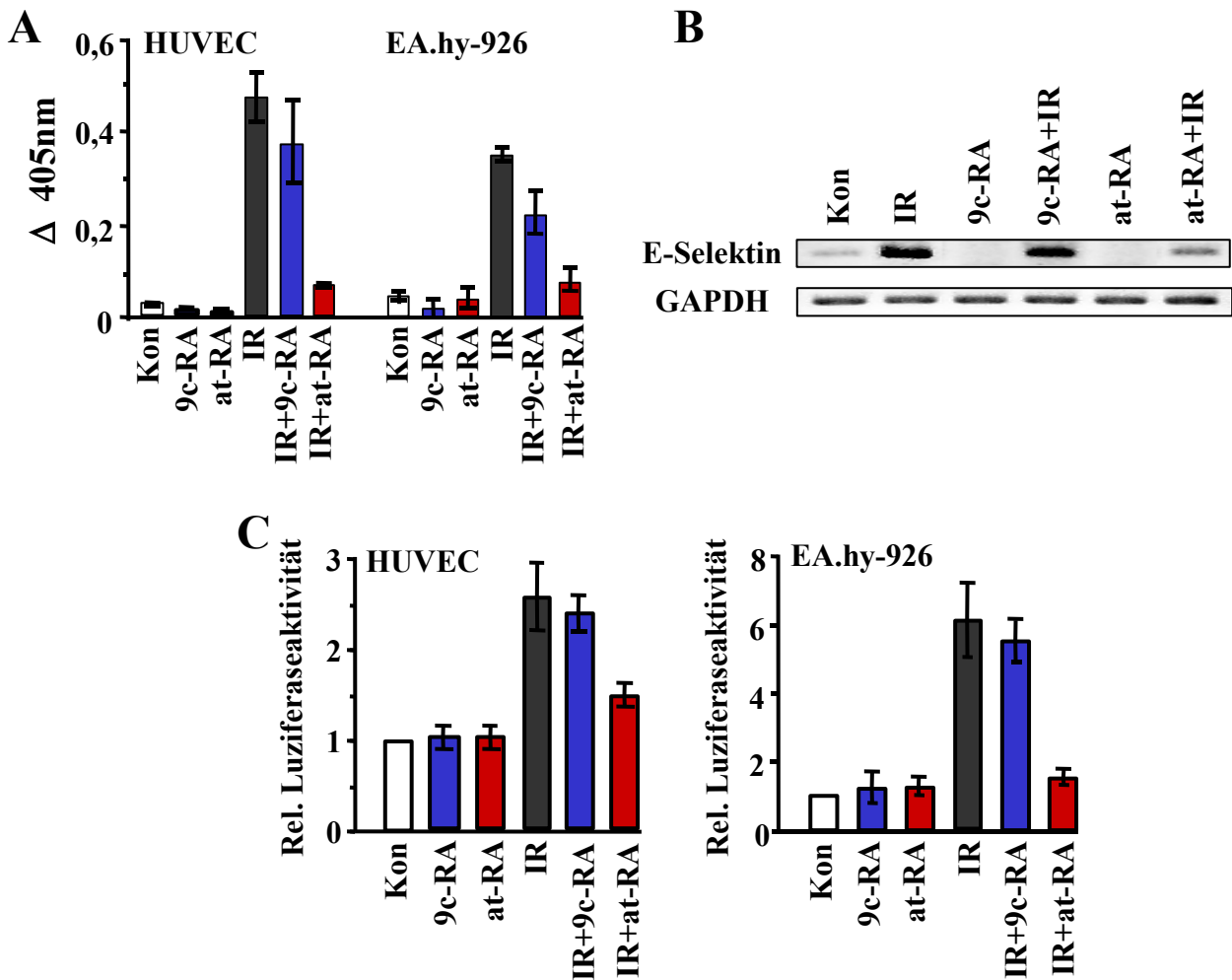


Abb.31 All-trans-Retinsäure hemmt die γ -Strahlen-induzierte E-Selektin-Expression in humanen Endothelzellen.

A: Subkonfluente Endothelzellen wurden mit IR (HUVEC: 2 Gy; EA.hy-926: 10 Gy) bestrahlt und sofort im Anschluss mit 9-cis- (9c-RA)(2 μ M) und all-trans-Retinsäure (at-RA)(2 μ M) behandelt. 5 Stunden später wurden die Zellen mittels ELISA auf die E-Selektin-Oberflächenexpression hin analysiert. Gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Experimenten (jeweils n = 3).

B: Subkonfluente Endothelzellen (HUVEC) wurden wie unter A beschrieben behandelt und 3 Stunden später erfolgte die Analyse der mRNA-Expression mittels semiquantitativer RT-PCR, wobei GAPDH als interner Standard gewählt wurde.

C: 24 h nach Transfektion der Endothelzellen mit dem E-Selektin-Promotor-Konstrukt wurden die Zellen wie unter A beschrieben behandelt. 16 Stunden später wurden die Zellen geerntet und die Zelllysate auf Luciferaseaktivität hin untersucht. Die basale Luciferaseaktivität in unbehandelten Endothelzellen wurde als Bezugswert gleich 1 gesetzt. Die gezeigten Mittelwerte \pm Standardabweichung ergaben sich aus zwei Experimenten (jeweils n = 2).

Retinsäure keinerlei Auswirkung auf die strahleninduzierte, NF- κ B-regulierte Genexpression hat (Abbildung 32A). All-trans-Retinsäure hingegen verhindert die Aktivierung von NF- κ B vollständig (Abbildung 32A). Im parallelen Versuchsansatz wurde mit Hilfe eines AP-1-Minimalpromotor-Luziferasekonstrukts gezeigt, dass γ -Strahlung in der Lage ist, auch AP-1 im HUVEC-Zellsystem dosisabhängig zu induzieren (Abbildung 32B). Auch im Fall von AP-1 führt eine all-trans-Retinsäure-Behandlung zur Hemmung dessen strahleninduzierter Aktivierung, während das 9-cis Isomer keinerlei Effekt zeigt. Unter Berücksichtigung von Literaturdaten (Na et al., 1998) lässt dieses Ergebnis den Schluss zu, dass all-trans-Retinsäure unter anderem über eine Hemmung der strahleninduzierten NF- κ B-Aktivierung die E-Selektin-Expression in humanen Endothelzellen beeinträchtigt. Eine Einflussnahme von all-trans-Retinsäure auf die transkriptionelle Aktivierbarkeit des E-Selektin-Gens durch Hemmung der Aktivität anderer Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel AP-1 kann dabei nicht ausgeschlossen werden.

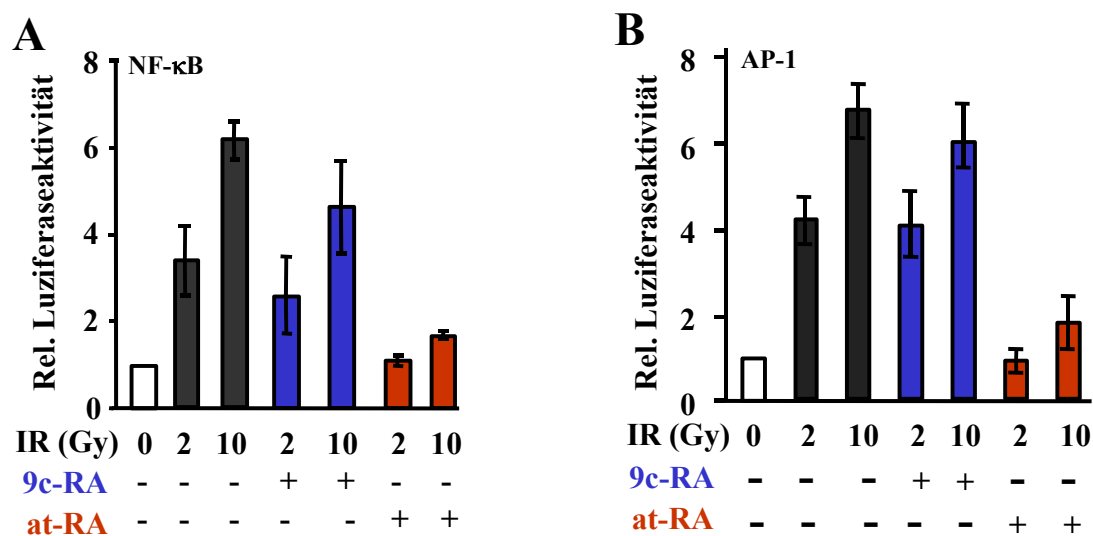


Abb.32 All-trans-Retinsäure inhibiert die γ -Strahlen-induzierte Aktivierung von NF- κ B und AP-1 in humanen Endothelzellen.

A, B: Subkonfluente Endothelzellen (HUVEC) wurden mit NF- κ B- (A) und AP-1- (B) Minimalpromotor-Konstrukten transfiziert und 24 h später mit den angegebenen Dosen an IR bestrahlt. Unmittelbar nach Bestrahlung wurde 9-cis- (9c-RA)(2 μ M) und all-trans-Retinsäure (at-RA)(2 μ M) zugesetzt und nach 16 h Inkubation die Luziferaseaktivität in den Zelllysaten bestimmt. Gezeigte Mittelwerte \pm Standardabweichung stammen aus drei unabhängigen Versuchen (jeweils n = 2).

3.2.5 Ionisierende Strahlung stimuliert die Adhäsion humaner Tumorzellen an Endothelien

Da E-Selektin im Metastasierungs geschehen insbesondere bei Kolonkarzinomen von entscheidender Bedeutung ist (Krause und Turner, 1999), stellt sich die Frage, ob die Bestrahlung von Endothelzellen, wie sie z.B. auch im Rahmen von Strahlentherapien erfolgt, zu einer erhöhten Tumorzelladhäsion an Endothelien führt. Im *in vitro*-Experiment wurde die Adhäsionspotenz fluoreszenzmarkierter Kolonkarzinomzellen (DLD1) an bestrahlte im Vergleich zu unbestrahlten Endothelzellen überprüft. γ -Bestrahlung von HUVEC erhöht dosisabhängig die Adhäsion von Tumorzellen (Abbildung 33). Bereits im therapeutisch relevanten Dosisbereich von zwei bis fünf Gray zeigte sich ein deutlich detektierbarer Anstieg der Tumorzelladhäsion (Abbildung 33A). Eine maximale Adhäsion der Kolonkarzinomzellen wurde mit Dosen ≥ 20 Gy erreicht (Abbildung 33A, B). Entsprechend dieser Befunde könnten bereits klinisch relevante Dosen an γ -Strahlung das metastatische Potential von Tumorzellen fördern.

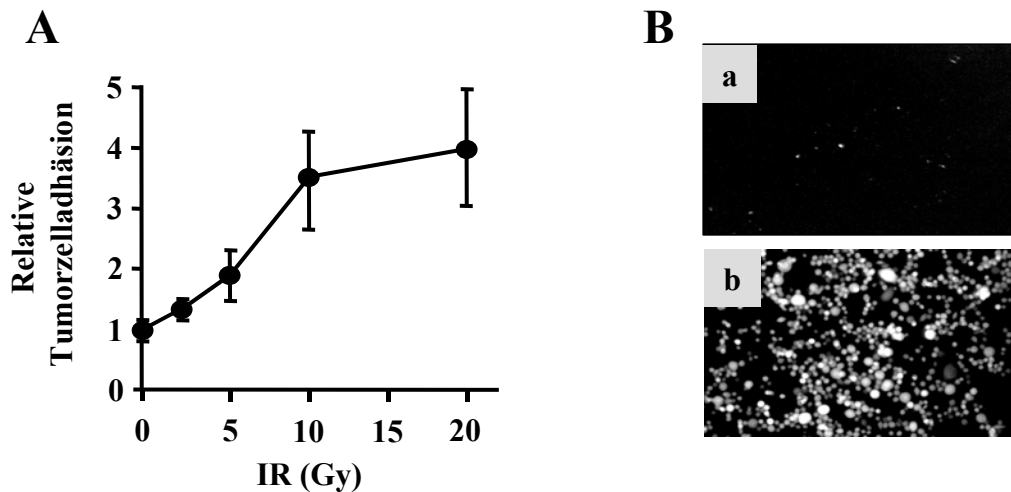


Abb.33 Ionisierende Strahlung induziert die Adhäsion humaner Tumorzellen an HUVEC.

A: Humane Endothelzellen (HUVEC) wurden mit den angegebenen Dosen an ionisierender Strahlung (IR) behandelt. 5 h später wurden fluoreszenzmarkierte Kolonkarzinomzellen (DLD1) auf die Endothelzellen gegeben. 2 h nach Inkubation bei 37°C erfolgte die photometrische Quantifizierung der Tumorzelladhäsion. Die basale Adhäsion von DLD1 an unbestrahlte HUVEC wurde gleich 1 gesetzt. Gezeigte Mittelwerte \pm Standardabweichung ergaben sich aus drei unabhängigen Experimenten (jeweils $n = 3$).

B: Illustrierte Darstellung der strahleninduzierten Tumorzelladhäsion an HUVEC: a: unbehandelte HUVEC + fluoreszenzmarkierte DLD1; b: mit 10 Gy bestrahlte HUVEC + fluoreszenzmarkierte DLD1; Vergrößerung: 1 : 400.

3.2.6 All-trans-Retinsäure und Lovastatin hemmen γ -Strahlen-induzierte Tumorzelladhäsion an Endothelien

Im Hinblick auf eine mögliche klinische Relevanz der Ergebnisse war zu klären, ob eine Hemmung strahleninduzierter Expression des endothelialen Selektins zu verminderter Adhäsion von Tumorzellen an Endothelien führt. Zu diesem Zweck wurden fluoreszenzmarkierte, humane Kolonkarzinomzellen auf einen Lovastatin-vorbehandelten Endothelzellmonolayer nach dessen Stimulation mit γ -Strahlung aufgebracht. Nach zwei Stunden wurde die Adhäsion der Tumorzellen am Endothel analysiert. In den Abbildungen 34A und 34B ist dargestellt, dass Lovastatin und all-trans-Retinsäure in der Lage sind, die Adhäsion von Tumorzellen an bestrahlte HUVEC zu hemmen, während 9-cis-Retinsäure keine Wirkung zeigt. Darüber hinaus konnte eine konzentrationsabhängige Verminderung der Tumorzelladhäsion sowohl durch Lovastatin (Abbildung 34C) als auch durch all-trans-Retinsäure (Abbildung 34D) nachgewiesen werden. Schon bei niedrigen Lovastatindosen (1 μ M) ist eine signifikant erniedrigte Adhäsion detektierbar. An unbehandelte HUVEC findet nahezu keine Tumorzelladhäsion statt (Abbildung 34B).

3.2.7 Lovastatin schützt Endothelzellen vor der zytotoxischen Wirkung von γ -Strahlung

In verschiedenen Studien wurden für Statine sowohl pro-apoptotische (Dimitroulakos et al., 2000; Xia et al., 2001; Knapp et al., 2000; Urbich et al., 2002) als auch protektive Eigenschaften (Llevadot et al., 2001; von Bardeleben et al., 2002; von Bardeleben et al., 2003) nachgewiesen. Die Tatsache, dass Statine je nach experimenteller Bedingungen derart unterschiedliche zelluläre Antworten bedingen, führt zu der Frage, in wie weit Statine das Resistenzverhalten humaner Endothelzellen gegenüber IR modulieren.

Abbildung 35A zeigt, dass die Vitalität von HUVEC durch Behandlung mit ionisierender Strahlung dosisabhängig reduziert wird. 48 Stunden nach Bestrahlung mit 20 Gy konnte eine Verminderung der zellulären Vitalität um 60 - 70 % beobachtet werden (Abbildung 35A). Eine Vorbehandlung über Nacht mit 1 μ M Lovastatin schützt Endothelzellen zu ca. 30 % und mit 20 μ M Lovastatin bis zu 50 % vor der toxischen Wirkung ionisierender γ -Strahlung (Abbildung 35A). Wie in Abbildung 35B zu sehen ist, wird durch γ -Strahlung (20 Gy) die DNA-Replikation in Endothelzellen um ca. 80 % gehemmt. Diese Replikationshemmung kann durch Statinvorbehandlung dosis- und zeitabhängig reduziert werden (Abbildung 35B).

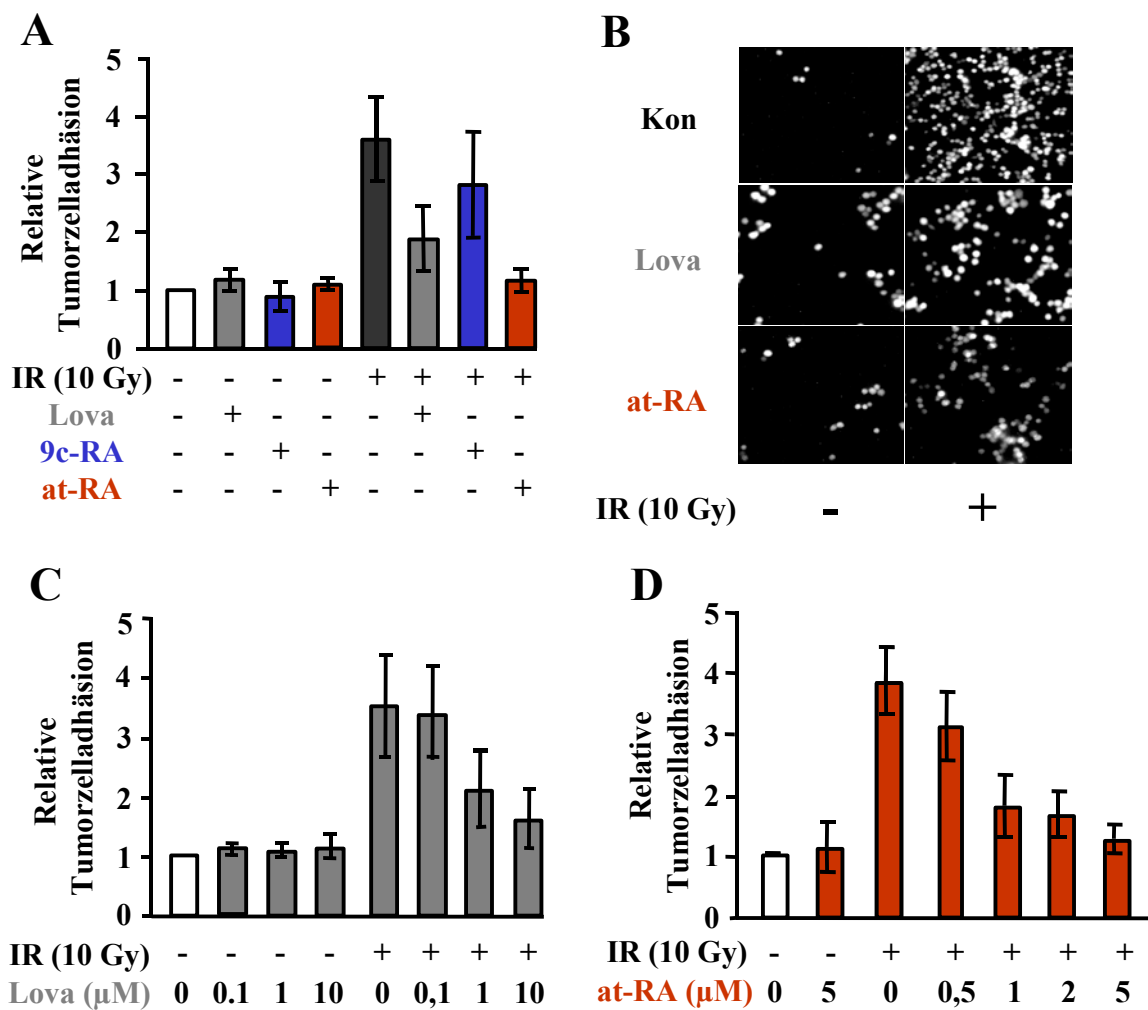


Abb.34 Lovastatin und all-trans-Retinsäure vermindern γ -Strahlen-induzierte Tumorzelladhäsion an Endothelzellen.

A: Konfluente HUVEC wurden mit Lovastatin (10 μ M) über Nacht vorbehandelt und anschließend mit IR (10 Gy) bestrahlt. Unmittelbar nach Bestrahlung wurde 9-cis-Retinsäure (9c-RA)(2 μ M) und all-trans-Retinsäure (at-RA)(2 μ M) zugegeben. 5 h später erfolgte die Analyse der Tumorzelladhäsion (DLD1) wie im Methodenteil beschrieben. Die basale Adhäsion von DLD1 an unbehandelte HUVEC wurde als Bezugswert gleich 1 gesetzt. Gezeigte Mittelwerte \pm Standardabweichung ergaben sich aus zwei unabhängigen Experimenten (jeweils n = 4).

B: Repräsentative, illustrierte Darstellung des Ergebnisses von A; Vergrößerung: 1 : 400.

C: Konfluente HUVEC wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an Lovastatin wie unter A beschrieben vorbehandelt und auf ihre adhäsiven Eigenschaften untersucht. Gezeigte Mittelwerte \pm Standardabweichung ergaben sich aus zwei unabhängigen Experimenten (jeweils n = 4).

D: Konfluente HUVEC wurden wie unter A beschrieben mit den angegebenen Konzentrationen an all-trans-Retinsäure (at-RA) vorbehandelt und auf ihr adhäsives Potential analysiert. Gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus zwei unabhängigen Experimenten (jeweils n = 4).

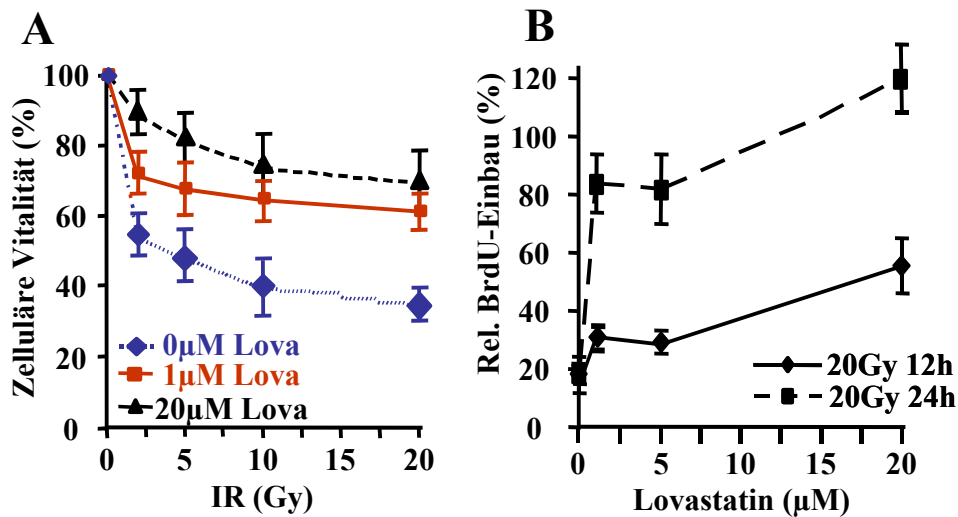


Abb.35 Lovastatin schützt HUVEC vor der zytotoxischen Wirkung von γ -Strahlung.

A: Subkonfluente HUVEC wurden mit Lovastatin (Lova)(1 μ M bzw. 20 μ M) über Nacht vorbehandelt und im Anschluss mit den angegebenen Dosen ionisierender Strahlung (IR) bestrahlt. 48 h später erfolgte die Analyse der zellulären Vitalität mit Hilfe des WST-1-Tests wie im Methodenteil beschrieben. Die angegebenen Mittelwerte \pm Standardabweichung stammen aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten (jeweils n = 4).

B: Subkonfluente HUVEC wurden mit den angegebenen Konzentrationen Lovastatin über Nacht vorbehandelt und im Anschluss mit IR (20 Gy) bestrahlt. 12 bzw. 24 h später wurde die DNA-*de novo*-Syntheserate mittels BrdU-Einbau, wie im Methodenteil beschrieben, bestimmt. Die BrdU-Einbaurrate in unbehandelten und unbestrahlten HUVEC wurde gleich 100 % gesetzt. Die dargestellten Mittelwerte \pm Standardabweichung stammen aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten (jeweils n = 4).

Um zu untersuchen, ob ionisierende Strahlung in Endothelzellen den programmierten Zelltod induziert, erfolgte die Analyse bestrahlter Zellpopulationen hinsichtlich ihrer Apoptoserate. In Abbildung 36A ist eine repräsentative FACS-Analyse von HUVEC 72 Stunden nach Bestrahlung mit (10 Gy) dargestellt. Wie deutlich zu erkennen ist, induziert Röntgenstrahlung in HUVEC dosisabhängig Apoptose (Abbildung 36A). Vorbehandlung der Zellen mit niedrigen Dosen an Lovastatin (1 μ M) bewirkt eine Prävention vor strahleninduzierter Apoptose (Abbildung 36A). Der strahlenprotektive Effekt von Lovastatin ist bereits 48 Stunden nach Bestrahlung detektierbar (Abbildung 36B). Eine Statinbehandlung von Endothelzellen mit 20 μ M Lovastatin, nicht jedoch mit niedrigen Konzentrationen (\leq 1 μ M) führt nach 96 Stunden zu einer deutlichen Induktion des programmierten Zelltodes (Abbildung 36B). Die Kombination von ionisierender Strahlung (10 Gy) mit hohen Statinkonzentrationen (d.h. 20 μ M) hat bei Endothelzellen erst nach 96 Stunden einen

additiven apoptotischen Effekt. Bei niedrigen Lovastatinkonzentrationen (d.h. 1 μM) zeigt sich auch zu späten Zeitpunkten (96 Stunden) eine Protektion der Endothelien gegenüber der pro-apoptotischen Wirkung von γ -Strahlung (Abbildung 36B).

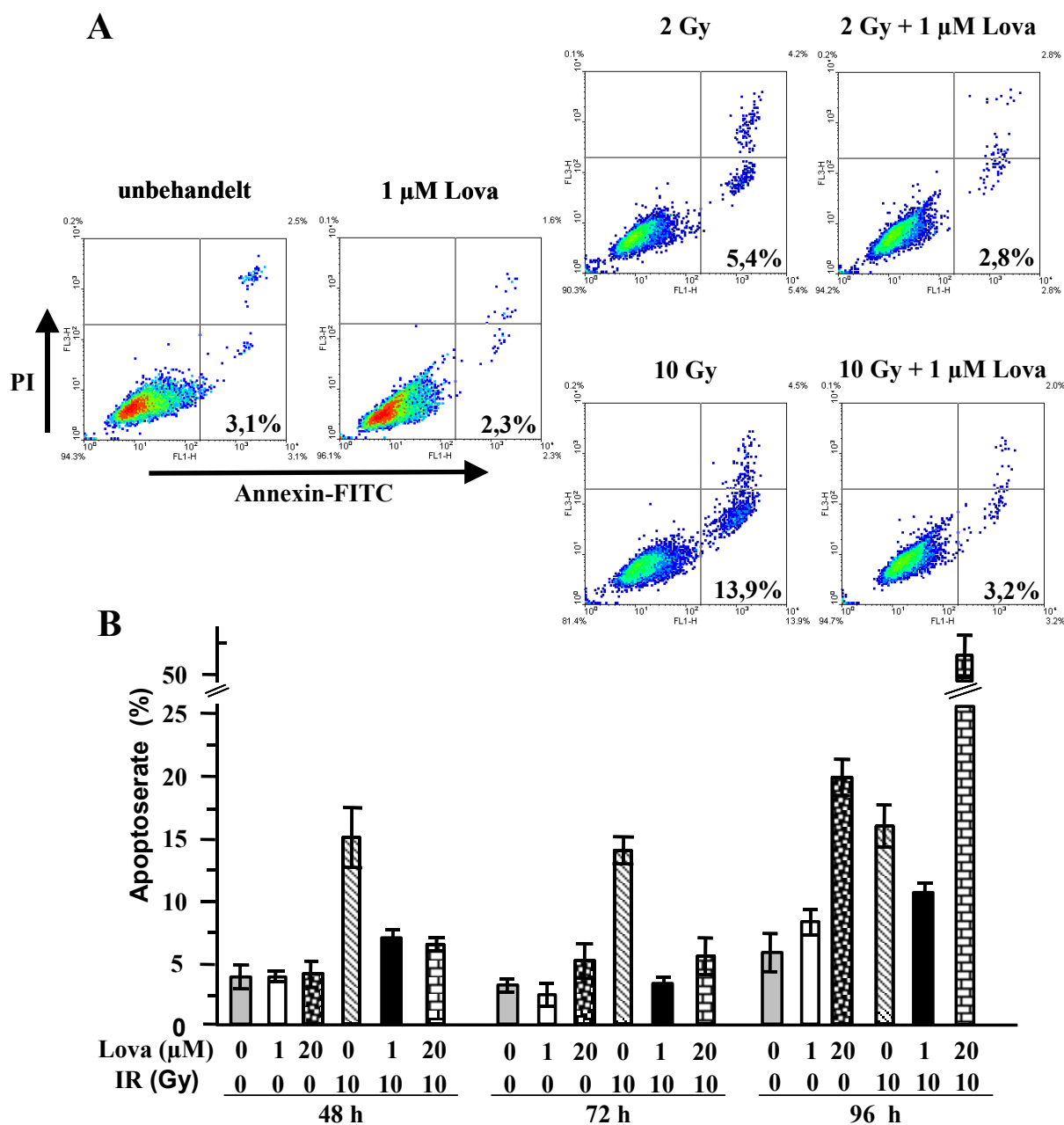


Abb.36 Lovastatin schützt HUVEC vor γ -Strahlen-induzierter Apoptose.

A: Subkonfluente HUVEC wurden über Nacht mit Lovastatin (Lova)(1 μM) vorbehandelt und im Anschluss mit IR (2 Gy bzw. 10 Gy) bestrahlt. 72 Stunden später erfolgte die durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptoserate mittels Annexin-V-Färbung. Die gezeigten Dot-Plots sind repräsentative Darstellungen eines von mindestens zwei unabhängigen Experimenten. Im unteren, rechten Quadranten sind die apoptotischen Ereignisse prozentual zur untersuchten Gesamtpopulation angegeben.

B: Subkonfluente HUVEC wurden mit Lovastatin (Lova)(1 μM bzw. 20 μM) über Nacht vorbehandelt und im Anschluss mit IR (10 Gy) bestrahlt. 48, 72 bzw. 96 Stunden später wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf ihre Apoptoserate mittels Annexin-V-Färbung analysiert. Gezeigt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

Eine mögliche Erklärung, wie Statine Endothelzellen vor Apoptose nach Röntgenbestrahlung schützen, könnte eine Hemmung von CD95 (Fas-Rezeptor) - abhängigen Mechanismen sein. Das Oberflächenprotein CD95 gehört der TNF-Rezeptorsuperfamilie an und wird durch Bindung seines Liganden „Fas“ aktiviert (Smith et al., 1994). Die zytoplasmatische Domäne des aktivierten Fas-Rezeptors induziert nach Trimerisierung des Rezeptors eine Signalkaskade, die letztlich mit der Aktivierung von Caspasen endet. Caspasen sind Proteinasen, deren Aktivität zum apoptotischen Zelltod führt (Friesen et al., 1996; Earnshaw et al., 1999). Subkonfluente HUVEC wurden mit einem den Todesrezeptor CD95 aktivierenden anti-Fas-Antikörper behandelt. Abbildung 37A macht deutlich, dass der Fas-aktivierende Antikörper in HUVEC kaum Apoptose und nur in geringem Maße Nekrose induziert. Bestätigung findet dieses Ergebnis in einen Vitalitätstest („WST-1-Test“), der zeigt, dass HUVEC nach Behandlung mit einem Anti-Fas-Antikörper eine nahezu unveränderte metabolische Aktivität aufweisen (Abbildung 37B). Vorbehandlung mit Lovastatin zeigt wie erwartet keine Wirkung (Abbildung 37B). Nach kombinierter Behandlung der Zellen mit 2 Gy und aktivierendem anti-Fas-Antikörper ist ebenfalls keine Fas-Rezeptor-vermittelte Apoptose erkennbar (Abbildung 37C). Um die Funktionalität des verwendeten anti-Fas-Antikörpers zu überprüfen, wurde seine Wirkung auf humane primäre Lymphozyten unter identischen Versuchsbedingungen wie bei HUVEC untersucht. Es zeigte sich, dass in diesem humanen Zellsystem der den Todesrezeptor aktivierende Antikörper in der Lage ist, deutlich Apoptose zu induzieren (Abbildung 37A). Als Ergebnis bleibt demnach festzuhalten, dass HUVEC bei den gewählten Bedingungen nicht über CD95-vermittelte Signalwege in Apoptose gehen können. Somit ist der protektive Effekt von Lovastatin nach Behandlung endothelialer Zellen mit γ -Strahlung wahrscheinlich nicht auf Beeinflussung der Fas-induzierten Apoptose zurückzuführen.

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob Statine über Beeinflussung des mitochondrial vermittelten Apoptose-Signalwegs protektiv wirken könnten. Mit Hilfe von Western-Blot-Analysen wurde gezeigt, dass das anti-apoptotisch wirkende Mitochondrien-assoziierte Protein Bcl-2 12 und 24 Stunden nach γ -Bestrahlung (10 Gy) von HUVEC in seiner Expression herunterreguliert wird. Der strahleninduzierte Bcl-2-Abfall wird durch Statinbehandlung verhindert (Abbildung 38A, obere Spalte). Der Gegenspieler von Bcl-2, das pro-apoptotisch wirkende Bax-Protein, zeigt weder 12 noch 24 Stunden nach γ -Bestrahlung eine veränderte Proteinexpression in Endothelzellen (Abbildung 38A, mittlere Spalte). Statinvorbehandlung hat keinerlei Einfluss auf den basalen Bax-Proteinlevel in

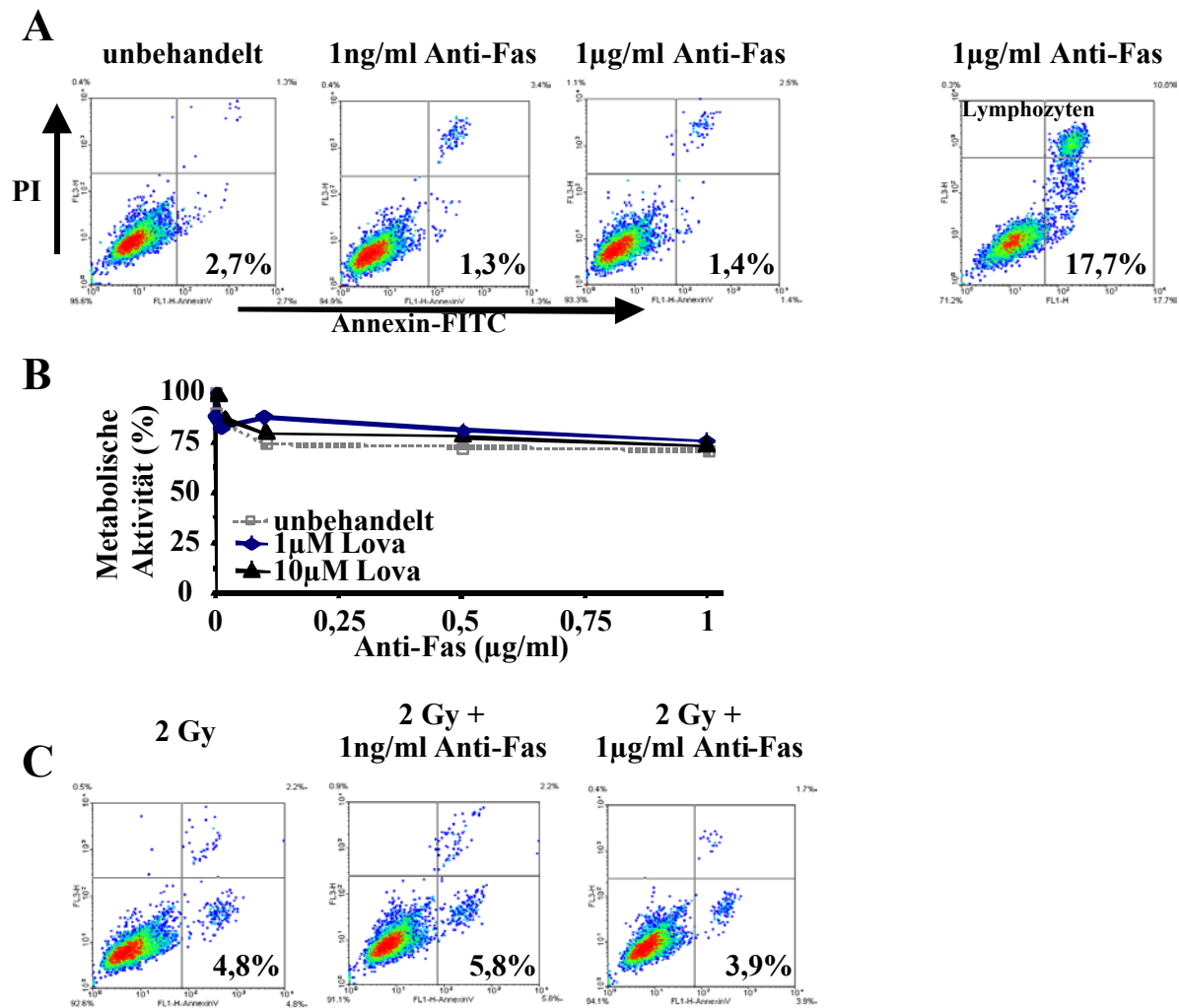


Abb.37 Die anti-apoptotische Wirkung von Lovastatin in Endothelzellen nach γ -Bestrahlung ist Fas-Rezeptor-unabhängig.

A: Subkonfluente HUVEC wurden 24 h mit aktivierendem Anti-Fas-Rezeptor-Antikörper (Anti-Fas)(1 ng/ml bzw. 1 µg/ml) behandelt und anschließend durchflusszytometrisch mittels Annexin-V-Färbung bezüglich ihrer Apoptoserate untersucht. Die gezeigten Dot-Plots sind repräsentative Darstellungen eines von mindestens zwei unabhängigen Experimenten. Im unteren, rechten Quadranten sind die apoptotischen Ereignisse prozentual zur untersuchten Gesamtpopulation angegeben. Um die Funktionalität des aktivierenden Anti-Fas-Rezeptor-Antikörpers zu belegen, wurden primäre humane Lymphozyten unter identischen Bedingungen mit 1 µg/ml Anti-Fas behandelt und per FACS analysiert.

B: Subkonfluente HUVEC wurden über Nacht mit Lovastatin (1 µM bzw. 10 µM) vorbehandelt und 8 h später mit aktivierendem Anti-Fas-Rezeptor-Antikörper (Anti-Fas) in angegebenen Konzentrationen stimuliert. Nach weiteren 24 h erfolgte die Bestimmung der zellulären, metabolischen Aktivität mittels WST-1-Zellproliferationsreagenz wie unter Methoden beschrieben. Dargestellt sind Mittelwerte aus einem Experiment mit $n = 3$.

C: Subkonfluente HUVEC wurden mit ionisierender Strahlung (2 Gy) stimuliert. 8 h später erfolgte die Behandlung mit aktivierendem Anti-Fas-Rezeptor-Antikörper (Anti-Fas)(1 ng/ml bzw. 1 µg/ml) und nach weiteren 24 h die durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptosefrequenz mittels Annexin-V-Färbung. Die gezeigten Dot-Plots sind repräsentative Darstellungen eines von mindestens zwei unabhängigen Experimenten. Im unteren, rechten Quadranten sind die apoptotischen Ereignisse prozentual zur untersuchten Gesamtpopulation angegeben.

HUVEC. Auch nach IR-Behandlung konnte keine Wirkung von Lovastatin auf die endotheliale Bax-Expression gefunden werden (Abbildung 38A, mittlere Spalte). Betrachtet man das Verhältnis von Bcl-2- und Bax-Protein in IR-behandelten (10 Gy) Zellen, so findet sich nach 12 bzw. 24 Stunden ein um 60 % verminderter Protein-Quotient (Abbildung 38B). Das Verhältnis von Bcl-2 zu Bax in Lovastatin-vorbehandelten HUVEC nach γ -Bestrahlung entspricht dem von nicht vorbehandelten und unbestrahlten Endothelzellen. Daher kann zusammenfassend festgehalten werden, dass Lovastatin bei Stimulation von Endothelzellen mit ionisierender Strahlung eine Verschiebung des Bcl-2 / Bax-Verhältnisses zu Gunsten des anti-apoptotisch wirkenden Bcl-2 bewirkt. Diese Befunde stellen einen Hinweis auf eine mögliche Einflussnahme von Statinen auf den mitochondrialen Apoptosesignalweg dar. Der radioprotektive Effekt von Statinen könnte demnach seine Ursache in statinvermittelter Begünstigung des Verhältnisses anti-apoptotischer zu pro-apoptotischen Faktoren haben.

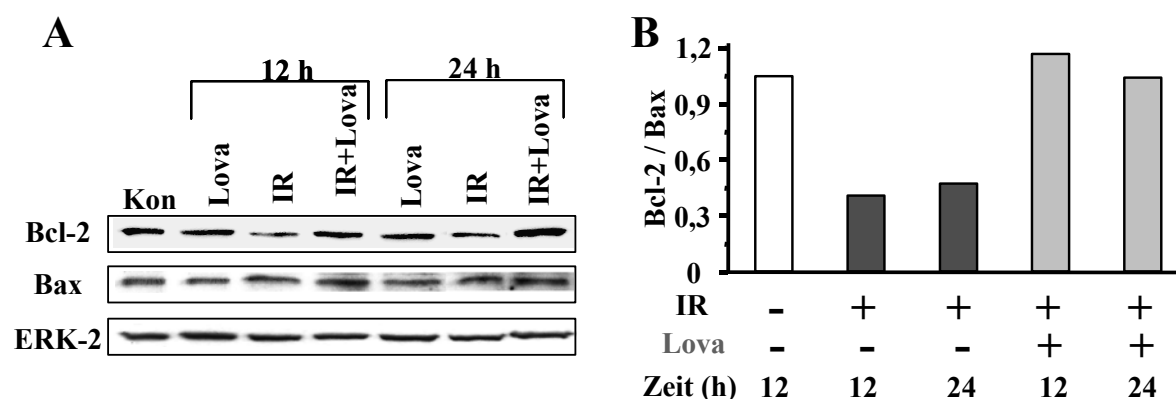


Abb.38 Lovastatin beeinflusst das Bcl-2- / Bax-Proteinverhältnis in HUVEC nach γ -Bestrahlung.

A: Subkonfluente HUVEC wurden über Nacht mit Lovastatin (Lova)(10 μ M) vorbehandelt und im Anschluss bestrahlt (IR)(10 Gy). Nach 12 bzw. 24 h wurden die Zellen geerntet und mittels Western-Blot-Analyse die Bcl-2- und Bax-Proteinmengen analysiert. Zur internen Normierung wurde der Filter mit einem anti-ERK-2-Antikörper rehybridisiert.

B: Quantitativ-densitometrische Auswertung der unter A dargestellten Ergebnisse. Gezeigt ist das relative Verhältnis von Bcl-2- zu Bax-Proteinmenge, welches in der unbestrahlten und unbehandelten Kontrolle gleich 1 gesetzt wurde.

3.3 Etablierung eines transgenen Mausmodells zur Untersuchung der Rolle von Rho-GTPasen im E-Selektin-vermittelten Metastasierungs-geschehen *in vivo*

3.3.1 Klonierung von Expressionsvektoren für dominant-negatives Rac1 und wildtyp-RhoB

Im Hinblick auf eine mögliche klinische Relevanz der bisher gefundenen Ergebnisse wäre es wünschenswert, die *in vitro*-Befunde in einem geeigneten Tiermodell überprüfen zu können. In zwei parallelen experimentellen Ansätzen sollten dafür transgene Mäuse generiert werden, welche eine gezielt veränderte Rho-Protein-Expression aufweisen. Zum einen war das Ziel, die kleine GTPase RhoB im Mausmodell heterogen zu exprimieren, im anderen Versuchsansatz sollte eine Mutante des Signalmoleküls Rac1 in dominant-negativer Form überexprimiert werden. Zunächst galt es hierfür geeignete Expressionsvektoren zu klonieren.

a) Strategie

Die Vektoren wurden so konzipiert, dass einem humanen UbiquitinC-Promotor die kodierende Sequenz für das *Escherichia coli*-Enzym β -Galaktosidase (β -Gal) folgt. Dieses Enzym wird vom bakteriellen lacZ-Gen aus *E. coli* kodiert und soll als Reporter fungieren, da seine Enzymaktivität photometrisch leicht bestimmt werden kann (Alam und Cook, 1990). Die kodierende Sequenz von lacZ ist 3' durch ein Simplex-Virus 40-Polyadenylierungssignal (SV40 - PA) abgeschlossen und wird beidseitig, also 5' und 3', von einer 34 Basenpaare langen sogenannten „loxP-site“ flankiert. Die loxP-Sequenz „ATAACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTAT“ ist Erkennungssequenz für das Enzym cre-Rekombinase des Bakteriophagen P1, welches Bereiche aus DNA-Strängen ausschneidet, die von loxP beidseitig flankiert sind und die neu entstehenden DNA-Enden miteinander rekombiniert (Sternberg und Hamilton, 1981). In diesem Fall hat das zur Folge, dass das Reporter-gen lacZ aus dem Expressionsplasmid entfernt werden kann und das dem lacZ nachgeschaltete Gen direkt unter die Kontrolle des UbiquitinC-Promotors kommt. Bei dem hier klonierten Vektor findet sich hinter dem lacZ-Gen die cDNA von mutiertem humanen Rac1 (dnRac1)(Ansatz 1) beziehungsweise die Sequenz von RhoB aus *Rattus*

norvegicus (Ansatz 2). Die hinter den Rho-Protein-Sequenzen gelegene Terminationssequenz in Form eines BGH (bovine growth hormone) - Polyadenylierungssignals soll eine korrekte Expression gewährleisten. Abbildung 39 gibt schematisch einen Überblick über den zentralen Bereich der entsprechenden Expressionsvektorkonstrukte.

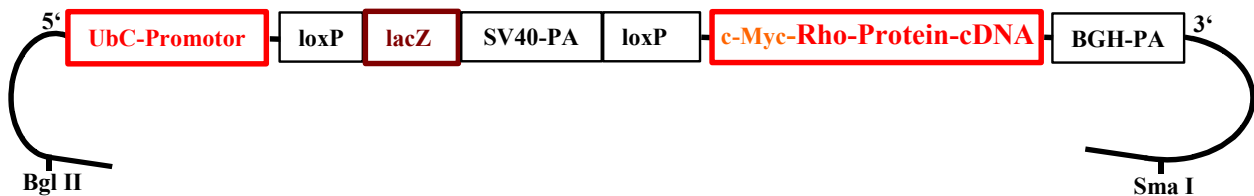


Abb.39 Partielle, schematische Darstellung des Expressionsvektors für die Fremdexpression von Rho-Proteinen im Mausmodellsystem.

Im Rho-Expressionsvektor folgt einem humanen UbiquitinC (UbC)-Promotor die kodierende Sequenz für β -Galaktosidase (*lacZ*). *lacZ* ist 3' durch ein Simplex-Virus 40-Polyadenylierungssignal (SV40-PA) abgeschlossen und wird beidseitig von „loxP“-Sequenzen flankiert. *lacZ* ist eine Rho-Protein-cDNA nachgeschaltet, die ihrerseits durch ein BGH (bovine growth hormone) - Polyadenylierungssignal abgeschlossen ist. Der 5' vor der Rho-Protein-cDNA befindliche „c-Myc-Tag“ soll eine schnelle Detektion der Rho-Proteinexpression vereinfachen.

b) Klonierung des UbiquitinC-Promotors

Als Ausgangsplasmid wurde ein kommerziell erhältlicher Vektor der Firma INVITROGEN™ *life technologies* mit der Bezeichnung pcDNA3.1 (5,4 kB) herangezogen. In diesem Vektor wurde der Cytomegalovirus (CMV)-Promotor durch den humanen UbiquitinC-Promotor aus dem ebenfalls kommerziell erhältlichen pUB6/V5-HisC (INVITROGEN™ *life technologies*) ersetzt (Abbildung 40). Dafür erfolgte ein Doppelverdau des pcDNA3.1 mit den Restriktionsenzymen Bgl II und Hind III, wobei der CMV-Promotor herausgeschnitten wurde. Der gleiche Doppelverdau erfolgte mit dem Vektor pUB6/V5-HisC, um den UbiquitinC-Promotor humaner Herkunft zu erhalten. In einem Ligationsschritt mit T₄-Ligase aus *Escherichia coli* erfolgte der Einbau des UbiquitinC-Promotors in pcDNA3.1 (Abbildung 40).

c) Klonierung des loxP-lacZ-Fragments

Der Klonierungsvektor pGlac (NCBI-Genbank, Accession No. U19930) wurde einem Doppel-Restriktionsverdau mit Pst I und Sal I unterzogen, wodurch das bakterielle *lacZ*-Gen, gefolgt von einem SV40-Polyadenylierungssignal, gewonnen wurde. Mit Hilfe von speziellen

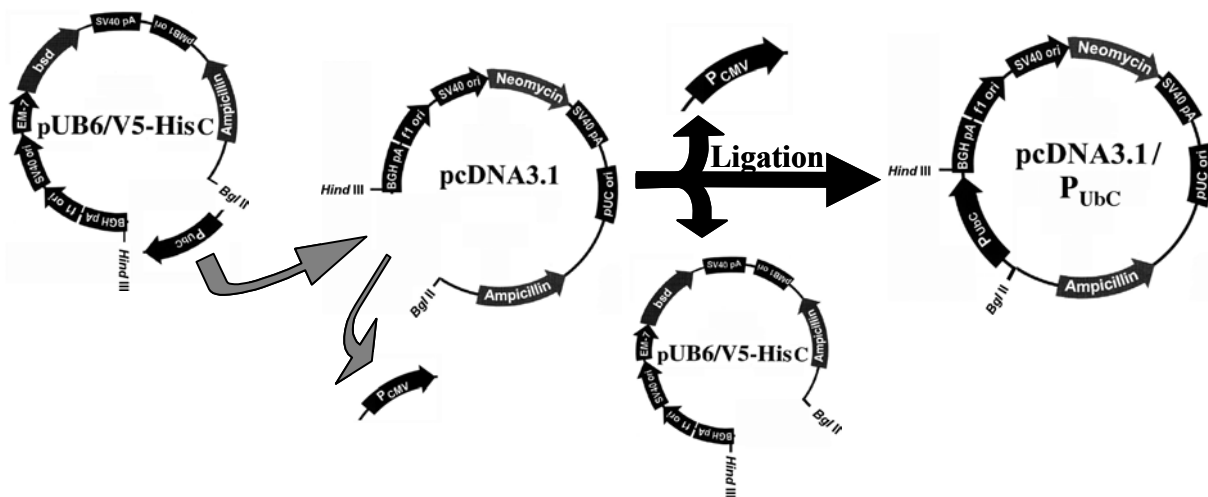


Abb.40 Schematische Darstellung der Umklonierung des humanen UbiquitinC-Promotors in den Expressionsvektor pcDNA3.1.

Aus den Expressionsvektoren pUB6/V5-HisC und pcDNA3.1 wurden mittels Doppelverdau mit Hind III und Bgl II deren eukaryontische Promotoren herausgeschnitten. Der humane UbiquitinC-Promotor aus pUB6/V5-HisC wurde in einem T_4 -Ligase-vermittelten Ligationsschritt an die Stelle des CMV-Promotors in pcDNA3.1 kloniert.

Primern wurde die kodierende Sequenz für lacZ und die sich anschließende SV40-Terminationssequenz mittels PCR vervielfacht und an den Enden um loxP-Sequenzen erweitert, wobei zusätzlich 5' eine Hind III- und 3' eine Kpn I-Schnittstelle angefügt wurde. Das „loxP-lacZ-PCR-Produkt“ wurde über seine 5'-Hind III- und 3'-Kpn I-Enden in den entsprechend präparierten Ubiquitin-Promotor-pcDNA3.1-Vektor ligiert. Abbildung 41 stellt die Teilschritte dieser Klonierung schematisch dar.

d) Synthese des dnRac1-Expressionsvektors

Die codierende Sequenz des humanen Rac1, welches an Position 17 eine Punktmutation enthält (Asparagin \rightarrow Threonin) und dadurch inaktiv ist (dnRac1), stand in dem eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3.1 integriert zur Verfügung. Mit Hilfe eines Doppelverdaus (BamH I und Not I) wurde die cDNA des humanen dnRac1 gewonnen und anschließend in eine PCR eingesetzt, wobei die verwendeten Primer so konzipiert waren, dass im 5'-Bereich „upstream“ des Startcodons ATG die cDNA um ein c-Myc-Epitop verlängert wurde. Die Sequenz des sogenannten „Myc-Tags“ ist identisch mit jener, die von der Firma INVITROGEN™ *life technologies* in deren Vektoren Verwendung findet und ist für eine

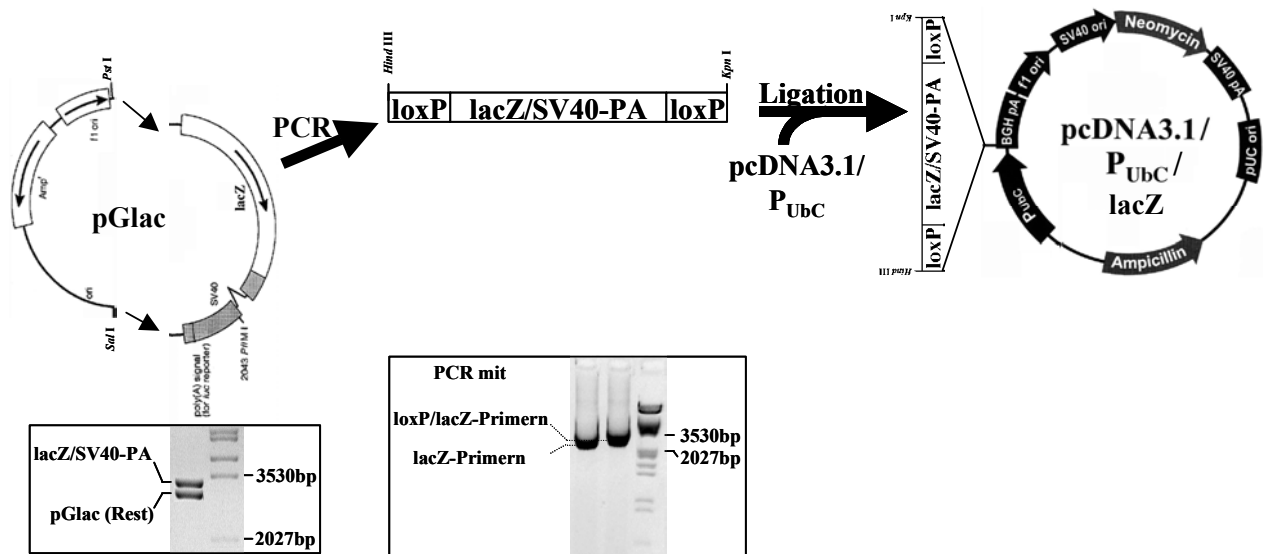


Abb.41 Schematische Darstellung der Konstruktion eines Expressionsvektors für loxP-flankierte β -Galaktosidase unter der Kontrolle eines UbiquitinC-Promotors.

Aus dem Klonierungsvektor pGlac wurde mittels Doppelverdau mit Sal I und Pst I die kodierende Sequenz für β -Galaktosidase (lacZ) gewonnen. Unter der schematischen Darstellung ist die gelelektrophoretische Auftrennung des verdauten Vektors auf einem invers dargestellten Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel gezeigt. LacZ wurde in einer PCR-Reaktion beidseitig um loxP-Sequenzen, sowie 5' um eine Hind III- und 3' um eine Kpn I-Schnittstelle erweitert. Unter der schematischen Darstellung sind die mit unterschiedlichen Primer-Paaren erhaltenen PCR-Produkte nach gelelektrophoretischer Auftrennung auf einem invers dargestellten, Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel gezeigt. Mittels T₄-Ligase wurde das loxP-lacZ-loxP-Fragment in den pcDNA3.1/P_{UBC}-Expressionsvektor hinter den UbiquitinC-Promotor kloniert.

spätere schnelle Detektion des Proteins von Vorteil. Zusätzlich wurden 5' eine BamH I- und 3' eine EcoR I-Schnittstelle hinzugefügt. Das so gewonnene Myc-dnRac1 wurde über die Schnittstellen BamH I und EcoR I in die „multiple cloning site“ (MCS) des Klonierungsvektors pcDNA3.1 ligiert und im Anschluss mit den Restriktionsenzymen Kpn I und Not I für die Ligation in den Ubiquitin-loxP-lacZ-pcDNA3.1 wieder herausgeschnitten und in diesen hineingesetzt. Schematisch verdeutlicht Abbildung 42 die abschließenden Klonierungsschritte zur Herstellung des dnRac1-Expressionsvektors für die nachfolgende Mikroinjektion in Mausoozyten. Mit Hilfe verschiedener Kontrollverdau und einer partiellen DNA-Sequenzierung konnte sichergestellt werden, dass im Expressionsvektor während des Klonierungsvorgangs keine unerwünschten Mutationen aufgetreten waren

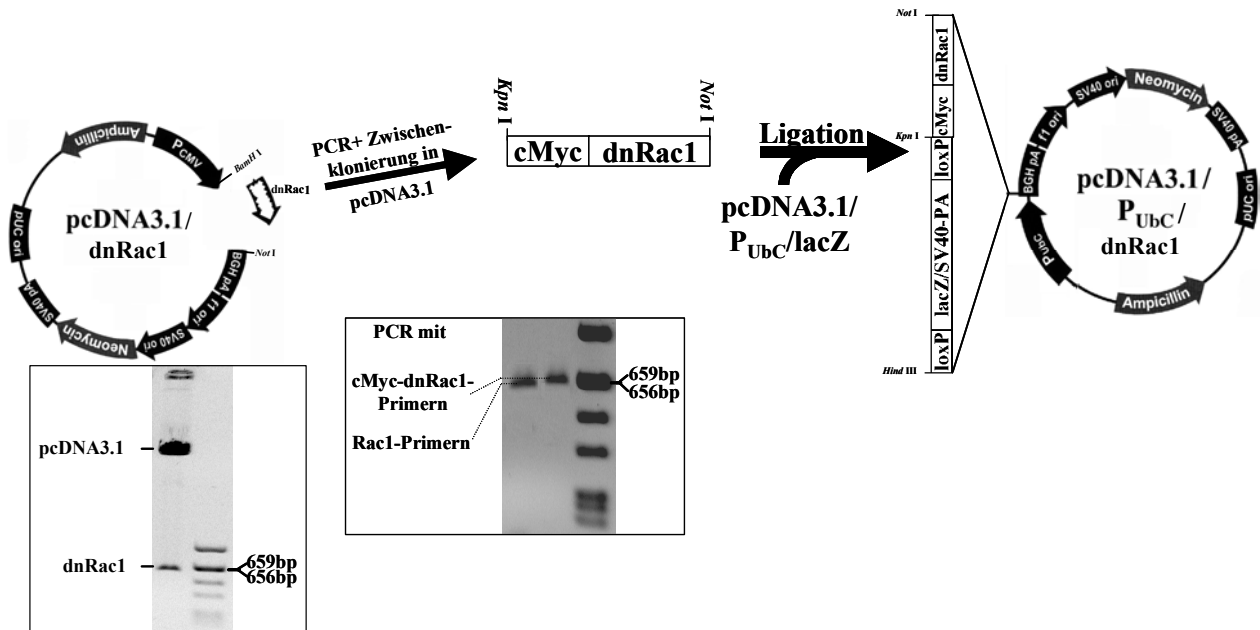


Abb.42 Schematische Darstellung der Konstruktion eines β -Gal-Reporter-Expressionsvektors für dominant-negatives Rac1 unter der Kontrolle eines UbiquitinC-Promotors.

Aus dem Expressionsvektor pcDNA3.1 wurde mittels Doppelverdau mit BamH I und Not I die kodierende Sequenz für dominant-negatives Rac1 (dnRac1) gewonnen. Unter der schematischen Darstellung ist die gelelektrophoretische Auftrennung des verdauten Vektors auf einem invers dargestellten, Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel gezeigt. dnRac1 wurde in einer PCR-Reaktion 5' um einen cMyc-Tag mit Kpn I- und 3' um eine Not I-Schnittstelle erweitert. Unter der schematischen Darstellung sind die mit unterschiedlichen Primer-Paaren erhaltenen PCR-Produkte nach gelelektrophoretischer Auftrennung auf einem invers dargestellten, Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel gezeigt. Mittels T₄-Ligase wurde das cMyc-dnRac1-Fragment in den pcDNA3.1/P_{Ubc}/lacZ-Expressionsvektor hinter die kodierende Sequenz der β -Galaktosidase (lacZ) kloniert.

e) Synthese des RhoB-Expressionsvektors

Die kodierende Sequenz der GTPase RhoB lag bereits ebenfalls in einem pcDNA3.1-Vektor integriert vor. Nach dem Herausschneiden mit EcoR I und Not I wurde die cDNA für RhoB mittels PCR vervielfacht und modifiziert. Am 5'-Ende wurde wie bei dnRac1 die Sequenz für ein c-Myc-Epitop und zusätzlich eine Restriktionsschnittstelle für Kpn I angefügt. Der Ubiquitin-loxP-lacZ-pcDNA3.1 wurde mit Kpn I und Not I für die Ligation vorbereitet und mit dem Myc-RhoB-PCR-Produkt über die Kpn I- und Not I-Schnittstellen mittels bakterieller T₄-Ligase ligiert. Abbildung 43 verdeutlicht schematisch die Synthese des RhoB-Expressionsvektors. Auch dieser Vektor wurde mit Kontrollverdaus und partieller DNA-Sequenzierung kontrolliert, um sicherzustellen, dass die molekulare Grundlage für seine Funktionalität gegeben ist.

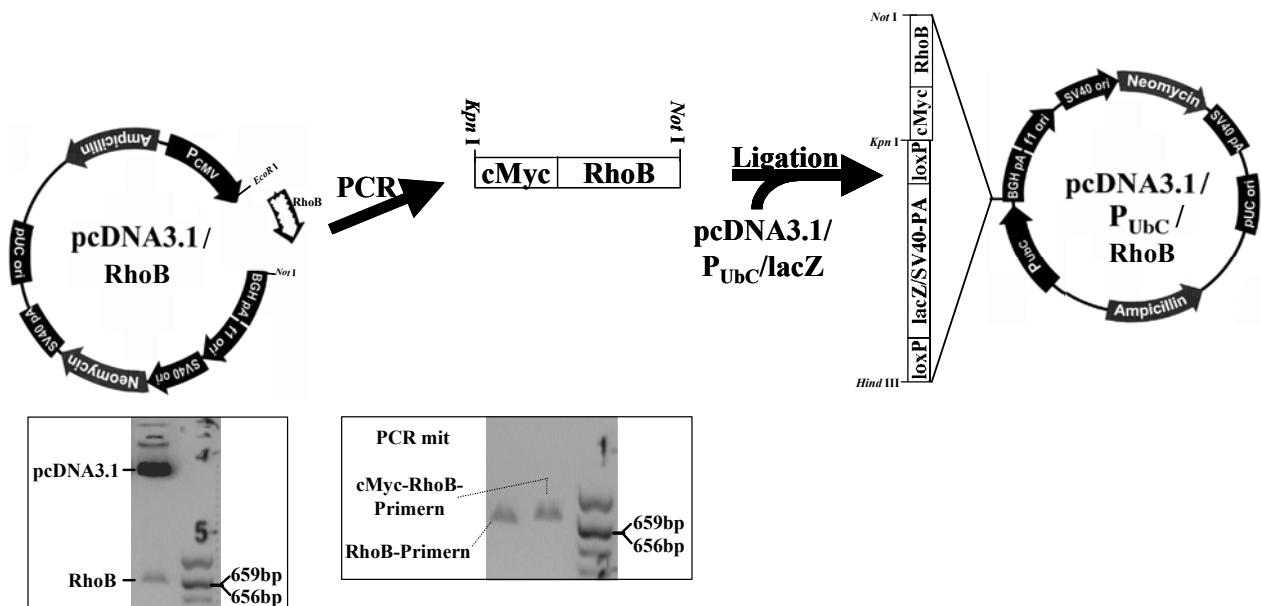


Abb.43 Schematische Darstellung der Synthese eines β -Gal-Reporter-Expressionsvektors für wildtypisches RhoB unter der Kontrolle eines UbiquitinC-Promotors.

Aus dem Expressionsvektor pcDNA3.1 wurde mittels Doppelverdau mit EcoR I und Not I die kodierende Sequenz für wildtyp-RhoB (RhoB) gewonnen. Unter der schematischen Darstellung ist die gelelektrophoretische Auftrennung des verdauten Vektors auf einem invers dargestellten, Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel gezeigt. RhoB wurde in einer PCR-Reaktion 5' um einen cMyc-Tag mit Kpn I-Schnittstelle erweitert. 3' wurde die Not I-Schnittstelle komplementiert. Unter der schematischen Darstellung sind die mit unterschiedlichen Primer-Paaren erhaltenen PCR-Produkte nach gelelektrophoretischer Auftrennung auf einem invers dargestellten, Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel gezeigt. Mittels T_4 -Ligase wurde das cMyc-RhoB-Fragment den pcDNA3.1/ P_{UbC} / $lacZ$ -Expressionsvektor hinter die kodierende Sequenz des Reporters β -Galaktosidase ($lacZ$) kloniert.

3.3.2 *in vitro*-Funktionsüberprüfung der Rho-Protein-Expressionsvektoren

a) Nachweis der Rho-Protein-Fremdexpression in COS-7-Zellen

Die erhaltenen Konstrukte wurden zunächst transient in COS-7-Zellen exprimiert, wobei in einem Ansatz ein Expressionsvektor der cre-Rekombinase co-transfiziert wurde. Die 24 Stunden später aus den Zellen gewonnenen Zelllysate wurden per Western-Blot mit Hilfe eines anti-Rac1- bzw. eines anti-RhoB-Antikörpers analysiert. Wie in Abbildung 44 zu sehen, lässt sich mit einem spezifischen anti-Rac1-Antikörper in Zelllysaten aus Zellen, die mit dem dnRac1-lacZ-Konstrukt transfiziert waren, nahezu ausschließlich endogenes Rac1-Protein detektieren. Das geringfügig höhermolekulare Myc-dnRac1 wird nur in sehr geringem Maß exprimiert. Im Gegensatz hierzu findet man in Zellen, die sowohl das dnRac1-lacZ-Konstrukt als auch einen Expressionsvektor für die cre-Rekombinase enthielten, deutlich erhöhte

Mengen an Myc-Rac1-Protein. Die Proteinbande, die bei Verwendung eines Expressionsvektors für Myc-dnRac1 im COS-7-Zellsystem erhalten wurde, beweist die Funktionalität von Transfektion und Fremdexpression in diesem Zellsystem. Die Kontrollansätze mit leerem pcDNA3.1-Vektor und pcDNA3.1, der ausschließlich die kodierende Sequenz von lacZ trägt, belegen die Spezifität der erhaltenen Signale (Abbildung 44). Die Rehybridisierung mit einem Anti-c-Myc-Antikörper, der das c-Myc-Epitop des Myc-dnRac1-Fusionsproteins erkennt, bestätigt teilweise das Ergebnis der Western-Blot-Analyse mit dem Anti-Rac1-Antikörper. Während die Überexpression von Myc-Rac1 mit dem entsprechenden Expressionsvektor durch den Anti-c-Myc-Antikörper nachgewiesen werden konnte, war es nicht möglich, die Myc-dnRac1-Expression nach kombinierter Transfektion von dnRac1-lacZ- und cre-Rekombinase-Konstrukt zu detektieren (Abbildung 44).

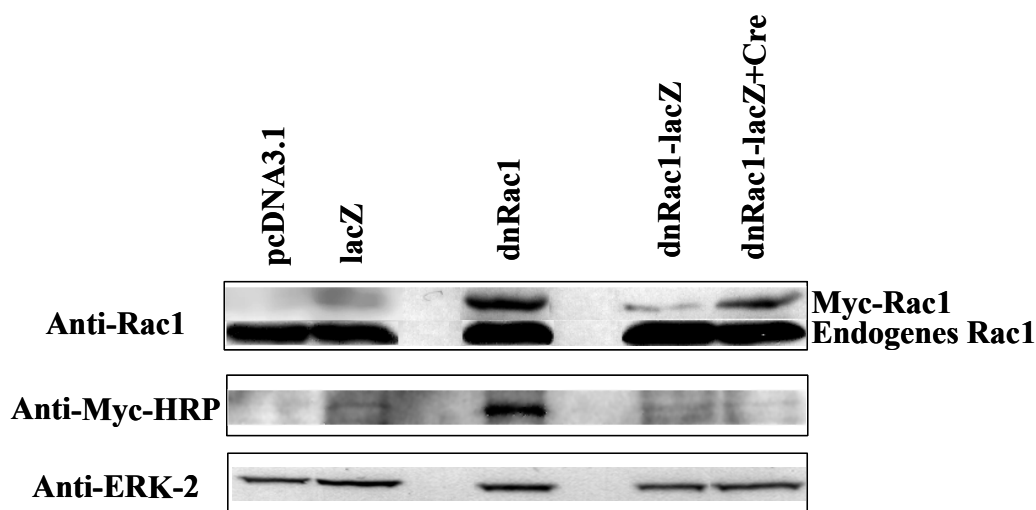


Abb.44 Funktionsüberprüfung des dnRac1-Expressionskonstrukts: die Expression von dnRac1 lässt sich *in vitro* durch cre-Rekombinase induzieren.

Subkonfluente COS-7-Zellen wurden transient mit pcDNA3.1 oder mit Expressionsvektoren für β -Galaktosidase (lacZ), dominant-negativem Rac1 (dnRac1), sowie dem dnRac1-Expressionskonstrukt alleine (dnRac1-lacZ) oder in Kombination mit einem Expressionsvektor für cre-Rekombinase (dnRac1-lacZ+Cre) transfiziert. 24 Stunden später wurden die Zellen geerntet und die Zelllysate mit Hilfe spezifischer Antikörper auf Rac1-, Myc-Epitop- und ERK-2-Proteinmenge untersucht. ERK-2 diente als interne Ladekontrolle für die aufgetragenen Proteinmengen.

In Abbildung 45 sind die Untersuchungen zur Funktionalität des RhoB-lacZ-Konstruktes in COS-7-Zellen dargestellt. Mit cre-Rekombinase und dem RhoB-lacZ-Konstrukt co-transfizierte Zellen zeigen eine deutliche RhoB-Proteinexpression, während nach Transfektion

ausschließlich mit dem RhoB-lacZ-Konstrukt RhoB im Lysat nur in sehr geringer Menge nachweisbar ist (Abbildung 45). Überexpression des Myc-RhoB durch Transfektion mit einem Myc-RhoB-Expressionskonstrukt führt zu massiver Fremdexpression der kleinen Rho-GTPase RhoB (Abbildung 45). Die Transfektion von COS-7-Zellen mit leerem pcDNA3.1 oder einem β -Gal-Expressionsvektor führt nicht zu erhöhter RhoB-Expression (Abbildung 45). Hier konnte das Ergebnis, welches mit dem anti-RhoB-Antikörper erhalten wurde, mit einem anti-c-Myc-Antikörper bestätigt werden (Abbildung 45).

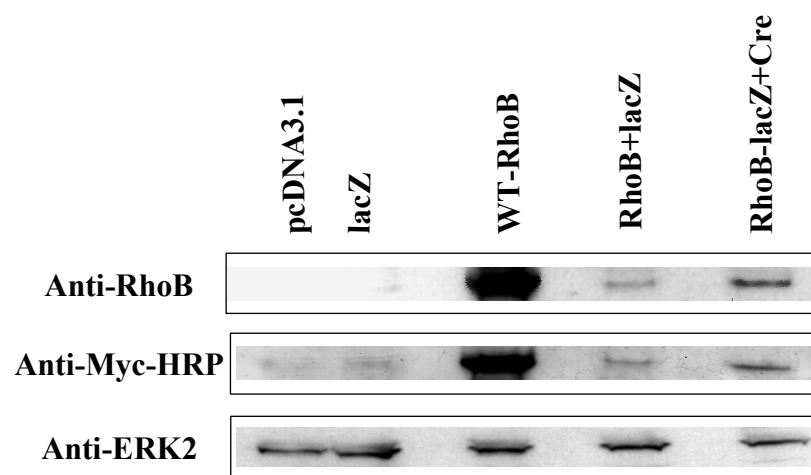


Abb.45 Funktionsüberprüfung des RhoB-Expressionskonstrukts: die Expression von RhoB lässt sich *in vitro* durch cre-Rekombinase induzieren.

Subkonfluente COS-7-Zellen wurden transient mit pcDNA3.1 oder mit Expressionsvektoren für β -Galaktosidase (lacZ), wildtyp-RhoB (WT-RhoB), sowie dem RhoB-Expressionskonstrukt alleine (RhoB-lacZ) oder in Kombination mit einem Expressionsvektor für cre-Rekombinase (RhoB-lacZ+Cre) transfiziert. 24 Stunden später wurden die Zellen geerntet und die Zelllysate mit Hilfe spezifischer Antikörper auf RhoB-, Myc-Epitop- und ERK-2-Proteinmenge untersucht. ERK-2 diente als interne Ladekontrolle für die aufgetragenen Proteinmengen.

b) Nachweis der β -Galaktosidase-Überexpression in NIH-3T3-Zellen

Im Weiteren wurden mit den klonierten Expressionskonstrukten (3.3.1) transfizierte NIH-3T3-Mausfibroblasten auf die Expression des lacZ-Gens untersucht, wobei mit einem kolorimetrischen Enzym-Immunoassay (ELISA) in den jeweiligen Zelllysaten das Genprodukt von lacZ, d.h. die β -Galaktosidase, quantitativ bestimmt wurde. Auch hier

erfolgte die Co-Transfektion mit einem Expressionsvektor der cre-Rekombinase. Abbildung 46A stellt die β -Gal-Konzentration der Lysate pro Mikrogramm transfizierten Plasmids dar. Die Überexpression von β -Gal durch Transfektion mit einem β -Gal-Expressionsvektor (lacZ) diente als Positivkontrolle. Ebenso wie das lacZ-dnRac-Konstrukt bewirkt auch das lacZ-RhoB-Konstrukt eine deutliche Proteinexpression von β -Gal. Eine Co-Expression der cre-Rekombinase in diesem Zellsystem hat bei beiden Konstrukten (lacZ-dnRac1+Cre; lacZ-RhoB+Cre) eine deutliche Abnahme der β -Galaktosidase-Expression zur Folge (Abbildung 46A). Parallel dazu wurde auch die Enzymaktivität der überexprimierten β -Galaktosidase in den entsprechend transfizierten und co-transfizierten NIH-3T3-Zellen bestimmt. Abbildung 46B zeigt, dass β -Gal-Aktivität in Zellen auftritt, die entweder mit dem lacZ-dnRac1-Konstrukt oder dem lacZ-RhoB-Konstrukt oder aber einem Expressionsplasmid für die β -Galaktosidase (lacZ) transfiziert waren. Zellen die sowohl mit dem lacZ-dnRac1-Konstrukt oder dem lacZ-RhoB-Konstrukt als auch mit dem Expressionsplasmid für die cre-Rekombinase (Cre) transfiziert waren (lacZ-dnRac1+Cre; lacZ-RhoB+Cre), zeigten eine um ca. 50 % verminderte β -Gal-Aktivität (Abbildung 46B). Als Ergebnis dieser *in vitro* Studien lässt sich somit festhalten, dass sowohl das lacZ-dnRac1-Konstrukt, als auch das Expressionssystem lacZ-RhoB unter *in vitro*-Bedingungen funktionell sind. Das den jeweiligen Rho-Sequenzen vorgeschaltete lacZ bewirkt nahezu ein Stilllegen der Genexpression der kleinen G-Proteine. Entfernen von lacZ durch ein cre-vermitteltes „Ausloxen“ ermöglicht die Expression von dnRac1 beziehungsweise RhoB.

3.3.3 Generierung und Charakterisierung transgener Mäuse

Größere Mengen an Plasmid-DNA der entsprechenden Konstrukte wurden unter endotoxinfreien Bedingungen für die Injektion in Maus-Oozyten isoliert und in präparativen Ansätzen mit Hilfe der Restriktionsenzyme Bgl II und Sma I linearisiert. Nach Aufreinigung wurden die erhaltenen Fragmente (vgl. Abbildung 39) in Injektionspuffer aufgenommen. Die Injektion eines jeden Konstruktfragments in Maus-Oozyten erfolgte durch Herrn Dr. Reifenberg (Zentrale Tierversuchseinrichtung der Universität Mainz). Die aus diesen Oozyten hervorgegangenen 25 „RhoB-Founder-“ und 25 „dnRac1-Founder-Mäuse“ wurden mit Hilfe geeigneter Primer (vgl. 2.1.6 Oligonukleotide) mittels PCR genotypisiert. Hierbei diente die

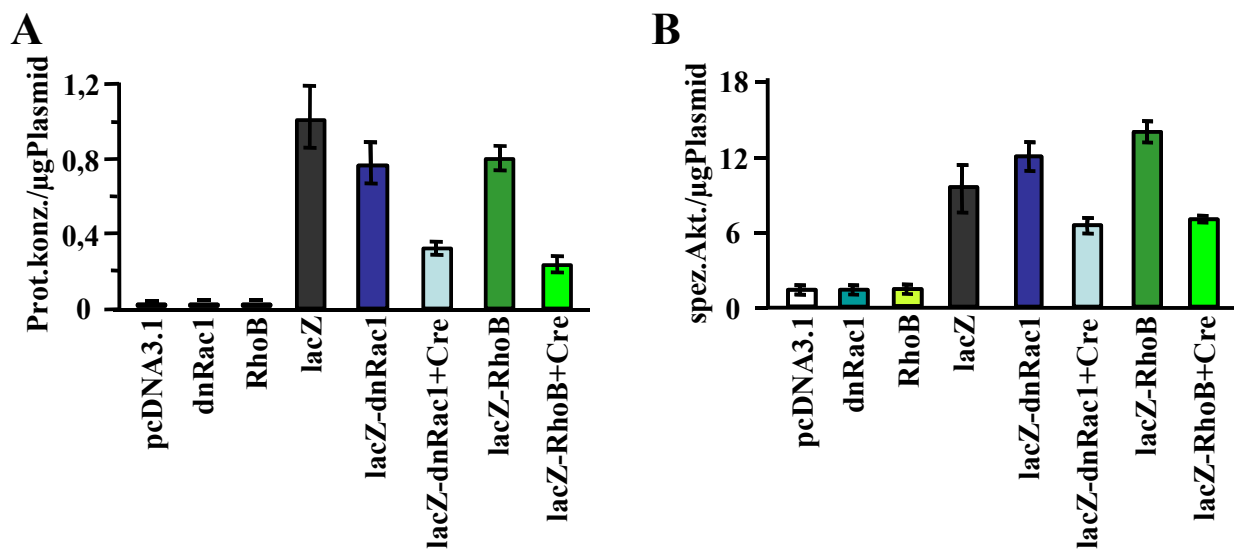


Abb.46 Funktionsüberprüfung der Rho-Protein-Expressionskonstrukte: die lacZ-Kassette der Rho-Protein-Expressionskonstrukte wird *in vitro* durch cre-Rekombinase ausgeschnitten.

A, B: Subkonfluente NIH-3T3-Mausfibroblasten wurden transient mit pcDNA3.1 oder Expressionsvektoren für β -Galaktosidase (β -Gal)(lacZ), dominant-negatives Rac1 (dnRac1), wildtyp-RhoB (RhoB), sowie dem dnRac1- bzw. RhoB-Expressionskonstrukt alleine (lacZ-dnRac1, lacZ-RhoB) oder in Kombination mit einem Expressionsvektor für cre-Rekombinase (lacZ-dnRac1+Cre, lacZ-RhoB+Cre) transfiziert. 16 Stunden später wurden die Zellen lysiert und das Zelllysat im Fall der β -Gal-Proteinbestimmung mittels Anti- β -Gal-Antikörper analysiert (A) bzw. nach β -Gal-Substrat (ONPG)-Zugabe auf die Aktivität des Enzyms hin photometrisch analysiert (B). Die quantitative Auswertung erfolgte in A und B jeweils mit Hilfe von mitgelieferten Standards. In A ist die β -Gal-Proteinkonzentration in Nanogramm pro Milliliter und Mikrogramm jeweils transfizierter Expressionsplasmid-DNA dargestellt. In B ist die spezifische β -Gal-Aktivität in Nanomol pro Minute und Milligramm und Mikrogramm jeweils transfizierter Expressionsplasmid-DNA angegeben. Die gezeigten Mittelwerte \pm Standardabweichung stammen aus mindestens zwei unabhängigen Versuchen (jeweils n = 3).

aus Schwanzbiopsien gewonnene genomische DNA als Template für eine Hot-Start-PCR mit 35 Zyklen (vgl. 2.2.4.4). Insgesamt konnten fünf der 25 RhoB-Founder-Tiere und sechs der 25 dnRac1-Founder-Tiere als positiv ermittelt werden (Abbildung 47). Diese Mäuse hatten das injizierte DNA-Konstrukt in ihr Genom integriert und sind somit Träger der Fremdgene. Die gefundenen transgenen Tiere wurden mit FVB-Wildtyp-Mäusen verpaart, um sicherzustellen, dass eine Keimbahn-Transmission der Fremd-DNA stattgefunden hat und das Transgen stabil auf die Nachkommen vererbt wird. Aus der Verpaarung gingen 60 RhoB- und 55 dnRac1-Nachkommen hervor. Nach deren Genotypisierung konnten letztendlich zwei der fünf RhoB- und fünf der sechs dnRac1-Founder-Tiere als stabile Founder identifiziert werden.

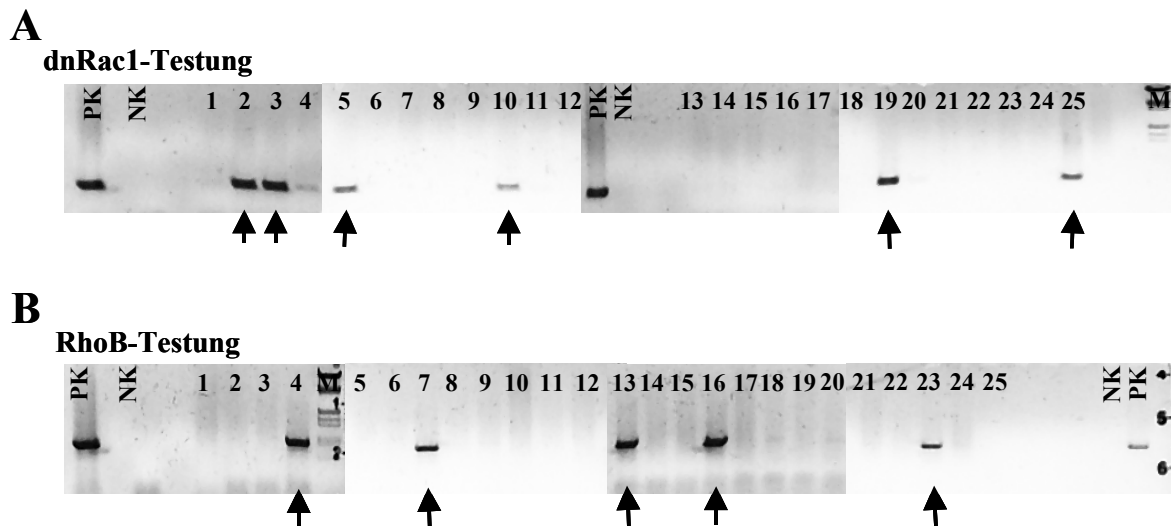


Abb.47 Genotypisierung von Rho-Founder-Tieren.

Aus Schwanzbiopsien von 25 dnRac- (A) und 25 RhoB-Founder-Mäusen (B) wurde genomische DNA isoliert und in eine Hot-Start-PCR mit 35 Zyklen als Template eingesetzt. 1/3 der PCR-Ansätze wurde auf einem 1 %-Agarosegel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid visualisiert. Die Verwendung von dnRac1- (A) bzw. RhoB-cDNA (B) als Template diente als Positivkontrolle (PK). Weitere Kontrollansätze ohne Template-DNA (Negativkontrolle, NK) belegen die Spezifität der erhaltenen Signale. Als Größenstandard (M) wurde EcoR I/Hind III-verdaute λ -DNA verwendet. A und B zeigen eine inverse Darstellung der Ethidiumbromidgefärbten Agarosegele. Genomische DNA-Präparationen, die das dnRac1- bzw. RhoB-Fragment enthalten, sind mit einem Pfeil gekennzeichnet.

In Homogenisaten verschiedener Organe der durch Genotypisierung positiv identifizierten dnRac1-Tochter-Tiere wurde die organspezifische Aktivität des gewählten UbiquitinC-Promotors mit Hilfe der β -Gal-Aktivität ermittelt. Die Bestimmung der Enzymaktivität des Reporterproteins β -Gal erfolgte in Leber-, Herz-, Lungen- und Nierengewebe. Abbildung 48A zeigt, dass sowohl in Leber, Niere, Herz als auch in der Lunge transgener "Rac1-Mäuse" im Vergleich zu den entsprechenden Organen von FVB-Wildtyp-Mäusen eine erhöhte β -Gal-Aktivität zu finden ist (vgl. auch Abbildung 48C). Während in Herz und Niere nur eine relativ geringe Expression (ca. Faktor 4) des Reportergens „lacZ“ detektierbar war, erfolgte in Leber und Lunge im Vergleich zu Wildtyp-Organen eine um den Faktor 10 bis 15 höhere β -Gal-Expression (Abbildung 48B, C). Dementsprechend lässt sich sagen, dass der gewählte UbiquitinC-Promotor des Rho-Expressionskonstrukts in den untersuchten Organen funktionell ist. In Leber und Lunge zeigt der Promotor besonders hohe Aktivität, wohingegen seine Aktivität in Niere und Herz deutlich geringer ist. Die entsprechende Untersuchung von Organlysaten positiv identifizierter RhoB-Tochter-Tiere steht noch aus. Auf Grund genetisch

identischer Vektor-Voraussetzungen beider Rho-Protein-Expressionskonstrukte (vgl. hierzu 3.3.1) werden auch bei RhoB-Tieren ähnliche Expressionsmuster erwartet.

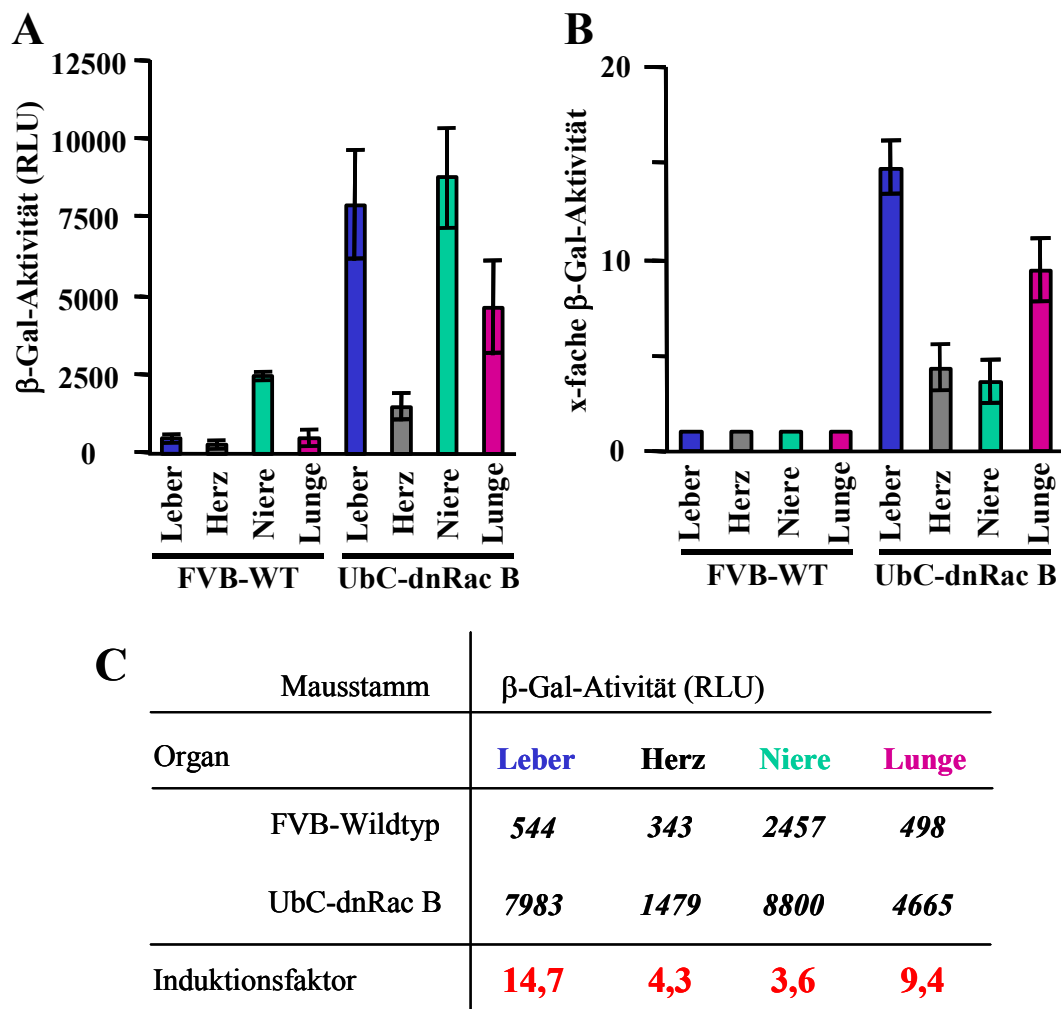


Abb. 48 Organspezifische β -Galaktosidase-Aktivität in generierten transgenen „dnRac1“-Mäusen.

A, B: Aus FVB-Wildtyp (FVB-WT)- und transgenen „dnRac1“-Mäusen (UbC-dnRac B) wurden Leber, Herz, Niere und Lunge präpariert und nach Homogenisierung auf β -Galaktosidase (β -Gal)-Aktivität mit Hilfe des Beta-Glow™-Assays (Promega) wie in „2.2 Methoden“ beschrieben analysiert. RLU = relative light units. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung aus mindestens zwei unabhängigen Messungen.

C: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse aus A und B.

4. Diskussion

Die Familie der Selektine - mit drei Mitgliedern die kleinste der vier Adhäsionsmolekül-Superfamilien - vermittelt die Adhäsion von Leukozyten an blutgefäßauskleidende Endothelzellen und an Thrombozyten. Somit initiieren die Selektine die Immunantwort bei inflammatorischen Reaktionen (McEver, 1997; Springer, 1990). Die Erkenntnis, dass vor allem der endotheliale Selektinvertreter E-Selektin den Ablauf der hämatogenen Metastasierung beginnend mit der Tumorzelladhäsion an vaskuläre Endothelzellen bis hin zur Tumorzellinvasion in umgebendes Gewebe mitbestimmt, macht die wichtige Rolle der Selektine und ihrer Expressionsregulation auch im Hinblick auf Tumorprogression und das Metastasierungs geschehen deutlich. Abbildung 49 gibt einen schematischen Überblick über die E-Selektin-vermittelte Tumorzelladhäsion an das Endothel. Die mittlerweile unbestritten bedeutende Stellung des endothelialen E-Selektins bei der Regulation von Metastasierungsprozessen einer ganzen Reihe von Tumorarten (Krause und Turner, 1999) macht dieses Adhäsionsmolekül zu einer interessanten und vielversprechenden Zielstruktur, über die in den Vorgang der Sekundärtumorentstehung eingegriffen werden könnte.

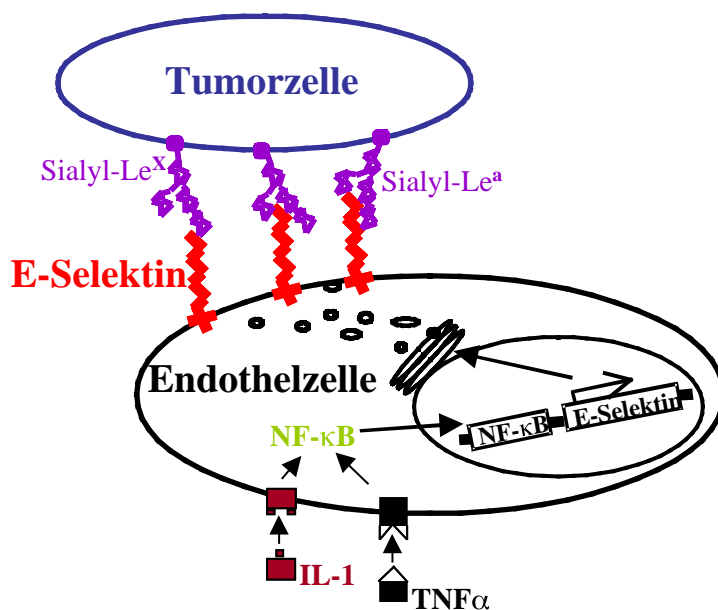


Abb.49 E-Selektin vermittelt die Adhäsion zwischen Tumor- und Endothelzellen.

Schematische Darstellung der Interaktion von Kohlenhydratstrukturen (Sialyl-Lewis X (Le^X); Sialyl-Lewis a (Le^a)) auf der Oberfläche von Tumorzellen und dem endothelialen Adhäsionsmolekül E-Selektin. Die E-Selektin-Expression wird in Endothelzellen durch inflammatorische Zytokine wie IL-1 oder TNF rezeptorvermittelt über Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB stimuliert. Nach der E-Selektin-Oberflächenexpression führt diese zur Zell-Zelladhäsion an E-Selektinliganden-präsentierende Zellen.

4.1 TNF α und γ -Strahlung induzieren endotheliale E-Selektin-Expression und Tumorzelladhäsion

Grundlage jeglicher therapeutischer Ansätze, das Metastasierungsgeschehen gezielt über Beeinflussung des Adhäsionsmoleküls E-Selektin zu modulieren, ist das Verständnis der molekularen Regulation von Gen- und Proteinexpression dieses Zelloberflächenproteins.

Eine essentielle Voraussetzung für die Expression von E-Selektin in Endothelzellen ist die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B. Im E-Selektin-Promotor existieren mindestens drei NF- κ B-Bindungsstellen, die in Kombination erkannt und gebunden werden müssen, um maximale Genexpression zu erreichen (Tozawa et al., 1995; Montgomery et al., 1990; Schindler et al., 1994; Whitley et al., 1994). Exposition mit inflammatorischen Zytokinen wie z.B. TNF α (Bevilacqua et al., 1987) oder mit ionisierender Strahlung (Hallahan et al., 1995) führt in Endothelzellen zu gesteigerter NF- κ B-Aktivität. Das inflammatorische Zytokin TNF α wird im Fall von entzündlichen Reaktionen, die auch bei maligner Tumorprogression häufig auftreten, ausgeschüttet und wirkt so über das Blut direkt auf Endothelzellen. IR belastet im Fall einer Tumor-Strahlentherapie nicht nur bestrahlte Tumorzellen, sondern auch das Tumorgefäßsystem auskleidende Endothelzellen. In Übereinstimmung mit Literaturdaten konnte gezeigt werden, dass sowohl TNF α als auch Röntgenstrahlung Endothelzellen NF- κ B-abhängig zu gesteigerter E-Selektin-Genexpression und E-Selektin-mRNA-Synthese aktivieren, was eine erhöhte Präsentation des Adhäsionsmoleküls auf der Zelloberfläche zur Folge hat. Bereits strahlentherapeutisch relevante Dosen von 2 Gray (Gy) führen zu deutlicher E-Selektin-Expression. Für das Adhäsionsmolekül E-Selektin ist eine zeitlich strikt regulierte endotheliale Expression charakteristisch. Bereits drei Stunden nach Stimulation ist die maximale Proteinexpression erreicht, die nur etwa drei bis fünf Stunden persistiert und dann stark abfällt. Als endotheliale Modellsysteme kamen bei *in vitro*-Studien primäre humane Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVEC) und die davon abgeleitete Zelllinie EA.hy-926 zum Einsatz. Während in HUVEC E-Selektin neben TNF α und ionisierender Strahlung auch mit den inflammatorischen Zytokinen IL-1 α und IL-1 β , dem Phorbol ester TPA und dem zellulären Phospholipid Lysophosphatidsäure (LPA) induzierbar ist, zeigt das Zellsystem EA.hy-926 nur bei TNF α und ionisierender Strahlung E-Selektin-Expression. Damit stellen EA.hy-926-Zellen ein geeignetes Modell dar, um die TNF α - und strahlenvermittelte E-Selektin-Expression zu untersuchen, während sie im Allgemeinen kein befriedigender Ersatz für primäre HUVEC sind. Neben Zytokinen und ionisierender Strahlung kann NF- κ B-

Aktivierung auch durch verschiedenste Formen an zellulärem Stress erfolgen, wie z.B. durch UV-C-Licht oder das Zytostatikum Doxorubicin (Bender et al., 1998; Li und Karin, 1998; Baldwin, 1996). Falls eine Aktivierung von NF- κ B ausreichen würde, E-Selektin zu induzieren, sollten dementsprechend diese beiden Agenzien die E-Selektin-Expression stimulieren können. Es zeigte sich jedoch, dass UV-C und Doxorubicin im Endothelzellsystem zwar in der Lage sind die NF- κ B-regulierte Genexpression zu aktivieren, jedoch dabei keinerlei E-Selektin-Expression induzieren. Folglich lässt sich sagen, dass die Aktivierung von NF- κ B eine notwendige, aber keine ausreichende Bedingung für die Induktion von E-Selektin in Endothelzellen darstellt.

Aktivierte, E-Selektin-exprimierende Endothelzellen zeigen ein deutlich erhöhtes Potential, Tumorzellen humaner Herkunft wie z.B. Kolonkarzinomzellen zu binden (Krause und Turner, 1999; Walz et al., 1990; Nakashio et al., 1997). Eine erhöhte Tumorzelladhäsion an Endothelien korreliert mit einer erhöhten E-Selektin-Expression und kann daher sowohl durch TNF als auch durch Röntgenstrahlung in konzentrations- bzw. dosisabhängiger Weise hervorgerufen werden. Gesteigerte Tumorzelladhäsion führt - wie zu erwarten - auch zu erhöhten Tumorzell-Transmigrationsraten durch endotheliale Monolayer. Die Tatsache, dass ionisierende Strahlung Tumorzelladhäsion an Endothelzellen induziert, ist ein bisher noch nicht beschriebenes Ereignis, das klinisch bedeutsam sein könnte. Im Fall einer Tumor-Strahlentherapie könnte es diesem Ergebnis zu Folge zu erhöhter E-Selektin-vermittelter Tumorzelladhäsion und somit zu einem gesteigerten Metastasierungsrisiko kommen. Ähnliches wäre auch bei chronischen Entzündungen im Rahmen fortgeschrittener Krebserkrankungen z.B. bei Kolonkarzinomen zu erwarten. Inwieweit diese Szenarien unter *in vivo*-Bedingungen tatsächlich auftreten, muss in zukünftigen tierexperimentellen Studien überprüft werden.

4.2 Pharmakologische Modulation der E-Selektin-Expression in Endothelzellen

4.2.1 Statine sind potente Inhibitoren der Expression von E-Selektin

Da die Tumorzelladhäsion an Endothelien unter anderem von E-Selektin vermittelt wird, sollte über die Hemmung TNF α - und IR-induzierter E-Selektin-Induktion eine verminderte Tumorzelladhäsion an derart aktivierte Endothelzellen erreicht werden können, was *in vivo* möglicherweise ein vermindertes Metastasierungsrisiko zur Folge hat. Aus Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe war bekannt, dass die NF- κ B-Aktivierung, die von TNF α und genotoxischem Stress hervorgerufen wird, durch den HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor Lovastatin blockiert werden kann (Gnad et al., 2000; Gnad et al., 2001). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte über die Bestimmung der Serin 32-Phosphorylierung von I κ B β gezeigt werden, dass Lovastatin auch in der Lage ist, die IR-vermittelte NF- κ B-Aktivierung zu verhindern. Statine stellen Hemmstoffe der Isoprenylierung kleiner G-Proteine dar, die in einigen wenigen Arbeiten als Regulatoren der Expression von Adhäsionsmolekülen in Endothelzellen beschrieben wurden (Braga et al., 1997; Clark et al., 1998; Wojciak-Stothard et al., 1999; Evers et al., 2000). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Statine interessanterweise auch die E-Selektin-Expression in Endothelzellen stark beeinflussen. Die auf ELISA, FACS, RT-PCR und Promotorstudien basierenden Experimente mit HUVEC und EA.hy-926 zeigen, dass Statine sowohl bei zytokin- als auch bei strahlenvermittelter Endothelzellaktivierung auf Ebene der Genexpression hemmend in die Regulation der E-Selektin-Induktion eingreifen. Ein wichtiger Aspekt, der den durchgeführten Studien potentiell klinische Bedeutung verleiht, ist die Beobachtung, dass bereits sehr niedrige, *in vivo* relevante Lovastatinkonzentrationen von weniger als 100 nM die E-Selektin-Expression um ca. 50 % hemmen. Konzentrationen im nanomolaren Bereich werden systemisch bei Patienten erreicht, die bei oraler Applikation täglich ca. 60 - 80 mg Statin zu sich nehmen. Die den Statinen nachgewiesenen anti-inflammatorischen Eigenschaften (Vaughan et al., 1996; Marz und Wieland, 2000; Takemoto und Liao, 2001) könnten somit unter anderem auf einer Hemmung der E-Selektin-vermittelten Leukozytenadhäsion am Endothel beruhen. Tatsächlich wird diese Hypothese durch eine Reihe von Studien gestützt (Teupser et al., 2001; Yoshida et al., 2001; Stalker et al., 2001; Prager et al., 2003; Geenwood et al., 2003). Auch die anti-thrombotischen (Lopez et al., 2001; Swiatkowska et al., 2002) und koronar protektiven Eigenschaften von Statinen (Waters et al., 1994; Sacks et al., 1996; Li und Metha,

2003) könnten zumindest teilweise auf modulierter Expression von Adhäsionsmolekülen basieren.

Statine führen insbesondere über die Hemmung der kleinen GTPase RhoA zum Zusammenbruch des Aktinzytoskeletts, was auch in Endothelzellen beobachtet wurde (Koch et al., 1997). Da E-Selektin über seine zytoplasmatische Domäne direkt mit dem Aktinzytoskelett in Verbindung steht (Yoshida et al., 1996), führt eine zytoskelettale Umstrukturierung auch zu veränderter E-Selektin-Oberflächenexpression, was hier am Beispiel einer CytochalasinD-Behandlung von Endothelzellen gezeigt werden konnte. CytochalasinD, ein zellpermeables Mycotoxin, verhindert die Aktinpolymerisation und zerstört so rasch das zelluläre Aktinfilamentsystem, ohne dass dabei TNF-Rezeptor-Signaltransduktionswege beeinträchtigt werden (Goddette und Frieden, 1986). Der Einsatz von CytochalasinD ermöglicht es somit Zytoskelett-Effekte von signaltransduktionsvermittelten Wirkungen zu differenzieren (d'Alessio et al., 1998; VandenBerg et al., 2004). Mit steigender CytochalasinD-Konzentration kommt es zu einem zunehmenden Verlust der normalen Zellmorphologie, was mit einer abnehmenden Potenz der Zellen einhergeht, E-Selektin nach Zytokinexposition auf der Zelloberfläche zu exprimieren. Die CytochalasinD-verursachte Depolarisation der endothelzellulären Aktinfilamente ist reversibel. In einer dreistündigen Erholungsphase nach CytochalasinD-Über-Nacht-Behandlung stellt sich in Endothelzellen die natürliche Zellmorphologie wieder ein und E-Selektin wird nach TNF -Stimulation in vollem Ausmaß exprimiert. Eine Über-Nacht-Behandlung von Endothelzellen mit Lovastatin führt jedoch dazu, dass selbst nach drei Stunden Erholung in Statinabwesenheit, die zytokinvermittelte E-Selektin-Expression nach wie vor blockiert ist. Außerdem kann eine deutliche Schädigung des Zytoskeletts durch niedrige Konzentrationen an CytochalasinD die TNF -vermittelte E-Selektin-Induktion nicht verhindern, was auch von anderen bestätigt werden konnte (VandenBerg et al., 2004). Darüber hinaus sind bereits geringe Statinkonzentrationen, welche noch keinen Effekt auf das Zytoskelett zeigen, in der Lage, die induzierte E-Selektin-Expression zu hemmen. Insgesamt sprechen diese Befunde dafür, dass der inhibitorische Effekt insbesondere niedriger Lovastatindosen ($< 10 \mu\text{M}$) auf die E-Selektin-Expression primär nicht auf eine zytoskelettale Umorganisation zurückgeführt werden kann. Statine scheinen vielmehr durch Hemmung isoprenylierter Proteine wie z.B. Rho- und Ras-Proteine in die Regulation der E-Selektin-Genaktivität einzugreifen. Nach langen Behandlungszeiten (> 48 Stunden) und bei hohen Statinkonzentrationen ($> 20 \mu\text{M}$) kann jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden, dass eine

Hemmung der E-Selektin-Expression auch über einen Zusammenbruch des Aktinfilamentsystems mit bedingt ist.

Untersuchungen zur TNF-Rezeptordichte nach Statinbehandlung von HUVEC zeigten, dass der TNF-Rezeptor 1 (TNF-R1) durch Lovastatin weder *per se* noch in Kombination mit TNF in seiner Oberflächenexpression verändert werden kann. Dieser Befund steht im Einklang mit Berichten, die dem TNF-R1-Promotor Eigenschaften eines nichtinduzierbaren „house-keeping-gene“-Promotors zuschreiben (Kemper und Wallach, 1993; Rothe et al., 1993). Die Präsenz von TNF-Rezeptor 2 (TNF-R2) auf der Endothelzelloberfläche lässt sich hingegen durch Lovastatin und TNF steigern. Die Induktion des TNF-R2 durch Zytokine kann mit der Existenz von NF- κ B- und AP-1-Erkennungssequenzen im 5'-nichtkodierenden Bereich des TNF-R2-Gens erklärt werden (Santee und Owen-Schaub, 1996). Die Ursache für den beobachteten stimulierenden Lovastatin-Effekt bleibt in diesem Zusammenhang jedoch unklar. Die erhaltenen Befunde widerlegen die mögliche Annahme, dass Statine die Expression von TNF-Rezeptoren hemmen und so eine Endothelzellaktivierung durch TNF als Grundlage der zytokinvermittelten E-Selektin-Expression nicht mehr möglich sein könnte. Vielmehr kann davon ausgegangen werden, dass Statin-vorbehandelte Endothelzellen sensitiver auf eine TNF-Behandlung reagieren als unbehandelte Endothelien nach Zytokinstimulation. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass prozentual gesehen mehr E-Selektin-positive Zellen in TNF-induzierten Zellpopulationen auftreten, wenn zuvor eine Behandlung mit einem HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor aus der Statinfamilie erfolgt war. Jede einzelne dieser E-Selektin-positiven Zellen zeigt jedoch statinvermittelt eine Verminderung der Zytokin-stimulierten E-Selektin-Expression. Statine rufen demnach in Endothelzellen zwei gegenläufige Effekte hervor: zum einen sensibilisieren sie die Zellen durch Hochregulation der TNF-R2-Oberflächenexpression gegenüber TNF, zum anderen hemmen sie die TNF-vermittelte Expression des endothelialen Selektins. Dies ist möglicherweise Ursache für widersprüchliche Veröffentlichungen zu diesem Themenkomplex. So berichten z.B. Dimitrova und Sadeghi eine potenzierende Statinwirkung (Dimitrova et al., 2003; Sadeghi et al., 2000), während Meroni in Übereinstimmung mit den Befunden dieser Arbeit zu dem Ergebnis kommt, dass Statine die zytokinvermittelte E-Selektin-Expression hemmen (Meroni et al. 2001).

In der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass Statine über die Hemmung der Synthese von Isopreneinheiten in die E-Selektin-Expressionsregulation eingreifen. C15- und

C20-Isopreneinheiten sind für die Aktivierung kleiner G-Proteine essentiell. Die Co-Inkubation mit Geranylgeranylpyrophosphat, nicht aber mit Farnesylpyrophosphat, vermag den inhibitorischen Effekt von Lovastatin bezüglich der E-Selektin-Expression zu revertieren. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass vor allem geranylgeranylierte Proteine bei der E-Selektin-Expression regulierend wirken. Bestätigung findet diese Hypothese in der Tatsache, dass der Geranylgeranyltransferase-Inhibitor Typ I in gleichem Ausmaß wie Lovastatin in der Lage ist, die TNF α -stimulierte E-Selektin-Expression zu hemmen, während der Farnesyltransferase-Inhibitor keinerlei Effekte zeigt. Geranylgeranylierte Proteine aus der Familie der kleinen GTPasen, die von Statinen beeinflusst werden, sind zum Beispiel Rho-Proteine (Hancock et al., 1989; Kawata et al., 1990; Gnad et al., 2000; Koch et al., 1997). Die Hemmung von Rho-Proteinen durch das Rho-inaktivierende *Clostridium difficile* Toxin A (ToxA), welches spezifisch RhoA, Rac1 und Cdc42 simultan inaktiviert (Aktories et al., 1988; Genth et al., 1999), führt zur Inhibierung strahleninduzierter E-Selektin-Expression, ohne jedoch die durch TNF α verursachte E-Selektin-Expressionssteigerung zu beeinflussen. Diese Beobachtung steht mit Befunden im Einklang, wonach clostridiale Toxine die Aktivierung von NF- κ B durch genotoxische Agenzien blockieren, nicht jedoch die durch TNF α (Gnad et al., 2001). Interessanterweise führt das spezifische Ausschalten einzelner Rho-GTPasen durch Überexpression dominant-negativer Formen von RhoB oder Rac1 bei Strahleninduktion und von RhoA, RhoB oder Rac1 bei TNF α -vermittelter Stimulierung zur vollständigen Hemmung der E-Selektin-Genexpression. Bestätigt wird dieses Ergebnis von Chen et al., die Rac1 eine essentielle Funktion bei TNF α -induzierter E-Selektin-Genexpression zuschreiben (Chen et al., 2003). Der scheinbare Widerspruch, dass konzertiertes Ausschalten mehrerer Rho-GTPasen keinen Effekt, das Ausschalten einzelner GTPasen jedoch zur Hemmung der Selektin-Expression führt, könnte folgendermaßen erklärt werden: verschiedene von ToxA gehemmte Rho-GTPasen könnten gegenläufige, also sowohl hemmende als auch aktivierende Effekte auf die E-Selektin-Genexpression ausüben und sich so gegenseitig in ihrer Wirkung aufheben. Dies hätte zur Folge, dass Rho-Proteine bei gleichzeitiger Hemmung in ihren Effekten unerkannt bleiben könnten. Solche antagonistischen Effekte wurden beispielsweise im Zusammenhang mit der Regulation von Cadherin-vermittelter Zell-Zelladhäsion und Stabilisierung von Cadherin-Catenin-Komplexen für Rho und Rac/Cdc42 berichtet (Fukata et al., 1999). Im Fall der E-Selektin-Stimulation durch γ -Strahlung konnte im Gegensatz zur Induktion durch TNF α bei Überexpression einer dominant-negativen Form von RhoA keine Hemmung erzielt werden. Dies lässt auf unterschiedliche Beteiligung von RhoA an der jeweils zu Grunde liegenden

Signaltransduktion schließen. Bestätigung findet diese Hypothese darin, dass die mit TNF maximal erreichbare E-Selektin-Expression in Endothelzellen mit Hilfe von γ -Strahlung noch weiter gesteigert werden kann. Bei Kombination von Röntgenstrahlung und TNF zeigt sich bezüglich der Expressionshöhe von E-Selektin ein nahezu additiver Effekt.

Wie mittels Hemmstoffversuchen gezeigt werden konnte, ist die Aktivierung des PI-3-Kinase-Signaltransduktionsweges für die strahleninduzierte Expression des Adhäsionsmoleküls E-Selektin essentiell, wobei in diesem Zusammenhang mitogen aktivierte Proteinkinasen wie MEK1/2 oder ERK-2 keine Rolle zu spielen scheinen. Statinbehandlung führt dazu, dass die strahleninduzierte Aktivierung der Akt-Kinase in Form einer Phosphorylierung vermindert wird. Daraus ergibt sich die in Abbildung 50 schematisch dargestellte Modellvorstellung, dass es eventuell über die γ -Strahlen-vermittelte Stimulierung der PI-3-Kinase Rho/Ras-abhängig zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B kommt. Der nach IR-Behandlung aktivierte Transkriptionsfaktor NF- κ B induziert in Endothelzellen direkt die E-Selektin-Genexpression (Hallahan et al., 1998). Über die Rolle von AP-1 kann in diesem Zusammenhang nur spekuliert werden. Die Existenz eines AP-1-responsiven Elements im E-Selektin-Promotorbereich lässt auf eine mögliche regulatorische Funktion dieses Transkriptionsfaktors schließen, was auch von anderen im Zusammenhang mit einer Zytokin-stimulierten E-Selektin-Genaktivität diskutiert wurde (Read et al., 1997; Vermeulen et al., 2003). Durch Behandlung von Endothelzellen mit ionisierender Strahlung könnte es darüber hinaus auch Rho-abhängig zu gesteigerter PI-3-Kinase-Aktivität kommen. Wie die Aktivierung des „downstream-signalings“ von PI-3- und Akt-Kinase im Zusammenhang mit der γ -Strahlen-induzierten E-Selektin-Expression steht, ist völlig unklar und bedarf weiterer Aufklärung. Der Angriffspunkt von Statinen bei diesen Signalwegen liegt wahrscheinlich in einer Reduktion der Verfügbarkeit von aktivierbaren, membrangebundenen Rho-Proteinen (Abbildung 50). Allerdings können weitere Mechanismen zur Hemmung NF- κ B-vermittelter E-Selektin-Expression durch Statine nach γ -Bestrahlung nicht ausgeschlossen werden.

4.2.2 Retinsäuren sind potente Inhibitoren der E-Selektin-Expression in Endothelzellen

Neben Statinen konnten Retinsäurederivate als effektive Hemmstoffe der stressinduzierten E-Selektin-Expression gefunden werden. Isomere der Retinsäure wie z.B. 9-cis-Retinsäure (9c-RA) und all-trans-Retinsäure (at-RA) sind Vitamin A-Derivate, die mit hoher Affinität an ihre

Rezeptoren, d.h. die ligandeninduzierbaren Transkriptionsfaktoren „retinoic-X-receptor“ RXR und „retinoic-acid-receptor“ RAR binden (Mangelsdorf et al., 1995; Mangelsdorf und Evans, 1995; Carlberg et al., 1999). Anfang der 1990er Jahre wurde der Retinsäure in einer Reihe von Berichten inhibitorische Effekte auf TNF α -induzierte Genexpression zugeschrieben (Ishii et al., 1992; Conese et al., 1991; Barstad et al., 1995). Unter anderem beeinflussen Retinsäurederivate auch die Expression von Adhäsionsmolekülen (Di Noto et al., 1996). Für das Adhäsionsmolekül E-Selektin existieren widersprüchliche Berichte, denen zu Folge at-RA keinen (Gille et al., 1997), beziehungsweise einen hemmenden Einfluß auf die zytokininduzierte Genexpression besitzt (Blankely et al., 1994). Studien mit 9c-RA waren im Fall von E-Selektin bisher nicht veröffentlicht. Ebenso existierten bisher keine Daten zum Einfluss von Retinsäure auf IR-vermittelte E-Selektin-Expression.

Die vorliegende Arbeit kommt zu dem Ergebnis, dass die verschiedenen Isomere der Retinsäure in unterschiedlicher Weise auf die Expression von E-Selektin in Endothelzellen Einfluss nehmen. In Übereinstimmung mit Literaturdaten ist das all-trans Isomer nicht in der Lage, TNF α -induzierte E-Selektin-Expression zu hemmen (Gille et al., 1997), wohingegen 9-cis-Retinsäure ein stark inhibitorisches Potential besitzt. Im Gegensatz hierzu bleibt die Röntgenstrahlen-induzierte E-Selektin-Genexpression von 9-cis-Retinsäure unbeeinflusst, während all-trans-Retinsäure hemmende Eigenschaften aufweist. Diese Befunde stellen eine weitere Bestätigung der bereits diskutierten Hypothese dar, dass zytokin- und IR-vermittelter E-Selektin-Expression unterschiedliche Regulationsmechanismen zu Grunde liegen. Die Unterschiede in der Wirksamkeit der zwei Retinsäure-Isomere könnten ihre Ursache in den verschiedenen nuklearen Rezeptoren der jeweiligen Retinsäureform haben. Demnach scheint der nukleare Rezeptor RAR, der von at-RA aktiviert werden kann, an der Signaltransduktion der strahleninduzierten E-Selektin-Expression beteiligt zu sein. Da auch 9-cis-Retinsäure in der Lage ist, RAR zu aktivieren, bleibt unklar, warum das 9-cis-Isomer die strahlenvermittelte Expression von endothelalem Selektin nicht zu modulieren vermag. Der ausschließlich durch 9c-RA aktivierbare Rezeptor RXR hingegen, scheint das „TNF α -Signaling“ zu beeinflussen. Eine bereits von anderen diskutierte Interaktion der nuklearen Retinsäurerezeptoren mit dem Transkriptionsfaktor NF- κ B, die eine DNA-Bindung von NF- κ B verhindern oder erleichtern könnte (Gille et al., 1997; Chadwick et al., 1998), kann nicht ausgeschlossen werden. Die Bindung der nuklearen Rezeptoren an ihre responsiven Promotorelemente könnte zusätzlich zu einer Konformationsänderung des Promotorbereiches führen und so die Interaktion anderer Transkriptionsfaktoren mit der DNA beeinflussen (Gille et al., 1997; Chadwick et al., 1998;

Na et al., 1999; Chen et al., 2002). Neben NF- κ B ist AP-1 ein potentiell mit RAR interagierender Transkriptionsfaktor (Benkoussa et al., 2002; Manna und Aggarwal, 2000; Zhou et al., 1999). Ebenso wie NF- κ B lässt sich im endothelialen Zellsystem AP-1 dosisabhängig durch ionisierende Strahlung aktivieren. Somit lässt sich nicht ausschließen, dass ionisierende Strahlung die Expression von E-Selektin neben der NF- κ B-Stimulierung möglicherweise auch über eine Aktivierung von AP-1 vermittelt. Die strahleninduzierte Aktivierung der zwei Transkriptionsfaktoren kann durch 9c-RA nicht beeinflusst werden, wohingegen 2 μ M at-RA zu 60 %iger Hemmung der Aktivierung beider Faktoren führt. Wie die beobachtete Hemmung strahlenvermittelter E-Selektin-Expression durch all-trans-Retinsäure mechanistisch erfolgt, kann mit den vorliegenden Befunden nicht beantwortet werden. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass at-RA ausschließlich über Hemmung der NF- κ B-Aktivierung die IR-induzierte E-Selektin-Expression verhindert, ohne dass eine verminderte AP-1-Aktivität von Bedeutung wäre. Zum anderen könnte die parallele Blockade der AP-1-Aktivität durch at-RA zusätzlich negativen Einfluss auf strahleninduzierte E-Selektin-Expression haben.

Abbildung 50 gibt in schematischer Weise einen zusammenfassenden Überblick über die Signaltransduktion TNF- α und -Strahlen-induzierter E-Selektin-Expression in Endothelzellen, die - wie in dieser Arbeit gezeigt wurde - direkt zur Tumorzelladhäsion an Endothelien führt.

4.3 Hemmung der E-Selektin-Expression führt zu verminderter Tumorzelladhäsion und -diapedese

Die bisher diskutierten Ergebnisse führen zu der Frage, ob es möglicherweise ausreichend sein könnte, über Hemmung der induzierten E-Selektin-Expression mittels Statinen oder Retinsäuren eine deutliche Reduktion der Tumorzelladhäsion an Endothelzellen zu erreichen. Grundsätzlich kann nicht davon ausgegangen werden, dass durch Blockade einzelner beteiligter Komponenten der sehr komplex organisierte und über eine Vielzahl von Adhäsionsmolekülen vermittelte Zell-Zelladhäsionsprozesses signifikant zu hemmen ist. Neben den eigenen Befunden waren es einige wenige Literaturdaten, die dennoch zur Überprüfung dieser Hypothese Anlass gaben.

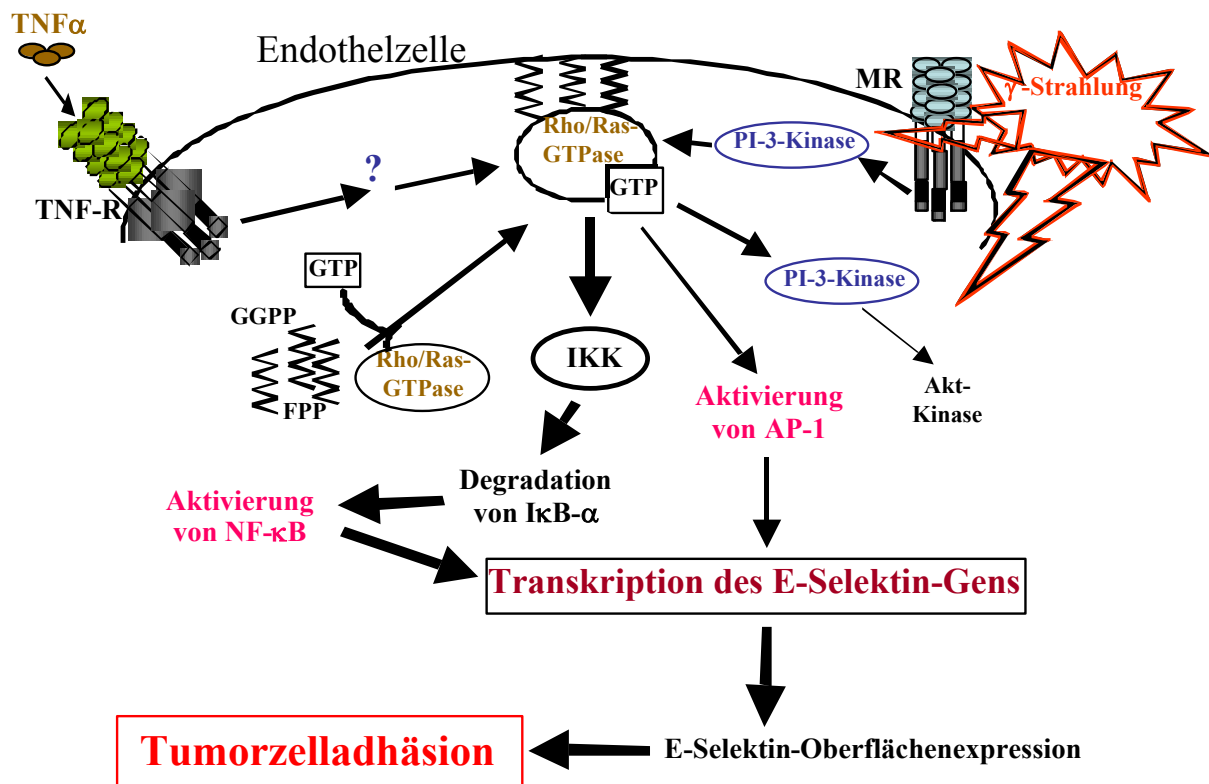


Abb.50 Die Signaltransduktion E-Selektin-vermittelter Tumorzelladhäsion an Endothelzellen - ein schematisches Modell.

Das inflammatorische Zytokin TNF α induziert nach Rezeptorstimulation (TNF-R) Rho-abhängig die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B in Endothelzellen. γ -Strahlung aktiviert wahrscheinlich über Stimulierung von Membranrezeptoren (MR) Rho-abhängig die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 und die PI-3-Kinase in Endothelzellen. Aktiviertes NF- κ B führt zu erhöhter E-Selektin-Gen- und -Oberflächenexpression, welche ihrerseits eine erhöhte Tumorzelladhäsion an Endothelzellen zur Folge hat. (FPP=Farnesylpyrophosphat, GGPP=Geranylgeranylpyrophosphat)

Die Ergebnisse der Arbeitsgruppen um Omi und Bernot, die Statine als effektive Inhibitoren der Leukozytenadhäsion an Endothelien charakterisieren (Omi et al., 2003; Bernot et al., 2003) führten zu der Annahme, dass Tumorzellen bezüglich ihres adhäsiven Potentials in ähnlicher Weise wie weiße Blutzellen zu beeinflussen sein könnten. Des Weiteren diskutierten verschiedene Autoren die Möglichkeit durch Hemmung von NF- κ B mit z.B. N-Azetyl-L-Cystein, Aspirin, Pentoxifyllin oder Homocystein die Adhäsion von Tumorzellen an Endothelzellen zu blockieren (Tozawa et al., 1995; Roth et al., 2001). Da Statine und Retinsäure über eine Hemmung der NF- κ B-Aktivität wirken, bestehen auch zu diesen Arbeiten direkte Parallelen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte diesbezüglich der überaus überraschende Befund erhalten werden, dass die gefundenen Hemmstoffe der E-Selektin-Expression in Form von Retinsäure und Statinen tatsächlich die E-Selektin-

vermittelte Tumorzelladhäsion an Endothelzellen reduzieren. Bereits niedrige Dosen an Lovastatin (0,1 - 1 μ M) führen im Fall endothelialer TNF -Stimulation zu signifikanter Verminderung der Adhäsion und der transendothelialen Migration von Kolonkarzinomzellen. Für die TNF -stimulierte Adhäsion von Tumorzellen konnte auch mit 9-cis-Retinsäure ein potenter Inhibitor gefunden werden. Das all-trans-Retinsäure-Isomer zeigte hier keinerlei Effekt. Interessanterweise lässt sich die zytokinvermittelte Endothel-Transmigration von Tumorzellen sehr effektiv sowohl durch 9-cis- als auch durch at-RA hemmen. Dieses Ergebnis lässt schließen, dass bei der Diapedese im Vergleich zur Adhäsion andere oder weitere Faktoren essentiell beteiligt sind, die von at-RA negativ beeinflusst werden. Somit ist zwar die Adhäsion, nicht aber die Tumorzell-Transmigration nach Behandlung von Endothelzellen mit der all-trans-Form der Retinsäure möglich. Schlussfolgernd lässt sich sagen, dass nicht jeder Hemmstoff der Tumorzelladiapedese in der Lage ist, den Vorgang der E-Selektin-abhängigen Tumorzelladhäsion zu blockieren. Die strahlenvermittelte Anheftung von Tumorzellen am Endothel konnte erwartungsgemäß mit Lovastatin, aber auch mit all-trans-Retinsäure effizient gehemmt werden. Der effektive Inhibitor zytokinvermittelter Tumorzelladhäsion und -diapedese, nämlich 9-cis-Retinsäure, zeigt im Fall von -Strahlung keine inhibitorische Potenz. Auf Grund der hier diskutierten Ergebnisse, lässt sich festhalten, dass Retinsäurederivate und Statine die Adhäsivität und Invasivität von Tumorzellen mitbestimmen, indem sie die Adhäsionsmolekül-Expression durch Interaktion mit NF- κ B beeinflussen. Über eine mögliche inhibitorische Funktion der Retinsäure im Metastasierungs geschehen wurde schon mehrfach spekuliert (Di Noto et al., 1996; Marchetti et al., 1996; Taraboletti et al., 1997; Brown et al., 1999; Farina et al., 2002). Abbildung 51 gibt schematisch einen Überblick über die in dieser Arbeit diskutierten Möglichkeiten, E-Selektin-vermittelte Tumorzelladhäsion an Endothelzellen zu blockieren.

Zelladhäsionsvorgänge an Endothelien sind jedoch nicht nur von E-Selektin abhängig. Daher könnte die Verminderung der Tumorzelladhäsion durch Statine und Retinsäurederivate auch auf einer Hemmung anderer zytokin- oder strahleninduzierbarer Adhäsionsmoleküle basieren. Der auf Endothelzellen exprimierte Vertreter der Immunglobulin-Superfamilie ICAM-1 ist wie E-Selektin ein derart induzierbares Adhäsionsmolekül (Sadeghi et al., 2000; Meroni et al., 2001; Son et al., 2001; Prabhakarandian et al., 2001). In entsprechenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass weder Lovastatin noch Retinsäure in den Konzentrationsbereichen, in denen sie die E-Selektin-Expression inhibieren, Einfluss auf die zytokin- bzw. strahlenvermittelte ICAM-1-Induktion nehmen.

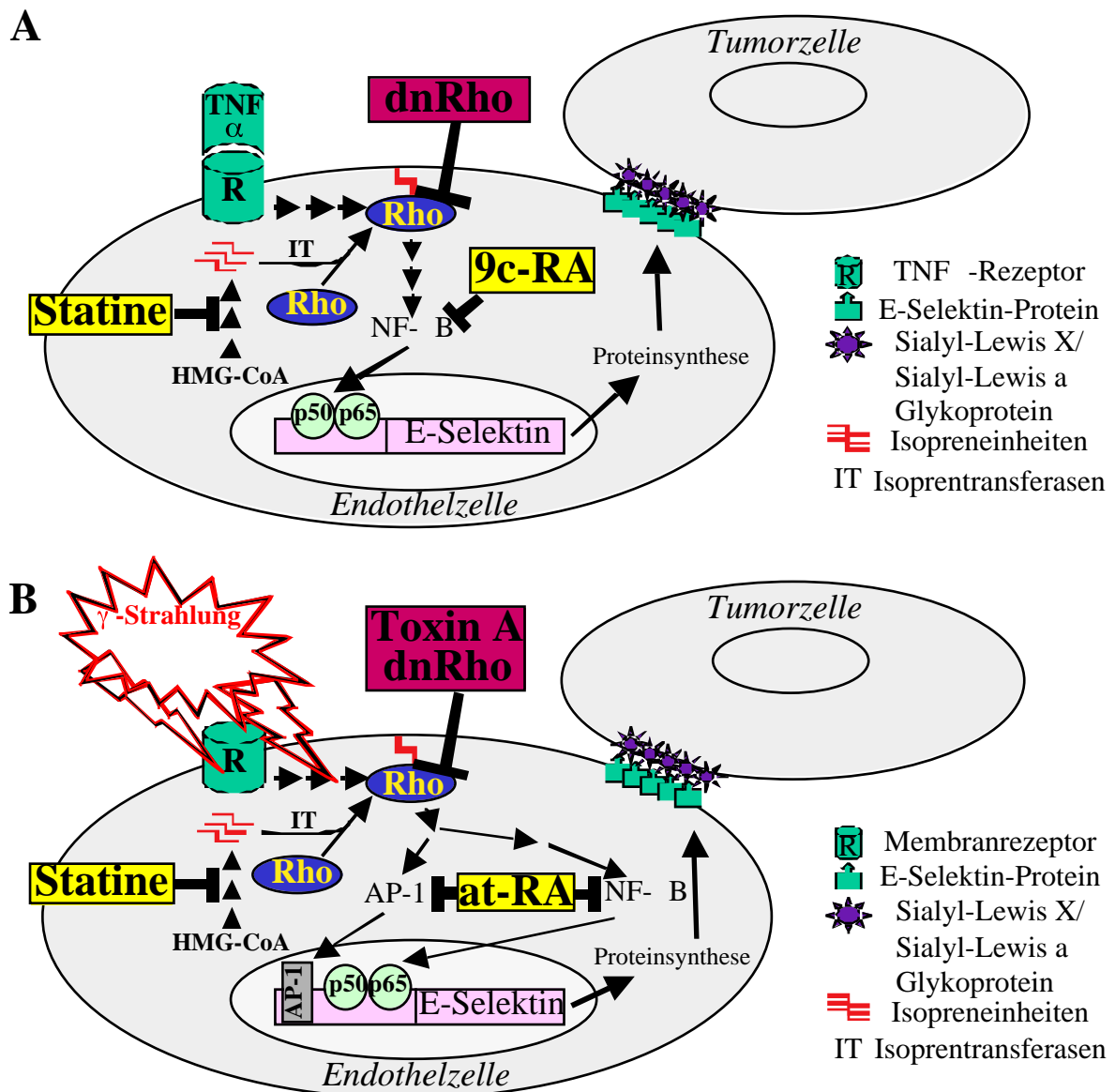


Abb.51 Ansatzpunkte zur pharmakologischen Hemmung der E-Selektin-vermittelten Tumorzelladhäsion an Endothelzellen nach TNF α - bzw. IR-Stimulation.

Statine, Retinsäure-Isoformen, *Clostridium difficile* Toxin A und dominant-negative Formen von Rho-Proteinen (dnRho) sind in der Lage, TNF- α - (A) bzw. IR-induzierte (B), endotheliale E-Selektin-Expression und E-Selektin-vermittelte Tumorzelladhäsion zu blockieren. Statine reduzieren die intrazellulären Konzentrationen an Isopreneinheiten, die für die carboxyterminale Isoprenylierung von Rho-Proteinen durch Isoprenyltransferasen (IT) benötigt werden. Isoprenylierungen sind für eine korrekte Lokalisation und damit die Funktionalität von Rho-Proteinen essentiell. Statine verhindern somit eine Rho-abhängige NF- κ B-Aktivierung. Toxin A und dominant-negative Rho-Proteine blockieren die Rho-abhängige Aktivierung von NF- κ B, indem sie letztendlich Rho-Protein-Effektorkopplungen verhindern. 9-cis-Retinsäure (9c-RA) (A) und all-trans-Retinsäure (at-RA) (B) hemmen ohne direkten Einfluss auf Rho-Proteine die Aktivierung von NF- κ B. Im Fall von IR wird durch at-RA zusätzlich die Aktivierung von AP-1 blockiert. Eine direkte Interaktion der RAs mit den genannten Transkriptionsfaktoren kann hierbei nicht ausgeschlossen werden.

Lovastatindosen höher als 50 μM , die zu massiver Schädigung des Zytoskeletts der Endothelzellen führen, vermindern sehr wahrscheinlich auf unspezifische Art und Weise die zytokinstimulierte ICAM-1-Expression. Für ICAM-1 gibt es wie für E-Selektin bezüglich der Effekte von Statinen widersprüchliche Literaturdaten. Während Sadeghi (Sadeghi et al., 2000) von einer die ICAM-1-Expression potenzierenden Statinwirkung berichtet, kommen Meroni (Meroni et al., 2001) und Greenwood (Greenwood et al., 2003) zu dem Ergebnis, dass Statine die zytokininduzierte ICAM-1-Expression blockieren. Hierbei ist anzumerken, dass sich Greenwood mikrovaskulärer Gehirnendothelzellen bedient. Mikrovaskuläre Endothelzellen stellen organspezifisch differenzierte Zelltypen dar und weisen in vielerlei Hinsicht andere Eigenschaften als makrovaskuläre HUVEC auf (Chi et al., 2003). Sadeghi und Meroni verwendeten in ihren Studien mit Simvastatin bzw. Fluvastatin andere Statinformen als das in dieser Arbeit eingesetzte Lovastatin, worin ebenfalls Diskrepanzen mit den beschriebenen Ergebnissen begründet liegen könnten. P-Selektin, ein weiterer Selektinvertreter, der neben E-Selektin auf Endothelzellen exprimiert ist, lässt sich in Übereinstimmung mit Literaturdaten in seiner Expression weder durch IR (Hallahan et al., 1996; Weinmann et al., 2000) noch durch das Zytokin TNF (Khew-Goodall et al., 1996; Raab et al., 2002) steigern. Darüber hinaus hat eine Behandlung von Endothelzellen mit Retinsäuren oder Statinen keinen Einfluss auf die geringe Basalexpression von P-Selektin. Daher scheint auch P-Selektin im Zusammenhang mit seiner möglichen Beteiligung an zytokin- und IR-vermittelter Tumorzelladhäsion ein vernachlässigbarer Faktor zu sein. Auf Grund dieser Befunde kann davon ausgegangen werden, dass die Hemmung von Adhäsion und Diapedese von Tumorzellen an bzw. durch Endothelien mit Hilfe von Statinen und Retinsäurederivaten nicht über Beeinflussung der endothelialen Expression von ICAM-1 oder P-Selektin, sondern primär durch Blockade der E-Selektin-Expression erfolgt. Die diskutierten Ergebnisse bestätigen nochmals die Relevanz von E-Selektin bei der Regulation maligner Adhäsions- und Transmigrationsereignisse.

Kritische Überlegungen bezüglich des Mechanismus der statinvermittelten Hemmung von zytokin- und strahleninduzierter Tumorzelladhäsion an Endothelien führten zu der Frage, ob Stickstoffmonoxid-abhängige Ereignisse in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen könnten. Statine sind als Stimulantien der endothelialen Stickstoffmonoxid (NO) - Synthase (eNOS) beschrieben (Dobrucki et al., 2001; Laufs et al., 1998). Eine Stickstoffmonoxid-Freisetzung führt neben Vasodilatation auch zu verminderter Zelladhäsion am Endothel (Benjamim et al., 2002; Hickey et al., 2001). Im betrachteten Zeitfenster von 16 Stunden

konnte in HUVEC durch Lovastatin jedoch keine eNOS-Aktivierung nachgewiesen werden. Literaturdaten zufolge wird eine NO-Synthese erst 24 Stunden nach eNOS-Aktivierung gemessen (Bereta et al., 1994; Goodstone und Hardingham, 2002). TNF seinerseits zeigt ebenfalls keine eNOS-aktivierenden Eigenschaften, was mit der verfügbaren Literatur im Einklang steht. Shinoda und Kollegen berichten keinen Einfluss von TNF auf die NO-Synthase (Shinoda et al., 2002), Mohamed und Yoshizumi beschreiben eine TNF-vermittelte eNOS-Expressionshemmung (Yoshizumi et al., 1993; Mohamed et al., 1994). Im Fall von γ -Strahlung ist eine Stimulierung der Stickstoffmonoxid-Synthase berichtet worden. Leach und Mitarbeiter beschreiben die Aktivierung der NOS durch 1 - 5 Gray jedoch als ein sehr frühes Ereignis innerhalb der ersten 3 - 5 Minuten, das vier Stunden nach Bestrahlung keine Auswirkungen mehr zeigt (Leach et al., 2002). Alles in allem ist es demnach sehr unwahrscheinlich, dass Statine die Tumorzelladhäsion über die Stimulation der NO-Synthase beeinträchtigen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass einer erhöhten Adhäsion zirkulierender Tumorzellen an das Endothel mit Statinen und Retinsäure über die Hemmung stressinduzierter E-Selektin-Expression entgegengewirkt werden kann. Vor allem im Verlauf von inflammatorischen Prozessen oder im Rahmen einer Tumor-Strahlentherapie sollte auf Grund der diskutierten Daten von einem erhöhten Metastasierungsrisiko ausgegangen werden. Insbesondere die klinisch gut erforschten Statine, für welche bereits anti-metastatische Wirkungen postuliert wurden (Mehta et al., 1998; Alonso et al., 1998; Matar et al., 1998; Matar et al., 1999; Mehta, 2003), aber auch Retinsäurederivate sollten demnach im Rahmen weiterer Studien bezüglich ihrer potentiellen anti-tumorigenen Eigenschaften weiter charakterisiert werden.

4.4 Lovastatin schützt Endothelzellen vor der Zytotoxizität von γ -Strahlung

Auf Grund einer möglichen klinischen Relevanz der gefundenen Ergebnisse liegt die Frage nahe, inwieweit das bisherige Wissen auf Szenarien des klinischen Alltags übertragbar ist. In einem fiktiven Fallbeispiel, bei dem eine Strahlentherapie in Anwesenheit von Statinen erfolgt, würden diese Pharmaka in Kombination mit ionisierender Strahlung auf Endothelien und Tumorzellen einwirken. Ein solcher Fall könnte beispielsweise dann eintreten, wenn ein Krebspatient wegen weiterer Erkrankungen bereits mit Statinen - zum Beispiel zur

Lipidsenkung - therapiert würde. Dieses durchaus vorstellbare Szenario wirft die Frage auf, ob die therapeutische Wirkung von γ -Bestrahlung durch Statine beeinflusst werden könnte, das heißt ob die Effizienz von Primärtumor-Bestrahlungen und das Ausmaß auftretender Nebenwirkungen verändert sein könnte.

γ -Bestrahlung von Endothelzellen hat einen stark negativen Einfluss auf die DNA-Replikationsaktivität und die Vitalität exponierter Zellen. Interessanterweise können Zellen endothelialer Herkunft vor der Zytotoxizität von γ -Strahlen durch Statinvorbehandlung geschützt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass Lovastatin humane Endothelien vor strahlenvermittelter Hemmung der DNA-Replikation schützt, wobei in statinbehandelten Endothelzellen nach γ -Bestrahlung ähnlich hohe DNA-Replikationsraten zu beobachten waren, wie in unbestrahlten Zellen. Auch die Zellvitalität ist in Lovastatinvorbehandelten HUVEC nach Behandlung mit ionisierender Strahlung deutlich höher als in bestrahlten aber nicht statinbehandelten Zellen. Überraschenderweise konnte auch die IR-induzierte Apoptose von Endothelzellen durch den HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor Lovastatin verhindert werden. Dieses Ergebnis bestätigt eine grundsätzlich anti-apoptotische Wirkung von Statinen, wie sie bereits in einigen Arbeiten im Zusammenhang mit anderen Apoptose-induzierenden Agenzien wie UV-Licht (von Bardeleben et al., 2003) oder anti-neoplastisch wirkenden Pharmaka (von Bardeleben et al., 2002) und der Induktion des programmierten Zelltodes durch Hungern von Zellen bei Serumdepletion (Llevadot et al., 2001) beschrieben wurde. Der erhaltene Befund steht jedoch im vermeintlichen Widerspruch zu einer Reihe von Arbeiten, in denen für Statine pro-apoptotische Effekte diskutiert wurden. Den Berichten zu Folge induzieren Statine zelltypspezifisch in glatten Muskelzellen den programmierten Zelltod über mitochondrial vermittelte Signalwege, was zusätzlich von einer Sensibilisierung der Zellen gegenüber dem Fas-Liganden begleitet ist (Knapp et al., 2000; Buemi et al., 1999; Blanco-Colio et al., 2002; Ogata et al., 2002). Neben diesen muskelzellspezifischen, pro-apoptotischen Statineffekten wurde eine Apoptose-Induktion durch Statine in Tumorzellen beschrieben (Wong et al., 2002; Dimitroulakos et al., 2000; Xia et al., 2001). Statin-induzierte Endothelzell-Apoptose ist bisher nur von drei Arbeitsgruppen berichtet worden. Urbich und Kaneta finden bei Statinkonzentrationen $10 \mu\text{M}$ bereits nach 24 Stunden eine Zunahme apoptotischer Ereignisse (Urbich et al., 2002; Kaneta et al., 2003). Diese Befunde sind mit den in der vorliegenden Arbeit gefundenen Ergebnissen grundsätzlich in Einklang zu bringen, als dass hier für Lovastatin nach 16-stündiger Behandlung mit hohen Konzentrationen ($20 \mu\text{M}$) und zu späten Zeitpunkten (96 Stunden) ein

signifikant pro-apoptisches Potential (ca. 20 % Apoptose) nachgewiesen werden konnte. Wichtig festzuhalten bleibt allerdings, dass bei therapeutisch relevanten Konzentrationen 1 μM erst nach 96 Stunden mit nur etwa 3 % apoptotischen Ereignissen eine sehr geringe Apoptosefrequenz beobachtet wurde. Berichte von Li et al., dass 10 μM Lovastatin die Apoptoserate in HUVEC um den Faktor drei steigern, sind mit den Daten dieser Arbeit nicht vergleichbar. Bei Li und Kollegen handelt es sich um Dauerbehandlungen der Endothelien mit Lovastatin über eine Zeitspanne von 48 Stunden, was zu gesteigertem endothelialen Zellsterben führte (Li et al., 2002).

Die von Lovastatin in Endothelzellen vermittelte Resistenz gegenüber ionisierender Strahlung ist sehr wahrscheinlich nicht durch Hemmung der Fas-Rezeptor-Signaltransduktion vermittelt, da Antikörper, die den Fas-Rezeptor aktivieren, nicht in der Lage sind, die Vitalität der HUVEC zu beeinflussen oder gar Apoptose zu induzieren. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre eine sehr geringe Fas-Rezeptor-Expression auf der Zelloberfläche von primären HUVEC. Auch eine Vorbehandlung mit ionisierender Strahlung kann Endothelzellen nicht für die Fas-vermittelte Apoptose sensibilisieren. Im Fall der tumorzellspezifischen, pro-apoptischen Effekte von Statinen ist unbestritten, dass über den mitochondrialen Apoptose-Signalweg, d.h. durch verminderte Bcl-2-Expression, das zelluläre Überleben reduziert wird (Blanco-Colio et al., 2002; Wong et al., 2002; Dimitroulakos et al., 2000). Somit könnte es möglich sein, dass Statine auch in Endothelzellen den Fas-unabhängigen, mitochondrialen Apoptose-Signalweg beeinflussen. Die bereits 12 Stunden nach Behandlung mit γ -Strahlung in Endothelzellen beobachtete verminderte Expression des anti-apoptischen Bcl-2 beruht möglicherweise auf strahleninduzierter Stimulation proteasomaler Proteindegradation. Die Tatsache, dass die IR-vermittelte Reduktion des Bcl-2-Expressionslevels auch 24 Stunden nach Bestrahlung persistiert und darüber hinaus bereits nach 48 Stunden deutliche Endothelzell-Apoptose detektierbar ist, spricht jedoch für eine mitochondrial ausgelöste Apoptosesignalkaskade. Interessanterweise lässt sich diese Apoptose-einleitende, zelluläre Antwort der Endothelzellen auf Exposition mit ionisierender Strahlung durch Vorbehandlung mit Lovastatin verhindern. Anti-apoptisch wirkendes Bcl-2 bleibt nach Statinvorbehandlung in seiner Expression nach γ -Bestrahlung unverändert hoch und parallel dazu werden deutlich geringere Apoptoseraten detektiert. Das pro-apoptische Bax hingegen lässt sich in seiner Expression weder durch ionisierende Strahlung noch durch Lovastatin beeinflussen. Die Entscheidung einer Zelle, nach Schädigung über den mitochondrial vermittelten Weg Suizid zu begehen, wird maßgeblich durch das zelluläre Proteinverhältnis von Bcl-2 und Bax

determiniert (Adams et al., 1998). Eine Beeinflussung des Bcl-2 / Bax-Gleichgewichts führt zu einem veränderten Resistenzverhalten der Zelle (Yin et al., 1994; Oltvai et al., 1993). Im Fall einer Lovastatinbehandlung von Endothelzellen wird der Bcl-2 / Bax-Protein-Quotient zu Gunsten des anti-apoptotischen Bcl-2 verändert, was die beobachteten protektiven Effekte von Lovastatin im Fall von γ -Strahlung erklären könnte. Jedoch sind noch weitere Untersuchungen nötig, um die auf der bisherigen Datenlage basierende Hypothese zu bestätigen. Beispielsweise sollten eine Analyse des p53-Expressionsstatus sowie Aktivitätsassays verschiedener Apoptose-induzierender Caspasen weitere Aufschlüsse über die anti-apoptotische Natur von Statinen geben. Der Befund, dass die Aktivierung des anti-apoptotisch wirkenden Transkriptionsfaktors NF- κ B (Liu et al., 1996; Madrid et al., 2000) durch Lovastatin gehemmt wird, steht im Widerspruch zu den beobachteten protektiven Statineffekten. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass Statine neben einer Hemmung von NF- κ B die Aktivierung anderer anti-apoptotisch wirkender Signalmoleküle fördern. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, dass pro-apoptotisch wirkende Faktoren inhibiert werden, die im hier diskutierten Fall von γ -Strahlen-vermittelter Zytotoxizität in ihren Effekten überwiegen könnten. Die potentielle Hemmung oder Aktivierung von pro- und / oder anti-apoptotischen Faktoren und damit ihres „down-stream-signalings“ durch niedrig dosierte Statine, macht diese HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren zu effektiven Zell-Protectoren vor Schädigungen durch die in der Tumorthherapie verwendete ionisierende Strahlung.

4.5 Tierexperimentelle Bestätigung der *in vitro*-Befunde

Auf Basis der vorliegenden *in vitro*-Ergebnisse lässt sich festhalten, dass inflammatorische Ereignisse sowie therapeutische Strahlenbehandlungen ein erhöhtes Metastasierungsrisiko mit sich bringen könnten. Möglicherweise könnte diesem Risiko durch Einsatz von Statinen begegnet werden. Weiterhin lässt die Datenlage keinen Zweifel daran, dass Statine das Resistenzverhalten zellulärer Systeme gegenüber den zytotoxischen Wirkungen von ionisierender Strahlung und von Zytostatika wie Doxorubicin oder Etoposid (von Bardeleben et al., 2002) positiv beeinflussen und sogar anti-apoptotische Effekte zeigen. Für weiterführende Erkenntnisse, die die *in vivo*-Relevanz der Daten belegen könnten, sind geeignete tierexperimentelle Untersuchungen und klinische Studien notwendig. Auf Grund der Befunde, dass die E-Selektin-vermittelte Tumorzelladhäsion an Endothelien ein von Rho-GTPasen vermitteltes Ereignis ist und Rho-GTPasen funktionell relevante „Target“-Proteine

von Statinen darstellen, sollten transgene Tiere generiert werden, die in ihrer Rho-Expression verändert sind. Die Tatsache, dass bis auf „RhoB-knock-out“-Mäuse (Liu et al., 2000, Liu et al., 2001a) keine weiteren Rho-transgenen Tiere verfügbar sind, verdeutlicht die Relevanz und Notwendigkeit dieses Vorhabens. Die Generierung transgener „RhoB-“ und „dnRac1-Mäuse“ stellt eine vielversprechende Strategie dar, um die in dieser Arbeit erhaltenen Befunde, dass sowohl RhoB als auch Rac1 als wichtige Vermittler der Adhäsionsmolekül-Expression und der Selektin-abhängigen Tumorzelladhäsion wirken, *in vivo* zu bestätigen. Für Rac1 existieren diesbezüglich bestätigende Indizien in einer von Chen et al. veröffentlichten Arbeit (Chen et al. 2003). Darüber hinaus finden sich in der Literatur Hinweise auf eine Beteiligung der Rho-GTPase Rac1 an der stressinduzierten Signaltransduktion (Li et al., 1999) und der Regulation molekularer Grundlagen des Resistenzverhaltens gegenüber zellulärem Stress (Murga et al., 2002). Auch für das Signalmolekül RhoB wurde eine Beteiligung am Tumorgenese geschehen (Fritz et al., 1999; Liu et al., 2001a) und an der Vermittlung zellulärer Resistenz gegenüber zytotoxischen Agenzien diskutiert (Fritz et al., 2003; Liu et al., 2000; Lebowitz und Prendergast, 1998).

Die in dieser Arbeit generierten, transgenen Mausmodelle bieten den Vorteil, dass ein dem Rho-Protein vorgeschalteter lacZ-Genabschnitt die Transkription des Rho-Proteins verhindert und damit das Maussystem „quasi-induzierbar“ macht. Erst durch Kreuzung mit cre-Rekombinase-positiven Tieren kann es in den Nachkommen zur Rho-Proteinexpression kommen, die unter der Kontrolle eines humanen UbiquitinC-Promotors erfolgt. Außerdem ermöglicht der Einsatz des β -Galaktosidase-Reportersystems eine Bestimmung der Organverteilung fremdexprimierter Proteine im transgenen Tier. In Organen mit β -Galaktosidase-Aktivität ist nach „Ausloxen“ des lacZ durch organspezifische cre-Rekombinasen die Expression des jeweiligen Rho-Proteins zu erwarten. Mit diesen Tiermodellen, die eine organspezifische Rho-Protein-Fremdexpression ermöglichen, liegt ein System vor, das es erlaubt, sich über die in dieser Arbeit beschriebenen Rho-abhängigen und E-Selektin-vermittelten molekularen Mechanismen der Tumorprogression und Metastasierung *in vivo* mehr Klarheit zu verschaffen. Außerdem ist es jetzt möglich, die mechanistischen Grundlagen der zur Zeit intensiv diskutierten anti-tumorigenen und anti-metastatischen Eigenschaften von Statinen als hochpotente Rho-Hemmstoffe (Mehta, 2003) am lebenden Tier zu erforschen. Diese „Rho-Tiermodelle“ bieten des Weiteren die Möglichkeit, neue tumortherapeutische Strategien zu überprüfen, die auf der Hemmung von Rho-GTPasen basieren. Mit Sicherheit wird es jedoch noch einige Jahre intensiver Forschung in Anspruch

nehmen, bis die Wirksamkeit von Statinen im komplexen Prozess der Tumorzellmetastasierung vollständig nachgewiesen und mechanistisch verstanden ist. Dies sind die Voraussetzungen für einen routinemäßigen klinischen Einsatz dieser Pharmaka in der Tumorthherapie.

5. Zusammenfassung

Das Problem einer Tumorerkrankung ist in vielen Fällen nicht der Primärtumor, der oft mit lokalen – meist chirurgischen - Maßnahmen behandelbar ist, sondern die Metastasierung von Tumorzellen. Bei Metastasierungsprozessen lösen sich einzelne maligne Zellen aus dem Zellverband des Primärtumors und dringen in Blut- und Lymphgefäße ein. In anderen Körperregionen verlassen die Tumorzellen die Gefäße wieder und vermehren sich. Schließlich entstehen klinisch nachweisbare Metastasen, die oft nicht mehr kurativ therapierbar sind. Solche hämatogen metastasierenden Tumorzellen sind über die Expression bestimmter Adhäsionsproteine oder deren Liganden in der Lage, physiologische Adhäsionsvorgänge weißer Blutzellen an gefäßauskleidende Endothelzellen zu imitieren und damit auf „physiologischem Wege“ zu metastasieren. Grundlage für potentielle neue Strategien in der Tumortherapie und der Prävention der Metastasierung sind detaillierte Kenntnisse über die Expressionsregulation der an diesen Prozessen beteiligten Adhäsionsmolekülen. Das endotheliale Zelloberflächenprotein E-Selektin ist eines dieser Zelladhäsionsmoleküle, denen eine bedeutende Stellung bei der Regulation von Metastasierungsprozessen zugeschrieben wird (Dejana et al., 1992; Nguyen et al., 1997; Turner und Krause, 1999). Die Tumorzelladhäsion an Endothelzellen als Grundlage der Extravasation maligner Zellen aus Blutgefäßen wird von E-Selektin initial vermittelt, indem dieses endotheliale Adhäsionsprotein Tetrasaccharidstrukturen von Glykoproteinen auf der Tumorzelloberfläche spezifisch erkennt und bindet. Um über E-Selektin in das Metastasierungsgeschehen regulierend einzugreifen und es damit zu einem Zielmolekül („Target“) für neue tumortherapeutische Strategien zu machen, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit die an der Regulation der Gen- und Proteinexpression von E-Selektin beteiligten molekularen Mechanismen näher charakterisiert.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl TNF - als auch Röntgenstrahlen-vermittelte E-Selektin-Expression in Endothelzellen durch kleine GTPasen der Rho-Proteinfamilie reguliert ist. Hemmung dieser kleinen G-Proteine z.B. durch Statine oder clostridiale Toxine führt zu verminderter Expression von E-Selektin in primären humanen Endothelzellen (HUVEC). In Übereinstimmung mit Literaturdaten (Schindler et al., 1994; Tozawa et al., 1995) konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor NF- B für die stimulierte E-Selektin-Genexpression essentiell ist. Die Hemmung der NF- B-Aktivierung durch Retinsäurederivate

oder Rho-inhibierende Statine hat eine stark verminderte E-Selektin-Expression nach Stimulation mit Zytokinen oder γ -Strahlung zur Folge. Aus den in der Arbeit erhaltenen Ergebnissen kann außerdem die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Regulation der zytokininduzierten E-Selektin-Genexpression von der γ -Strahlen-vermittelten Expression des E-Selektins differiert. Für strahleninduzierte, endotheliale E-Selektin-Expression scheint beispielsweise der Transkriptionsfaktor AP-1 als ein weiterer Kontrollfaktor neben NF- κ B zu fungieren. Des Weiteren konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass eine gesteigerte E-Selektin-Proteinexpression mit einer erhöhten Tumorzelladhäsion korreliert und die Hemmung TNF- α - oder γ -Strahlen-induzierter E-Selektin-Expression durch Retinsäuren oder Statine ausreichend ist, die Tumorzelladhäsion an Endothelzellen zu vermindern. Eine durch Statin- oder Retinsäurebehandlung reduzierte E-Selektin-Expression nach Zytokinstimulation führt darüber hinaus zu einer geringeren Tumorzellmigration durch endotheliale Zellmonolayer. Mit Statinen und Retinsäurederivaten wurden somit Pharmaka identifiziert, die durch inhibitorische Einflussnahme auf die Genexpression von E-Selektin in humanen Endothelzellen *in vitro* die Adhäsion und Invasion von Tumorzellen an bzw. durch das Endothel minimieren. Damit verhindern diese Verbindungen die Grundvoraussetzung für *in vivo*-Metastasierung und Sekundärtumorentstehung. Obwohl eine ganze Reihe von induzierbaren Adhäsionsmolekülen auf zytokinbehandelten oder bestrahlten Endothelzellen exprimiert werden, scheint die Blockierung der Tumorzelladhäsion durch Statine und Retinsäure spezifisch auf einer Hemmung der E-Selektin-Expression zu beruhen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das Adhäsionsmolekül E-Selektin eine vielversprechende Zielstruktur ist, über deren kontrollierte Beeinflussung es eventuell auch *in vivo* möglich sein könnte, das Risiko der Metastasierung zu reduzieren. Mit Statinen und Retinsäurederivaten, die ihr anti-metastatisches Potential durch eine Hemmung der induzierbaren E-Selektin-Expression entfalten, liegen klinisch getestete und im Fall der Statine bereits auf dem Markt befindliche Pharmaka vor, die möglicherweise auch *in vivo* Tumorzellmetastasierung vorbeugen und demnach tumortherapeutisch Einsatz finden könnten. Für zukünftige tierexperimentelle Studien, welche für die Verifizierung der vorliegenden *in vitro*-Daten und zur Überprüfung ihrer Übertragbarkeit auf die Situation im komplexen eukaryontischen Organismus unabdingbar sind, wurde im Rahmen dieser Arbeit mit der Generierung transgener Tiermodelle begonnen.

6. Literaturverzeichnis

- Abbas, A.K., Lichtman, A.H. & Pober J.S. (1996). Immunologie. Verlag Hans Huber, Bern, Göttingen.
- Adam, T., Giry, M., Boquet, P. & Sansonetti, P. (1996). Rho-dependent membrane folding causes Shigella entry into epithelial cells. *Embo J*, **15**, 3315-21.
- Adams, J.M. & Cory, S. (1998). The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, **281**, 1322-6.
- Adamson, P., Marshall, C.J., Hall, A. & Tilbrook, P.A. (1992). Post-translational modifications of p21rho proteins. *J Biol Chem*, **267**, 20033-8.
- Aktories, K., Just, I. & Rosenthal, W. (1988). Different types of ADP-ribose protein bonds formed by botulinum C2 toxin, botulinum ADP-ribosyltransferase C3 and pertussis toxin. *Biochem Biophys Res Commun*, **156**, 361-7.
- Alam, J. & Cook, J.L. (1990). Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. *Anal Biochem*, **188**, 245-54.
- Alberts, A.S., Bouquin, N., Johnston, L.H. & Treisman, R. (1998). Analysis of RhoA-binding proteins reveals an interaction domain conserved in heterotrimeric G protein beta subunits and the yeast response regulator protein Skn7. *J Biol Chem*, **273**, 8616-22.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J.D. (1994). Molecular Biology of the Cell. Published by Garland Publishing, a member of the Taylor & Francis Group.
- Alonso, D.F., Farina, H.G., Skilton, G., Gabri, M.R., De Lorenzo, M.S. & Gomez, D.E. (1998). Reduction of mouse mammary tumor formation and metastasis by lovastatin, an inhibitor of the mevalonate pathway of cholesterol synthesis. *Breast Cancer Res Treat*, **50**, 83-93.
- Alsina, M., Fonseca, R., Wilson, E.F., Belle, A.N., Gerbino, E., Price-Troska, T., Overton, R.M., Ahmann, G., Bruzek, L., Adjei, A., Kaufmann, S., Wright, J.J., Sullivan, D., Djulbegovic, B., Cantor, A.B., Greipp, P.R., Dalton, W.S. & Sebti, S.M. (2004). The Farnesyltransferase Inhibitor Zarnestra is well tolerated, induces stabilization of disease and inhibits farnesylation and oncogenic/tumor survival pathways in patients with advanced multiple myeloma. *Blood*.
- Anand-Apte, B. & Zetter, B. (1997). Signaling mechanisms in growth factor-stimulated cell motility. *Stem Cells*, **15**, 259-67.
- Aruffo, A., Kolanus, W., Walz, G., Fredman, P. & Seed, B. (1991). CD62/P-selectin recognition of myeloid and tumor cell sulfatides. *Cell*, **67**, 35-44.
- Azuma, A., Takahashi, S., Nose, M., Araki, K., Araki, M., Takahashi, T., Hirose, M., Kawashima, H., Miyasaka, M. & Kudoh, S. (2000). Role of E-selectin in bleomycin induced lung fibrosis in mice. *Thorax*, **55**, 147-52.
- Bagrodia, S., Derijard, B., Davis, R.J. & Cerione, R.A. (1995a). Cdc42 and PAK-mediated signaling leads to Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J Biol Chem*, **270**, 27995-8.
- Bagrodia, S., Taylor, S.J., Creasy, C.L., Chernoff, J. & Cerione, R.A. (1995b). Identification of a mouse p21Cdc42/Rac activated kinase. *J Biol Chem*, **270**, 22731-7.
- Bardeleben, R., Dunkern, T., Kaina, B. & Fritz, G. (2002). The HMG-CoA reductase inhibitor lovastatin protects cells from the antineoplastic drugs doxorubicin and etoposide. *Int J Mol Med*, **10**, 473-9.
- Bardeleben, R., Kaina, B. & Fritz, G. (2003). Ultraviolet light-induced apoptotic death is impaired by the HMG-CoA reductase inhibitor lovastatin. *Biochem Biophys Res Commun*, **307**, 401-7.
- Barstad, R.M., Hamers, M.J., Stephens, R.W. & Sakariassen, K.S. (1995). Retinoic acid reduces induction of monocyte tissue factor and tissue factor/factor VIIa-dependent arterial thrombus formation. *Blood*, **86**, 212-8.
- Behrens, J., Mareel, M.M., Van Roy, F.M. & Birchmeier, W. (1989). Dissecting tumor cell invasion: epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *J Cell Biol*, **108**, 2435-47.
- Bendas, G., Krause, A., Bakowsky, U., Vogel, J. & Rothe, U. (1999). Targetability of novel immunoliposomes prepared by a new antibody conjugation technique. *Int J Pharm*, **181**, 79-93.
- Bender, K., Gottlicher, M., Whiteside, S., Rahmsdorf, H.J. & Herrlich, P. (1998). Sequential DNA damage-independent and -dependent activation of NF-kappaB by UV. *Embo J*, **17**, 5170-81.
- Benjamim, C.F., Silva, J.S., Fortes, Z.B., Oliveira, M.A., Ferreira, S.H. & Cunha, F.Q. (2002). Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils. *Infect Immun*, **70**, 3602-10.
- Benkoussa, M., Brand, C., Delmotte, M.H., Formstecher, P. & Lefebvre, P. (2002). Retinoic acid receptors inhibit AP1 activation by regulating extracellular signal-regulated kinase and CBP recruitment to an AP1-responsive promoter. *Mol Cell Biol*, **22**, 4522-34.

- Bereta, M., Bereta, J., Georgoff, I., Coffman, F.D., Cohen, S. & Cohen, M.C. (1994). Methylxanthines and calcium-mobilizing agents inhibit the expression of cytokine-inducible nitric oxide synthase and vascular cell adhesion molecule-1 in murine microvascular endothelial cells. *Exp Cell Res*, **212**, 230-42.
- Bernot, D., Benoliel, A.M., Peiretti, F., Lopez, S., Bonardo, B., Bongrand, P., Juhan-Vague, I. & Nalbhone, G. (2003). Effect of atorvastatin on adhesive phenotype of human endothelial cells activated by tumor necrosis factor alpha. *J Cardiovasc Pharmacol*, **41**, 316-24.
- Bevilacqua, M., Butcher, E., Furie, B., Gallatin, M., Gimbrone, M., Harlan, J., Kishimoto, K., Lasky, L., McEver, R. & et al. (1991). Selectins: a family of adhesion receptors. *Cell*, **67**, 233.
- Bevilacqua, M.P. & Nelson, R.M. (1993). Selectins. *J Clin Invest*, **91**, 379-87.
- Bevilacqua, M.P., Pober, J.S., Mendrick, D.L., Cotran, R.S. & Gimbrone, M.A., Jr. (1987). Identification of an inducible endothelial-leukocyte adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 9238-42.
- Bevilacqua, M.P., Stengelin, S., Gimbrone, M.A., Jr. & Seed, B. (1989). Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science*, **243**, 1160-5.
- Biancone, L., Araki, M., Araki, K., Vassalli, P. & Stamenkovic, I. (1996). Redirection of tumor metastasis by expression of E-selectin in vivo. *J Exp Med*, **183**, 581-7.
- Bienvenu, K. & Granger, D.N. (1993). Molecular determinants of shear rate-dependent leukocyte adhesion in postcapillary venules. *Am J Physiol*, **264**, H1504-8.
- Bird, M.I., Foster, M.R., Priest, R. & Malhotra, R. (1997). Selectins: physiological and pathophysiological roles. *Biochem Soc Trans*, **25**, 1199-206.
- Blakely, M.L., Van der Werf, W.J., Stuhlmeier, K., Dalmasso, A.P., Winkler, H. & Bach, F.H. (1994). Retinoic acid inhibits expression of E-selectin in endothelial cells and prolongs discordant xenograft survival. *Transplant Proc*, **26**, 1176.
- Blanco-Colio, L.M., Tunon, J., Martin-Ventura, J.L. & Egido, J. (2003). Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of statins. *Kidney Int*, **63**, 12-23.
- Blanco-Colio, L.M., Villa, A., Ortego, M., Hernandez-Presa, M.A., Pascual, A., Plaza, J.J. & Egido, J. (2002). 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, induce apoptosis of vascular smooth muscle cells by downregulation of Bcl-2 expression and Rho A prenylation. *Atherosclerosis*, **161**, 17-26.
- Boettner, B. & Van Aelst, L. (2002). The role of Rho GTPases in disease development. *Gene*, **286**, 155-74.
- Boguski, M.S. & McCormick, F. (1993). Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature*, **366**, 643-54.
- Borghini, C., Veronesi, M., Prandin, M.G., Dormi, A. & Ambrosioni, E. (2001). Statins and blood pressure regulation. *Curr Hypertens Rep*, **3**, 281-8.
- Bourne, H.R., Sanders, D.A. & McCormick, F. (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*, **349**, 117-27.
- Bourne, H.R., Wrishnik, L. & Kenyon, C. (1990). Ras proteins. Some signal developments. *Nature*, **348**, 678-9.
- Brackenbury, R., Rutishauser, U. & Edelman, G.M. (1981). Distinct calcium-independent and calcium-dependent adhesion systems of chicken embryo cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 387-91.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-54.
- Braga, V.M. (1999). Small GTPases and regulation of cadherin dependent cell-cell adhesion. *Mol Pathol*, **52**, 197-202.
- Bresalier, R.S., Byrd, J.C., Brodt, P., Ogata, S., Itzkowitz, S.H. & Yunker, C.K. (1998). Liver metastasis and adhesion to the sinusoidal endothelium by human colon cancer cells is related to mucin carbohydrate chain length. *Int J Cancer*, **76**, 556-62.
- Bresalier, R.S., Ho, S.B., Schoeppner, H.L., Kim, Y.S., Sleisenger, M.H., Brodt, P. & Byrd, J.C. (1996). Enhanced sialylation of mucin-associated carbohydrate structures in human colon cancer metastasis. *Gastroenterology*, **110**, 1354-67.
- Brodt, P. (1991). Adhesion mechanisms in lymphatic metastasis. *Cancer Metastasis Rev*, **10**, 23-32.
- Brodt, P., Fallavollita, L., Bresalier, R.S., Meterissian, S., Norton, C.R. & Wolitzky, B.A. (1997). Liver endothelial E-selectin mediates carcinoma cell adhesion and promotes liver metastasis. *Int J Cancer*, **71**, 612-9.
- Brown, D.C., Tsuji, H. & Larson, R.S. (1999). All-trans retinoic acid regulates adhesion mechanism and transmigration of the acute promyelocytic leukaemia cell line NB-4 under physiologic flow. *Br J Haematol*, **107**, 86-98.
- Buday, L. & Downward, J. (1993). Epidermal growth factor regulates the exchange rate of guanine nucleotides on p21ras in fibroblasts. *Mol Cell Biol*, **13**, 1903-10.
- Buemi, M., Allegra, A., Senatore, M., Marino, D., Medici, M.A., Aloisi, C., Di Pasquale, G. & Corica, F. (1999). Pro-apoptotic effect of fluvastatin on human smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol*, **370**, 201-3.
- Canman, C.E. & Kastan, M.B. (1996). Signal transduction. Three paths to stress relief. *Nature*, **384**, 213-4.
- Carlberg, C. (1999). Lipid soluble vitamins in gene regulation. *Biofactors*, **10**, 91-7.

- Carlos, T.M. & Harlan, J.M. (1994). Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood*, **84**, 2068-101.
- Casey, P.J. & Seabra, M.C. (1996). Protein prenyltransferases. *J Biol Chem*, **271**, 5289-92.
- Chadwick, C.C., Shaw, L.J. & Winneker, R.C. (1998). TNF-alpha and 9-cis-retinoic acid synergistically induce ICAM-1 expression: evidence for interaction of retinoid receptors with NF-kappa B. *Exp Cell Res*, **239**, 423-9.
- Chang, J.H., Pratt, J.C., Sawasdikosol, S., Kapeller, R. & Burakoff, S.J. (1998). The small GTP-binding protein Rho potentiates AP-1 transcription in T cells. *Mol Cell Biol*, **18**, 4986-93.
- Chen, X.L., Zhang, Q., Zhao, R., Ding, X., Tummala, P.E. & Medford, R.M. (2003). Rac1 and superoxide are required for the expression of cell adhesion molecules induced by tumor necrosis factor-alpha in endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther*, **305**, 573-80.
- Chen, Y., Kerimo, A., Khan, S. & Wei, L.N. (2002). Real-time analysis of molecular interaction of retinoid receptors and receptor-interacting protein 140 (RIP140). *Mol Endocrinol*, **16**, 2528-37.
- Chi, J.T., Chang, H.Y., Haraldsen, G., Jahnsen, F.L., Troyanskaya, O.G., Chang, D.S., Wang, Z., Rockson, S.G., van de Rijn, M., Botstein, D. & Brown, P.O. (2003). Endothelial cell diversity revealed by global expression profiling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 10623-8.
- Cho, M., Dahiya, R., Choi, S.R., Siddiki, B., Yeh, M.M., Sleisenger, M.H. & Kim, Y.S. (1997). Mucins secreted by cell lines derived from colorectal mucinous carcinoma and adenocarcinoma. *Eur J Cancer*, **33**, 931-41.
- Clark, E.A. & Brugge, J.S. (1995). Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science*, **268**, 233-9.
- Clark, E.A., King, W.G., Brugge, J.S., Symons, M. & Hynes, R.O. (1998). Integrin-mediated signals regulated by members of the rho family of GTPases. *J Cell Biol*, **142**, 573-86.
- Clark, E.A., Golub, T.R., Lander, E.S. & Hynes, R.O. (2000). Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature*, **406**, 532-5.
- Cleverley, S.C., Costello, P.S., Henning, S.W. & Cantrell, D.A. (2000). Loss of Rho function in the thymus is accompanied by the development of thymic lymphoma. *Oncogene*, **19**, 13-20.
- Cohen, S.J., Gallo, J., Lewis, N.L., Alpaugh, R.K., Gentner, L., Rogatko, A., Yeslow, G., Schol, J., Verhaeghe, T., Zannikos, P., Palmer, P.A., Weiner, L.M. & Meropol, N.J. (2004). Phase I and pharmacokinetic study of the farnesyltransferase inhibitor R115777 in combination with irinotecan in patients with advanced cancer. *Cancer Chemother Pharmacol*.
- Conese, M., Montemurro, P., Fumarulo, R., Giordano, D., Riccardi, S., Colucci, M. & Semeraro, N. (1991). Inhibitory effect of retinoids on the generation of procoagulant activity by blood mononuclear phagocytes. *Thromb Haemost*, **66**, 662-5.
- Cornelius, L.A., Sepp, N., Li, L.J., Degitz, K., Swerlick, R.A., Lawley, T.J. & Caughman, S.W. (1994). Selective upregulation of intercellular adhesion molecule (ICAM-1) by ultraviolet B in human dermal microvascular endothelial cells. *J Invest Dermatol*, **103**, 23-8.
- Coso, O.A., Chiariello, M., Yu, J.C., Teramoto, H., Crespo, P., Xu, N., Miki, T. & Gutkind, J.S. (1995). The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell*, **81**, 1137-46.
- Cunningham, B.A., Hemperly, J.J., Murray, B.A., Prediger, E.A., Brackenbury, R. & Edelman, G.M. (1987). Neural cell adhesion molecule: structure, immunoglobulin-like domains, cell surface modulation, and alternative RNA splicing. *Science*, **236**, 799-806.
- d'Alessio, P., Moutet, M., Coudrier, E., Darquenne, S. & Chaudiere, J. (1998). ICAM-1 and VCAM-1 expression induced by TNF-alpha are inhibited by a glutathione peroxidase mimic. *Free Radic Biol Med*, **24**, 979-87.
- Das, K.C. & White, C.W. (1997). Activation of NF-kappaB by antineoplastic agents. Role of protein kinase C. *J Biol Chem*, **272** (23), 14914-20.
- de Leeuw, H.P., Wijers-Koster, P.M., van Mourik, J.A. & Voorberg, J. (1999). Small GTP-binding protein RalA associates with Weibel-Palade bodies in endothelial cells. *Thromb Haemost*, **82**, 1177-81.
- Dejana, E., Martin-Padura, I., Lauri, D., Bernasconi, S., Bani, M.R., Garofalo, A., Giavazzi, R., Magnani, J., Mantovani, A. & Menard, S. (1992). Endothelial leukocyte adhesion molecule-1-dependent adhesion of colon carcinoma cells to vascular endothelium is inhibited by an antibody to Lewis fucosylated type I carbohydrate chain. *Lab Invest*, **66**, 324-30.
- del Peso, L., Hernandez-Alcoceba, R., Embade, N., Carnero, A., Esteve, P., Paje, C. & Lacal, J.C. (1997). Rho proteins induce metastatic properties in vivo. *Oncogene*, **15**, 3047-57.
- Detrick, R.J., Dickey, D. & Kintner, C.R. (1990). The effects of N-cadherin misexpression on morphogenesis in *Xenopus* embryos. *Neuron*, **4**, 493-506.
- Di Noto, R., Lo Pardo, C., Schiavone, E.M., Ferrara, F., Manzo, C., Vacca, C. & Del Vecchio, L. (1996). All-trans retinoic acid (ATRA) and the regulation of adhesion molecules in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*, **21**, 201-9.

- DiDonato, J.A., Hayakawa, M., Rothwarf, D.M., Zandi, E. & Karin, M. (1997). A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature*, **388**, 548-54.
- Dimitroulakos, J., Marhin, W.H., Tokunaga, J., Irish, J., Gullane, P., Penn, L.Z. & Kamel-Reid, S. (2002). Microarray and biochemical analysis of lovastatin-induced apoptosis of squamous cell carcinomas. *Neoplasia*, **4**, 337-46.
- Dimitroulakos, J., Thai, S., Wasfy, G.H., Hedley, D.W., Minden, M.D. & Penn, L.Z. (2000). Lovastatin induces a pronounced differentiation response in acute myeloid leukemias. *Leuk Lymphoma*, **40**, 167-78.
- Dimitrova, Y., Dunoyer-Geindre, S., Reber, G., Mach, F., Kruithof, E.K. & de Moerloose, P. (2003). Effects of statins on adhesion molecule expression in endothelial cells. *J Thromb Haemost*, **1**, 2290-9.
- Dobrucki, L.W., Kalinowski, L., Dobrucki, I.T. & Malinski, T. (2001). Statin-stimulated nitric oxide release from endothelium. *Med Sci Monit*, **7**, 622-7.
- Donalies, M., Cramer, M., Ringwald, M. & Starzinski-Powitz, A. (1991). Expression of M-cadherin, a member of the cadherin multigene family, correlates with differentiation of skeletal muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 8024-8.
- Du, W., Lebowitz, P.F. & Prendergast, G.C. (1999). Cell growth inhibition by farnesyltransferase inhibitors is mediated by gain of geranylgeranylated RhoB. *Mol Cell Biol*, **19**, 1831-40.
- Dunham, A.J., Barkley, R.M. & Sievers, R.E. (1995). Aqueous nitrite ion determination by selective reduction and gas phase nitric oxide chemiluminescence. *Anal Chem*, **67**, 220-4.
- Earnshaw, W.C., Martins, L.M. & Kaufmann, S.H. (1999). Mamalian caspases: Structure, activation, substrates and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem*, **68**, 383-424.
- Eberlein, M., Heusinger-Ribeiro, J. & Goppelt-Struebe, M. (2001). Rho-dependent inhibition of the induction of connective tissue growth factor (CTGF) by HMG CoA reductase inhibitors (statins). *Br J Pharmacol*, **133**, 1172-80.
- Endo, A. (1988). Chemistry, biochemistry, and pharmacology of HMG-CoA reductase inhibitors. *Klin Wochenschr*, **66**, 421-7.
- Endres, M., Laufs, U., Huang, Z., Nakamura, T., Huang, P., Moskowitz, M.A. & Liao, J.K. (1998). Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 8880-5.
- Erbe, D.V., Watson, S.R., Presta, L.G., Wolitzky, B.A., Foxall, C., Brandley, B.K. & Lasky, L.A. (1993). P- and E-selectin use common sites for carbohydrate ligand recognition and cell adhesion. *J Cell Biol*, **120**, 1227-35.
- Erbe, D.V., Wolitzky, B.A., Presta, L.G., Norton, C.R., Ramos, R.J., Burns, D.K., Rumberger, J.M., Rao, B.N., Foxall, C., Brandley, B.K. & et al. (1992). Identification of an E-selectin region critical for carbohydrate recognition and cell adhesion. *J Cell Biol*, **119**, 215-27.
- Esteve, P., Embade, N., Perona, R., Jimenez, B., del Peso, L., Leon, J., Arends, M., Miki, T. & Lacal, J.C. (1998). Rho-regulated signals induce apoptosis in vitro and in vivo by a p53-independent, but Bcl2 dependent pathway. *Oncogene*, **17**, 1855-69.
- Evers, E.E., van der Kammen, R.A., ten Klooster, J.P. & Collard, J.G. (2000a). Rho-like GTPases in tumor cell invasion. *Methods Enzymol*, **325**, 403-15.
- Evers, E.E., Zondag, G.C., Malliri, A., Price, L.S., ten Klooster, J.P., van der Kammen, R.A. & Collard, J.G. (2000b). Rho family proteins in cell adhesion and cell migration. *Eur J Cancer*, **36**, 1269-74.
- Farina, A.R., Masciulli, M.P., Tacconelli, A., Cappabianca, L., De Santis, G., Gulino, A. & Mackay, A.R. (2002). All-trans-retinoic acid induces nuclear factor kappaB activation and matrix metalloproteinase-9 expression and enhances basement membrane invasivity of differentiation-resistant human SK-N-BE 9N neuroblastoma Cells. *Cell Growth Differ*, **13**, 343-54.
- Felding-Habermann, B., Mueller, B.M., Romerdahl, C.A. & Cheresch, D.A. (1992). Involvement of integrin alpha V gene expression in human melanoma tumorigenicity. *J Clin Invest*, **89**, 2018-22.
- Fokstuen, T., Rabo, Y.B., Zhou, J.N., Karlson, J., Platz, A., Shoshan, M.C., Hansson, J. & Linder, S. (1997). The Ras farnesylation inhibitor BZA-5B increases the resistance to cisplatin in a human melanoma cell line. *Anticancer Res*, **17**, 2347-52.
- Folkman, J. (1996). New perspectives in clinical oncology from angiogenesis research. *Eur J Cancer*, **32A**, 2534-9.
- Fox, S.B., Turner, G.D., Gatter, K.C. & Harris, A.L. (1995). The increased expression of adhesion molecules ICAM-3, E- and P-selectins on breast cancer endothelium. *J Pathol*, **177**, 369-76.
- Fraker, P.J., King, L.E., Lill-Elghanian, D. & Telford, W.G. (1995). Quantification of apoptotic events in pure and heterogeneous populations of cells using the flow cytometer. *Methods Cell Biol*, **46**, 57-76.
- Friesen, C., Herr, I., Krammer, P.H. & Debatin, K.M. (1996). Involvement of the CD95 (APO-1/FAS) receptor/ligand system in drug-induced apoptosis in leukemia cells. *Nature Med*, **2(5)**, 574-7.
- Fritz, G., Just, I., Wollenberg, P. & Aktories, K. (1994). Differentiation-induced increase in *Clostridium botulinum* C3 exoenzyme-catalyzed ADP-ribosylation of the small GTP-binding protein Rho. *Eur J Biochem*, **223 (3)**, 909-16.

- Fritz, G., Just, I. & Kaina, B. (1999). Rho GTPases are over-expressed in human tumors. *Int J Cancer*, **81**, 682-7.
- Fritz, G. & Kaina, B. (2000). Ras-related GTPase RhoB forces alkylation-induced apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun*, **268**, 784-9.
- Fritz, G., Brachetti, C., Bahlmann, F., Schmidt, M. & Kaina, B. (2002). Rho GTPases in human breast tumours: expression and mutation analyses and correlation with clinical parameters. *Br J Cancer*, **87**, 635-44.
- Fritz, G., Brachetti, C. & Kaina, B. (2003). Lovastatin causes sensitization of HeLa cells to ionizing radiation-induced apoptosis by the abrogation of G2 blockage. *Int J Radiat Biol*, **79**, 601-10.
- Frixen, U.H., Behrens, J., Sachs, M., Eberle, G., Voss, B., Warda, A., Lochner, D. & Birchmeier, W. (1991). E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol*, **113**, 173-85.
- Fukata, M., Kuroda, S., Nakagawa, M., Kawajiri, A., Itoh, N., Shoji, I., Matsuura, Y., Yonehara, S., Fujisawa, H., Kikuchi, A. & Kaibuchi, K. (1999). Cdc42 and Rac1 regulate the interaction of IQGAP1 with beta-catenin. *J Biol Chem*, **274**, 26044-50.
- Fukui, K., Sasaki, T., Imazumi, K., Matsuura, Y., Nakanishi, H. & Takai, Y. (1997). Isolation and characterization of a GTPase activating protein specific for the Rab3 subfamily of small G proteins. *J Biol Chem*, **272**, 4655-8.
- Fukumoto, Y., Kaibuchi, K., Hori, Y., Fujioka, H., Araki, S., Ueda, T., Kikuchi, A. & Takai, Y. (1990). Molecular cloning and characterization of a novel type of regulatory protein (GDI) for the rho proteins, ras p21-like small GTP-binding proteins. *Oncogene*, **5**, 1321-8.
- Gaddam, V., Li, D.Y. & Mehta, J.L. (2002). Anti-thrombotic effects of atorvastatin--an effect unrelated to lipid lowering. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, **7**, 247-53.
- Garcia-Ranea, J.A. & Valencia, A. (1998). Distribution and functional diversification of the ras superfamily in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, **434**, 219-25.
- Gearing, A.J. & Newman, W. (1993). Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol Today*, **14**, 506-12.
- Gehlsen, K.R., Dillner, L., Engvall, E. & Ruoslahti, E. (1988). The human laminin receptor is a member of the integrin family of cell adhesion receptors. *Science*, **241**, 1228-9.
- Geiger, B. & Ayalon, O. (1992). Cadherins. *Annu Rev Cell Biol*, **8**, 307-32.
- Genth, H., Aktories, K. & Just, I. (1999). Monoglucosylation of RhoA at threonine 37 blocks cytosol-membrane cycling. *J Biol Chem*, **274** (41), 29050-6.
- Ghosh, S. & Karin, M. (2002). Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell*, **109** Suppl, S81-96.
- Gille, J., Paxton, L.L., Lawley, T.J., Caughman, S.W. & Swerlick, R.A. (1997). Retinoic acid inhibits the regulated expression of vascular cell adhesion molecule-1 by cultured dermal microvascular endothelial cells. *J Clin Invest*, **99**, 492-500.
- Glise, B. & Noselli, S. (1997). Coupling of Jun amino-terminal kinase and Decapentaplegic signaling pathways in *Drosophila* morphogenesis. *Genes Dev*, **11**, 1738-47.
- Glomset, J.A., Gelb, M.H. & Farnsworth, C.C. (1990). Prenyl proteins in eukaryotic cells: a new type of membrane anchor. *Trends Biochem Sci*, **15**, 139-42.
- Glomset, J.A. & Farnsworth, C.C. (1994). Role of protein modification reactions in programming interactions between ras-related GTPases and cell membranes. *Annu Rev Cell Biol*, **10**, 181-205.
- Glorioso, N., Troffa, C., Filigheddu, F., Dettori, F., Soro, A., Pargaglia, P.P., Collatina, S. & Pahor, M. (1999). Effect of the HMG-CoA reductase inhibitors on blood pressure in patients with essential hypertension and primary hypercholesterolemia. *Hypertension*, **34**, 1281-6.
- Gnad, R., Aktories, K., Kaina, B. & Fritz, G. (2000). Inhibition of protein isoprenylation impairs rho-regulated early cellular response to genotoxic stress. *Mol Pharmacol*, **58**, 1389-97.
- Gnad, R., Kaina, B. & Fritz, G. (2001). Rho GTPases are involved in the regulation of NF-kappaB by genotoxic stress. *Exp Cell Res*, **264**, 244-9.
- Goddette, D.W. & Frieden, C. (1986). Actin polymerization. The mechanism of action of cytochalasin D. *J Biol Chem*, **261**, 15974-80.
- Goetz, D.J., Ding, H., Atkinson, W.J., Vachino, G., Camphausen, R.T., Cumming, D.A. & Luscinskas, F.W. (1996). A human colon carcinoma cell line exhibits adhesive interactions with P-selectin under fluid flow via a PSGL-1-independent mechanism. *Am J Pathol*, **149**, 1661-73.
- Goldstein, J.L. & Brown, M.S. (1990). Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*, **343**, 425-30.
- Goodstone, N.J. & Hardingham, T.E. (2002). Tumour necrosis factor alpha stimulates nitric oxide production more potently than interleukin-1beta in porcine articular chondrocytes. *Rheumatology (Oxford)*, **41**, 883-91.
- Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S. & Tannenbaum, S.R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*, **126**, 131-8.
- Greenwood, J., Walters, C.E., Pryce, G., Kanuga, N., Beraud, E., Baker, D. & Adamson, P. (2003). Lovastatin inhibits brain endothelial cell Rho-mediated lymphocyte migration and attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Faseb J*, **17**, 905-7.

- Guijarro, C., Blanco-Colio, L.M., Ortego, M., Alonso, C., Ortiz, A., Plaza, J.J., Diaz, C., Hernandez, G. & Egido, J. (1998). 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase and isoprenylation inhibitors induce apoptosis of vascular smooth muscle cells in culture. *Circ Res*, **83**, 490-500.
- Gutierrez, L., Magee, A.I., Marshall, C.J. & Hancock, J.F. (1989). Post-translational processing of p21ras is two-step and involves carboxyl-methylation and carboxy-terminal proteolysis. *Embo J*, **8**, 1093-8.
- Hacker, H. & Karin, M. (2002). Is NF-kappaB2/p100 a direct activator of programmed cell death? *Cancer Cell*, **2** (6), 431-3.
- Hakomori, S. (1994). Novel endothelial cell activation factor(s) released from activated platelets which induce E-selectin expression and tumor cell adhesion to endothelial cells: a preliminary note. *Biochem Biophys Res Commun*, **203**, 1605-13.
- Hakomori, S. (1996). Tumor malignancy defined by aberrant glycosylation and sphingo(glyco)lipid metabolism. *Cancer Res*, **56**, 5309-18.
- Hall, A. (1990). The cellular functions of small GTP-binding proteins. *Science*, **249**, 635-40.
- Hallahan, D., Clark, E.T., Kuchibhotla, J., Gewertz, B.L. & Collins, T. (1995). E-selectin gene induction by ionizing radiation is independent of cytokine induction. *Biochem Biophys Res Commun*, **217**, 784-95.
- Hallahan, D.E., Virudachalam, S. & Kuchibhotla, J. (1998). Nuclear factor kappaB dominant negative genetic constructs inhibit X-ray induction of cell adhesion molecules in the vascular endothelium. *Cancer Res*, **58**, 5484-8.
- Hancock, J.F., Magee, A.I., Childs, J.E. & Marshall, C.J. (1989). All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell*, **57**, 1167-77.
- Harlan, J.M., Winn, R.K., Vedder, N.B., Doerschuk, C.M. & Rice, C.L. (1992). In Adhesion: Its role in inflammatory disease. Harlan J.M. & Liu D.Y., Edition Freeman; New York, N.Y. 117-24.
- Hart, M.J., Eva, A., Evans, T., Aaronson, S.A. & Cerione, R.A. (1991). Catalysis of guanine nucleotide exchange on the CDC42Hs protein by the dbl oncogene product. *Nature*, **354**, 311-4.
- Hatta, K., Nose, A., Nagafuchi, A. & Takeichi, M. (1988). Cloning and expression of cDNA encoding a neural calcium-dependent cell adhesion molecule: its identity in the cadherin gene family. *J Cell Biol*, **106**, 873-81.
- Hebbar, M., Revillion, F., Louchez, M.M., Vilain, M.O., Fournier, C., Bonnetterre, J. & Peyrat, J.P. (1998). The relationship between concentrations of circulating soluble E-selectin and clinical, pathological, and biological features in patients with breast cancer. *Clin Cancer Res*, **4**, 373-80.
- Heckmann, M., Douwes, K., Peter, R. & Degitz, K. (1998). Vascular activation of adhesion molecule mRNA and cell surface expression by ionizing radiation. *Exp Cell Res*, **238**, 148-54.
- Heckmann, M., Eberlein-Konig, B., Wollenberg, A., Przybilla, B. & Plewig, G. (1994). Ultraviolet-A radiation induces adhesion molecule expression on human dermal microvascular endothelial cells. *Br J Dermatol*, **131**, 311-8.
- Herlyn, M. & Malkowicz, S.B. (1991). Regulatory pathways in tumor growth and invasion. *Lab Invest*, **65**, 262-71.
- Hickey, M.J., Granger, D.N. & Kubes, P. (2001). Inducible nitric oxide synthase (iNOS) and regulation of leucocyte/endothelial cell interactions: studies in iNOS-deficient mice. *Acta Physiol Scand*, **173**, 119-26.
- Hildebrandt, G., Maggiorella, L., Rodel, F., Rodel, V., Willis, D. & Trott, K.R. (2002). Mononuclear cell adhesion and cell adhesion molecule liberation after X-irradiation of activated endothelial cells in vitro. *Int J Radiat Biol*, **78**, 315-25.
- Hill, C.S., Wynne, J. & Treisman, R. (1995). The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell*, **81**, 1159-70.
- Hoff, S.D., Matsushita, Y., Ota, D.M., Cleary, K.R., Yamori, T., Hakomori, S. & Irimura, T. (1989). Increased expression of sialyl-dimeric LeX antigen in liver metastases of human colorectal carcinoma. *Cancer Res*, **49**, 6883-8.
- Hsieh, J.T., Luo, W., Song, W., Wang, Y., Kleinerman, D.I., Van, N.T. & Lin, S.H. (1995a). Tumor suppressive role of an androgen-regulated epithelial cell adhesion molecule (C-CAM) in prostate carcinoma cell revealed by sense and antisense approaches. *Cancer Res*, **55**, 190-7.
- Hsieh, T.C., Xu, W. & Chiao, J.W. (1995b). Growth regulation and cellular changes during differentiation of human prostatic cancer LNCaP cells as induced by T lymphocyte-conditioned medium. *Exp Cell Res*, **218**, 137-43.
- Hu, Y., Szente, B., Kiely, J.M. & Gimbrone, M.A., Jr. (2001). Molecular events in transmembrane signaling via E-selectin. SHP2 association, adaptor protein complex formation and ERK1/2 activation. *J Biol Chem*, **276**, 48549-53.
- Hyafil, F., Babinet, C. & Jacob, F. (1981). Cell-cell interactions in early embryogenesis: a molecular approach to the role of calcium. *Cell*, **26**, 447-54.
- Hynes, R.O. (1992). Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, **69**, 11-25.

- Imamura, F., Mukai, M., Ayaki, M. & Akedo, H. (2000). Y-27632, an inhibitor of rho-associated protein kinase, suppresses tumor cell invasion via regulation of focal adhesion and focal adhesion kinase. *Jpn J Cancer Res*, **91**, 811-6.
- Inuzuka, H., Miyatani, S. & Takeichi, M. (1991). R-cadherin: a novel Ca(2+)-dependent cell-cell adhesion molecule expressed in the retina. *Neuron*, **7**, 69-79.
- Ishii, H., Horie, S., Kizaki, K. & Kazama, M. (1992). Retinoic acid counteracts both the downregulation of thrombomodulin and the induction of tissue factor in cultured human endothelial cells exposed to tumor necrosis factor. *Blood*, **80**, 2556-62.
- Itoh, K., Yoshioka, K., Akedo, H., Uehata, M., Ishizaki, T. & Narumiya, S. (1999). An essential part for Rho-associated kinase in the transcellular invasion of tumor cells. *Nat Med*, **5**, 221-5.
- Iwai, M., Iwai, Y., Imai, S., Sugiyama, T., Matsuda, M., Watanabe, A. & Nakano, H. (1995a). DNA fragmentation and CEA production in collagen gel culture of human colon carcinoma cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, **31**, 579-81.
- Iwai, M., Iwai, Y., Matsuda, M., Watanabe, A., Imai, S., Nakano, H. & Sugiyama, T. (1995b). Sequential production of CEA and CEA-related antigens in three-dimensional culture of human gastric carcinoma cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, **31**, 7-10.
- Iwamura, T., Caffrey, T.C., Kitamura, N., Yamanari, H., Setoguchi, T. & Hollingsworth, M.A. (1997). P-selectin expression in a metastatic pancreatic tumor cell line (SUIT-2). *Cancer Res*, **57**, 1206-12.
- Johnston, G.I., Cook, R.G. & McEver, R.P. (1989). Cloning of GMP-140, a granule membrane protein of platelets and endothelium: sequence similarity to proteins involved in cell adhesion and inflammation. *Cell*, **56**, 1033-44.
- Jou, T.S. & Nelson, W.J. (1998). Effects of regulated expression of mutant RhoA and Rac1 small GTPases on the development of epithelial (MDCK) cell polarity. *J Cell Biol*, **142**, 85-100.
- Kaneta, S., Satoh, K., Kano, S., Kanda, M. & Ichihara, K. (2003). All hydrophobic HMG-CoA reductase inhibitors induce apoptotic death in rat pulmonary vein endothelial cells. *Atherosclerosis*, **170**, 237-43.
- Kannagi, R. (1997). Carbohydrate-mediated cell adhesion involved in hematogenous metastasis of cancer. *Glycoconj J*, **14**, 577-84.
- Kannagi, R., Fukushi, Y., Tachikawa, T., Noda, A., Shin, S., Shigeta, K., Hiraiwa, N., Fukuda, Y., Inamoto, T., Hakomori, S. & et al. (1986). Quantitative and qualitative characterization of human cancer-associated serum glycoprotein antigens expressing fucosyl or sialyl-fucosyl type 2 chain polylectosamine. *Cancer Res*, **46**, 2619-26.
- Kansas, G.S. & Pavalko, F.M. (1996). The cytoplasmic domains of E- and P-selectin do not constitutively interact with alpha-actinin and are not essential for leukocyte adhesion. *J Immunol*, **157**, 321-5.
- Kaplanski, G., Farnarier, C., Benoliel, A.M., Foa, C., Kaplanski, S. & Bongrand, P. (1994). A novel role for E- and P-selectins: shape control of endothelial cell monolayers. *J Cell Sci*, **107** (Pt 9), 2449-57.
- Kawata, M., Farnsworth, C.C., Yoshida, Y., Gelb, M.H., Glomset, J.A. & Takai, Y. (1990). Posttranslationally processed structure of the human platelet protein smg p21B: evidence for geranylgeranylation and carboxyl methylation of the C-terminal cysteine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 8960-4.
- Kemper, O. & Wallach, D. (1993). Cloning and partial characterization of the promoter for the human p55 tumor necrosis factor (TNF) receptor. *Gene*, **134**, 209-16.
- Khew-Goodall, Y., Butcher, C.M., Litwin, M.S., Newlands, S., Korpelainen, E.I., Noack, L.M., Berndt, M.C., Lopez, A.F., Gamble, J.R. & Vadas, M.A. (1996). Chronic expression of P-selectin on endothelial cells stimulated by the T-cell cytokine, interleukin-3. *Blood*, **87**, 1432-8.
- Kim, I., Moon, S.O., Kim, S.H., Kim, H.J., Koh, Y.S. & Koh, G.Y. (2001). Vascular endothelial growth factor expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), and E-selectin through nuclear factor-kappa B activation in endothelial cells. *J Biol Chem*, **276**, 7614-20.
- Kim, Y.J., Borsig, L., Han, H.L., Varki, N.M. & Varki, A. (1999). Distinct selectin ligands on colon carcinoma mucins can mediate pathological interactions among platelets, leukocytes, and endothelium. *Am J Pathol*, **155**, 461-72.
- Kishimoto, T., Ishikura, H., Kimura, C., Takahashi, T., Kato, H. & Yoshiki, T. (1996). Phenotypes correlating to metastatic properties of pancreas adenocarcinoma in vivo: the importance of surface sialyl Lewis(a) antigen. *Int J Cancer*, **69**, 290-4.
- Kishimoto, T.K., Kahn, J., Migaki, G., Mainolfi, E., Shirley, F., Ingraham, R. & Rothlein, R. (1995). Regulation of L-selectin expression by membrane proximal proteolysis. *Agents Actions Suppl*, **47**, 121-34.
- Kleinerman, D.I., Dinney, C.P., Zhang, W.W., Lin, S.H., Van, N.T. & Hsieh, J.T. (1996). Suppression of human bladder cancer growth by increased expression of C-CAM1 gene in an orthotopic model. *Cancer Res*, **56**, 3431-5.
- Knapp, A.C., Huang, J., Starling, G. & Kiener, P.A. (2000). Inhibitors of HMG-CoA reductase sensitize human smooth muscle cells to Fas-ligand and cytokine-induced cell death. *Atherosclerosis*, **152**, 217-27.

- Koch, G., Benz, C., Schmidt, G., Olenik, C. & Aktories, K. (1997). Role of Rho protein in lovastatin-induced breakdown of actin cytoskeleton. *J Pharmacol Exp Ther*, **283**, 901-9.
- Kozma, R., Ahmed, S., Best, A. & Lim, L. (1995). The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol Cell Biol*, **15**, 1942-52.
- Kraling, B.M., Razon, M.J., Boon, L.M., Zurakowski, D., Seachord, C., Darveau, R.P., Mulliken, J.B., Corless, C.L. & Bischoff, J. (1996). E-selectin is present in proliferating endothelial cells in human hemangiomas. *Am J Pathol*, **148**, 1181-91.
- Krause, T. & Turner, G.A. (1999). Are selectins involved in metastasis? *Clin Exp Metastasis*, **17**, 183-92.
- Kunath, T., Ordonez-Garcia, C., Turbide, C. & Beauchemin, N. (1995). Inhibition of colonic tumor cell growth by biliary glycoprotein. *Oncogene*, **11**, 2375-82.
- Kunzendorf, U., Kruger-Krasagakes, S., Notter, M., Hock, H., Walz, G. & Diamantstein, T. (1994). A sialyl-Le(x)-negative melanoma cell line binds to E-selectin but not to P-selectin. *Cancer Res*, **54**, 1109-12.
- Kusama, T., Mukai, M., Tatsuta, M., Matsumoto, Y., Nakamura, H. & Inoue, M. (2003). Selective inhibition of cancer cell invasion by a geranylgeranyltransferase-I inhibitor. *Clin Exp Metastasis*, **20**, 561-7.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-5.
- Laferriere, J., Houle, F., Taher, M.M., Valerie, K. & Huot, J. (2001). Transendothelial migration of colon carcinoma cells requires expression of E-selectin by endothelial cells and activation of stress-activated protein kinase-2 (SAPK2/p38) in the tumor cells. *J Biol Chem*, **276**, 33762-72.
- Lafrenie, R.M., Gallo, S., Podor, T.J., Buchanan, M.R. & Orr, F.W. (1994). The relative roles of vitronectin receptor, E-selectin and alpha 4 beta 1 in cancer cell adhesion to interleukin-1-treated endothelial cells. *Eur J Cancer*, **30A**, 2151-8.
- Lai, P.F., Mohamed, F., Monge, J.C. & Stewart, D.J. (2003). Downregulation of eNOS mRNA expression by TNFalpha: identification and functional characterization of RNA-protein interactions in the 3'UTR. *Cardiovasc Res*, **59**, 160-8.
- Lasky, L.A. (1992). Selectins: interpreters of cell-specific carbohydrate information during inflammation. *Science*, **258**, 964-9.
- Lasky, L.A. (1995). Selectin-carbohydrate interactions and the initiation of the inflammatory response. *Annu Rev Biochem*, **64**, 113-39.
- Lauffenburger, D.A. & Horwitz, A.F. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell*, **84**, 359-69.
- Laufs, U., La Fata, V., Plutzky, J. & Liao, J.K. (1998). Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation*, **97**, 1129-35.
- Laufs, U., Endres, M., Custodis, F., Gertz, K., Nickenig, G., Liao, J.K. & Bohm, M. (2000). Suppression of endothelial nitric oxide production after withdrawal of statin treatment is mediated by negative feedback regulation of rho GTPase gene transcription. *Circulation*, **102**, 3104-10.
- Laufs, U., Kilter, H., Konkol, C., Wassmann, S., Bohm, M. & Nickenig, G. (2002). Impact of HMG CoA reductase inhibition on small GTPases in the heart. *Cardiovasc Res*, **53**, 911-20.
- Laufs, U. (2003). Beyond lipid-lowering: effects of statins on endothelial nitric oxide. *Eur J Clin Pharmacol*, **58**, 719-31.
- Lauri, D., Needham, L., Martin-Padura, I. & Dejana, E. (1991). Tumor cell adhesion to endothelial cells: endothelial leukocyte adhesion molecule-1 as an inducible adhesive receptor specific for colon carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst*, **83**, 1321-4.
- Lazar, T., Gotte, M. & Gallwitz, D. (1997). Vesicular transport: how many Ypt/Rab-GTPases make a eukaryotic cell? *Trends Biochem Sci*, **22**, 468-72.
- Leach, J.K., Black, S.M., Schmidt-Ullrich, R.K. & Mikkelsen, R.B. (2002). Activation of constitutive nitric-oxide synthase activity is an early signaling event induced by ionizing radiation. *J Biol Chem*, **277**, 15400-6.
- Lebowitz, P.F., Davide, J.P. & Prendergast, G.C. (1995). Evidence that farnesyltransferase inhibitors suppress Ras transformation by interfering with Rho activity. *Mol Cell Biol*, **15**, 6613-22.
- Lebowitz, P.F. & Prendergast, G.C. (1998). Non-Ras targets of farnesyltransferase inhibitors: focus on Rho. *Oncogene*, **17**, 1439-45.
- Leid, J.G., Speer, C.A. & Jutila, M.A. (2002). Ultrastructural examination of cytoskeletal linkage of L-selectin and comparison of L-selectin cytoskeletal association to that of other human and bovine lymphocyte surface antigens. *Cell Immunol*, **215**, 219-31.
- Leung, T., Manser, E., Tan, L. & Lim, L. (1995). A novel serine/threonine kinase binding the Ras-related RhoA GTPase which translocates the kinase to peripheral membranes. *J Biol Chem*, **270**, 29051-4.
- Ley, K. & Gaehetgens, P. (1991). Endothelial, not hemodynamic, differences are responsible for preferential leukocyte rolling in rat mesenteric venules. *Circ Res*, **69**, 1034-41.

- Li, C., Hu, Y., Mayr, M. & Xu, Q. (1999). Cyclic strain stress-induced mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase 1 expression in vascular smooth muscle cells is regulated by Ras/Rac-MAPK pathways. *J Biol Chem*, **274**, 25273-80.
- Li, D. & Mehta, J.L. (2003). 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors protect against oxidized low-density lipoprotein-induced endothelial dysfunction. *Endothelium*, **10**, 17-21.
- Li, D., Singh, R.M., Liu, L., Chen, H., Singh, B.M., Kazzaz, N. & Mehta, J.L. (2003). Oxidized-LDL through LOX-1 increases the expression of angiotensin converting enzyme in human coronary artery endothelial cells. *Cardiovasc Res*, **57**, 238-43.
- Li, D., Yang, B. & Mehta, J.L. (1998). Ox-LDL induces apoptosis in human coronary artery endothelial cells: role of PKC, PTK, bcl-2, and Fas. *Am J Physiol*, **275**, H568-76.
- Li, N. & Karin, M. (1998). Ionizing radiation and short wavelength UV activate NF-kappaB through two distinct mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 13012-7.
- Li, Q. & Verma, I.M. (2002). NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol*, **2**, 725-34.
- Li, X., Liu, L., Tupper, J.C., Bannerman, D.D., Winn, R.K., Sebti, S.M., Hamilton, A.D. & Harlan, J.M. (2002). Inhibition of protein geranylgeranylation and RhoA/RhoA kinase pathway induces apoptosis in human endothelial cells. *J Biol Chem*, **277**(18), 15309-16.
- Lian, J.P. & Badwey, J.A. (1997). Activation of the p21-activated protein kinases from neutrophils with an antibody that reacts with the N-terminal region of Pak 1. *FEBS Lett*, **404**, 211-5.
- Lidington, E.A., Moyes, D.L., McCormack, A.M. & Rose, M.L. (1999). A comparison of primary endothelial cells and endothelial cell lines for studies of immune interactions. *Transpl Immunol*, **7**, 239-46.
- Liu, A.X., Rane, N., Liu, J.P. & Prendergast, G.C. (2001a). RhoB is dispensable for mouse development, but it modifies susceptibility to tumor formation as well as cell adhesion and growth factor signaling in transformed cells. *Mol Cell Biol*, **21**, 6906-12.
- Liu, A., Du, W., Liu, J.P., Jessell, T.M. & Prendergast, G.C. (2000). RhoB alteration is necessary for apoptotic and antineoplastic responses to farnesyltransferase inhibitors. *Mol Cell Biol*, **20**, 6105-13.
- Liu, M., Bishop, W.R., Nielsen, L.L., Bryant, M.S. & Kirschmeier, P. (2001b). Orally bioavailable farnesyltransferase inhibitors as anticancer agents in transgenic and xenograft models. *Methods Enzymol*, **333**, 306-18.
- Liu, Z.G., Hsu, H., Goeddel, D.V. & Karin, M. (1996). Dissection of TNF receptor 1 effector functions: JNK activation is not linked to apoptosis while NF-kappaB activation prevents cell death. *Cell*, **87**, 565-76.
- Llavadot, J., Murasawa, S., Kureishi, Y., Uchida, S., Masuda, H., Kawamoto, A., Walsh, K., Isner, J.M. & Asahara T. (2001). HMG-CoA reductase inhibitor mobilizes bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *J Clin Invest*, **108**, 399-405.
- Lopez, S., Peiretti, F., Bonardo, B., Deprez-Beauchair, P., Laouenan, H., Juhan-Vague, I. & Nalbone, G. (2001). Effect of atorvastatin on plasminogen activator inhibitor type-1 synthesis in human monocytes/macrophages. *J Cardiovasc Pharmacol*, **37**, 762-8.
- Luscinskas, F.W., Ding, H., Tan, P., Cumming, D., Tedder, T.F. & Gerritsen, M.E. (1996). L- and P-selectins, but not CD49d (VLA-4) integrins, mediate monocyte initial attachment to TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow in vitro. *J Immunol*, **157**, 326-35.
- MacEwan, D.J. (2002). TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences. *Cell Signal*, **14**, 477-92.
- Mackay, D.J. & Hall, A. (1998). Rho GTPases. *J Biol Chem*, **273**, 20685-8.
- Madaule, P., Eda, M., Watanabe, N., Fujisawa, K., Matsuoka, T., Bito, H., Ishizaki, T. & Narumiya, S. (1998). Role of citron kinase as a target of the small GTPase Rho in cytokinesis. *Nature*, **394**, 491-4.
- Madrid, L.V., Wang, C., Guttridge, D.C., Schottelius, A.J.G., Baldwin, A.S. & Mayo, M.W. (2000). *Mol Cell Biol*, **20** (5), 1626-38.
- Mangelsdorf, D.J. & Evans, R.M. (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell*, **83**, 841-50.
- Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P. & et al. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell*, **83**, 835-9.
- Manna, S.K. & Aggarwal, B.B. (2000). All-trans-retinoic acid upregulates TNF receptors and potentiates TNF-induced activation of nuclear factors-kappaB, activated protein-1 and apoptosis in human lung cancer cells. *Oncogene*, **19**, 2110-9.
- Mannori, G., Santoro, D., Carter, L., Corless, C., Nelson, R.M. & Bevilacqua, M.P. (1997). Inhibition of colon carcinoma cell lung colony formation by a soluble form of E-selectin. *Am J Pathol*, **151**, 233-43.
- Manser, E., Chong, C., Zhao, Z.S., Leung, T., Michael, G., Hall, C. & Lim, L. (1995). Molecular cloning of a new member of the p21-Cdc42/Rac-activated kinase (PAK) family. *J Biol Chem*, **270**, 25070-8.
- Marchetti, M., Falanga, A., Giovanelli, S., Oldani, E. & Barbui, T. (1996). All-trans-retinoic acid increases adhesion to endothelium of the human promyelocytic leukaemia cell line NB4. *Br J Haematol*, **93**, 360-6.
- Marshall, C.J. (1993). Protein prenylation: a mediator of protein-protein interactions. *Science*, **259**, 1865-6.

- Marz, W. & Wieland, H. (2000). HMG-CoA reductase inhibition: anti-inflammatory effects beyond lipid lowering? *Herz*, **25**, 117-25.
- Matar, P., Rozados, V.R., Binda, M.M., Roggero, E.A., Bonfil, R.D. & Scharovsky, O.G. (1999). Inhibitory effect of Lovastatin on spontaneous metastases derived from a rat lymphoma. *Clin Exp Metastasis*, **17**, 19-25.
- Matar, P., Rozados, V.R., Roggero, E.A. & Scharovsky, O.G. (1998). Lovastatin inhibits tumor growth and metastasis development of a rat fibrosarcoma. *Cancer Biother Radiopharm*, **13**, 387-93.
- Matsuura, N., Narita, T., Mitsuoka, C., Kimura, N., Kannagi, R., Imai, T., Funahashi, H. & Takagi, H. (1997). Increased level of circulating adhesion molecules in the sera of breast cancer patients with distant metastases. *Jpn J Clin Oncol*, **27**, 135-9.
- May, M.J., Wheeler-Jones, C.P. & Pearson, J.D. (1996). Effects of protein tyrosine kinase inhibitors on cytokine-induced adhesion molecule expression by human umbilical vein endothelial cells. *Br J Pharmacol*, **118**, 1761-71.
- Mayrovitz, H.N. (1992). Leukocyte rolling: a prominent feature of venules in intact skin of anesthetized hairless mice. *Am J Physiol*, **262**, H157-61.
- McEver, R.P. (1994). Role of selectins in leukocyte adhesion to platelets and endothelium. *Ann N Y Acad Sci*, **714**, 185-9.
- McEver, R.P. (1997). Selectin-carbohydrate interactions during inflammation and metastasis. *Glycoconj J*, **14**, 585-91.
- Mehta, J.L. (2003). Pleiotropic effects of statins: how important are they in the prevention of vascular disease? *Endothelium*, **10**, 3-4.
- Mehta, N., Hordines, J., Sykes, D., Doerr, R.J. & Cohen, S.A. (1998). Low density lipoproteins and Lovastatin modulate the organ-specific transendothelial migration of primary and metastatic human colon adenocarcinoma cell lines in vitro. *Clin Exp Metastasis*, **16**, 587-94.
- Melichar, B., Ferrandina, G., Verschraegen, C.F., Loercher, A., Abbruzzese, J.L. & Freedman, R.S. (1998). Growth inhibitory effects of aromatic fatty acids on ovarian tumor cell lines. *Clin Cancer Res*, **4**, 3069-76.
- Melrose, J., Tsurushita, N., Liu, G., Berg, E.L. (1998). IFN-gamma inhibits activation-induced expression of E- and P-selectin on endothelial cells. *J Immunol*, **161**(5), 2457-64
- Meroni, P.L., Raschi, E., Testoni, C., Tincani, A., Balestrieri, G., Molteni, R., Khamashta, M.A., Tremoli, E. & Camera, M. (2001). Statins prevent endothelial cell activation induced by antiphospholipid (anti-beta2-glycoprotein I) antibodies: effect on the proadhesive and proinflammatory phenotype. *Arthritis Rheum*, **44**, 2870-8.
- Miller, A.C., Kariko, K., Myers, C.E., Clark, E.P. & Samid, D. (1993). Increased radioresistance of EJras-transformed human osteosarcoma cells and its modulation by lovastatin, an inhibitor of p21ras isoprenylation. *Int J Cancer*, **53**, 302-7.
- Miller, N., Vile, R.G. & Hart, I.R. (1996). Selectin ligands on human melanoma cells. *Glycoconj J*, **13**, 33-43.
- Minden, A., Lin, A., Claret, F.X., Abo, A. & Karin, M. (1995). Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell*, **81**, 1147-57.
- Minden, A., Lin, A., McMahon, M., Lange-Carter, C., Derijard, B., Davis, R.J., Johnson, G.L. & Karin, M. (1994). Differential activation of ERK and JNK mitogen-activated protein kinases by Raf-1 and MEKK. *Science*, **266**, 1719-23.
- Mitchison, T.J. & Cramer, L.P. (1996). Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell*, **84**, 371-9.
- Mitjans, F., Sander, D., Adan, J., Sutter, A., Martinez, J.M., Jaggel, C.S., Moyano, J.M., Kreysch, H.G., Piulats, J. & Goodman, S.L. (1995). An anti-alpha v-integrin antibody that blocks integrin function inhibits the development of a human melanoma in nude mice. *J Cell Sci*, **108 (Pt 8)**, 2825-38.
- Miyatani, S., Shimamura, K., Hatta, M., Nagafuchi, A., Nose, A., Matsunaga, M., Hatta, K. & Takeichi, M. (1989). Neural cadherin: role in selective cell-cell adhesion. *Science*, **245**, 631-5.
- Montgomery, K.F., Osborn, L., Hession, C., Tizard, R., Goff, D., Vassallo, C., Tarr, P.I., Bomsztyk, K., Lobb, R., Harlan, J.M. & et al. (1991). Activation of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1) gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 6523-7.
- 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 Harb Symp Quant Biol*, **51 Pt 1**, 263-73.
- Murga, C., Zohar, M., Teramoto, H. & Gutkind, J.S. (2002). Rac1 and RhoG promote cell survival by the activation of PI3K and Akt, independently of their ability to stimulate JNK and NF-kappaB. *Oncogene*, **21**, 207-16.
- Na, S.Y., Choi, H.S., Kim, J.W., Na, D.S. & Lee, J.W. (1998). Bcl3, an IkappaB protein, as a novel transcription coactivator of the retinoid X receptor. *J Biol Chem*, **273**, 30933-8.
- Na, S.Y., Kang, B.Y., Chung, S.W., Han, S.J., Ma, X., Trinchieri, G., Im, S.Y., Lee, J.W. & Kim, T.S. (1999). Retinoids inhibit interleukin-12 production in macrophages through physical associations of retinoid X receptor and NFkappaB. *J Biol Chem*, **274**, 7674-80.

- Naderi, S., Blomhoff, R., Myklebust, J., Smeland, E.B., Erikstein, B., Norum, K.R. & Blomhoff, H.K. (1999). Lovastatin inhibits G1/S transition of normal human B-lymphocytes independent of apoptosis. *Exp Cell Res*, **252**, 144-53.
- Nakamori, S., Furukawa, H., Hiratsuka, M., Iwanaga, T., Imaoka, S., Ishikawa, O., Kabuto, T., Sasaki, Y., Kameyama, M., Ishiguro, S. & Irimura, T. (1997a). Expression of carbohydrate antigen sialyl Le(a): a new functional prognostic factor in gastric cancer. *J Clin Oncol*, **15**, 816-25.
- Nakamori, S., Kameyama, M., Imaoka, S., Furukawa, H., Ishikawa, O., Sasaki, Y., Izumi, Y. & Irimura, T. (1997b). Involvement of carbohydrate antigen sialyl Lewis(x) in colorectal cancer metastasis. *Dis Colon Rectum*, **40**, 420-31.
- Nakashio, T., Narita, T., Sato, M., Akiyama, S., Kasai, Y., Fujiwara, M., Ito, K., Takagi, H. & Kannagi, R. (1997). The association of metastasis with the expression of adhesion molecules in cell lines derived from human gastric cancer. *Anticancer Res*, **17**, 293-9.
- Napolitano, E.W., Venstrom, K., Wheeler, E.F. & Reichardt, L.F. (1991). Molecular cloning and characterization of B-cadherin, a novel chick cadherin. *J Cell Biol*, **113**, 893-905.
- Narumiya, S., Ishizaki, T. & Watanabe, N. (1997). Rho effectors and reorganization of actin cytoskeleton. *FEBS Lett*, **410**, 68-72.
- Needham, L.K. & Schnaar, R.L. (1993). Carbohydrate recognition in the peripheral nervous system: a calcium-dependent membrane binding site for HNK-1 reactive glycolipids potentially involved in Schwann cell adhesion. *J Cell Biol*, **121**, 397-408.
- Nguyen, H.N., Sevin, B.U., Averette, H.E., Ramos, R., Ganjei, P. & Perras, J. (1993). Evidence of tumor heterogeneity in cervical cancers and lymph node metastases as determined by flow cytometry. *Cancer*, **71**, 2543-50.
- Nguyen, M. (1997). Angiogenic factors as tumor markers. *Invest New Drugs*, **15**, 29-37.
- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, F. & Riccardi, C. (1991). A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods*, **139**, 271-9.
- Niwa, S., Totsuka, T. & Hayashi, S. (1996). Inhibitory effect of fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, on the expression of adhesion molecules on human monocyte cell line. *Int J Immunopharmacol*, **18**, 669-75.
- Nozawa, F., Hirota, M., Okabe, A., Shibata, M., Iwamura, T., Haga, Y. & Ogawa, M. (2000). Tumor necrosis factor alpha acts on cultured human vascular endothelial cells to increase the adhesion of pancreatic cancer cells. *Pancreas*, **21**, 392-8.
- Ogata, Y., Takahashi, M., Takeuchi, K., Ueno, S., Mano, H., Ookawara, S., Kobayashi, E., Ikeda, U. & Shimada, K. (2002). Fluvastatin induces apoptosis in rat neonatal cardiac myocytes: a possible mechanism of statin-attenuated cardiac hypertrophy. *J Cardiovasc Pharmacol*, **40**, 907-15.
- Olson, M.F., Ashworth, A. & Hall, A. (1995). An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science*, **269**, 1270-2.
- Oltvai, Z.N., Millman, C.L. & Korsmeyer, S.J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, **74**, 609-19.
- Omi, H., Okayama, N., Shimizu, M., Fukutomi, T., Imaeda, K., Okouchi, M. & Itoh, M. (2003). Statins inhibit high glucose-mediated neutrophil-endothelial cell adhesion through decreasing surface expression of endothelial adhesion molecules by stimulating production of endothelial nitric oxide. *Microvasc Res*, **65**, 118-24.
- Overduin, M., Harvey, T.S., Bagby, S., Tong, K.I., Yau, P., Takeichi, M. & Ikura, M. (1995). Solution structure of the epithelial cadherin domain responsible for selective cell adhesion. *Science*, **267**, 386-9.
- Palmetshofer, A., Robson, S.C. & Nehls, V. (1999). Lysophosphatidic acid activates nuclear factor kappa B and induces proinflammatory gene expression in endothelial cells. *Thromb Haemost*, **82**, 1532-7.
- Pasceri, V., Willerson, J.T. & Yeh, E.T. (2000). Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation*, **102**, 2165-8.
- Patel, T.R. & Corbett, S.A. (2003). Mevastatin suppresses lipopolysaccharide-induced Rac activation in the human monocyte cell line THP-1. *Surgery*, **134**, 306-11.
- Pavalko, F.M., Walker, D.M., Graham, L., Goheen, M., Doerschuk, C.M. & Kansas, G.S. (1995). The cytoplasmic domain of L-selectin interacts with cytoskeletal proteins via alpha-actinin: receptor positioning in microvilli does not require interaction with alpha-actinin. *J Cell Biol*, **129**, 1155-64.
- Pedersen, T.R., Wilhelmsen, L., Faergeman, O., Strandberg, T.E., Thorgeirsson, G., Troedsson, L., Kristianson, J., Berg, K., Cook, T.J., Haghfelt, T., Kjekshus, J., Miettinen, T., Olsson, A.G., Pyorala, K. & Wedel, H. (2000). Follow-up study of patients randomized in the Scandinavian simvastatin survival study (4S) of cholesterol lowering. *Am J Cardiol*, **86**, 257-62.
- Perfettini, J.L., Roumier, T., Castedo, M., Larochette, N., Boya, P., Raynal, B., Lazar, V., Ciccocanti, F., Nardacci, R., Penninger, J., Piacentini, M. & Kroemer, G. (2004). NF- κ B and p53 are the

- dominant apoptosis-inducing transcription factors elicited by the HIV-1 envelope. *J Exp Med*, **199** (5), 629-40.
- Perona, R., Montaner, S., Saniger, L., Sanchez-Perez, I., Bravo, R. & Lacal, J.C. (1997). Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. *Genes Dev*, **11**, 463-75.
- Pottratz, S.T., Hall, T.D., Scribner, W.M., Jayaram, H.N. & Natarajan, V. (1996). P-selectin-mediated attachment of small cell lung carcinoma to endothelial cells. *Am J Physiol*, **271**, L918-23.
- Prabhakarandian, B., Goetz, D.J., Swerlick, R.A., Chen, X. & Kiani, M.F. (2001). Expression and functional significance of adhesion molecules on cultured endothelial cells in response to ionizing radiation. *Microcirculation*, **8**, 355-64.
- Price, L.S. & Collard, J.G. (2001). Regulation of the cytoskeleton by Rho-family GTPases: implications for tumour cell invasion. *Semin Cancer Biol*, **11**, 167-73.
- Qian, F., Vaux, D.L. & Weissman, I.L. (1994). Expression of the integrin alpha 4 beta 1 on melanoma cells can inhibit the invasive stage of metastasis formation. *Cell*, **77**, 335-47.
- Raab, M., Daxecker, H., Markovic, S., Karimi, A., Griesmacher, A. & Mueller, M.M. (2002). Variation of adhesion molecule expression on human umbilical vein endothelial cells upon multiple cytokine application. *Clin Chim Acta*, **321**, 11-6.
- Ray, K.P., Farrow, S., Daly, M., Talabot, F. & Searle, N. (1997). Induction of the E-selectin promoter by interleukin 1 and tumour necrosis factor alpha, and inhibition by glucocorticoids. *Biochem J*, **328** (Pt 2), 707-15.
- Read, M.A., Whitley, M.Z., Gupta, S., Pierce, J.W., West, J., Davis, R.J. & Collins, T. (1997). Tumor necrosis factor alpha-induced E-selectin expression is activated by the nuclear factor kappaB and c-JUN N-terminal kinase/p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem*, **272** (5), 2753-61.
- Redowicz, M.J. (1999). Rho-associated kinase: involvement in the cytoskeleton regulation. *Arch Biochem Biophys*, **364**, 122-4.
- Renkonen, J., Paavonen, T. & Renkonen, R. (1997a). Endothelial and epithelial expression of sialyl Lewis(x) and sialyl Lewis(a) in lesions of breast carcinoma. *Int J Cancer*, **74**, 296-300.
- Renkonen, R., Mattila, P., Majuri, M.L., Rabina, J., Toppila, S., Renkonen, J., Hirvas, L., Niittymaki, J., Turunen, J.P., Renkonen, O. & Paavonen, T. (1997b). In vitro experimental studies of sialyl Lewis x and sialyl Lewis a on endothelial and carcinoma cells: crucial glycans on selectin ligands. *Glycoconj J*, **14**, 593-600.
- Ridley, A.J. & Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*, **70**, 389-99.
- Ridley, A.J. & Hall, A. (1994). Signal transduction pathways regulating Rho-mediated stress fibre formation: requirement for a tyrosine kinase. *Embo J*, **13**, 2600-10.
- Ridley, A.J., Paterson, H.F., Johnston, C.L., Diekmann, D. & Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*, **70**, 401-10.
- Ringwald, M., Schuh, R., Vestweber, D., Eistetter, H., Lottspeich, F., Engel, J., Dolz, R., Jahnig, F., Epplen, J., Mayer, S. & et al. (1987). The structure of cell adhesion molecule uvomorulin. Insights into the molecular mechanism of Ca²⁺-dependent cell adhesion. *Embo J*, **6**, 3647-53.
- Ritter, D.M. & McKerrow, J.H. (1996). Intercellular adhesion molecule 1 is the major adhesion molecule expressed during schistosome granuloma formation. *Infect Immun*, **64**, 4706-13.
- Rizza, C., Leitinger, N., Yue, J., Fischer, D.J., Wang, D.A., Shih, P.T., Lee, H., Tigyi, G. & Berliner, J.A. (1999). Lysophosphatidic acid as a regulator of endothelial/leukocyte interaction. *Lab Invest*, **79**, 1227-35.
- Rosen, S.D. & Bertozzi, C.R. (1994). The selectins and their ligands. *Curr Opin Cell Biol*, **6**, 663-73.
- Rosette, C. & Karin, M. (1996). Ultraviolet light and osmotic stress: activation of the JNK cascade through multiple growth factor and cytokine receptors. *Science*, **274**, 1194-7.
- Roth, J., Goebeler, M., Ludwig, S., Wagner, L., Kilian, K., Sorg, C., Harms, E., Schulze-Osthoff, K. & Koch, H. (2001). Homocysteine inhibits tumor necrosis factor-induced activation of endothelium via modulation of nuclear factor-kappa b activity. *Biochim Biophys Acta*, **1540**, 154-65.
- Rothe, J., Bluethmann, H., Gentz, R., Lesslauer, W. & Steinmetz, M. (1993). Genomic organization and promoter function of the murine tumor necrosis factor receptor beta gene. *Mol Immunol*, **30**, 165-75.
- Ruiz, P., Dunon, D., Sonnenberg, A. & Imhof, B.A. (1993). Suppression of mouse melanoma metastasis by EA-1, a monoclonal antibody specific for alpha 6 integrins. *Cell Adhes Commun*, **1**, 67-81.
- Ruiz-Velasco, N., Dominguez, A. & Vega, M.A. (2004). Statins upregulate CD36 expression in human monocytes, an effect strengthened when combined with PPAR-gamma ligands Putative contribution of Rho GTPases in statin-induced CD36 expression. *Biochem Pharmacol*, **67**, 303-13.
- Rutishauser, U., Brackenbury, R., Thiery, J.P. & Edelman, G.M. (1978a). Cell-adhesion molecules from neural tissues of the chick embryo. *Birth Defects Orig Artic Ser*, **14**, 305-16.

- Rutishauser, U., Gall, W.E. & Edelman, G.M. (1978b). Adhesion among neural cells of the chick embryo. IV. Role of the cell surface molecule CAM in the formation of neurite bundles in cultures of spinal ganglia. *J Cell Biol*, **79**, 382-93.
- Rutishauser, U., Thiery, J.P., Brackenbury, R. & Edelman, G.M. (1978c). Adhesion among neural cells of the chick embryo. III. Relationship of the surface molecule CAM to cell adhesion and the development of histotypic patterns. *J Cell Biol*, **79**, 371-81.
- Sacks, F.M., Pfeffer, M.A., Moye, L.A., Rouleau, J.L., Rutherford, J.D., Cole, T.G., Brown, L., Warnica, J.W., Arnold, J.M., Wun, C.C., Davis, B.R. & Braunwald, E. (1996). The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *N Engl J Med*, **335**, 1001-9.
- Sadeghi, M.M., Collinge, M., Pardi, R. & Bender, J.R. (2000). Simvastatin modulates cytokine-mediated endothelial cell adhesion molecule induction: involvement of an inhibitory G protein. *J Immunol*, **165**, 2712-8.
- Santee, S.M. & Owen-Schaub, L.B. (1996). Human tumor necrosis factor receptor p75/80 (CD120b) gene structure and promoter characterization. *J Biol Chem*, **271**, 21151-9.
- Sato, M., Narita, T., Kimura, N., Zenita, K., Hashimoto, T., Manabe, T. & Kannagi, R. (1997). The association of sialyl Lewis(a) antigen with the metastatic potential of human colon cancer cells. *Anticancer Res*, **17**, 3505-11.
- Sawaya, D.E., Jr., Zibari, G.B., Minardi, A., Bilton, B., Burney, D., Granger, D.N., McDonald, J.C. & Brown, M. (1999). P-selectin contributes to the initial recruitment of rolling and adherent leukocytes in hepatic venules after ischemia/reperfusion. *Shock*, **12**, 227-32.
- Schadendorf, D., Herfordt, R. & Czarnetzki, B.M. (1995). P-glycoprotein expression in primary and metastatic malignant melanoma. *Br J Dermatol*, **132**, 551-5.
- Schindler, U. & Baichwal, V.R. (1994). Three NF-kappa B binding sites in the human E-selectin gene required for maximal tumor necrosis factor alpha-induced expression. *Mol Cell Biol*, **14**, 5820-31.
- Schmid, E., Muller, T.H., Budzinski, R.M., Binder, K. & Pfizenmaier, K. (1995). Signaling by E-selectin and ICAM-1 induces endothelial tissue factor production via autocrine secretion of platelet-activating factor and tumor necrosis factor alpha. *J Interferon Cytokine Res*, **15**, 819-25.
- Schmitz, A.A., Govek, E.E., Bottner, B. & Van Aelst, L. (2000). Rho GTPases: signaling, migration, and invasion. *Exp Cell Res*, **261**, 1-12.
- Schwarzacher, S.P. (2002). Das Endothel: parakrine und endokrine Funktionen. *J Kardiol*, **9** (4), 121-4.
- Segain, J.P., Raingeard de la Bletiere, D., Sauzeau, V., Bourreille, A., Hilaret, G., Cario-Toumaniantz, C., Picaud, P., Galmiche, J.P. & Loirand, G. (2003). Rho kinase blockade prevents inflammation via nuclear factor kappa B inhibition: evidence in Crohn's disease and experimental colitis. *Gastroenterology*, **124**, 1180-7.
- Settleman, J., Narasimhan, V., Foster, L.C. & Weinberg, R.A. (1992). Molecular cloning of cDNAs encoding the GAP-associated protein p190: implications for a signaling pathway from ras to the nucleus. *Cell*, **69**, 539-49.
- Shinoda, M., Shimazu, M., Wakabayashi, G., Tanabe, M., Hoshino, K. & Kitajima, M. (2002). Tumor necrosis factor suppression and microcirculatory disturbance amelioration in ischemia/reperfusion injury of rat liver after ischemic preconditioning. *J Gastroenterol Hepatol*, **17**, 1211-9.
- Siebenlist, U., Franzoso, G. & Brown, K. (1994). Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol*, **10**, 405-55.
- Smeets, E.F., de Vries, T., Leeuwenberg, J.F., van den Eijnden, D.H., Buurman, W.A. & Neefjes, J.J. (1993). Phosphorylation of surface E-selectin and the effect of soluble ligand (sialyl Lewisx) on the half-life of E-selectin. *Eur J Immunol*, **23**, 147-51.
- Smith, C.A., Farrah, T. & Goodwin, R.G. (1994). The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation and death. *Cell*, **76**, 959-62.
- Son, E.W., Cho, C.K., Rhee, D.K. & Pyo, S. (2001). Inhibition of gamma-irradiation induced adhesion molecules and NO production by alginate in human endothelial cells. *Arch Pharm Res*, **24**, 466-71.
- Spertini, O., Lusinskas, F.W., Gimbrone, M.A., Jr. & Tedder, T.F. (1992). Monocyte attachment to activated human vascular endothelium in vitro is mediated by leukocyte adhesion molecule-1 (L-selectin) under nonstatic conditions. *J Exp Med*, **175**, 1789-92.
- Springer, T.A. (1990). Adhesion receptors of the immune system. *Nature*, **246**, 425-34.
- Stalker, T.J., Lefer, A.M. & Scalia, R. (2001). A new HMG-CoA reductase inhibitor, rosuvastatin, exerts anti-inflammatory effects on the microvascular endothelium: the role of mevalonic acid. *Br J Pharmacol*, **133**, 406-12.
- Stegmaier, M., Levinovitz, A., Isenmann, S., Borges, E., Lenter, M., Kocher, H.P., Kleuser, B. & Vestweber, D. (1995). The E-selectin-ligand ESL-1 is a variant of a receptor for fibroblast growth factor. *Nature*, **373**, 615-20.

- Sternberg, N. & Hamilton, D. (1981). Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol*, **150**, 467-86.
- Stone, J.P. & Wagner, D.D. (1993). P-selectin mediates adhesion of platelets to neuroblastoma and small cell lung cancer. *J Clin Invest*, **92**, 804-13.
- Strickland, I., Rhodes, L.E., Flanagan, B.F. & Friedmann, P.S. (1997). TNF-alpha and IL-8 are upregulated in the epidermis of normal human skin after UVB exposure: correlation with neutrophil accumulation and E-selectin expression. *J Invest Dermatol*, **108**, 763-8.
- Stuhlmeier, K.M., Tarn, C., Csizmadia, V. & Bach, F.H. (1996). Selective suppression of endothelial cell activation by arachidonic acid. *Eur J Immunol*, **26**, 1417-23.
- Sulciner, D.J., Irani, K., Yu, Z.X., Ferrans, V.J., Goldschmidt-Clermont, P. & Finkel, T. (1996). rac1 regulates a cytokine-stimulated, redox-dependent pathway necessary for NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol*, **16**, 7115-21.
- Sun, J., Ohkanda, J., Coppola, D., Yin, H., Kothare, M., Busciglio, B., Hamilton, A.D. & Sebt, S.M. (2003). Geranylgeranyltransferase I inhibitor GGTI-2154 induces breast carcinoma apoptosis and tumor regression in H-Ras transgenic mice. *Cancer Res*, **63**, 8922-9.
- Suwa, H., Ohshio, G., Imamura, T., Watanabe, G., Arii, S., Imamura, M., Narumiya, S., Hiai, H. & Fukumoto, M. (1998). Overexpression of the rhoC gene correlates with progression of ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Br J Cancer*, **77**, 147-52.
- Swiatkowska, M., Pawlowska, Z., Szymraj, J., Drzewoski, J., Watala, C. & Cierniewski, C.S. (2002). Cerivastatin, a HMG-CoA reductase inhibitor, reduces plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression in endothelial cells by down-regulation of cellular signaling and the inhibition of PAI-1 promoter activity. *Jpn J Pharmacol*, **90**, 337-44.
- Takada, A., Ohmori, K., Takahashi, N., Tsuyuoka, K., Yago, A., Zenita, K., Hasegawa, A. & Kannagi, R. (1991). Adhesion of human cancer cells to vascular endothelium mediated by a carbohydrate antigen, sialyl Lewis A. *Biochem Biophys Res Commun*, **179**, 713-9.
- Takada, A., Ohmori, K., Yoneda, T., Tsuyuoka, K., Hasegawa, A., Kiso, M. & Kannagi, R. (1993). Contribution of carbohydrate antigens sialyl Lewis A and sialyl Lewis X to adhesion of human cancer cells to vascular endothelium. *Cancer Res*, **53**, 354-61.
- Takai, Y., Kaibuchi, K., Kikuchi, A., Sasaki, T. & Shirataki, H. (1993). Regulators of small GTPases. *Ciba Found Symp*, **176**, 128-38; discussion 138-46.
- Takai, Y., Sasaki, T. & Matozaki, T. (2001). Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev*, **81**, 153-208.
- Takaishi, K., Sasaki, T., Kotani, H., Nishioka, H. & Takai, Y. (1997). Regulation of cell-cell adhesion by rac and rho small G proteins in MDCK cells. *J Cell Biol*, **139**, 1047-59.
- Takemoto, M. & Liao, J.K. (2001). Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **21**, 1712-9.
- Taraboletti, G., Borsotti, P., Chirivi, R.G., Vergani, V., Falanga, A., Barbui, T., Giavazzi, R. & Rambaldi, A. (1997). Effect of all trans-retinoic acid (ATRA) on the adhesive and motility properties of acute promyelocytic leukemia cells. *Int J Cancer*, **70**, 72-7.
- Tedder, T.F., Isaacs, C.M., Ernst, T.J., Demetri, G.D., Adler, D.A. & Distech, C.M. (1989). Isolation and chromosomal localization of cDNAs encoding a novel human lymphocyte cell surface molecule, LAM-1. Homology with the mouse lymphocyte homing receptor and other human adhesion proteins. *J Exp Med*, **170**, 123-33.
- Tedder, T.F., Steeber, D.A., Chen, A. & Engel, P. (1995). The selectins: vascular adhesion molecules. *Faseb J*, **9**, 866-73.
- Teupser, D., Bruegel, M., Stein, O., Stein, Y. & Thiery, J. (2001). HMG-CoA reductase inhibitors reduce adhesion of human monocytes to endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, **289**, 838-44.
- Thibault, A., Samid, D., Tompkins, A.C., Figg, W.D., Cooper, M.R., Hohl, R.J., Trepel, J., Liang, B., Patronas, N., Venzon, D.J., Reed, E. & Myers, C.E. (1996). Phase I study of lovastatin, an inhibitor of the mevalonate pathway, in patients with cancer. *Clin Cancer Res*, **2**, 483-91.
- Thornhill, M.H. & Haskard, D.O. (1990). IL-4 regulates endothelial cell activation by IL-1, tumor necrosis factor, or IFN-gamma. *J Immunol*, **145**, 865-72.
- Tiemeyer, M., Swiedler, S.J., Ishihara, M., Moreland, M., Schweingruber, H., Hirtzer, P. & Brandley, B.K. (1991). Carbohydrate ligands for endothelial-leukocyte adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 1138-42.
- Tozawa, K., Sakurada, S., Kohri, K. & Okamoto, T. (1995). Effects of anti-nuclear factor kappa B reagents in blocking adhesion of human cancer cells to vascular endothelial cells. *Cancer Res*, **55**, 4162-7.
- Tozeren, A., Kleinman, H.K., Grant, D.S., Morales, D., Mercurio, A.M. & Byers, S.W. (1995). E-selectin-mediated dynamic interactions of breast- and colon-cancer cells with endothelial-cell monolayers. *Int J Cancer*, **60**, 426-31.
- Trahey, M. & McCormick, F. (1987). A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants. *Science*, **238**, 542-5.

- Urbich, C., Dernbach, E., Zeiher, A.M. & Dimmeler, S. (2002). Double-edged role of statins in angiogenesis signaling. *Circ Res*, **90**, 737-44.
- VandenBerg, E., Reid, M.D., Edwards, J.D. & Davis, H.W. (2004). The role of the cytoskeleton in cellular adhesion molecule expression in tumor necrosis factor-stimulated endothelial cells. *J Cell Biochem*, **91**, 926-37.
- van Zante, A. & Rosen, S.D. (2003). Sulphated endothelial ligands for L-selectin in lymphocyte homing and inflammation. *Biochem Soc Trans*, **31**, 313-7.
- Varki, A. (1994). Selectin ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 7390-7.
- Vaughan, C.J., Murphy, M.B. & Buckley, B.M. (1996). Statins do more than just lower cholesterol. *Lancet*, **348**, 1079-82.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. & Reutelingsperger, C. (1995). A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*, **184**, 39-51.
- Vermeulen, L., De Wilde, G., Van Damme, P., Vanden Berghe, W. & Haegeman, G. (2003). Transcriptional activation of the NF-kappaB p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1). *Embo J*, **22**, 1313-24.
- Vleminckx, K., Vakaet, L., Jr., Mareel, M., Fiers, W. & van Roy, F. (1991). Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell*, **66**, 107-19.
- Vora, M., Romero, L.I. & Karasek, M.A. (1996). Interleukin-10 induces E-selectin on small and large blood vessel endothelial cells. *J Exp Med*, **184**, 821-9.
- Wada, M., Nakanishi, H., Satoh, A., Hirano, H., Obaishi, H., Matsuura, Y. & Takai, Y. (1997). Isolation and characterization of a GDP/GTP exchange protein specific for the Rab3 subfamily small G proteins. *J Biol Chem*, **272**, 3875-8.
- Wagener, C. (1999). Molekulare Onkologie: Entstehung und Progression maligner Tumoren. 2., veränd. Aufl. – Stuttgart, New York; Thieme.
- Wagner, D.D. (1993). The Weibel-Palade body: the storage granule for von Willebrand factor and P-selectin. *Thromb Haemost*, **70**, 105-10.
- Wagner, M., Klein, C.L., Kleinert, H., Euchenhofer, C., Forstermann, U. & Kirkpatrick, C.J. (1997). Heavy metal ion induction of adhesion molecules and cytokines in human endothelial cells: the role of NF-kappaB, I kappaB-alpha and AP-1. *Pathobiology*, **65**, 241-52.
- Wajant, H., Henkler, F. & Scheurich, P. (2001). The TNF-receptor-associated factor family: scaffold molecules for cytokine receptors, kinases and their regulators. *Cell Signal*, **13**, 389-400.
- Walz, G., Aruffo, A., Kolanus, W., Bevilacqua, M. & Seed, B. (1990). Recognition by ELAM-1 of the sialyl-Lex determinant on myeloid and tumor cells. *Science*, **250**, 1132-5.
- Wassmann, S. & Nickenig, G. (2003). Interrelationship of free oxygen radicals and endothelial dysfunction--modulation by statins. *Endothelium*, **10**, 23-33.
- Waters, D., Higginson, L., Gladstone, P., Kimball, B., Le May, M., Boccuzzi, S.J. & Lesperance, J. (1994). Effects of monotherapy with an HMG-CoA reductase inhibitor on the progression of coronary atherosclerosis as assessed by serial quantitative arteriography. The Canadian Coronary Atherosclerosis Intervention Trial. *Circulation*, **89**, 959-68.
- Watson, M.L., Kingsmore, S.F., Johnston, G.I., Siegelman, M.H., Le Beau, M.M., Lemons, R.S., Bora, N.S., Howard, T.A., Weissman, I.L., McEver, R.P. & et al. (1990). Genomic organization of the selectin family of leukocyte adhesion molecules on human and mouse chromosome 1. *J Exp Med*, **172**, 263-72.
- Weinmann, M., Hoffmann, W., Rodegerdts, E. & Bamberg, M. (2000). Biological effects of ionizing radiation on human blood compounds ex vivo. *J Cancer Res Clin Oncol*, **126**, 584-8.
- Weller, A., Isenmann, S. & Vestweber, D. (1992). Cloning of the mouse endothelial selectins. Expression of both E- and P-selectin is inducible by tumor necrosis factor alpha. *J Biol Chem*, **267**, 15176-83.
- Westwick, J.K., Lambert, Q.T., Clark, G.J., Symons, M., Van Aelst, L., Pestell, R.G. & Der, C.J. (1997). Rac regulation of transformation, gene expression, and actin organization by multiple, PAK-independent pathways. *Mol Cell Biol*, **17**, 1324-35.
- Whitley, M.Z., Thanos, D., Read, M.A., Maniatis, T. & Collins, T. (1994). A striking similarity in the organization of the E-selectin and beta interferon gene promoters. *Mol Cell Biol*, **14**, 6464-75.
- Witcher, M., Ross, D.T., Rousseau, C., Deluca, L. & Miller, W.H., Jr. (2003). Synergy between all-trans retinoic acid and tumor necrosis factor pathways in acute leukemia cells. *Blood*, **102**, 237-45.
- Wittig, B.M., Kaulen, H., Thees, R., Schmitt, C., Knolle, P., Stock, J., Meyer zum Buschenfelde, K.H. & Dippold, W. (1996). Elevated serum E-selectin in patients with liver metastases of colorectal cancer. *Eur J Cancer*, **32A**, 1215-8.
- Wojciak-Stothard, B., Williams, L. & Ridley, A.J. (1999). Monocyte adhesion and spreading on human endothelial cells is dependent on Rho-regulated receptor clustering. *J Cell Biol*, **145**, 1293-307.
- Wong, W.W., Dimitroulakos, J., Minden, M.D. & Penn, L.Z. (2002). HMG-CoA reductase inhibitors and the malignant cell: the statin family of drugs as triggers of tumor-specific apoptosis. *Leukemia*, **16**, 508-19.

- Wu, J.R. & Gilbert, D.M. (2000). Lovastatin arrests CHO cells between the origin decision point and the restriction point. *FEBS Lett*, **484**, 108-12.
- Xia, Z., Tan, M.M., Wong, W.W., Dimitroulakos, J., Minden, M.D. & Penn, L.Z. (2001). Blocking protein geranylgeranylation is essential for lovastatin-induced apoptosis of human acute myeloid leukemia cells. *Leukemia*, **15**, 1398-407.
- Xie, S., Luca, M., Huang, S., Gutman, M., Reich, R., Johnson, J.P. & Bar-Eli, M. (1997). Expression of MCAM/MUC18 by human melanoma cells leads to increased tumor growth and metastasis. *Cancer Res*, **57**, 2295-303.
- Yaku, H., Sasaki, T. & Takai, Y. (1994). The Dbl oncogene product as a GDP/GTP exchange protein for the Rho family: its properties in comparison with those of Smg GDS. *Biochem Biophys Res Commun*, **198**, 811-7.
- Yamada, N., Chung, Y.S., Sawada, T., Okuno, M. & Sowa, M. (1995). Role of SPan-1 antigen in adhesion of human colon cancer cells to vascular endothelium. *Dig Dis Sci*, **40**, 1005-12.
- Yamada, N., Chung, Y.S., Takatsuka, S., Arimoto, Y., Sawada, T., Dohi, T. & Sowa, M. (1997). Increased sialyl Lewis A expression and fucosyltransferase activity with acquisition of a high metastatic capacity in a colon cancer cell line. *Br J Cancer*, **76**, 582-7.
- Yamamoto, M., Marui, N., Sakai, T., Morii, N., Kozaki, S., Ikai, K., Imamura, S. & Narumiya, S. (1993). ADP-ribosylation of the rhoA gene product by botulinum C3 exoenzyme causes Swiss 3T3 cells to accumulate in the G1 phase of the cell cycle. *Oncogene*, **8**, 1449-55.
- Ye, C., Kiriya, K., Mistuoka, C., Kannagi, R., Ito, K., Watanabe, T., Kondo, K., Akiyama, S. & Takagi, H. (1995). Expression of E-selectin on endothelial cells of small veins in human colorectal cancer. *Int J Cancer*, **61**, 455-60.
- Yin, X.M., Oltvai, Z.N. & Korsmeyer, S.J. (1994). BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature*, **369**, 321-3.
- Yoneda, J., Saiki, I., Kobayashi, H., Fujii, H., Ishizaki, Y., Kato, I., Kiso, M., Hasegawa, A. & Azuma, I. (1994). Inhibitory effect of recombinant fibronectin polypeptides on the adhesion of liver-metastatic lymphoma cells to hepatic sinusoidal endothelial cells and tumor invasion. *Jpn J Cancer Res*, **85**, 723-34.
- Yoshida, M., Sawada, T., Ishii, H., Gerszten, R.E., Rosenzweig, A., Gimbrone, M.A., Jr., Yasukochi, Y. & Numano, F. (2001). Hmg-CoA reductase inhibitor modulates monocyte-endothelial cell interaction under physiological flow conditions in vitro: involvement of Rho GTPase-dependent mechanism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **21**, 1165-71.
- Yoshida, M., Westlin, W.F., Wang, N., Ingber, D.E., Rosenzweig, A., Resnick, N. & Gimbrone, M.A., Jr. (1996). Leukocyte adhesion to vascular endothelium induces E-selectin linkage to the actin cytoskeleton. *J Cell Biol*, **133**, 445-55.
- Yoshizumi, M., Perrella, M.A., Burnett, J.C., Jr. & Lee, M.E. (1993). Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. *Circ Res*, **73**, 205-9.
- Zetter, B.R. (1993). Adhesion molecules in tumor metastasis. *Semin Cancer Biol*, **4**, 219-29.
- Zhou, X.F., Shen, X.Q. & Shemshedini, L. (1999). Ligand-activated retinoic acid receptor inhibits AP-1 transactivation by disrupting c-Jun/c-Fos dimerization. *Mol Endocrinol*, **13**, 276-85.
- Zutter, M.M., Krigman, H.R. & Santoro, S.A. (1993). Altered integrin expression in adenocarcinoma of the breast. Analysis by in situ hybridization. *Am J Pathol*, **142**, 1439-48.

Publikationen

- 1.) Nübel, T., Roos, W.P., Damrot, J., Kaina, B. & Fritz, G. Low concentration of the HMG-CoA reductase inhibitor lovastatin protects human endothelial cells from apoptotic death induced by ionizing radiation and the tumortherapeutic drug doxorubicin. In Vorbereitung.
- 2.) Nübel, T., Dippold, W., Kaina, B. & Fritz, G. (2004a). Ionizing radiation-induced E-selectin gene expression and tumor cell adhesion is inhibited by lovastatin and all-trans retinoic acid. *Carcinogenesis*, **25 (8)**, 1335-1344.
- 3.) Nübel, T., Dippold, W., Kleinert, H., Kaina, B. & Fritz, G. (2004b). Lovastatin inhibits Rho-regulated expression of E-selectin by TNF α and attenuates tumor cell adhesion. *Faseb J*, **18**, 140-2.
- 4.) Nübel, T., Klughammer, C., Huber, R., Hauska, G. & Schutz, M. (2000). Sulfide-quinone oxidoreductase in membranes of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus* (VF5). *Arch Microbiol*, **173**, 233-44.

Tagungsbeiträge

- 1.) Nübel, T., Fritz, G., Kaina, B. & Dippold, W. (2002a). Pharmacological modulation of E-selectin expression in human endothelial cells after stimulation with TNF and ionizing radiation. *Naunyn Schmiedbergs Arch Pharmacol*, **365 Suppl. 1**, R 11.
- 2.) Nübel, T., Fritz, G., Dippold, W. & Kaina, B. (2002b). Cytokine and gamma-ray-stimulated E-selectin expression in human endothelial cells is modulated by statins and retinoic acid. *5th Annual Meeting of the GZG, Regensburg, 2002*, A 11.
- 3.) Nübel, T., Kaina, B., Dippold, W. & Fritz, G. (2003a). Downregulation of E-selectin and tumor cell adhesion by statin-mediated inhibition of Rho. *Eur J Cell Biol*, **82 Suppl. 53**, 31.
- 4.) Nübel, T., Kaina, B., Dippold, W. & Fritz, G. (2003b). Statins and retinoic acid inhibit Rho-regulated E-selectin-expression stimulated by TNF and ionizing radiation. *Eur J Biochem*, **270 Suppl. 1**, 76.
- 5.) Nübel, T., Kaina, B., Dippold, W. & Fritz, G. (2003c). Inhibition of stress-induced E-selectin expression in human endothelial cells attenuates tumor cell adhesion. *Naunyn Schmiedbergs Arch Pharmacol*, **367 Suppl. 1**, R 10.
- 6.) Nübel, T., Kaina, B. & Fritz, G. (2004a). E-selectin-mediated tumor cell adhesion induced by γ -rays is blocked by statins and retinoic acid. *Naunyn Schmiedbergs Arch Pharmacol*, **369 Suppl. 1**, R 132.
- 7.) Nübel, T., Kaina, B. & Fritz, G. (2004b). Inhibition of γ -ray-induced tumor cell adhesion by statins and retinoic acid. *7. Jahrestagung der Gesellschaft für Biologische Strahlenforschung, Darmstadt, 2004*, 45.

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Die vorgelegte Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt. Ich habe mich bisher noch keinem Promotionsverfahren unterzogen.

Mainz, im Juli 2004

Tobias Nübel