

**Molekulare Mechanismen Proteinkinase C-
induzierter Nox4-Hochregulation in humanen
Endothelzellen**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Frank Martin Schlufter
geboren am ... in ...

Mainz, 2013

Diese Arbeit widme ich meinen lieben Eltern, meinem Bruder und meiner Liebsten

Danksagung (alle Namen aus Datenschutzgründen gelöscht)

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer und Doktorvater Prof. Dr. ..., der mir für die Erstellung dieser Arbeit stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Dr. ... für seine Bereitschaft, meine Arbeit zu begutachten.

Ein herzlicher Dank soll auch ..., der guten Seele des kompletten 12ten Stockwerkes, zuteilwerden, die für uns alle stets einen Tipp parat hatte.

Auch meinen Kollegen Frau Dr. ..., ..., ... und ... möchte ich für das kollegiale Zusammenspiel in dieser Arbeitsgruppe danken.

Meinen Eltern und meinem Bruder danke ich für die Geduld und Unterstützung.

Schließlich danke ich meiner geliebten Lebensgefährtin Frau Dr. ... für den angeregten Austausch von Wissen und für unsere gegenseitige moralische Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung

1.1 Das Endothel.....	1
1.2 Vaskuläre Dysfunktion.....	3
1.3 NADPH-Oxidasen.....	5
1.4 Proteinkinase C.....	10
1.5 Ziel der Arbeit.....	12

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur.....	14
2.1.1 Lagerung von Zellen.....	14
2.1.2 Kultivierung und Versuchsvorbereitungen von EA.hy 926 Zellen.....	15
2.1.3 Stimulation von Zellen.....	17
2.1.4 Transfektion von EA.hy 926 Zellen mit siRNA.....	18
2.1.5 Transfektion von EA.hy 926 Zellen mit Plasmiden.....	19
2.2 Untersuchung von Genexpressionen.....	20
2.2.1 Isolation von RNA aus EA.hy 926 Zellen.....	20
2.2.2 Reverse Transkription: Von der RNA zur cDNA.....	21
2.2.3 qPCR (Quantitative Real Time PCR).....	22
2.3 Untersuchung von Proteinen.....	25
2.3.1 Isolation von Proteinen.....	25
2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels BCA-Assay.....	27
2.3.3 SDS-PAGE.....	28
2.3.4 Western Blot.....	30
2.4 Luziferase Reporter Assay.....	34
2.5 Transformation von Bakterien.....	37

3 Ergebnisse

3.1 PMA-induzierte Nox4-Hochregulation in humanen Endothelzellen.....	38
3.2 MAPK.....	42
3.3 Elk-1 und c-Fos.....	48
3.4 c-Jun.....	56

3.4.1 Die Relevanz von Fos/Jun-AP-1 für die PMA-vermittelte Nox4-Hochregulation.....	59
3.5 Langzeitwirkung von PMA auf PKC Isoformen alpha und delta.....	62
3.6 Die Involvierung von PKC delta.....	64
3.7 GSK-3 beta.....	68
3.7.1 Die Wirkung von PMA auf GSK-3 beta.....	74
3.8 NFAT3.....	75
3.9 In der späten Phase der PMA-Behandlung muss ein Protein gebildet werden.....	85
3.10 HDAC.....	87
3.11 p53.....	94
3.11.1 Die Verlinkung von Nox4 und p53.....	97

4 Diskussion

4.1 Proteinkinase C.....	101
4.2 Die Rolle der MAP-Kinase Erk1/2.....	103
4.2.1 Die Aktivierung von Erk1/2.....	105
4.2.2 Down-stream von Erk1/2.....	106
4.3 AP-1: die Mischung macht's.....	109
4.3.1 c-Fos.....	109
4.3.2 c-Jun.....	110
4.4 Histondeacetylasen.....	113
4.5 Die mögliche Beteiligung anderer Proteine.....	116
4.5.1 GSK-3 beta.....	116
4.5.2 PKC delta.....	117
4.5.3 NFAT.....	119
4.6 p53: Der „Wächter des Genoms“ und Nox4.....	122
4.7 Physiologische und pathophysiologische Relevanz der erhobenen Daten.....	125

5 Zusammenfassung.....129

6 Literaturverzeichnis.....132

1. Einleitung

1.1 Das Endothel

Das vaskuläre Endothel wird in vielen Lehrbüchern der Anatomie oder Physiologie als „Gefäßtapete“ bezeichnet. Diese Charakterisierung ist jedoch einseitig, da es sich bei dieser hochspezialisierten Zellschicht, um eine multifunktionelle Grenzschicht handelt, die in vielseitige Aufgaben eingebunden ist. Des Weiteren ist eine Dysfunktion dieses Organs Ausgangspunkt für schwere vaskuläre Erkrankungen.

Bei dem vaskulären Endothel handelt es sich um einen kontinuierlichen Zellmonolayer, der den intraluminalen Blutfluss, also die Bestandteile des Blutes, von den umgebenen Geweben und Organen abgrenzt (physikalische Barriere). Das semipermeable Endothel kann verschiedene Moleküle aktiv aus dem Blut aufnehmen und dank einer hohen Stoffwechselrate um- oder abbauen (metabolische Barriere).

Außerdem verfügen Endothelzellen über eine Vielzahl von Rezeptoren, wodurch eine Signalerkennung aus dem Blutstrom möglich ist (Veikkola, Karkkainen, Claesson-Welsh, & Alitalo, 2000). Dies wird mit Hilfe von Rezeptoren für folgende Moleküle wie

- Zytokine, wie IL-1alpha, IL-1 beta, IFN-gamma und TGF-beta,
- Wachstumsfaktoren, wie FGF (Fibroblast Growth Factor) und VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) und IGF (Insulin-like Growth Faktor)
- Insulin bewerkstelligt.

Darüber hinaus hat das Endothel eine antithrombotische Wirkung und hält somit einen normalen Blutfluss aufrecht. Dies ist zum einen durch die Tatsache gegeben, dass die Glykokalyx der Endothelzellen über keine Bindestellen oder Rezeptoren für Thrombozyten verfügt. Zusätzlich bildet das Endothel Thrombozyten-hemmende Wirkstoffe, wie PGI₂, NO, Heparin, Endothel-assoziierte ADPase (Straub et al., 2011). PGI-2 und NO haben auch eine vasodilatorische Wirkung auf das Blutgefäß. Da das Endothel aber auch Botenstoffe bilden und freisetzen kann, die eine

kontrahierende Wirkung auf die glatte Gefäßmuskulatur haben (Endothelin-1, Angiotensin II), hält das vaskuläre Endothel nicht nur den Blutfluss aufrecht, sondern hat auch einen beträchtlichen Einfluss auf den Gefäßtonus.

Auch bei entzündlichen Prozessen ist das Endothel beteiligt. Durch Bildung von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen werden Zellen der Immunabwehr chemotaktisch angelockt und gebunden. Bei den Adhäsionsmolekülen handelt es sich um Selektine, die eine reversible Wechselwirkung mit Leukozyten eingehen. Folgt eine Bindung an ICAM-I und VCAM-I, ist die Leukozyten-Bindung irreversibel und es kommt zu einer biochemischen Wechselwirkung zwischen den Immunzellen und den Endothelzellen, die letztendlich zur Einwanderung von T-Lymphozyten und Monozyten in das entzündete Gewebe führt. Die Wechselwirkungen zwischen dem vaskulären Endothel und den Immunzellen spielen auch bei der Entstehung von atherosklerotischer Plaque eine maßgebliche Rolle.

Abschließend soll auch erwähnt werden, dass das Endothel in der Lage ist, auf hämodynamische Reize zu reagieren. Das heißt, dass Drucksensoren die Stärke des Blutflusses wahrnehmen. Besteht eine dauerhafte Erhöhung der Belastung, wie es zum Beispiel bei einem hohen Blutdruck der Fall ist, kann das Endothel durch Freisetzung von Wachstumsfaktoren Umbaumaßnahmen einleiten. Bei Strukturveränderungen (z.B. Erhöhung der Wandmasse) wird von „Remodelling“ gesprochen; das Anlegen von neuen Gefäßen wird als Angiogenese bezeichnet.

1.2 Vaskuläre Dysfunktion

Ross und Glomset gingen 1976 davon aus, dass krankhafte Veränderungen des Gefäßsystems (entzündliche Prozesse, Atherosklerose) mit der „Response-to-Injury“-Hypothese zu erklären seien. Demnach lag die Ursache für die Dysfunktion des Endothels bei einer Ulzeration, die durch Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie, Bluthochdruck, Rauchen oder Diabetes mellitus entstanden war. Nach damaliger Vorstellung waren diese Läsionen anschließend die Andockstelle für Blutplättchen und Quelle von Wachstumshormonen, so dass es lokal, nach Intimahyperplasie und Akkumulation von Lipiden, zur Ausbildung einer atherosklerotischen Plaque kommen würde.

Morphologische Untersuchungen von humanen Gefäßbiopsien widerlegten zusammen mit anderen Befunden diese Hypothese. Demnach kann es auch in einem unverletzten Endothel zu atherosklerotischen Veränderungen kommen. Nach heutigem Wissen liegt die Ursache von endothelialen Dysfunktionen in einem gestörten Reduktions/Oxidations-Verhältnis (Red/Ox-Bilanz). Die Zellen von Gefäßen (Bindegewebszellen, glatte Muskelzellen und Endothelzellen) produzieren aus unterschiedlichen Quellen freie Radikale, die als ROS (reactive oxygen species) bezeichnet werden. ROS kann in drei Kategorien eingeteilt werden:

- ROI (reactive oxygen intermediates): Superoxid, Hydroxyl-, Peroxyl-, Alkoxy- und Hydroperoxyl-Radikale
- RNS (reactive nitrogen species): Nitritoxid und Nitrogendioxid-Radikale
- RCS (reactive chlorine species): Chloratome

Freie Radikale tragen ungepaarte Elektronenpaare, sind hochreaktiv und können bei überschüssiger Menge zu massiven Zellschädigungen führen. Durch die hohe Reaktionsfreudigkeit werden die Zellen an mehreren Punkten angegriffen:

Die Zellmembran besteht aus einer Doppellipid-Membran aus ungesättigten Fettsäuren. Eine Lipidperoxidation unter oxidativem Stress führt zu einer Zellmembranschädigung, die letztendlich zu einem Zusammenbruch der selektiven Permeabilität führt. Neben einem gestörten Ionenhaushalt kommt es nach Aufnahme

von LDL-Partikeln zu vermehrter Fettablagerung in dem betroffenen Endothelabschnitt. Makrophagen verwandeln sich nach Resorption dieser Partikel in Schaumzellen, eine Voraussetzung für Inflammation und Ausbildung von atherosklerotischer Plaque.

Freie Radikale greifen die DNA an, so dass durch Oxidation veränderte Nukleinsäuren zu Mutationen beitragen. Dadurch kann es zur Produktion von fehlerhaften Enzymen und anderen Proteinen kommen.

Auch bestehende und normal funktionierende Enzyme können von freien Radikalen direkt angegriffen werden. Die oxidativen Prozesse an Proteinen können zur Fragmentierung von Polypeptidketten führen und einzelne Aminosäuren oxidativ verändern. Die Veränderung der Proteine kann zu Funktionsverlusten führen, außerdem können nach Bildung von reaktiven Aminosäure-Resten intra- oder intermolekulare Quervernetzungen entstehen. Diese funktionslosen Proteinkonstrukte können immense Größen annehmen, so dass ein proteolytischer Abbau durch Proteosome nicht mehr möglich ist. Dadurch kommt es zu einer intrazellulären Akkumulation von Proteinresten. Diese Ablagerungen werden mit einer beschleunigten Zellalterung in Verbindung gebracht.

Als Produzenten von ROS gelten Mitochondrien, die Xanthin-Oxidase, die entkoppelte eNOS und die NADPH-Oxidasen (Nox, siehe auch 1.3).

Den freien Radikalen stehen Antioxidantien entgegen, wie NO, Gluthathion, Superoxiddismutase und Katalase, die bei einer ausgeglichenen Red/Ox-Bilanz überschüssiges ROS durch Neutralisierungsreaktionen abfangen können.

ROS darf nicht nur als unerwünschtes Nebenprodukt des Stoffwechsels wahrgenommen werden, da diese flüchtigen Moleküle in wichtige Prozesse eingebunden sind (siehe 1.3). Die Ursache von endothelialer Dysfunktion aufgrund von oxidativem Stress beruht folglich auf einer gestörten Regulation der ROS-produzierenden Enzyme.

1.3 NADPH-Oxidasen

Als Hauptquelle von freien Radikalen (ROS) wird in diesem Abschnitt gesondert auf eine bemerkenswerte Enzymfamilie eingegangen, den NADPH-Oxidasen (Nox).

Die Entdeckung von NADPH-abhängigen Oxidasen nahm ihren Anfang in der zweiten Hälfte des 20igsten Jahrhunderts. 1957 war amerikanischen Ärzten ein seltenes Krankheitsbild aufgefallen, das hauptsächlich bei männlichen Kindern auftrat (BERENDES, BRIDGES, & GOOD, 1957). Diese erlitten heftige Fieberschübe und neigten zu einer großen Anfälligkeit gegenüber bakteriellen und Pilzinfektionen. Zehn Jahre später wurde mehrfach publiziert, dass es sich bei der CGD (chronic granulomatous disease), wie dieses Krankheitsbild nun bezeichnet wurde, um eine Funktionsstörung der Granulozyten handelte (Baehner & Nathan, 1968). Zwar spürten sie nach wie vor Krankheitserreger auf und zeigten ebenfalls eine normale Phagozytose, allerdings blieb die anschließende Abtötung der Erreger aus, wodurch eine unkontrollierte Ausbreitung und Befall von nicht infizierten Organen eintreten konnte. Der Grund für diese Fehlfunktion lag an einer verminderten oder nicht vorhandenen Bildung von ROS in den Granulozyten.

Auf der Suche nach dem ROS-bildenden Protein in den Phagozyten gelang 1978 Segal, Jones und Kollegen der Durchbruch, als sie Cytochrom b558 als das Protein identifizierten, das in Leukozyten von CGD-Patienten fehlte. Dies war der Startpunkt für eine intensive Erforschung von dieser Phagozyten-typischen NADPH-Oxidase.

Nach der Identifikation von fehlerhaften oder fehlendem Cytochrom b558 als Ursache für CGD wurde in den späten 80iger Jahren des 20sten Jahrhunderts der katalytische Teil von Cytochrom b558 von Royer-Pokora et al. und Teahan et al. erfolgreich geklont und erhielt zunächst die Bezeichnung gp91phox, später folgte eine Umbenennung zu Nox2. Kurz darauf wurde entdeckt, dass Nox2 nicht die einzige Komponente der Phagozyten NADPH-Oxidase war. 1987 wurde nachgewiesen, dass es sich bei Cytochrom b558 um ein dimeres Protein handelte. Die neu entdeckte Untereinheit, die mit gp91phox/Nox2 assoziiert war, wurde als p22phox bezeichnet (Parkos, Allen, Cochrane, & Jesaitis, 1987).

Kurz darauf wurden folgende zytosolische Faktoren entdeckt, die für die Funktionalität der NADPH-Oxidase wichtig sind:

- p47phox und p67phox (Nunoi, Rotrosen, Gallin, & Malech, 1988)
- p40phox (Wientjes, Hsuan, Totty, & Segal, 1993)
- Die GTP-bindenden Proteine Rac1 und Rac2 (Abo et al., 1991) und (Knaus, Heyworth, Evans, Curnutte, & Bokoch, 1991)

Parallel zur Erforschung von Nox2 wurden homologe NADPH-Oxidasen entdeckt, die in nicht-phagozytären Zellen auffindbar sind. Bis heute sind sieben Mitglieder bekannt, die sich im Aufbau und in der Enzymaktivität ähneln, aber über unterschiedliche Aktivierungsmechanismen verfügen: Nox1-5, DUOX1 und DUOX2. Abbildung 1 zeigt alle Mitglieder der Nox-Familie mit ihren jeweiligen regulatorischen Untereinheiten, eine Übersicht über Gewebeverteilung gibt (Tabelle 1).

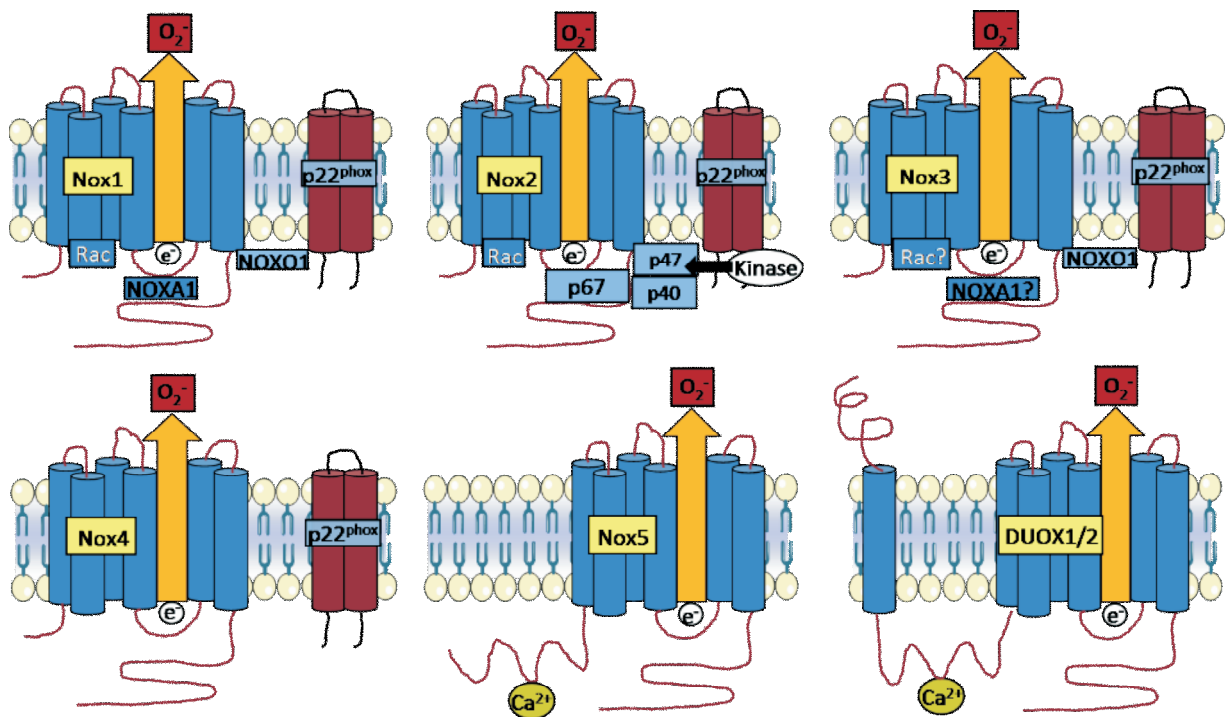


Abbildung 1.1: Die Nox-Familie (angelehnt an Bedard & Krause, 2007)

Oben links: Nox1 benötigt p22phox, NOXO1 (Homolog von p47phox), NOXA1 (Homolog von p67phox) und die kleine GTPase Rac. In einigen Fällen kann die regulatorische Untereinheit NOXO1 durch ein p47phox ersetzt sein.

Oben mitte: Nox2 benötigt p22phox, p47phox (für die Aktivierung ist eine Phosphorylierung erforderlich), p67phox und Rac. Nach heutigem Stand des Wissens wirkt p40phox als Modulator und wird für eine Nox2 Aktivität nicht zwingend gebraucht.

Oben rechts: Nox3 benötigt p22phox und NOXO1, die Notwendigkeit von NOXA1 ist spezie-spezifisch. Ob Rac benötigt wird ist unklar.

Unten links: Nox4 benötigt nur p22phox.

Unten mitte und unten rechts: Nox5 und DUOX1/2 benötigen Calcium für die Aktivierung.

	Starke Expression	Schwache Expression
Nox1	Colon	Glatte Muskelzellen, Endothelzellen, Uterus, Plazenta, Prostata, Osteoklasten, retinale Perizyten
Nox2	Phagozyten	B-Lymphozyten, Neurone, Herzmuskelzellen, Skelettmuskelzellen, Leberzellen, Endothelzellen, hematopoietische Stammzellen, glatte Muskelzellen
Nox3	Innenohr	glatte Muskelzellen, fötale Niere, fötale Milz, Schädelknochen, Gehirn
Nox4	Niere, Endothelzellen	Osteoklasten, glatte Muskelzellen, hematopoietische Stammzellen, Fibroblasten, Keratinozyten, Melanomzellen, Neurone
DUOX1	Schilddrüse	Lungenepithel, Kleinhirn, Hoden
DUOX2	Schilddrüse	Rektum, gastrointestinale Epithelzellen, Lungenepithel, Uterus, Gallenblase, Pankreas

Tabelle 1.1: Die Verteilung der Nox-Isoformen (Bedard & Krause, 2007)

Zusammenfassend können alle Mitglieder der NADPH-Familie als transmembrane Proteine angesehen werden, deren Funktion darin besteht, Elektronen durch eine biologische Membran zu schleusen. Als Elektronen-Donor verwenden diese Proteine NADPH, Elektronen-Akzeptor ist molekularer Sauerstoff, der dann auf der anderen Seite der Membran zu Superoxid reduziert wird.

In Abbildung 2 ist der allgemeine Nox-Grundaufbau ohne Untereinheiten dargestellt (DUOX1/2 weicht von der Darstellung ab):

Dabei handelt es sich um eine α -Helix, die sechsfach die Membran durchspannt, wobei sowohl der COOH-, als auch der NH₂-Terminus zum Cytosol orientiert sind. Der COOH-Terminus trägt eine Bindestelle für NADPH und eine für FAD. Zwischen der dritten und der fünften Transmembran-Domäne sind zwei eisenhaltige Häm-Proteine gebunden. Der Elektronentransfer startet mit der Oxidation von NADPH, wobei FAD zu FADH₂ reduziert wird. Dann folgt schrittweise ein Transfer von zwei Elektronen zu den Häm-Proteinen, sodass FADH₂ erst zu FADH, dann wieder zu FAD oxidiert wird. Bevor das zweite Elektron transportiert werden kann, muss das erste Elektron auf das äußere Häm-Protein wechseln. Dieser Schritt ist energetisch ungünstig, wird aber dadurch ermöglicht, weil das äußere Häm das Sauerstoffmolekül bindet, wodurch für den Elektronentransfer energetisch ein günstigeres Verhältnis entsteht.

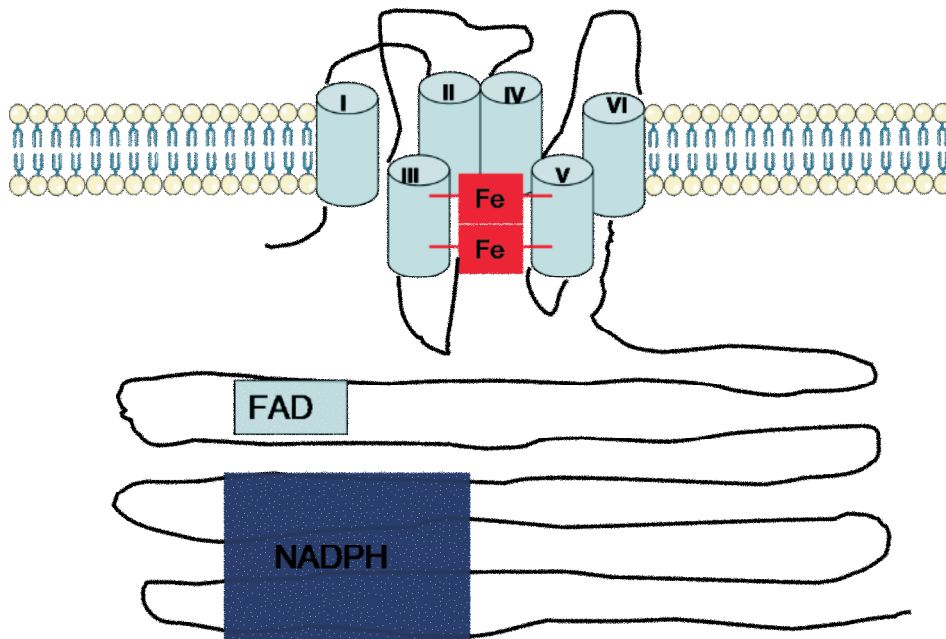


Abbildung 1.2: Das molekulare Schema von Nox (angelehnt an Bedard & Krause, 2007)

Das von den NADPH-Oxidasen gebildete ROS ist im vaskulären System in vielfältigen Prozessen eingebunden. So spielt ROS eine Rolle bei der Einstellung des Gefäßtonus (Gryglewski, Palmer, & Moncada, 1986), Zellteilung und Apoptose (Irani, 2000), Aktivierung von Kinasen (Touyz, Yao, Viel, Amiri, & Schiffrin, 2004),

Proliferation und Migration von vaskulären Endothelzellen (Abid, Kachra, Spokes, & Aird, 2000) und bei vielen anderen Vorgängen.

Allerdings wird ROS auch mit der Entstehung von pathophysiologischen Vorgängen in Gefäßen in Verbindung gebracht, nämlich dann, wenn eine Dysfunktion in der Nox-Regulation vorliegt, so dass ein Überschuss an freien Radikalen besteht (Guzik et al., 2006).

Tabelle 1.1 und Abbildung 1.3 machen deutlich, dass nicht alleine das Endothel zur ROS-Bildung in Blutgefäßen beiträgt, jedoch ist die dort vorherrschende Isoform Nox4.

Nox4 gilt als ein kontinuierlicher ROS-Bildner (Ambasta et al., 2004), da für die Enzymaktivität keinerlei regulatorische Untereinheiten benötigt werden (abgesehen von der p22phox Untereinheit). Auch die GTPasen Rac1 und Rac2 sind nicht erforderlich (Bedard & Krause, 2007). So konnte eine erhöhte Nox4-Expression mit der Entstehung von Atherosklerose in Verbindung gebracht werden (Sorescu & Griendling, 2002).

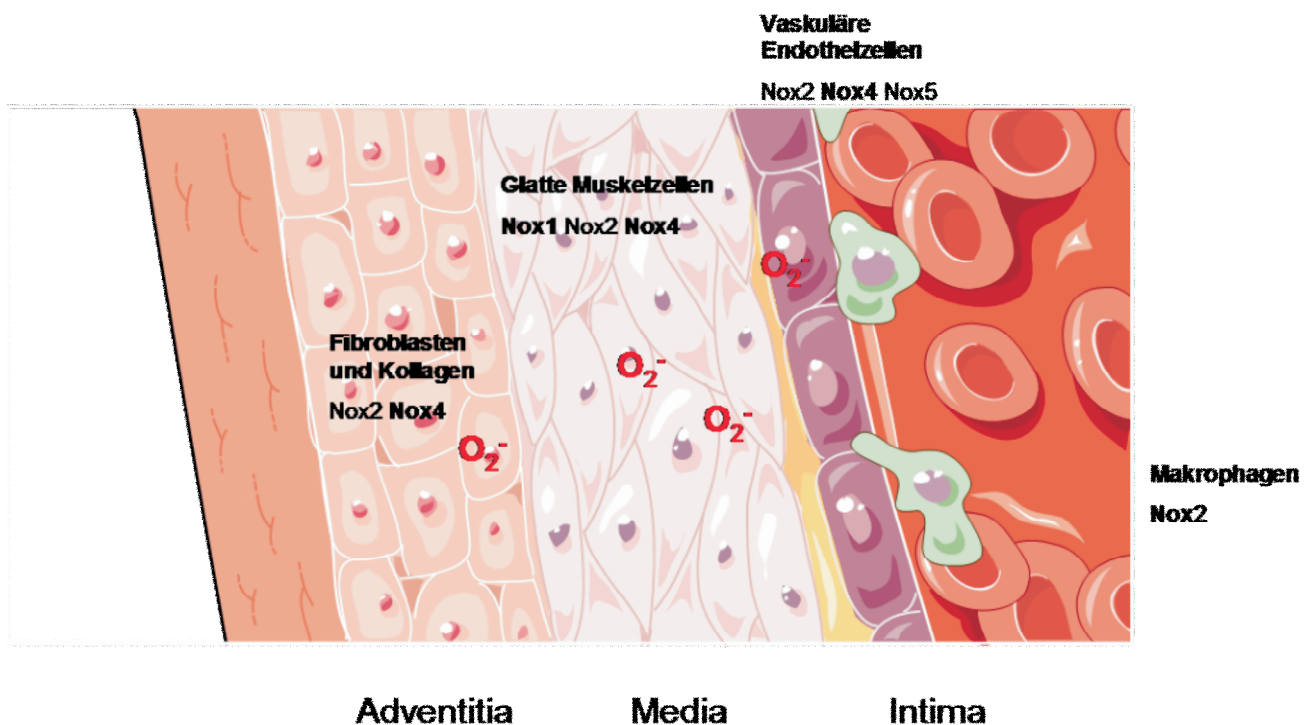


Abbildung 1.3: Nox-Enzyme in der Gefäßwand (angelehnt an Bedard & Krause, 2007)

1.4 Proteinkinase C

In den späten 1970iger Jahren wurde im bovinen Kleinhirn eine neuartige Proteinkinase entdeckt, deren Aktivität Calcium- und Phospholipase C-abhängig ist (Löffler, 3. Auflage, 1999). Dem Protein wurde die Bezeichnung Proteinkinase C (PKC) zugeteilt und bisweilen ist eine Familie von neun Genen identifiziert worden, aus der elf verschiedene Isotypen aus der Proteinkinase C hervorgehen.

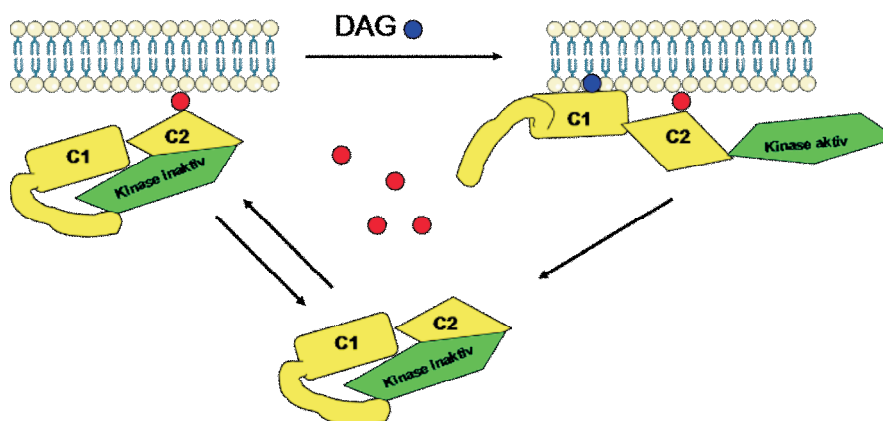


Abbildung 1.4: Proteinkinase C (angelehnt an Goedhart J , and Gadella T W J. R. Soc. Interface 2009;6:S27-S34)

Es werden vier C-Domänen unterschieden, dabei bilden C1 und C2 den regulatorischen, C3 und C4 den katalytischen Teil des Enzyms. Im inaktiven Zustand wird das katalytische Zentrum (C4) von einem N-Terminus gelegenen (C1) Pseudosubstrat blockiert. In Anwesenheit von Calcium-Ionen, Phosphatidylserinen und Diacylglycerol wird diese Pseudosubstrat-Bindung aufgehoben, da diese Bestandteile an Bindungsstellen von C1 und C2 binden, woraufhin eine Konformationsänderung eintritt. C3 und C4 besitzen dann zusammen die Eigenschaft einer Serin/Threonin-Kinase, wobei C3 den ATP-bindenden, C4 den katalytischen Teil innehat. Bis heute werden drei Subfamilien von PKC unterschieden, so dass diese allgemeine Beschreibung inzwischen ergänzt werden muss.

Subfamilie	Isoform	Aktiviert von
Conventional (cPKC)	$\alpha, \beta 1, \beta 2, \gamma$	DAG, PS, Calcium
Novel (nPKC)	$\delta, \epsilon, \eta, \theta$	DAG, PS
Atypical (aPKC)	ζ, ξ, μ	PS

Tabelle 1.2: Isoformen von PKC

Aus Tabelle 1.2 geht hervor, dass die nPKC-Isoformen kein Calcium für die Aktivierung brauchen. Dies liegt an einer alternativen C2-Domäne, die über keine Bindungsstelle für Calcium verfügt. Für die Aktivierung der atypischen PKCs wird weder Calcium noch DAG benötigt. Dies liegt daran, dass diesen Isotypen die C2-Domäne fehlt und sie eine atypische C1-Domäne besitzen, die keine Bindungsstelle für DAG besitzt. Bemerkenswert ist auch eine zusätzliche PB1-Domäne (Protein-Protein Interaktionsdomäne). Folglich unterscheiden sich die Mitglieder der drei Subfamilien im Aufbau des regulatorischen Teils, allen ist aber das hemmende Pseudosubstrat gemein, das im inaktiven Zustand das katalytische Zentrum blockiert.

Die Aktivierung von Proteinkinase C ist der Startpunkt für unzählige Signalkaskaden die Einfluss auf Genexpressionen, Proliferation, Apoptose und auch auf den Gefäßtonus nehmen. Die Bildung von Karzinomen wird mit einer Dysfunktion der Aktivitätsregulierung in Zusammenhang gebracht.

Unter physiologischen Bedingungen ist eine Rezeptor-vermittelte Aktivierung der Phospholipase C (PLC) Voraussetzung für die Aktivierung von cPKC- und nPKC-Isoformen. Dieses Enzym spaltet ein spezifisches Membranphospholipid, das als Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) bekannt ist. Dabei entsteht das zytoplasmatische Inositol-(1,4,5)-trisphosphat (InsP₃), welches im endoplasmatischen Retikulum an spezifischen Rezeptoren bindet, woraufhin es zu einer Calciummobilisierung kommt. Das zweite Spaltprodukt von PLC ist das Diacylglycerol (DAG), das in der Membran zurück bleibt und als aktivierende Andockstelle für die cPKCs und nPKCs bereitsteht.

Für die Anfertigung dieser Arbeit wurden die Zellen mit dem Phorbolester Phorbol 12-Myristat 13-Acetat (PMA) behandelt, einer Substanz, die durch Hydrolyse von Crotonöl gewonnen wird. PMA und DAG ähneln sich chemisch, so dass durch Einsatz des Phorbolesters eine PLC-unabhängige Aktivierung von cPKC- und nPKC-Isoformen möglich war.

1.5 Ziel der Arbeit

Die PKC-Isoformen sind in unzähligen Signalwegen und Funktionen eingebunden. In unserer Arbeitsgruppe konnte in der Vergangenheit auch ein Zusammenhang zwischen dieser Kinasefamilie und der Entstehung von oxidativem Stress in vaskulären Endothelzellen hergestellt werden (Xu et al., 2008).

Unter Verwendung des Phorbolesters PMA wurde in humanen vaskulären Endothelzellen (EA.hy 926 Zellen) eine Erhöhung der DAG-Konzentration imitiert und eine Aktivierung der klassischen und novelen PKC-Isoformen initiiert. Durch diese Bedingung konnte mittels quantitativer Real-time PCR eine hoch signifikante Erhöhung der Nox4-mRNA nachgewiesen werden, allerdings wurde diese Induktion erst nach einer 48-stündigen Dauerinkubation mit dem Phorbolster gemessen. Kürzere Inkubationen (6h und 8h) zeigten hingegen keinen Anstieg der Nox4-mRNA. Dieser Langzeit-Effekt konnte durch eine Co-Inkubation mit dem PKC-Inhibitor Gö 6983 abgewendet werden, wodurch die Involvierung von PKC untermauert worden war. Interessanterweise konnte die Hochregulation von Nox4-mRNA nicht unterbunden werden, wenn der Inhibitor 24h nach Start der PMA-Inkubation hinzugefügt worden ist.

Durch Knockout-Experimente mittels siRNA gegen verschiedene PKC-Isoformen konnte gezeigt werden, dass für die PMA-vermittelte Nox4-mRNA-Hochregulation PKC alpha unverzichtbar ist.

In vaskulären Endothelzellen ist Nox4 der Hauptproduzent von freien Radikalen, daher wird eine Dysfunktion dieser Oxidase mit krankhaften Veränderungen des Gefäßsystems in Verbindung gebracht. Mit ROS-Messungen von EA.hy 926 Zellen, die zuvor 48 Stunden PMA inkubiert worden waren, konnte ein signifikanter Anstieg von freien Radikalen nachgewiesen werden. Dieser PMA-vermittelte ROS-Anstieg konnte durch eine Co-Inkubation mit dem PKC-Inhibitor Gö 6983 oder durch siRNA-Transfektion gegen PKC alpha komplett unterbunden werden. Weitere PMA-Inkubationen von Zellen, die zuvor mit einer siRNA gegen Nox4 transfiziert worden waren, belegten, dass für den ROS-Anstieg Nox4 verantwortlich war.

Außerdem wurden EA.hy 926 Zellen für 48h mit PMA und Cyclohexamid, einem potenten Inhibitor der Proteinbiosynthese, co-inkubiert. Es stellte sich heraus, dass durch Zugabe dieser Substanz eine PMA-vermittelte Nox4-mRNA-Hochregulierung

abwendbar war. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass während der Inkubationsdauer von 48 Stunden ein oder mehrere Proteine gebildet werden müssen.

Zusammenfassend kann die Aussage gemacht werden, dass eine Verbindung zwischen der Aktivierung von PKC alpha und der Expression von Nox4 existiert. Es ist das Ziel dieser Arbeit, die Proteine und Signalwege down-stream von PKC alpha näher zu charakterisieren, die die PMA-induzierte Nox4-Hochregulation vermitteln.

2 Material und Methode

2.1 Zellkultur

2.1.1 Lagerung von Zellen

Für den Erhalt von Zelllinien bietet sich eine Lagerung in flüssigen Stickstoff (-196° Celsius) an. Für die Tiefkühlagerung wurde wie folgt vorgegangen:

Eine konfluente 75cm² Zuchtflasche wurde unter sterilen Bedingungen mit 10 ml PBS (Gibco) gewaschen (gründliches Schwenken des Waschpuffers über den Zellrasen). Nach dem Absaugen des Waschpuffers wurde 1 ml Trypsin (PAA) zu den Zellen pipettiert und gleichmäßig über den Flaschenboden geschwenkt. Nach Entfernung des überschüssigen Trypsins (Flasche schräg halten, Trypsin in eine Ecke fließen lassen, dann absaugen) folgte eine 3-minütige Inkubation bei 37° Celsius, 5 % CO₂ und H₂O gesättigter Atmosphäre (Inkubator). Anschließend wurde die Trypsinierung durch Zugabe von 10 ml PBS gestoppt. Um eine vollständige Ablösung der Zellen von dem Flaschenboden zu gewährleisten wurde die Suspension gründlich auf- und abpipettiert, dann folgte eine vollständige Überführung in ein steriles und verschließbares 15 ml Röhrchen (Greiner). Nach einer 5-minütigen Zentrifugation (37° Celsius, 900 x g) wurde das PBS abgesaugt und das Pellet in 3 ml einer 10 % DMSO/FCS Mischung resuspendiert. Pro Zuchtflasche wurden drei 1,5 ml Kryoröhrchen bereitgestellt, die mit je 1 ml Zellsuspension beladen wurden. Diese Röhrchen wurden nun 24h bei -80° Celsius zwischengelagert, dann folgte die Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff.

Bestand Bedarf an frischen Zellen, wurde ein Kryoröhrchen aus der Stickstofflagerung geholt, sanft durch kurzes Schwenken in einem 37° Celsius Wasserbad aufgetaut und dann zu 5 ml Vollmedium in ein steriles 15 ml Röhrchen überführt. Nach einer Zentrifugation (37° Celsius, 900 x g) wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet in 10 ml Vollmedium resuspendiert und in eine 75 cm² Kulturflasche überführt. Dieser Schritt sollte für die Entfernung des DMSO sorgen.

Die Zellen wurden dann in den Flaschen bei 37° Celsius, 5 % CO₂ und H₂O gesättigter Atmosphäre (Inkubator) kultiviert.

2.1.2 Kultivierung und Versuchsvorbereitung von EA.hy 926 Zellen

- Kultivierung

Bei EA.hy 926 Zellen handelt es sich um käuflich erworbene immortalisierten Zelllinie, die aus einer Fusion von humanen Umbilikalvenenendothelzellen (HUVEC) mit einer humanen Lungenkazinomzelllinie hervorgegangen ist. Die Zellen wurden in einem Inkubator kultiviert, in dem 37° Celsius und eine Wasserdampf gesättigte, 5 %-ige CO₂ Atmosphäre herrschte. Alle zwei Tage folgte ein Mediumwechsel, um eine optimale Versorgung der Zellen mit Nährstoffen zu gewährleisten. Alle Lösungen oder Medien wurden vor dem Zellkontakt auf 37° Celsius vorgewärmt (Wasserbad).

- Ablösen der Zellen durch Trypsin

Konfluent gewachsene Zellen in 75 cm² Zuchtflaschen wurden mit 10 ml PBS gewaschen, nach Absaugen des Waschpuffers wurde 1 ml Trypsin/EDTA auf dem Zellrasen verteilt. Nachdem das überschüssige Trypsin durch Absaugen entfernt worden war, folgte eine 3-minütige Einwirkzeit im Inkubator. Durch Zugabe von Vollmedium wurde die enzymatische Zellablösung von dem Flaschenboden gestoppt. Durch gründliches Auf- und Abpipettieren konnte nun eine gleichmäßige Zellsuspension gewonnen werden. Die Zellkonzentration dieser Suspension konnte aktiv durch die Wahl des zugefügten Vollmediums beeinflusst werden.

- Zellzählung

Für die Bestimmung der Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Zählkammer gearbeitet. Dabei handelt es sich um einen gläsernen Objektträger, in den auf der Fläche von 1 mm² vier Großquadrate geätzt worden waren, die wiederum aus vier Mal vier Kleinquadraten zusammengesetzt waren. Zwei parallele Stege flankieren diese Fläche und haben eine exakte Höhe von 0,1 mm. Setzte man nun ein Deckplättchen

auf diese Stege, wurde über den Quadraten ein Volumen von $0,1 \text{ mm}^3$ (= $0,1 \text{ }\mu\text{l}$) geschaffen. Für die Zellzählung wurde die Zellsuspension gründlich durchmengt, dann konnte mit einer Pipette ein Tropfen in dieses Volumen aufgebracht werden. Dies geschah passiv durch physikalische Adhäsionskräfte. Unter dem Mikroskop wurden dann die Zellen ausgezählt, die sich innerhalb der vier Großquadrate befanden. Um auf die Zellzahl pro ml schließen zu können wurde die Gesamtanzahl durch 4 geteilt, dann mit der Kammerkonstante 10 000 multipliziert. Wurde die Zellsuspension vorher noch einmal verdünnt, wurde abschließend mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert.

- Aussäen

Bei bekannter Zellkonzentration konnten nun Platten mit der gewünschten Zellzahl pro Well ausgesät werden. Ein Beispiel aus der Praxis:

Wurde eine konfluente 75 cm^2 Flasche mit der Absicht trypsiniert, eine 24-Well-Platte zu besäen, wurde das Trypsin durch Zugabe von 5 ml HT-Vollmedium abgestoppt. Mehrfache Zellzählungen in der Vergangenheit hatten gezeigt, dass nun 5 ml Zellsuspension mit einer Konzentration von 1.000.000 Zellen pro ml zur Verfügung standen.

Waren nun 100.000 Zellen pro Well gewünscht, konnte dies auf zwei unterschiedliche Wege erreicht werden. Zum einen durch das Überführen von 100 μl Zellsuspension pro Well mit anschließender Zugabe von 900 μl HT-Medium pro Well, zum anderen durch die Herstellung einer angepassten Vorverdünnung. Letzteres Verfahren wurde aufgrund seiner Schnelligkeit und Sicherheit bevorzugt. Hierzu wurden 2,5 ml der Zellsuspension zu 22,5 ml HT-Medium gegeben, das in einem 50 ml Falcon vorgelegt worden war. Nach gründlichem Auf- und Abpipettieren konnten nun 100.000 Zellen pro ml, bzw. pro Well ausgesät werden ($2.500.000/25 \text{ ml HT-Medium} = 100.000/1 \text{ ml HT Medium}$).

In der trypsinierten Flasche wurde von den 5 ml Zellsuspension stets 1 ml zurückgelassen und für eine weitere Anzucht mit 9 ml HAT-Medium vereint. Nach vorsichtigem Schwenken war so eine neue 1:5 Passage entstanden (von fünf Teilen Zellsuspension verbleibt ein Teil). Bestand die Absicht, nur den Zellbestand zu vergrößern und keine Well-Platten zu beladen, wurde wie oben beschrieben

vorgegangen. Der Unterschied bestand darin, dass dann das Trypsin mit HAT-Medium abgestoppt wurde.

Medium	Hersteller
Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)	Sigma-Aldrich
1 % L-Glutamin	Gibco
1 % Sodium Pyruvat	Gibco
2 % HAT-Supplement (Flaschenzucht) oder 2 % HT-Supplement /Plattenzucht)	Gibco
10 % FCS	PAA

Tabelle 2.1: Zuchtmedium für EA.hy 926 Zellen

2.1.3 Stimulation von Zellen

Für Experimente wurden die EA.hy 926 Zellen in Well-Platten (6-Well, 12-Well oder 24-Well) ausgesät. Nachdem eine Konfluenz erreicht worden war, konnte die Stimulation gestartet werden. Handelte es sich zum Beispiel um nur eine Substanz, wurden zwei Schraubdeckelröhrchen mit einem geeigneten Volumen an HT-Medium befüllt. Nun wurde in dem einen Röhrchen die gewünschte Substanz-Konzentration eingestellt (für die Testgruppe), in dem anderen Röhrchen wurde die gleiche Menge des puren Lösungsmittels pipettiert, in der die Substanz gelöst worden war. Nach Absaugen der Wells konnte dann aus den vorbereiteten Röhrchen die Kontroll- und die Testgruppe beladen werden. Nach Ablauf der gewünschten Inkubationszeit wurden dann die Medien abgesaugt. Nach Spülung der Wells mit PBS, folgte die Überführung der Platte in flüssigen Stickstoff. Die Lagerung der Wellplatte wurde bis zur weiteren Verarbeitung in einem – 80° Celsius Tiefkühlschrank vorgenommen.

Bei jedem Experiment musste bedacht werden, um welche Substanzen es sich handelte. Viele Stoffe werden in DMSO gelöst, einem zelltoxischen Mittel, dessen Anteil im Inkubationsmedium nicht über 0,1 % liegen soll. Wurden komplexere Experimente mit in DMSO gelösten Substanzen vorgenommen, mussten die Stocklösungen entsprechend konzentriert werden, um die verwendete DMSO-Menge unter der toxischen Konzentration zu halten.

2.1.4 Transfektion von EA.hy 926 Zellen mit siRNA

Um die Funktion einzelner Gene besser zu verstehen, wurde eine Technik angewendet, mit der gezielt die mRNA eines Gens abgebaut wird. Folglich kann die Produktion eines bestimmten Proteins verhindert werden. Hierzu wird siRNA (small interfering RNA) verwendet, die mit einem Transfektionsmittel einen Komplex ausbildet, der dann in die Zellen eingeschleust wird. Als Transfektionsmittel sind kommerziell verschiedene Technologien erhältlich, die entweder auf Nanopartikeln, PEG-Liposomen, oder Lipiden basieren. Wurde die 21-23 Basepaare umfassende siRNA erfolgreich in die Zelle geschleust, folgten die Bindung und der Abbau der Ziel-mRNA.

Die Transfektion wurde in Well-Platten durchgeführt. In eine 24-Well Platte wurden am Vortag 50000 bis 80000 EA.hy 926 Zellen pro Well ausgesät. Die siRNA lag in einer 20 µmol/l Stocklösung vor.

Die siRNA und das Transfektionsmittel Saint-Red (Synvolux, Groningen, NL) wurden jeweils in 1,5 ml Reaktionsgefäßen mit HBS-Puffer (Bestandteil des Transfektions-Kits) verdünnt, vereinigt und bei Raumtemperatur 5min inkubiert. Pro Well wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen 187,5 µl Medium ohne FCS vorgelegt und mit 62,5 µl siRNA/Saint-Red/HBS Mix vereint. Vor der Transfektion wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, um ein FCS-freies Milieu zu gewährleisten. Anschließend wurden die vorgelegten 250 µl siRNA/Saint-Red/HBS/Medium Mischungen einzeln auf die Zellen geträufelt. Nach einer 3-stündigen Inkubation bei 37° Celsius und 5 % CO₂ wurde die Transfektion durch Absaugen der siRNA Mischungen und Zugabe von 1 ml Medium mit FCS pro Well abgestoppt. Je nach Qualität und Potenz der verwendeten siRNA konnte dann 24h-72h später das Experiment gestartet werden. Alle siRNAs wurden bei Sigma-Aldrich erworben:

Elk-1	SASI_Hs02 00326324
Erk1/2	SASI_Hs01 00190617
c-Fos	SASI_Hs01 00184572
GSK-beta	SASI_HS01 00192104
HDAC3	SASI_Hs01 00136351
c-Jun	SASI_Hs02 00333461
NFAT3	SASI_Hs01 00243957
PKC alpha	SASI_Hs01 00018817
PKC delta	SASI_Hs01 000 61170

Tabelle 2.2: Verwendete siRNAs

2.1.5 Transfektion von EA.hy 926 Zellen mit Plasmiden

Für Plasmid-Transfektionen wurden am Vortag EA.hy 926 Zellen in 24-Well gesät (50000 pro 24-Well). Pro Well wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß 1 µg DNA mit 150 mM NaCl auf ein Volumen von 50 µl vereint. In einem weiteren Reaktionsgefäß wurde pro Well 3,2 µl Nanofektin (PAA Laboratories GmbH) mit 150 mM NaCl auf das gleiche Volumen eingestellt. Anschließend wurde die Nanofektin-Verdünnung zu der DNA-Lösung pipettiert. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Nanofektin/DNA Mischungen in die Wells geträufelt, in denen sich 500 µl frisches Medium mit FCS befanden.

Nach zwei Stunden Inkubation wurde 500 µl Medium mit FCS zu den Wells pipettiert, nach weiteren zwei Stunden wurde die Transfektion durch Absaugen und Zugabe von 1 ml Medium mit FCS abgestoppt. 24 Stunden später konnte mit dem Experiment begonnen werden.

2.2 Untersuchung von Genexpressionen

2.2.1 Isolation von RNA aus EA.hy 926 Zellen

Die Isolation von RNA wurde mit einer kombinierten Guanidinisothiocyanat/Phenol-Methode (peqGOLD Trifast, Peqlab) durchgeführt. Durch Zugabe der einphasigen Mischung in die abgesaugten Wells folgte durch den Guanidinisothiocyanat-Anteil eine Zelllyse mit gleichzeitiger Inaktivierung sämtlicher Enzymaktivitäten. Durch anschließende Zugabe von Chloroform folgte eine Drei-Phasen Auftrennung, wobei die obere wässrige Phase die RNA, die mittlere Phase die Proteine und die untere Phase die DNA enthielt. Daher war eine saubere Trennung und Präparation der RNA durch Abnahme der oberen Phase möglich.

Das benötigte Volumen der Extraktionslösung richtete sich nach der Well-Größe. Für 6-Well-Platten wurden pro Well 1000 µl, für 12-Well-Platten 500 µl und für 24-Well-Platten 250 µl Extraktionslösung pro Well pipettiert, dann folgte bei Raumtemperatur eine 5-minütige Zelllyse. Anschließend wurden die Lysate vollständig in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Die Phasenauftrennung wurde durch Zugabe von einem Chloroform-Volumen eingeleitet, welches 20 % des Extraktionsvolumens entsprach. Dem folgten ein 15-sekündiges Schütteln und eine 5-minütige Ruhepause. Um die Phasentrennung abzuschließen, wurden die Reaktionsgefäße für 5min bei 13000 g und 4° Celsius zentrifugiert. Die oberen Phasen wurden vorsichtig abgenommen und in Reaktionsgefäße überführt. Die RNA-Fällung wurde durch Zugabe von einem Isopropanol-Volumen eingeleitet, welches 50 % des ursprünglichen Extraktionsvolumens entsprach. Nach einem kurzen Aufschütteln (Vortex) folgte eine 30-minütige Ruhephase bei -20° Celsius. Die RNA wurde schließlich abzentrifugiert (10min, 12000 g, 4° Celsius) und der Überstand durch vorsichtiges Abgießen entfernt. Abschließend wurde die gewonnene RNA durch Zugabe von 500 µl 75 %-Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (10min, 12000 g, 4° Celsius) wurde der Alkohol vorsichtig abgeschüttet. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Nach 30min war der übrige Alkohol verdampft, so dass die Pellets in DEPC-Wasser gelöst werden konnten (40 µl bei 24-Well, 80 µl bei 12-Well und 180 µl bei 6-Well). Die Konzentrationsbestimmung wurde unmittelbar nach der Präparation mit einem Nanodrop Photometer durchgeführt.

2.2.2 Reverse Transkription: Von der RNA zur cDNA

Für die Untersuchung von Genexpressionen mittels quantitativer Real-Time PCR war es erforderlich, die gewonnene RNA in cDNA umzuschreiben. Hierfür wurde das High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit von Applied Biosystems verwendet. Unter Eiskühlung wurden von den RNA-Lösungen jeweils 10 µl in ein vorbereitetes 0,2 ml Reaktionsgefäß überführt. Für eine komplette Umschreibung war es wichtig, dass die RNA-Beladung nicht den Grenzwert von 2 µg überschritt. Anschließend wurden 10 µl eines frisch angesetzten 2-fach RT-Mix zu den Proben pipettiert, so dass jeder PCR-Ansatz folgende Zusammensetzung hatte:

10-fach RT Puffer	2 µl
25-fach dNTP Mix (100mM)	0,8 µl
10-fachRT Random Primer	2 µl
MultiScribe Reverse Transcriptase	1 µl
Nuclease freies Wasser (Braun)	4,2 µl
RNA-Probe	10 µl
Endvolumen pro Einzelprobe	20 µl

Tabelle 2.3: Mix für Reverse Transkription

Nach sorgfältiger Durchmischung (Vortex) und 3-sekündiger Zentrifugation wurde das vom Hersteller des Kits vorgegebene PCR-Programm gestartet:

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
Temperatur	25° Celsius	37° Celsius	85° Celsius	4° Celsius
Dauer	10min	120min	5min	∞

Tabelle 2.4: Schritte für Reverse Transkription

2.2.3 qPCR (Quantitative Real Time PCR)

Die quantitative Real Time PCR basiert auf dem Prinzip einer herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction). Diese Technik erlaubt die Vervielfältigung einer gewünschten DNA-Sequenz. Dazu sind drei Schritte erforderlich:

- Denaturierung

Durch Hitze (95° Celsius) wird die doppelsträngige DNA denaturiert, das heißt die komplementären DNA-Stränge lösen sich von einander. Dies ist Voraussetzung für den zweiten Schritt.

- Annealing

Nun lagern sich Oligonukleotide (Primer) an den „sense“- bzw. an den „antisense“-Strang an und ermöglichen durch ihre freien 3'-OH Enden den dritten Schritt.

- Elongation

Eine thermostabile DNA-Polymerase füllt nun unter Einbau von Desoxyribonukleotiden den zu amplifizierenden Bereich auf, so dass beide Stränge in 5'-3'-Richtung neu synthetisiert werden.

Die Besonderheit der quantitativen Real Time PCR ist der Zusatz eines interkalierenden Fluoreszenz-Farbstoffes, der doppelsträngige DNA bindet und Licht einer bestimmten Wellenlänge emittiert. Die Amplifikation kann wegen der Proportionalität von Lichtsignal zur Kopienanzahl der DNA in Echtzeit verfolgt werden.

In dieser Arbeit wurde für die Durchführung der quantitativen Real Time PCR SYBR Green JumpStart Taq ReadyMix (Sigma-Aldrich) verwendet. Dieses System enthält den interkalierenden Cyanin-Farbstoff SYBR Green. Der Doppelstrang-DNA/SYBR Green-Komplex absorbiert blaues Licht der Wellenlänge von 494 nm und emittiert grünes Licht der Wellenlänge von 521 nm. Die PCR-Analysen wurden an einem iCycler iQ Multi-Color Real Time PCR Detection System (BioRad Laboratories GmbH) durchgeführt. Die dazugehörige Computersoftware ermittelte für jeden PCR-Durchlauf eine Amplifikationskurve und einen Ct-Wert (Threshold-Wert).

Letzterer definiert jenen Zyklus, bei dem ein Lichtsignal innerhalb der exponentiellen Phase der Amplifikation messbar war, das sich signifikant von den Hintergrundsignalen unterschied. Durch den Vergleich der Ct-Werte von der Ziel-DNA mit der eines konstitutiv exprimierten „Housekeeping“-Gens konnte anschließend die relative Expressionsrate des zu untersuchenden Gens ermittelt werden.

Für die quantitativen Real Time PCR Analysen wurden 96-Well-Platten (Thermo Fischer) verwendet, die vor dem Start mit einer durchsichtigen Verdunstungsschutz-Folie (BioRad Laboratories GmbH) abgedeckt wurden.

Komponenten	Volumen (µl)
SYBR Green Ready Mix	10
Primer forward (10 pmol/Liter)	0,2
Primer reverse (10 pmol/Liter)	0,2
Aqua dest.	5,6
Template Probe (40 ng)	4

Tabelle 2.5: Pipettierschema für die quantitative Real Time PCR (pro Well).

Beschreibung	Dauer	Temperatur	Wiederholung
Initiale Denaturierung und Aktivierung	4,5min	95° Celsius	1x
Denaturierung	15sec	95° Celsius	40x
Annealing/Extension	30sec	60° Celsius	
Detektion	30sec	72° Celsius	
Ende	∞	4° Celsius	1x

Tabelle 2.6: Zyklenschema der quantitativen Real Time PCR

Gen	Sequenz	Orientierung
c-Fos	5'-GACCTTATCTGTGCGTGAAACA-3' 5'-AATACACACTCCATGCGTTTTG-3'	forward reverse
c-Jun	5'-TAACAGTGGGTGCCAACTCA-3' 5'-TTTTTCTCTCCGTCGCAACT-3'	forward reverse
HDAC3	5'-TGGCTTCTGCTATGTCAACG-3' 5'-CCCGGTCAGTGAGGTAGAAA-3'	forward reverse
NFATC4 (NFAT3)	5'-CAAGACGTGTTGGGGAAACT-3' 5'-GAGGGGCAGTTGAGAGACTG-3'	forward reverse
Nox4	5'-TTTTCTCAGGCGTGCATGTG-3' 5'-CATTCAGTTCAACAAAGTCTTCACTGT-3'	forward reverse
TBP	5'-GCCGCCGGCTGTTTAACT-3' 5'-ACGCCAAGAAACAGTGATGCT-3'	forward reverse
p53	5'-GCGAGCACTGCCCAACA-3' 5'-TGAAATATTCTCCATCCAGTGGTTT-3'	forward reverse

Tabelle 2.7: Primer für die quantitative Real Time PCR (bezogen von Eurofins MWG Synthesis GmbH)

2.3 Untersuchung von Proteinen

2.3.1 Isolation von Proteinen

Zur Untersuchung von Konzentrationsveränderungen bestimmter Proteine, wurden EA.hy 926 Zellen entweder in 6-Well Platten oder 3-6 cm Petrischalen ausgesät. Nach der Behandlung der Zellen wurden sie gewaschen und in flüssigem Stickstoff gefroren.

Für die Isolation von Proteinen standen drei Methoden zur Verfügung:

- Proteinpräparation mit TritonX Lyse Puffer

Der Lysepuffer wurde stets frisch angesetzt und hatte pro 1 ml folgende Zusammensetzung.

Komponente	Volumen	Hersteller
5 x TBS	200 µl	Roth
10 % TritonX	100 µl	Roth
Proteinase-Phosphatase-Inhibitor	10 µl	Thermo Scientific
Millipore Wasser (autoklaviert)	690 µl	

Tabelle 2.8: Lysepuffer

Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis ausgeführt. Pro Well einer 6-Well Platte wurden 60 µl TritonX Lyse Puffer gegeben und gleichmäßig verteilt. Dann wurde mit einem Schaber gründlich über den Zellrasen geschabt und das Lyse-Volumen in ein bereitgestelltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einer 10-minütigen Inkubation folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 13000 rpm und 4° Celsius. Die Überstände wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80° Celsius gelagert. Die Pellets wurden verworfen.

- Trennung von zytoplasmatischen und Kernproteinen

Mittels NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo Scientific) ist es möglich, zytoplasmatische Proteine von den Kernproteinen zu trennen. Nach Ablauf des Experiments in 3 cm Schalen wurden die Zellen mittels Trypsin-EDTA Inkubation abgelöst, in 3 ml Medium aufgenommen und in 15 ml Falkons überführt. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 500 g wurde der Überstand abgenommen, das Pellet mit PBS gewaschen und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und erneut zentrifugiert (3min, 500 g, RT). Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet nach Anweisungen des Herstellers mit unterschiedlichen Lysepuffern bearbeitet, um erst die zytoplasmatischen Proteine und anschließend die Kernproteine zu isolieren.

- Gesamtlyse für Western Blot

Diese Methode wurde angewandt, um die Effekte von siRNA auf spezifische Gene zu untersuchen. Viele siRNA wirken rasch, so dass die Ziel-mRNA bereits 24h nach der Transfektion mittels quantitativer RT-PCR kaum nachweisbar ist. Allerdings gibt es stabile und langlebige Proteine, so dass die Konzentration des Zielproteins zeitverzögert abnimmt.

Für diese Methode wurde mit 24-Well Platten gearbeitet. Nach Ablauf der siRNA Inkubation wurden die Wells abgesaugt und mit PBS gewaschen. Die Zellyse wurde durch Zugabe von 50 µl einer frisch angesetzten Lösung vorgenommen, die pro 1 ml folgende Zusammensetzung hatte:

Komponente	Volumen	Hersteller
2x Proben-Puffer	500 µl	siehe Tabelle 2.10
Benzonase	5 µl	Noragen
Magnesium-Chlorid	20 µl	Qiagen
Proteinase-Phosphatase-Inhibitor	10 µl	Thermo Scientific
Millipore Wasser (autoklaviert)	465 µl	

Tabelle 2.9: Lysepuffer für die Herstellung von Komplettproben

Nach kurzer Einwirkung wurde das Lysat in 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgenommen und konnte dann entweder bei -80° Celsius aufbewahrt, oder nach 5-minütigem Kochen bei 95° Celsius komplett auf ein SDS-Gel aufgetragen werden.

Der 2x Proben-Puffer wurde selbst hergestellt und bis zur Verwendung bei -20° Celsius aufbewahrt. Für die Herstellung wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

Komponenten	Volumen/Gewicht	Hersteller
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	5 ml	Roth
SDS 10 %	4 ml	Roth
Glycerin	4 ml	Roth
Aqua dest.	5 ml	
Bromphenolblau	6 mg	Roth
Nachdem das Bromphenolblau gelöst war, wurde der Ansatz einmal filtriert, dann folgte die Zugabe von		
beta-Mercaptoethanol	2 ml	Roth

Tabelle 2.10: 2-fach Proben-Puffer.

2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen mittels BCA-Assay

Der BCA-Assay ist eine zuverlässige Methode, um Proteinkonzentrationen von Lysaten zu bestimmen. In Anwesenheit von Proteinen oder Peptiden werden Kupferionen zu monovalentem Kupfer reduziert (Oxidation von Cystein-, Tyrosin- und Tryptophanresten). Die reduzierten Kupferionen bilden in Folge mit jeweils zwei Molekülen Bicinchoninsäure einen farbigen Komplex. Die Intensität des Farbumschlages ist proportional zur Proteinkonzentration und bei einer Wellenlänge von 595 nm messbar. Die Konzentrationsbestimmung wurde in durchsichtigen 96-Wellplatten durchgeführt. Um den Extinktionen die jeweilige Proteinkonzentration zuordnen zu können, wurde bei jeder Messung eine BSA-Verdünnungsreihe (0, 1, 2, 5, 10, 20, 30, 40 und 50 µg BSA in 50 µl Millipore Wasser) angelegt. Von den Proben wurden jeweils 5 µl in die Wells pipettiert und mit Millipore Wasser auf ein Volumen

von 50 µl eingestellt. In einem Becherglas wurde eine 50-fache Verdünnung von Kupfersulfat-Lösung mit BCA (beides von Sigma-Aldrich) hergestellt. Davon wurde 200 µl in jedes Well gegeben. Da die Komplexbildung von monovalentem Kupfer mit BCA temperaturabhängig war, folgte eine 30-minütige Inkubation bei 37° Celsius. Die Messung fand in einem Sunrise Multireader bei 595 nm statt.

2.3.3 SDS-PAGE

- Fertigung von Trenn- und Sammelgelen

Zur Untersuchung spezifischer Proteine wurden Western Blot-Analysen durchgeführt. Voraussetzung für diese Methode ist eine Auftrennung der Proteine nach ihren Molekülgrößen. Dies wurde mittels SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgel-Elektrophorese) erreicht. Als Trennmedium dient ein Gel basierend auf polymerisiertem Polyacrylamid. Die Dichte der Trenngele ist durch unterschiedliche Mengen von Acrylamid-Lösung beeinflussbar. Folgende Komponenten für Trenn- und Sammelgel wurden jeweils in einem 50 ml Falcon zusammengegeben:

Komponenten	Volumen	Volumen	Hersteller
Angaben für die Fertigung von zwei Mini-Gelen (in µl)	Trenngel 15 % Acrylamid	Sammelgel 5 % Acrylamid	
Wasser	4600	5500	
Tris-HCl pH 8,8 1,5 M	5000		Roth
Tris-HCl pH 6,8 1 M		1000	Roth
SDS 10 %	200	80	Roth
Acrylamid-Lösung 30 %	10000	1300	Applichem
TEMED	8	8	Applichem
APS	200	80	Applichem

Tabelle 2.11: Zusammensetzung von Trenn- und Sammelgel.

Zuerst wurden die Komponenten des Trenngels vereint, wobei TEMED und APS abschließend pipettiert wurden, da diese Chemikalien die Polymerisation einleiten. Nach dem Gießen wurde das Trenngel mit 2-3 ml Wasser überschichtet, um eine horizontale Kante zu gewährleisten. Nach 20 min wurde die Polymerisation des Sammelgels gestartet und nach Entfernung des Ballastwassers auf das verfestigte Trenngel gegeben und mit einem Kamm versehen. Nach weiteren 20min wurden die Gele in eine Elektrophorese-Kammer eingespannt.

- Vorbereitung der Auftragsproben

Hierzu wurde von jeder Lysatprobe ein 30 µg Gesamtprotein enthaltendes Volumen entnommen, in ein vorbereitetes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit Millipore Wasser und 2-fach Sample-Buffer auf ein Volumen von 22 µl (kleine Taschen), oder 35 µl (große Taschen) eingestellt. Die zugefügten Wassermengen orientierten sich an den erforderlichen Volumina der Proteinlysate, so dass die Auftragsproben zu einem Teil aus Proteinlysate/Wasser und zu einem Teil aus 2-fach Sample-Buffer bestanden. Anschließend folgte ein 5-minütiges Kochen bei 95° Celsius, um eine Denaturierung der Proteine zu erreichen.

- Elektrophorese

Um durch das Anlegen einer elektrischen Spannung eine Proteinauftrennung nach Molekülgröße zu gewährleisten, mussten die Eigenladungen der Proteine aufgehoben werden. Dies wird durch die SDS-Komponente in den Gelen erreicht, da diese anionische Chemikalie nach Proteinbindung zu einer gleichmäßigen negativen Ladung nach Größe führt. Da die Auftragsproben vorher gekocht worden waren, fand in Kombination mit dem SDS eine Linearisierung der Proteine statt.

Vor Beladen der Taschen wurden diese durch wiederholtes auf und abziehen mit einer 100 µl Pipette gespült, um lose Gelstücke zu entfernen. Dann wurde das gesamte Volumen der Auftragsproben vorsichtig auf die Taschen verteilt, eine Tasche war für 3 µl Marker (Page Ruler #SM0671, Fermentas Life Sciences) reserviert. Solange sich die Proteinfront durch das Sammelgel bewegte wurde eine

Spannung von 80 Volt angelegt, nach dem Übertritt in das Trenngel wurde diese auf 140 Volt erhöht. Nach etwa 1,5h konnte die Elektrophorese beendet werden.

Komponenten für 10-fach Laufpuffer	Gramm pro Liter	Endkonzentration	Hersteller
Tris Ultra, ph 8,8	30 g	250 mM	Roth
Glycin	144 g	2000 mM	Roth
SDS	10 g	1 %	Roth
Wasser	Ad 1000 ml		

Tabelle 2.12: Zusammensetzung des Laufpuffers für die SDS-PAGE.

2.3.4 Western Blot

- Proteintransfer (Blotten)

Die Elektrophorese führt abhängig von den Molekülgrößen der Proteine zu einer Auftrennung, da größere Proteine wesentlich langsamer durch das Gel wandern als kleinere. Um spezifische Proteine mittels Antikörperbindung untersuchen zu können, musste als nächstes ein Proteintransfer auf eine Nitrocellulosemembran durchgeführt werden. Dieser Vorgang wird als Blotten bezeichnet. Folgende Lösungen und Apparaturen wurden hierfür benötigt.

Komponenten	Volumen/Menge	Endkonzentration	Hersteller
Tris Base	2,85 g	20 mM	Roth
Glycin	22,5 g	150 mM	Applichem
Methanol	400 ml	20 %	Roth
Wasser	Ad 2000 ml		

Tabelle 2.13: Elektroblothing Puffer

Komponente	Menge	Hersteller
Nitrocellulose Membran	1 x	Whatman
Whatman-Papier	6 x	Whatman
Abzugshaubenfilter	4 x	Baumarkt
Glasstab	1 x	Eigene Werkstatt
Blotting Kammer	1 x	Eigene Werkstatt
Netzgerät	1 x	BioRad
Kunststoff-Gitter	2 x	Eigene Werkstatt

Tabelle 2.14: Material zum Transfer zweier Minigele

Das Blotten wurde unmittelbar nach der Elektrophorese durchgeführt. Hierzu wurden die Gele, die Nitrocellulosemembran, die Whatman-Papiere und die Abzugshaubenfilter in Schälchen mit Elektrobloiting Puffer eingelegt und für 15 min äquiliibriert. Anschließend wurde der Blot wie folgt zusammengesetzt:

Ein Kunststoff-Gitter, zwei Abzugshaubenfilter, drei Whatman-Papiere, eine Nitrocellulosemembran, maximal zwei Minigele, drei Whatman-Papiere, zwei Abzugshaubenfilter und abschließend ein Kunststoff-Gitter. Eingeschlossene Luftblasen mussten sorgfältig entfernt werden, indem ein Glasstab zwischen den Aufbausritten über den Blot gerollt wurde.

Der fertige Aufbau wurde senkrecht so in eine Blotting Kammer gespannt, dass das Gel zum Minus-Pol und die Membran zum Plus-Pol ausgerichtet waren. Der Blot musste vollständig mit Elektrobloiting Puffer bedeckt sein und wurde über Nacht bei 90 mA an ein Netzgerät angeschlossen. Ein Rührfisch sorgte für die dauerhafte Homogenität des Puffers.

- Analyse von spezifischen Proteinen

Nach dem Transfer der Proteine wurden die Gele verworfen und die Membran kurz in einer Schale Wasser gespült, anschließend folgte ein 5-minütiges Bad in einer PonceauS Lösung, um die transferierten Proteinbanden sichtbar zu machen. Die Anfärbung diente zum einen der Transferkontrolle, zum anderen konnte nun mit einem Skalpell der Bereich ausgeschnitten werden, in dem das zu untersuchende

Protein zu erwarten war. Die rötliche Färbung wurde anschließend durch dreimaliges Schwenken in TBS Puffer (je 5min) entfernt, dann folgte eine einstündige Inkubation mit einer 5 %-igen Milch/TBST Lösung. Dieser als Blocken bezeichnete Schritt deckte unspezifische Bindestellen auf der Membran ab. Nach dem Blocken wurde die Membran fünfmal je 10min in TBST Puffer geschwenkt, dann folgte über Nacht die Inkubation mit dem primären Antikörper gegen das zu untersuchende Protein. Hierzu wurde das Schälchen abgedeckt und bei 4° Celsius in der Kühlkammer auf einem Schüttler sanft geschwenkt. Am folgenden Tag wurde der primäre Antikörper mit einer Pipette abgezogen, in ein 15 ml Falcon überführt und für weitere Inkubationen bei -20° Celsius aufbewahrt, die Membran wurde fünfmal je 10min in TBST Puffer geschwenkt. Dann wurde für eine Stunde und bei Raumtemperatur mit einem geeigneten Sekundär-Antikörper inkubiert. Nach Ablauf der Inkubation wurde der Sekundär-Antikörper verworfen und es folgten ein viermaliges Waschen der Membran mit TBST und ein abschließender Waschgang mit TBS (jeweils 10min).

Für die Detektion der Proteine wurde die Membran auf einer Glasscheibe mit 1-2 ml Western Lightning Plus-ECL-Lösung (Perkin-Elmer) beträufelt. Diese Lösung enthält eine Substanz, die von der Sekundär-Antikörper assoziierten Meerrettich-Peroxidase unter Lichtentwicklung gespalten wird.

Nach einer Minute wurde die überschüssige Lösung vorsichtig von der Membran abgenommen (Glasplatte schief halten und Tropfen mit Saugpapier aufnehmen, ohne die Membran zu berühren). Nachdem eine durchsichtige Folie über die Membran gespannt worden war, wurden in der Dunkelkammer Röntgenfilme (GE Healthcare) in einer Hypercassette (Amersham) belichtet.

Die Entwicklung und Fixierung fand per Hand statt. Für den Gebrauch wurden sowohl der Entwickler, als auch der Fixierer (beide Kodak) 1:5 mit Wasser verdünnt.

Primär-Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Kaninchen Anti-Elk-1	1:500 in 5 % MP/TBST	Millipore #04-226
Kaninchen Anti-c-Fos	1:1000 in 5 % BSA/TBST	Cell signaling #4384
Kaninchen Anti-GAPDH	1:20000 in 5 % MP/TBST	Epitopics #2251-1
Kaninchen Anti-GSK-3	1:1000 in 5 % BSA/TBST	Cell signaling #5676
Kaninchen Anti-phospho-GSK-3	1:1000 in 5 % BSA/TBST	Cell signaling #9327



Kaninchen Anti-HDAC3	1:1000 in 5 % MP/TBST	Abcam #ab7030
Kaninchen Anti-c-Jun	1:1000 in 5 % MP/TBST	Abcam #ab31419
Kaninchen Anti-NFAT3	1:1000 in 5 % BSA/TBST	Cell signaling #2183
Maus Anti-PKC alpha	1:1000 in 5 % MP/TBST	Santa Cruz #sc-8393
Kaninchen Anti-PKC delta	1:1000 in 5 % MP/TBST	Santa Cruz #sc937
Kaninchen  Anti-phospho-PKC delta	1:1000 in 5 % BSA/TBST	Cell signaling #9374
Kaninchen Anti-p44/42	1:1000 in 5 % BSA/TBST	Cell signaling #9102
Kaninchen  Anti-phospho-p44/42	1:1000 in 5 % BSA/TBST	Cell signaling #9101
Kaninchen Anti-p53	1:500 in 5 % MP/TBST	Epitomics #1005-1
Sekundär-Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Ziege Anti-Hase	1:5000 in 5 % MP/TBST	Sigma-Aldrich #A9169
Hase Anti-Maus	1:5000 in 5 % MP/TBST	Sigma-Aldrich #A9044

Tabelle 2.15: Verwendete Primär- und Sekundär-Antikörper

2.4 Luziferase Reporter Assay

Für die Durchführung von Nox4-Promotor-Experimenten wurden veränderte pGL3-Basic Vektoren verwendet. Bei einem pGL3-Basic Vektor handelt es sich um ein ringförmiges DNA-Stück, das frei von eukaryotischen Promotor- oder Enhancer-Sequenzen ist, aber über eine kodierende Sequenz der Feuerfliegen-Luziferase (*luc+*) (*Photinus pyralis*) verfügt.

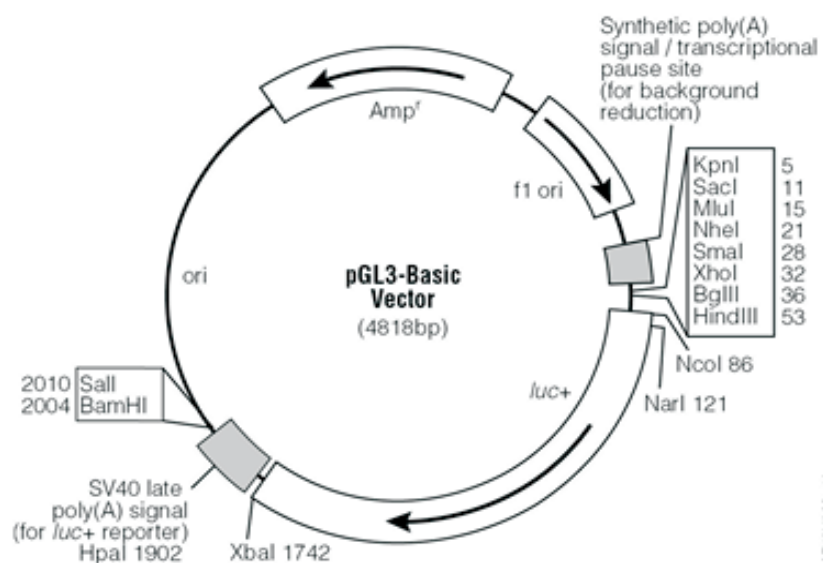


Abbildung 2.1: pGL3-Basic Vektor

Zur Transkription der Luziferase durch eukaryotische Zellen ist ein funktionales Promotorstück upstream von *luc+* inseriert. Dank einer sogenannten „multiple cloning site“ ist es möglich, Promotoren unterschiedlichster Gene in den Vektor einzubringen.

Wird durch einen Stimulus eine Promotoraktivierung eingeleitet, kommt es in den transfizierten Zellen zu einer Luziferase-Produktion, deren Intensität in den Zelllysaten messbar ist. Grundlage der Messung ist eine Reaktion, die von der gebildeten Luziferase katalysiert wird. Dabei wird ein Mix aus D-Luciferin, ATP, Magnesium und CoenzymA mit den Zelllysaten gemischt. Bei Anwesenheit von Luziferase wird D-Luciferin unter Lichtentwicklung oxidiert.



Abbildung 2.2: Substratumsatz der Luziferase

Für diese Arbeit wurden EA.hy 926 Zellen mit pGI3-Basic Plasmiden transfiziert, die drei unterschiedlich lange Nox4-Promotorstücke enthielten. 24h nach der Plasmid-Transfektion wurden die Zellen für 48h mit 10 nmol/Liter PMA inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium angesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und wie folgt für den Luziferase-Assay vorbereitet:

Durch eine 1:5 Verdünnung einer 5-fach PLB-Lösung („passive Lysis Buffer“, Promega) mit Aqua dest. wurde ein ausreichendes Volumen PLB-Lösung hergestellt, wovon 100 µl pro Well zu den Zellen pipettiert wurden. Nach kurzer Einwirkzeit wurden die Zelllysate in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt, für 10 Sekunden geschüttelt (Vortex) und für 10min auf Eis inkubiert. Dann wurde bei 13.000 rpm und 4° Celsius für 15min zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und in frische Reaktionsgefäße überführt. Diese Proben konnten entweder bei -80° Celsius gelagert werden, oder für eine anschließende Messung in eine weiße 96-Well-Platte (10 µl Probe pro Well) pipettiert werden. Für die Kontrolle wurden drei Wells mit 10 µl PLB-Lösung beladen.

Die Messungen fanden an einem Luminometer statt, das automatisch durch Zugabe von 100 µl Luziferase-Substrat-Lösung pro Well die Luziferase-katalysierte Reaktion einleitete. Der Luminometer registrierte die Lichtintensität pro Well, die über einen Zeitraum von 10 Sekunden entstanden war.

Parallel dazu wurde auch die Proteinkonzentrationen der Lysate bestimmt, um einen Bezug von Lichtintensität pro µg Protein herstellen zu können.

Die Luziferase-Substrat-Lösung wurde in einem undurchsichtigen 50 ml Falcon angesetzt (Lichtschutz):

Komponente	Volumen	Hersteller
2-fach Luciferase Assay Puffer	5000 µl	siehe Tabelle 2.17
Wasser	4660 µl	
D-Luciferin 25 mM	188 µl	Applichem
Coenzym A 27 mM	100 µl	Applichem
ATP 100 mM	52 µl	Applichem

Tabelle 2.16: Luziferase-Substrat-Lösung

Der 2-fach Luziferase Assay Puffer setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

Komponente	Volumen/ Menge	Hersteller
Tricine	1,075 g	Sigma
EDTA 0,5 M pH 8,0	40 µl	Applichem
Magnesiumsulfat	0,739 g	Merck
DTT	0,301 g	Applichem
Aqua dest.	ad 100 ml	

Tabelle 2.17: 2-fach Luziferase Assay Puffer

2.5 Transformation von Bakterien

Für den Erhalt der Plasmidbestände wurden kompetente E.coli Bakterien (DH5-alpha; bereitgestellt von AG Kleinert) verwendet. Das Einschleusen von Plasmiden in Bakterien, mit dem Ziel dieses zu vermehren, wird als Transformation bezeichnet.

Für diese Arbeit wurde die Hitzeschock-Methode angewendet. Hierfür wurde zu 100 µl Bakterien-Suspension 2 µl einer Plasmid-Verdünnung (5 ng DNA/µl) pipettiert. Nach einem 30-minütigen Eisbad wurde das Reaktionsgefäß für 50 Sekunden in einen Heizblock gestellt, der auf 42° Celsius eingestellt worden war. Durch den Hitzeschock entstehen kurzfristig Löcher in der Bakterienmembran, sodass die Plasmide in die Zellen gelangen können. Auf den Hitzeschock folgte ein zweiminütiges Eisbad. Nach Zugabe von 400 µl Antibiotika-freies LB-Medium wurde die Bakterien 1h bei 37° Celsius inkubiert. Da die Bakterien mit der Plasmid-Aufnahme resistent gegen Ampicillin geworden waren, konnte nun eine selektive Anzucht von transformierten Bakterien durchgeführt werden. Hierfür wurden 50 µl der Bakterien-Suspension dünn auf einer Ampicillin-haltigen Agar-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37° Celsius inkubiert (Platten kopfüber).

Am folgenden Tag wurde mit einer Pipettenspitze eine Kolonie von der Agar-Platte gekratzt („Picken“) und zu 4 ml LB-Medium mit Ampicillin gegeben. Nach 8-10 Stunden bei 37° Celsius und 250 rpm (Schüttler) wurde aus dieser Vorkultur 500 bis 1000 µl entnommen und zu 150 bis 200 ml LB-Medium pipettiert. Diese Hauptkultur wurde über Nacht bei 37° Celsius und 250 rpm inkubiert. Für die Plasmid-Präparation wurde das peqGold XChange Plasmid Maxi-EF kit (Peqlab) verwendet. Dabei wurden die Arbeitsanweisungen exakt befolgt.

Komponente	Menge	Hersteller
Bactotryptone	5 g	Roth
Hefeextrakt	2,5 g	Roth
10 g NaCl	5 g	Roth
Wasser	ad 500 ml	

Tabelle 2.18: Zusammensetzung des LB-Mediums. Nach Autoklavierung und Abkühlung wurde Ampicillin (100 µg/ml; Ratiopharm) hinzugefügt.

3. Ergebnisse

3.1 PMA-induzierte Nox4-Hochregulation in humanen Endothelzellen

Zur Verifizierung der Kernaussagen der Publikation der Arbeitsgruppe (Xu et al., 2008), an denen diese Arbeit anknüpft, wurden humane Endothelzellen EA.hy 926 für 48h mit 10 nmol/l PMA behandelt. Eine Parallelgruppe wurde für 30min mit 1 µmol/l Gö 6983 vorbehandelt. Diese Zellen wurden schließlich ebenfalls für 48h mit dem Phorbolester und in ständiger Anwesenheit von 1 µmol/l Gö 6983 inkubiert. Die Analyse mittels quantitativer RT-PCR konnte zum einen die PMA-induzierte Nox4-Hochregulation bestätigen, zum anderen konnte die Tatsache reproduziert werden, dass eine Inhibierung von PKC-Isoformen mittels dem Inhibitor Gö 6983 abgewendet werden kann (Abbildung 3.1).

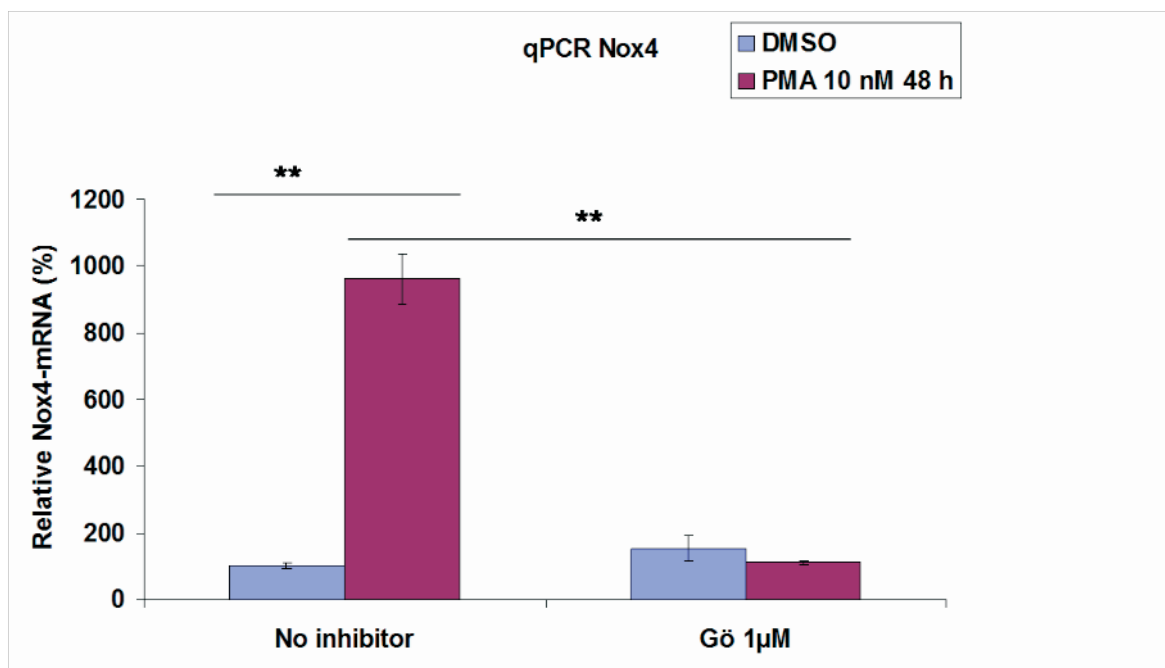


Abbildung 3.1: EA.hy 926 Zellen wurden für 48h mit 10 nmol/l PMA behandelt. Der PKC Inhibitor Gö 6983 wurde entweder zu Beginn des Versuches hinzu gegeben (rechts) oder durch ein gleiches Volumen DMSO ersetzt (links). Die Zellen der Inhibitor-Gruppe wurden vor PMA-Zugabe 30min nur mit 1 µmol/l Gö 6983 vorbehandelt. Die Nox4 mRNA Expression wurde mit quantitativer RT-PCR analysiert. (n = 7; **P < 0,01)

Des Weiteren wurde nachgeprüft, ob die Isoform PKC alpha maßgeblich in der PMA induzierten Nox4 Hochregulation involviert ist. Dazu wurden EA.hy 926 Zellen für 48h entweder mit scrambled siRNA, oder mit PKC alpha siRNA behandelt. Anschließend folgte eine 48-stündige PMA Inkubation. Die PKC alpha siRNA Gruppe zeigte zwar eine PMA induzierte Nox4 Hochregulation, allerdings höchst signifikant schwächer als die Kontroll-Gruppe (siehe Abbildung 3.2). Eine Überprüfung des Proteingehaltes mittels Western Blot konnte zeigen, dass eine 48 stündige PKC alpha siRNA Einwirkung zu einem fast vollständigen Knock-out dieses Proteins geführt hatte (Abbildung 3.3).

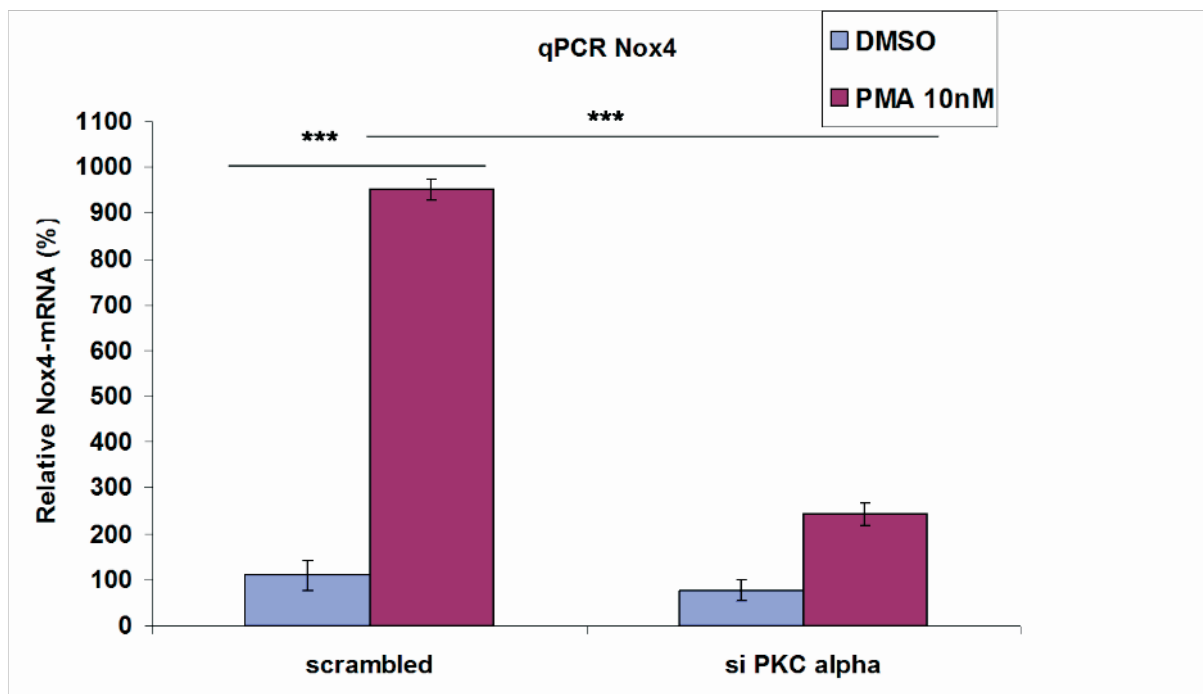


Abbildung 3.2: EA.hy 926 Zellen wurden entweder mit 50 nmol/l scrambled siRNA (links) oder mit 50 nmol/l PKC alpha siRNA (rechts) transfiziert. Nach 48h wurden die Zellen für 48h DMSO oder 10 nmol/l PMA stimuliert. Die Nox4 mRNA Expression wurde mit quantitativer RT-PCR analysiert. (n=3; ***P< 0,001)

~ Ergebnisse ~

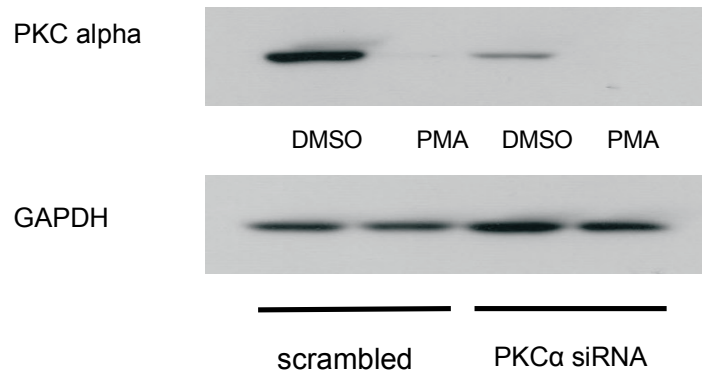


Abbildung 3.3: EA.hy 926 Zellen wurden entweder mit 50 nmol/l scrambled siRNA oder mit 50 nmol/l PKC alpha siRNA transfiziert. Nach 48h wurden die Zellen für 48h DMSO oder 10 nmol/l PMA stimuliert. Anschließend wurden Gesamtprotein-Lysate hergestellt und ein Western Blot durchgeführt. Die hier gezeigte Bilder sind repräsentativ für n = 3 Experimente.

In der Publikation wurde auch beschrieben, dass die PMA induzierte Nox4-Hochregulation durch Zugabe des Proteinbiosyntheseinhibitors Cyclohexamid abgewendet werden konnte. Diese Tatsache wurde in Abbildung 3.4 nicht nur bestätigt, sondern es konnte gezeigt werden, dass dies auch der Fall ist, wenn der Inhibitor erst nach 24h PMA Inkubation zu den Zellen gegeben wird. Hierfür wurde der Inhibitor unter sterilen Bedingungen direkt in das Medium pipettiert und auf eine Konzentration von 1 μ g/ml eingestellt. Der Kontrollgruppe wurde das gleiche Volumen DMSO hinzugefügt.

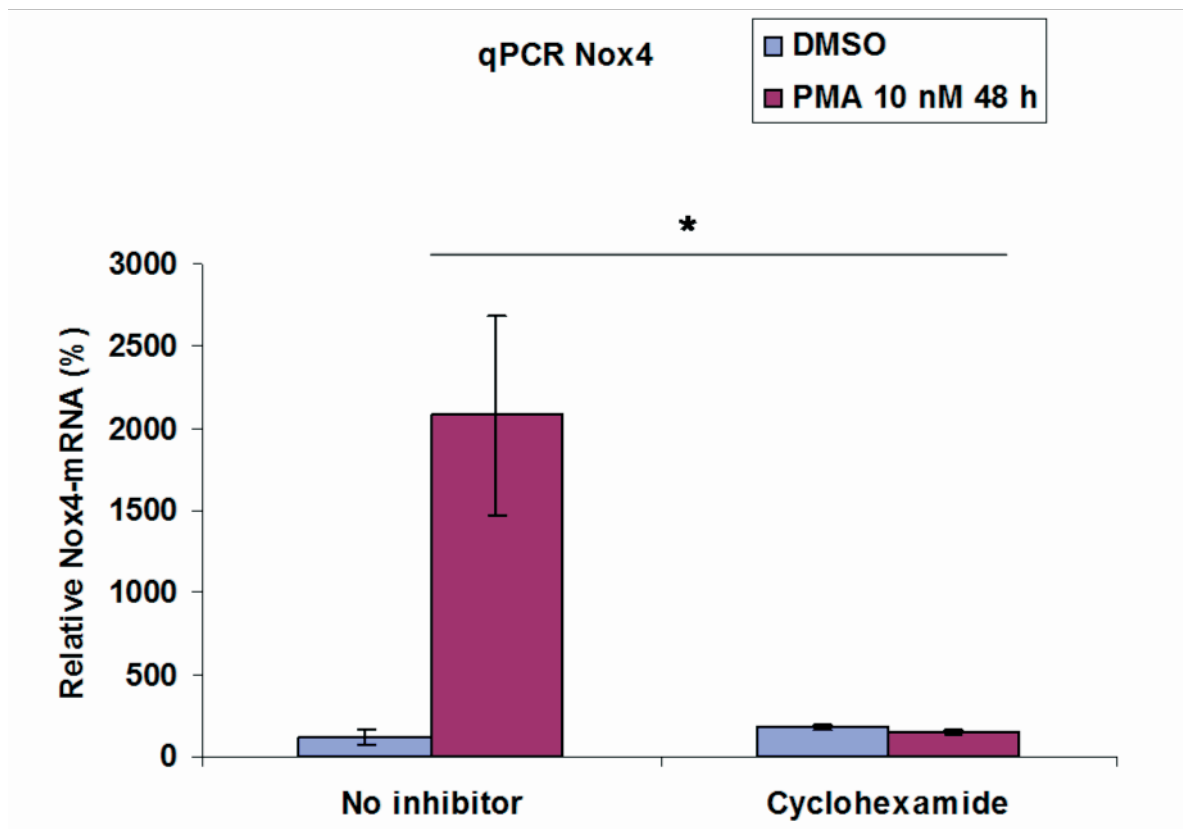


Abbildung 3.4: EA.hy 926 Zellen wurden für 48h mit 10 nmol/l PMA inkubiert. 24h nach Versuchsbeginn wurde DMSO (links), oder 1 µg/ml Cyclohexamid (rechts) hinzugefügt ohne das Medium zu wechseln. Nach weiteren 24h Inkubation wurde das Experiment abgestoppt. Die Nox4 mRNA Expression wurde mit quantitativer RT-PCR analysiert. (n=3; * P< 0,05)

3.2 MAPK

Da bestätigt werden konnte, dass mindestens eine Isoform von PKC bei der PMA-induzierten Nox4-Hochregulation in humanen Endothelzellen involviert ist, wurde im folgenden überprüft, welche Signalwege down-stream nach der Aktivierung von PKC alpha beteiligt sind. In der Literatur wird beschrieben, dass PKC Isoformen Erk1/2 (MAPK) aktivieren können (Sözeri et al., 1992). Um die Bedeutung dieses Signalweges zu testen, wurden EA.hy 926 Zellen für 48h mit 10 nmol/l PMA in An- und Abwesenheit des Erk1/2 Inhibitors PD 98059 inkubiert.

Die Inhibierung von Erk1/2 zeigte eine signifikante Abschwächung der PMA-induzierten Nox4-Hochregulierung (Abbildung 3.5).

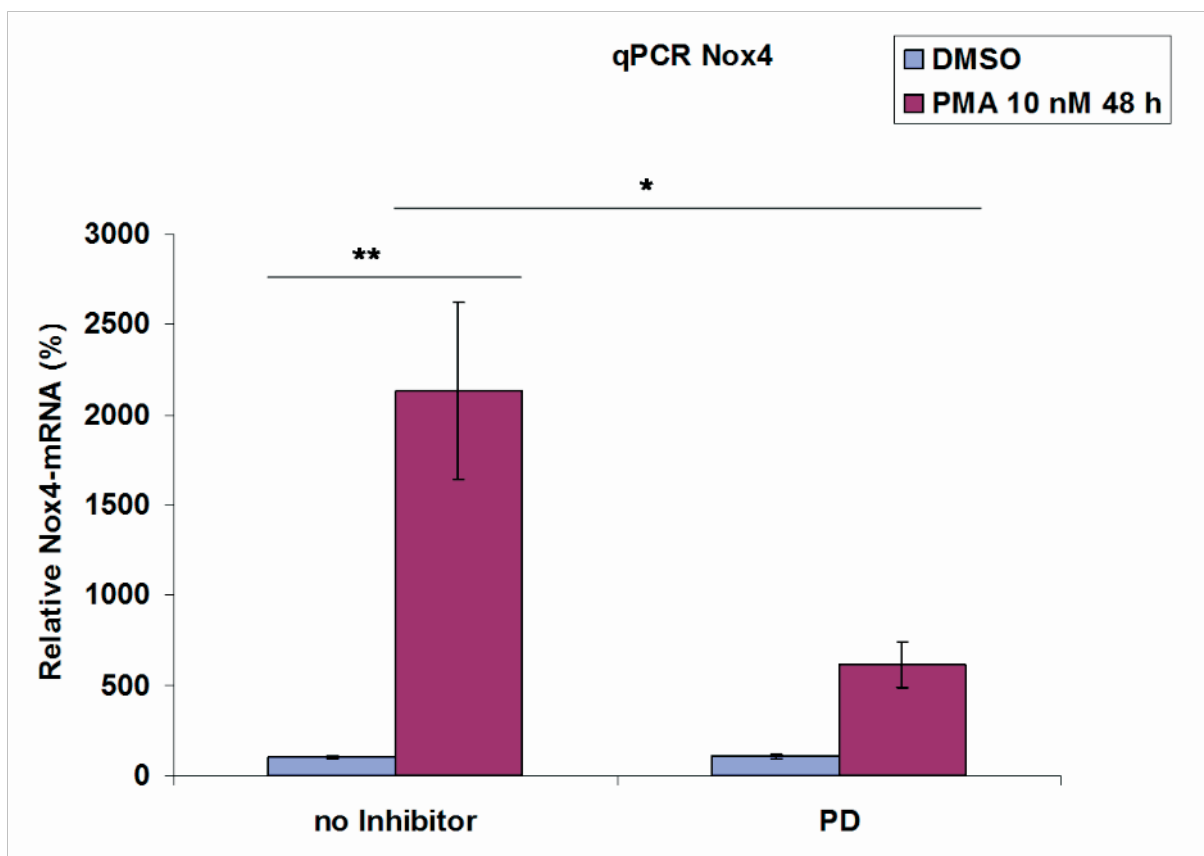


Abbildung 3.5: EA.hy 926 Zellen wurden für 48h mit 10 nmol/l PMA behandelt. Der Erk1/2 Inhibitor wurde entweder zu Beginn des Versuches hinzu gegeben (rechts) oder durch ein gleiches Volumen DMSO ersetzt (links). Die Zellen der Inhibitor-Gruppe wurde vor PMA-Zugabe 30min alleine mit 10 μ mol/l PD 98059 vorbehandelt. Die Nox4 mRNA Expression wurde mit quantitativer RT-PCR analysiert. (n = 6; * P < 0,05; **P < 0,01)

Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass die PMA-induzierte Nox4-Hochregulation auch dann signifikant reduziert werden konnte, wenn der Inhibitor PD 98059 zu späteren Zeitpunkten zu den Zellen gegeben wurde (Abbildung 3.6). Hierfür wurden EA.hy 926 Zellen mit 10 nmol/l PMA inkubiert, 24h bzw. 30h nach dem Start des 48h andauernden Experiments wurde dann unter sterilen Bedingungen PD 98059 direkt in das Medium der Inhibitorgruppe pipettiert und auf eine Konzentration von 10 μ mol/l eingestellt.

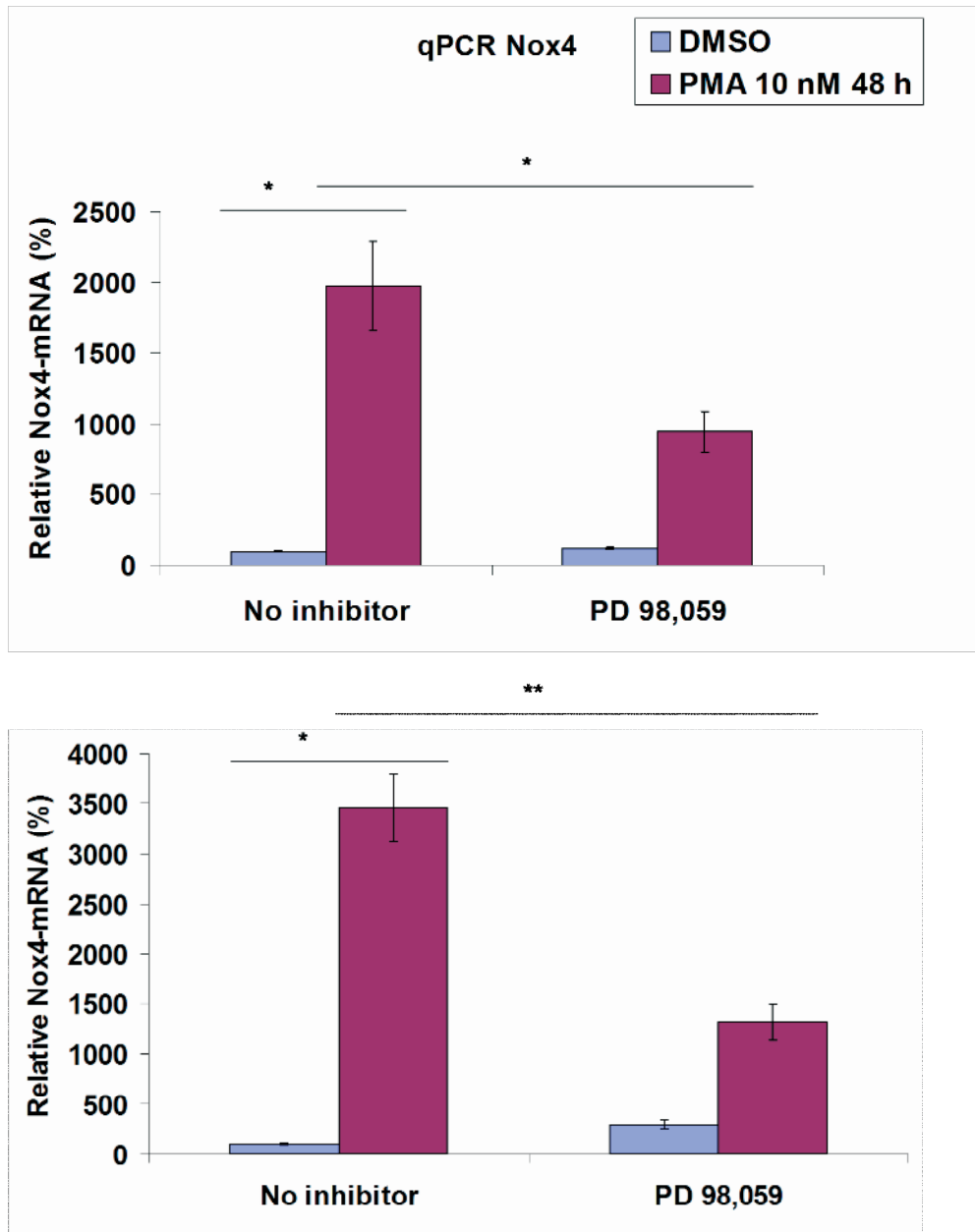


Abbildung 3.6: EA.hy 926 Zellen wurden für 48h mit 10 nmol/l PMA inkubiert. 24h (oben) und 30h (unten) nach Versuchsbeginn wurde DMSO (links), bzw. 10 μ mol/l PD 98059 (rechts) hinzugefügt ohne das Medium zu wechseln. Nach weiteren 24h, bzw. 18h Inkubation wurde das Experiment abgestoppt. Die Nox4 mRNA Expression wurde mit quantitativer RT-PCR analysiert. (n=3-6; * P< 0,05; **P< 0,01)

Da durch den Einsatz des Erk1/2 Inhibitors eine deutliche Reduktion der PMA-vermittelten Nox4-Hochregulierung herbeigeführt werden konnte, wurden im Folgenden Western Blots durchgeführt, um die Phosphorylierung der Erk1/2-Proteine nach PMA-Inkubationen nachzuweisen. Hierfür wurden zum einen EA.hy 926 Zellen für 48h mit 10 nmol/l PMA in An- und Abwesenheit von PD 98059, zum anderen EA.hy 926 Zellen ohne Einsatz des Inhibitors für 3h, 6h, 30h und 48h mit PMA inkubiert. Anschließend wurden aus den Zellen Gesamtprotein-Lysate hergestellt.

Es zeigte sich, dass weder PMA noch PD 98059 Einfluss auf die Proteinmenge von Erk1/2 hatte, allerdings konnte mittels des phospho-Erk1/2 Antikörper, der die aktivierte Form detektiert, eine deutliche Zunahme des Phosphorylierungsgrades von Erk1/2 nachgewiesen werden, wenn PMA 48h lang gewirkt hatte (Abbildung 7A, Bande 3 und 4). Der Erk1/2 Inhibitor PD 98059 schwächt diese Phosphorylierung und damit die Aktivierung von Erk1/2 deutlich ab (Abbildung 3.7A, Bande 7 und 8).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass diese PMA-vermittelte Erk1/2-Aktivierung auch an drei weiteren Messpunkten (3h, 6h und 30h) vorhanden war (Abbildung 3.7B, Bande 3, 4 und Bande 7, 8). Dies legt den Schluss nahe, dass Erk1/2 kurz nach der PMA-Gabe aktiviert wird und dass diese Aktivierung über den gesamten Zeitraum von 48h anhält.

~ Ergebnisse ~

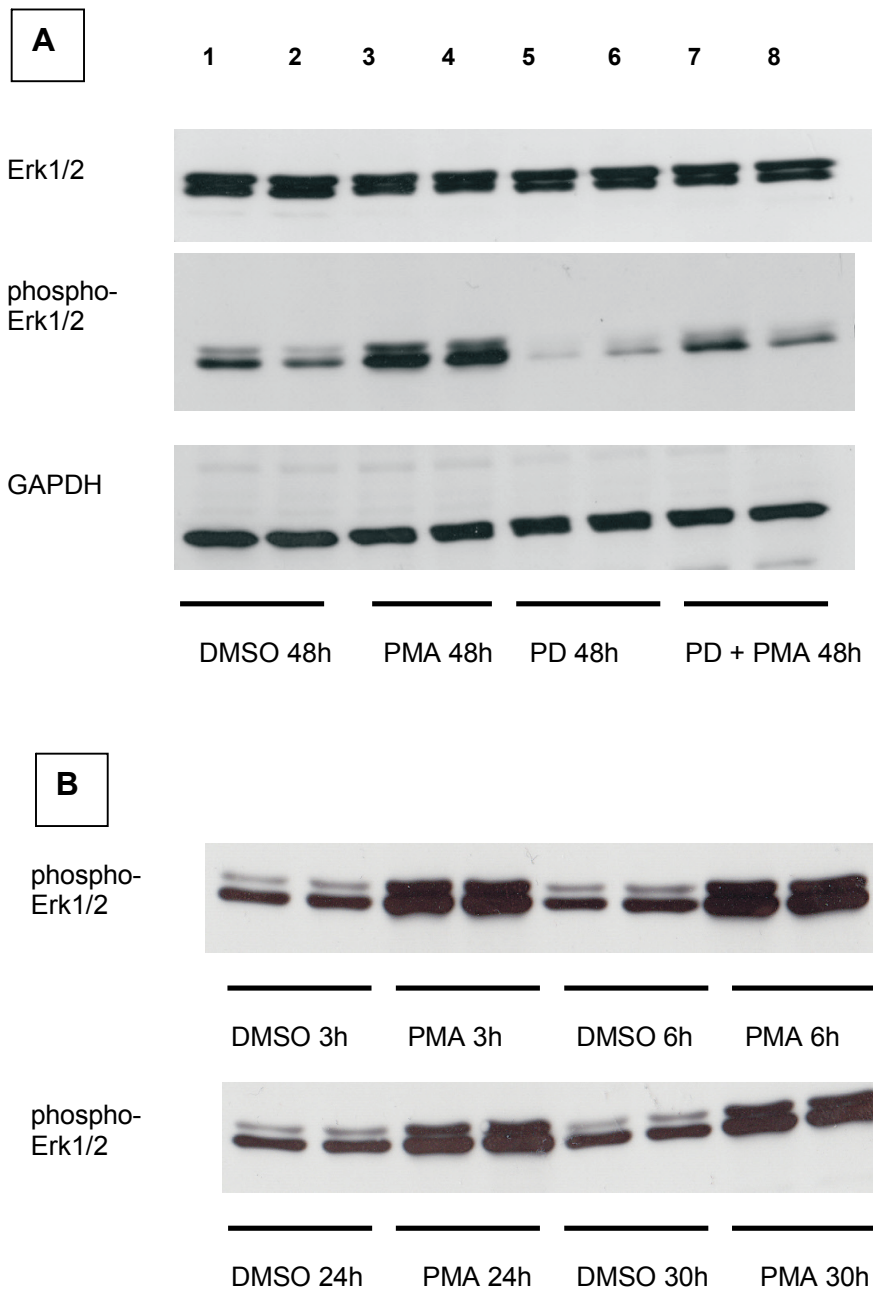


Abbildung 3.7:

A: EA.hy 926 Zellen wurden für 48h mit 10 nmol/l PMA mit und ohne 10 µmol/l PD 98059 behandelt. Vor Beginn des Experimentes wurde die Inhibitorgruppe für 30 min mit 10 µmol/l PD 98059 vorinkubiert.

B: EA.hy 926 Zellen wurden jeweils für 3h, 6h, 30h und 48h mit 10 nmol/l PMA ohne Inhibitor inkubiert.

Die Gesamtprotein-Lysate (35 µg) wurden mittels eines 10 %-igen SDS-Polyacryl-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und einer Western Blot-Analyse unterzogen.

Die hier gezeigte Bilder sind repräsentativ für n = 3 Experimente.

Um den Beweis für die Beteiligung von Erk1/2 an der PMA-vermittelten Signaltransduktion zu untermauern, wurden siRNA Transfektionen gegen die Erk1/2 Proteine p42 und p44 durchgeführt. In Abbildung 3.8 ist ein entsprechender Western Blot dargestellt, dem entnommen werden kann, dass die siRNA zu einem Abbau der Erk1/2-Proteine führte, der Abbau aber langsam vor sich ging.

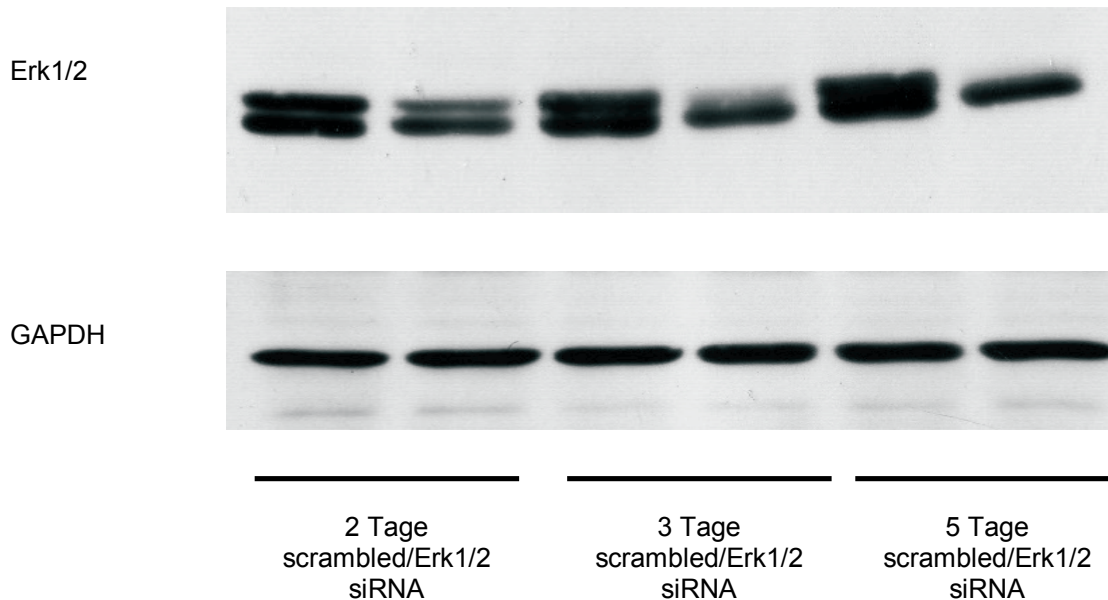


Abbildung 3.8: EA.hy 926 Zellen wurden mit 50 nmol/l scrambled oder Erk1/2 siRNA transfiziert. Nach 2, 3 und 5 Tagen wurden die siRNA Inkubationen beendet. Die Gesamtprotein-Lysate (35 µg) wurden mittels eines 10 %-igen SDS-Polyacryl-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und einer Western Blot-Analyse unterzogen. Die hier gezeigte Bilder sind repräsentativ für n = 3 Experimente.

Da gezeigt werden konnte, dass die Erk1/2 siRNA nur langsam wirkte, wurde im weiteren Verlauf die 48-stündige PMA Inkubation der Zellen erst 72h nach der Transfektion gestartet. In Abbildung 3.9 kann eine deutliche Abschwächung der PMA-vermittelten Nox4-Hochregulation in den EA.hy 926 Zellen entnommen werden. Dieses Ergebnis deckte sich mit den Beobachtungen, die mit Hilfe des Inhibitors PD 98059 gemacht worden waren.

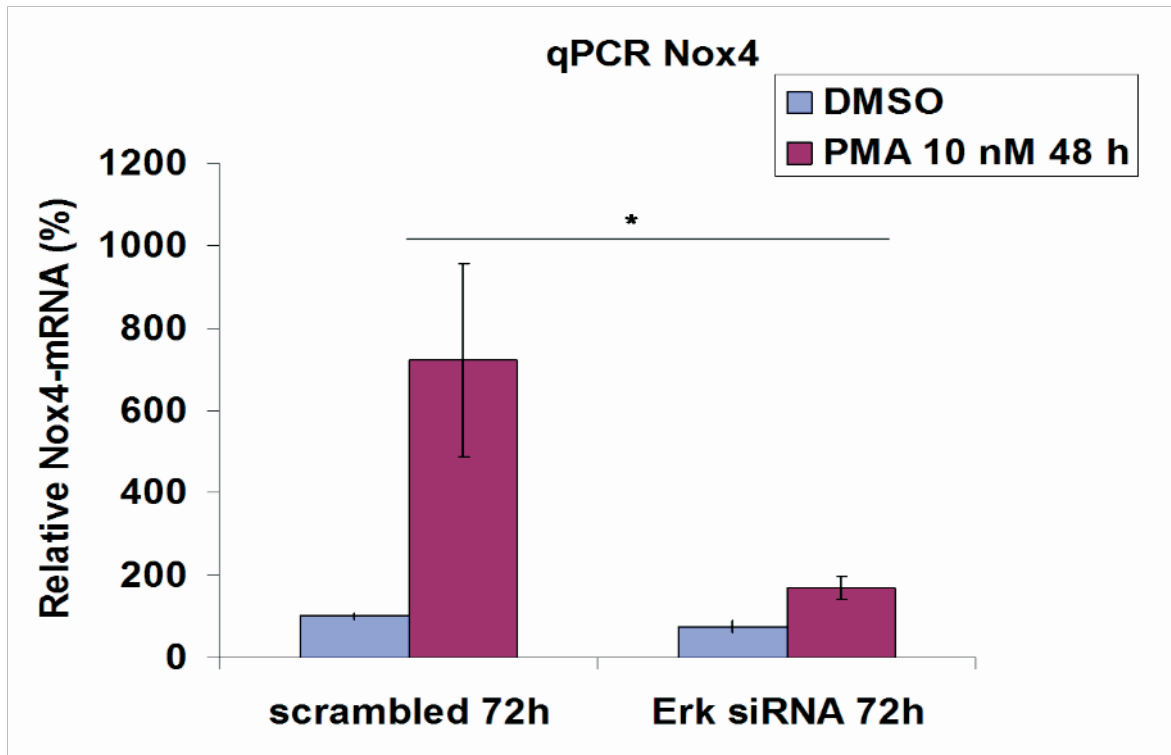


Abbildung 3.9: EA.hy 926 Zellen wurden entweder mit 50 nmol/l scrambled siRNA (links) oder mit 50 nmol/l Erk1/2 siRNA (rechts) transfiziert. Nach 72h wurden die Zellen 48h lang mit DMSO oder 10 nmol/l PMA stimuliert. Die Nox4 mRNA Expression wurde mit quantitativer RT-PCR analysiert. (n=6; * P< 0,05)

3.3 Elk-1 und c-Fos

In 3.2 konnten mehrfach Hinweise darauf gefunden werden, dass Erk1/2 in der PMA stimulierten Signalkette ein downstream-Partner von PKC alpha ist. Erk1/2 wiederum hat eine Vielzahl von Target-Partner. Der Transkriptionsfaktor Elk-1 ist ein etablierter Kandidat (Janknecht, Ernst, Pingoud, & Nordheim, 1993), der nach Aktivierung an den c-Fos-Promotor bindet und eine Transkription dieses Proteins anregt, aber auch mittels einer speziellen DNA-Bindedömane andere Promotoren binden kann.

Um zu klären, ob dieser Transkriptionsfaktor ein Bindeglied in der PMA-induzierten Nox4-Hochregulation in Endothelzellen sein könnte, wurden siRNA Transfektionen gegen Elk-1 durchgeführt, um die Zellen dann wieder für 48h PMA auszusetzen.

In Abbildung 3.10 ist zu sehen, dass eine Elk-1 siRNA Transfektion den durch PMA hervorgerufenen Effekt zwar nicht abwenden, jedoch signifikant abschwächen kann.

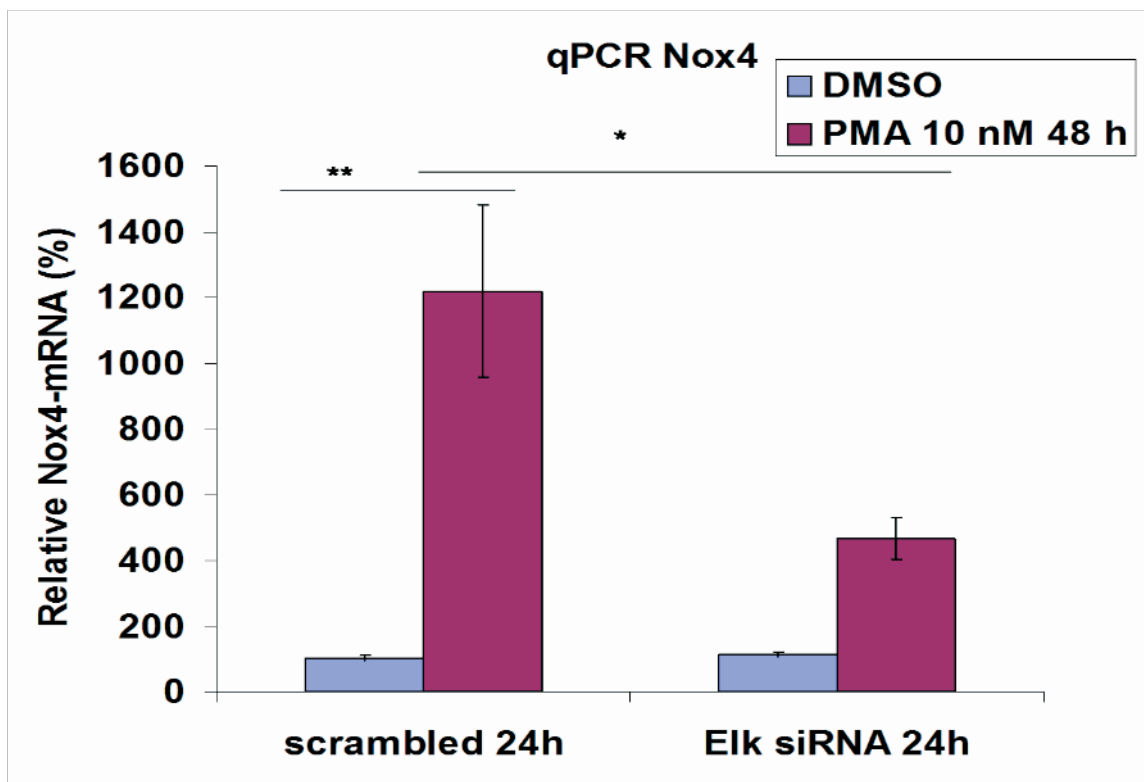


Abbildung 3.10: EA.hy 926 Zellen wurden entweder mit 50 nmol/l scrambled siRNA (links) oder mit 50 nmol/l Elk-1 siRNA (rechts) transfiziert. Nach 48h wurden die Zellen 48h lang mit DMSO oder 10 nmol/l PMA stimuliert. Die Nox4 mRNA Expression wurde mit quantitativer RT-PCR analysiert. (n=6; * P< 0,05; **P< 0,01)

Der Hinweis, dass Elk-1 eine Rolle in der PMA-induzierten Signalkette haben könnte, wurde parallel durch Luziferase-Assay Versuche gewonnen. Hierfür wurden EA.hy 926 Zellen mit pGL3-basic Plasmiden transformiert, die entweder leer waren oder drei unterschiedlich lange Nox4 Promotor-Sequenzen enthielten. 24h nach der Transformation der Zellen wurde für 48h mit 10 nmol/l PMA stimuliert. Durch die gemessenen Lichtintensitäten konnte festgestellt werden, dass das Reporter-gen am stärksten aktiviert worden war wenn das längste (2160 bp) Nox4-Promotorstück davor geschaltet war. Die mittleren Promotorstücke (672 bp) hatten zu einer tendenziell schwächeren Aktivierung geführt, wobei die Plasmide mit dem kürzesten Stück (495 bp) eine signifikante Abschwächung der Promotoraktivierung vorwies (Abbildung 3.11). Dieser Befund legt den Verdacht nahe, dass innerhalb des Differenzbruchstückes, welches das mittlere Promotor- von dem kurzen Promotorstück unterscheidet, ein wichtiges Bindeelement enthalten sein muss, das wichtig für die PMA-vermittelte Nox4-Hochregulation ist. Nach der Sequenzierung dieses 177 bp umfassenden Bruchstückes konnte eine Bindestelle für Elk-1 ausgemacht werden.

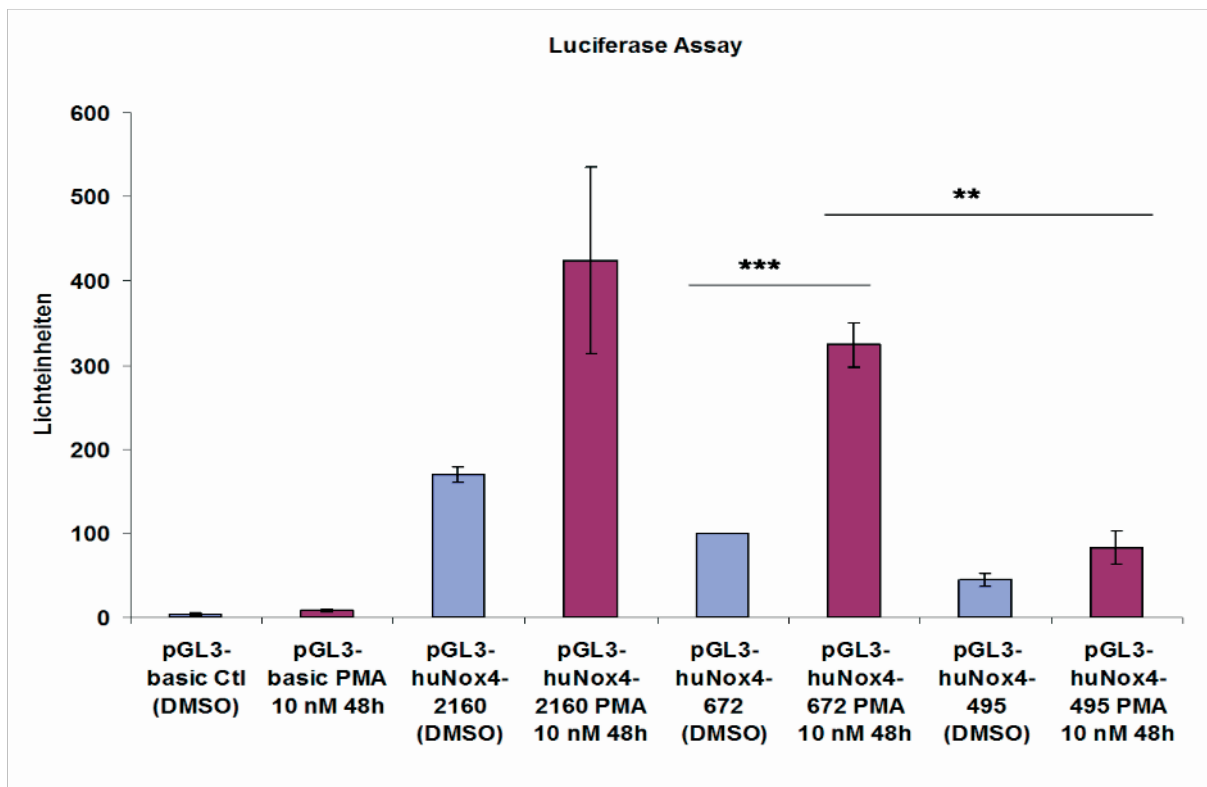


Abbildung 3.11: 24h nach der Transformation von EA.hy 926 Zellen folgte eine 48h Inkubation mit 10 nmol/l PMA. Anschließend wurde ein Luziferase-Assay durchgeführt. (n=9, **P< 0,01; *** P<0,001)

Darüber hinaus wurden EA.hy 926 Zellen für 3h, 6h, 30h und 48h mit 10 nmol/l PMA inkubiert und mittels Western Blot dahingehend untersucht, ob der Phorbolester den Proteingehalt von Elk-1 veränderte. Aus Abbildung 3.12 wird ersichtlich, dass alle PMA Inkubationen (3h, 6h, 30h und 48h) zu einer deutlichen Erhöhung des Elk-1 Proteingehaltes geführt hatten.

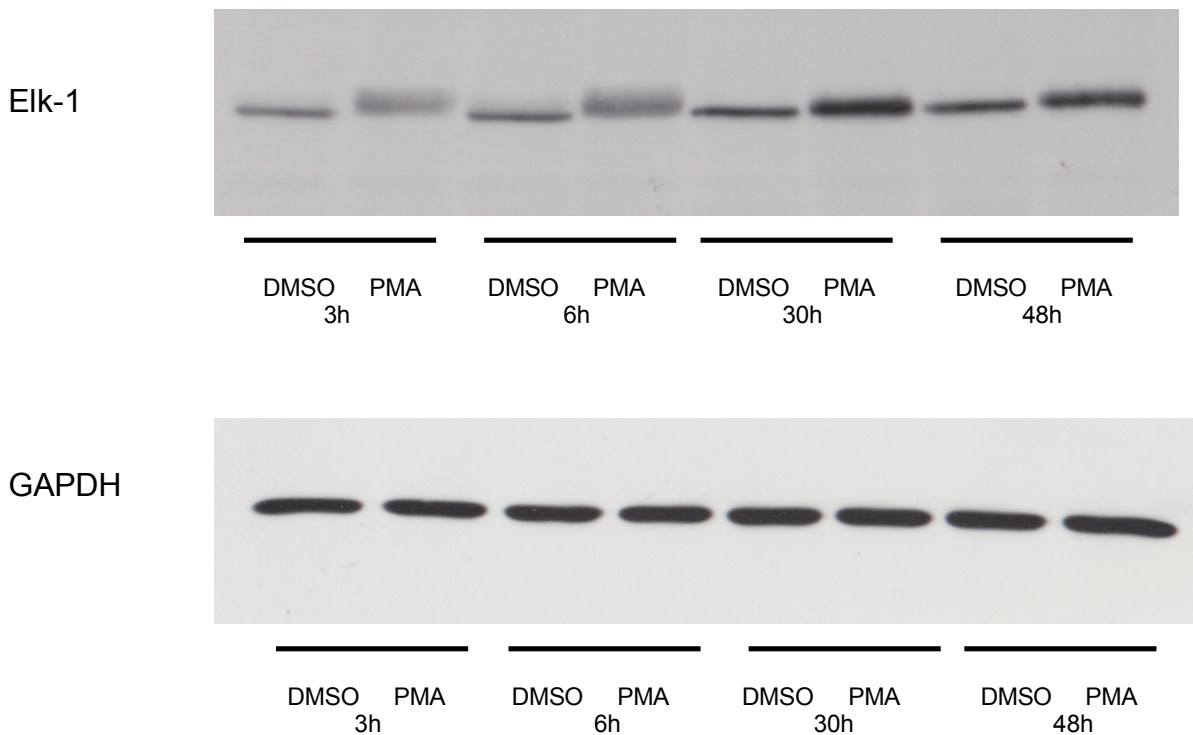


Abbildung 3.12: EA.hy 926 Zellen wurden jeweils für 3h, 6h, 30h und 48h mit 10 nmol/l PMA ohne Inhibitor inkubiert. Die Proben (35 µg) wurden mittels eines 10 %-igen SDS-Polyacryl-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und einer Western Blot-Analyse unterzogen. Die hier gezeigten Bilder sind repräsentativ für n = 3 Experimente.

Der Promotor des Transkriptionsfaktors c-Fos beinhaltet Bindeelemente für Elk-1 und in der Literatur wird beschrieben, dass eine Elk-1 Aktivierung stets zu einer Synthese von c-Fos führt (Janknecht et al., 1993).

Da in 3.3 mehrere Hinweise auf eine direkte Rolle von Elk-1 in der PMA-induzierten Nox4-Hochregulation gefunden worden waren, wurde im Folgenden untersucht, ob c-Fos relevant für die untersuchte Signalkaskade ist.

Hierzu wurden EA.hy 926 Zellen mit 50 nmol/l siRNA gegen c-Fos transfiziert und 24h später für 48h mit 10 nmol/l PMA inkubiert. In Abbildung 3.13 wird deutlich, dass es zu einer signifikanten Reduktion des PMA vermittelten Effektes auf die Nox4

Expression kommt wenn zuvor eine siRNA Transfektion gegen c-Fos stattgefunden hatte. Abbildung 3.14 zeigt die Funktionalität der c-Fos siRNA, die in diesem Fall ausschließlich mittels qPCR Analysen getestet worden war.

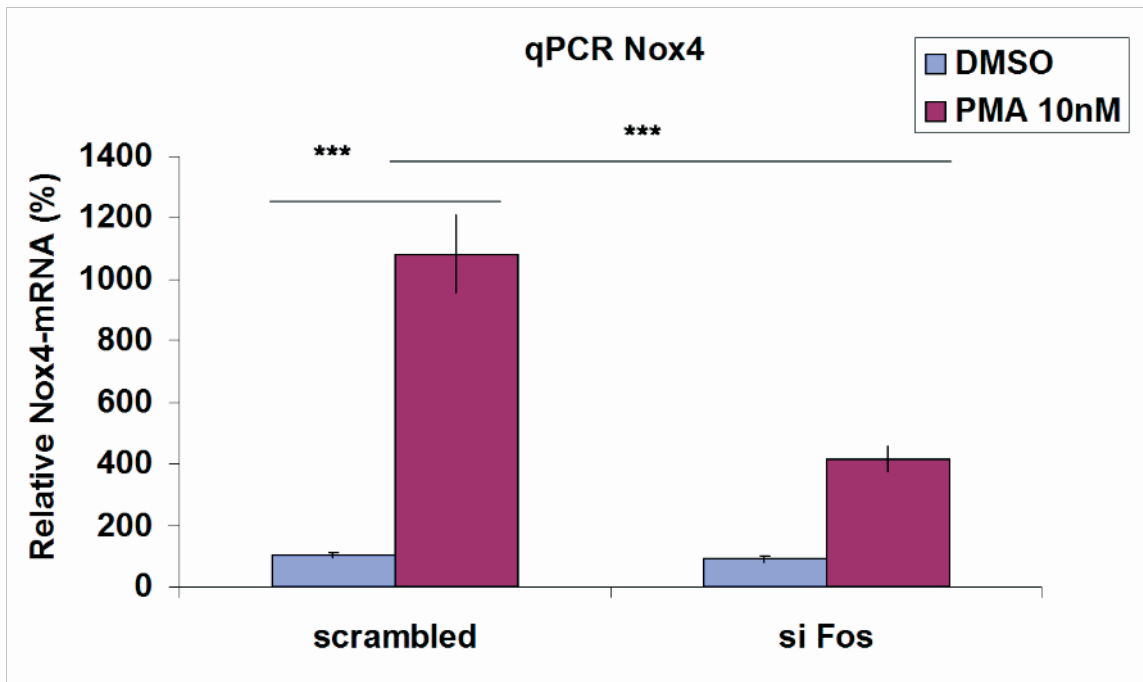


Abbildung 3.13: EA.hy 926 Zellen wurden entweder mit 50 nmol/l scrambled siRNA (links) oder mit 50 nmol/l c-Fos siRNA (rechts) transfiziert. Nach 24h wurden die Zellen für 48h mit DMSO oder 10 nmol/l PMA stimuliert. Die Nox4 mRNA Expression wurde mit quantitativer RT-PCR analysiert. (n=6; ***P< 0,001)

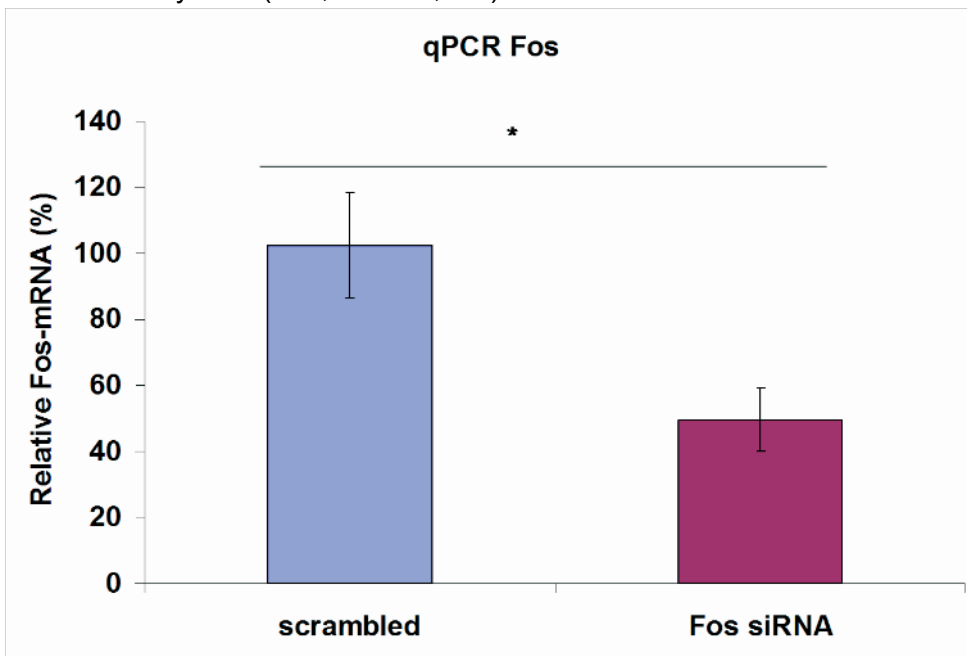


Abbildung 3.14: EA.hy 926 Zellen wurden entweder mit 50 nmol/l scrambled siRNA (links) oder mit 50 nmol/l c-Fos siRNA (rechts) transfiziert. Nach 72h wurde mittels quantitativer PCR der c-Fos Knock-down gemessen. (n=6; * P< 0,05)

Da mit c-Fos siRNA ein signifikanter Effekt auf die Nox4 Hochregulation nachgewiesen werden konnte, wurden weitere Western Blot Untersuchungen durchgeführt. Hierzu wurden EA.hy 926 Zellen für 3h, 6h, 30h und 48h mit PMA inkubiert, um anschließend Protein-Lysate herzustellen. Es zeigte sich, dass der verwendete Antikörper nicht mit Gesamtprotein-Lysaten sondern nur mit Lysate von Kernproteinen funktionierte. Aus Abbildung 3.15 wird ersichtlich, dass 10 nmol/l PMA tatsächlich zu einer erhöhten Proteinkonzentration von c-Fos im Zellkern führt, allerdings war diese Erhöhung transient. Bereits 3h später nimmt die c-Fos-Induktion deutlich ab und nach 30h PMA und 48h PMA sind mittels Western Blot nur noch Spuren von c-Fos nachweisbar.

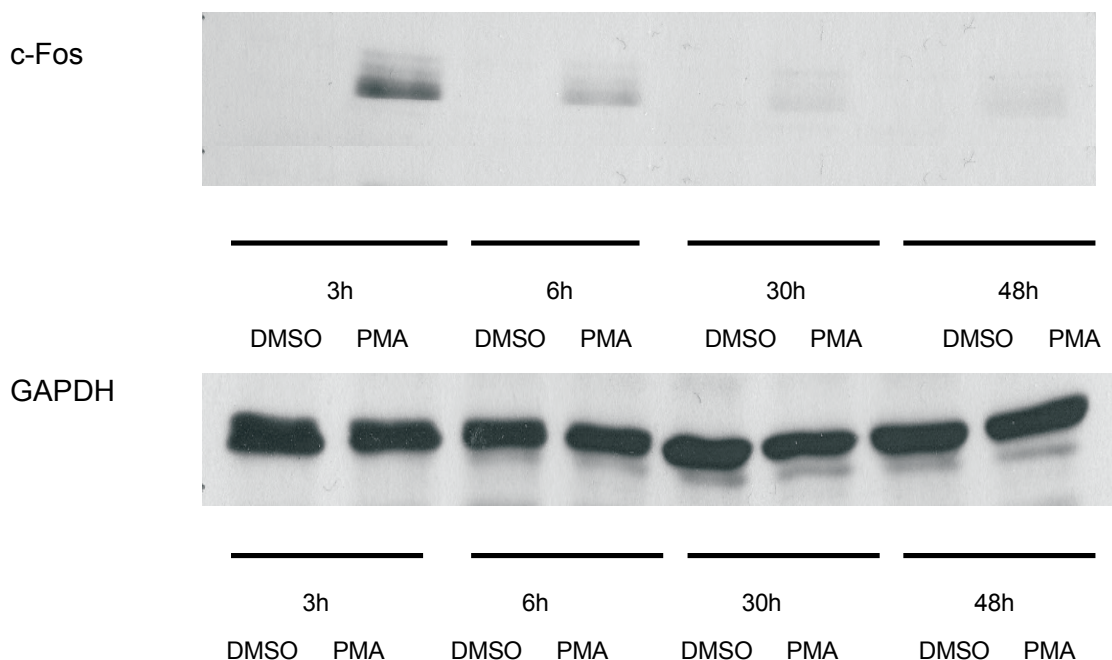


Abbildung 3.15: EA.hy 926 Zellen wurden jeweils für 3h, 6h, 30h und 48h mit 10 nmol/l PMA ohne Inhibitor inkubiert. Die Kernlysate-Proben (35 µg) wurden mittels eines 10 %-igen SDS-Polyacryl-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und einer Western Blot-Analyse unterzogen. Die hier gezeigte Bilder sind repräsentativ für n = 3 Experimente.

Der Western Blot in Abbildung 3.15 zeigt, dass PMA zu einer Zunahme des c-Fos Proteins im Kern der EA.hy 926 Zellen führt. Um zu verifizieren, ob dies über die Signalkette Erk1/2 vermittelt wird, wurden die Zellen für 3h mit 10 nmol/l PMA mit und ohne Erk1/2 Inhibitor PD 98059 inkubiert. Anschließend wurden aus den behandelten Zellen erneut zytoplasmatische und Kernproteine extrahiert, um mittels Western Blot Veränderungen der c-Fos-Proteinkonzentrationen sichtbar zu machen.

In Abbildung 3.16 ist auf der linken Seite (Banden 1 bis 4) die zytoplasmatische Fraktion, auf der rechten Seite die Kernfraktion (Banden 5 bis 8) dargestellt. Es ist gut zu erkennen, dass c-Fos nicht im Cytoplasma vorkommt (siehe Bande 1 bis 4). Der Vergleich der Banden 5 und 6 zeigt erneut, dass c-Fos im Kern zunimmt, wenn die Zellen über 3h mit 10 nmol/l PMA behandelt werden. Der Vergleich der Banden 6 und 8 (3h PMA ohne Inhibitor, 3h mit Inhibitor) belegt, dass diese c-Fos-Zunahme über Erk1/2 vermittelt wird, da die Intensität von Bande 8 wesentlich schwächer ausgeprägt ist als Bande 6.

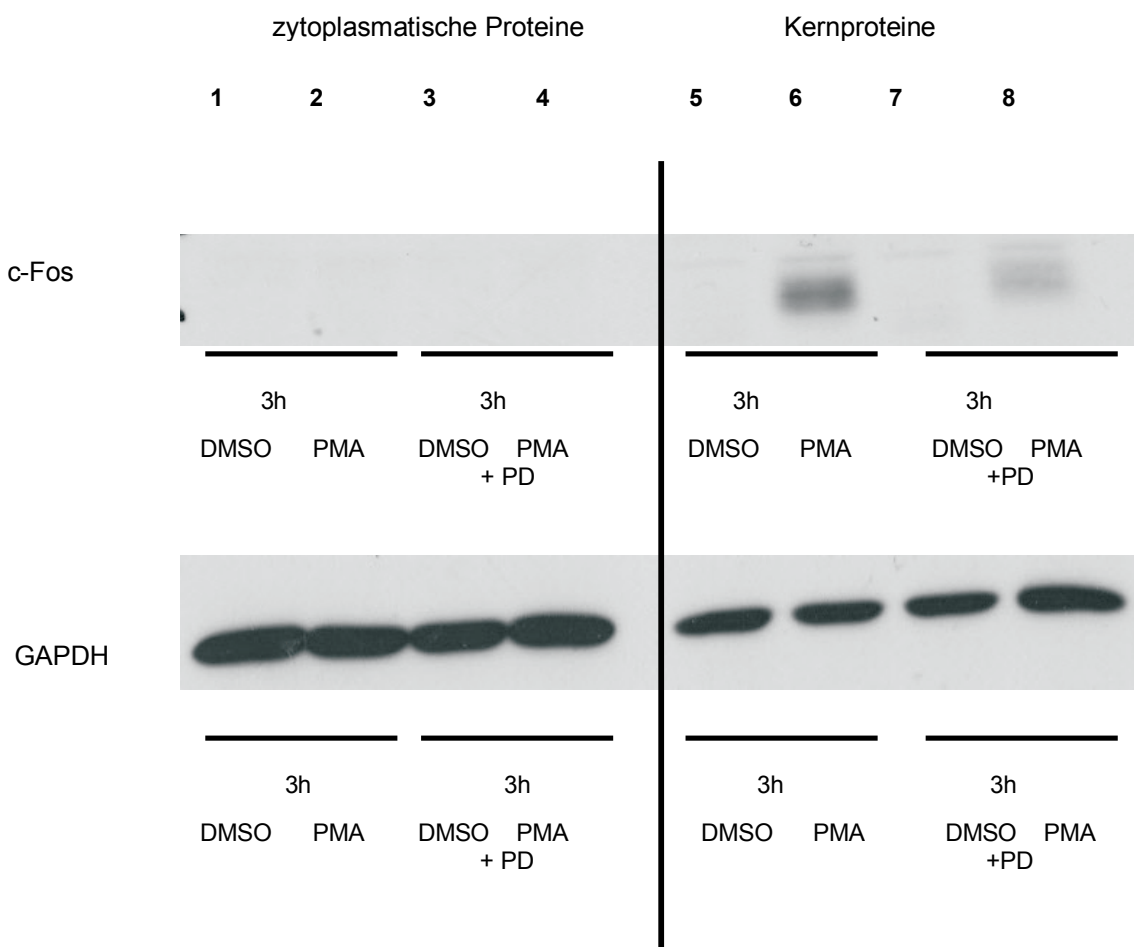


Abbildung 3.16: EA.hy 926 Zellen wurden für 3h mit DMSO oder 10 nmol/l PMA inkubiert. Der Erk1/2 Inhibitor PD 98059 wurde entweder zu Beginn des Versuches zugefügt (Banden 3, 4 und 7, 8) oder durch ein gleiches Volumen DMSO ersetzt (Banden 1, 2 und 5, 6). Vor Versuchsbeginn erfolgte bei der Inhibitorgruppe eine 30-minütige Vorinkubation mit 10 µmol/l PD 98059, die Kontrollgruppen wurden ersatzweise mit dem gleichen Volumen DMSO vorbehandelt. Die Proteine wurden in eine zytoplasmatische und eine Kernfraktion getrennt. Die Proben wurden mittels eines 10 %-igen SDS-Polyacryl-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und einer Western Blot-Analyse unterzogen. Die hier gezeigte Bilder sind repräsentativ für n = 3 Experimente.

Um herauszufinden, ob die c-Fos-Zunahme des Weiteren über Elk-1 vermittelt wird, wurde 24h nach einer Elk-1 siRNA Transfektion eine 3-stündige PMA Inkubation durchgeführt. Der Zeitrahmen von 3h wurde gewählt, da zuvor gezeigt werden konnte, dass zu diesem Zeitpunkt die größte c-Fos Zunahme zu erwarten war. Nach Extraktion der Kernproteine wurden mittels Western Blot Veränderungen der c-Fos-Proteinkonzentrationen sichtbar gemacht. Der Vergleich der Banden 1, 2 und 3, 4 des mittleren Bildes von Abbildung 3.17 zeigt, dass bereits 27h nach der siRNA Transfektion ein vollständiger Knock-down von Elk-1 stattgefunden hatte. In der Kontrollgruppe hatte die PMA Inkubation wieder zu einer c-Fos-Zunahme geführt, die allerdings bei der Elk-1 siRNA Gruppe deutlich schwächer ausgefallen war (oberes Bild, Vergleich von Bande 2 mit Bande 4). Damit war belegt, dass Elk-1 in die PMA-vermittelte c-Fos-Zunahme eingeschaltet ist.

~ Ergebnisse ~

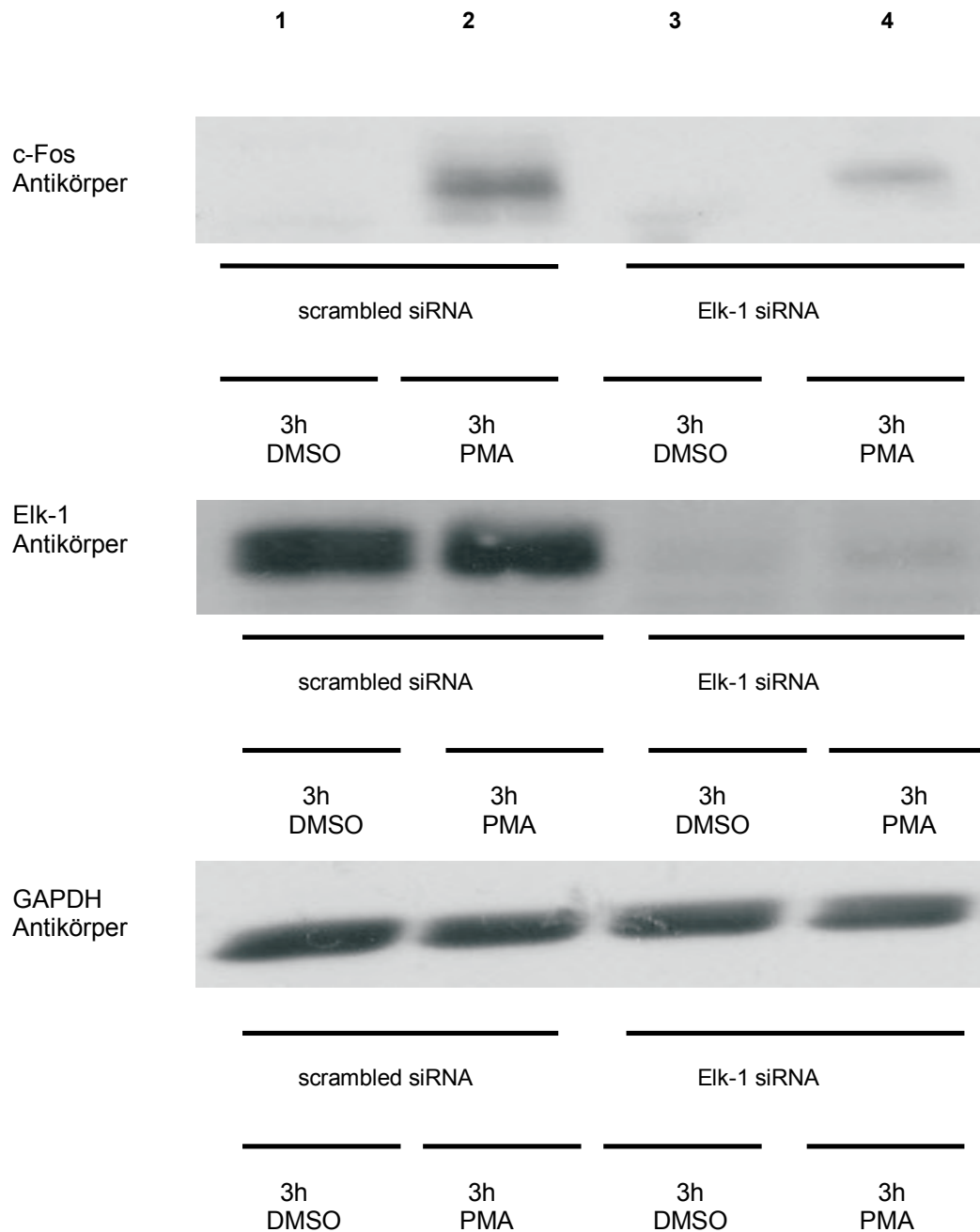


Abbildung 3.17: EA.hy 926 Zellen wurden entweder mit 50 nmol/l scrambled siRNA (links) oder mit 50 nmol/l Elk-1 siRNA (rechts) transfiziert. Nach 24h wurden die Zellen für 3h mit DMSO oder 10 nmol/l PMA stimuliert. Die Proteine wurden in eine zytoplasmatische und eine Kernfraktion getrennt und mittels eines 10 %-igen SDS-Polyacryl-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und einer Western Blot-Analyse unterzogen. Die hier gezeigte Bilder sind repräsentativ für n = 3 Experimente.

3.4 c-Jun

Da dem Transkriptionsfaktor c-Fos eine Beteiligung an der PMA vermittelten Nox4 Hochregulation nachgewiesen werden konnte, wurde nun auch das Protein c-Jun interessant, da beide Partner eines wichtigen Komplexes sind. Die Proteine c-Fos und c-Jun können sich zu einem so genannten AP-1 Komplex vereinen und nach Bindung an spezifischen Bindeelementen die Transkription zahlreicher Proteine anregen. Für die Klärung einer möglichen Beteiligung von c-Jun an der PMA-initiierten Signalkette oder einer Korrelation von c-Fos und c-Jun wurde zunächst c-Jun mittels siRNA ausgeschaltet, um zu untersuchen, ob nach einer 48-stündigen PMA Inkubation eine Veränderung der Nox4 Expression herbei geführt werden konnte.

In Abbildung 3.18 (oben) wird dargestellt, dass der PMA-Effekt signifikant vermindert werden kann, wenn die EA.hy 926 Zellen 24h zuvor mit c-Jun siRNA transfiziert worden waren. Allerdings muss bei diesem Resultat beachtet werden, dass unter diesen Bedingungen auch die basale Nox4 Expression verringert wurde (Abbildung 3.18, unten). Der Vergleich der Quotienten zwischen DMSO und PMA behandelten Proben ergab bei der scrambled siRNA Gruppe eine 9,7-fache Steigerung und bei der c-Jun siRNA Gruppe eine 8,3-fache Erhöhung der Nox4 mRNA Expression. Demzufolge war zwar eine Verminderung der Nox4 Hochregulation eingetreten, allerdings war diese nur von geringem Ausmaß.

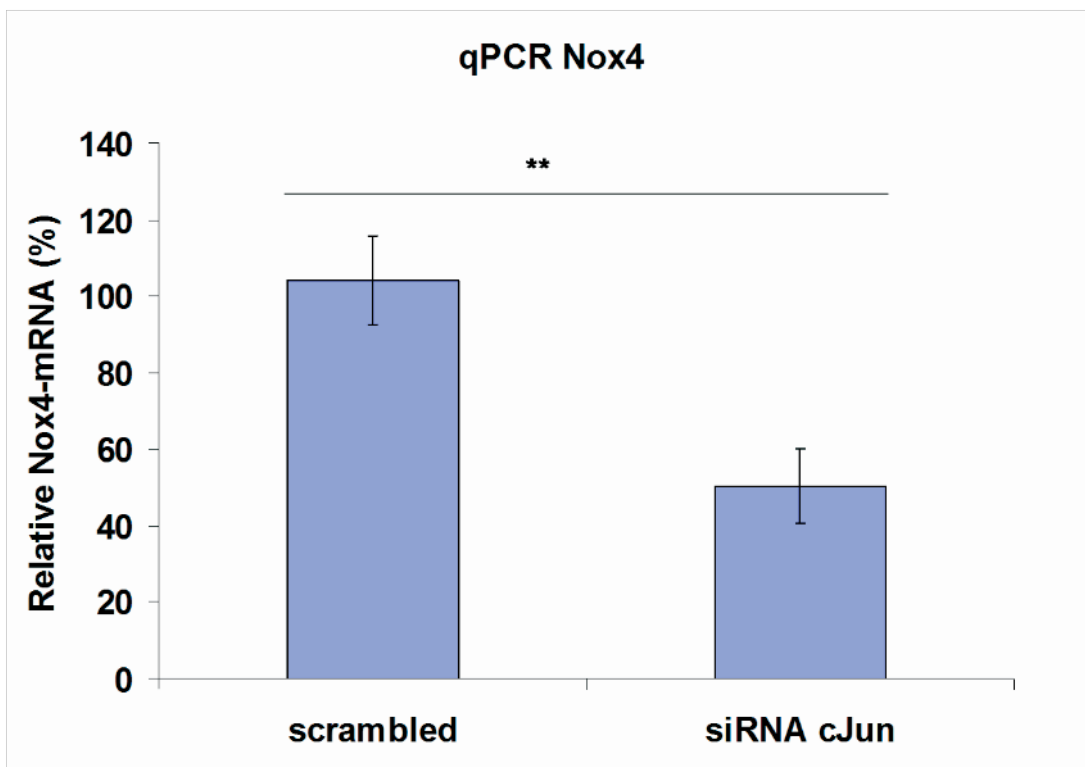
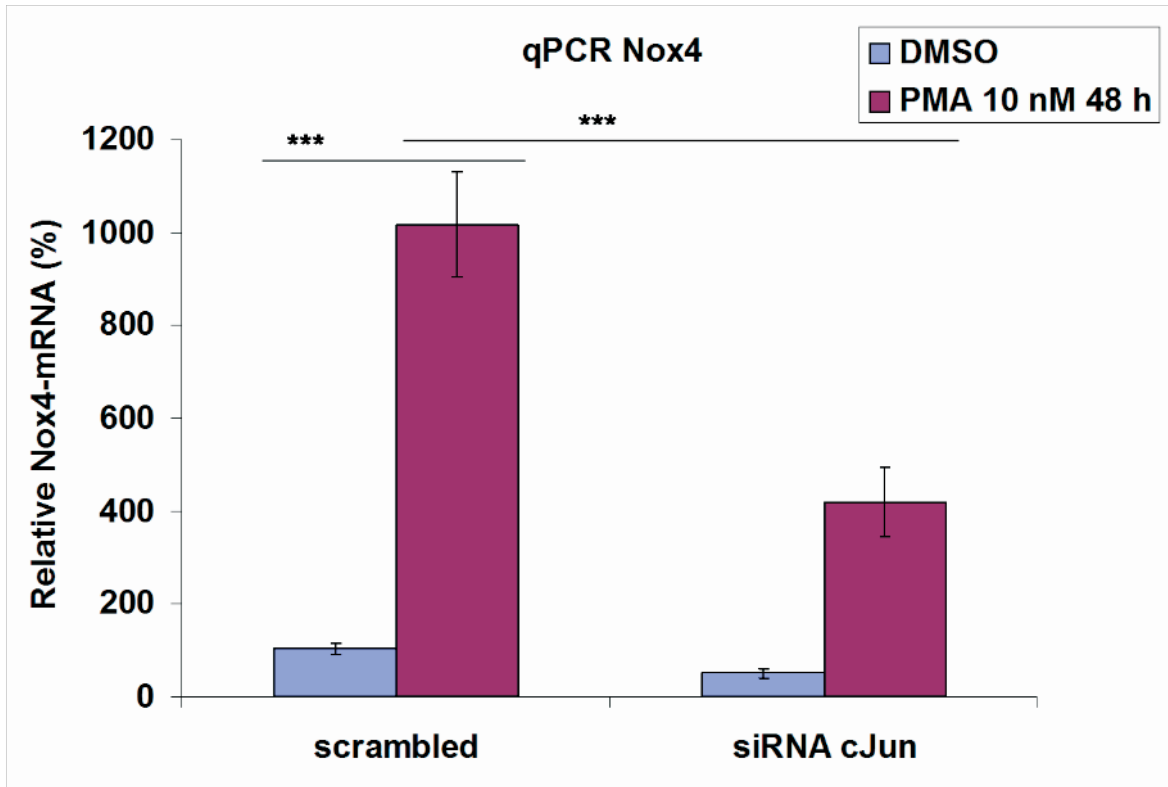


Abbildung 3.18: EA.hy 926 Zellen wurden entweder mit 50 nmol/l scrambled siRNA (links) oder mit 50 nmol/l c-Jun siRNA (rechts) transfiziert. Nach 24h wurden die Zellen 48h lang mit DMSO oder 10 nmol/l PMA stimuliert (siehe oben). Da durch die Transfektion auch Auswirkungen auf die basale Nox4 mRNA Expression aufgetreten waren, wurden diese in einem eigenen Diagramm dargestellt (siehe unten). Die Nox4 mRNA Expression wurde mit quantitativer RT-PCR analysiert. (n=3; **P< 0,01; ***P< 0,001)

Für den Western Blot in Abbildung 3.19 wurden EA.hy 926 Zellen für 3h, 6h, 30h und 48h mit 10 nmol/l PMA inkubiert. Mit diesem Experiment sollte untersucht werden, ob PMA auch Einfluss auf die Proteinbiosynthese von c-Jun hat und ob zeitliche Korrelationen mit dem potentiellen AP-1 Partner c-Fos zu erkennen sind.

Im Ergebnis zeigte sich, dass c-Jun stets in den DMSO behandelten Kontrollproben nachweisbar war und dass PMA in allen vier Inkubationsintervallen zu einer deutlichen Erhöhung der c-Jun-Konzentration geführt hatte.

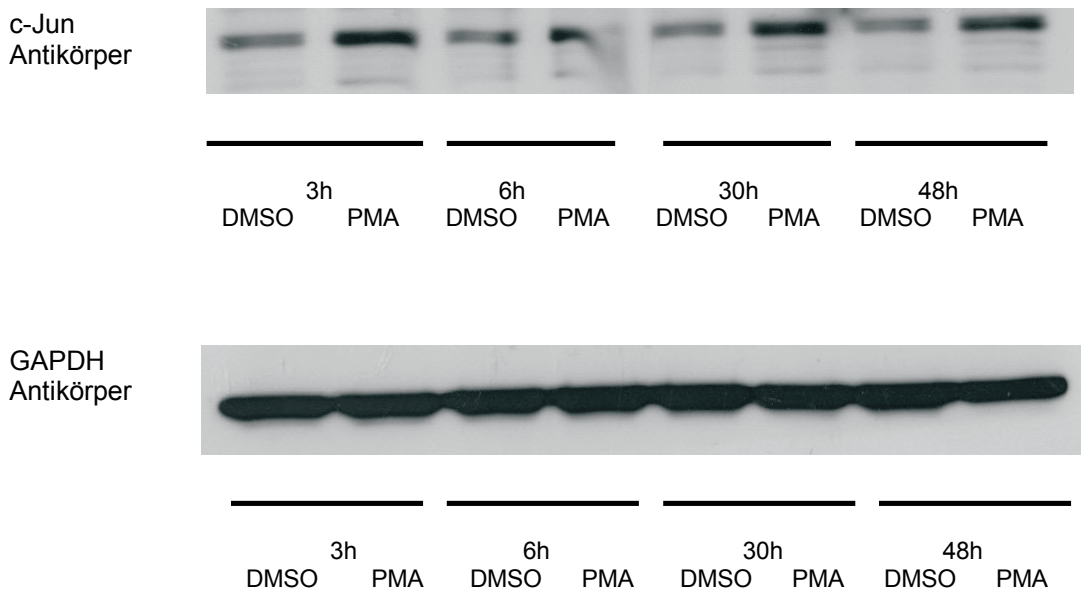


Abbildung 3.19: EA.hy 926 Zellen wurden jeweils für 3h, 6h, 30h und 48h mit 10 nmol/l PMA ohne Inhibitor inkubiert. Die Gesamtprotein-Lysate (35 µg) wurden mittels eines 10 %-igen SDS-Polyacryl-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und einer Western Blot-Analyse unterzogen. Die hier gezeigte Bilder sind repräsentativ für n = 3 Experimente.

Zusätzlich wurde die längste Inkubationszeit (48h) ausgewählt und EA.hy 926 Zellen abermals mit 10 nmol/l PMA in An- und Abwesenheit von 1 µmol/l Gö 6983 inkubiert. Dadurch sollte geklärt werden, ob die PMA-initiierte c-Jun-Zunahme über Proteinkinase C vermittelt wird.

In Abbildung 3.20 wird die PMA-Wirkung auf c-Jun deutlich: im Vergleich zu den DMSO-Kontrollen kann eine massive Zunahme der c-Jun-Konzentration abgelesen werden. Diese Proteinzunahme kann abgewendet werden, wenn die Zellen zusätzlich mit dem PKC-Inhibitor Gö behandelt werden.

~ Ergebnisse ~

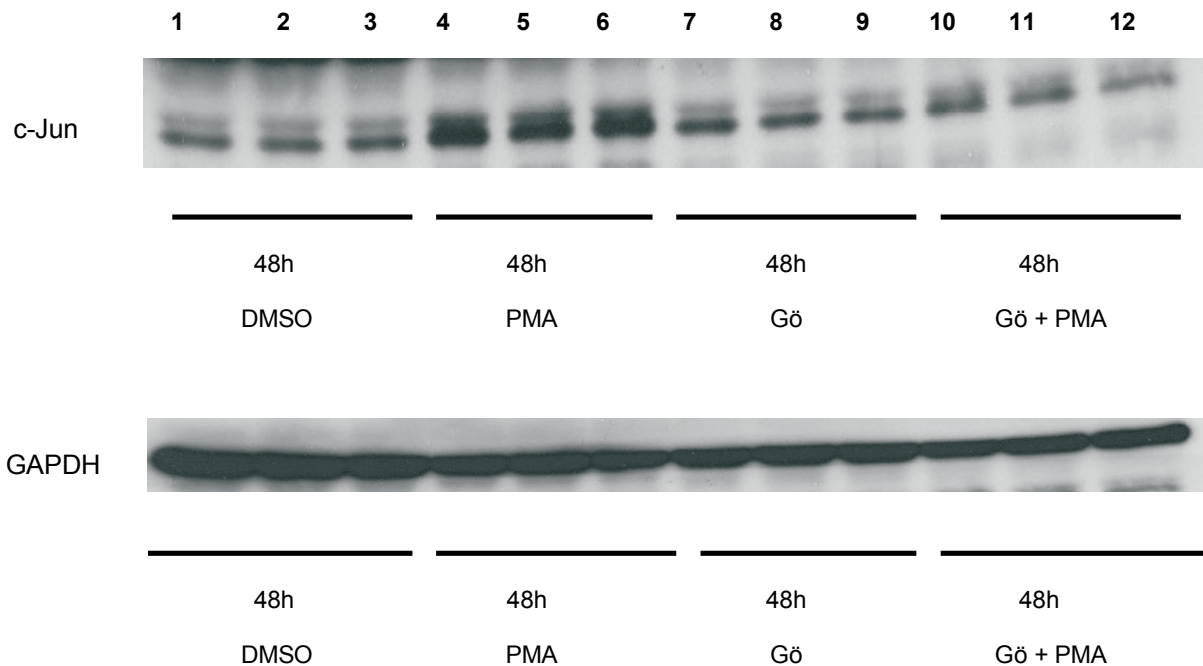


Abbildung 3.20: EA.hy 926 Zellen wurden für 48h mit DMSO oder 10 nmol/l PMA inkubiert. Der PKC Inhibitor Gö 6983 wurde entweder zu Beginn des Versuches zugefügt (Banden 7 bis 12) oder durch ein gleiches Volumen DMSO ersetzt (Banden 1 bis 6). Vor Versuchsbeginn erfolgte bei der Inhibitorgruppe eine 30-minütige Vorinkubation mit 1 μ mol/l Gö 6983, die Kontrollgruppen wurden ersatzweise mit dem gleichen Volumen DMSO vorbehandelt. Die Gesamtprotein-Lysate (35 μ g) wurden mittels eines 10 %-igen SDS-Polyacryl-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und einer Western Blot-Analyse unterzogen. Die hier gezeigte Bilder sind repräsentativ für n = 3 Experimente.

3.4.1 Die Relevanz von Fos/Jun-AP-1 für die PMA-vermittelte Nox4-Hochregulation?

Die vorangegangenen Versuche konnten zeigen, dass c-Fos für die PMA initiierte Nox4 Hochregulation eine wichtige Rolle spielt. Wie bereits oben erwähnt, kann dieses Protein mit c-Jun einen so genannten AP-1 Komplex bilden. Auch c-Jun wird durch PMA auf Proteinebene vermehrt und ein Knock-down via siRNA führt zu einer Reduktion der PMA vermittelten Nox4 Hochregulation. Jedoch fällt diese Reduktion gering aus, wenn bei einem Knock-down auch der starke basale Rückgang von Nox4 beachtet wird.

Um klären zu können, ob der Fos/Jun-AP-1 Komplex eine Funktion in der PMA initiierten Signalkette ausübt, wurden EA.hy 926 Zellen in An- und Abwesenheit des AP-1 Inhibitors Sr 11302 (Tocris) 48h lang mit 10 nmol/l PMA inkubiert.

Überraschenderweise wurde durch den Einsatz von Sr 11302, das eine Bindung zwischen Jun und Fos blockiert, der PMA-Effekt nicht gehemmt. Außerdem bewirkte diese Substanz eine konzentrationsabhängige Steigerung der basalen Nox4 mRNA Expression (Abbildung 3.21).

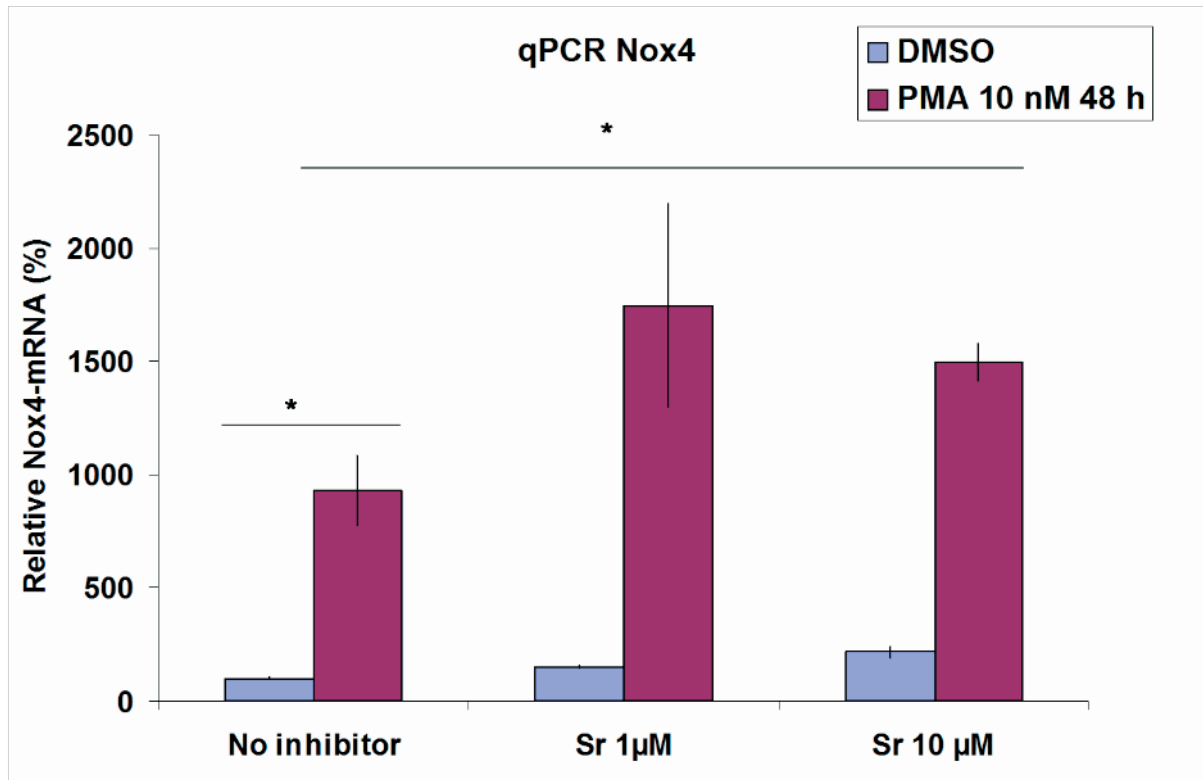


Abbildung 3.21: EA.hy 926 Zellen wurden für 48h mit 10 nmol/l PMA behandelt. Der AP-1 Inhibitor Sr wurde entweder zu Beginn des Versuches hinzu gegeben (1 µmol/l Mitte und 10 µmol/l rechts) oder durch ein gleiches Volumen DMSO ersetzt (links). Die Zellen der Inhibitorgruppen wurde vor PMA-Zugabe 30min alleine mit 1 µmol/l, bzw. 10 µmol/l Sr 11302 vorbehandelt. Die Nox4 mRNA Expression wurde mit quantitativer RT-PCR analysiert. (n = 6; * P < 0,05)

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl ein knock-down von c-Fos als auch ein knock-down von c-Jun zu einer Reduzierung der PMA vermittelten Nox4 Hochregulation geführt hatte, wobei c-Fos einen stärkeren Einfluss zu haben schien. Nun stellte sich die Frage, ob eine 48 stündige PMA Inkubation überhaupt eine Wirkung zeigen kann, wenn zuvor beide Proteine gleichzeitig ausgeschaltet werden. Hierfür wurden EA.hy 926 Zellen mit c-Fos und c-Jun siRNA co-transfiziert und 48h später mit PMA inkubiert.

Oberflächlich betrachtet wurde die PMA vermittelte Nox4 Hochregulation massiv reduziert. Diese Aussage kann jedoch nicht gestützt werden, wenn man auch die Reduktion der basalen Nox4 mRNA Expression der siRNA behandelten Proben berücksichtigt. Demnach wurde der PMA-Effekt durch die co-Transfektion lediglich um 47% reduziert (Abbildung 3.22). Dies entspricht der Größenordnung, die alleine durch c-Fos siRNA erreicht werden konnte. Demzufolge wurde durch das gleichzeitige Ausschalten von c-Jun und c-Fos keine zusätzliche Blockierung der PMA vermittelten Nox4 Hochregulation erreicht.

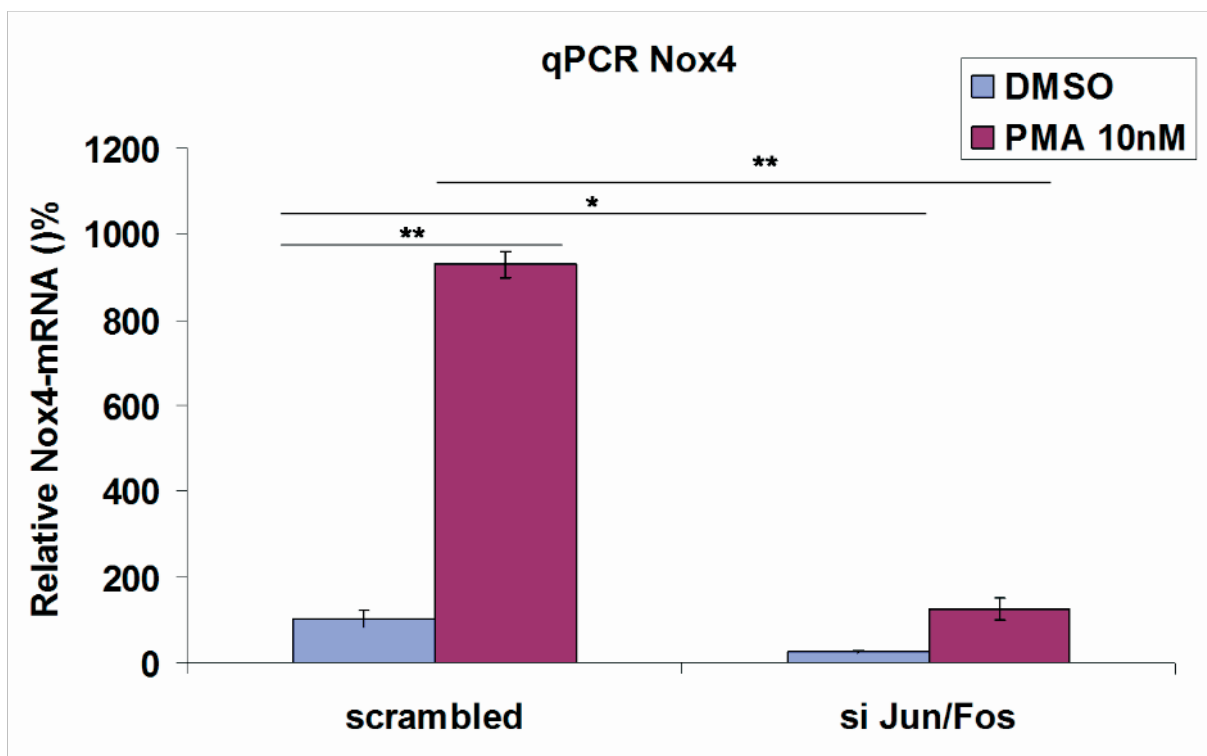


Abbildung 3.22: EA.hy 926 Zellen wurden entweder mit 100 nmol/l scrambled siRNA (links) oder mit 50 nmol/l c-Fos siRNA und 50 nmol/l c-Jun siRNA (rechts) transfiziert, bzw.co-transfiziert. Nach 48h wurden die Zellen für 48h mit DMSO oder 10 nmol/l PMA stimuliert. Die Nox4 mRNA Expression wurde mit quantitativer RT-PCR analysiert. (n=3; * P< 0,05; **P< 0,01)

3.5 Langzeitwirkung von PMA auf die PKC Isoformen alpha und delta

In 3.3 wurde beschrieben, dass eine PMA-Inkubation zu einer Phosphorylierung von Erk1/2 führt. Überraschend war der Befund, dass dies selbst nach langen Einwirkzeiten (30h und 48h) der Fall war. Darüber hinaus konnte mittels Verwendung des Inhibitors PD 98059 gezeigt werden, dass dieser aktivierte Zustand stets wichtig ist, damit ein ungehemmter PMA-Effekt auf die Nox4 Expression nach 48h eintreten kann. Die dauerhafte Erk1/2 Phosphorylierung war demnach der Ansatz, um weitere Proteine zu finden, die an der Signaltransduktion beteiligt sind. In Abbildung 3.3 konnte gezeigt werden, dass nach 48h PMA Inkubation kein PKC alpha im Cytoplasma vorliegt. In der Literatur gibt es Hinweise, dass PMA ein PKC-Aktivator ist, der nach 24h Dauerinkubation die Rolle eines Inhibitors annimmt. Um dies für PKC alpha anschaulich zu machen, wurden EA.hy 926 Zellen mit 10 nmol/l PMA für die Dauer von 3h, 6h, 30h und 48h behandelt, um anschließend Veränderungen dieser Kinase mittels Western Blot sichtbar zu machen. Gleichzeitig wurde auch die Isoform delta untersucht, da über diese Kinase bekannt ist, dass diese eine Verstärkung der Erk1/2 Phosphorylierung vermitteln kann (Y.-J. Lee et al., 2002).

Abbildung 3.23 zeigt, dass die verschiedenen PMA-Inkubationen unterschiedliche Konsequenzen für den Proteingehalt von PKC alpha und delta haben: PKC alpha wird der Proteolyse zugeführt. Dieser Effekt kann schon nach der kürzesten Inkubationsdauer von 3h tendenziell beobachtet werden. Nach 30h PMA sind nur noch Spuren dieses Proteins zu finden, während eine 48-stündige PMA-Inkubation zu einer nahezu vollständigen Entfernung von PKC alpha führt.

Die Isoform delta hingegen wird nach gleicher Behandlung nicht abgebaut, jedoch ist bei allen Inkubationsperioden eine Veränderung des Proteingewichtes zu beobachten. Das heißt, dass die PMA behandelten Proben sich deutlich von ihren jeweiligen DMSO behandelten Kontrollbanden absetzen.

~ Ergebnisse ~

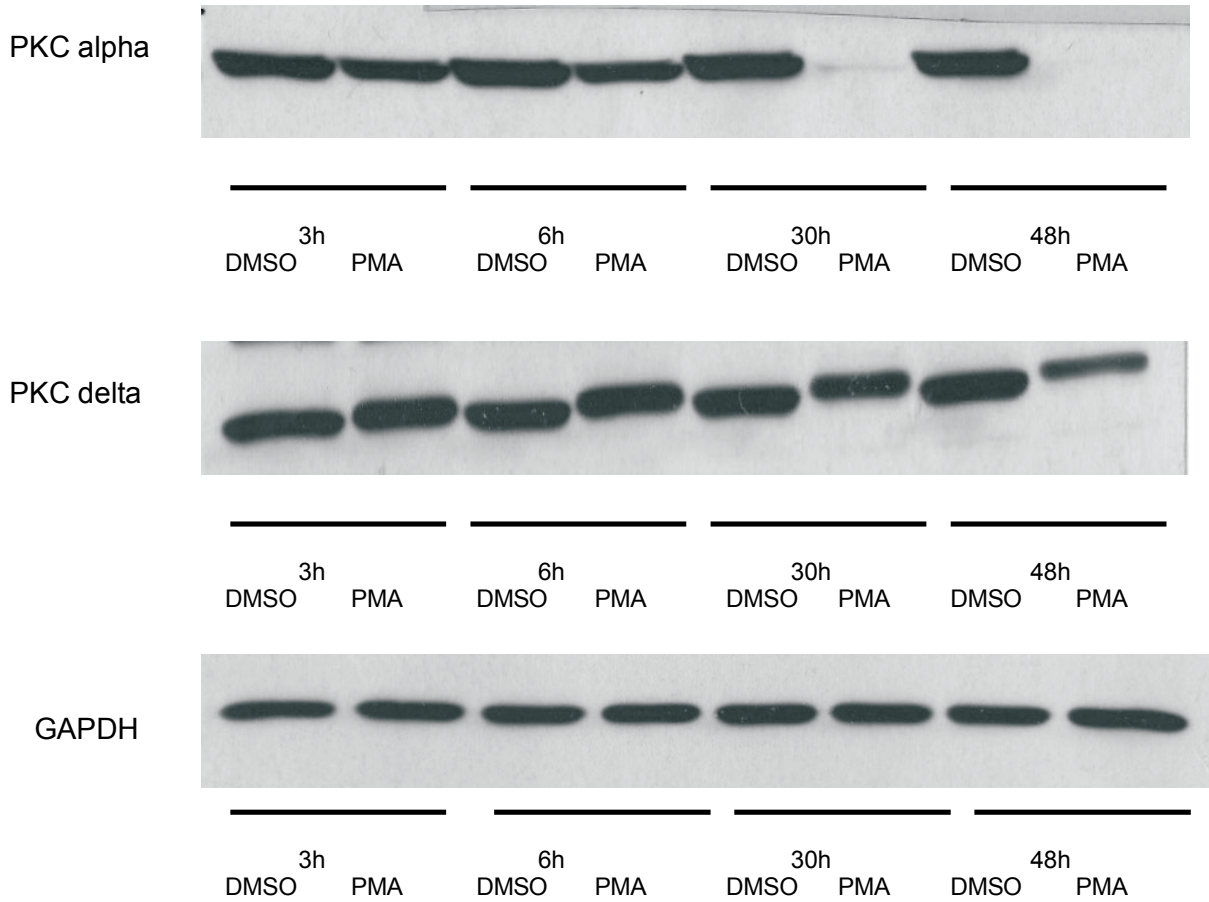


Abbildung 3.23: EA.hy 926 Zellen wurden jeweils für 3h, 6h, 30h und 48h mit 10 nmol/l PMA ohne Inhibitor inkubiert. Die Gesamtprotein-Lysate (35 µg) wurden mittels eines 10 %-igen SDS-Polyacryl-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und einer Western Blot-Analyse unterzogen. Die hier gezeigte Bilder sind repräsentativ für n = 3 Experimente.

3.6 Die Involvierung von PKC delta

Nach den letzten Ergebnissen sollte PKC delta nun eingehender untersucht werden. Unterschiedlich lange PMA-Inkubationen führten nicht zu einem proteolytischen Abbau, sondern bewirkten eine Erhöhung des Proteingewichtes. Um welche Modifikation es sich dabei handelte war spekulativ, dennoch ist bekannt, dass PKC delta über eine Vielzahl von Phosphorylierungsstellen verfügt, die Einfluss auf die Aktivität des Proteins haben. Um der Frage nachzugehen, ob diese Isoform eine Rolle in der PMA-induzierten Nox4 Hochregulation spielen könnte, wurde zunächst der PKC delta Inhibitor Rottlerin eingesetzt. Hierfür wurden die Zellen 30 min mit diesem Inhibitor (30 $\mu\text{mol/l}$) vorinkubiert, dann folgte eine 48 stündige PMA-Inkubation (10 nmol/l) mit und ohne Rottlerin. Es zeigte sich, dass Rottlerin einen toxischen Einfluss auf die EA.hy 926 Zellen hatte, so dass nach Ablauf der 48h alle Zellen abgetötet worden waren.

Deshalb wurde das Experiment unter anderen Bedingungen wiederholt: die EA.hy 926 Zellen wurden ungehemmt mit 10 nmol/l PMA inkubiert, um 24h später Rottlerin (30 $\mu\text{mol/l}$) direkt zu der Inhibitorgruppe zu pipettieren. Nach weiteren 24h wurde das Experiment abgebrochen und es folgte eine Analyse der Nox4-Expression mittel quantitativer RT-PCR.

In Abbildung 3.24 wird gezeigt, dass die Zugabe von Rottlerin zu einer leichten basalen Expressionszunahme von Nox4 geführt hatte, aber der PMA-Effekt signifikant abgeschwächt worden war.

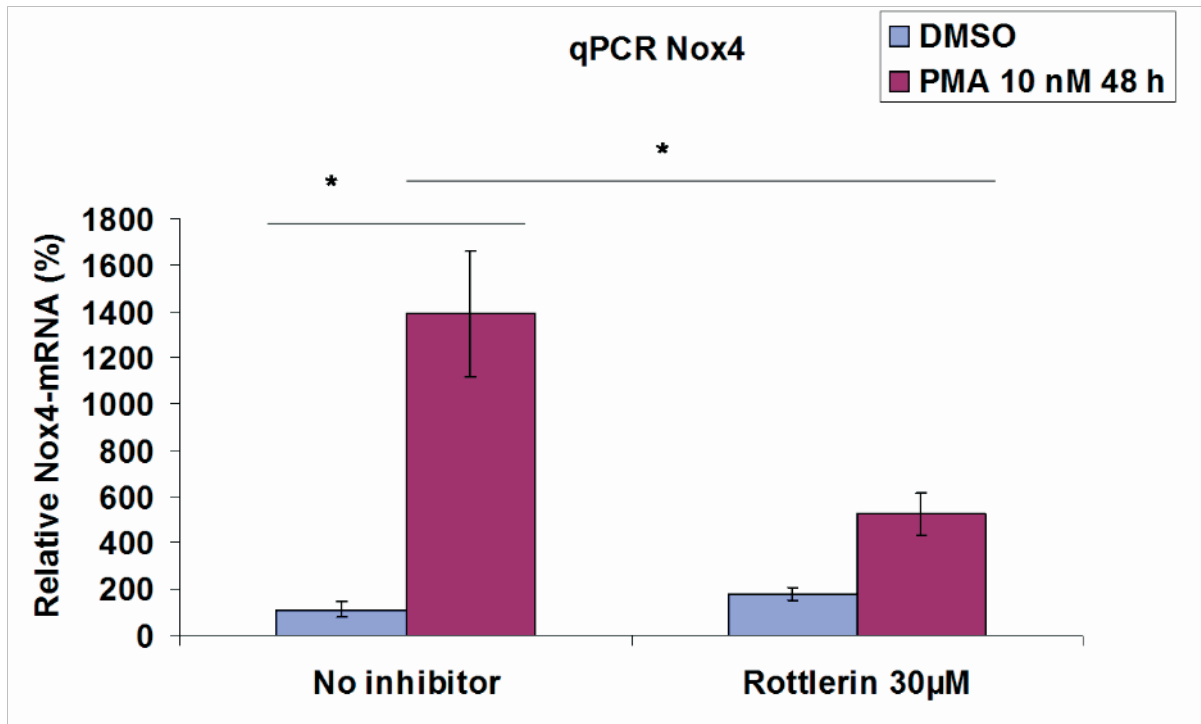


Abbildung 3.24: EA.hy 926 Zellen wurden für 48h mit 10 nmol/l PMA inkubiert. 24h nach Versuchsbeginn wurde DMSO (links), bzw. 30 µmol/l Rottlerin (rechts) hinzugefügt ohne das Medium zu wechseln. Nach weiteren 24h Inkubation wurde das Experiment beendet. Die Nox4 mRNA Expression wurde mit quantitativer RT-PCR analysiert. (n=3; * P< 0,05)

Das Ergebnis aus Abbildung 3.24 ist deshalb interessant, da daraus gefolgert werden konnte, dass PKC delta in den letzten 24h der PMA-Inkubation bezüglich der Nox4 Hochregulation involviert war. Es konnte hierbei nicht ausgeschlossen werden, dass die signifikante Reduzierung der Nox4 Expression durch einen toxischen Effekt von Rottlerin ausgelöst worden war. Deshalb wurden nun EA.hy 926 Zellen mit 50 nmol/l siRNA gegen PKC delta transfiziert, um 48h später das PMA-Experiment zu wiederholen.

Die basale Nox4 Expression war nach dem Knock-out von PKC delta leicht erhöht und im Vergleich zu der scrambled siRNA transfizierten Gruppe war die PMA induzierte Nox4 Hochregulation hoch signifikant reduziert. Damit konnte das zuvor mit Rottlerin gewonnene Ergebnis bestätigt werden (Abbildung 3.25).

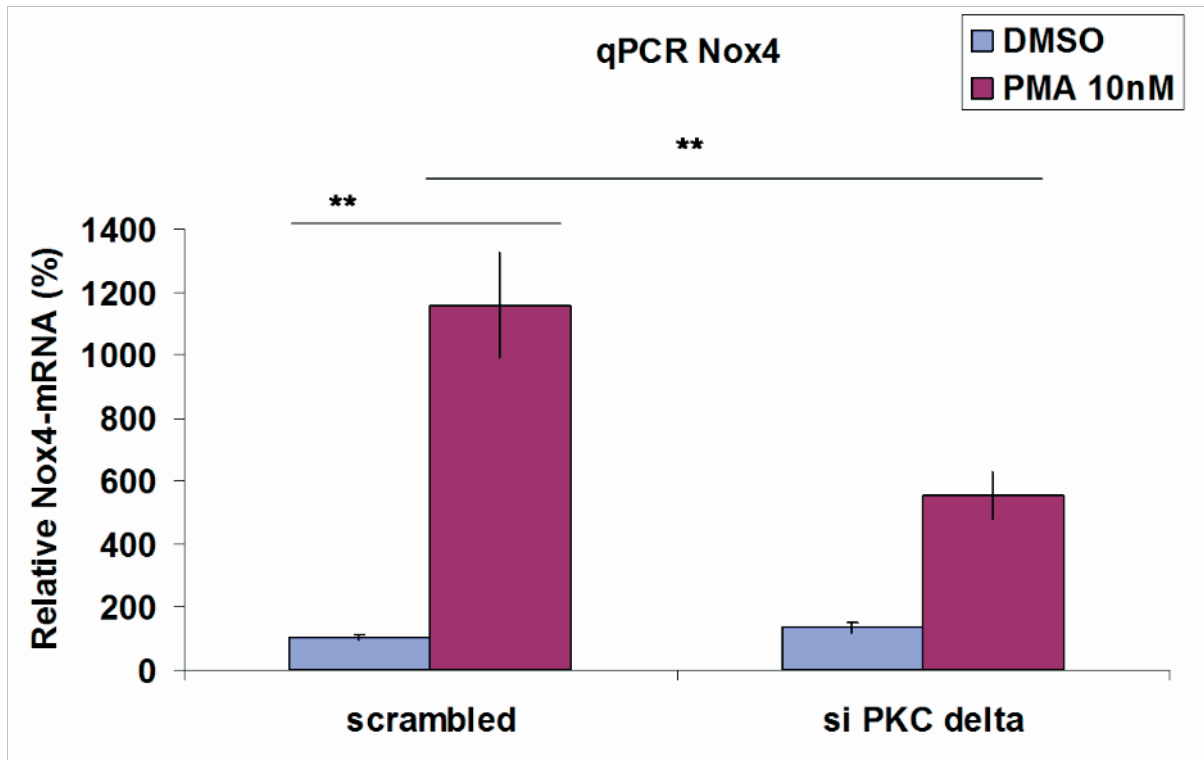


Abbildung 3.25: EA.hy 926 Zellen wurden entweder mit 50 nmol/l scrambled siRNA (links) oder mit 50 nmol/l PKC delta siRNA (rechts) transfiziert. Nach 48h wurden die Zellen für 48h mit DMSO oder 10 nmol/l PMA stimuliert. Die Nox4 mRNA Expression wurde mit quantitativer RT-PCR analysiert. (n=9; **P< 0,01)

Wie bereits erwähnt, verfügt PKC delta über mehrere Phosphorylierungsstellen. Während einige konstitutiv phosphoryliert vorliegen und keinen Einfluss auf die Aktivität dieses Proteins haben, bildet Thr505 eine Ausnahme. Eine Phosphorylierung an dieser Stelle bewirkt eine Aktivierung von PKC delta. Es konnte zuvor gezeigt werden, dass PMA-Inkubationen zu einer Zunahme des Molekulargewichtes dieser PKC-Isoform führte. Eine verstärkte Phosphorylierung von Proteinen hat den gleichen Effekt. Um herauszufinden, ob PMA-Inkubationen zu einer verstärkten Phosphorylierung von Thr505 führt, wurden EA.hy 926 Zellen 3h, 6h, 30h und 48h mit PMA inkubiert, um dies mittels Western Blot zu analysieren. Überraschenderweise zeigten die PKC delta Banden ein anderes Erscheinungsbild (siehe Abbildung 3.26, oberes Bandenbild) als diejenigen in Abbildung 3.23, obwohl der gleiche Antikörper gegen PKC delta zum Einsatz gekommen war, die Proben aber auf große Taschen aufgetragen worden waren. Zwar zeigte sich abermals bei allen Inkubationsdauern eine Zunahme des Proteingewichtes, doch diesmal konnte bei den PMA behandelten Proben ein unmodifizierter Proteinanteil von PKC delta dargestellt werden (siehe Abbildung 3.26).

Das mittlere Bandenbild zeigt den Anteil von PKC delta, der an Thr505 phosphoryliert und somit aktiviert vorlag. Es ist augenscheinlich, dass dieser Zustand auch ohne PMA-Einwirkung präsent ist. Die PMA behandelten Proben zeigten keinen nennenswerten Umsatz vom unphosphorylierten zum phosphorylierten Zustand. Davon ausgenommen war die 48h PMA Probe, die eine deutliche Konzentrationsverringering von phospho-PKC delta erfahren hatte. Bemerkenswert war die Tatsache, dass wieder eine Massenzunahme eingetreten war, so dass sich abermals die Banden der PMA behandelten Proben deutlich von ihren jeweiligen Kontrollen abhoben. Demnach war für diese Gewichtszunahme nicht die aktivierende Phosphorylierung von Thr505 verantwortlich.

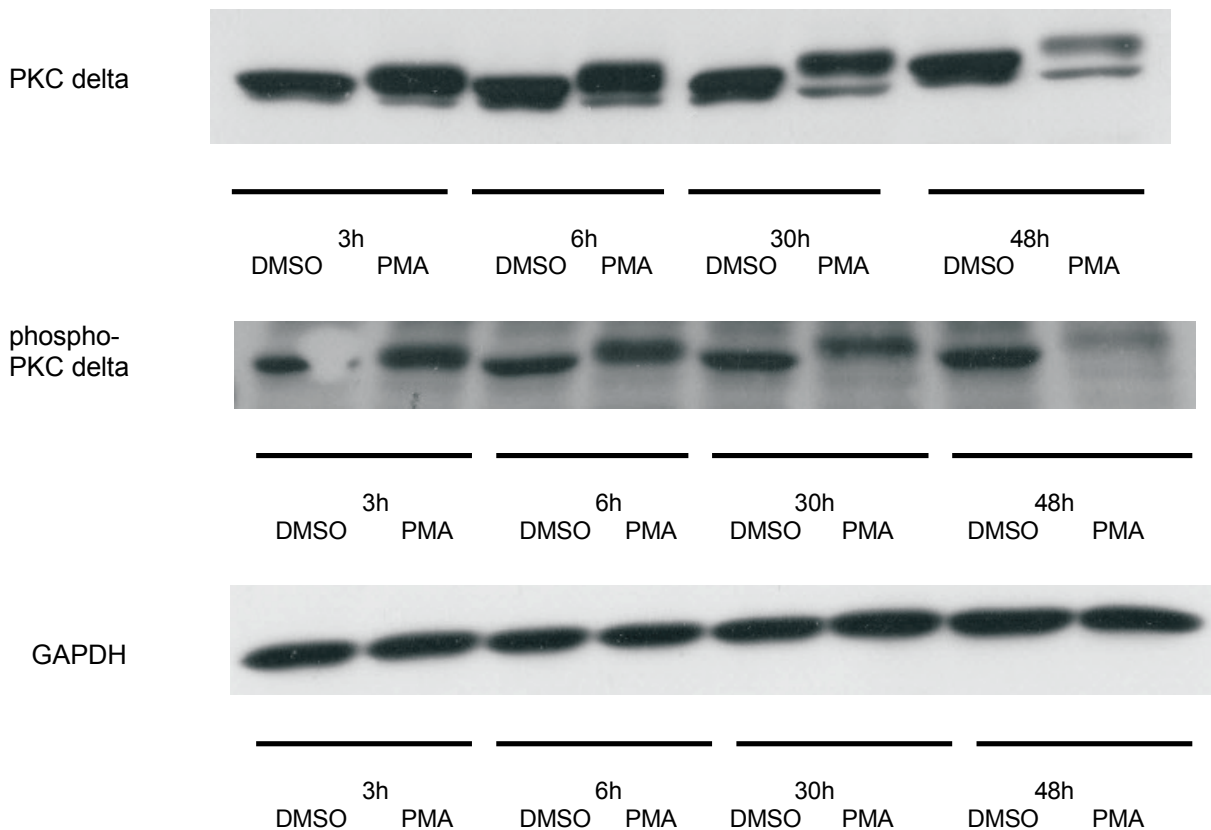


Abbildung 3.26: EA.hy 926 Zellen wurden jeweils für 3h, 6h, 30h und 48h mit 10 nmol/l PMA ohne Inhibitor inkubiert. Die Gesamtprotein-Lysate (35 µg) wurden mittels eines 10 %-igen SDS-Polyacryl-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und einer Western Blot-Analyse unterzogen. Die hier gezeigte Bilder sind repräsentativ für n = 3 Experimente.

3.7 GSK-3-beta

In der Literatur gibt es Hinweise, dass PKC delta und GSK-3-beta in einem Zusammenhang bezüglich der Erk1/2 Phosphorylierung stehen. Demnach führt eine PKC delta Aktivierung zu einer Deaktivierung von GSK-3-beta, umgekehrt führt eine Inhibierung von GSK-3 beta zu einer Aktivitätszunahme von PKC delta (Wang, Zjou, Wang, & Evers, 2006). Beide Varianten führen zu einer verstärkten Erk1/2 Aktivierung, wobei bis heute die genauen Mechanismen unzureichend geklärt sind.

In 3.2 konnte bewiesen werden, dass Erk1/2 durch die verschiedenen langen PMA-Inkubationen (3h, 6h, 30h und 48h) verstärkt in einem aktivierten Zustand vorlag. Dies war ungewöhnlich, da in der Literatur beschrieben wird, dass Erk1/2 für schnelle Informationsweiterleitung bekannt ist, und dass der dafür notwendige phosphorylierte Zustand zeitlich streng limitiert ist (Roskoski, 2012). Eine Störung der Dephosphorylierung von Erk1/2 wird mit der Entstehung von Tumoren in direkten Zusammenhang gesetzt (Hoshino et al., 1999).

Um der Frage nachzugehen, ob bei der PMA-vermittelten Nox4 Hochregulation ein Zusammenspiel von PKC delta und GSK-3-beta eingeschaltet war, schien es sinnvoll, zunächst nach einer alleinigen Beteiligung von GSK-3-beta zu suchen.

Hierfür wurden EA.hy 926 Zellen mit siRNA gegen GSK-3-beta transfiziert und 48h später mit 10 nmol/l PMA inkubiert. Es zeigte sich, dass ein GSK-3-beta Knock-out mittels siRNA zu einer Verstärkung der Nox4 Hochregulation führte. Interessanterweise wurde auch die basale Nox4-mRNA Expression positiv beeinflusst (Abbildung 3.27).

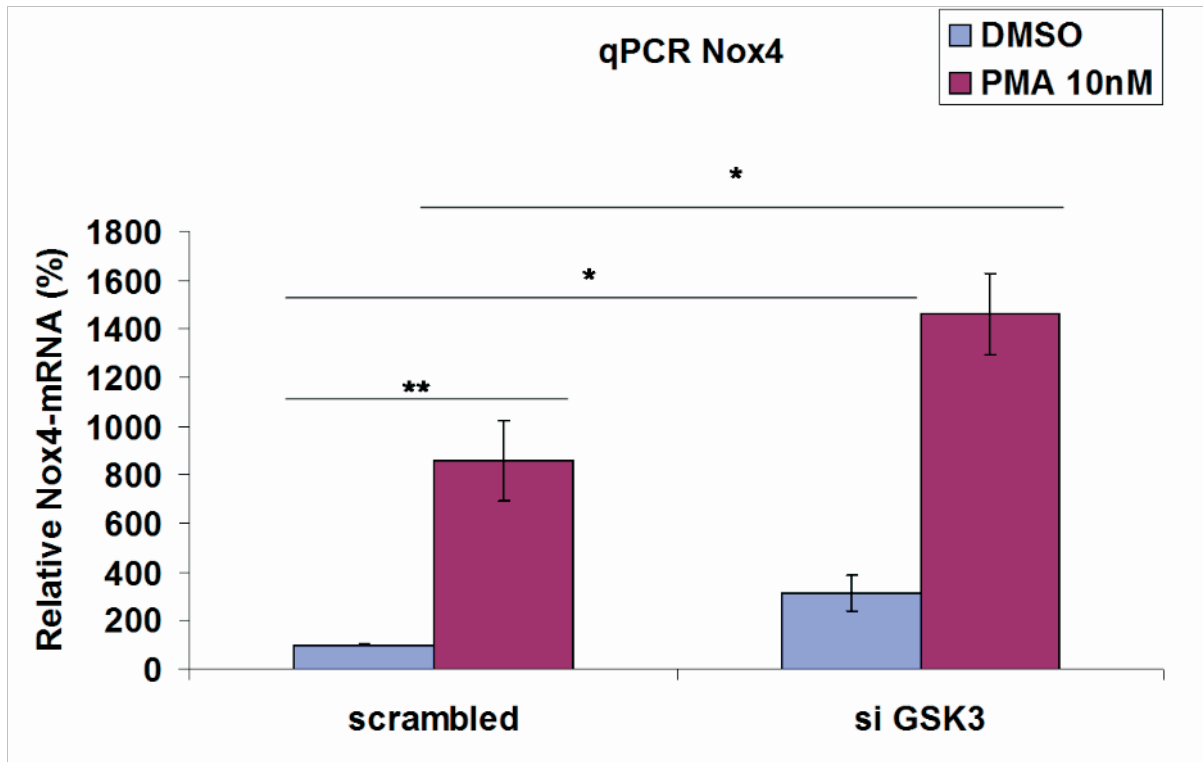


Abbildung 3.27: EA.hy 926 Zellen wurden entweder mit 50 nmol/l scrambled siRNA (links) oder mit 50 nmol/l GSK-3 siRNA (rechts) transfiziert. 48h nach der Transfektion wurden die Zellen 48h lang mit DMSO oder 10 nmol/l PMA stimuliert. Die Nox4 mRNA Expression wurde mit quantitativer RT-PCR analysiert. (n=6; * P< 0,05)

Da tatsächlich eine Verstärkung der PMA vermittelten Nox4 Hochregulation eingetreten war, nachdem GSK-3-beta ausgeschaltet worden war, sollte als nächstes geklärt werden, ob dies mit veränderten Aktivitäten von PKC delta und Erk1/2 verknüpft war.

Dazu wurden EA.hy 926 Zellen für 6h und 30h mit 10 nmol/l PMA inkubiert, um anschließend Western Blot Analysen durchzuführen. Die Versuche wurden 48h nach siRNA-Transfektionen gegen PKC delta und GSK-3-beta gestartet. Die Inkubationsdauer von 6h wurde gewählt, um einen Einblick in eine frühe Phase des Experiments gewinnen zu können, zudem wurde die 30-stündige Inkubation untersucht, da sich hier in vorangegangenen Experimenten deutlichere Signale von PKC delta, bzw. phospho-PKC delta gezeigt hatten.

Die Banden 1 und 2 in Abbildung 3.28 beinhalten die scrambled siRNA, 3 und 4 die PKC delta siRNA und 5 und 6 die GSK-3-beta siRNA transfizierten Zellen, die jeweils für 6h mit DMSO oder 10nmol/l PMA behandelt worden waren. Aus den Banden A3, A4, B3 und B4 wird die Wirksamkeit der siRNA gegen PKC delta ersichtlich. Das

Protein liegt nach 54h (48h + 6h) nur noch in Spuren vor. Die Bilder A und B zeigen PKC delta jeweils im un- und phosphorylierten Zustand. Wieder konnte eine Gewichtszunahme festgestellt werden, wenn die Zellen mit PMA inkubiert worden waren, wobei bei diesem Muster keine Veränderung festzustellen war, wenn zuvor GSK-3-beta mittels siRNA ausgeschaltet worden war (A5, A6, B5 und B6). Die Wirksamkeit der siRNA gegen GSK-3-beta wird mit D5 und D6 belegt. Aus den Bildern D und E wird ersichtlich, dass weder eine 6-stündige PMA-Inkubation Einfluss auf die Proteinkonzentrationen von GSK-3beta und alpha haben, noch eine Entfernung von PKC delta mittels siRNA.

In Bild C fällt jedoch ein Erk1/2 Anteil auf, der sich durch die GSK-3-beta-siRNA-Behandlung basal erhöht (C1 versus C5). Dies bedeutet, dass sich die Grundaktivität von Erk1/2 durch die Hemmung von GSK-3-beta erhöht. Die Entfernung von PKC delta zeigte keinen Einfluss auf phospho-Erk1/2 nach einer 6-stündigen PMA-Inkubation.

~ Ergebnisse ~

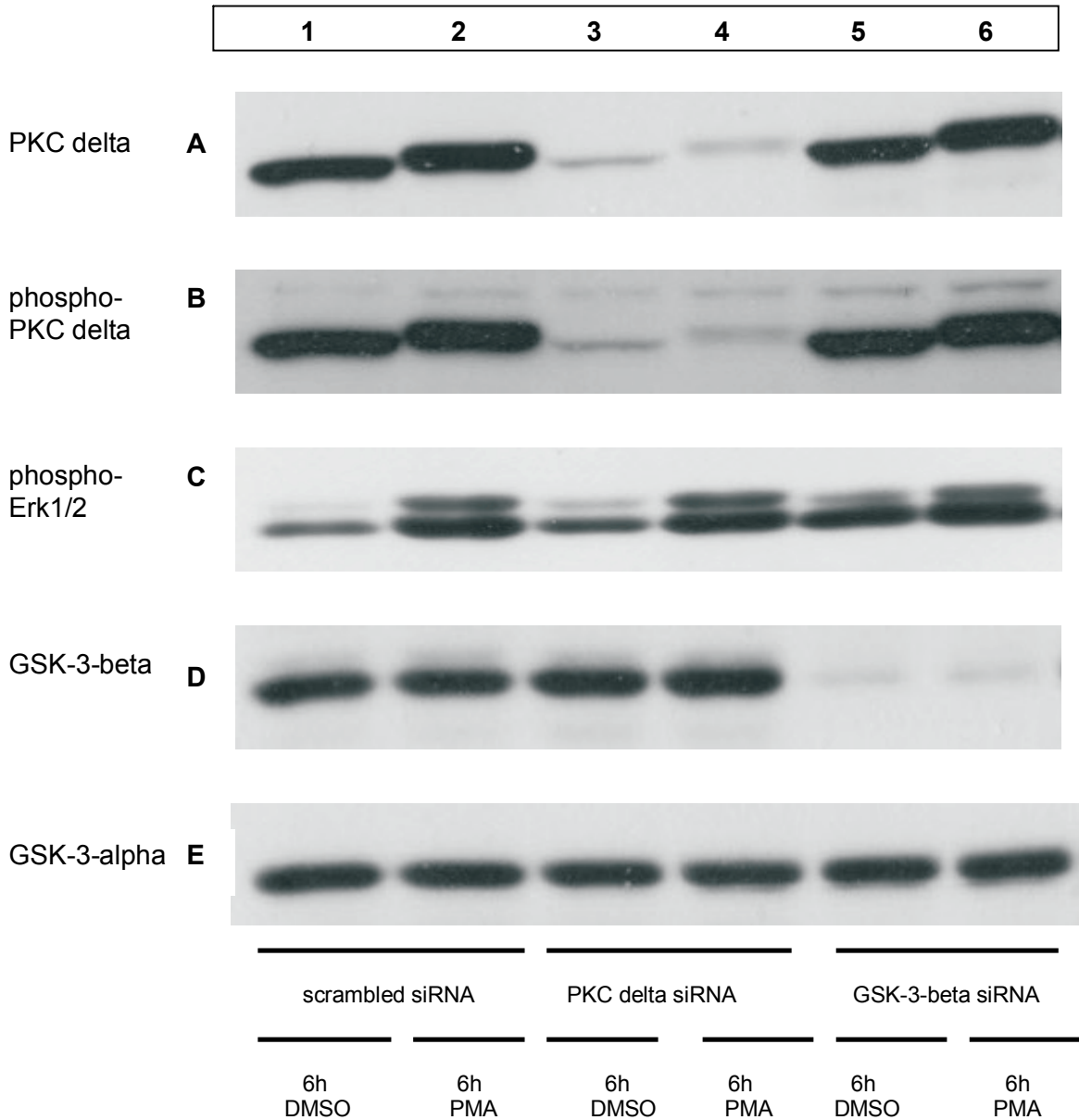


Abbildung 3.28: EA.hy 926 Zellen wurden entweder mit 50 nmol/l scrambled siRNA (Banden 1 und 2), mit 50 nmol/l PKC delta siRNA (Banden 3 und 4), oder mit 50 nmol/l GSK-3-beta siRNA (Banden 5 und 6) transfiziert. Nach 48h wurden die Zellen für 6h mit DMSO oder 10 nmol/l PMA stimuliert. Die Gesamtprotein-Lysate (35 µg) wurden mittels eines 10 %-igen SDS-Polyacryl-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und einer Western Blot-Analyse unterzogen. Die hier gezeigte Bilder sind repräsentativ für n = 3 Experimente.

Abbildung 3.29 zeigt das Ergebnis des gleichen Versuchsaufbaus wie Abbildung 3.28 mit dem Unterschied, dass hier über 30h mit 10 nmol/l PMA inkubiert worden war.

A3, A4, B3 und B4 zeigen auch hier die Wirksamkeit der siRNA gegen PKC delta. Nach 78h (48h + 30h) sind nur noch Spuren von PKC delta nachweisbar. Sowohl PKC delta als auch phospho-PKC delta zeigen abermals das stufenartige Muster, wenn die Zellen PMA ausgesetzt gewesen sind. Vergleicht man die Banden A2 und A6 wird ersichtlich, dass nach 30h PMA vermehrt PKC delta nachweisbar ist, wenn zuvor GSK-3-beta mittels siRNA ausgeschaltet worden war. Dies trifft auch für das phosphorylierte PKC delta zu. Der Umfang und die Intensität von B6 sind wesentlich verstärkt wenn mit B2 verglichen wird. Folglich wird die Konzentration von PKC delta und der Anteil der phosphorylierten Form nach einer 30-stündigen PMA-Inkubation verstärkt, wenn zuvor GSK-3-beta mittels siRNA ausgeschaltet worden war. Der Vergleich der Banden C2 und C4 zeigt eine tendenzielle Abschwächung der Erk1/2 Phosphorylierung, nachdem PKC delta ausgeschaltet worden war. Außerdem konnte durch einen GSK-3-beta knock-down wieder ein erhöhter basaler Anteil von phospho-Erk1/2 festgestellt werden (C1 versus C5). Die Proteinkonzentrationen von GSK-3-alpha und beta wurden durch den Versuchsaufbau nicht beeinflusst. Die Banden D5 und D6 zeigen die Funktionalität der siRNA gegen GSK-3-beta.

~ Ergebnisse ~

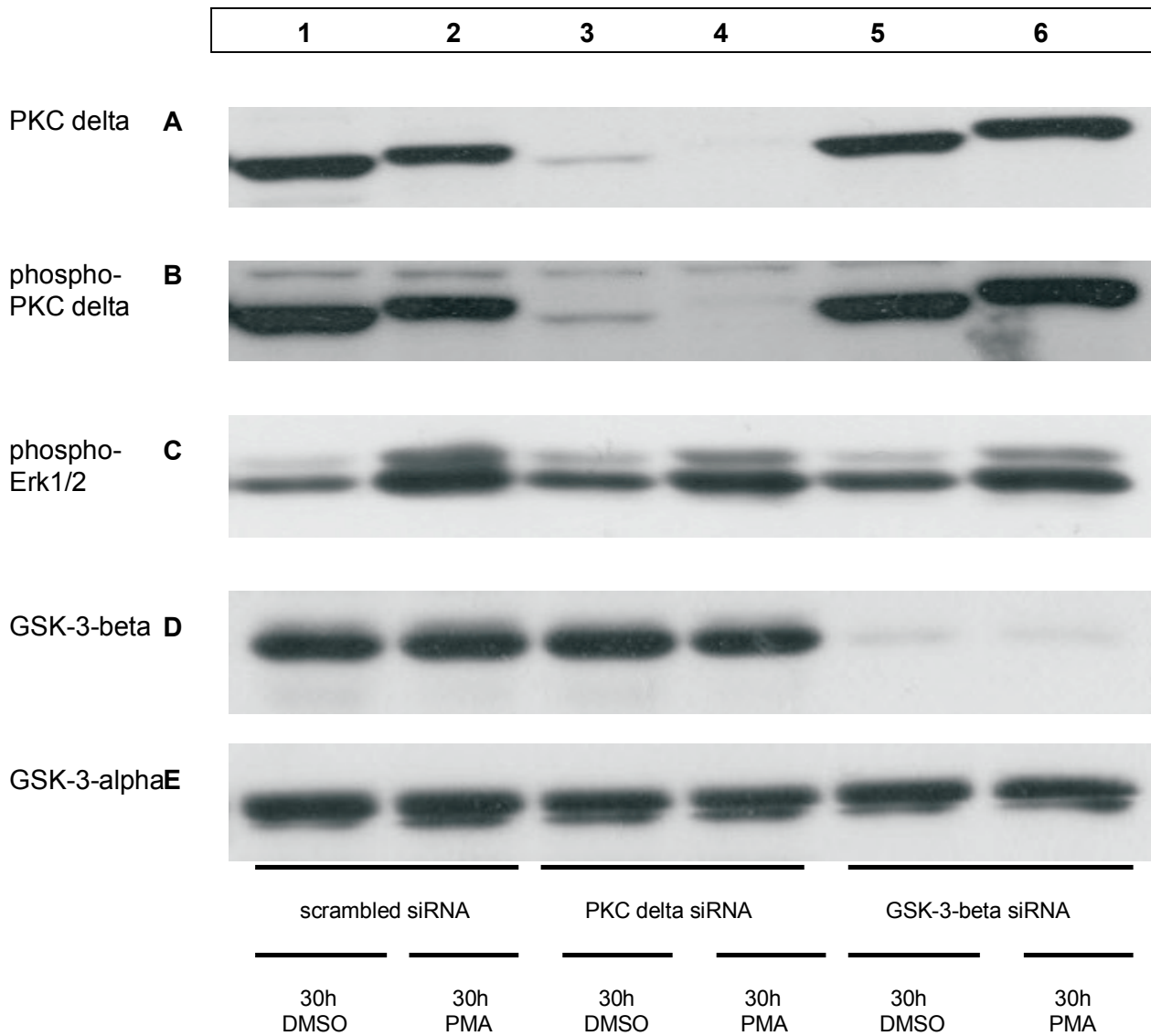


Abbildung 3.29: EA.hy 926 Zellen wurden entweder mit 50 nmol/l scrambled siRNA (Banden 1 und 2), mit 50 nmol/l PKC delta siRNA (Banden 3 und 4), oder mit 50 nmol/l GSK-3-beta siRNA (Banden 5 und 6) transfiziert. Nach 48h wurden die Zellen für 30h mit DMSO oder 10 nmol/l PMA stimuliert. Die Gesamtprotein-Lysate (35 µg) wurden mittels eines 10 %-igen SDS-Polyacryl-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und einer Western Blot-Analyse unterzogen. Die hier gezeigte Bilder sind repräsentativ für n = 3 Experimente.

3.7.1 Die Wirkung von PMA auf GSK-3 beta

Zuvor konnte bereits gezeigt werden, dass phospho-Erk1/2 einen wichtigen Baustein in der PMA vermittelten Nox4 Hochregulation darstellt. Offensichtlich wird die Phosphorylierung von Erk1/2 begünstigt, wenn GSK-3-beta inhibiert wird. In Abbildung 3.28 und 3.29 wurde diese Inhibierung mittels siRNA gegen GSK-3-beta erreicht. Nun sollte geklärt werden, ob PMA-Inkubationen zu einer physiologischen Inhibierung von GSK-3-beta führen. Wird GSK-3-beta an Serin 9 (GSK-3-alpha an Serin 21) phosphoryliert, geht das Protein in einen deaktivierten Zustand über (Sutherland, Leighton, & Cohen, 1993). Um zu testen, ob diese inhibierende Phosphorylierung unter PMA-Einfluss eintritt, wurden die EA.hy 926 Zellen mit 10 nmol/l PMA für 3h, 6h, 30h und 48h behandelt und eine Western Blot-Analyse unter Verwendung eines Antikörpers gegen phospho-GSK-3-beta (Cell Signaling) durchgeführt. Abbildung 3.30 zeigt deutlich, dass es bei jeder durchgeführten Inkubationsdauer zu einer erhöhten Deaktivierung von GSK-3-beta gekommen war und dass diese Phosphorylierung mit fortschreitender Zeit an Intensität zunimmt.

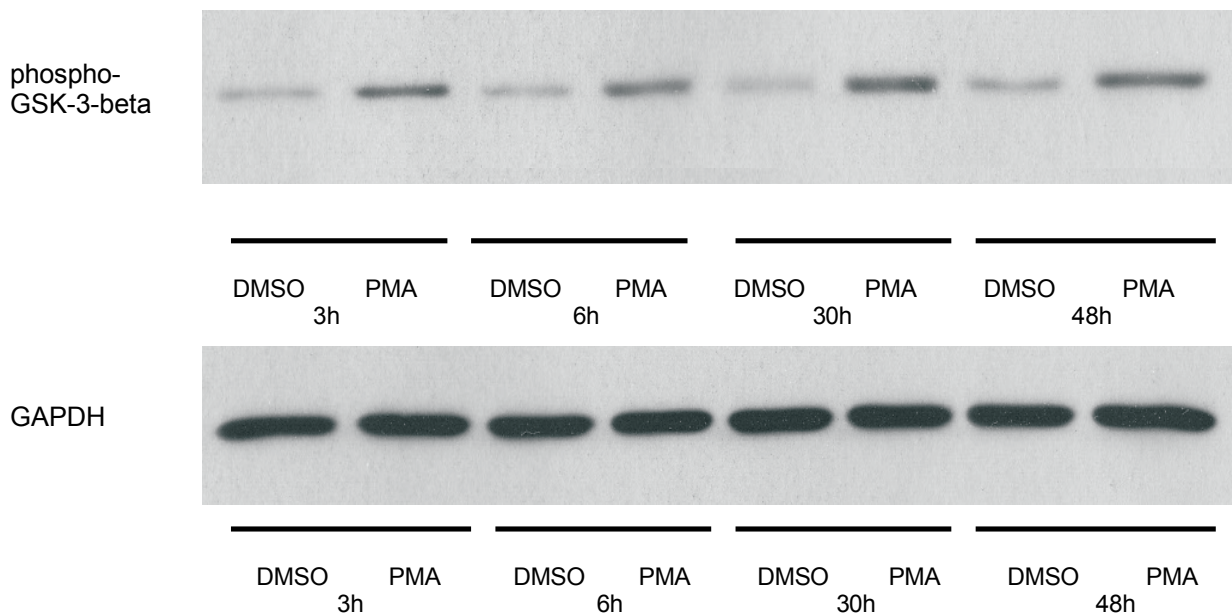


Abbildung 3.30: EA.hy 926 Zellen wurden jeweils für 3h, 6h, 30h und 48h mit 10 nmol/l PMA ohne Inhibitor inkubiert. Die Gesamtprotein-Lysate (35 µg) wurden mittels eines 10 %-igen SDS-Polyacryl-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und einer Western Blot-Analyse unterzogen. Die hier gezeigte Bilder sind repräsentativ für n = 3 Experimente.

3.8 NFAT3

Es konnte gezeigt werden, dass eine künstliche Inhibierung von GSK-3-beta Einfluss auf die PMA vermittelte Nox4 Hochregulation nahm. Aus diesem Grund war eine Untersuchung bekannter down-stream Partner dieses Proteins sinnvoll. In der Literatur wird beschrieben, dass GSK-3-beta einen kontrollierenden Einfluss auf NFAT hat (Horsley & Pavlath, 2002). Dabei handelt es sich um ein Protein, welches im Kern als Transkriptionsfaktor fungiert. GSK-3-beta phosphoryliert zytoplasmatisches NFAT, welches in diesem Zustand nicht in der Lage ist, die Kernmembran zu passieren. Aktiviertes GSK-3-beta wirkt folglich als physiologischer Inhibitor für NFAT. Wird nun GSK-3-beta seinerseits deaktiviert, fallen nicht nur die inhibierenden Phosphorylierungen von NFAT weg, sondern die bestehenden Phosphatgruppen werden von der Phosphatase Calcineurin entfernt. Dann kann NFAT in den Kern wechseln und als Transkriptionsfaktor arbeiten. Für Endothelzellen ist die Isoform NFAT3 typisch. Um zu testen, ob NFAT3 eine Rolle in der PMA vermittelten Nox4 Hochregulation spielt, wurde dieser Transkriptionsfaktor indirekt inhibiert. Hierzu wurden EA.hy 926 Zellen 48h lang mit und ohne 1 µmol/l Cyclosporin und mit 10 nmol/l PMA inkubiert. Cyclosporin ist ein Inhibitor von Calcineurin, d.h. auch im Falle der Deaktivierung von GSK-3-beta kann NFAT3 dennoch nicht in den Kern wechseln, weil die bestehenden Phosphatgruppen nicht entfernt werden können. Nach einigen Vorversuchen konnte festgestellt werden, dass Cyclosporin eine tendenzielle Abnahme der PMA vermittelten Nox4 Hochregulation verursachte, wenn dieser Wirkstoff ab Stunde 0 zu den Zellen gegeben wurde. Dies änderte sich, wenn Cyclosporin 24h nach Versuchsstart für weitere 24h zu den Zellen gegeben wurde. In diesen Fällen konnte der PMA-Effekt auf höchst signifikante Weise reduziert werden (Abbildung 3.31).

Dieses Ergebnis ist ein Indiz für die Relevanz von NFAT3 in der zweiten Hälfte des 48-stündigen PMA Experiments. Dass der Cyclosporin-Einfluss wesentlich schwächer ausfällt, wenn man diesen Wirkstoff zu Beginn des Experiments verwendet, könnte mit einer chemischen Instabilität erklärt werden. Das bedeutet, dass NFAT3 in der ersten Hälfte des Experimentes noch keine Rolle spielt und später dann nur noch Reste von Cyclosporin wirken können.

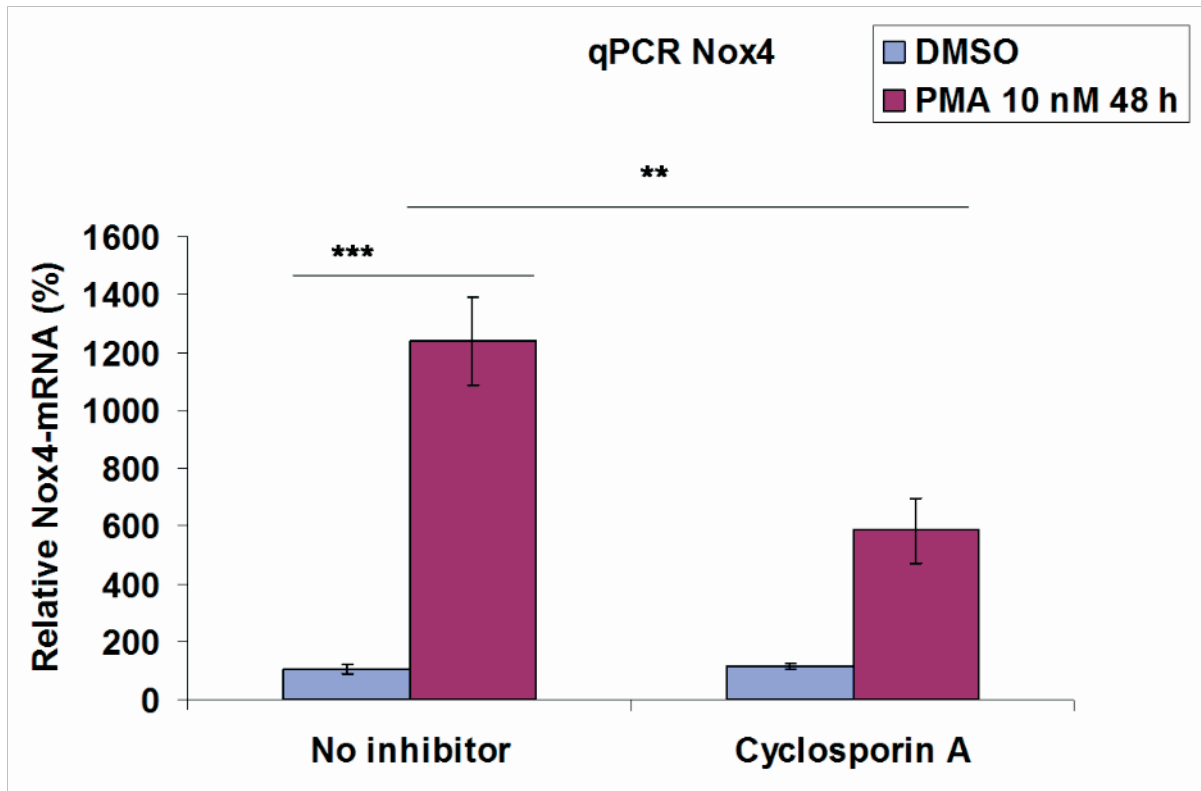


Abbildung 3.31: EA.hy 926 Zellen wurden für 48h mit 10 nmol/l PMA inkubiert. 24h nach Versuchsbeginn wurde DMSO (links), bzw. 1 μ mol/l Cyclosporin (rechts) hinzugefügt ohne das Medium zu wechseln. Nach weiteren 24h Inkubation wurde das Experiment beendet. Die Nox4 mRNA Expression wurde mit quantitativer Real-time RT-PCR analysiert. (n=9; **P< 0,01; ***P< 0,001)

Auch die Verwendung eines weiteren Calcineurin-Inhibitors zeigte einen reduzierenden Einfluss auf die PMA vermittelte Nox4 Hochregulation. Hierfür wurden EA.hy 926 Zellen mit und ohne FK 506 über 48h mit 10 nmol/l PMA inkubiert. Diesmal wurden zwei Inhibitorgruppen gewählt, welche entweder mit 100 nmol/l oder 500 nmol/l FK 506 behandelt wurden.

Die Co-Inkubation von 10 nmol/l PMA und 100 nmol/l FK 506 resultierte zwar in einer deutlichen Reduzierung der Nox4 Hochregulation, war aber mit einem P-Wert von 0,06 nicht signifikant. Anders verhielt es nach 500 nmol/l FK 506: unter diesen Bedingungen war die Nox4 mRNA Expression mit einem P-Wert von 0,03 signifikant niedriger als bei der Kontrollgruppe. Allerdings muss bei diesem Experiment auf eine Besonderheit hingewiesen werden: der Inhibitor FK 506 hat augenscheinlich auch einen konzentrationsabhängigen Einfluss auf die basale Nox4 mRNA Expression. Diese war mit steigender Inhibitor-Konzentration gestiegen. Wird nun dieser

Umstand rechnerisch berücksichtigt, kann folgende Aussage getroffen werden: ohne Inhibitor konnte durch die 48-stündige PMA-Inkubation eine 14,5-fache Nox4 mRNA Expression eingeleitet werden, in Anwesenheit des FK 506 sank diese Erhöhung auf das 6,1-fache und mit 500 nmol/l FK 506 sogar auf das 3,5-fache (Abbildung 3.32).

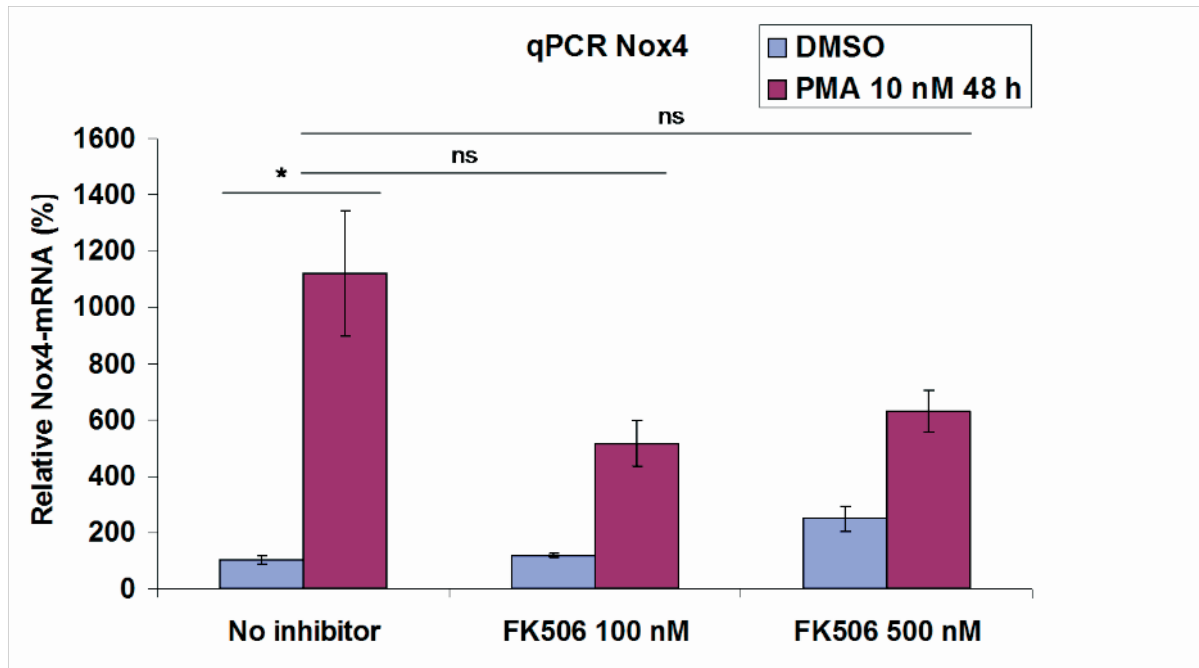


Abbildung 3.32: EA.hy 926 Zellen wurden für 48h mit 10 nmol/l PMA behandelt. Der Calcineurin-Inhibitor FK 506 wurde entweder zu Beginn des Versuches hinzugegeben (100 nmol/l Mitte und 500 nmol/l rechts) oder durch ein gleiches Volumen DMSO ersetzt (links). Die Zellen der Inhibitorgruppen wurden vor PMA-Zugabe 30min alleine mit 100 nmol/l, bzw. 500 nmol/l vorbehandelt. Die Nox4 mRNA Expression wurde mit quantitativer RT-PCR analysiert. (n = 6; * P < 0,05)

Nun wurde der Einfluss einer direkten Inhibierung von NFAT3 untersucht. Hierfür wurden EA.hy 926 Zellen mit 50 nmol/l siRNA gegen NFAT3 transfiziert, um 24h später eine 48-stündige PMA-Inkubation einzuleiten. In Abbildung 3.33 (oben) ist das Ergebnis der quantitativen RT-PCR dargestellt. Die basale Nox4 mRNA Expression der NFAT3 siRNA Gruppe war auf 42% abgefallen, jedoch hatte die PMA-Inkubation eine massive Nox4 Hochregulation ausgelöst, die sich statistisch nicht von der PMA behandelten scrambled siRNA Gruppe unterschied. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis kann heran gezogen werden, wenn man die NFAT3 mRNA Expressionen dieses Experiments betrachtet (Abbildung 3.33, unten). Die basale NFAT3 mRNA Expression der siRNA Gruppe war auf 47% abgefallen, dies belegt

die Wirksamkeit der siRNA. Jedoch kann man bei den scrambled siRNA transfizierten Gruppen erkennen, dass PMA eine Hochregulation der NFAT3 mRNA Expression eingeleitet hatte, die offensichtlich nicht von der NFAT3 siRNA abgefangen werden konnte, denn diese Hochregulierung war im gleichen Ausmaß nach einer NFAT3 siRNA Transfektion geschehen.

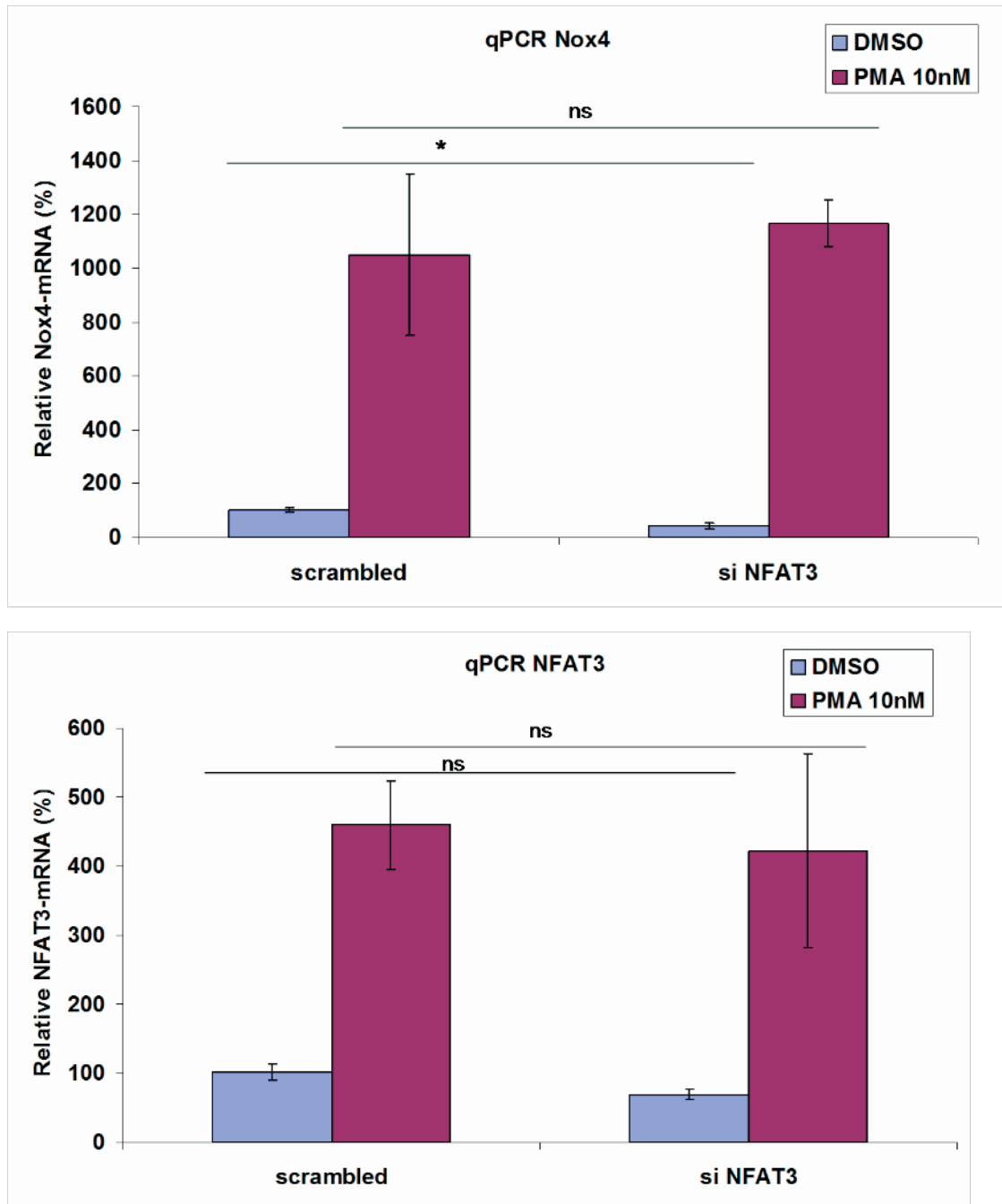
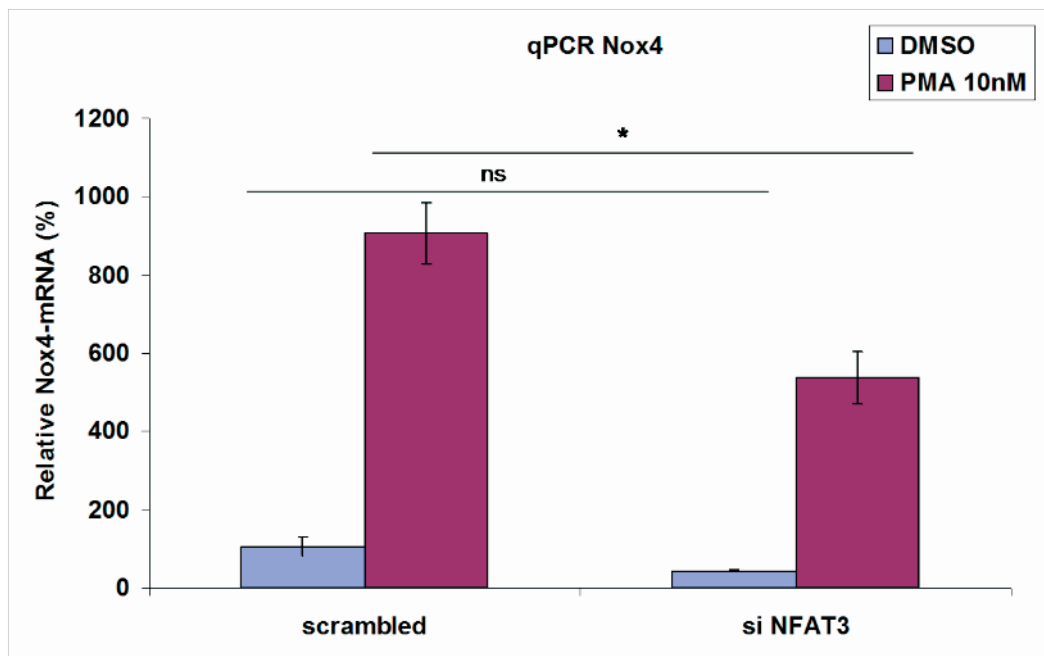


Abbildung 3.33: EA.hy 926 Zellen wurden entweder mit 50 nmol/l scrambled siRNA (links) oder mit 50 nmol/l NFAT3 siRNA (rechts) transfiziert. Nach 24h wurden die Zellen für 48h mit DMSO oder 10 nmol/l PMA stimuliert. Die Nox4 und NFAT3 mRNA Expression wurde mit quantitativer RT-PCR analysiert. (n=6; * P< 0,05)

Um die Chance wahrzunehmen, eine bessere Wirksamkeit der NFAT3 siRNA mit einer längeren post-transfunktionalen Inkubation zu erreichen, wurde bei der Wiederholung des Experimentes erst drei Tage nach der Transfektion mit PMA inkubiert. Anschließend wurden die Expressionsmuster von Nox4 und NFAT3 mittels quantitativer RT-PCR gemessen. Abbildung 3.34 zeigt, dass abermals die basale Nox4 mRNA Expression durch eine NFAT3 siRNA Transfektion reduziert wurde. In diesem Fall war sie auf 44% gesunken. Zwar war bei der NFAT3-siRNA-Gruppe ein deutlicher PMA-Effekt zu beobachten, dieser fiel aber im Vergleich zur PMA behandelten scrambled siRNA Gruppe signifikant geringer aus.

Die basale NFAT3 mRNA Expression war bei der siRNA Gruppe auf 65% gesunken. Demnach konnte auch eine längere siRNA Inkubation den knock-down nicht verbessern. Die NFAT3 mRNA Expressionen waren wieder durch PMA erhöht worden, diesmal aber mit einer geringeren Intensität. Auch diesmal konnte die PMA vermittelte NFAT3 Induktion nicht mittels siRNA abgefangen werden.



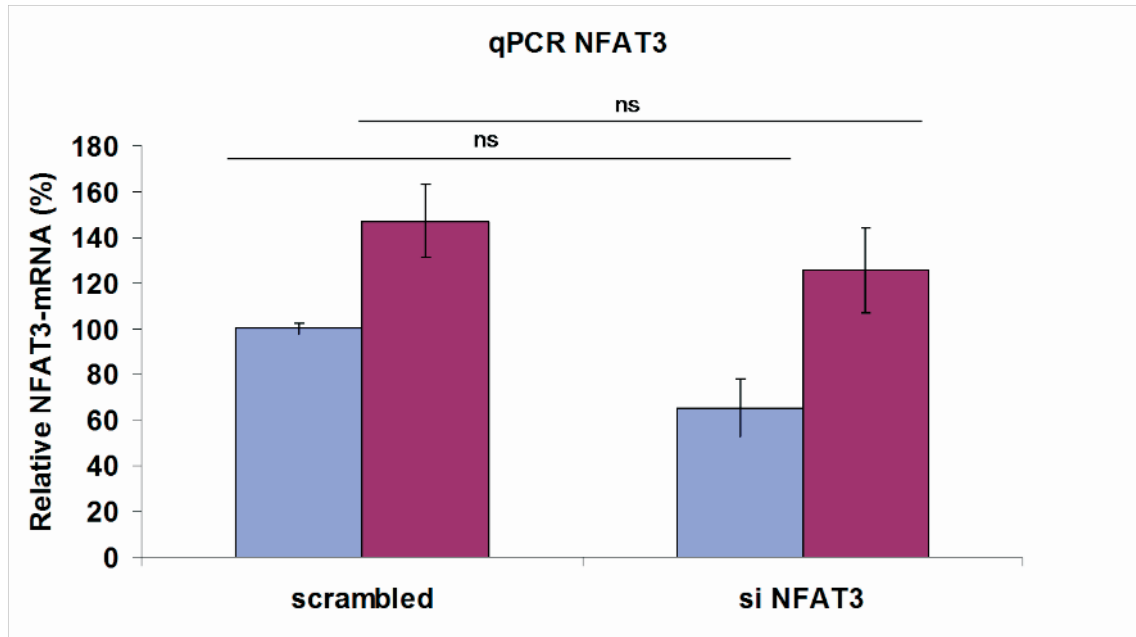


Abbildung 3.34: EA.hy 926 Zellen wurden entweder mit 50 nmol/l scrambled siRNA (links) oder mit 50 nmol/l NFAT3 siRNA (rechts) transfiziert. Nach 72h wurden die Zellen für 48h mit DMSO oder 10 nmol/l PMA stimuliert. Die Nox4 und NFAT3 mRNA Expression wurde mit quantitativer RT-PCR analysiert. (n=3; * P< 0,05)

Letztendlich waren weitere Knock-down Versuche mit der NFAT3 siRNA nicht nutzbringend. Eine Transfektion konnte die basale NFAT3 mRNA zwar stets senken, aber es war unmöglich, die NFAT3 Induktion ausreichend abzufangen. Jedoch konnte aus den Transfektionen mit dieser siRNA eine interessante Beobachtung bezüglich der Kontrollgruppen gemacht werden: die basale Nox4 mRNA Expression war stets um die Hälfte gesunken wenn das basale NFAT3 Proteinniveau vermindert worden war. Umgekehrt betrachtet, konnte die PMA vermittelte Nox4 und NFAT3 Hochregulation trotz NFAT3 siRNA ungehindert stattfinden. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass es sich dabei um eine Korrelation zwischen Nox4 und NFAT3 handeln könnte. Um die Hypothese zu überprüfen, ob Nox4 und NFAT3 in einem Zusammenhang stehen, wurde im Folgenden eine Zeitkurve angelegt, indem EA.hy 926 Zellen unterschiedlich lange mit 10 nmol/l PMA inkubiert wurden. Anschließend wurden die mRNA Expressionen von Nox4 und NFAT3 mittels quantitativer RT-PCR analysiert und in Abbildung 3.35 miteinander verglichen.

Nach 3h und 6h zeigten die PMA-Gruppen eine unterdurchschnittliche NFAT3 mRNA Expression, zu diesen Zeitpunkten blieb auch eine massive Nox4 Induktion aus. Allerdings war nach 3h eine hoch signifikante Nox4 Erhöhung zu beobachten, die

den Wert der Kontrolle 1,5-fach überragte. Nach der neunten Stunde folgte bei beiden Genaktivitäten eine positive Wende. Während NFAT3 zu diesem Zeitpunkt eine tendenzielle Steigerung der Expression zeigte, hatte sich die Nox4 mRNA unter PMA höchst signifikant vervierfacht (Abbildung 3.35).

Diese Induktion setzte sich bei beiden Genen massiv fort. Die Nox4 mRNA Expression stieg bis zur 21igsten Stunde auf ein Maximum, fiel dann aber innerhalb von drei Stunden höchst signifikant. Wiederum drei Stunden später setzte eine erneute Steigerung der Nox4 Expression ein, die ein zweites Mal zur 30igsten Stunde ein Maximum erreichte. Alle übrigen Messpunkte zeigten danach einen stetigen Abwärtstrend. Das Expressionsprofil von NFAT3 zeigte große Ähnlichkeit zu Nox4, mit dem Unterschied, dass es keine Korrelation zur 24igsten Stunde gibt. Das heißt, während Nox4 zu diesem Zeitpunkt einen höchst signifikanten Einbruch hatte, war die NFAT3 mRNA sogar tendenziell weiter gestiegen. Allerdings kann man auch bei NFAT3 drei Stunden später einen kurzen Abfall der Expression sehen, der weitere drei Stunden später wieder nach oben korrigiert war. Interessanterweise zeigen also beide Profile zwei ähnlich gesetzte Maxime. Allerdings muss erwähnt werden, dass bei den NFAT3 mRNA Expressionen zwischen der 21igsten und 30igsten Stunde nur tendenzielle Aussagen über die Expressionsänderungen gemacht werden können. Nach der 30igsten Stunde PMA zeigen beide Expressionsprofile einen stetigen Abwärtstrend.

~ Ergebnisse ~

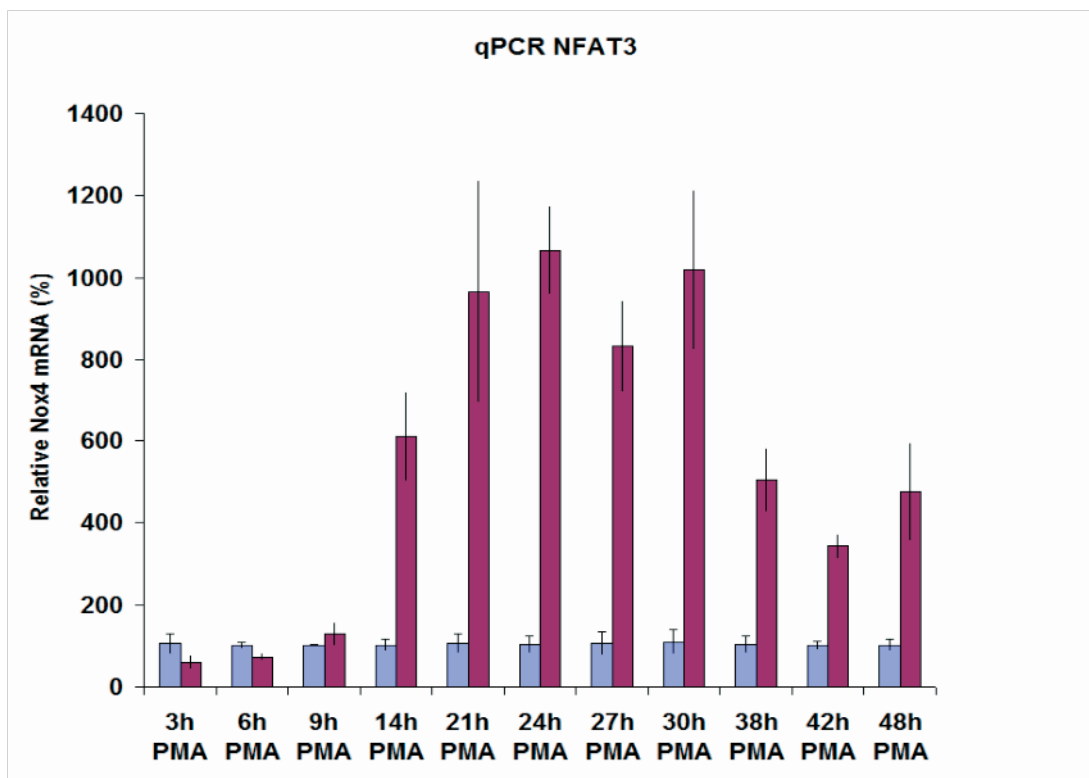
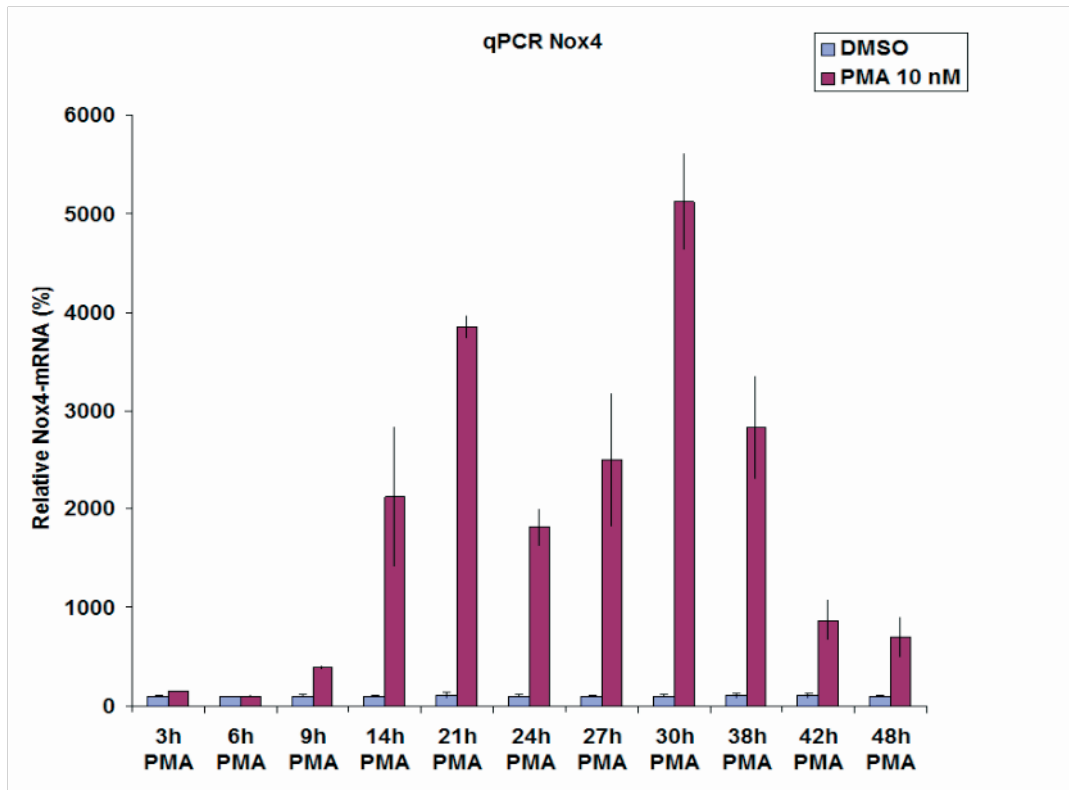
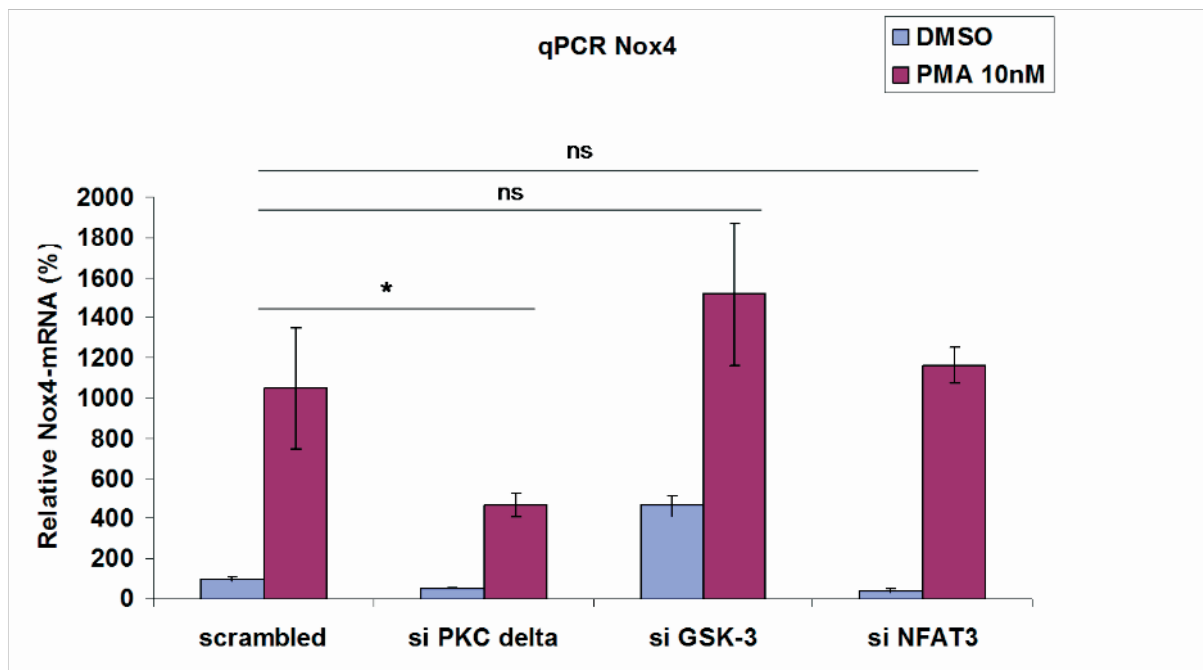


Abbildung 3.35: EA.hy 926 Zellen wurden jeweils für 3h bis 48h mit 10 nmol/l PMA ohne Inhibitor inkubiert. Die Nox4 und NFAT3 mRNA Expression wurde mit quantitativer RT-PCR analysiert. (n = 3)

Auch Abbildung 3.36 zeigt eine große Übereinstimmung der Expressionsprofile von Nox4 und NFAT3. Die Intention dieses Versuchs umfasste nicht nur die Reproduzierbarkeit dieser Korrelation, sondern sollte Hinweise auf up-stream gelegene Interaktionspartner untersuchen. Vorangegangene Versuche hatten mehrere Belege gezeigt, dass sowohl PKC delta als auch GSK-3-beta in der PMA-vermittelten Nox4 Hochregulation involviert waren. EA.hy 926 Zellen wurden daher mit siRNA gegen PKC delta, GSK-3-beta und NFAT3 transfiziert und 24h später für 48h mit 10 nmol/l PMA behandelt. Anschließend folgte eine Analyse von den mRNA Expressionen von Nox4 und NFAT3 mittels quantitativer RT-PCR. Die scrambled siRNA transfizierten Zellen zeigten nach 48-stündiger PMA Inkubation verstärkte Nox4 und NFAT3 mRNA Expressionen, die in beiden Fällen vermindert waren wenn zuvor PKC delta mittels siRNA herunterreguliert worden war.

Bei den EA.hy 926 Zellen, die zuvor mit siRNA gegen GSK-3-beta transfiziert worden waren, zeigte sich hingegen in den basalen Expressionen beider Gene eine korrelierende Erhöhung.

Die NFAT3 siRNA transfizierten EA.hy 926 Zellen zeigten bezüglich Nox4 und NFAT3 identische Expressionsprofile.



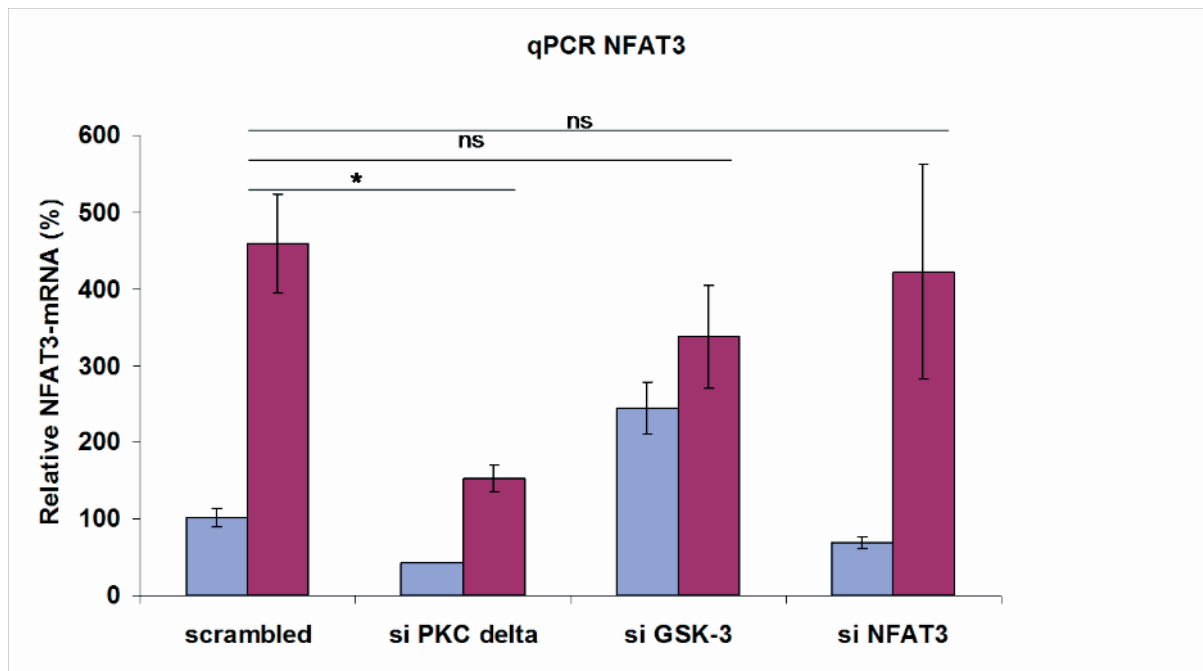


Abbildung 3.36: EA.hy 926 Zellen wurden entweder mit 50 nmol/l scrambled siRNA, PKC delta siRNA, GSK-3-beta siRNA, oder mit NFAT3 siRNA transfiziert. Nach 24h wurden die Zellen für 48h mit DMSO oder 10 nmol/l PMA stimuliert. Die Nox4 und NFAT3 mRNA Expression wurde mit quantitativer RT-PCR analysiert. (n=6; * P< 0,05)

3.9 In der späten Phase der PMA-Behandlung muss ein Protein gebildet werden

Anfangs wurde erwähnt, dass Versuche mit Cyclohexamid unternommen worden waren. Die Ergebnisse zeigen, dass mindestens ein Protein innerhalb der 48-stündigen PMA-Inkubation gebildet werden musste, damit überhaupt eine Nox4 Hochregulation stattfinden konnte. Denn damals wurde der Proteinbiosynthese-Inhibitor gleich zu Beginn der PMA-Inkubation zu den EA.hy 926 Zellen gegeben mit dem Resultat, dass PMA keinen Einfluss mehr auf die Nox4 mRNA Expression zeigte (Xu et al., 2008). Für die Reproduzierbarkeit dieses Befundes wurde das Cyclohexamid-Experiment wiederholt, doch diesmal wurde der Inhibitor erst 24h nach Beginn der PMA-Inkubation zu den Zellen gegeben. Nach weiteren 24h wurde dann die Nox4 mRNA Expression mittels quantitativer RT-PCR analysiert und es stellte sich heraus, dass auch eine derart verspätete Inhibierung der Proteinbiosynthese zu einem identischen Ergebnis führte (Abb. 3.4).

Es sollte daher weiterhin untersucht werden, zu welchem Zeitpunkt genug von dem Protein X produziert worden war, damit eine Blockierung der Proteinbiosynthese mittels Cyclohexamid keine Abwendung des PMA-Effektes bewirken konnte.

Eine Eingrenzung des Zeitraumes konnte nach einer Testreihe auf die PMA-Inkubationen zwischen der 30igsten und 38igsten Stunde bestimmt werden. Für die Ergebnisse in Abbildung 3.37 wurde das Experiment aus Abbildung 3.4 mehrfach wiederholt mit dem Unterschied, dass zu anderen Zeiten das Cylohexamid zu den Zellen gegeben wurde.

Folglich konnte eine PMA vermittelte Nox4 Hochregulation abgewendet werden, wenn das Cyclohexamid 30h nach Beginn des Experiments hinzugefügt wurde, nicht aber wenn die Inhibitor-Gabe acht Stunden später erfolgte.

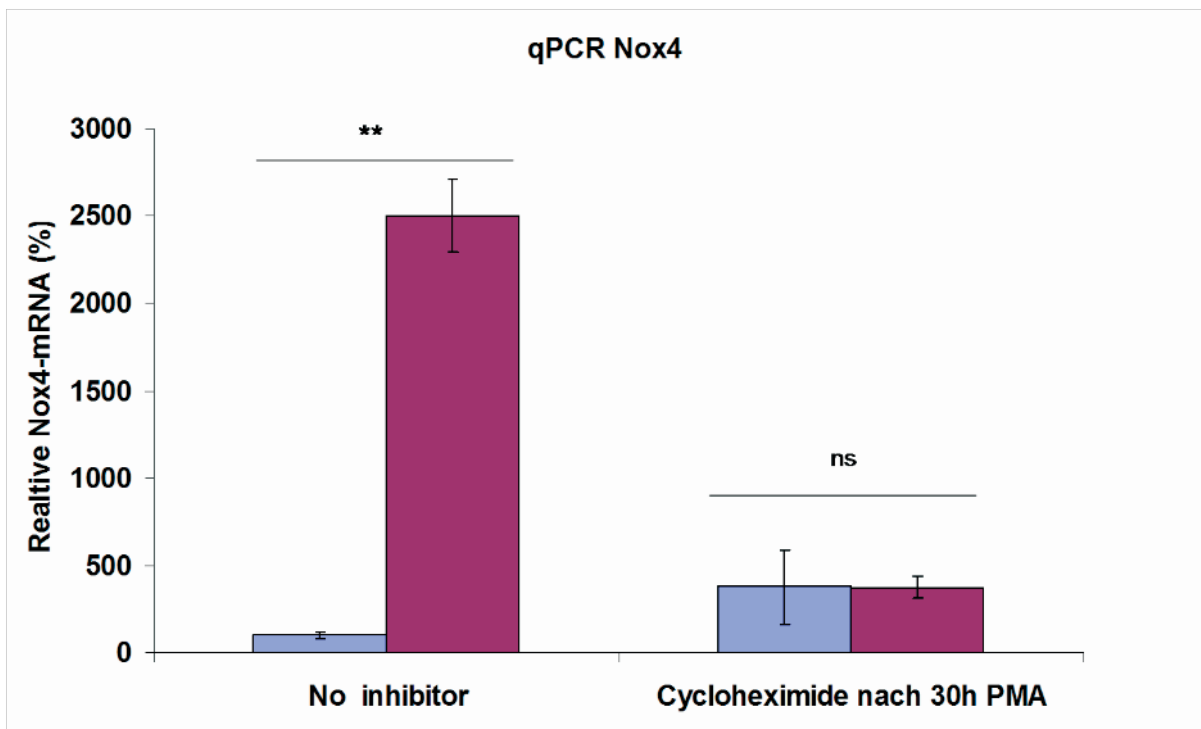
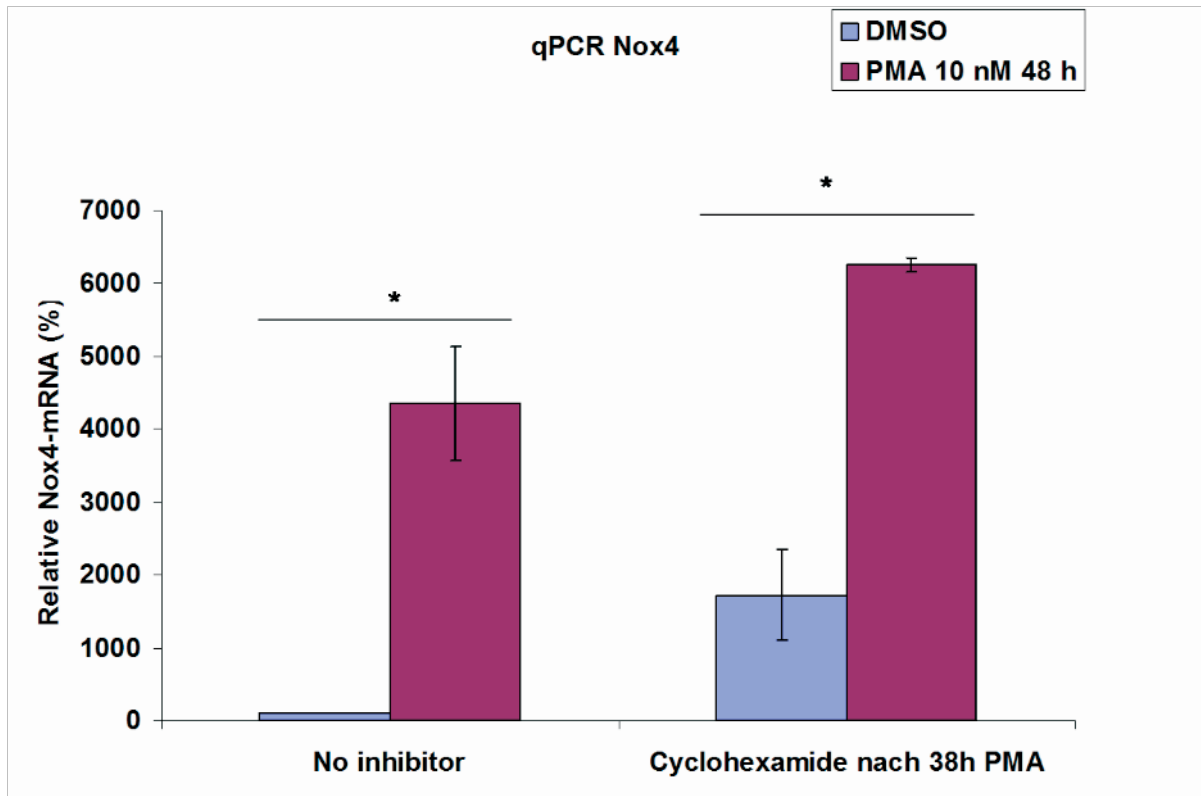


Abbildung 3.37: EA.hy 926 Zellen wurden für 48h mit 10 nmol/l PMA inkubiert. Nach 30h (oben), bzw. 38h (unten) wurde entweder DMSO (links), oder 1 µg/ml Cyclohexamid (rechts) zu den Zellen hinzugefügt ohne das Medium zu wechseln. Nach Ablauf der 48-stündigen PMA-Inkubation wurde das Experiment beendet. Die Nox4 mRNA Expression wurde mit quantitativer RT-PCR analysiert. (n=3; * P< 0,05; **P< 0,01)

3.10 HDAC

Histondeacetylasen (kurz: HDAC) beeinflussen den Grad der Acetylierungen von Lysinresten der Histonproteine, die mit der DNA assoziiert sind. Dadurch haben HDACs indirekt Einfluss auf die Transkription von Genen. Liegen die Histone acetyliert vor, entfaltet sich die DNA und Gene werden leichter von der Transkriptionsapparatur erreicht. Nach Aktivierung von Histondeacetylasen entfernen diese Acetylreste von den Histonen, wodurch sich die DNA wieder in einen kompakteren Zustand begibt, der so zu einer Reduzierung von Genexpressionen führt. Scriptaid ist eine Chemikalie, die die Aktivität von HDACs blockiert. In Abbildung 3.38 wird gezeigt, dass der Einsatz dieses Reagens massive Auswirkungen auf die PMA vermittelte Nox4 Hochregulation hat. Hierfür wurden EA.hy 926 Zellen mit und ohne 3 $\mu\text{mol/l}$ Scriptaid 48h lang mit PMA inkubiert. Anschließend wurde die Nox4 mRNA Expression mittels quantitativer PCR untersucht.

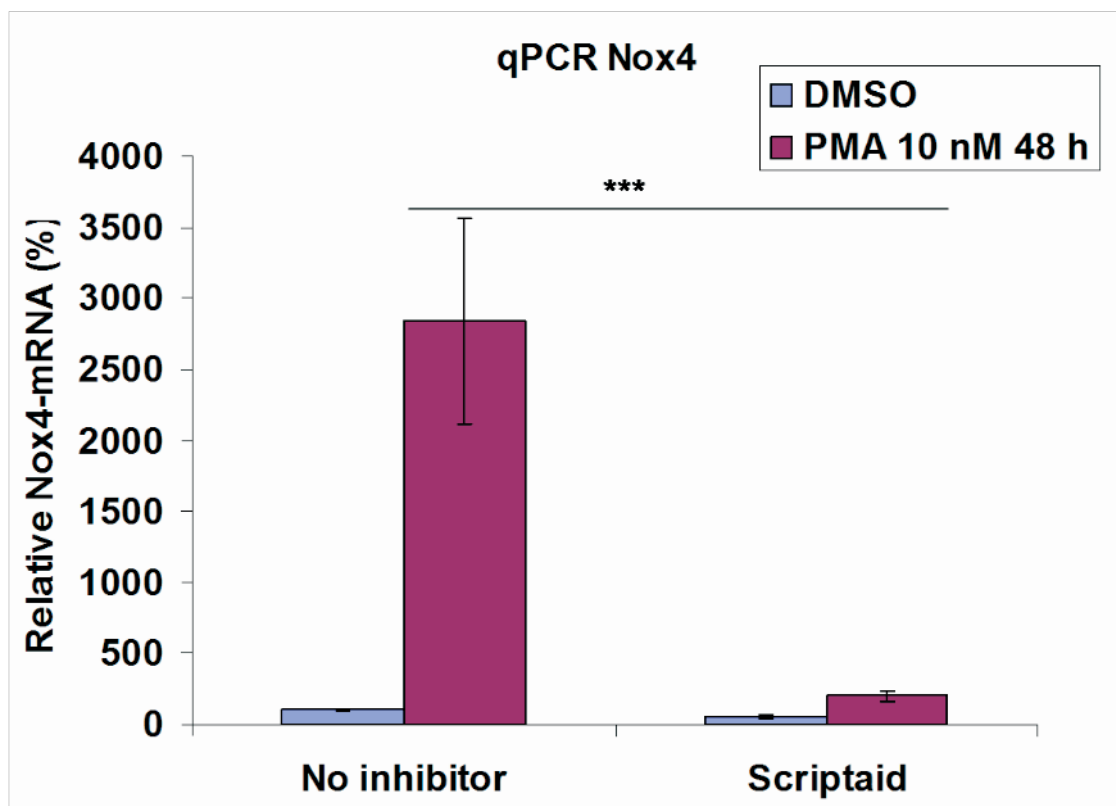


Abbildung 3.38: EA.hy 926 Zellen wurden für 48h mit 10 nmol/l PMA behandelt. Der HDAC Inhibitor Scriptaid wurde entweder zu Beginn des Versuches hinzugegeben (rechts) oder durch ein gleiches Volumen DMSO ersetzt (links). Die Zellen der Inhibitor-Gruppe wurde vor

PMA-Zugabe 30min alleine mit 3 $\mu\text{mol/l}$ Scriptaid vorbehandelt. Die Nox4 mRNA Expression wurde mit quantitativer RT-PCR analysiert. ($n = 6$; $***P < 0,001$)
Dieser hemmende Effekt konnte auch durch eine spätere Scriptaid-Gabe hervorgerufen werden. Dies ist in Abbildung 3.39 dargestellt, denn bei diesem Experiment wurde das Scriptaid erst 24h nach Start des 48-stündigen PMA Experimentes zu den EA.hy 926 Zellen gegeben. Nach weiteren 24h wurde dann die Nox4 mRNA Expression mittels quantitativer PCR analysiert. Wieder konnte eine massive Reduzierung der PMA vermittelten Nox4 Hochregulation festgestellt werden.

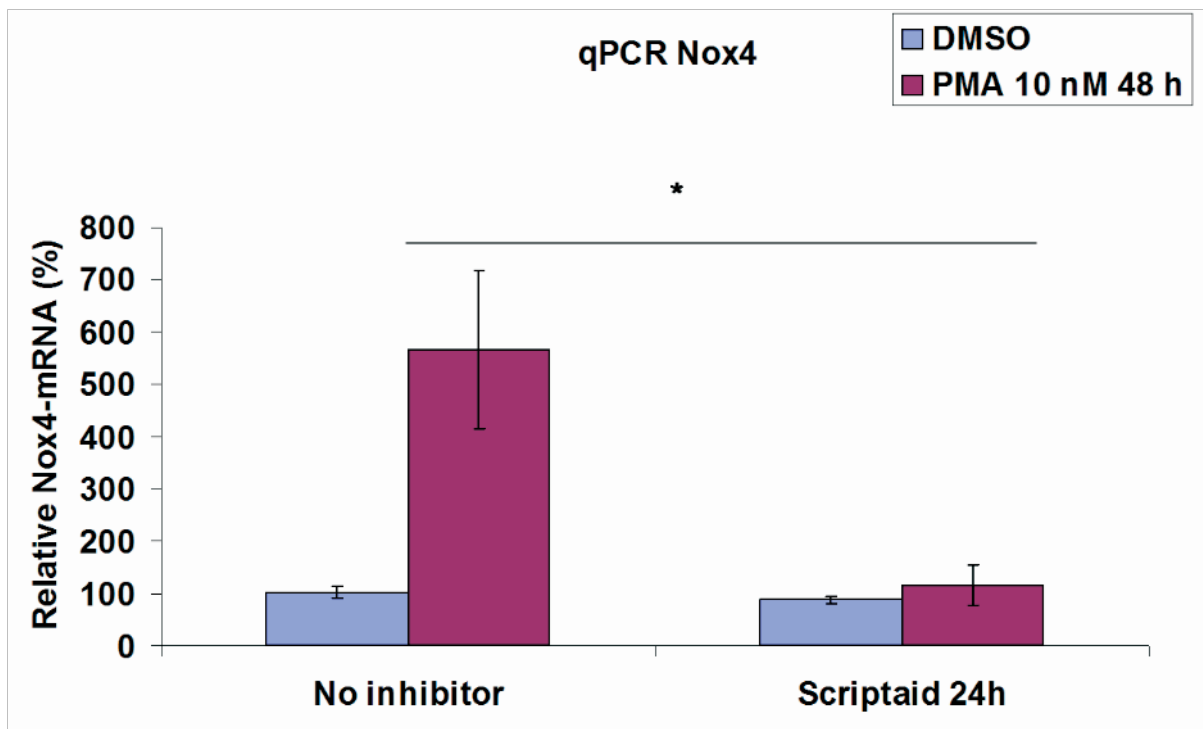


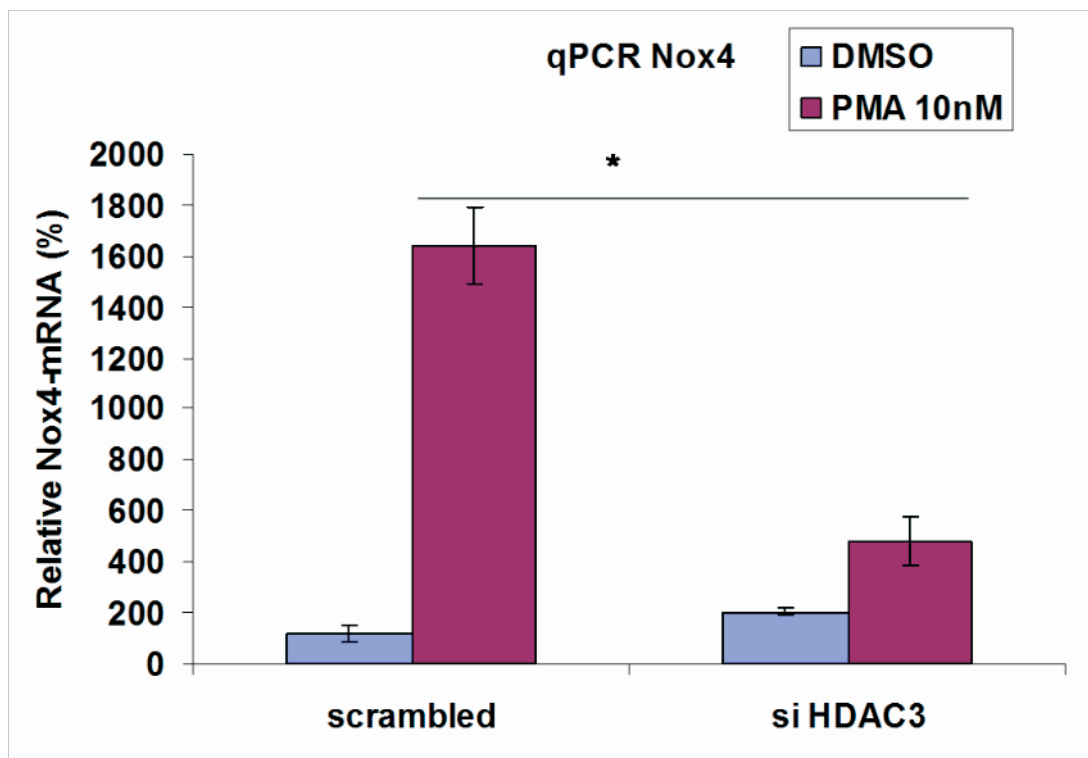
Abbildung 3.39: EA.hy 926 Zellen wurden für 48h mit 10 nmol/l PMA inkubiert. 24h nach Versuchsbeginn wurde DMSO (links), bzw. 3 $\mu\text{mol/l}$ Scriptaid (rechts) hinzugefügt ohne das Medium zu wechseln. Nach weiteren 24h Inkubation wurde das Experiment beendet. Die Nox4 mRNA Expression wurde mit quantitativer RT-PCR analysiert. ($n=3$; * $P < 0,05$)

Die Inhibierung von HDAC-Proteinen zeigte also einen unübersehbaren Einfluss auf die PMA-Wirkung bezüglich der Nox4 mRNA Expression. Leider sind viele kommerziell erhältliche Inhibitoren mit unkalkulierbaren Nebenwirkungen behaftet, so dass es ratsam ist, die mit Hilfe dieser Chemikalien gewonnenen Ergebnisse bestmöglich zu verifizieren.

Eine geeignete Wahl ist ein Protein-Knock-down mittels siRNA, allerdings werden im Fall von HDAC-Proteinen mehrere Isoformen exprimiert. Zeitgleich wurde von einem

Mitarbeiter der Arbeitsgruppe (Daniel Siuda) gefunden, dass für endotheliale Zellen HDAC3 maßgeblich ist.

Folglich wurden siRNA Experimente gegen HDAC3 unternommen und geprüft, ob der Knock-down dieser Isoform vergleichbare Effekte auslöste wie der Einsatz von Scriptaid. Im Rahmen dieser Testreihen zeigte sich, dass HDAC3 über eine enorme Stabilität verfügte. Aus diesem Grund wurden die 48-stündigen PMA Experimente erst 72h nach der siRNA Transfektion gestartet. Abbildung 3.40 (oben) zeigt einen höchst signifikanten Abfall der PMA vermittelten Nox4 Hochregulation. Außerdem war die basale Nox4 mRNA Expression signifikant angehoben worden. Aus Abbildung 3.40 (unten) wird außerdem ersichtlich, dass eine 48-stündige PMA Inkubation zu einer massiven Expressionserhöhung von HDAC3 mRNA führte. Diese Induktion wird allerdings abgefangen, wenn die EA.hy 926 Zellen zuvor mit siRNA gegen HDAC3 transfiziert worden waren.



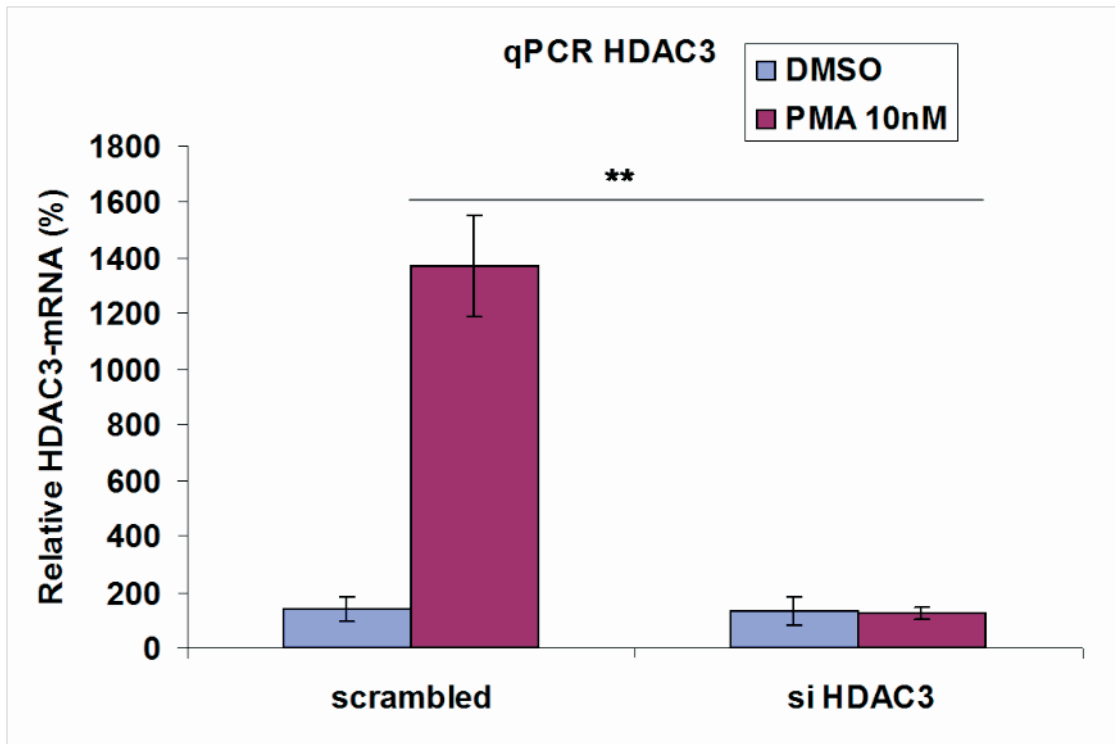


Abbildung 3.40: EA.hy 926 Zellen wurden entweder mit 50 nmol/l scrambled siRNA (links) oder mit 50 nmol/l HDAC3 siRNA (rechts) transfiziert. Nach 72h wurden die Zellen für 48h mit DMSO oder 10 nmol/l PMA stimuliert. Die Nox4 und HDAC3 mRNA Expression wurde mit quantitativer RT-PCR analysiert. (n=6; * P< 0,05; **P< 0,01)

Mittels Western Blot-Analyse wurde anschließend überprüft, ob die gestiegene HDAC3 mRNA Induktion ebenfalls zu einer erhöhten Proteinkonzentration geführt hatte. Aus Abbildung 3.41 kann entnommen werden, dass dies nicht der Fall gewesen war, wenn man Bandenpaar 1 (48h DMSO) mit Bandenpaar 2 (48h PMA) vergleicht. Folglich führte eine 48-stündige PMA-Inkubation zwar zu einer starken Zunahme von HDAC3 mRNA, das Proteinniveau wurde aber nicht verändert. Bandenpaar 3 und 4 zeigen die Wirksamkeit der siRNA gegen HDAC3. Die Proteinkonzentration war stark zurückgegangen unabhängig davon, ob die Zellen mit DMSO oder PMA behandelt worden waren.

~ Ergebnisse ~

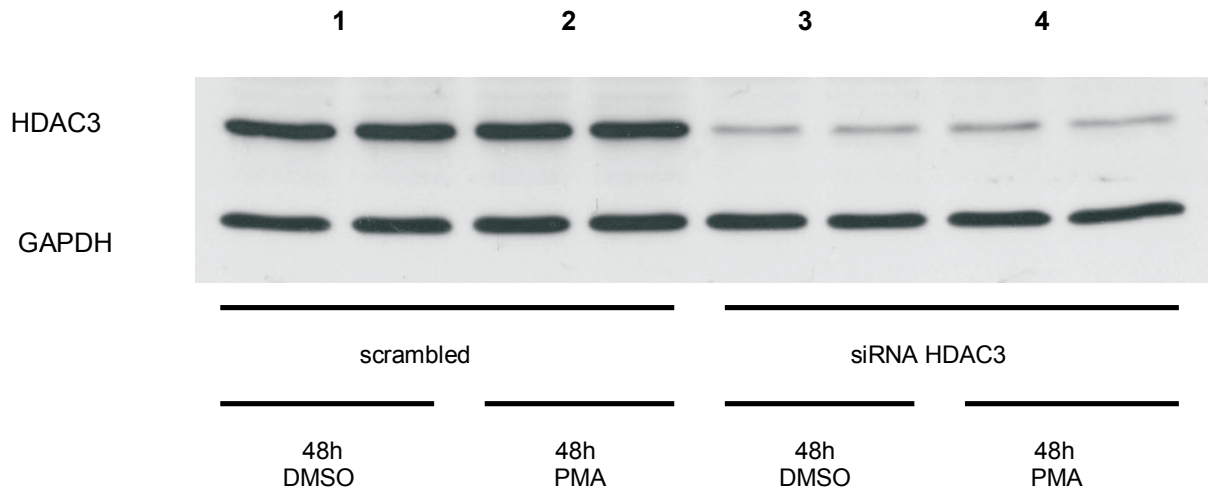


Abbildung 3.41: EA.hy 926 Zellen wurden entweder mit 50 nmol/l scrambled siRNA (Bandenpaar 1 und 2) oder mit 50 nmol/l HDAC3 siRNA (Bandenpaar 3 und 4) transfiziert. Nach 72h wurden die Zellen für 48h mit DMSO oder 10 nmol/l PMA stimuliert. Die Gesamtprotein-Lysate (35 µg) wurden mittels eines 10 %-igen SDS-Polyacryl-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und einer Western Blot-Analyse unterzogen. Die hier gezeigte Bilder sind repräsentativ für n = 3 Experimente.

Es hatte sich gezeigt, dass eine Blockierung von HDAC3 eine starke Reduzierung der PMA vermittelten Nox4 Hochregulation nach sich zog. Dieses Resultat war sehr überraschend, da aktives HDAC3 eher zu einem Rückgang von Transkriptionsvorgängen führen sollte. Eine Hyperacetylierung von Histonen führt zwar zu einer Entfaltung der DNA, jedoch lag nun der Verdacht nahe, dass der Überschuss von acetylierten Lysinresten von Histonen dennoch einen reduzierenden Einfluss auf die Transkription haben könnte.

In früheren Kapiteln konnte gezeigt werden, dass für die PMA vermittelte Nox4 Hochregulation Erk1/2, c-Fos und PKC delta eine wichtige Rolle spielen. Wenn eine Blockierung von HDAC3 zu einem Rückgang von Proteinen führen sollte, wurde im Folgenden untersucht, ob die erwähnten Kandidaten davon betroffen waren.

Hierfür wurden EA.hy 926 Zellen mit 50 nmol/l siRNA gegen HDAC3 transfiziert und 72h später über 48h 10 nmol/l PMA ausgesetzt. Anschließend wurden Proteinlysate hergestellt und Western Blots durchgeführt. Abbildung 3.42 zeigt, dass ein Knock-down von HDAC3 keinen Einfluss auf die Modifikation von PKC delta oder auf die Phosphorylierung von Erk1/2 hatte. Allerdings war eine deutliche Reduzierung der

basalen Proteinkonzentration von Phospho-Erk1/2 zu beobachten wenn HDAC3 fehlte (mittleres Bild, Bande 1 versus Bande 3).

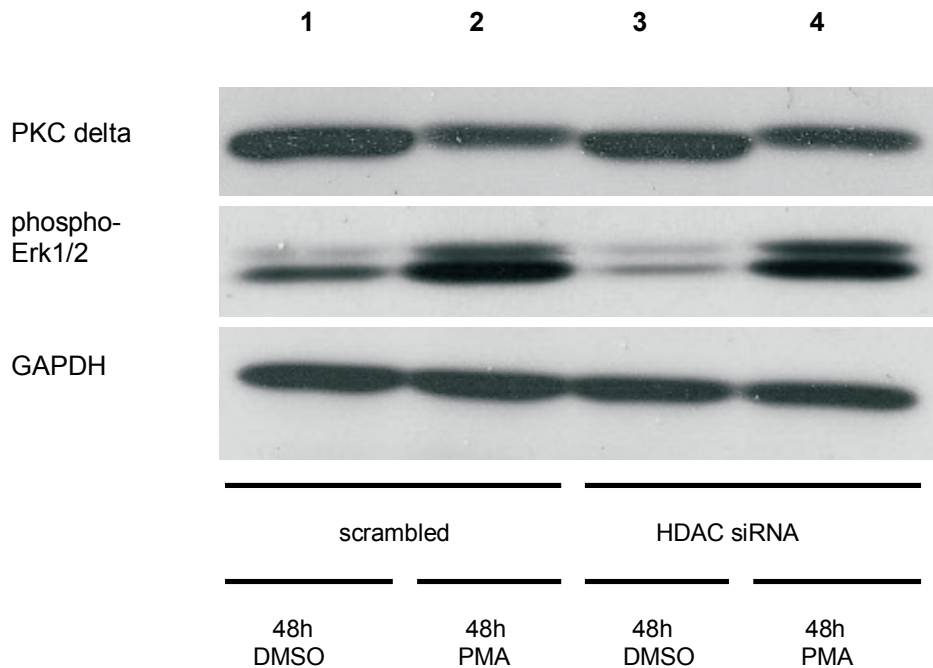


Abbildung 3.42: EA.hy 926 Zellen wurden entweder mit 50 nmol/l scrambled siRNA (Banden 1 und 2) oder mit 50 nmol/l HDAC3 siRNA (Banden 3 und 4) transfiziert. Nach 72h wurden die Zellen für 48h mit DMSO oder 10 nmol/l PMA stimuliert. Die Gesamtprotein-Lysate (35 µg) wurden mittels eines 10 %-igen SDS-Polyacryl-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und einer Western Blot-Analyse unterzogen. Die hier gezeigte Bilder sind repräsentativ für n = 3 Experimente.

Um den negativen Einfluss eines HDAC3 Knock-downs auf den Transkriptionsfaktor c-Fos zu überprüfen, wurde in einem weiteren Versuch die PMA-Inkubation ebenfalls 72h nach der Transfektion gestartet, dauerte aber nur drei Stunden, da nach dieser Zeit die stärkste c-Fos-Zunahme nachgewiesen werden konnte. Für die Western Blot-Analyse wurden auf gereinigte Kernprotein-Lysate verwendet. Abbildung 3.43 stellt deutlich dar, dass ein HDAC3 Knock-down keinen negativen Einfluss auf die c-Fos Proteinkonzentration ausübt.

~ Ergebnisse ~

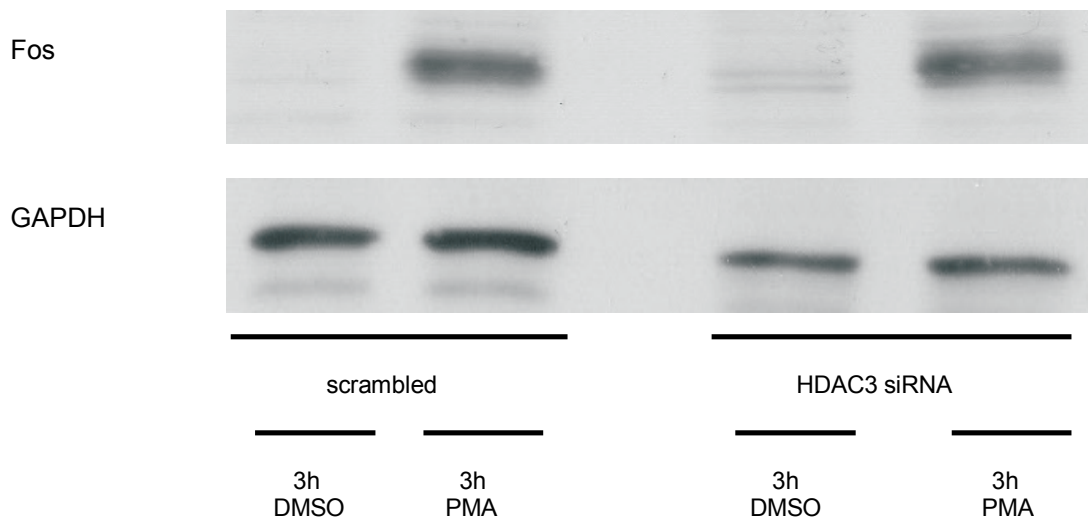


Abbildung 3.43: EA.hy 926 Zellen wurden entweder mit 50 nmol/l scrambled siRNA (links) oder mit 50 nmol/l HDAC3 siRNA (rechts) transfiziert. Nach 72h wurden die Zellen für 3h mit DMSO oder 10 nmol/l PMA stimuliert. Die Proteine wurden in eine zytoplasmatische und eine Kernfraktion getrennt und mittels eines 10 %-igen SDS-Polyacryl-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und einer Western Blot-Analyse unterzogen. Die hier gezeigte Bilder sind repräsentativ für n = 3 Experimente. Da c-Fos nicht im Cytoplasma vorkommt, wurde nur mit der Kernfraktion gearbeitet.

3.11 p53

Ein Übermaß von Nox4 Protein wird mit der Entstehung von oxidativen Stress in Verbindung gesetzt, der sich auf Dauer zellschädigend auswirkt. Werden Zellen irreversibel geschädigt, kommt es zu einer Akkumulation des Proteins p53, das neben vielen anderen Funktionen auch die Apoptose einleiten kann. Im Folgenden wurde untersucht, ob die von einer 48-stündigen PMA Inkubation vermittelte Nox4 mRNA Hochregulation mit einer Erhöhung der Proteinkonzentration von p53 korrespondiert. Hierfür wurde zunächst eine Testreihe mit siRNA gegen p53 durchgeführt, in der EA.hy 926 Zellen 24h, 48h und 72h nach der Transfektion für 48h mit 10 nmol/l PMA inkubiert wurden. Danach wurde die mRNA Expression von Nox4 und p53 mittels quantitativer PCR ermittelt. Von den drei Varianten erwies sich die 48-stündige siRNA Inkubationszeit als optimal. Aus Abbildung 3.44 (oben) wird ersichtlich, dass eine PMA vermittelte Nox4 Hochregulation nicht durch einen Knock-down von p53 aufzuheben war, anders war es bei der basalen Nox4 mRNA Expression, die unter diesen Versuchsbedingungen beinahe komplett ausgeschaltet worden war. Abbildung 3.44 (unten) zeigt, dass PMA auch zu einer Anhebung der mRNA Expression führt. Das Gesamtausmaß der Nox4 mRNA Hochregulation fiel bei diesem Experiment geringer als gewohnt aus, ist aber ein mögliches Erscheinungsbild wenn die Zellen Transfektionsprozeduren unterzogen worden waren.

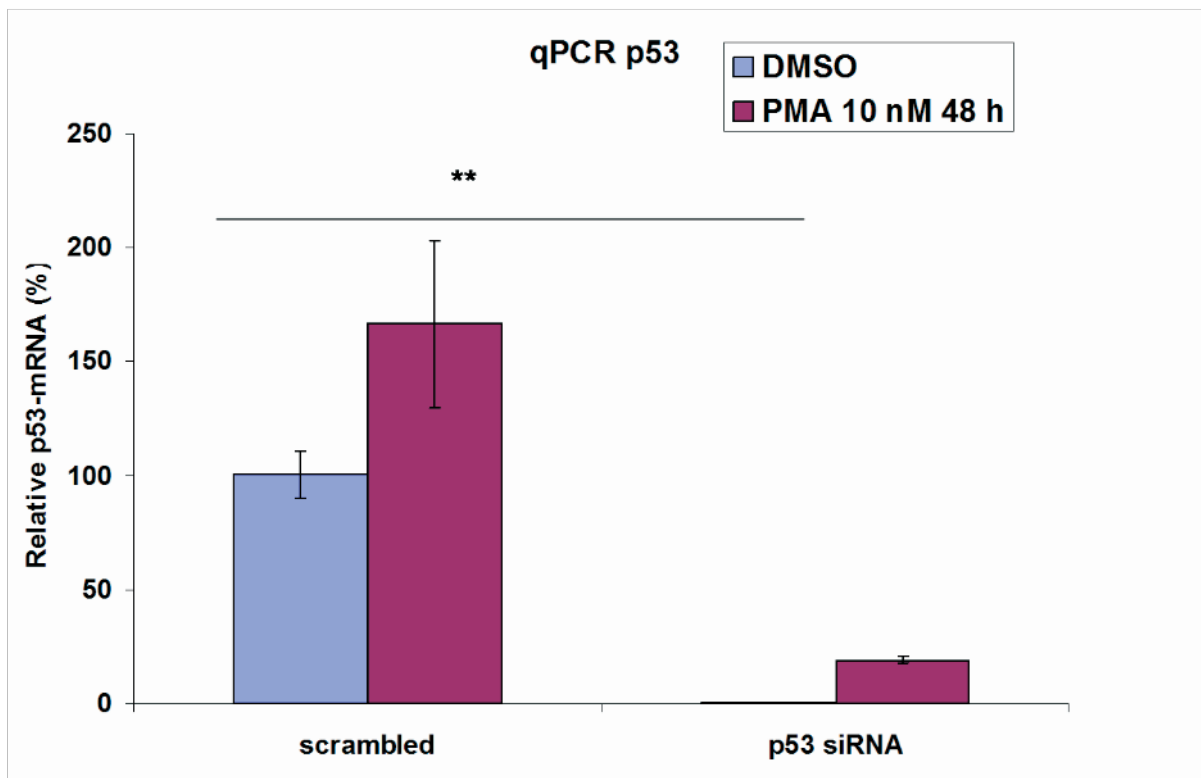
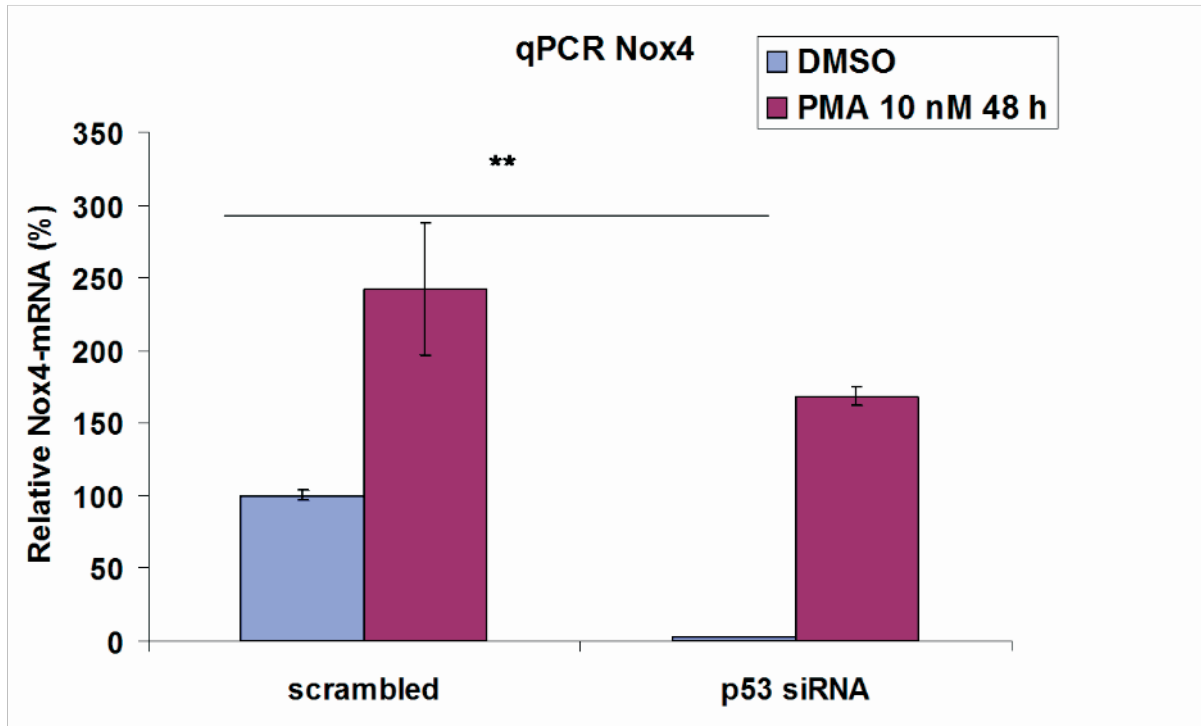


Abbildung 3.44: EA.hy 926 Zellen wurden entweder mit 50 nmol/l scrambled siRNA (links) oder mit 50 nmol/l p53 siRNA (rechts) transfiziert. Nach 48h wurden die Zellen für 48h mit DMSO oder 10 nmol/l PMA stimuliert. Die Nox4 und p53 mRNA Expression wurde mit quantitativer RT-PCR analysiert. (n=3; **P< 0,01)

Um einen Einblick zu erhalten, welchen Einfluss PMA auf das Proteinniveau von p53 hat und um die Wirksamkeit der siRNA gegen dieses Protein zu untermauern, wurden EA.hy 926 Zellen 48h nach der Transfektion für 48h mit 10 nmol/l PMA behandelt. Danach wurden Gesamtprotein-Lysate hergestellt und eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Der Vergleich der Bandenpaare 1 und 2 in Abbildung 3.45 zeigt eine ausgezeichnete Wirksamkeit der siRNA, da das Protein nach der Transfektion nur noch in Spuren nachgewiesen werden konnte. Die Bandenpaare 3 und 4 entsprechen hinsichtlich der siRNA Transfektionen den Bandenpaaren 1 und 2, diese Zellen wurden allerdings mit 10 nmol/l PMA behandelt. Folglich kann die Aussage getroffen werden, dass das Proteinniveau von p53 nicht von der PMA Inkubation beeinflusst worden war.

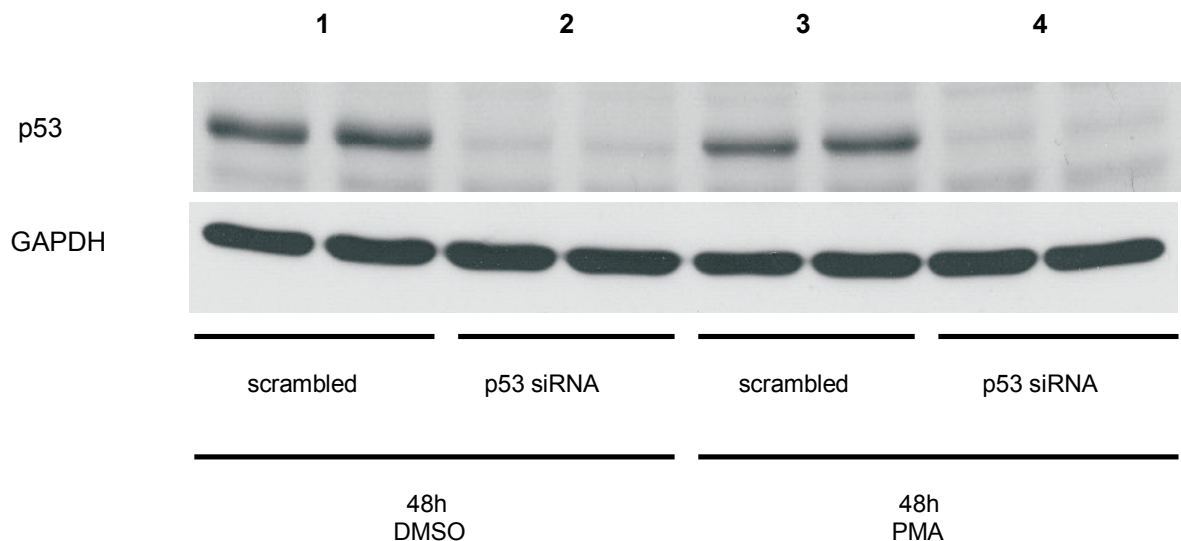


Abbildung 3.45: EA.hy 926 Zellen wurden entweder mit 50 nmol/l scrambled siRNA (Bandenpaar 1 und 3) oder mit 50 nmol/l p53 siRNA (Bandenpaar 2 und 4) transfiziert. Nach 48h wurden die Zellen für 48h mit DMSO oder 10 nmol/l PMA stimuliert. Die Gesamtprotein-Lysate (35 µg) wurden mittels eines 10 %-igen SDS-Polyacryl-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und einer Western Blot-Analyse unterzogen. Die hier gezeigte Bilder sind repräsentativ für n = 3 Experimente.

3.11.1 Die Verlinkung von Nox4 und p53

Dieses Kapitel soll die Beobachtung beleuchten, dass ein Knock-down von p53 Protein einen massiven Abfall der basalen Nox4 mRNA Expression verursacht hatte. Es stellte sich die Frage, ob diese Korrelation auch im umgekehrten Fall real war. Es sollte also geklärt werden, ob eine künstliche Erhöhung von p53 zu einer Expressionssteigerung von Nox4 mRNA in EA.hy 926 Zellen führen würde.

Das Protein p53 wird verstärkt gebildet, wenn ungünstige Bedingungen andauern, so dass für die Zellen der programmierte Zelltod eingeleitet wird. Aus der Literatur ist zu entnehmen, dass dies durch gezielten Nährstoffmangel künstlich bewerkstelligt werden kann (Okoshi et al., 2008). Dabei werden die Zellen mit einem Mangelmedium inkubiert, das frei von Wachstumsfaktoren, Glucose oder essentielle Aminosäuren ist. Ein anderes Beispiel stellt der totale Entzug aller Nährstoffe dar und kann durch den Tausch des Mediums mit physiologischem Waschpuffer (PBS) durchgeführt werden. In diesem Fall sollte ein gleichzeitiger Mangel sämtlicher Nährfaktoren eingeleitet werden. Hierzu wurden EA.hy 926 Zellen für 24h mit normalem Zuchtmedium oder mit einer 1:5 Medium/PBS Verdünnung inkubiert. Vor Versuchsbeginn wurden alle Zellen gründlich mit PBS gespült, damit mögliche Rückstände des normalen Mediums keine Verfälschungen der Ergebnisse verursachen konnten. Nach 24h wurden die mRNA Expressionen von Nox4 und p53 mittels quantitativer PCR analysiert.

Abbildung 3.46 zeigt, dass die gewählte Methode geeignet war, um eine Steigerung der p53 mRNA herbeizuführen. Darüber hinaus konnte eine Korrelation mit der Nox4 Expression festgestellt werden, die ebenfalls hoch signifikant angestiegen war.

~ Ergebnisse ~

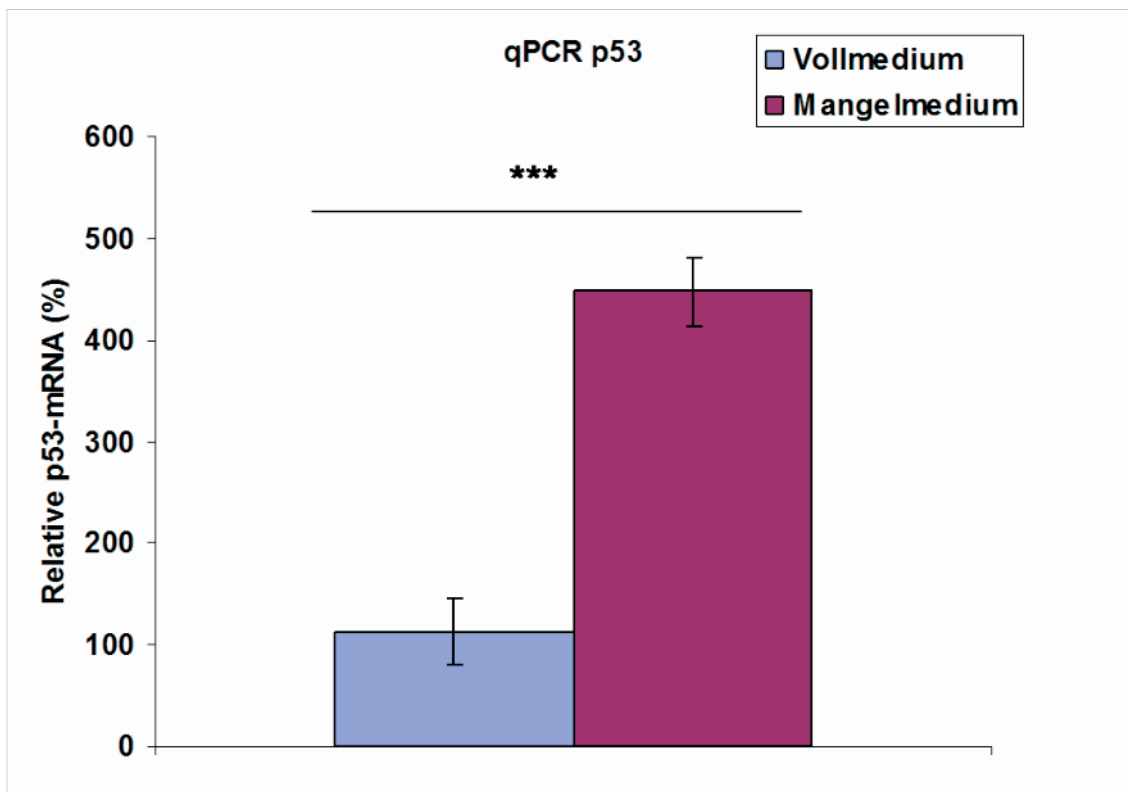
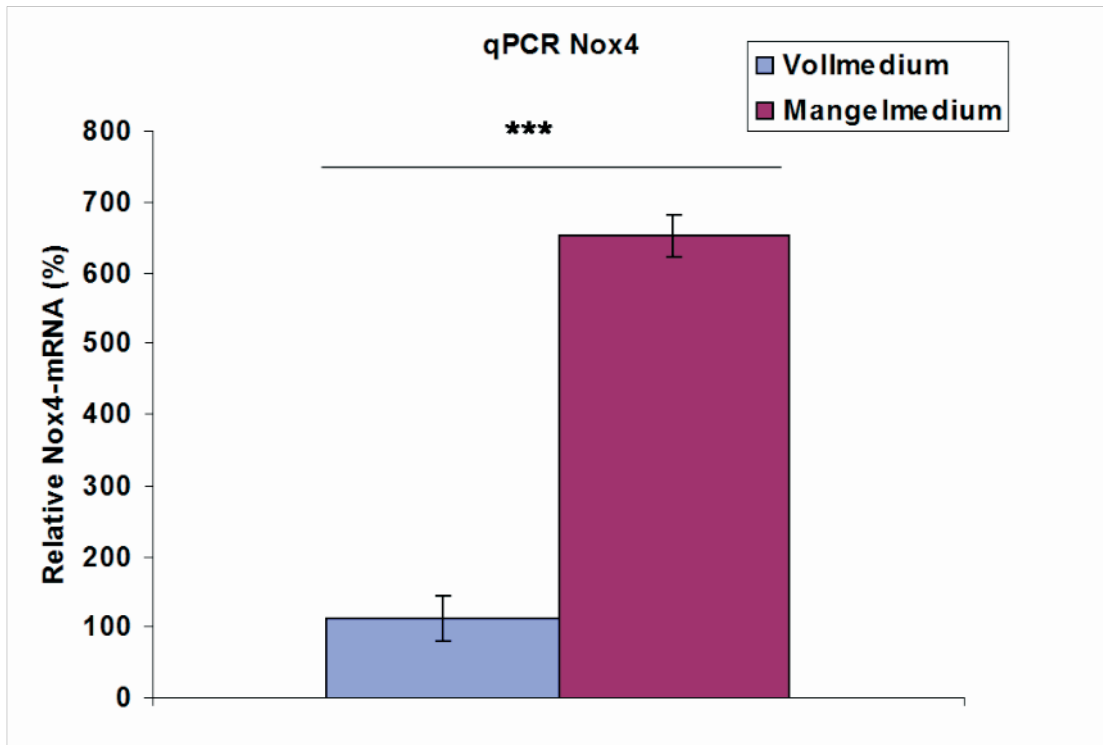


Abbildung 3.46: EA.hy 926 Zellen wurden für 24h mit normalen Vollmedium, oder mit einer 1:5 Medium/PBS-Verdünnung inkubiert. Vor Versuchsbeginn wurden alle Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Die Nox4 und p53 mRNA Expression wurde mit quantitativer RT-PCR analysiert. (n=3; ***P< 0,001)

Nach der Beobachtung, dass eine 24-stündige Mangelmedium Inkubation sowohl eine Steigerung von Nox4 als auch eine p53 mRNA Expression induzierte, sollte in einem weiteren Experiment untersucht werden, ob diese Nox4 Induktion abhängig von p53 sein würde. Hierzu wurden EA.hy 926 Zellen mit siRNA gegen p53 transfiziert, um sie dann 24h später für 24h mit einer 1:5 Zuchtmedium/PBS-Verdünnung zu inkubieren. Anschließend wurden die Nox4 mRNA mittels quantitativer PCR analysiert. Aus Abbildung 3.47 kann entnommen werden, dass durch das angewandte Mangelmedium erneut eine Steigerung der Nox4 mRNA eingeleitet werden konnte. Augenscheinlich wird diese Induktion massiv geblockt, wenn zuvor p53 mittels siRNA ausgeschaltet worden war. Allerdings muss bei der siRNA-Gruppe bedacht werden, dass der p53 Knock-down für einen massiven Einbruch der basalen Nox4 mRNA Expression geführt hatte. Folglich war der Anstieg der Nox4 mRNA bei der scrambled siRNA Gruppe 9,1-fach, bei der p53 siRNA Gruppe 6,1-fach.

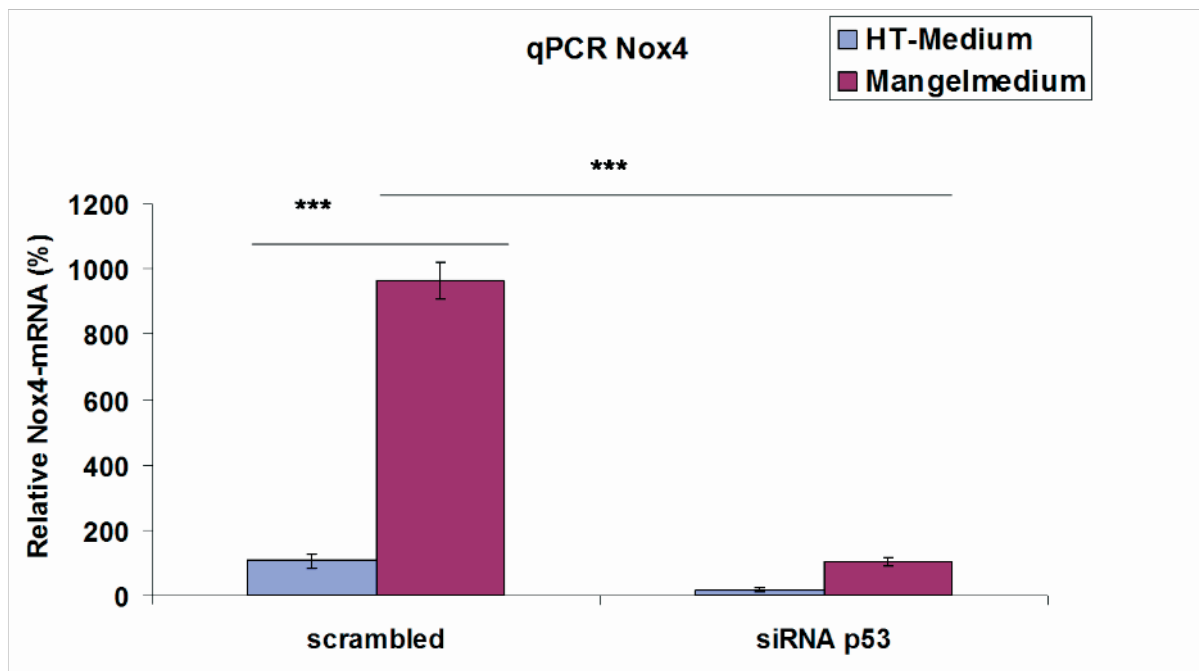


Abbildung 3.47: EA.hy 926 Zellen wurden entweder mit 50 nmol/l scrambled siRNA (links) oder mit 50 nmol/l p53 siRNA (rechts) transfiziert. Nach 24h wurden die Zellen für 24h mit normalem Vollmedium, oder mit einer 1:5 Medium/PBS Verdünnung inkubiert. Die Nox4 und p53 mRNA Expression wurde mit quantitativer RT-PCR analysiert. (n=3; ***P< 0,001)

Zeitgleich wurde mittels Western Blot auf Veränderungen des p53 Proteingehaltes geprüft. Abbildung 3.48 zeigt, dass die 24-stündige Mangelmedium Inkubation zu einem deutlichen Anstieg des p53 Proteingehaltes geführt hatte (Bande 1 versus 2). Dieser Anstieg wurde durch Einsatz von p53 siRNA abgefangen (Bande 2 versus 4), so dass die Wirksamkeit der siRNA bewiesen war.

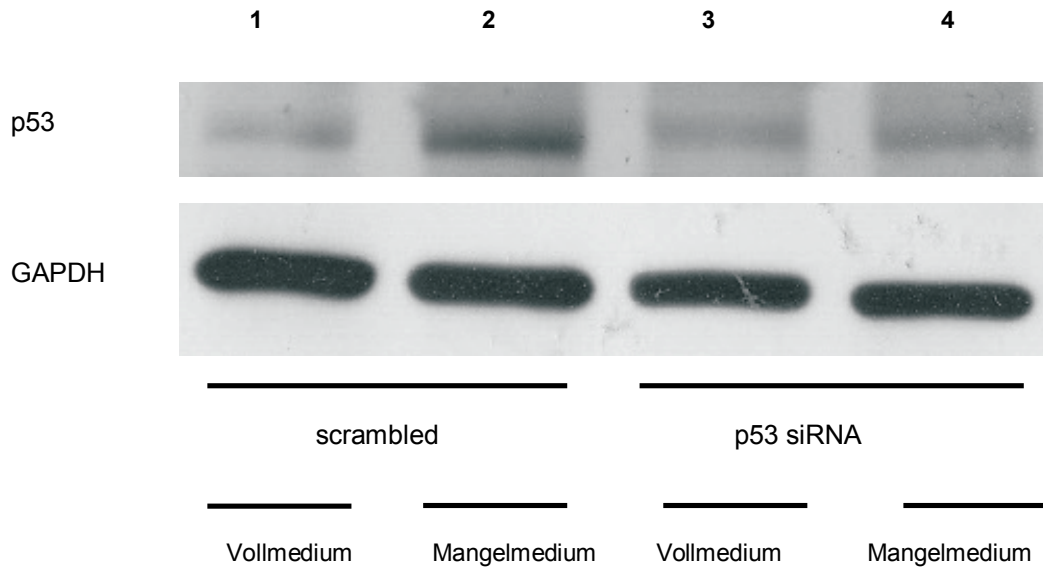


Abbildung 3.48: EA.hy 926 Zellen wurden entweder mit 50 nmol/l scrambled siRNA (Banden 1 und 2) oder mit 50 nmol/l p53 siRNA (Banden 3 und 4) transfiziert. Nach 24h wurden die Zellen für 24h mit normalem Vollmedium, oder mit einer 1:5 Medium/PBS-Verdünnung inkubiert. Die Gesamtprotein-Lysate (35 µg) wurden mittels eines 10 %-igen SDS-Polyacryl-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und einer Western Blot-Analyse unterzogen. Die hier gezeigte Bilder sind repräsentativ für n = 3 Experimente.

4 Diskussion

Die Nox4-Expression in vaskulären Endothelzellen ist für den Organismus lebensnotwendig, da das Protein unerlässlich für die Proliferation und Koordination der Blutgefäße ist (Petry et al., 2006). Die Schattenseite von Nox4 zeigt sich jedoch, sobald eine Störung der Genregulation zu einer Überproduktion führt (Bedard & Krause, 2007). Dies ist durch den Umstand begründet, dass Nox4 konstitutiv aktiv ist, da für die ROS-Produktion keine zusätzlichen Regulationsproteine notwendig sind. Liegt nun eine Überproduktion dieser NADPH-Oxidase vor, führt dies zu oxidativem Stress, der mit der Entstehung von atherosklerotischen Veränderungen in Blutgefäßen in Verbindung gesetzt wird.

Somit ist es unerlässlich, die unterschiedlichen Stimuli und Signaltransduktionswege zu verstehen, die zu einer Expressionssteigerung von Nox4 führen.

4.1 Proteinkinase C

In der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass die späte PMA-induzierte Nox4-Hochregulation initial über Proteinkinase C vermittelt wird, da dieser Effekt vollständig durch die gleichzeitige Gabe eines PKC-Inhibitors (Gö 6983) abgewendet werden konnte (siehe Abbildung 3.1). Des Weiteren konnte die Entdeckung verifiziert werden, dass es sich bei der beteiligten Isoform um PKC alpha handelt, da ein Knock-down dieser Kinase zu einem Einbruch der späten Nox4-mRNA-Hochregulation führt (siehe Abbildung 3.2).

Der Phorbolester PMA gilt als sehr potenter Aktivator von klassischen und neuen PKC-Isoformen, wobei Dauerinkubationen diesen Effekt umkehren (Kugiyama et al., 1992). Dies ist auf einer Gegenregulation begründet, die zu einem proteolytischen Abbau der daueraktivierten PKC-Isoformen führt (siehe Abbildung 3.3).

In Säugerzellen werden alle PKC-Isoformen (siehe Einleitung) exprimiert, das Expressionsmuster unterscheidet sich aber in der Verteilung innerhalb der

Zellkompartimente, der Aktivitätsregulierung und in der Art der vermittelten Information, die zwischen den verschiedenen Isoformen auch gegenteilig sein kann (Proliferation versus Apoptose).

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass den verschiedenen Mitgliedern der PKC-Familie eine große Rolle in der Weiterleitung von unterschiedlichen Stresssignalen zuzuschreiben ist. Darunter zählen unter anderem zytotoxische Chemikalien, physikalische Dehnung, osmotischer Stress, Hypoxie und andere belastende Einflüsse (Jiang, Zhang, & Dusing, 2011), (Kugiyama et al., 1992), (Goldberg, Zhang, & Steinberg, 1997), (Suzuma et al., 2002). Demnach kann PKC als Stresssensor angesehen werden, was auch bei vaskulären Endothelzellen der Fall ist. Quagliari et al. belegte in Endothelzellen eine durch Glucose-Inkubationen verursachte Hochregulierung von Nox, die jedoch mittels PKC-Inhibitoren abgeflacht werden konnte (Quagliari et al., 2003).

PKC alpha wird mit proliferatorischen und antiapoptotischen Mechanismen in Verbindung gesetzt: in mehreren Zellsystemen führen Knock-down-Versuche dieser Isoform zu einer starken Abnahme des Zellwachstums und zu einer Zunahme der Apoptose (Whelan & Parker, 1998). Ein weiteres Beispiel für die proliferierende Wirkung stellt die Beobachtung dar, dass in vielen schnell wachsenden Tumorzellen eine starke PKC alpha Aktivität feststellbar ist (Hanauske, Sundell, & Lahn, 2004).

4.2 Die Rolle der MAP-Kinase Erk1/2

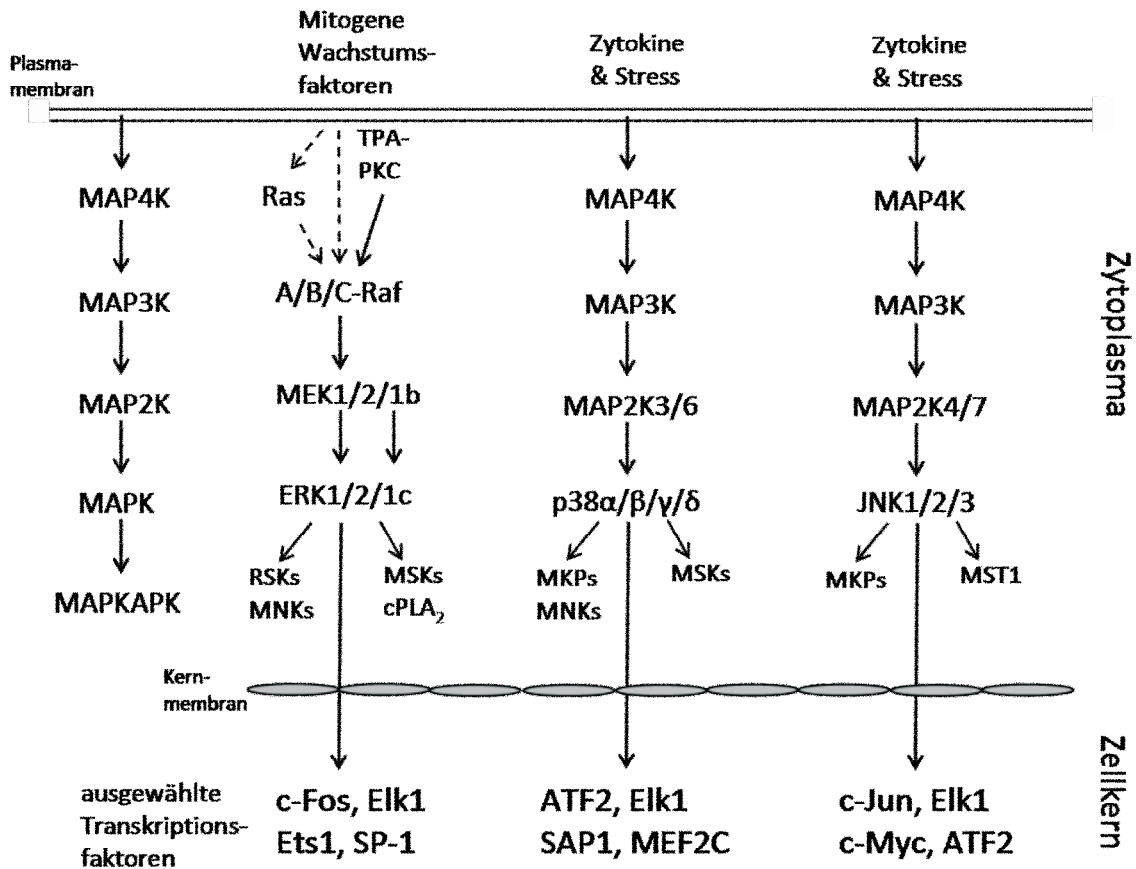


Abbildung 4.1: Die Familie der MAP-Kinase (angelehnt an Roskoski 2012)

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die MAP-Kinase (Mitogen-activated-Kinase) Erk1/2 eine entscheidende Rolle in der späten PMA-vermittelten Nox4-mRNA-Expression spielt. Die Aktivierung von Erk1/2 ist upstream abhängig von der dual-spezifischen Tyrosin/Threonin-Kinase MEK1, die durch den spezifischen Inhibitor PD 98059 gehemmt werden kann. Durch den indirekten Block des Erk1/2 Signalweges konnte die PMA-vermittelte Nox4-mRNA-Hochregulation signifikant abgeflacht werden (siehe Abbildung 3.5). Eine Überprüfung mittels Western Blot bestätigte zwar die Wirksamkeit des Inhibitors, da die aktivierende Phosphorylierung von Erk1/2 stark abnahm, jedoch verblieb stets eine Restaktivität, die durch PD 98059 nicht geblockt werden konnte (siehe Abbildung 3.7). Ein Knock-down von Erk1/2 via siRNA bewirkte im Vergleich zu dem Inhibitor eine deutlich

stärkere Abflachung der PMA-vermittelten Nox4-mRNA-Hochregulierung (siehe Abbildung 3.9).

Die Familie der MAP-Kinase beinhaltet verschiedene zytoplasmatische Serin/Threonin-Kinasen, die eine rasche Signaltransduktion von der Zelloberfläche in das Zellinnere bewerkstelligen (Roskoski, 2012). Neben Erk1/2 (Extracellular Signal-Related Kinase) sind noch JNK (c-Jun N-Terminal Proteinkinase) und p38 MAP-Kinase bekannt (siehe Abbildung 4.1).

Alle drei Subtypen werden über eine mehrstufige Signalkaskade aktiviert, wobei die Erk1/2-Transduktion am besten untersucht ist. Für die Aktivierung von Erk1/2 sind die Threonin/Tyrosin-Kinasen MEK1, MEK2 und MEK5 (MAPK-Erk-Kinase) zuständig, wobei angenommen wird, dass MEK1 und MEK2 einzig Erk1/2 als Substrat haben (Roskoski, 2012). Upstream der MEKs befindet sich die erste Kinase der Signalkette und wird allgemein als MAP-Kinase-Kinase-Kinase bezeichnet. Verständlich, dass auch die Bezeichnung MAP3K in Gebrauch ist. Bei der MAP3K von Erk1/2 handelt es sich die Kinase c-Raf, die die MEKs an zwei Serinresten phosphoryliert und aktiviert. Die Aktivierung von Raf ist noch nicht lückenlos geklärt, jedoch ist unstrittig, dass für eine vollständige Aktivierung eine Wechselwirkung mit Ras (einem kleinen G-Protein) stattfinden muss (Leevers, Paterson, & Marshall, 1994). JNK und p38-MAPK werden über eine vergleichbare Kaskadenkette aktiviert, allerdings sind dabei andere MAP3Ks und MAP2Ks involviert. Die drei MAP-Kinasen unterscheiden sich auch in der Informationsvermittlung: Erk1/2-Aktivierung leitet proliferatorische Signale weiter. In vielen Zellsystemen führt ein Erk1/2-Knock-down zu einer Abnahme der Zellteilung, umgekehrt finden sich in vielen Tumorzellen eine gesteigerte Erk1/2-Aktivität. JNK und p38-MAPK werden durch Stressfaktoren, wie einem Mangel an Wachstumsfaktoren, ionisierende Strahlung oder Entzündungsmediatoren aktiviert und leiten bei anhaltender Aktivierung die Apoptose ein. Im folgenden Abschnitt wird näher auf Erk1/2 eingegangen, da dieser Signalweg eine sehr wichtige Rolle in der späten PMA-vermittelten Nox4-mRNA-Hochregulation einzunehmen scheint.

4.2.1 Die Aktivierung von Erk1/2

Interessanterweise führte die Phorbolster-Inkubation zu einer ungewöhnlichen Daueraktivierung von Erk1/2 (siehe Abbildung 3.7), wobei das nachträgliche Zufügen (24h und 30h nach Versuchsstart) von PD 98059 eine reduzierende Wirkung auf die späte Nox4-mRNA-Expression hatte (siehe Abbildung 3.6). Dieses Ergebnis ist ein Indiz dafür, dass Erk1/2 nicht nur anfänglich für die Weitergabe des PMA-Signals von Bedeutung ist, sondern auch zu späteren Zeitpunkten zumindest eine modulierende Rolle in der PMA-vermittelten Nox4-mRNA-Expression einzunehmen scheint.

Da die Aktivierung von Erk1/2 MAP-Kinase eine zentrale Rolle in der Vermittlung von zahlreichen Zellantworten auf unterschiedliche Reize darstellt, werden im Folgenden einige bedeutsame Mechanismen näher erläutert.

Binden mitogene Wachstumsfaktoren (EGF, VEGF und andere) an membranständige Rezeptortyrosinkinasen (RTK) folgt die Formation eines Rezeptorsignalkomplexes. Dabei dockt die SH3-Domäne des Adapterproteins Grb2 an die prolinreiche Sequenz von SOS, einem „*guanine nucleotide exchange factor*“, der anschließend von dem kleinen G-Protein ras GDP entfernt und mit GTP ersetzt. Das nun aktivierte ras interagiert dann mit der MAP3K c-Raf, woraufhin das proliferatorische Signal über Erk1/2 weitergeleitet werden kann (siehe Abbildung 4.7).

Inzwischen ist bekannt, dass auch physikalische Kräfte ein Signal für Endothelzellen darstellen, dass über Erk1/2 weitergeleitet wird, um Anpassungsprozesse für die veränderten Umwelteinflüsse zu ermöglichen. So konnte in retinalen Endothelzellen streckungsinduziert eine rasche und heftige Erk1/2-Aktivierung nachgewiesen werden, die durch die Verwendung von PKC-Inhibitoren abgewendet werden konnte (Suzuma et al., 2002). Verschiedene PKC-Isoformen können demnach mit dem Erk1/2 Signalweg kommunizieren, wobei dies über eine Phosphorylierung der MAP3K Raf geschieht (siehe Abbildung 4.1 und Abbildung 4.7).

Ein weiteres Beispiel, dass Erk1/2 in der Weiterleitung von physischen Kräften involviert ist, zeigen Studien von Endothelzellen, die turbulenten Flüssigkeitsströmen ausgesetzt wurden (Traub & Berk, 1998). Die Scherkräfte bewirkten eine Aktivierung von Erk1/2, die ebenfalls durch Verwendung von PKC-Inhibitoren abgewendet

werden konnte. Auch in diesem Fall wurde die Aktivierung von Erk1/2 über die Phosphorylierung von Raf eingeleitet (siehe Abbildung 4.7). Die dabei beteiligten Isoformen wurden als PKC alpha und PKC epsilon identifiziert (Traub & Berk, 1998). Die Aktivierung von Erk1/2 unterliegt einer strengen Kontrolle, so dass die meisten Publikationen nur kurze aktive Zeitspannen erwähnen (Fujioka et al., 2006). Die Notwendigkeit für eine strenge Regulierung von Erk1/2 wird durch die Tatsache verdeutlicht, dass in ca. 30% aller Tumorgewebe eine Überaktivität dieses Signalweges vorliegt (Hoshino et al., 1999). Für die Dephosphorylierung sind Proteintyrosin-Phosphatasen (PTPs) zuständig, die eine essentielle Rolle in der Herunterregulierung von Signalwegen spielen, die von aktivierten Rezeptortyrosinkinasen stammen.

Oxidativer Stress stellt einen weiteren Auslöser für die Aktivierung von Erk1/2 dar. Dies liegt an der Tatsache, dass Proteintyrosin-Phosphatasen (PTPs) durch intrazellulären ROS ausgeschaltet werden. Durch den Wegfall der dephosphorylierenden Wirkung ist an den RTKs eine Formation von Rezeptorsignalkomplexen möglich, ohne vorangegangene Bindung eines Wachstumsfaktors (Jiang et al., 2011). Durch diese Hemmwirkung scheint ROS eine modulierende Rolle in verschiedenen Signalwegen einzunehmen. So konnte in Nox4-überexprimierenden vaskulären Endothelzellen gezeigt werden, dass eine VEGF-vermittelte Angiogenese und proliferatorische Prozesse maßgeblich verstärkt werden (Datla et al., 2007).

4.2.2 Down-stream von Erk1/2

Dem aktivierten Erk1/2 steht eine Vielzahl von Zielsubstraten zur Verfügung, die dann bevorzugt an Prolin-benachbarten Serin- und Threonin-Resten phosphoryliert werden. Erk1/2 phosphoryliert cytoplasmatische Proteine direkt, muss aber zur Phosphorylierung von Kernsubstraten erst in den Zellkern wechseln, wobei der dabei beteiligte Mechanismus bis heute unklar ist (passiver Prozess versus aktiven Transport).

In dieser Arbeit konnte durch die Inhibierung des Transkriptionsfaktors Elk-1 (mittels siRNA) eine signifikante Verminderung des PMA-Effektes auf die Nox4-mRNA-

Expression bewirkt werden (siehe Abbildung 3.10). Dabei handelt es sich um ein Mitglied der Ets-Transkriptionsfaktoren (*E26 transformation-specific* oder *E-twenty-six family*), die ursprünglich in dem Retrovirus E26 entdeckt worden waren, welche bei Mäusen Erythroblastose und bei Hühnern Myoblastose verursachte (Leprince et al., 1983). Bald darauf wurden auch humane Homologe dieser Transkriptionsfamilie ausgemacht (de Taisne, Gegonne, Stehelin, Bernheim, & Berger, 1984), darunter auch Elk-1 (*Ets-like factor-1*), der als Bestandteil eines ternären Komplexes identifiziert worden war. Deswegen wird Elk-1 heute zu den TCFs (*ternary complex factor*) gezählt, einer Untergruppe der Ets-Familie. Durch die Phosphorylierung von Elk-1 über Erk1/2 ist ein direkter Link zwischen einer Proteinkinase getragenen Signaltransduktion zu einer daraus resultierenden Gentranskription erstellt (Janknecht et al., 1993).

Die Besonderheit von Elk-1 ist die Tatsache, dass dieser Transkriptionsfaktor in der Lage ist, an zwei unterschiedlichen Promotorsequenzen zu binden, was die Bandbreite der transkribierten Gene erweitert (siehe Abbildung 4.2). Das Transkriptionsverhalten von Elk-1 ist davon abhängig, ob nach der Phosphorylierung sofort die Arbeit als Transkriptionsfaktor aufgenommen wird, oder ob zunächst eine Bildung eines ternären Komplexes folgt.

Im ersten Fall bindet Elk-1 direkt mit seiner Ets-Domäne an entsprechenden Promotorsequenzen. Ein Beispiel für diesen Weg stellt die Promotorsequenz des Oncogens Ick (*lymphocyte-specific proteintyrosinkinase*) dar (siehe Abbildung 4.2). Ob in der PMA-vermittelten Nox4-mRNA-Hochregulation ein Genprodukt involviert ist, das über die Aktivierung eines Ets-Promotors hervorgegangen ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden.

Im zweiten Fall bindet Elk-1 über seine B-Domäne zwei SRFs (*serum response factors*). Als ternärer Komplex folgt anschließend die Transkription von Genen, deren Promotorsequenz ein SRE (*serum response element*) tragen. Die Formation des ternären Elk-1/SRF/SRF-Komplex ist für die Erk1/2-getragene Induktion des Oncogens c-Fos (*feline osteosarcoma virus*) essentiell. Zellen, in denen eine dysfunktionale Variante von SRF vorliegt, sind nicht mehr in der Lage, auf mitogene Reize mit der Induktion von c-Fos zu reagieren, da Elk-1 alleine keine stabile Bindung zu SRE-Sequenzen der DNA aufnehmen kann (Gille et al., 1995).

Die Induktion von c-Fos ist eine Antwort auf verschiedene Stimuli, wie mitogene Reize oder Stressfaktoren, und spielt als Bestandteil des AP-1 Transkriptionsfaktors

eine wichtige Rolle, um die Zelle rasch auf veränderte Umweltbedingungen einzustellen.

Da im Rahmen dieser Arbeit auch eine Involvierung in der PMA-Wirkung festgestellt worden ist, wird dieses Protein im nächsten Kapitel genauer beleuchtet.

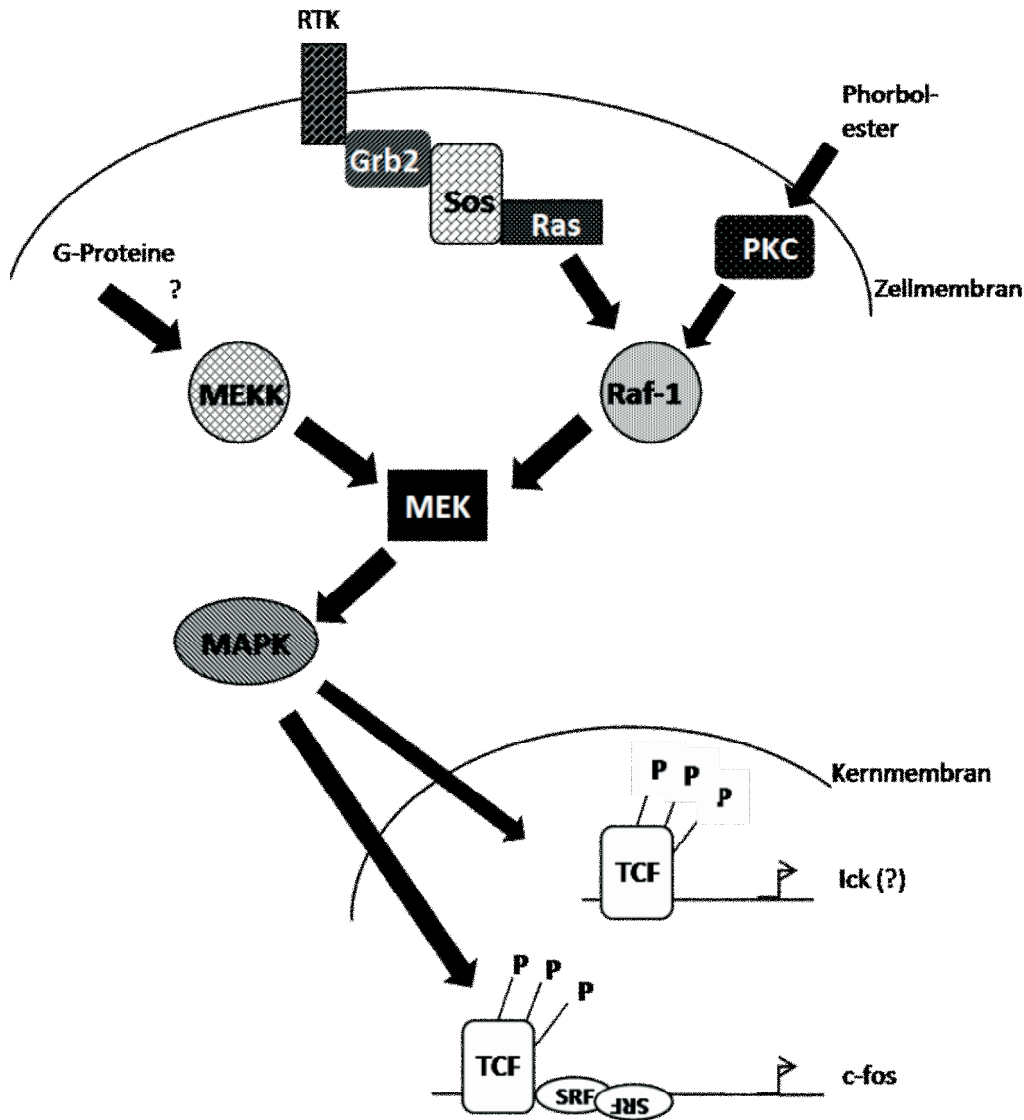


Abbildung 4.2: Unterschiedliche Aktivierung von Elk-1 (TCF) (angelehnt an Jahnknecht 1993)

4.3 AP-1: die Mischung macht's

Alle Zellen müssen die Fähigkeit besitzen, rasch auf veränderte Umweltbedingungen zu reagieren. Dies beinhaltet die Registrierung von Reizen (Rezeptoren), die Umwandlung in ein biochemisches Signal (Signaltransduktion) und die Aktivierung von speziellen Genen, deren Produkte für die Anpassung benötigt werden. Als *immediate early response genes* werden Gene zusammengefasst, die sehr schnell (einige Minuten) nach der Registrierung des Reizes transkribiert werden. Zu dieser Gruppe zählen auch die Familienmitglieder von Fos (c-Fos, FosB, Fra1 und Fra2) und von Jun (c-Jun, JunB und JunD), die sich dann als Homo- und Heterodimere zum Transkriptionsfaktor AP-1 zusammenschließen. Das Vorkommen und die Interaktion der verschiedenen Fos- und Jun-Mitglieder ist vom Zelltyp abhängig, sodass sich hinter der Bezeichnung AP-1 ein komplexes Netzwerk von vielen Transkriptionsregulatoren verbirgt (Mechta-grigoriou, Gerald, & Yaniv, 2001), die in der Verarbeitung von unterschiedlichen Reizen (z.B. Phorbolster, Zytokine, Wachstumsfaktoren, Hormonen, bakterielle und virale Infektion) involviert ist. Eine verstärkte Aktivierung von AP-1 Transkriptionsfaktoren wird auch mit der Entstehung von oxidativen Stress und mit der Tumorgenese in Verbindung gebracht (T.-S. Huang, Lee, & Lin, 1991).

4.3.1 c-Fos

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch die Inhibierung von c-Fos (siRNA) eine signifikante Abflachung der Nox4-mRNA-Expression nach einer 48-stündigen PMA-Inkubation verursacht werden konnte (siehe Abbildung 3.13).

Tatsächlich konnten in den EA.hy 926 Zellen ohne PMA keine detektierbaren Proteinmengen von c-Fos nachgewiesen werden. Dies änderte sich durch die Inkubation mit PMA, aber interessanterweise nur in der sehr frühen Phase (3h) des Experiments (siehe Abbildung 3.15). In dieser Phase konnte mittels Western Blot eine kräftige c-Fos-Bande im Zellkernlysate festgestellt werden, die jedoch im Anschluss innerhalb weniger Stunden wieder abebbte. Demnach wird in EA.hy 926 Zellen die Expression von Nox4, die durch eine 48-stündige PMA-Inkubation forciert

wurde, durch ein Protein beeinflusst, das nachweislich nur zu Beginn der Inkubation für wenige Stunden in den Zellen anwesend war.

Des Weiteren konnte in dieser Arbeit festgestellt werden, dass die c-Fos-Induktion in den ersten Stunden der PMA-Dauerinkubation über Erk1/2-> Elk-1 vermittelt wird.

Dies belegten Western Blot-Analysen von PMA-inkubierten Zelllysaten, die entweder mit PD 98059 (Erk1/2-Inhibitor) oder siRNA gegen Elk-1 behandelt worden waren. Sowohl der Erk1/2-, als auch der Elk-1-Block ließ die frühe PMA-vermittelte c-Fos-Proteinkonzentration abebben (siehe Abbildung 3.16 und 3.17). Dieses Ergebnis deckt sich mit der Beobachtung, dass Zellen mit einer Elk-1-Variante, die weder von Erk1/2 phosphoryliert werden kann, noch zu einer Bindung mit SRFs fähig ist, nicht mehr in der Lage sind, auf mitogene Reize mit einer c-Fos-Produktion zu reagieren (Janknecht et al., 1993). Dies legte den Verdacht nahe, dass unter diesen Versuchsbedingungen ein AP-1-Dimer involviert sein könnte, wobei eine Komponente c-Fos sein könnte.

4.3.2 c-Jun

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit die Beteiligung der AP-1 Komponente c-Jun an der PMA-vermittelten Nox4-mRNA-Expression untersucht, da es in der Literatur mehrere Hinweise gibt, dass dieses Protein direkt in der Regulation von Nox1 und Nox4 involviert ist: Raicu und Manea cotransfizierten humane glatte Muskelzellen aus der Aorta mit einem c-Jun überexprimierenden Plasmid und mit einem Luziferase-Reporterplasmid, das entweder mit einem Nox1- (vier AP-1 Bindestellen), oder mit einem Nox4-Promotorstück (zwei AP-1 Bindestellen) bestückt war. Die Messung der Luziferaseaktivität wies bei beiden Promotorstücken eine höchst signifikante Transkriptionsrate nach, die bei den Kontrollzellen, die kein c-Jun exprimierten, fehlte (siehe Abbildung 4.3) (Raicu & Manea, 2009).

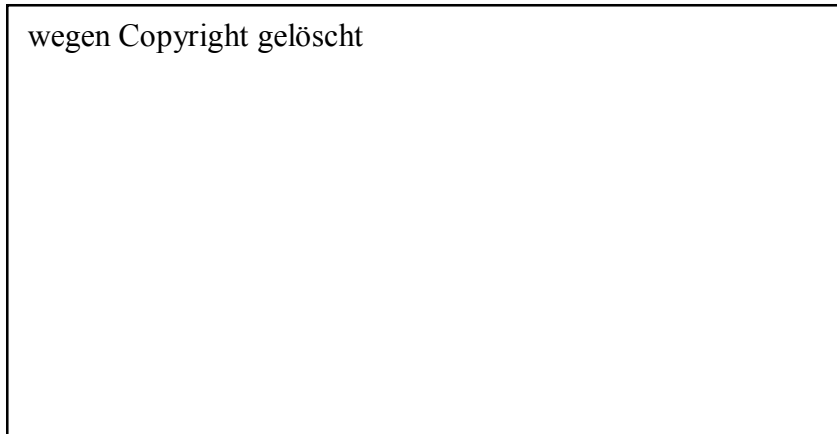


Abbildung 4.3: Nox1/4 Promotor-Aktivität in c-Jun-überexprimierenden glatten Muskelzellen der Aorta (siehe Raicu and Manea 2009, Seite 14)

In EA.hy 926 Zellen unterscheidet sich das Proteinsynthese-Verhalten von c-Jun und c-Fos deutlich (siehe Abbildung 3.17 und 3.19). Anders als bei c-Fos konnte in den Zellen über die gesamte Versuchsdauer eine stabile basale Proteinkonzentration von c-Jun festgestellt werden, die stets durch PMA-Inkubationen (3h, 6h, 30h und 48h PMA) angehoben werden konnte (siehe Abbildung 3.19 und 3.20). In der vorliegenden Arbeit konnte zwar durch die Inhibierung von c-Jun (siRNA) eine Abflachung der Nox4-mRNA-Expression (nach 48h PMA) registriert werden, jedoch relativierte sich dieses Ergebnis durch den basalen Abfall der Nox4-mRNA-Expression (siehe Abbildung 3.18). Demzufolge scheint c-Jun in den EA.hy 926 Zellen zwar per se einen regulatorischen Einfluss auf die Nox4-mRNA-Expression zu haben, jedoch wird diese AP-1 Komponente nicht benötigt, um die späte PMA-vermittelte Hochregulierung einzuleiten.

Diese Folgerung konnte durch eine Doppel-Inhibierung von c-Jun und c-Fos (beide siRNA) bekräftigt werden (siehe Abbildung 3.22), da dadurch gegenüber einer alleinigen c-Fos-Inhibierung keine zusätzliche Abschwächung des PMA-Effektes auf die Nox4-mRNA-Expression eingeleitet werden konnte.

Die Aktivität von AP-1 Transkriptionsfaktoren kann mit synthetischen Retinoiden gehemmt werden. Dies konnte in der Vergangenheit mittels transgenen AP-1 Luziferase Mäusen bewiesen werden, die mit und ohne Retinoide einer Phorbolster-

Inkubation unterzogen wurden (C. Huang et al., 1997). Das synthetische Retinoid Sr 11302 erwies sich als effektiv, um eine AP-1 Aktivierung abzuwenden.

In dieser Arbeit konnte interessanterweise die PMA-vermittelte Nox4-mRNA-Hochregulation nicht durch die Verwendung dieser Chemikalie gehemmt werden (siehe Abbildung 3.21). Außerdem erhöhte Sr 11302 dosisabhängig die basale Expression von Nox4-mRNA. Diese Ergebnisse lassen sich schwer erklären. Es ist nicht auszuschließen, dass Sr 11302 unspezifische Wirkungen besitzt.

4.4 Histondeacetylasen

Die vorliegende Arbeit erbrachte zudem interessante Hinweise, dass Histondeacetylasen (HDACs) eine besondere und wichtige Rolle in der mRNA-Expression von Nox4 nach einer 48-stündigen Phorbolster-Inkubation einnehmen. Dies konnte durch die Verwendung eines potenten HDAC-Inhibitors (Scriptaid) angezeigt werden, durch den eine komplette Entfernung des späten PMA-Effektes gelang (siehe Abbildung 3.38). Dies war auch der Fall, wenn Scriptaid nachträglich 24h nach dem Start der Phorbolster-Inkubation zu den Zellen gegeben wurde. Demnach war dieses Ergebnis ein Indiz für die Wichtigkeit der HDAC-Aktivität für die zweite Hälfte des 48-Stunden-Experiments (siehe Abbildung 3.39).

Bei HDACs handelt es sich um Enzyme, die die Acetylgruppe von epsilon-N-Acetyl-Lysinresten von Histonproteinen entfernen. Die dadurch entstehende Ladungsveränderung (positiv) erhöht die Affinität der Histone zu der negativ geladenen DNA, wodurch eine dichtere Verpackung des Erbgutes folgt. Da dies eine blockierende Wirkung für Transkriptionsfaktoren nach sich zieht, haben HDACs einen gewichtigen Einfluss auf die Expressionsrate unzähliger Gene und stehen diesbezüglich im Bereich der epigenetischen Forschung im Fokus des Interesses. Zusätzlich wird auch postuliert, dass HDACs in der Aktivitätsregulation von Nicht-Histonproteine durch Deacetylierung eingreifen (D.-Y. Lee et al., 2012).

Die Familienmitglieder werden in vier Hauptgruppen unterteilt:

Klasse I: HDAC1/2/3 und HDAC8

Klasse II: HDAC4/5/6/7

Klasse III: Sirtuin (Sirt1-7)

Klasse IV: HDAC11

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass HDACs unverzichtbar für eine stabile Proliferation und die Vitalität von vaskulären Endothelzellen sind. Dabei stach besonders HDAC3 hervor, da ein Knock-down mittels shHDAC3-Lentivirus einen dramatischen Effekt auf Zellmorphologie und Zellzahl nach sich zog (Zampetaki et al., 2010).

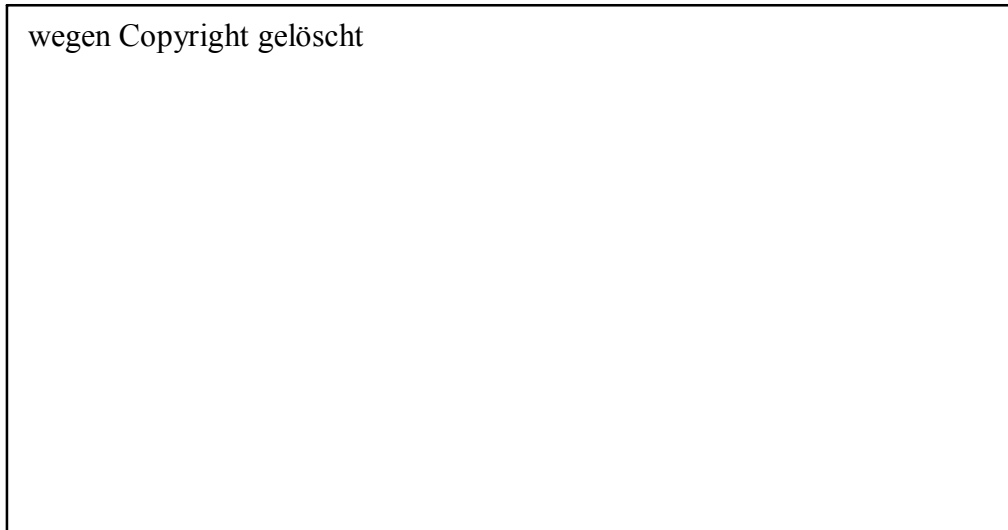


Abbildung 4.4: Ein Knock-down von HDAC3 führt zu einer Abnahme der Zellzahl und zu einer veränderten Morphologie von vaskulären Endothelzellen (siehe Zampetaki et al. 2009, Seite 134).

Auch in vivo konnte der Nachweis erbracht werden, dass HDAC3 eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung eines gesunden Gefäßsystems einnimmt. Ein Lentivirus-vermittelter HDAC3-Knock-down führte bei Mäusen zu tödlichen Gefäßrupturen (D.-Y. Lee et al., 2012).

Um die Beteiligung der Isoform HDAC3 an der PMA-vermittelten Nox4-mRNA-Hochregulation zu untersuchen, wurde im Rahmen dieser Arbeit HDAC3 inhibiert (siRNA). Aus Abbildung 3.40 kann entnommen werden, dass durch diesen Eingriff tatsächlich eine massive und signifikante Abflachung des späten PMA-Effektes herbeigeführt werden konnte, allerdings stellte sich die reduzierende Wirkung des HDAC3-Knock-downs im Vergleich zu Scriptaid etwas schwächer dar. Dieser Umstand könnte damit erklärt werden, dass in der PMA-vermittelten Nox4-mRNA-Hochregulierung auch andere Familienmitglieder von HDAC eingeschaltet sein könnten.

Der Vollständigkeit halber soll an dieser Stelle erwähnt werden, dass in unserer Arbeitsgruppe Überlegungen angestellt wurden, dass die Hyperacetylierung von Histonen nach einem HDAC-Block aus sterischen Gründen zu einer erschwerten Transkription führen könnte. Demnach könnte die Abwendung der Nox4-mRNA-Hochregulierung durch die HDAC-Inhibierung lediglich ein unspezifischer Nebeneffekt sein.

Diesem Gedankenkonstrukt soll aber entgegengesetzt werden, dass eine 48-stündige PMA-Inkubation auch eine intensive HDAC3-mRNA-Expression nach sich zieht (siehe Abbildung 3.40), der Isoform, die für Proliferation und Vitalität von Endothelzellen essentiell ist. Dies könnte ein Hinweis sein, dass sowohl die Expression von Nox4-, als auch HDAC3-mRNA in einem proliferatorischen Kontext gesehen werden können.

Darüber hinaus werden HDACs in vaskulären Endothelzellen mit mechanosensitiven Mechanismen in Verbindung gebracht sind. Histondeacetylasen werden verstärkt an Gefäßregionen exprimiert, an denen eine turbulente Blutströmung einwirkt (Gefäßgabelungen, Abschnitte direkt hinter Stenosen). Die belasteten Endothelzellen weisen sowohl eine erhöhte Proliferation, als auch anti-apoptotische Mechanismen auf. Diese Veränderungen werden durch eine Inhibierung von Klasse I HDACs unterbunden. Auf diesen Aspekt wird in Kapitel 4.7 Physiologische und Pathophysiologische Relevanz der erhobenen Daten noch einmal näher eingegangen.

4.5 Die mögliche Beteiligung anderer Proteine

Vorangegangen wurde gezeigt, dass für die PMA-vermittelte Nox4-mRNA-Hochregulation aktives Erk1/2 eine wichtige Rolle einnimmt und dass der Phorbol-ester eine Daueraktivierung dieser MAP-Kinase bewirkt.

Da eine ununterbrochene Dauerinkubation mit PMA nur in den ersten 12 Stunden als PKC-Aktivator (klassische und neue Isoformen), danach aber als potenter Inhibitor wirkt, müssen PKC-unabhängige Mechanismen eingeschaltet sein, die die phosphorylierte Form von Erk1/2 aufrecht erhalten. Im folgenden Abschnitt werden verschiedene Proteine bzw. Mechanismen näher beleuchtet, die entweder Einfluss auf den Phosphorylierungsgrad von Erk1/2 nehmen oder über andere Mechanismen in die Modulation der Nox4-mRNA-Expression eingeschaltet sein könnten.

4.5.1 GSK-3 beta

Die multifunktionale Serin-/Threonin-Kinase GSK-3 beta (Glykogen Synthase Kinase-3) ist in einem unphosphorylierten Zustand aktiv und wird durch eine Phosphorylierung (Serin 9) deaktiviert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PMA-Inkubationen (3h, 6h, 30h und 48h) zu einer deaktivierenden Phosphorylierung von GSK-3 beta führten (siehe Abbildung 3.30). Die Bedeutung dieser Beobachtung kann verdeutlicht werden, wenn die breit gestreute Funktion von GSK-3 beta berücksichtigt wird. Die Funktion dieser Kinase geht über die namensgebende Regulation der Insulin-abhängigen Glykogensynthese weit hinaus. Das konstitutiv aktive GSK-3 beta wird als Repressor von einer Vielzahl von Substraten angesehen, die wiederum in einem weiten Spektrum von zellulären Prozessen eingebunden sind, wie Steuerung des Metabolismus, Transkription, Translation, Organisation des Zytoskeletts, Proliferation und vielen mehr. Demnach bewirkt eine physiologische Inhibierung von GSK-3 beta umfassende Veränderungen des Transkriptionsverhaltens (Luo, 2009).

In der Literatur gibt es Berichte, dass GSK-3 beta als negativer Regulator von Erk1/2 fungieren kann. Demnach führte eine Inhibierung von GSK-3 zu einer Zunahme der Erk1/2-Phosphorylierung (Wang et al., 2006), umgekehrt konnte die Aktivität von

GSK-3 durch eine Inhibierung von Erk1/2 gesteigert werden (Welsh, Foulstone, Young, Tavaré, & Proud, 1994). Der Mechanismus, der an der Verknüpfung von Erk1/2 und GSK-3 beta beteiligt ist, wurde noch nicht gänzlich geklärt, jedoch gibt es Hinweise für die Involvierung von PKC delta: Die GSK-3 beta-Block vermittelte Erk1/2-Phosphorylierung konnte durch die Inhibierung von PKC delta (siRNA) abgeschwächt werden (Wang et al., 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Auswirkung eines GSK-3 beta-Blocks (siRNA) auf den Phosphorylierungsgrad von Erk1/2 und die PMA-vermittelte Nox4-mRNA-Expression untersucht. Die Transfektion der Zellen mit siRNA gegen GSK-3 beta zog tatsächlich eine erhöhte Phosphorylierung von Erk1/2 nach sich, allerdings zeigte sich dieses Phänomen nur in den Kontrollproben (siehe Abbildungen 3.28 und 3.29 Bild C). Außerdem fiel bei einem GSK-3 beta-Block sowohl bei der Kontrollgruppe, als auch bei der PMA-inkubierten Gruppe eine signifikante Erhöhung der Nox4-mRNA-Expression auf (siehe Abbildung 3.27). GSK-3 beta bzw. seine Inhibierung scheint zwar für den PMA-Effekt auf die Nox4-mRNA-Expression nicht benötigt zu werden, es konnte jedoch dargestellt werden, dass über eine Inhibierung von GSK-3 beta eine basale Expressionssteigerung dieser NADPH-Oxidase eingeleitet werden kann. Eine mögliche Erklärung für diesen Mechanismus könnte die negative regulatorische Funktion von GSK-3 beta auf den Transkriptionsfaktor c-Jun sein, dessen DNA-Bindfähigkeit nach einer Phosphorylierung drastisch abnimmt. Zwar konnte vorangegangen gezeigt werden, dass c-Jun nicht an der PMA-vermittelten Nox4-mRNA-Hochregulation, aber an der basalen Expression beteiligt ist. Ein Block von GSK-3 beta geht in vielen Zellsystemen mit einer enormen c-Jun/AP-1 Aktivierung einher (Luo, 2009), dies könnte auch bei EA.hy 926 Zellen der Fall sein.

4.5.2 PKC delta

Tatsächlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die PMA-vermittelte Nox4-mRNA-Expression signifikant durch einen PKC delta-Block (siRNA und Inhibitor) reduziert werden konnte (siehe Abbildung 3.24 und 3.25).

In der Vergangenheit konnte in mehreren Zelllinien eine Zusammenarbeit von PKC delta mit der MAP-Kinase Erk1/2 nachgewiesen werden. So berichteten Lin et al.

über eine PKC delta-> Erk1/2-> AP-1-Signalkaskade, die in einer Brustkrebszelllinie das Migrationsverhalten und die Metastasenformation steuerte (Lin et al., 2008).

In vaskulären Endothelzellen spielt PKC delta in der Hormon-vermittelten Zytokin-Expression eine wichtige Rolle, weswegen diese Isoform mit inflammatorischen Veränderungen des vaskulären Endothels in Verbindung gesetzt werden kann. Die Signalkaskade, die auf die Bindung von Angiotensin II (Ang II) an den membrangebundenen Rezeptor AT1R folgt, kann hier als Beispiel angeführt werden. In vaskulären Endothelzellen konnte eine nachfolgende PKC delta -> Raf -> MEK1/2 -> Erk1/2-Signaltransduktion nachgewiesen werden, die schließlich eine gesteigerte Expression von Cox2 und Zytokinen vermittelte (Wong et al., 2011).

Im Fall von PMA-inkubierten vaskulären EA.hy 926 Zellen zeigte sich PKC delta für die anhaltende Phosphorylierung von Erk1/2 als nicht zwingend notwendig. Trotz geblocktem PKC delta (mittels siRNA) konnte nach einer PMA-Inkubation von 6 Stunden und 30 Stunden eine deutliche Zunahme des Phosphorylierungsgrades von Erk1/2 nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.28 und 3.29). Allerdings fällt bei der 30-stündigen Inkubation eine leichte Abnahme der Erk1/2-Phosphorylierung auf, wenn zuvor PKC delta geblockt worden war. Wenn man sich die Wichtigkeit von aktivem Erk1/2 für die PMA-vermittelte Nox4-mRNA-Expression in Erinnerung ruft, kann dies als Hinweis gewertet werden, dass PKC delta zwar in diesem Kontext nicht entscheidend ist, jedoch zumindest in der zweiten Versuchshälfte ein modulierender Faktor sein könnte. Dies wird zudem dadurch gestützt, dass die Phorbol ester getragene Nox4-mRNA-Hochregulation signifikant durch eine nachträgliche Inhibitor-Zugabe gegen PKC delta (Rottlerin, 24h nach Versuchsstart) gesenkt worden war (siehe Abbildung 3.24).

Zwei Findungen bezüglich des Verhaltens von PKC delta während einer 48-stündigen PMA-Inkubation sollen an dieser Stelle nicht unerwähnt bleiben:

Obwohl PMA bei lang anhaltender Inkubation (über 12h) als potenter Inhibitor von klassischen und neuen PKC-Isoformen beschrieben wird, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass PKC delta eine ungewöhnliche Stabilität aufwies. Während eine 30- und 48-stündige PMA-Inkubation eine vollständige Proteindegradation von PKC alpha nach sich zog, verlief der Abbau der Isoform delta sehr viel langsamer (siehe Abbildung 3.23). In der späten Phase des Experiments konnte auch die aktive phosphoryliert Form von PKC delta nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3.29).

Die zweite Findung betraf das elektrophoretische Auftrennungsverhalten von PKC delta, das sich bei allen PMA-Inkubationen (3h, 6h, 30h und 48h) veränderte: die Proteinbanden (unphosphoryliert und phosphoryliert) bewegten sich deutlich langsamer durch das SDS-Polyacryl-Gel (siehe Abbildung 3.23, 3.28 und 3.29). Dieses Phänomen deutet auf eine Modifikation von PKC delta (Phosphorylierung, Hydroxylierung, u.a.) hin.

4.5.3 NFAT

In 4.5.1 wurde auf die negative Regulation von GSK-3 beta auf eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren und anderen Proteinen eingegangen. Ein interessantes Beispiel für diesen regulatorischen Mechanismus stellt der Transkriptionsfaktor NFAT dar, der im Zytosol von GSK-3 beta phosphoryliert wird. Dadurch verbleibt der Transkriptionsfaktor inaktiv im Zytoplasma, da ein Wechsel in den Nukleus nur unphosphoryliert vonstattengehen kann. Eine Inhibierung von GSK-3 beta zieht keine automatische Aktivierung von NFAT nach sich, da der Wechsel in den Zellkern eine vorherige Entfernung der bestehenden Phosphatgruppen voraussetzt. Hierfür ist eine Bindung mit der Phosphatase Calcineurin erforderlich (Graef, Chen, Chen, Kuo, & Crabtree, 2001). Das Zusammenspiel von NFAT und Calcineurin wurde erstmals in Zellen des Immunsystems charakterisiert (Flanagan, Corthésy, Bram, & Crabtree, 1991).

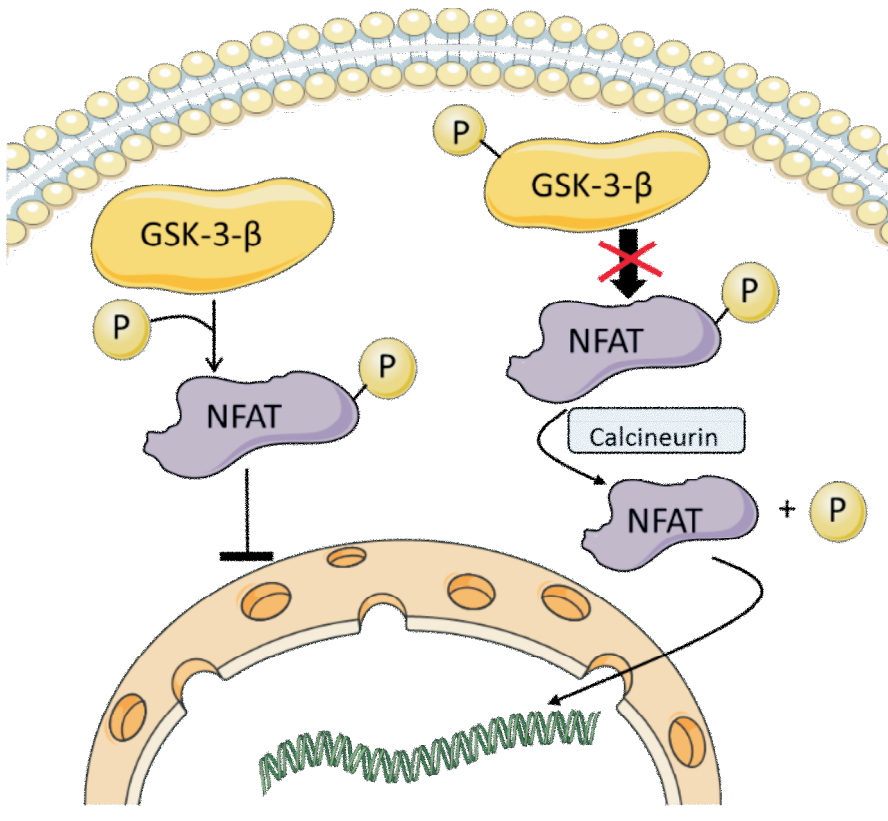


Abbildung 4.5: Regulierung von NFAT

Zuvor konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass in EA.hy 926 eine PMA-vermittelte Inhibierung von GSK-3 beta ausgelöst wurde. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine zusätzliche Inhibierung dieser regulatorischen Kinase (siRNA) einen förderlichen Einfluss auf die Nox4-mRNA-Expression bewirkte. In diesem Zusammenhang schien es lohnenswert, die Auswirkung eines NFAT-Blocks auf die PMA-vermittelte Nox4-mRNA-Expression näher zu untersuchen.

Eine indirekte Hemmung von NFAT mittels Ausschaltung der Phosphatase Calcineurin reduzierte den späten PMA-Effekt auf die Nox4-mRNA-Expression. Dies konnte sowohl unter ständiger Anwesenheit eines Calcineurin-Inhibitors (siehe Abbildung 3.32), als auch bei einer späteren Inhibitor-Gabe (siehe Abbildung 3.31) beobachtet werden.

Von den NFAT-Transkriptionsfaktoren sind bis heute fünf Isoformen bekannt, wobei NFATc1 (NFAT2), NFATc2 (NFAT1), NFATc3 (NFAT4) und NFATc4 (NFAT3) zytologisch vorliegen und durch die Calcineurin-Interaktion aktiviert werden, die Isoform NFAT5 hingegen ausschließlich im Zellkern anzutreffen ist. Diese Familie von Transkriptionsfaktoren wird oft mit der Einleitung von Entzündungsprozessen in Verbindung gebracht, da sie für die Induktion von Zytokin-Genen verantwortlich ist.

Die Aktivität von NFATs ist deshalb in der Medizin bei Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantationen relevant. Jedoch gibt es in der Literatur reichlich Hinweise auf eine bedeutende Rolle einiger NFAT-Mitglieder für die Proliferation von vaskulären Endothelzellen. So konnte zum Beispiel nachgewiesen werden, dass die VEGF-vermittelte Angiogenese durch Gabe von Calcineurin-Inhibitoren unterbunden werden kann (Hernandez et al., 2001). Auch pränatal scheinen diese Transkriptionsfaktoren essentiell für die Organisation der Vaskularisation zu sein. NFAT3 Null-Mäuse starben zum Zeitpunkt E11, da Blutgefäße in Nervenbahnen und die Somiten hineingewandert waren (Graef et al., 2001).

Da NFAT3 relevant für vaskuläre Endothelzellen ist, wurde im Laufe dieser Arbeit das Expressionsverhalten dieser Isoform auf unterschiedlich lange PMA-Inkubationen beobachtet und mit der Expression der Nox4-mRNA verglichen. Dabei konnte mehrfach eine Korrelation zwischen den beiden mRNAs beobachtet werden (siehe Abbildung 3.35). Dies und die Ergebnisse mit den Calcineurin-Inhibitoren könnte als Hinweis gewertet werden, dass NFAT3 in der PMA-vermittelten Nox4-mRNA-Hochregulation involviert sein könnte. Ein weiterer Hinweis, dass NFAT3 zumindest einen regulatorischen Einfluss auf die Nox4-mRNA-Expression ausüben könnte, wird durch die Tatsache dargestellt, dass das Ausschalten von GSK-3 beta (siRNA) basal sowohl die Expression von NFAT3 als auch die von Nox4 erhöhte. Umgekehrt sanken die basalen Expressionen von beiden mRNAs, wenn NFAT3 geblockt worden war (siehe Abbildung 3.36). Eine weitere interessante Beobachtung war, dass ein Knock-down von PKC delta nicht nur eine hemmende Wirkung auf die PMA-vermittelte Nox4-mRNA-Hochregulation zeigte, sondern auch einen reduzierenden Einfluss auf die NFAT3-mRNA-Expression ausübte. Dies bezog sich sowohl auf die basale als auch auf die PMA-vermittelte Erhöhung (siehe Abbildung 3.36). Im Rahmen dieser Arbeit konnte die Involvierung von NFAT3 in den PMA-vermittelten Effekt auf die Nox4-mRNA-Expression nicht abgesichert werden, da die verwendete NFAT3-siRNA nicht in der Lage gewesen war, die massive Phorbol-ester-getragene Induktion abzuwenden (siehe Abbildung 3.33 und 3.34).

4.6 p53: Der „Wächter des Genoms“ und Nox4

Bei der Erforschung einer 48-stündigen Signalkaskade bleibt es nicht aus, dass zusätzliche Erkenntnisse gewonnen werden, die möglicherweise ein interessanter Gegenstand weiterer Forschungsprojekte werden könnten. Aus Abbildung 3.44 kann entnommen werden, dass das Tumorsuppressorprotein p53 nicht in der PMA-vermittelten Nox4-mRNA-Hochregulierung involviert ist, da eine Inhibierung (siRNA) nicht zu einer Abwendung des PMA-Effektes geführt hatte. Jedoch konnte ein massiver Einbruch der basalen Nox4-mRNA-Expression festgestellt werden. Demnach war der Hinweis darauf erbracht, dass dieses Protein eine essentielle Rolle in der basalen Regulation von Nox4 spielen könnte, so dass im Rahmen dieser Arbeit thematisch eine kleine Exkursion durchgeführt wurde, um den Zusammenhang beider Proteine näher zu betrachten.

Das 1979 entdeckte Protein p53 wurde nach seinem elektrophoretischen Auftrennungsverhalten in SDS-Gelen benannt. Obwohl das Protein permanent gebildet wird, weist es in gesunden Zellen eine enorme Instabilität auf. Tritt jedoch ein DNA-Schaden (z.B. DNA-Doppelstrangbruch durch ionisierende Strahlung) auf, verändert sich dieser Umstand. Das p53 wird durch eine posttranslationale Modifikation stabilisiert, wodurch das Protein in der Zelle akkumuliert und als Transkriptionsfaktor seine Arbeit aufnimmt. Dadurch wird die Bildung des Proteins p21 eingeleitet, das den Zellzyklus stoppt, so dass die Zelle in der G1-Phase verharret. Weitere Produkte, die aus der Akkumulation von p53 hervorgehen, sind Komponenten des DNA-Reparatursystems (z.B. Gadd45). Durch diese Vorgänge wird nicht nur die unkontrollierte Weitergabe von fehlerhafter DNA verhindert, sondern es wird der Zelle Zeit eingeräumt, den Schaden zu beheben. Ist die Arbeit des DNA-Reparatursystems erfolgreich, folgt ein proteolytischer Abbau von p21 und p53 und die Zelle wird aus dem G1-Arrest entlassen. Liegt jedoch ein irreversibler Schaden vor, leitet p53 über verschiedene Signalkaskaden den apoptotischen Untergang der fehlerhaften Zelle ein. Aufgrund dieser schützenden Funktion wird p53 auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet. Tatsächlich liegt in etwa 50% der Tumorarten eine funktionslose p53-Mutation vor, die zwar keine Tumorbildung einleitet, aber als Prüfinstanz ausfällt, wodurch sich DNA-Schäden unerkant vervielfältigen können.

Neben der Genomüberwachung wurden in der Vergangenheit Hinweise gefunden, dass zwischen p53 und oxidativem Stress eine Wechselwirkung existiert. Demnach konnte in verschiedenen Zellsystemen mittels einer künstlichen p53-Überexpression eine gesteigerte ROS-Produktion eingeleitet werden (Liu, Chen, & Clair, 2009). Darüber hinaus kann ROS das Transkriptionsverhalten von p53 beeinflussen, da zum Beispiel die Bindefähigkeit von p53 an den Promotor von CADD45 unter oxidativem Stress abnimmt, während das p21-Gen unverändert transkribiert wird. Inzwischen wird sogar angenommen, dass ROS indirekt unterschiedliche Gene über p53 aktiviert, wobei die dabei beteiligten Mechanismen noch unklar sind.

In Nierenepithelzellen konnte über eine High-Glucose-Inkubation eine Nox4-mRNA-Hochregulation eingeleitet werden, die schließlich zu einer apoptotischen p53-Akkumulation führte. Aufgrund der Ergebnisse dieser Studie wurde darüber spekuliert, ob Nierenschäden bei Typ1 Diabetes-Patienten mittels Nox4-Inhibition abgemildert werden könnte (Eid et al., 2010). Demnach wurde in diesem Zelltyp über Nox4 der gezielte Zelltod eingeleitet.

Um den Kontext von Nox4 und p53 in vaskulären Endothelzellen besser zu verstehen, wurde im Laufe dieser Arbeit eine Methode erprobt, um die p53-Akkumulation in EA.hy 926 Zellen zu provozieren: die Zellen wurden für 24 Stunden mit Mangelmedien (PBS-verdünnten Nährmedien) inkubiert. Durch diese Maßnahme konnte nicht nur eine p53-mRNA-Hochregulation, sondern auch eine deutliche Zunahme des Proteingehaltes eingeleitet werden (siehe Abbildung 3.46 und 3.48). Gleichzeitig war auch die Nox4-mRNA-Expression auf ein höchst signifikantes Niveau gestiegen. Durch höhere Verdünnungen des Nährmediums (1:10 statt 1:5) konnten die Expressionsraten beider mRNAs verstärkt werden (Daten nicht gezeigt). Ein Knock-down von p53 (siRNA) schwächte die Mangelmedium-vermittelte Nox4-mRNA-Hochregulation ab (siehe Abbildung 3.47). Konträr zu Eids Nierenepithelzellversuchen scheint in vaskulären Endothelzellen die p53-Akkumulation der Nox4-Bildung vorgeschaltet zu sein. Lichtmikroskopische Beobachtungen konnten nach einer 24-stündigen Mangelmedium-Inkubation kein vermehrtes Absterben der Zellen ausmachen, obwohl unter diesen Bedingungen p53 nachweislich akkumuliert vorlag (siehe Abbildung 3.48). Dies könnte ein Indiz dafür sein, dass Nox4 in vaskulären Endothelzellen eine anti-apoptische Komponente

darstellen könnte. Diese Überlegung könnte in zukünftigen Arbeiten weiter überprüft werden.

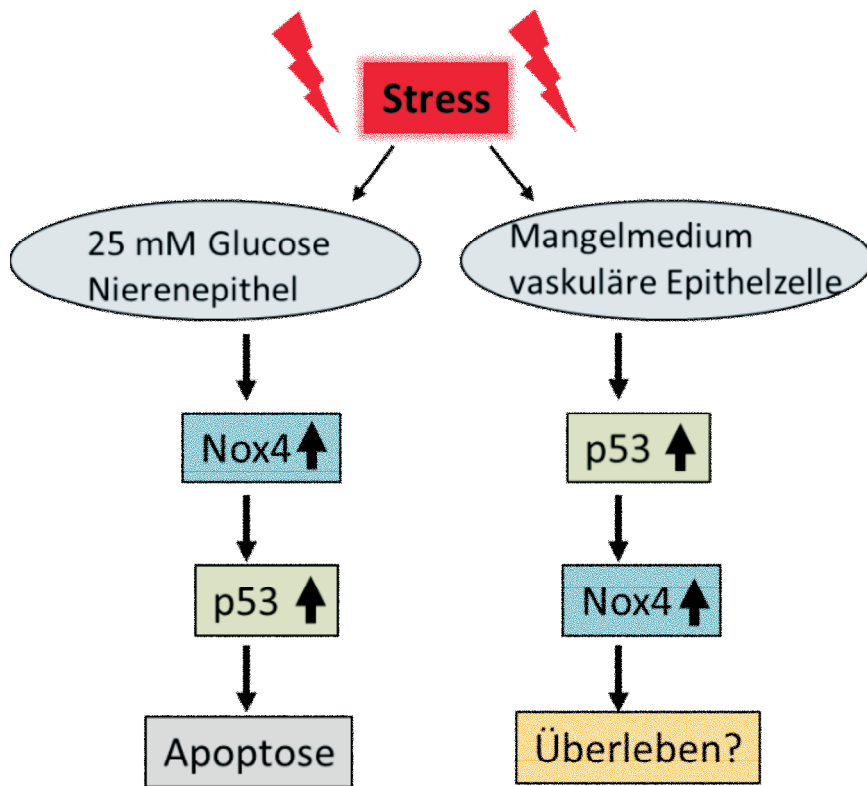


Abbildung 4.6: Variable Zusammenhänge zwischen Nox4 und p53

4.7 Physiologische und pathophysiologische Relevanz der erhobenen Daten

Endotheliale Dysfunktionen und Entstehungsorte von Atherosklerose treten bevorzugt an Gefäßabschnitten auf, an denen hämodynamische Scherkräfte wirken. Die Turbulenz des Blutflusses wird entweder durch Gefäßgabelungen oder hinter Gefäßverengungen (Stenosen) verursacht. Endothelzellen in diesen Abschnitten weisen eine verstärkte Expression von Nox4 auf, dem zellspezifischen Hauptproduzenten von ROS. Obwohl diese Expressionserhöhung mit der Entstehung von atherosklerotischer Plaque in Verbindung gebracht worden ist, dürfen dieser NADPH-Oxidase nicht nur zerstörerische Eigenschaften zugeordnet werden.

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass Nox4 nicht nur unerlässlich für die Proliferation von Endothelzellen (Petry et al., 2006), sondern dass einer Überexpression dieser Oxidase sogar eine antiapoptotische Wirkung zuzuschreiben ist (Datla et al., 2007). Außerdem konnte Nox4 als ein positiver Regulator von Anpassungs- und Modulationsprozessen von Endothelzellen identifiziert werden (Jiang et al., 2011), die zum Beispiel bei einer Gewebsregeneration (Angioneogenese) oder zur Anpassung an verstärkten Scherkräften vonnöten sind. Datla et al. konnten belegen, dass diese Modulationsprozesse mit einer starken Erk1/2-Aktivierung assoziiert ist (Datla et al., 2007), die interessanterweise durch die Gabe von Nox-Inhibitoren deutlich abnimmt (Lange et al., 2009).

Erk1/2 spielt nicht nur in der Angioneogenese und Weitergabe von mitogenen Reizen eine wichtige Rolle, sondern ist auch für die Weiterleitung von mechanischen Reizen zuständig. Werden Endothelzellen Scherkräften ausgesetzt (turbulente Strömung), zieht dies eine rasche und starke Aktivierung von Erk1/2 nach sich (Traub & Berk, 1998). Eine derartige Aktivierung von Erk1/2 setzt Proteinkinase C voraus, die die MAP-Kinase-Kinase-Kinase Raf-1 an Serin- und Threoninresten phosphoryliert und aktiviert. In Endothelzellen kann dies über PKC alpha und PKC epsilon bewerkstelligt werden.

Für die Registrierung und Transduktion eines mechanischen Reizes in ein biochemisches Signal wird nach wie vor über verschiedene Rezeptormodelle diskutiert (Transmembrane Integrine; Caveolen, die als Proteinanker Signalmoleküle

rekrutieren und organisieren; Scherstress-sensitive G-Proteine, die zur Erhöhung der ras-GTPase Aktivität führen; mechanosensitive Ionen-Kanäle; siehe Abbildung 4.7).

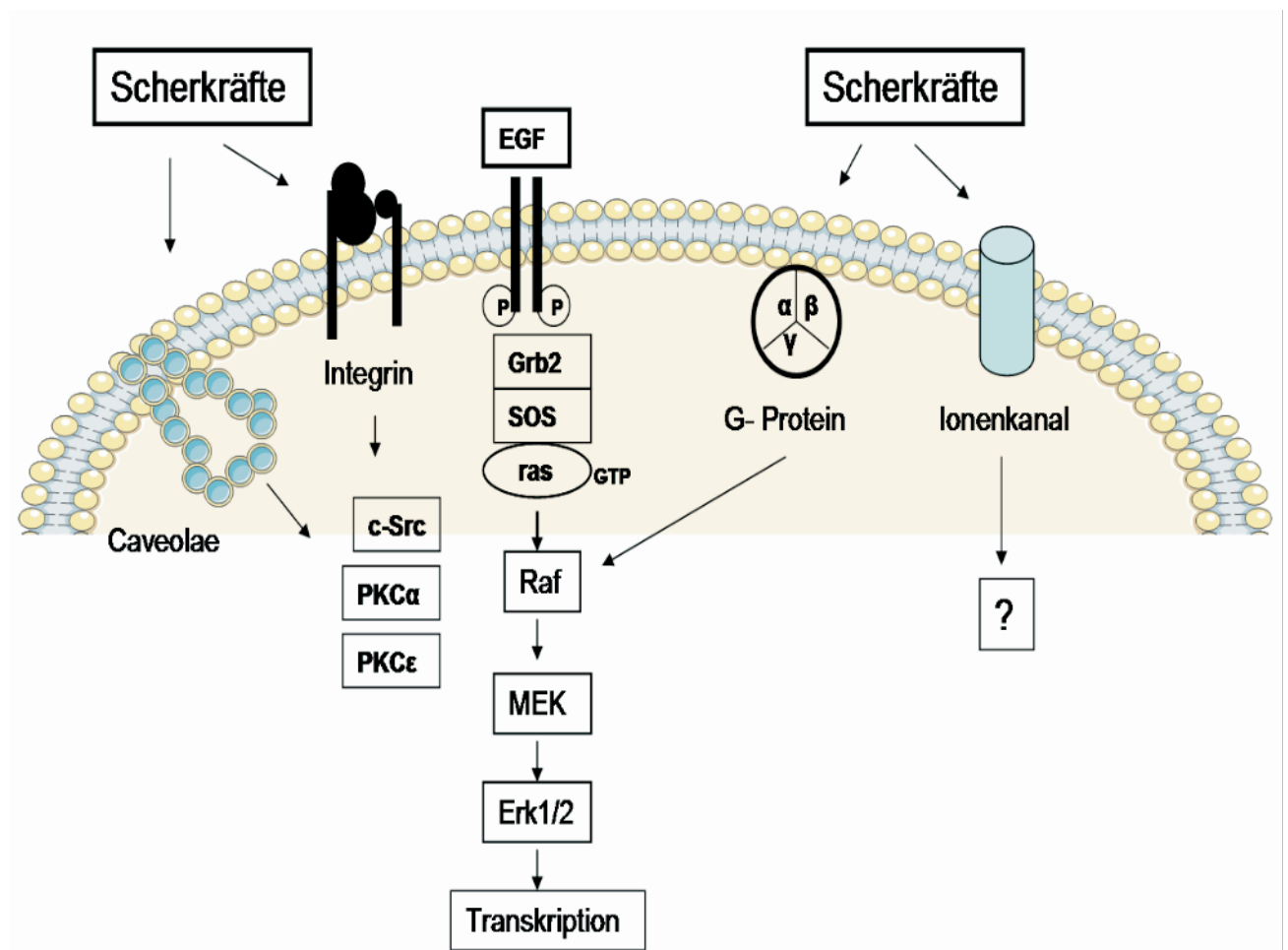


Abbildung 4.7: Modelle von primären Mechanorezeptoren (Integrine, Caveolen, G-Proteine, Ionenkanäle). Der mechanische Reiz wird in ein biochemisches Signal translatiert, das über PKC-> Raf-> MEK-> Erk1/2 geleitet wird (angelehnt an Traub et al. 1998).

Es gibt mehrere Hinweise, dass eine Inkubation von Endothelzellen mit dem Phorbolester PMA einen akuten Scherstress simuliert, woraufhin die Zellen mit Anpassungsprozessen reagieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde unter PMA eine frühzeitige Expressionssteigerung, bzw. Anhebung der c-Fos-Proteinkonzentration in den EA.hy 926 Zellen festgestellt. Obwohl sich diese Steigerung nur für wenige Stunden hielt, hatte dieses Ereignis Einfluss auf die späte Nox4-Hochregulation.

In der Literatur lassen sich mehrere Hinweise finden, dass diese kurzfristige c-Fos-Induktion auch durch Scherstress ausgelöst werden kann. Hsyue-Jen et al. setzten

HUVEC (human umbilical vein endothelial cells) einem pulsierenden Fluss von einem Hz mit einer durchschnittlichen Scherkraft von 16 dynes/cm^2 aus und registrierten nach 30min einen heftigen Anstieg der c-Fos-mRNA Expression, die sich innerhalb von einer Stunde wieder auf basale Werte zurück bewegte. Sie vermuteten, dass diese kurzfristige Induktion eine wichtige Rolle in der Regulation von späteren Zellantworten spielen könnte (Hsieh, Li, & Frangos, 1993). Dies ist wie folgt begründet: durch Scherstress werden eine Vielzahl von Genen aktiviert, deren Produkte eine entscheidende Rolle in der Anpassung auf die veränderte Umweltbedingung haben (z.B. PDGF-B Gen). Diese Gene besitzen in ihren Promotorsequenzen sogenannte „shear stress-responsive elements“ (SSRE). Jedoch ist es inzwischen unumstritten, dass durch Scherstress auch Gene aktiviert werden, denen diese spezifische Sequenz fehlt (z.B. „tissue factor“ Gen). Voraussetzung für die verzögerte Aktivierung dieser Gene ist die Expression von „immediate early genes“, und c-Fos ist ein bekannter Vertreter dieser Genklasse.

Ein weiterer Hinweis, dass durch PMA-Inkubation Scherstress simuliert wird, zeigt die Tatsache, dass die späte Nox4-Hochregulation komplett abwendbar ist, wenn zuvor eine Inhibition von Histondeacetylasen (HDAC) stattgefunden hat. Diese Enzymklasse deacetyliert Lysinreste von Histon- und anderen Proteinen und reguliert auf diese Weise eine Vielzahl von biologischen Prozessen. Zu diesen zählt auch die Modulation und Proliferation von vaskulären Endothelzellen. Außerdem haben Studien bewiesen, dass HDAC1/2/3 in Endothelzellen eine wichtige Rolle bei der Bewältigung von Scherstress einnehmen (D.-Y. Lee et al., 2012). Um dies zu belegen wurden Ratten operativ in der abdominalen Aorta eine Stenose gelegt, die zu einer Erhöhung der wirkenden Scherkräfte führte. Nach 3 Tagen konnte in der turbulenten Zone eine verstärkte Proliferation der Endothelzellen festgestellt werden, die jedoch nicht eintrat, wenn zuvor HDAC1/2/3 ausgeschaltet worden waren. Betrachtet man die Tatsache, dass die späte PMA-provozierte Nox4-Hochregulation komplett unterbunden wird, wenn zuvor eine Inhibition der HDACs stattgefunden hat, untermauert dies die Annahme, dass der Phorbol ester eine Scherstress-Situation simuliert. Eine weitere Bekräftigung dieser Idee sind Hinweise aus der Literatur, dass die biochemische Antwort von vaskulären Endothelzellen auf Scherstressreize massiv abgewendet werden kann, wenn die Zellen vor dem physikalischen Reiz mit einem Phorbol ester vorbehandelt worden sind (Shyy et al., 1995). Demnach liegt die Vermutung nahe, dass die Signaltransduktion von Phorbol ester-Inkubationen und

~ Diskussion ~

physikalischen Reizen den vaskulären Endothelzellen über sehr ähnliche Wege vermittelt werden.

5. Zusammenfassung

Eine verstärkte Nox4-Transkription wird mit der Entstehung von atherosklerotischen Veränderungen in Blutgefäßen in Verbindung gebracht. In der Vergangenheit konnte mehrfach gezeigt werden, dass in vaskulären Endothelzellen durch eine Dauerinkubation mit Phorbolestern (48h PMA) eine Hochregulation dieser NADPH-Oxidase provoziert werden kann, wobei die dabei beteiligten Mechanismen weitgehend im Dunklen verblieben sind. Mit der vorliegenden Arbeit soll nun mehr Licht auf die komplexen und verwundenen Signaltransduktionen geworfen werden.

Initial spielt die Proteinkinase C eine entscheidende Rolle, die von Phorbolestern aktiviert wird (klassische und neue Isoformen). In einer vorangegangenen Studie konnte besonders der klassischen Isoform PKC alpha ein unverzichtbarer Stellenwert in die Einleitung der PMA-vermittelten Nox4-mRNA-Hochregulation zugeschrieben werden. Downstream konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Involvierung der MAP-Kinase Erk1/2 dargestellt werden. Sowohl die chemische Inhibierung als auch der Knock-down (siRNA) von Erk1/2 zeigte eine deutliche Reduzierung des PMA-Effektes auf die späte PMA-vermittelte Nox4-mRNA-Hochregulation.

Downstream von Erk1/2 fiel in der frühen Phase des Experimentes (3h) eine Elk-1-vermittelte c-Fos-Proteinbiosynthese auf. Obwohl das Protein nur wenige Stunden stabil war, drückte sich seine Blockierung (siRNA) mit einer signifikanten Hemmung der späten PMA-getriebenen Nox4-mRNA-Expression aus. Das Phänomen, dass ein kurzfristig anwesendes Genprodukt maßgeblichen Einfluss auf spätere Zellreaktionen einnimmt, ist ein typisches Beispiel für Mitglieder der „*immediate early genes*“.

Die Transkriptionsfaktoren der Fos- und der Jun-Familie sind ein Bestandteil dieser frühzeitigen Bearbeitung von unterschiedlichen Reizen. Mitglieder der Fos- und/oder der Jun-Familie bilden einen transkriptionalen AP-1-Komplex. Knock-down (siRNA) sowohl von c-Fos als auch von c-Jun konnte die PMA-Wirkung auf Nox4-Expression reduzieren, wobei c-Fos von deutlich größerer Bedeutung zu sein scheint.

Eine weitere Findung war der mögliche Beitrag von Histondeacetylasen (HDACs) an der späten Phorbol-ester-vermittelten Nox4-mRNA-Hochregulation, die durch den Einsatz eines potenten HDAC-Inhibitors komplett abgewendet werden konnte. Ein Knock-down der Isoform HDAC3 bewirkte zwar ebenfalls eine starke Hemmung des PMA-Effektes, fiel aber schwächer aus. Dieses Ergebnis könnte auf die Involvierung weiterer Isoformen hinweisen.

Darüber hinaus wurden Anhaltspunkte gefunden, dass NFAT3 in der PMA-vermittelten Nox4-mRNA-Expression mindestens eine modulierende Wirkung inne hat. Zum einen konnte eine positive Korrelation von Nox4- und NFAT3-mRNA-Expression nach unterschiedlich langen PMA-Inkubationen gezeigt werden, zum anderen verstärkt die Inhibierung (siRNA) von GSK-3-beta (einem physiologischen NFAT-Inhibitor) die basale Nox4-mRNA-Expression.

Die gleiche Aussage kann über PKC delta getroffen werden, das sich in Anbetracht der PMA-Dauerinkubation als bemerkenswert stabil erwies. Eine Inhibierung dieser PKC-Isoform senkte nicht nur signifikant die PMA-vermittelte Nox4-mRNA-, sondern auch die NFAT3-mRNA-Expression. Das regulatorische Zusammenspiel zwischen NFAT3, PKC delta und Nox4 könnte Stoff zukünftiger Arbeiten sein.

Abschließend sei das apoptotisch wirkende p53 erwähnt, das zwar keinen Einfluss auf die PMA-vermittelte Nox4-mRNA-Hochregulation aufwies, jedoch zweifelsfrei in der basalen Regulation dieser NADPH-Oxidase involviert zu sein scheint. Eine Inhibierung von p53 (siRNA) drückte sich in einem drastischen Einbruch der basalen Nox4-mRNA-Expression aus. Dieser Knock-down reduzierte auch die durch Mangelmedien provozierte Nox4-mRNA-Expression, so dass p53 in diesem Zusammenhang der Nox4-mRNA-Hochregulation vorgeschaltet zu sein scheint.

~ Zusammenfassung ~

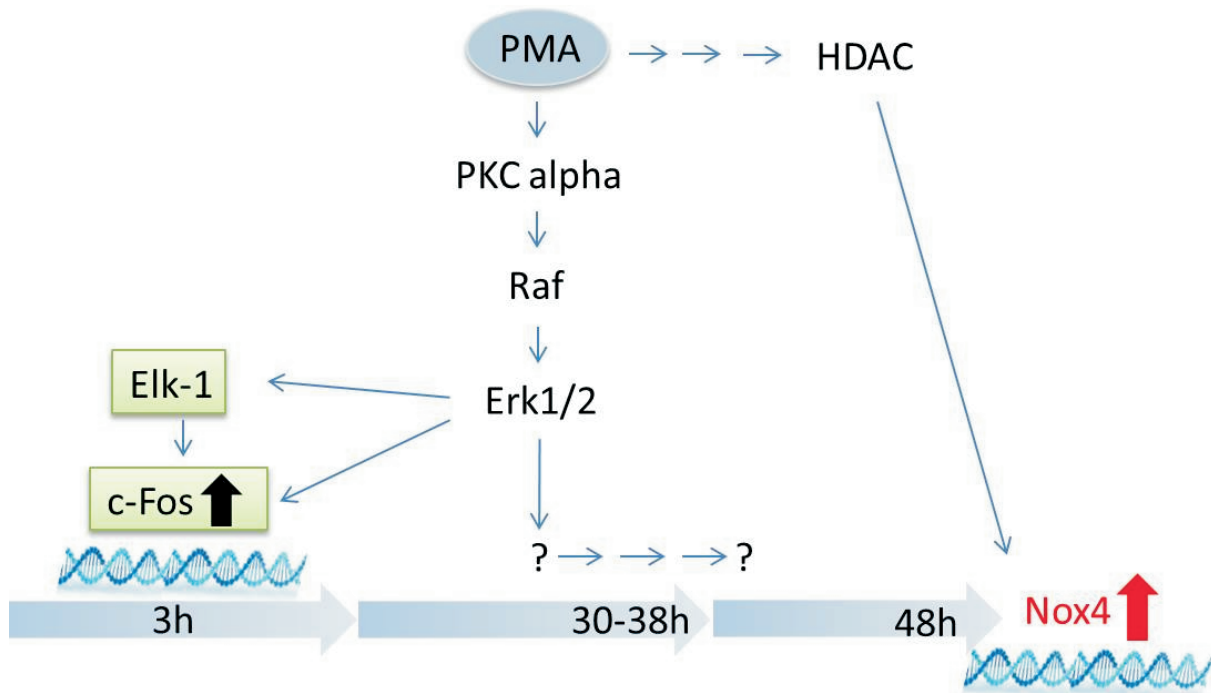


Abbildung 5.1: Das biochemische Zeitschema einer 48-stündigen PMA-Inkubation der vaskulären Endothelzelllinie EA.hy 926. Die MAP-Kinase Erk1/2 nimmt eine wichtige Position in der PMA-vermittelten Nox4-mRNA-Hochregulation ein. Das Gleiche gilt für den Transkriptionsfaktor c-Fos, obwohl dieses Protein nur zu Beginn des Experimentes für wenige Stunden anwesend war. Für die c-Fos-Induktion ist unter anderem Elk-1, verantwortlich. Die Zeitmarken, die die 30igste und die 38igste Stunde flankieren, markieren einen Zeitraum, in dem mindestens ein Protein gebildet werden muss, damit die PMA-vermittelte Nox4-mRNA-Hochregulation stattfinden kann. Als weitere wichtige Komponente sind die Histoneacetylrasen (HDACs) zu nennen, da eine Inhibition dieser Enzymklasse (entweder zu Beginn oder 24h nach Beginn der PMA-Inkubation) zu einer völligen Abwendung des PMA-Effektes auf die Nox4-mRNA-Hochregulation ausübte.

6. Literaturverzeichnis

- Abid, M. R., Kachra, Z., Spokes, K. C., & Aird, W. C. (2000). NADPH oxidase activity is required for endothelial cell proliferation and migration. *FEBS letters*, *486*(3), 252–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11119713>
- Abo, A., Pick, E., Hall, A., Totty, N., Teahan, C. G., & Segal, A. W. (1991). Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1. *Nature*, *353*(6345), 668–70. doi:10.1038/353668a0
- Ambasta, R. K., Kumar, P., Griending, K. K., Schmidt, H. H. H. W., Busse, R., & Brandes, R. P. (2004). Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase. *The Journal of biological chemistry*, *279*(44), 45935–41. doi:10.1074/jbc.M406486200
- Baehner, R. L., & Nathan, D. G. (1968). Quantitative Nitroblue Tetrazolium Test in Chronic Granulomatous Disease. *The New England Journal of Medicine*, *(278)*, 971–976. Retrieved from <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM196805022781801>
- Bedard, K., & Krause, K. (2007). The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological reviews*, *(87)*, 245–313. doi:10.1152/physrev.00044.2005.
- Berendes, H., Bridges, R. A., & Good, R. A. (1957). A fatal granulomatosis of childhood: the clinical study of a new syndrome. *Minnesota medicine*, *40*(5), 309–12. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/13430573>
- Datla, S. R., Peshavariya, H., Dusting, G. J., Mahadev, K., Barry, J., Goldstein, B. J., & Jiang, F. (2007). Important Role of Nox4 Type NADPH Oxidase in Angiogenic Responses in Human Microvascular Endothelial Cells in Vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, *27*, 2319–2324. doi:10.1161/ATVBAHA.107.149450
- De Taisne, C., Gégonne, A., Stehelin, D., Bernheim, A., & Berger, R. (1984). Chromosomal localization of the human proto-oncogene c-ets. *Nature*, *310*(5978), 581–583. doi:10.1038/310581a0
- Eid, A. a, Ford, B. M., Block, K., Kasinath, B. S., Gorin, Y., Ghosh-Choudhury, G., ... Abboud, H. E. (2010). AMP-activated protein kinase (AMPK) negatively regulates Nox4-dependent activation of p53 and epithelial cell apoptosis in diabetes. *The Journal of biological chemistry*, *285*(48), 37503–12. doi:10.1074/jbc.M110.136796
- Flanagan, W. M., Corthésy, B., Bram, R. J., & Crabtree, G. R. (1991). Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A. *Nature*, *352*(6338), 803–7. doi:10.1038/352803a0

- Fujioka, A., Terai, K., Itoh, R. E., Aoki, K., Nakamura, T., Kuroda, S., ... Matsuda, M. (2006). Dynamics of the Ras/ERK MAPK cascade as monitored by fluorescent probes. *The Journal of biological chemistry*, 281(13), 8917–26. doi:10.1074/jbc.M509344200
- Gille, H., Kortenjann, M., Thomae, O., Moomaw, C., Slaughterl, C., Cobb, M. H., & Shaw, P. E. (1995). Erk phosphorylation potentiates Elk-1-mediated ternary complex formation and transactivation. *The EMBO Journal*, 14(5), 951–962.
- Goldberg, M., Zhang, H. L., & Steinberg, S. F. (1997). Hypoxia alters the subcellular distribution of protein kinase C isoforms in neonatal rat ventricular myocytes. *The Journal of clinical investigation*, 99(1), 55–61. doi:10.1172/JCI119133
- Graef, I. a, Chen, F., Chen, L., Kuo, a, & Crabtree, G. R. (2001). Signals transduced by Ca(2+)/calcineurin and NFATc3/c4 pattern the developing vasculature. *Cell*, 105(7), 863–75. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11439183>
- Gryglewski, R. J., Palmer, R. M., & Moncada, S. (1986). Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor. *Nature*, 320(6061), 454–6. doi:10.1038/320454a0
- Guzik, T. J., Sadowski, J., Guzik, B., Jopek, A., Kapelak, B., Przybylowski, P., ... Channon, K. M. (2006). Coronary artery superoxide production and nox isoform expression in human coronary artery disease. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 26(2), 333–9. doi:10.1161/01.ATV.0000196651.64776.51
- Hanuske, A.-, Sundell, K., & Lahn, M. (2004). The Role of Protein Kinase C-alpha (PKC- α) in Cancer and its Modulation by the Novel PKC- α -Specific Inhibitor Aprinocarsen. *Current Pharmaceutical Design*, 10(16), 1923–1936. doi:10.2174/1381612043384376
- Hernandez, G. L., Volpert, O. V., Iniguez, M. A., Lorenzo, E., Martinez-Martinez, S., Grau, R., ... Redondo, J. M. (2001). Selective Inhibition of Vascular Endothelial Growth Factor-Mediated Angiogenesis by Cyclosporin a: Roles of the Nuclear Factor of Activated T Cells and Cyclooxygenase 2. *Journal of Experimental Medicine*, 193(5), 607–620. doi:10.1084/jem.193.5.607
- Horsley, V., & Pavlath, G. K. (2002). NFAT: ubiquitous regulator of cell differentiation and adaptation. *The Journal of cell biology*, 156(5), 771–4. doi:10.1083/jcb.200111073
- Hoshino, R., Chatani, Y., Yamori, T., Tsuruo, T., Oka, H., Yoshida, O., ... Kohno, M. (1999). Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. *Oncogene*, 18(3), 813–22. doi:10.1038/sj.onc.1202367
- Hsieh, H.-J., Li, N.-Q., & Frangos, J. A. (1993). Pulsatile and steady flow induces c-fos expression in human endothelial cells. *Journal of Cellular Physiology*, 154(1), 143–151.

- Huang, C., Ma, W.-Y., Dawson, M. I., Rincon, M., Flavell, R. A., & Dong, Z. (1997). Blocking activator protein-1 activity , but not activating retinoic acid response element , is required for the antitumor promotion effect of retinoic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *94*, 5826–5830.
- Huang, T.-S., Lee, S.-C., & Lin, J.-K. (1991). Suppression of c-Jun/AP-1 activation by an inhibitor of tumor promotion in mouse fibroblast cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *88*(1), 5292–5296.
- Irani, K. (2000). Oxidant Signaling in Vascular Cell Growth, Death, and Survival : A Review of the Roles of Reactive Oxygen Species in Smooth Muscle and Endothelial Cell Mitogenic and Apoptotic Signaling. *Circulation Research*, *87*(3), 179–183. doi:10.1161/01.RES.87.3.179
- Janknecht, R., Ernst, W. H., Pingoud, V., & Nordheim, a. (1993). Activation of ternary complex factor Elk-1 by MAP kinases. *The EMBO journal*, *12*(13), 5097–104. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=413771&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Jiang, F., Zhang, Y., & Dusting, G. J. (2011). NADPH oxidase-mediated redox signaling: roles in cellular stress response, stress tolerance, and tissue repair. *Pharmacological Reviews*, *63*(1), 218–242. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21228261>
- Knaus, U., Heyworth, P., Evans, T., Curnutte, J., & Bokoch, G. (1991). Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTP-binding protein Rac 2. *Science*, *254*(5037), 1512–1515. doi:10.1126/science.1660188
- Kugiyama, K., Ohgushi, M., Sugiyama, S., Murohara, T., Fukunaga, K., Miyamoto, E., & Yasue, H. (1992). Lysophosphatidylcholine inhibits surface receptor-mediated intracellular signals in endothelial cells by a pathway involving protein kinase C activation [published erratum appears in *Circ Res* 1993 Mar;72(3):723]. *Circulation Research*, *71*(6), 1422–1428. doi:10.1161/01.RES.71.6.1422
- Lange, S., Heger, J., Euler, G., Wartenberg, M., Piper, H. M., & Sauer, H. (2009). Platelet-derived growth factor BB stimulates vasculogenesis of embryonic stem cell-derived endothelial cells by calcium-mediated generation of reactive oxygen species. *Cardiovascular research*, *81*(1), 159–68. doi:10.1093/cvr/cvn258
- Lee, D.-Y., Lee, C.-I., Lin, T.-E., Lim, S. H., Zhou, J., Tseng, Y.-C., ... Chiu, J.-J. (2012). Role of histone deacetylases in transcription factor regulation and cell cycle modulation in endothelial cells in response to disturbed flow. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(6), 1967–72. doi:10.1073/pnas.1121214109
- Lee, Y.-J., Soh, J.-W., Dean, N. M., Cho, C.-K., Kim, T.-H., Lee, S.-J., & Lee, Y.-S. (2002). Protein kinase Cdelta overexpression enhances radiation sensitivity via extracellular regulated protein kinase 1/2 activation, abolishing the radiation-induced G(2)-M arrest. *Cell growth & differentiation : the molecular biology*

- Journal of the American Association for Cancer Research*, 13(5), 237–46.
Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12065247>
- Leevers, S. J., Paterson, H. F., & Marshall, C. J. (1994). Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane. *Nature*, 369(6479), 411–4. doi:10.1038/369411a0
- Leprince, D., Gégonne, A., Coll, J., de Taisne, C., Schneeberger, A., Lagrou, C., & Stehelin, D. (1983). A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26. *Nature*, 306(5941), 395–397. doi:10.1038/306395a0
- Lin, C.-W., Hou, W.-C., Shen, S.-C., Juan, S.-H., Ko, C.-H., Wang, L.-M., & Chen, Y.-C. (2008). Quercetin inhibition of tumor invasion via suppressing PKC delta/ERK/AP-1-dependent matrix metalloproteinase-9 activation in breast carcinoma cells. *Carcinogenesis*, 29(9), 1807–15. doi:10.1093/carcin/bgn162
- Liu, B., Chen, Y., & Clair, D. K. S. (2009). ROS and p53: versatile partnership. *Free radical biology & medicine*, 44(8), 1529–1535. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.01.011.ROS
- Luo, J. (2009). Glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) in tumorigenesis and cancer chemotherapy. *Cancer letters*, 273(2), 194–200. doi:10.1016/j.canlet.2008.05.045
- Mechta-grigoriou, F., Gerald, D., & Yaniv, M. (2001). The mammalian Jun proteins : redundancy and specificity. *Oncogene*, 20, 2378–2389.
- Nunoi, H., Rotrosen, D., Gallin, J., & Malech, H. (1988). Two forms of autosomal chronic granulomatous disease lack distinct neutrophil cytosol factors. *Science*, 242(4883), 1298–1301. doi:10.1126/science.2848319
- Okoshi, R., Ozaki, T., Yamamoto, H., Ando, K., Koida, N., Ono, S., ... Kizaki, H. (2008). Activation of AMP-activated protein kinase induces p53-dependent apoptotic cell death in response to energetic stress. *The Journal of biological chemistry*, 283(7), 3979–87. doi:10.1074/jbc.M705232200
- Parkos, C. a, Allen, R. a, Cochrane, C. G., & Jesaitis, a J. (1987). Purified cytochrome b from human granulocyte plasma membrane is comprised of two polypeptides with relative molecular weights of 91,000 and 22,000. *The Journal of clinical investigation*, 80(3), 732–42. doi:10.1172/JCI113128
- Petry, A., Djordjevic, T., Weitnauer, M., Kietzmann, T., Hess, J., & Görlach, A. (2006). NOX2 and NOX4 mediate proliferative response in endothelial cells. *Antioxidants & redox signaling*, 8(9-10), 1473–84. doi:10.1089/ars.2006.8.1473
- Quagliaro, L., Piconi, L., Assaloni, R., Martinelli, L., Motz, E., & Ceriello, A. (2003). Intermittent High Glucose Enhances Apoptosis Related to Oxidative Stress in Human Umbilical Vein Endothelial Cells The Role of Protein Kinase C and NAD(P)H-Oxidase Activation. *Diabetes*, 52(12), 2795–2804.

- Raicu, M., & Manea, A. (2009). Activator protein-1 regulates Nox1 and Nox4-containing NADPH oxidase transcription in human vascular smooth muscle cells. *Annals of RSCB*, 14(2).
- Roskoski, R. (2012). ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*, 66(2), 105–43. doi:10.1016/j.phrs.2012.04.005
- Shyy, J. Y., Lin, M., Hant, J., Lu, Y., Petrim, M., & Chien, S. H. U. (1995). The cis-acting phorbol ester “12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate” -responsive element is involved in shear stress-induced monocyte chemotactic protein 1 gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 8069–8073.
- Sorescu, D., & Griendling, K. K. (2002). Reactive oxygen species, mitochondria, and NAD(P)H oxidases in the development and progression of heart failure. *Congestive heart failure (Greenwich, Conn.)*, 8(3), 132–40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12045381>
- Sözeri, O., Vollmer, K., Liyanage, M., Frith, D., Kour, G., Mark, G. E., & Stabel, S. (1992). Activation of the c-Raf protein kinase by protein kinase C phosphorylation. *Oncogene*, 7(11), 2259–62. Retrieved from <http://europepmc.org/abstract/MED/1437148>
- Straub, A., Krajewski, S., Hohmann, J. D., Westein, E., Jia, F., Bassler, N., ... Peter, K. (2011). Evidence of platelet activation at medically used hypothermia and mechanistic data indicating ADP as a key mediator and therapeutic target. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 31(7), 1607–16. doi:10.1161/ATVBAHA.111.226373
- Sutherland, C., Leighton, I. a, & Cohen, P. (1993). Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *The Biochemical journal*, 296 (Pt 1, 15–9. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1137648&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Suzuma, I., Suzuma, K., Ueki, K., Hata, Y., Feener, E. P., King, G. L., & Aiello, L. P. (2002). Stretch-induced retinal vascular endothelial growth factor expression is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase C (PKC)-zeta but not by stretch-induced ERK1/2, Akt, Ras, or classical/novel PKC pathways. *The Journal of biological chemistry*, 277(2), 1047–57. doi:10.1074/jbc.M105336200
- Touyz, R., Yao, G., Viel, E., Amiri, F., & Schiffrin, E. (2004). Angiotensin II and endothelin-1 regulate MAP kinases through different redox-dependent mechanisms in human vascular smooth muscle cells. *Journal of Hypertension*, 22(6), 1141–1149. Retrieved from http://journals.lww.com/jhypertension/Abstract/2004/06000/Angiotensin_II_and_endothelin_1_regulate_MAP.15.aspx

- Traub, O., & Berk, B. C. (1998). Laminar Shear Stress: Mechanisms by Which Endothelial Cells Transduce an Atheroprotective Force. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, *18*, 677–685. doi:10.1161/01.ATV.18.5.677
- Veikkola, T., Karkkainen, M., Claesson-Welsh, L., & Alitalo, K. (2000). Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Research*, *(60)*, 203–212. Retrieved from <http://cancerres.aacrjournals.org/content/60/2/203.short>
- Wang, Q., Zjou, Y., Wang, X., & Evers, B. M. (2006). Glycogen synthase kinase-3 is a negative regulator of extracellular signal-regulated kinase. *Oncogene*, *25*(1), 43–50.
- Welsh, G. I., Foulstone, E. J., Young, S. W., Tavaré, J. M., & Proud, C. G. (1994). Wortmannin inhibits the effects of insulin and serum on the activities of glycogen synthase kinase-3 and mitogen-activated protein kinase. *The Biochemical journal*, *303* (Pt 1, 15–20. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1137549&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Whelan, R. D., & Parker, P. J. (1998). Loss of protein kinase C function induces an apoptotic response. *Oncogene*, *16*(15), 1939–44. doi:10.1038/sj.onc.1201725
- Wientjes, F. B., Hsuan, J. J., Totty, N. F., & Segal, A. W. (1993). p4OPhox , a third cytosolic component of the activation complex of the NADPH oxidase to contain src homology 3 domains. *Biochem J*, *561*, 557–561.
- Wong, S. L., Lau, C. W., Wong, W. T., Xu, A., Au, C. L., Fai, C., & Ng, C. F. (2011). Pivotal Role of Protein Kinase C delta in Angiotensin II – Induced Endothelial Cyclooxygenase-2 Expression A Link to Vascular Inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *31*, 1169–1176. doi:10.1161/ATVBAHA.110.216044
- Xu, H., Goettsch, C., Xia, N., Horke, S., Morawietz, H., Förstermann, U., & Li, H. (2008). Differential roles of PKCalpha and PKCepsilon in controlling the gene expression of Nox4 in human endothelial cells. *Free radical biology & medicine*, *44*(8), 1656–67. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2008.01.023
- Zampetaki, A., Zeng, L., Margariti, A., Xiao, Q., Li, H., Zhang, Z., Xu, Q. (2010). Histone deacetylase 3 is critical in endothelial survival and atherosclerosis development in response to disturbed flow. *Circulation*, *121*(1), 132–42. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.109.890491

Lebenslauf aus Datenschutzgründen gelöscht

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.