

AUS DER FORSCHUNGSGRUPPE IMMUNBIOLOGIE DER DERMATOLOGISCHEN
KLINIK AM BIOMEDIZINISCHES FORSCHUNGSZENTRUM (BMFZ) DER
HEINRICH-HEINE-UNIVERSITÄT, DÜSSELDORF

PROF. DR. VICTORIA KOLB-BACHOFEN

**DAS ZYTOKIN-ANTWORTPROFIL FÜR DIE EXPRESSION
DER INDUZIERBAREN NO-SYNTASE IN
AORTA-ENDOTHELZELLEN DER MAUS**

DISSERTATION

ZUR ERLANGUNG DES GRADES EINES DOKTORS DER MEDIZIN
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER HEINRICH-HEINE-UNIVERSITÄT
DÜSSELDORF

VORGELEGT VON

MARIUCA VASA

2002

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

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dieter Häussinger
Dekan

Referentin: Prof. Dr. Kolb-Bachofen

Korreferent: Prof. Dr. Kelm

INHALTSANGABE

<u>EINLEITUNG</u>	1
<u>DAS ENDOTHEL</u>	1
<u>STICKSTOFFMONOXID</u>	4
<u>BIOSYNTHESE VON NO</u>	5
<u>nNOS, NOS I</u>	6
<u>eNOS, NOS III</u>	7
<u>iNOS, NOS II</u>	7
<u>MOLEKULARE MECHANISMEN DER NO WIRKUNG</u>	8
<u>SCHÄDIGENDE WIRKUNGEN VON STICKSTOFFMONOXIDRADIKAL</u>	11
<u>PROTEKTIVE WIRKUNGEN VON STICKSTOFFMONOXIDRADIKAL</u>	14
<u>NO ALS SCAVENGER VON RADIKALEN UND INHIBITOR DER LIPIDPEROXIDATION</u>	14
<u>INHIBITION VON PROTEINEN DURCH S-NITROSYLIERUNG</u>	14
<u>INHIBITION DER CYTOCHROM C FREISETZUNG</u>	15
<u>IMMUNMODULATORISCHE EINFLÜSSE</u>	15
<u>FRAGESTELLUNG</u>	16
<u>MATERIALIEN UND METHODEN</u>	17
<u>MATERIALIEN</u>	17
<u>CHEMIKALIEN</u>	17
<u>EINWEGARTIKEL FÜR DIE ZELLKULTUR</u>	17
<u>GERÄTE</u>	17
<u>PUFFER, MEDIEN UND ZUSÄTZE FÜR DIE ZELLKULTUR</u>	18
<u>ZYTOKINE UND BIOLOGISCHE PROBEN</u>	18
<u>ANTIKÖRPER</u>	19
<u>TIERE</u>	19
<u>METHODEN</u>	19
<u>ISOLIERUNG UND INKULTURNAHME VON AORTA-ENDOTHELZELLEN DER MAUS</u>	19
<u>ISOLIERUNG DER AORTA -ENDOTHELZELLEN</u>	19
<u>ARBEITSMETHODEN UND KULTURBEDINGUNGEN FÜR DIE ENDOTHELZELL-PRIMÄRKULTUREN</u>	20
<u>ARBEITSMETHODEN DER ZELLKULTUR</u>	20
<u>IMMUNZYTOCHEMISCHE FÄRBUNG VON ENDOTHELZELLEN</u>	21
<u>UNTERSUCHUNG DES ZELLWACHSUMS</u>	23
<u>NITRITBESTIMMUNG NACH GRIESS</u>	23
<u>UNTERSUCHUNG DER AKTIVITÄTSMUSTER DER INDUZIERBAREN NO-SYNTHESE (iNOS) IN ENDOTHELZELLEN DER MAUS</u>	24
<u>REVERSE TRANSKRIPTION (RT) DER RNA UND AMPLIFIKATION DER NOS-CDNA MIT HILFE DER POLYMERASE KETTEN REAKTION (PCR)</u>	25
<u>ERGEBNISSE</u>	29
<u>ISOLIERUNG VON ENDOTHELZELLEN AUS DER AORTA DER MAUS</u>	29
<u>PHÄNOTYP-CHARAKTERISIERUNG VON AORTA-ENDOTHELZELL-KULTUREN DER MAUS</u>	29
<u>BESTIMMUNG DES WACHSTUMSVERHALTEN VON MAUS-AORTA-ENDOTHELZELLEN</u>	30
<u>BESTIMMUNG DER AKTIVIERUNGS- UND EXPRESSIONSMUSTER DER iNOS IN</u>	

<u>MAUS-AORTA- ENDOTHELZELLEN</u>	31
<u>BESTIMMUNG DER NITRITPRODUKTION RESIDENTER, MIT EINZELNEN ZYTOKINEN UND ZYTOKINKOMBINATION STIMULIERTEN MAUS- AORTA- ENDOTHELZELLEN</u>	32
<u>INKUBATION VON MAUS-AORTA-ENDOTHELZELLEN MIT VERSCHIEDENEN IFN-γKONZENTRATIONEN</u>	33
<u>WIRKUNG EINER REPETITIVEN IFN-γSTIMULATION AUF DIE NITRITPRODUKTION AORTALEN ENDOTHELZELLEN DER MAUS</u>	35
<u>NACHWEIS DER iNOS-mRNA AORTALEN ENDOTHELZELLEN DER MAUS</u> ...	36
<u>NACHWEIS DER ENDOGENEN IL-1β UND ICE-mRNA EXPRESSION IN AORTALEN ENDOTHELZELLEN DER MAUS</u>	39
<u>DISKUSSION</u>	43
<u>MÖGLICHE PATHOPHYSIOLOGISCHE UND THERAPEUTISCHE RELEVANZ DER ERGEBNISSE</u>	48
<i>iNOS als Promotor der Arteriosklerose?</i>	48
<i>Protektive Rolle der iNOS in der Transplantations-Arteriosklerose</i>	50
<u>LITERATUR</u>	52
<u>DANKSAGUNG</u>	62
<u>CURRICULUM VITAE</u>	63
<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	64

EINLEITUNG

DAS ENDOTHEL

Das Endothel stellt ein großes Organ mit wichtigen sekretorischen, synthetischen, metabolischen und immunologischen Funktionen dar (1). Endothelzellen stammen aus dem Mesenchym (2, 3), sie kleiden lumenseitig die Blutgefäße aus und bilden, im adulten humanen Organismus, eine dynamische, einschichtige Barriere zwischen Kreislauf und extravaskulärem Kompartiment (4), mit einer Gesamt-Fläche von mehr als 7 qm (5). Aufgrund histologischer Kriterien werden 3 Arten von Endothelien unterschieden: durchgehend, diskontinuierlich und fenestriert; große Blutgefäße (z.B. die Aorta), Gehirn und Retina sind mit einer durchgehenden, durch „tight junctions“ verbundenen Endothelschicht ausgekleidet; Leber-, Milz- und Knochenmarksinsuloide besitzen ein diskontinuierliches oder offen fenestriertes Endothelgewebe, das die Ein- und Auswanderung von Zellen ermöglicht. Das fenestrierte Endothel in den Dünndarmvilli aller endokrinen Drüsen sowie der Niere, ermöglicht Adsorption, Sekretion und Filtration (6).

Endothelzellen sind aber außer den oben beschriebenen strukturellen Merkmalen auch heterogen in Hinblick auf ihren Phänotyp, so wird z.B. der von Willebrand Faktor (vWF), der als Marker für Endothelzellen gilt, nicht gleichmäßig auf allen Gefäßen exprimiert. Heterogene Expression von unterschiedlichen Proteinen, Expression von Rezeptoren wie Adhäsionsmoleküle (7-13), und unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber Apoptose-Signalen (14) sind vielfach beschrieben worden.

Das Endothel ist an vielen physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt, wie die Regulation der Hämostase, des Vasotonus, Transport von Substanzen zwischen Gewebe und Gefäßen, und Regulation der Gefäßwandpermeabilität.

In der Frühphase entzündlicher Prozesse beeinflussen Lymphozyten und Makrophagen durch Freisetzung der Zytokine, die sogenannte „Aktivierung“ vaskulärer Endothelzellen, die durch morphologische und funktionale Veränderungen des Endothels charakterisiert ist (15). Zu den durch Zytokine beeinflussbaren Funktionen der Endothelzellen gehören die Proliferationsrate und die Migration, die Expression von MHC-Klasse-II-Antigenen, die Produktion von Zytokinen und chemotaktisch aktiven Substanzen sowie die Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle, die

Adhäsion, Aktivierung und Migration von Lymphozyten und Monozyten in das betreffende Gewebe ermöglichen (16).

Endothelzellen sind also eine Quelle und gleichzeitig eine Zielscheibe für eine Vielfalt von Zytokinen (17, 18). Interleukin-1 (IL-1) wird von nicht-stimulierten Endothelzellen in einer niedrigen Rate produziert, was eine physiologische Rolle von IL-1 in der Aufrechterhaltung der Gefäßhomeostase impliziert (19, 20). Die IL-1-Gen-Familie besteht aus mindestens drei Mitgliedern, nämlich den agonistisch-wirkenden IL-1 α , IL-1 β , und dem IL-1 Rezeptor-Antagonisten (IL-1ra). Daneben wurde 1997 noch ein viertes Mitglied entdeckt, IL-18 (IL-1 γ IGIF=IFN γ -inducing factor), welches zwar zur selben Gen-Familie gehört, nicht aber über die selben Rezeptoren wirkt (21). IL-1 α und IL-1 β werden zunächst als Vorläufer (pro-IL-1) im Zytosol synthetisiert (22). Die Pro-Form von IL-1 β wird intrazellulär durch Caspase 1 (ICE=Interleukin-1-converting-enzyme) hinter Aspartat 116 gespalten (23).

Zytokine wie das Interleukin-1-beta (IL-1 β), der Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- α) und das Interferon-gamma (IFN- γ), aber auch bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) induzieren die Synthese von endothelalem IL-1 (24, 25). Neben der IL-1 α und IL-1 β Sekretion wird ein weiteres Produkt, der Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist von Endothelzellen produziert, welcher irreversibel an das Interleukin-1-Rezeptor bindet ohne Signaltransduktionsmechanismen auszulösen. Das vom Endothel freigesetzte IL-1 übt eine Reihe von parakrinen Funktionen aus. So kann IL-1 die Adhäsion von Leukozyten an die Endothelzellen beeinflussen (26), es erhöht die Synthese von Prostazyklin (PG₂) (27), induziert die Thrombin-mediierte Freisetzung des von Willebrand Faktors (vWF) (28), und regelt die Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (PAI) Synthese (29) bei gleichzeitiger Herunterregulation von Gewebe-Plasminogen-Aktivator (tPA). Weiterhin stimuliert IL-1 die Synthese anderer endothelialer Zytokine wie das IL-1 selbst (30), von Interleukin-6 (IL-6) (31), sowie Chemokinen wie Interleukin-8 (IL-8), das Makrophagen-chemotaktische-Protein-1 (MCP-1) (32) und Wachstumsfaktoren wie das Granulozyten-/Makrophagenkolonie-stimulierender-Faktor (GM-CSF) und das Granulozytenkolonie-stimulierender-Faktor (G-CSF) (33). IL-1 führt auch zu einer Erhöhung der Stickstoffmonoxid (NO) Freisetzung aus den Endothelzellen über eine Induktion der induzierbaren NO Synthase (iNOS) (34). Die Gegenregulation steuert ein weiteres Zytokin, der

Transformierende-Wachstumsfaktor- β (TGF- β) der ebenfalls von aktivierten Endothelzellen produziert wird.

TGF- β übt wichtige Funktionen in Entzündung und Immunreaktionen aus. Es wirkt chemoattraktiv auf Leukozyten aber hemmt interessanterweise die Leukozytenadhäsion an das aktivierte Endothel (35), vermutlich über eine Herunterregulierung endothelialer Adhäsionsmolekülen (36).

Zusätzlich zu den beschriebenen Funktionen, nehmen die in den Endothelzellen produzierte Zytokine auch an anderen Prozessen teil. Dazu gehören Regulation von Hämatopoese, Gerinnung, Chemotaxis und Akut-Phase-Reaktionen.

Durch Zytokine aktivierte Endothelzellen exprimieren an ihrer Oberfläche eine Reihe adhäsionswirksamen Substanzen die Adhäsionsmoleküle genannt werden. Dazu gehören die Selektine (E-Selektin und P-Selektin), die Integrine und das Vascular Cell Adhesion Molecule (VCAM), das Endothelial-Leucocyte Adhesion Molecule (ELAM) und die Familie der Intercellular Adhesion Molecule (ICAM 1-3). Endotheliale Adhäsionsmoleküle reagieren mit komplementären Erkennungsstrukturen auf Thrombozyten, Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen (26, 37). Durch die Anzahl und Variabilität der möglichen interzellulären Bindungen wird nach einem fein ausregulierten System zuerst ein reversibler und dann ein enger Kontakt zwischen den beiden Zelltypen hergestellt und anschließend der Aktivierungszustand und die weitere Interaktion mit den gebundenen Zellen definiert (38). Die proinflammatorischen Zytokinen TNF- α und IL-1 α können Endothelzellen *in vitro* schädigen; dies führt zu einer erhöhten Permeabilität der Zellschicht (39-42) und im Extremfall zum Zelltod (43). Die oben beschriebenen komplexen Prozesse führen wiederum zur Modulation zellmedierten Antworten. Dieser „cross-talk“ zwischen Entzündungszellen und Endothel ist essentiell für die Entstehung eines chronischen inflammatorischen Zustandes.

Endothelzellen spielen eine wichtige Rolle in der Zell-vermittelten Immunität. Während der sehr frühen, entzündlichen Phase der Abwehr-Reaktion produzieren die „natural killer cells“ Interferon-gamma (IFN- γ), das die Endothelzellen zur Expression von Major-Histokompatibilitätskomplexe (MHC) der Klasse II stimuliert. In der späteren, Antigen-spezifischen Phase der Immunantwort sowie bei

wiederholter Infektion können Endothelzellen sekundäre Immunreaktionen initiieren über die Präsentation von Antigenen an zirkulierende Gedächtnis-T-Zellen, deren T-Zell-Rezeptor-Spezifität gegen ein Antigen gerichtet ist, das im peripheren Gewebe lokalisiert ist. Auf diese Weise erhöhen die Endothelzellen die Effizienz der Immunreaktion. Signale, die von T Zellen ausgehen, und zwar sowohl lösliche (z.B. Zytokine) als auch Membran-gebundene (z.B. CD40-Ligand), können die Expression von Endothelzellgenen modulieren; so werden Effektorfunktionen verwirklicht, wie die Rekrutierung von Leukozyten oder die Aktivierung und Initiierung der Gerinnungskaskade (44).

Endothelzellen kontrollieren und modulieren durch die Produktion und Freisetzung vasoaktiver Stoffe den Gefäßtonus und somit den Blutdruck. Die nach entsprechender Stimulierung freigesetzten vasoaktiven Stoffe werden je nach ihrer Wirkung den Endothelium-Derived-Contraction-Faktoren (EDCF) (45, 46) bzw. den Endothelium-Derived-Relaxing-Faktoren (EDRF) (47) zugeordnet. Zu den Endothelzell-generierten vasokonstriktiven Substanzen zählt das Thromboxan A₂, das Superoxid Anion, das Endothelin und das Prostaglandin H₂ (48-51). Physiologische Antagonisten der vasokonstriktiven Substanzen sind die ebenfalls von den Endothelzellen sezernierten Endothelium-Derived-Relaxing-Faktoren (EDRF). Bei dem Hauptvertreter der EDRF handelt es sich um das Stickstoffmonoxid-Radikal (52) (\bullet NO).

Die vaskuläre Relaxation wird durch eine Reihe von Stimuli (Acetylcholin, Thrombin, Substanz P, Calcium Ionophore und Bradykinin) induziert und ist abhängig von der lokalen Produktion von NO durch Endothelzellen (53). Der Mechanismus ist ein Ca²⁺ Anstieg, welcher eNOS in der Endothelzelle aktiviert. NO diffundiert in die Glattenmuskelzellen, wo es die lösliche Guanylatzyklase stimuliert. Das produzierte cGMP kann auf Kinasen, Ionenkanäle und cGMP-abhängige Phosphodiesterasen wirken, und so die Relaxation des Muskelgewebes herbeiführen (54). Tatsächlich ist das cGMP-System der Hauptmechanismus über den die NO-medierte Effekte im vaskulären und neuronalen System vermittelt werden.

STICKSTOFFMONOXID

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein pleiotrop wirkendes Mediator- und Regulator-Molekül mit sehr wichtigen Aufgaben in der intra- und interzellulären Kommunikation. Das Gas NO hat Eigenschaften eines

Radikals. Obwohl es ursprünglich ausschließlich als Umweltgift und metabolisches Produkt von Mikroorganismen galt wurde deutlich, dass NO ein ubiquitäres Signalmolekül in Säugerzellen darstellt (55). Schon 1980 hatten Furchgott und Zawadski gezeigt, dass Vasodilatation in Präparaten von Arterien durch einen dem Endothel entstammenden Faktor induziert werden konnte. Dieser Faktor erhielt den Namen EDRF (endothelial-derived relaxing factor). Erst 1988 schlugen Ignarro und Furchgott unabhängig voneinander vor, dass EDRF NO sei (56, 57). Als Folge dieser Beobachtungen, für die 1998 der Nobel Preis für Physiologie und Medizin verliehen wurde, haben in den letzten 10 Jahren immer mehr Studien die multiplen physiologischen und pathologischen Rollen von NO untersucht. Die Mechanismen der Regulation der NO Bildung sind ein zentrales Thema im Verständnis der Rolle von Endothelzellen in der Pathophysiologie des Menschen.

BIOSYNTHESE VON NO

NO wird enzymatisch durch die Familie der Stickstoffmonoxidsynthasen generiert (NOS; L-Arginin-NADPH-Oxidoreduktase) (55, 58). Die NOS Isoenzymfamilie besteht derzeit aus drei Isoformen, die definiert werden als konstitutiv exprimiert und Ca^{2+} -Calmodulin-abhängig bzw. induzierbar und Ca^{2+} -Calmodulin unabhängig. Konstitutive Isoformen sind die neuronale NOS (nNOS, NOS I) und die endotheliale NOS (eNOS, NOS III). Die induzierbare NOS (iNOS, NOS III) ursprünglich in Makrophagen charakterisiert wurde dann aber in verschiedenen Zelltypen gefunden. Alle NOS Isoenzyme katalysieren unter Sauerstoffverbrauch die Konversion von L-Arginin zu L-Citrullin und NO. Um Sauerstoff in NO wie auch in L-Citrullin einzufügen, benötigen NOS eine Reihe von Kofaktoren, nämlich NADPH, FAD, FMN, BH₄ und (Ca^{2+})-Calmodulin.

NOS Enzyme zeigen eine deutliche Homologie (60%) in der C-terminalen Region mit der Cytochrom p-450 Reduktase. Cytochrom p-450 Enzyme der Säuger benötigen eine zusätzliche Reduktase für den Elektronentransfer auf die prosthetische Häm-Gruppe, wo die Monooxygenasereaktion stattfindet. Die NOS Isoenzyme aber sind katalytisch autark. Die Aktivität der NOS kann gehemmt werden durch L-Arginin Analoga, die an einem Guanidinostickstoff substituiert sind (53). N^G-nitro-Arginin (L-NA) und N^G-nitro-L-Argininmethylester (L-NAME) scheinen die konstitutiven gegenüber der induzierbaren NOS zu

bevorzugen. Umgekehrt ist N^G-Monomethyl-L-Arginin etwas aktiver in der Hemmung der iNOS im Vergleich zu den konstitutiven NOS.

Die allgemeinen Merkmale der NOS Isoenzyme sind in Tabelle 1 zusammengefaßt:

Tabelle 1

	nNOS (NOS I)	iNOS (NOS II)	eNOS (NOS III)
Molekulargewicht	160 kD	130 kD	135 kD
Expression	Konstitutiv	Induzierbar	konstitutiv
Aktivität	reguliert	nicht reguliert	reguliert
Ca²⁺-Abhängigkeit	0.2 – 0.4 µM	Unabhängig	0.3 µM

nNOS, NOS I

Die höchsten Mengen an NO im Organismus werden in Neuronen gefunden, wo NO Eigenschaften eines Botenmoleküls übernimmt. Im autonomen Nervensystem spielt NO die Rolle eines nicht-adrenergen, nicht-cholinergen (NANC) Neurotransmitters. Dieser NANC-Signaltransduktionsweg reguliert die Relaxation der glatten Muskelzellen in Zerebralgefäßen, sowie im Gastrointestinal-, Urogenital- und Respirationstrakt. Dysfunktionen der NOS-Aktivität im autonomen Nervensystem tragen zur Entstehung pathologischer Zuständen wie Migräne, hypertrophe Pylorusstenose und männliche Impotenz bei. Im Gehirn funktioniert NO als ein Neuromodulator der wahrscheinlich an Prozessen wie Lernen und Gedächtnis beteiligt ist. Unter physiologischen Bedingungen reguliert NO auch die Skelettmuskelkontraktibilität und die Übungs-induzierte Glukoseaufnahme.

Die neuronale NOS Isoform wird in verschiedenen neuronalen Zellen im peripheren Nervensystem und im Skelettmuskel exprimiert (59, 60). nNOS wird an die plasmatischen Membran der Skelettmuskel exprimiert und begünstigt die Diffusion von NO in die Gefäßen um dadurch die Muskelperfusion zu regulieren. Außerdem wird sie in nicht-neuronalen Zellen wie Lungenepithelzellen (61), im Skelettmuskel (62), und in der Macula densa der Niere (63) exprimiert. Die nNOS ist vornehmlich zytosolisch lokalisiert und wird durch physiologische Ca²⁺ Anstiege (über 100nM) aktiviert, die durch Hormone oder Ca²⁺ Einstrom durch

spannungsabhängige Kanäle oder Glutamatkanäle induziert werden. Ca^{2+} stimuliert die Aktivierung und Bindung von Calmodulin an NOS. Die Enzymaktivität kann durch Serin-Threonin Phosphorylierung über Proteinkinasen reguliert werden.

eNOS, NOS III

Das eNOS Isoenzym wurde zuerst in Endothelzellen identifiziert (64). Es liegt vornehmlich membrangebunden vor, aufgrund von Myristoylierung und Palmitoylierung (65, 66). Die Lokalisation in der Membran scheint notwendig für die Aktivität des Enzyms. Obwohl dieses Enzym konstitutiv exprimiert ist und durch Ca^{2+} -Calmodulin aktiviert werden kann, gibt es Mechanismen, die seine Induktion und/oder Translation regulieren. Zum Beispiel wird erhöhte mRNA-Synthese der eNOS durch Strömungsscherkräfte (shear stress) induziert (67). Ebenfalls führt shear stress (laminaren Blutfluß) über die Phosphorylierung und dadurch Aktivierung der Serine/Threonine Kinase Akt zu einer Ca^{2+} -unabhängigen eNOS-Aktivierung (68). Hingegen kann TNF- α die Genexpression der eNOS inhibierend modifizieren. Die physiologische Hauptrolle der eNOS ist die Regulation des Blutdrucks. eNOS-defiziente Mäuse entwickeln einen moderaten Bluthochdruck (69).

iNOS, NOS II

Die induzierbare NOS Isoform wurde erstmals aus Makrophagen aufgereinigt (70) und wird in verschiedenen Zellen wie Hepatozyten, Neutrophilen, Endothelzellen, pankreatischen beta-Zellen, Fibroblasten, Astrozyten, Mikroglia und vielen anderen Zelltypen exprimiert (71). Im Gegensatz zu den konstitutiven NO-Synthasen ist die iNOS Ca^{2+} -Calmodulin-unabhängig und ihre Expression wird im wesentlichen transkriptionell reguliert. Induziert werden kann die iNOS durch alle Entzündungsinhibitoren, wie bakterielle Bestandteile (LPS) und proinflammatorische Zytokine des Th-1 Typs IL-1 α , IFN- γ , TNF- α . Im Gegensatz dazu wird die Expression der iNOS durch Zytokine des Th-2 Typs wie IL-4, IL-10 (72) und TGF- β (73) blockiert bzw. herunterreguliert. Ein weiterer Gegensatz der iNOS zu den konstitutiv exprimierten Isoformen ist die Dauer und Intensität ihrer Aktivität. Nach erfolgter iNOS-

Induktion wird NO über einen langen Zeitraum (Tage) und daher lokal in hohen Konzentrationen synthetisiert (71).

MOLEKULARE MECHANISMEN DER NO WIRKUNG

Unter physiologischen Bedingungen dient NO als Molekül zur interzellulären Signal-Übertragung. NO ist zwar ein Radikal, liegt aber mit seinem ungepaarten Elektron in seiner "natürlichen" Elektronen-Konfiguration vor und ist deshalb längst nicht so reaktiv wie z.B. Sauerstoff-Radikale (74). Daher reagiert NO im Gegensatz z.B. zum Hydroxyl-Radikal OH \cdot auch nur relativ selektiv mit bestimmten Molekülen wie etwa dem Fe $^{2+}$ in Häm-Gruppen oder dem Di-Radikal O $_2$. In vielen Dingen ähnelt NO eher dem O $_2$ als einem reaktiven Radikal im klassischen Sinne und hat in biologischen Systemen daher auch eine relativ lange Lebensdauer, die je nach Konzentration bei mehreren Sekunden bis Minuten liegt (75).

NO reagiert mit O $_2$ zu höheren Stickoxiden wie ONOO \cdot , NO $_2$ \cdot oder N $_2$ O $_3$ ("NO $_x$ ") (76) und anschließend zu den vergleichsweise untoxischen Oxidationsprodukten Nitrit und Nitrat. Mit Superoxid-Anionen kann NO zum toxischen Peroxynitrit-Anion (ONOO $^-$) reagieren. Bisher ist allerdings ungeklärt, welche Produkte in welchen Konzentrationen eine Zielzelle wirklich erreichen.

Seit langem weiß man, dass NO die mitochondriale Atmung hemmt (77). Der genaue Mechanismus ist noch umstritten, aber es gibt gute Hinweise, dass NO die Cytochrom c Oxidase hemmt (78). Die dann in der Atmungskette auflaufenden Elektronen reduzieren O $_2$ zu O $_2$ \cdot^- , welches lokal an der Mitochondrien-Membran mit NO zum Peroxynitrit-Anion reagieren könnte. O $_2$ \cdot^- und/oder Peroxynitrit könnte(n) dann wiederum die schon lange bekannte Hemmung der Eisen-Schwefel-Cluster-Proteine Complex I und II in der Mitochondrienmembran verursachen (79, 80). Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß NO auch reversibel das mitochondriale Membran-Potential hemmt und den Ca $^{2+}$ -Einstrom in die Mitochondrien beeinträchtigt (81).

Eisen-Schwefel-Cluster-Proteine spielen eine wichtige Rolle bei Elektronen-Transfer-Reaktionen. NO bzw. Peroxynitrit zerstört Eisen-Schwefel-Cluster in Proteinen wie z.B. der Aconitase im Citrat-Zyklus, was zu einer irreversiblen Enzym-Hemmung führt.

NO kann unter physiologischen aeroben Bedingungen freie SH-Gruppen in Proteinen nitrosylieren. Wenn die SH-Gruppen in oder nahe am katalytischen Zentrum des Enzyms liegen, kann es dadurch zu einer Enzym-Hemmung kommen. Dies ist für viele Enzyme gezeigt worden, wie z.B. für die Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase, die Protein Kinase C, die Phosphotyrosin Protein Phosphatase, die Glutathion Reduktase, die Glutathion Peroxidase und die Kreatin Kinase (76).

Des weiteren induziert NO DNA-Schäden in Zellen (82, 83) wahrscheinlich mittels nitrosativer Deaminierung von Nukleotid-Basen (84). Die Zelle versucht, die modifizierten Nukleotide mittels seines DNA-Reparatursystems zu ersetzen. Im Verlauf dieses mehrstufigen Prozesses kommt es zu DNA-Strangbrüchen durch Endonukleasen, zur Bindung der PARP an diese DNA-Strangbrüche und zu einer PARP-Aktivierung. Die PARP automodifiziert sich anschließend selbst durch Anlagerung von bis zu 150-200 ADP-Ribosen. Der Sinn ist wahrscheinlich, die DNA-Reparaturstelle zu stabilisieren, bis der DNA-Reparatur-Komplex sich assembliert hat. Die Automodifikation der PARP führt nach NO-Behandlung in Neuronen und in Inselzellen zu einer starken Verarmung an NAD^+ und ATP (85, 86). Dies scheint einen wichtiger Teil der toxischen Wirkung von NO bei Inselzellen auszumachen, da Inselzellen aus PARP-Knock-out-Mäusen weit weniger empfindlich gegenüber NO sind als Inselzellen aus Kontroll-Mäusen (87). Zusätzlich reagiert NO mit dem Tyrosyl-Radikal im aktiven Zentrum der Ribonukleotid-Reduktase und hemmt dadurch die Bereitstellung von Nukleotiden zur DNA-Reparatur. Außerdem hemmt NO auch noch das DNA-Reparaturenzym Formamidpyrimidin-DNA Glykolase (Fpg) (88).

Wenn man dies alles zusammenfasst, ergibt sich folgendes Bild: NO in höheren Konzentrationen hemmt die Energie-Produktion in der Zelle und induziert DNA-Schäden, bei gleichzeitiger Hemmung der Reparatur. Durch die PARP-Aktivierung verarmt die Zelle an NAD^+ und ATP. Da wahrscheinlich auch der Membran-Transport, die Aktivität einiger zytosolischer Enzyme und die Transkriptions-Fähigkeiten der Zelle beeinträchtigt sind, stirbt eine Zelle, die über keine oder zu wenige Abwehrmechanismen gegenüber NO verfügt, wahrscheinlich als Folge eines multifaktoriellen Geschehen.

Dies führt zu der Frage, ob Zellen sich vor höheren NO-Konzentrationen schützen können. Es ist sehr unwahrscheinlich, dass Zellen während der

Evolution keine Schutzmechanismen gegenüber einem so potenten zytotoxischen Molekül wie NO entwickelt haben. Erste Hinweise auf einen induzierbaren Schutz vor NO hat man bei Bakterien gefunden. Dort gibt es sogenannte SoxR-regulierte Gene, die für bestimmte Schutz-Proteine wie Mn-Superoxid Dismutase, Endonuklease IV, Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (zur Bereitstellung von NADPH), micF etc. codieren. Werden E.coli mit subtoxischen NO-Konzentrationen vorbehandelt, so werden diese Gene aktiviert und die Bakterien erweisen sich anschließend als relativ resistent gegenüber der zytotoxischen Wirkung aktivierter Makrophagen (89). Ein sogenannter Hitze-Schock (Inkubation der Zellen für 90 Minuten bei 43°C) reduziert die Sensitivität von Inselzellen gegenüber 0,45 mM NP um etwa 70% (90). Eine Überexpression von Metallothionein bzw. des Protoonkogens Bcl-2 in Zell-Linien reduziert deren Empfindlichkeit gegenüber NO (91, 92). NO-Donore verstärken die Expression der Mn-SOD mRNA in glatten Gefäß-Muskelzellen (93) und des Streß-Proteins Hämoxxygenase-1 in Endothelzellen (94).

Neben Eisen-Schwefel-Clustern zerstört NO auch Zink-Finger-Domänen in Proteinen und hat damit Einfluss auf die Regulation der Gen-Expression.

Lange Zeit war umstritten, ob NO freie SH-Gruppen nitrosylieren kann. Heute weiß man, dass NO unter anaeroben Bedingungen nicht mit SH-Gruppen reagiert. Unter physiologischen aeroben Bedingungen dagegen reagiert NO mit O₂ zu N₂O₃, welches als höheres Stickoxid mit elektrophilem Charakter ("NO⁺") sehr schnell mit SH-Gruppen zu S-Nitrosothiolen reagiert (95). S-Nitrosothiole sind in Lösung instabil, sie zerfallen in Abhängigkeit ihrer chemischen Struktur unterschiedlich schnell wieder zu NO und den entsprechenden Disulfiden (96, 97). NO reagiert unter aeroben Bedingungen auch mit Stickstoff-Atomen sekundärer Amine zu Nitrosaminen (98) und mit dem Indol-Stickstoff vom Tryptophan zu N-Nitroso-Tryptophan (99). Diese Reaktionen sind unter physiologischen Bedingungen jedoch wesentlich langsamer als die S-Nitrosylierung.

SH-Gruppen spielen in Verbindung mit Zn²⁺ in vielen Proteinen eine wichtige strukturelle Rolle. Bei geeigneten Abständen der Aminosäuren können Schwefelatome des Cysteins und/oder Imidazol-Stickstoffatome des Histidins Zn²⁺ komplexieren, wodurch ein relativ stabiler "Loop" in

der Aminosäure-Kette entsteht. Diese sogenannten Zink-Finger oder Zink-Finger-ähnlichen Strukturen kommen sehr häufig in DNA-bzw. RNA-bindenden Proteinen wie z.B. Transkriptionsfaktoren vor. Es konnte gezeigt werden, daß NO unter aeroben physiologischen Bedingungen Zink-Ionen aus dem Zn^{2+} -Speicher-Molekül Metallothionein freisetzt. Dies geschieht mittels S-Nitrosylierung von Cystein-SH-Gruppen und anschließender Bildung von Disulfid-Gruppen. Auch die Zink-Finger-abhängige katalytische Aktivität der Alkohol-Dehydrogenase wird durch NO gehemmt, wobei ebenfalls eine Zn^{2+} -Freisetzung beobachtet werden kann. Schließlich wurde nachgewiesen, daß NO die DNA-Bindungsaktivität des Zink-Finger-Transkriptionsfaktors LAC9 hemmt, während ein Transkriptionsfaktor ohne Zink-Finger nach NO-Behandlung in seiner DNA-Bindungskapazität nicht beeinträchtigt ist.

Die Transkription von Genen wird unter anderem durch die Bindung spezifischer Proteine (Transkriptionsfaktoren) an DNA Bindungssequenzen in Genpromotoren reguliert. NO übt eine genregulatorische Funktion aus; ein molekularer Mechanismus für diese regulierende Aktivität stellt die Interaktion mit und Inhibition von Zink-Finger Strukturen in Transkriptionsfaktoren dar (100). Tatsächlich setzen physiologisch relevante Konzentrationen von NO im Nukleus von verschiedenen Zellen Zinkionen frei (101). Die reversible Inhibition der Zink-finger Familie von Transkriptionsfaktoren wie Sp1, EGR-1 und NFATc von NO führt zu einer Hemmung der IL-1 β -induzierte IL-2 mRNA-Expression; die dominante Regulation der IL-2-Genexpression liegt in den Zinkfinger Transkriptionsfaktoren Sp1 und EGR-1 (102). Diese inaktivierende Wirkung von NO auf Zinkfinger Transkriptionsfaktoren stellt wohl einen Teil der immunsuppressiven Eigenschaft von NO dar. Weitere Beispiele für einen Effekt von NO auf die Gentranskription werden als Folge von dessen Wirkung auf NF κ B beschrieben. NO kann die Aktivierung von NF κ B verhindern (103). Allerdings wurde aber ebenfalls auch eine Aktivierung von NF κ B durch NO beschrieben (104).

SCHÄDIGENDE WIRKUNGEN VON STICKSTOFFMONOXIDRADIKAL

Ein schädigender Effekt des durch die iNOS-produzierten NO scheint im Verlauf des septischen Schocks eine wesentliche Rolle zu spielen. Die Induktion der iNOS über die proinflammatorischen Zytokinen IL-1 β , IL-6, IFN- γ und TNF- α in Kombination mit Lipopolysaccharide LPS (105, 106)

kann zu einem massiven Blutdruckabfall bei Patienten mit septischen Schock beitragen. Es wurde gezeigt dass die Verabreichung von NOS-Inhibitoren eine stabilisierende Wirkung auf den Blutdruck erzielen kann (107) und dass in iNOS-defizienten Mäusen die Hypotension und die Letalität nach septischen Schock signifikant reduziert sind (108). Andererseits weisen iNOS-defiziente Mäuse nach experimentell induziertem septischen Schock eine signifikant erhöhte Leukozytenadhäsion und -migration auf (109), was auch für eine antiinflammatorische Wirkung von der iNOS spricht.

Bei einer Entzündungsreaktion wird die induzierbare NO-Synthase unter dem Einfluss proinflammatorischer Zytokinen exprimiert; bei Infektionen können Endotoxine einen weiteren Expressions-Induktor darstellen. In der Folge kommt es zur lokalen Produktion großer Mengen an NO, welche die physiologische NO-Freisetzung durch die konstitutiven Enzyme um das 100–1000 -fache übersteigen kann (110).

Das gebildete NO wirkt über seine molekularen Angriffspunkte toxisch auf Bakterien, Pilze, Protozoen, Helminthen sowie Tumorzellen und erfüllt somit eine wichtige Aufgabe bei der Abwehr von körperfremden Zellen (111). Hierbei muss die Schädigung gesunden Gewebes durch die erforderlichen hohen NO-Konzentrationen in Kauf genommen werden. Anders ist es bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen, wo das von der induzierbaren NO-Synthase produzierte NO als schädigender, proinflammatorischer Mediator wirken kann.

Bevor auf die Evidenzen für eine Beteiligung von NO am Pathomechanismus chronisch-entzündlicher, nicht erregerbedingten Erkrankungen eingegangen wird, ist zu erwähnen, dass geringe NO-Mengen, wie sie von den konstitutiven NO-Synthasen gebildet werden, einer entzündlichen Gewebsschädigung entgegenwirken. NO supprimiert die T-Zell-Proliferation und T-Zell-Aktivität, inhibiert die Synthese von Interleukin-6, Prostaglandin E₂ und Thromboxan in Makrophagen sowie die Freisetzung von plättchenaktivierendem Faktor und Histamin aus Mastzellen, außerdem bewirkt NO eine Hemmung der Endothel-Adhäsion und Transmigration neutrophiler Granulozyten (112). Als protektiver Faktor zu berücksichtigen ist auch die Aufrechterhaltung der Gewebepfusion aufgrund der vasodilatierenden und aggregationshemmenden Eigenschaften von NO.

Entsprechend diesen antiinflammatorischen und protektiven NO-Funktionen, kann die Hemmung der NO-Synthese zu Entzündung bzw. verstärkter Gewebsschädigung führen: Die Gabe von L-NAME induzierte bei gesunden Meerschweinchen eine Ileitis (113); Aminoguanidin, welches bevorzugt die induzierbare NO-Synthase inhibiert, hatte dagegen keine negativen Effekte, da die induzierbare NO-Synthase beim gesunden Säugetier nur minimal exprimiert ist. Ein weiteres Beispiel ist die durch Injektion von abgetöteten Corynebakterien und Endotoxin induzierte akute Leberzellnekrose der Maus; in diesem Tiermodell führte die Gabe von L-NMMA zu einem drastischen Anstieg der Leberschädigung aufgrund von Gefäßverschlüssen (114).

NO besitzt somit abhängig von Konzentration und Herkunft sowohl pro- als auch antiinflammatorische Wirkungen.

Am Tiermodell der Adjuvansarthritis konnte gezeigt werden, dass die Urinnitratausscheidung von Ratten mit Adjuvansarthritis gegenüber gesunden Kontrolltieren, um mehr als das 3fache erhöht war (115). *Ex vivo* und *in vitro* Untersuchungen geben auch Auskunft über die Herkunft der systemischen und intraartikulären NO-Produktion bei entzündlichen Gelenkerkrankungen des Menschen: Außer Monozyten/Makrophagen und neutrophilen Granulozyten in Blutbahn und entzündetem Gelenk sind auch Mastzellen, Synoviozyten, Osteoblasten, Osteoklasten und Chondrozyten nach Induktion der induzierbaren NO-Synthase durch Cytokine in der Lage, große Mengen NO zu bilden (116-118).

Auch die Transplantatabstoßung geht bei Mensch und Tier mit einer erhöhten NO-Produktion durch die induzierbare NO-Synthase einher. Bei der allogenen Herztransplantation in der Ratte konnte die Hemmung der induzierbaren NO-Synthase durch Aminoguanidin die Transplantatfunktion verbessern und die Lebenszeit verlängern (119).

Nur am Tiermodell dokumentiert ist die Beteiligung von NO als zytotoxischer Mediator beim Streptozotocin-induzierten Diabetes mellitus (120), Autoimmun-Enzephalomyelitis (121) und Glomerulonephritiden (122). Die Hemmung der NO-Synthese durch L-NAME, Aminoguanidin bzw. L-NMMA führte jeweils zu signifikanter Abnahme der entzündlichen Reaktion. Während der Induktionsphase der experimentellen Glomerulonephritiden sind jedoch auch schädigende Effekte der NO-Synthesehemmung beschrieben, hauptsächlich bedingt durch Verschlechterung der renalen Hämodynamik (123).

PROTEKTIVE WIRKUNGEN VON STICKSTOFFMONOXIDRADIKAL

Neben der oben dargestellten pathogenen Rolle des Stickstoffmonoxidradikals in verschiedenen Krankheitsbildern aus dem Formenkreis der Autoimmunerkrankungen fanden sich in den letzten 5 Jahren mehr und mehr Evidenzen für eine protektive Wirkung des Stickstoffmonoxidradikals. Die molekularen Mechanismen dieser Schutzwirkung beruhen ebenfalls auf der radikalischen Eigenschaft des NO sowie seiner Präferenz zur Thiolbindung und somit der Modulation von Proteineigenschaften und Genexpressionsänderungen.

NO ALS SCAVENGER VON RADIKALEN UND INHIBITOR DER LIPIDPEROXIDATION

In mehreren Modellen konnte gezeigt werden, dass aufgrund seiner Reaktion mit Alkoxy- und Peroxyradikalen NO einen ausgezeichneten Inhibitor der Lipidperoxidation darstellt (124). Dabei ist seine Reaktionsgeschwindigkeit mit den erwähnten Radikalarten ca. 1000-fach schneller als die der stark antioxidativ wirkenden Substanz Tocopherol. Diese Eigenschaft prädestiniert das NO-Radikal nicht nur zur Terminierung einer Radikalkettenreaktion während der Lipidperoxidation, sondern stellt gleichsam einen effektiven Inhibitionsmechanismus bei der Initiation sowie Propagation der Lipidperoxidation dar. Seine radikalischen Eigenschaften und seine Präferenz zur Reaktion mit Superoxidanion stellen einen weiteren Schutzmechanismus des NO gegen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) dar (125, 126).

INHIBITION VON PROTEINEN DURCH S-NITROSYLIERUNG

Der „Thiol-phile“ Charakter des NO-Radikals stellt gleichsam die Basis für einen weiteren wirkungsvollen protektiven Mechanismus dar. Die direkte S-Nitrosylierung von Cysteinresten führt, z.B. im Fall des NMDA-Rezeptors zur Inaktivierung und somit zur Inhibition des NMDA-induzierten Todes von Neuronen (127). Ferner, S-Nitrosylierung des Cystein-Thiol-Aktiven-Zentrums der Gewebs-Transglutaminase (tTG), welches essentiell für die Aktivität des Enzyms ist führt zur seiner Inhibition und somit zur Unterbrechung des durch tTG gesteuerten Prozesse während der Apoptose (128).

Alle Caspase-Proteasen, die Effektoraktivität in der Apoptosemaschinerie haben, tragen ein Cystein im katalytischen Zentrum, welches essentiell für ihre Aktivität ist. Dieses Thiol ist empfindlich gegenüber redoxbedingten Modifikationen und kann durch NO S-nitrosyliert werden, was zu herabgesetzter Enzymaktivität führt (129-131).

INHIBITION DER CYTOCHROM C FREISETZUNG

Die Cytochrom c Freisetzung aus den Mitochondrien ins Zytosol ist ein wichtiges Initiationsereignis von insgesamt derzeit 3 bekannten Startpunkte für Apoptose-Prozesse (132). Das antiapoptotische Protein Bcl-2 steuert über einen noch nicht ganz verstandenen Mechanismus gegen die Cytochrom c Freisetzung aus Mitochondrien, während proapoptotische Proteine wie z.B. Bax, die Freisetzung fördern. Ins Cytoplasma freigesetzt, aktiviert Cytochrom c die Caspase-Cascade und Caspase-3 ihrerseits verwendet das Protein Bcl-2 als Substrat und inaktiviert es durch Spaltung. Da NO die Cytochrom c Freisetzung zu hemmen vermag, postuliert man, dass diese Wirkung unter anderen über die S-Nitrosylierung der Caspase-3 gesteuert wird (133).

Neuere Arbeiten unserer Arbeitsgruppe beweisen, dass daneben noch zwei weitere protektive antiapoptotische Mechanismen des NO existieren. So konnte gezeigt werden, dass NO über den Mechanismus der Erhöhung der Expression des Bcl-2-Proteins vollkommen vor UVA-induzierter und ROS-mediierter Apoptose schützen kann, wobei das NO gleichzeitig eine UVA-induzierte Erhöhung des proapoptotischen Proteins Bax verhindert (134). Dieser Mechanismus führt über die erhöhten Bcl-2 Spiegel ebenfalls zu einer Inhibition der Cytochrom c Freisetzung. Ferner konnte gezeigt werden, dass eine Zerstörung der Zellmembranen eine weitere Voraussetzung für die Freisetzung von mitochondrialen Cytochrom c darstellt, und dass eine NO-medierte Inhibition der Lipidperoxidation diesen initiierenden Schritt der Apoptose ebenfalls verhindert (135).

IMMUNMODULATORISCHE EINFLÜSSE

Als Folge einer Immunantwort kann der Körper grundsätzlich auf zweierlei Arten reagieren, mit einer zellulären Reaktion, vertreten durch Zellen des sogenannten Th1-Typs (repräsentiert durch die Expression der Zytokine IL-1 α , IL-2, IL-8, IL-12, TNF- α und IFN- γ) und einer humoralen

Reaktion, vertreten durch Zellen des sogenannten Th2-Typs (repräsentiert durch die Expression der Zytokine IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13). Man konnte nun feststellen, dass eine iNOS-Expression zwar mit einem proinflammatorischen Zytokinprofil des Th1-Typs korreliert, jedoch gleichzeitig als Gegenregulation zu einer Limitierung der Th-1 Antwort führt und zwar im Wesentlichen über einen unterstützenden Einfluss auf die Expression des IL-4. Das von der iNOS synthetisierte NO übernimmt also wichtige immunmodulatorische Funktionen indem es über die Unterstützung der Th2-Antwort die Th1/Th2-Balance aufrechterhält

FRAGESTELLUNG

Die induzierbare NO-Synthase (iNOS) kann in vielen Zellen durch proinflammatorische Reize induziert werden und führt zu langandauernder NO-Synthese (high-output), die im wesentlichen unter transkriptioneller Kontrolle steht. Lange Zeit wurde dieser iNOS-mediierten NO-Synthese ausschließlich Abwehrfunktion und bei chronischer Expression eine zytotoxische Wirkung und Beteiligung an Organzerstörung zugewiesen. Es mehren sich allerdings die Evidenzen, dass die zytotoxische Aktivität wohl überwiegend sehr hohen NO-Konzentrationen oder einigen wenigen Zelltypen zuzuschreiben ist, und dass das Stickstoffmonoxidradikal auch das durch die iNOS freigesetzte zytoprotektive Wirkung ausüben kann. Aufgrund der wichtigen Rolle der iNOS in Physiologie wie Pathophysiologie, ist von enormer Wichtigkeit, mehr über die endogene Induktionsmechanismen der iNOS zu erfahren.

Mit der hier vorgelegten Arbeit sollten erstmals die genauen Zytokinprofilmuster charakterisiert werden, die zur iNOS Induktion in Endothelzellen der Maus führen sowie die weiteren, durch diese endogen induzierte iNOS-relevante Signalwege eruiert werden. Da aus Vorarbeiten Hinweise für eine besondere Rolle des endogenen IL-1 β für eine iNOS-Induktion in Rattenzellen vorlagen, sollte eine endogene Verfügbarkeit dieses Zytokins als Schlüsselzytokin der iNOS besonders berücksichtigt werden.

MATERIALIEN UND METHODEN

MATERIALIEN

CHEMIKALIEN

Agarose Serva, Heidelberg, **Blocking-Reagenz** Boehringer, **BSA** (bovine serum albumine) Sigma, **Chloroform** Merck, Darmstadt, **Collagenase** (0,3 U/mg) Serva, **Collagen Typ I** Sigma, **DEPC** (Diethylpyrocarbonat) Merck, **Diethylether** Merck, **DMSO** (Dimethylsulfoxid) Merck, **ECGS** (endothelial cell growth supplement) Sigma, **EDTA** (Ethylendiamintetraacetat) Merck, **Einbettungs-Medium** Leica Instruments, Heidelberg, **Essigsäure** Merck, **Ethanol** (Alkoholreihe: 30%, 50%, 70%, 90%) Merck, **Ethidumbromid** Merck, **Eukitt** (Einbettungsmedium) O. Kindler GmbH, Freiburg, **Formaldehyd** (37%-ige Lösung) Merck, **Formamid** Merck, **Gelatine** Serva, **Glutaraldehyd** Merck, **Guanidiniumthiocyanat** Boehringer, **HCl** (Salzsäure) Merck, **H₂O₂** (Wasserstoff-Peroxid) Merck, **H₃PO₄** (Ortho-Phosphorsäure) Merck, **Hämatoxylin** Serva, **Isopropanol** Merck, **K₂CO₃** (Kaliumcarbonat) Merck, **KCl** (Kaliumchlorid) Merck, **Mercaptoethanol** Serva, **Methanol 98%** Merck, **MgCl₂** (Magnesiumchlorid) Merck, **Natriumacetat** Merck, **NaCl** (Natriumchlorid) Merck, **Na₂HPO₄** (Dinatriumhydrogenphosphat) Merck, **NaNO₂** (Natriumnitrit) Merck, **NaOH** (Natriumhydroxid) Merck, **Natriumpyruvat** Merck, **NBT** (Nitroblau-Tetrazolium Salz), Boehringer, **NEDDC** (N-1-Naphtyl-ethylendiamindihydrochlorid) Sigma, **Neutral-Rot** (30%-ige Lösung) Sigma, **Paraffinöl** Sigma, **PEG 20.000** (Polyethylenglykol) Merck, **Phenol** (Gesättigte Phenollösung) Merck, **Trichloressigsäure** Merck, **TRIS** Tris(hydroxymethyl)aminomethan Merck, **Trypanblau** (20%-ige Lösung) Gibco, Eggenstein, **Trypsin** (0,45 U/mg) Serva, **Xylol** Merck.

EINWEGARTIKEL FÜR DIE ZELLKULTUR

Plastikartikel für die Zellkultur Falcon, Becton-Dickinson, Heidelberg und Eppendorf, Hamburg, **Lab-Tek Chamber slides** Nunc, Wiesbaden.

GERÄTE

Brutschrank 37°C, 90% Luftfeuchtigkeit, 5% CO₂, 95% Luft (Heraeus, Osterode), **ELISA-Reader** Titertek Multiscan Plus Flow Laboratories,

Heidelberg, **PCR-Thermo-Cycler** Cetus DANN Termal Cycler Perkin Elmer, Norwalk, CT, U.S.A., **Sterilbank** Lamin Air Heraeus, **Tischzentrifuge** Zentrifuge 5412 Eppendorf, **Zentrifuge** Minifuge GL Heraeus

PUFFER, MEDIEN UND ZUSÄTZE FÜR DIE ZELLKULTUR

DMEM Dulbeccos minimal essential medium Gibco, Eggenstein, **FCS** fetal calf serum (Endotoxin-frei); inaktiviert 30 min bei 56°C Boehringer, **Glukose** Merck, **H₂O-bidest** Milli-Q-Anlage, **HBSS** Hanks buffered salt solution Gibco, **HEPES** Gibco, **MEM** Non essential amino acids Gibco, **Pen-Strep** Penicillin-Streptomycin (1000 U/mg) Gibco, **Phenolrot** Serva, **RPMI 1640 – Medium** Gibco.

Das RPMI 1640-Medium wurde zum Teil nach Originalrezept aus den Einzelbestandteilen (p.a. grade) zusammengestellt. Aus versuchslogistischen Gründen wurde das Medium modifiziert und CaCl₂ statt Ca(NO₃)₂ eingewogen.

RPMI 1640+++ = RPMI 1640-Medium mit 1 mM Natrium-Pyruvat, 60 U/ml Penicillin-Streptomycin, 2mM L-Glutamin, 0,2% NaHCO₃, 1:100 non-essentielle Aminosäure ('MEM' 100x), 10 mM HEPES.

Das Medium wurde mit Milli-Q-Wasser angesetzt, sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

ZYTOKINE UND BIOLOGISCHE PROBEN

DNA-1kB-Leiter, 1 µg/ml (Boehringer), **dNTPs** (100 mM Lösung): dATP, dGTP, dCTP, dTTP (Boehringer), **IL-1β** (Rekombinantes humanes Interleukin-1-beta), 1x10⁷U/mg, LPS-Gehalt: 250 pg/µg (Genzyme, HBT), **Gamma-IFN** (Rekombinantes Ratten-gamma-Interferon), 1,5x10⁷ U/mg, LPS-Gehalt 150 pg/µg, (Genzyme, Cambridge, MA, USA Oder HBT, Leiden, Niederlande), **TNF-α** (Rekombinanter humaner Tumor-Nekrose-Faktor-alpha), 1x10⁷ U/mg, LPS-Gehalt 250 pg/µg, (Genzyme, HBT), **Oligo-dT16-Primer**, 20 pmol/µl, (Boehringer), **Polymerase** (Taq Polymerase 50 U/µl, Gibco), **Reverse Transkriptase**, MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus, 200 U/µl, Boehringer), **RNA-Marker** (1 µg/ml, Boehringer), **RNasin** (40 U/µl, Amersham, Braunschweig).

ANTIKÖRPER

Anti-vWF, Kaninchen anti-Maus von Willebrand Faktor, (Sigma). Sekundärantikörper, Peroxidase markiertes Ziege-anti-Kaninchen IgG Antiserum, **Anti-CD106**, Ratte anti-Maus CD106. Sekundärantikörper, Peroxidase markiertes Kaninchen-anti-Ratte IgG Antiserum

TIERE

C57bl6 Mäuse: 4 Männliche Tiere, ca. 20-25 g schwer und 30-60 Tage alt, stammen aus der zentralen Tierzuchtanlage der Heinrich-Heine-Universität. Alle Tiere erhielten eine Standard-Diät und Trinkwasser nach belieben.

METHODEN

ISOLIERUNG UND INKULTURNAHME VON AORTA-ENDOTHELZELLEN DER MAUS

Lösungen

Zellkulturmedium: RPMI 1640 mit 20 % FCS, pH 7,3

HBSS/HEPES-Puffer: HBSS-Puffer, pH 7,2 mit 10 mM HEPES, sterilfiltriert.

Kollagenase-Lösung: HBSS-Puffer, pH 7,2, mit 10 mM HEPES plus 2,5 mg/ml Kollagenase (0,3 U/mg), sterilfiltriert.

Kollagen-Gel: 3 Teile Kollagen Typ III: (Stammlösung: 3 mg/ml im 13 mM HCl) : 1 Teil, 5x D-MEM, 1 Teil 14 mM NaOH.

Die Einzelkomponenten wurden bei 4°C zusammengemischt und auf pH 7,2 eingestellt. 400 µl dieses Gemisches wurden pro well einer 24-well Gewebekulturplatte pipettiert, 30min mit UV-Licht bestrahlt, bei 37°C 40-60 min polymerisiert und anschließend im Brutschrank mindestens 90 min mit 1 ml/well RPMI 1640 mit 20 % FCS plus 50 µg/ml ECGS äquilibriert.

ISOLIERUNG DER AORTA -ENDOTHELZELLEN

Die Mäuse wurden mit Diäthyläther narkotisiert und getötet. Nach Thorakotomie wurde der Aortenbogen, die Aorta thoracalis und abdominalis herauspräpariert. Die Gefäße wurden mit einer Pinzette vom Bindegewebe und Fett freipräpariert und in HBSS/HEPES gründlich

gewaschen. Die Aorta wurde in Ringstücke von ca. 1 mm Breite geschnitten. Zum Auswachsen der Endothelzellen in das Kollagen-Gel wurden jeweils 3-4 Aorta-Segmente pro Well implantiert. Vor der Implantation wurde das Kollagen-Gel vom Äquibrierungsmedium befreit, anschließend erneut mit 1 ml RPMI 1640 mit 20% FCS plus 100 μ g/ml ECGS vorsichtig überschichtet und im Brutschrank kultiviert. Um eine Kontamination der Endothelzellkulturen mit Fibroblasten bzw. Muskelzellen zu vermeiden, die ein langsames Auswachsverhalten aufweisen, wurden nach 4-5 Tagen die Aorta-Stücke entfernt und die Endothelzellen für 1 -2 Tage weiterkultiviert. Danach wurden die Überstände verworfen und die Gele durch Zugabe von Kollagenase-Lösung (1 ml/well) bei 37°C 10 min verdaut. Die Endothelzellen wurden anschließend in zwei Zentrifugationsschritten (5 min bei 260 g) mit HBSS/HEPES/10% FCS gewaschen und auf 10 cm Kultur-Perischalen mit Zellkulturmedium (mit 75 μ g/ml ECGS) ausplattiert und im Brutschrank kultiviert. In den folgenden Tagen wurde bei jedem Mediumwechsel die ECGS-Konzentration langsam reduziert. Nach der ersten Zellpassage wurden die Zellen auf mehrere Kulturschalen aufgeteilt.

ARBEITSMETHODEN UND KULTURBEDINGUNGEN FÜR DIE ENDOTHELZELL-PRIMÄRKULTUREN

Lösungen

Zellkulturmedium: RPMI 1640 mit 20% FCS, pH 7,3. Lösung A: 0,9%ige NaCl-Lösung mit 10 mM HEPES und 200 μ M EDTA, pH 7,5. Trypsin-Lösung: 2 mg Trypsin/ml 0,9%ige NaCl. Trypanblau-Lösung: 0,5%-ige Trypanblau Lösung in 0,9%-iger NaCl wurde in der Verdünnung 1:5 eingesetzt. Einfriermedium: RPMI 1640 mit 20% FCS und 20% DMSO, pH 7,3.

ARBEITSMETHODEN DER ZELLKULTUR

a.) Kulturbedingungen: Die Kultur der Endothelzellen erfolgte in 10 ml RPMI mit 20% FCS auf 10 cm Zellkultur-Petrischalen. Die Zellen wurden bis zur Bildung eines Zellrasens kultiviert. Durch den unten beschriebenen Trypsinierungsvorgang wurden die adhären wachsenden Zellen von der Platte gelöst und in einer Konzentration von 5×10^5 Zellen / Platte erneut ausgesät, in Versuche eingesetzt oder eingefroren.

b.) Trypsinierung adhärenter Zellen: Kulturüberstände wurden von den Platten abgesaugt, die Zellen dreimal mit je 10 ml Lösung A gespült und anschließend je 3 ml der Lösung A in die Petrischale zugeführt. Es wurden

200 μ l Trypsin-Lösung hinzupipettiert, vermischt und für 3 min bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Nach mikroskopischer Überprüfung der Loslösung der Zellen vom Boden der Platte, wurde durch Zugabe von 10 ml RPMI 1640 mit 20% FCS die Trypsinaktivität gehemmt. Durch Spülen der Platte mit einer serologischen 10 ml-Pipette wurden die Zellen vereinzelt und anschließend 5 min bei 260 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen wurden in frischem Medium resuspendiert und in entsprechender Konzentration neu ausgesät. Die Bestimmung der Zellkonzentration erfolgte durch das Auszählen in der Neubauer-Zählkammer. Nach 3-7 Stunden wuchsen die Zellen wieder adhärent. Der Trypsinierungsvorgang wurde nach 4-5 Tagen wiederholt.

c.) Kryokonservierung lebender Zellen: Zellen wurden nach Trypsinierung und Zentrifugation in RPMI 1640 mit 20 % FCS auf die Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml verdünnt und im Verhältnis von 1:1 mit dem Einfriermedium vermischt und kurz inkubiert. Je 2 ml dieser Suspension wurden in Kryo-Röhrchen abgefüllt, in eine spezielle Einfrierbox gestellt und stufenweise eingefroren (4°C, 0°C, -20°C) und bei -80°C gelagert.

d.) Auftauen eingefrorener Zellen: Eingefrorene Zellen wurden im Wasserbad bei 37° C schell aufgetaut, in 10 ml RPMI 1640 mit 20% FCS aufgenommen und 5 min bei 260 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen erneut in Zellkulturmedium suspendiert, auf Platten ausgesät und im Brutschrank bei 37° C weiterkultiviert.

e.) Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität: Zur Bestimmung der Zahl lebender Zellen wurde der Trypanblau-Ausschlusstest durchgeführt. Dabei werden tote Zellen blau gefärbt, während lebende Zellen ungefärbt bleiben. Die Zellzahl wurde durch Auszählen gefärbter und ungefärbter Zellen in der Neubauer-Kammer und anschließenden Multiplikation mit dem Verdünnungsfaktor und dem Zählkammerfaktor (1×10^4) bestimmt.

IMMUNZYTOCHEMISCHE FÄRBUNG VON ENDOTHELZELLEN

Lösungen

TBS-Puffer: Stammlösung (20 fach konzentriert): TRIS (121,16 g), NaCl (180,00 g), H₂O-dest ad 1000 ml, pH 7,2.

Gebrauchslösung: Die TBS-Stammlösung wurde 1:20 verdünnt, pH 7,2

Fixierlösung: Glutaraldehyd-Lösung, 0,2%-ige Endkonzentration in TBS (pH 7,2)

TBS- Waschpuffer: TBS-Puffer mit 0,05% BSA, pH 7,2

TBS- Blockingpuffer: TBS -Puffer mit 0,5% BSA, pH 7,2

Peroxidase-Hemmlösung: Methanol absolut mit 0,3% H₂O₂

Substratlösung: 0,1%-ige Diamminobenzidin-Lösung in TBS-Puffer (pH 7,2) plus 0,06% H₂O₂. Diese Substratlösung ist nur für 15-20 min stabil und muss daher immer frisch eingesetzt werden.

Hämatoxylin-Lösung: Hämatoxylin (1,00 g), NaJO₃ (0,20 g), KaAl(SO₄) 12H₂O (50,00 g), Essigsäure (konz.) (15 ml), H₂O-bidest ad 1000 ml. Diese Lösung wurde vor Gebrauch filtriert

Antikörper-Lösung: Die Antikörper wurden in TBS-Puffer (pH 7,2) verdünnt.

1° Antikörper: Kaninchen-anti-human-vWF-Antiserum 1:100. 2° Antikörper:

Peroxidase-markiertes-Ziege-anti-Kaninchen-IgG Antiserum 1:50

1° Antikörper: Ratte-anti-Mause-CD106 1:50. 2° Antikörper: Peroxidase-markiertes-Kaninchen-anti-Ratte-IgG Antiserum 1:50

Versuchsablauf: 5 x 10³ Endothelzellen pro Well eines Lab-Tek Chamber slides wurden ausgesät und im Brutschrank bei 37° C bis über Nacht kultiviert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen unter einem kalten Luftstrom getrocknet und für 10 min bei 4° C fixiert, 30 min mit Peroxidase-Hemmlösung behandelt und anschließend fünfmal mit 100µl TBS-Waschpuffer pro Well gewaschen. Um mögliche unspezifische Bindungsstellen für die Antikörper zu blockieren, wurden die Proben 40 min mit TBS-Blockingpuffer bei 4° C in einer feuchten Kammer inkubiert. Danach folgte die Zugabe des Erstantikörpers in entsprechender Verdünnung und die Inkubation der Proben über Nacht bei 4° C in einer feuchten Kammer. Kontrollproben wurden anstatt des Primärantikörpers mit einem nicht relevanten Kaninchen-Immunsereum inkubiert. Am nächsten Tag folgte ein fünfmaliger Waschvorgang der Proben mit TBS-Waschpuffer und die Inkubation mit dem entsprechenden Sekundärantikörper für 1 Stunde bei 4° C. Es folgten erneut fünf Waschschrte mit TBS-Waschpuffer und anschließend wurden die Proben 10 min bei Raumtemperatur mit der Substratlösung inkubiert. Nach

Hämatoxylinfärbung, Entwässerung mit aufsteigender Alkoholreihe wurden die Proben anschließend mit Eukitt eingedeckt und ausgewertet.

UNTERSUCHUNG DES ZELLWACHSUMS

Lösungen

Vitalfärbungs-Lösung: 30%-ige Neutral-Rot-Lösung

Indikator-Lösung: Isopropanol plus 10mM HCl

PBS-Puffer: Stammlösung (20 fach konzentriert): KH_2PO_4 (5,34 g), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (28,66 g), NaCl (180,00 g), H_2O -bidest. ad 1000 ml

Gebrauchslösung: PBS 20x wurde 1:20 verdünnt, pH 7,2.

Versuchsablauf: Es wurden 5×10^3 Zellen pro Well einer 24-well Kulturplatte ausgesät und mit 1 ml RPMI Medium mit 20% FCS Medium überdeckt. Nach Konfluenz der Zellen auf den Plattenuntergrund wurde dem Überstand 10 μl der 30%-ige Neutral-Rot-Lösung zugesetzt und 90 min im Brutschrank inkubiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt, die Zellen solange mit PBS-Puffer gewaschen, bis sich die Lösung nicht mehr verfärbte und schließlich wurden die Zellen in den Platten trockengeblasen. Durch Zugabe von 200 μl der Indikatorlösung wurden die in lebenden Zellen eingebauten Neutral-Rot-Kristalle herausgewaschen und gelöst. 100 μl Lösung wurden in einer 96-well Platte pipetiert und im ELISA-Reader (530 nm) wurde die Extinktion gemessen. Da der Einbau der Neutral-Rot-Kristalle in vitalen Zellen proportional mit der Zellzahl steigt, eignet sich diese Methode zur Bestimmung des Zellwachstums.

NITRITBESTIMMUNG NACH GRIESS

Lösungen

Griess Reagenz I: 1% Sulfanilamid in 2,5% H_3PO_4

Griess Reagenz II: 1% N-1-Naphtylethylendiaminedihydrochlorid in 2,5% H_3PO_4

Nitritstandardreihe: 7 Natriumnitritlösungen in aufsteigender Konzentration von:

0, 0,2, 0,5, 1, 2, 5, 10 nmol NaNO_2 in Zellkulturmedium

Testansatz: Es wurden jeweils 100 μ l des zu untersuchenden Kulturüberstandes in die Wells einer 96-Well-ELISA-Platte pipettiert, 50 μ l des Griess Reagenz I dazugegeben, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 50 μ l Griess Reagenz II hinzupipettiert. Durch leichtes Bewegen der Platte wurde eine gute Durchmischung der Substanzen gefördert. Um vorhandene Luftblasen zu entfernen wurden 20 μ l Methanol/well hinzupipettiert. Es fand ein Farbumschlag der Lösung statt, deren Extinktion mit einem ELISA-Reader bei 540 nm bestimmt wurde. Eine aufsteigende Konzentrationsreihe mit NaNO₂ diente als Standard.

UNTERSUCHUNG DER AKTIVITÄTSMUSTER DER INDUZIERBAREN NO-SYNTHESE (iNOS) IN ENDOTHELZELLEN DER MAUS

Diese Versuche dienen dazu, die Heterogenität der Aktivitätsmuster der NO-Synthasen von makrovaskulären Endothelzellen in residentem und Zytokin-aktiviertem Zustand zu bestimmen. Als Parameter der Enzym-Aktivität wurden in Zellüberständen die Konzentration eines Metaboliten des Argininstoffwechsels, Nitrit, bestimmt. Zusätzlich wurden die Zelllysate für die Untersuchungen (RT-PCR) der Expressionsmuster der iNOS und der proinflammatorischen Zytokine gesammelt.

Lösungen

Medium: RPMI 1640 mit 20% FCS, pH 7,3.

Zytokine: IL-1 β -Stammlösung, 10000 U/ 10 μ l, TNF- α -Stammlösung, 10000 U/ 10 μ l,

IFN- γ -Stammlösung, 10000 U/ 10 μ l

Lysierlösung: GTC-Puffer: Guanidinthiocyanat (4 M), Na-Citrat (25 mM), Sarcosyl (0,5%), Mercaptoethanol (100 mM), H₂O-bidest.

Versuchsaufbau: Pro Well einer 24-well Platte wurden 4×10^4 Zellen in 1 ml Medium ausgesät. Nach einer Inkubation von 48 Stunden im Brutschrank bei 37° C wurden die Überstände abgesaugt, 500 μ l neues Medium und die entsprechenden Zytokinzusätze dazugegeben. Als Kontrollproben wurden Zellen nur mit Medium (ohne Zytokinzusatz) und nur Medium ohne Zellen mitgeführt. Nach einer weiteren Inkubation von 24 Stunden wurde die Nitritkonzentration (als Maß für die Aktivität der NO-Synthasen) in den Kulturüberständen gemessen.

Die vom Überstand befreiten Zellen wurden sofort mit der Lysierlösung überschichtet. Nach Aufrühren mit einer sterilen Pipettenspitze wurde des Zelllysats jedes einzelnen Wells in je einen Probenbehälter überführt und bis zur RNA-Isolation bei (-20° C) eingefroren.

REVERSE TRANSKRIPTION (RT) DER RNA UND AMPLIFIKATION DER NOS-CDNA MIT HILFE DER POLYMERASE KETTEN REAKTION (PCR)

Die Methode der Polymerase Ketten Reaktion ermöglicht die Amplifikation von DNA-Segmenten mit Hilfe von Oligonukleotiden, die spezifisch an flankierten Bereichen 5' und 3' der zu amplifizierenden Sequenzen hybridisieren. Als Substrate eignen sich klonierte und genomische DNA, sowie DNA-Hybride, die bei der Reaktion mit dem Enzym Reverse Transkriptase entstehen. In dieser Arbeit wurde die Methode der PCR in Kombination mit der Reversen Transkription eingesetzt, um aus gesamtzellulärer RNA spezifisch die endotheliale iNOS-oder zytokinspezifische-mRNA zu detektieren.

RNA-ISOLATION

Die RNA aus aktivierten und residenten Endothelzellen wurde isoliert und diente als Ausgangsprodukt für die Reverse Transkription und Polymerase Ketten Reaktion.

Lösungen:

DEPC-H₂O: H₂O bidest mit 0,1 Vol % DEPC, autoklaviert

TE-Puffer: Tris (10 mM), EDTA (1 mM) in DEPC-H₂O_{bidest} pH 8,0

Natriumacetatlösung: 2 M, pH 4,4, 0,1 Vol-% DEPC, autoklaviert

Chloroform / Isoamylalkohol-Lösung: Volumverhältnis 49:1

Phenollösung: Wasser-gesättigte Phenollösung

Äthanol: 70 % Äthanol verdünnt mit DEPC-H₂O bidest

Versuchsdurchführung: Die folgenden Arbeitsschritten fanden auf Eis statt. 1 Volumen (500 µl) der in GTC-Puffer lysierten Zellen wurde mit 1/10 Volumen der Natriumacetatlösung versetzt und gut gemischt. Es wurden 1 Volumen Phenollösung und 1/5 Volumen Chloroform/Isoalkylalkohol dazugegeben und erneut gut gemischt. Das Gemisch wurde 15 min auf Eis (0 -4° C) inkubiert und anschließend 15 min

bei 15000 U/min und 4° C zentrifugiert. Die obere, RNA-haltige wässrige Phase wurde entnommen und mit einem Volumen Isopropanol vermischt, und für 1 -2 Stunden bei (-80° C) gelagert. Anschließend wurden die Proben 15 min bei 10000 g/min zentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgegossen und das RNA-haltige Sediment in 2 Zentrifugationsschritten mit Äthanol gewaschen. Die Pellets wurden im Exikator für 20-30 min getrocknet und dann in 50 μ l TE -Puffer aufgenommen. Zur Bestimmung der RNA-Konzentration und des Verunreinigungsgrades der Proben wurden Verdünnungen von 1:50 hergestellt und deren Extinktion bei 260 nm (Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren) und bei 280 nm (Absorptionsmaximum für Proteinen) im UV-Photometer bestimmt. Die RNA-Konzentration wurde aus der Extinktion bei 260 nm errechnet, der Verunreinigungsgrad aus dem Verhältnis von Extinktion bei 260 nm / Extinktion 280 nm (Sollwert bei über 1,7). Die Proben wurden anschließend auf eine Konzentration von 0,1 μ g/ μ l RNA in DEPC-H₂O verdünnt und bei (-20° C) gelagert.

REVERSE TRANSKRIPTION (RT)

Lösungen:

RT-Ansatz: 10x Reaktions-Puffer: Tris (100 mM), KCl (500 mM), pH 8,3. Magnesiumchlorid (MgCl₂, 25 mM). Desoxynukleotid-Mix: jeweils 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP. Gelatine (0,5 mg/ml). Oligo-p(dT)₁₅ Primer (20 pmol/ μ l), Rnase-Inhibitor (Promega) (40 U/ μ l). Rnase (Promega) mind. 25 U/ μ l.

Versuchsdurchführung: Alle Arbeiten fanden auf Eis statt. 20 μ l von jeder Probe, entsprechend einer Konzentration von 1,0 μ g RNA wurden mit je 20 μ l RT-Mix (Zusammensetzung siehe Tabelle) versetzt, gut gemischt, kurz zentrifugiert, 10 min bei 25° C (Annealing der Primer and die RNA) und anschließend 60 min bei 42° C (Synthese der cDNA) im Wasserbad inkubiert. Die erhaltenen cDNA-Proben wurden bei (-20° C) gelagert.

Durch Verwendung eines oligo-dT Primers wurden die mRNA Moleküle über ihren polyA Schwanz transkribiert.

POLYMERASE-KETTENREAKTION

Durchführung der PCR: In kleinen Eppendorf-Hütchen wurden je 5 μ l der cDNA-Probe aus der reversen Transkription mit 5 μ l DEPC-H₂O vermischt. Es wurden je 10 μ l von den Sense- und Antisense-Primern und 20 μ l des PCR-Reaktionsgemisches (siehe Tabelle) hinzugeführt

Die Ansätze wurden mit je 3 Tropfen Paraffinöl überschichtet und anschließend die cDNA im Thermo-Cycler mit den entsprechenden Zyklus- Profilen amplifiziert.

Tabelle 2: Versuchsansatz für die reverse Transkription

10x Reaktions – Puffer	2 μ l / Probe
MgCl ₂ (25 mM)	4 μ l / Probe
DNTP-Mix	2 μ l / Probe
Gelatine (0,5 mg/ml)	0,4 μ l / Probe
Oligo-p(dT)15 Primer (20 pmol/ μ l)	1 μ l / Probe
Rnase-Inhibitor (40U/ μ l)	0,5 μ l / Probe
Reverse Transkriptase (25U/ μ l)	0,5 μ l / Probe

Tabelle 3: Versuchsansatz für die PCR

Primer	10 μ l Sense-plus 10 μ l Antisense-Primer
DNTP-Mix:	2 μ l / Probe (entspricht 40 nmol / 50 μ l PCR-Ansatz)
10x PCR-Puffer	5 μ l / Probe
Taq-Polymerase	0,25 μ l / Probe (entspricht 1,25 U / 50 μ l PCR-Ansatz)
DEPC-H ₂ O	12,75 μ l / Probe

NACHWEIS DER PCR-AMPLIFIKATIONSPRODUKTE MITTELS GELELEKTROPHORESE

Lösungen:

Ethidiumbromidlösung: Ethidiumbromidlösung 1%-ige Endkonzentration verdünnt in H₂O bidest. TAE-Puffer (50-fach):

Tris/ Acetat (2 M), EDTA (0,1 M). Der Puffer wurde vor Gebrauch 1:50 mit Aqua inject. verdünnt.

Agarose-Gel: 1,8 %-iges Agarose-Gel in TAE-Puffer

Durchführung: Die entsprechende Agarose Quantität wurde mit TAE-Puffer gemischt, kurz aufgekocht, auf 60° C abgekühlt und 3 µl Ethidiumbromid 1% zugesetzt. Nach Polymerisation des Gels wurden pro Geltasche 10 µl PCR-Proben und 2,5 µl Bromphenolblau 0,25% eingesetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für 20-30 min bei einer Spannung von 120 V. Die Identifikation der PCR-Amplifikate erfolgte über einem UV-Transilluminator durch Vergleich der sichtbaren Banden mit dem mitgeführten DNA-Leiternstandard. Zur Dokumentation der Ergebnisse wurde das Gel mit einer Polaroidkamera photographiert.

Tabelle 4: Beschreibung der Primer für die PCR

Spezies/ Product	Sequenz		Basen	GenBank accession number	Produkt- Größe (Basen)
Maus iNOS	Sense	5'-TGCAAATAGCTCTGCAGAGCCT-3'	1529-1551	L09126	739
	Antisense	5'-CTGGGTCCTCTGGTCAAACCTCTT-3'	533-555	010927	
Maus IL-1 β	Sense	5'-CTGAACTCAACTGTGAAATGCCAC-3'	91-114	M15131	640
	Antisense	5'-GGAActCTGCAGACTCAAActCCA-3'	707-730		
Maus ICE	Sense:	5'-ACTGCTATGGACAAGGCACGG-3'	136-156	009807	465
	Antisense	5'-TTCTTTCACTTTCACGGTATA-3'	580-600		
GAPDH (klein)	Sense	5'-ACAGTCCATGCCATCACTGC-3'	569-588	M32599	266
	Antisense	5'-GCCTGCTTCAccACCTTCTT-3'	815-834		
GAPDH (groß)	Sense:	5'-CAACTACATGGT TTACATGTTCC-3'	160-184	M32599	416
	Antisense:	5'-GGACTGTGGTCATGAGTCCT-3'	556-575		

ERGEBNISSE

ISOLIERUNG VON ENDOTHELZELLEN AUS DER AORTA DER MAUS

Maus-Aorta-Endothelzellen (MAEC) wurden mit Hilfe der Explant-Technik isoliert, wie im Abschnitt Methoden beschrieben. Die auswachsenden Zellen wiesen eine einheitliche Zellmorphologie auf. Nach Aussäen dieser Zellen auf die Kultur-Platten wuchsen sie adhärent weiter, wobei sich ihre Morphologie zum Teil änderte. AEC bildeten im subkonfluenten Zustand mit einer tri-bis polygonalen Morphologie netzartige und ringartige Koloniestrukturen. Im konfluenten Zustand wiesen sie die für Endothelzellen typische Pflasterstein (‘Cobblestone’) -Morphologie auf.

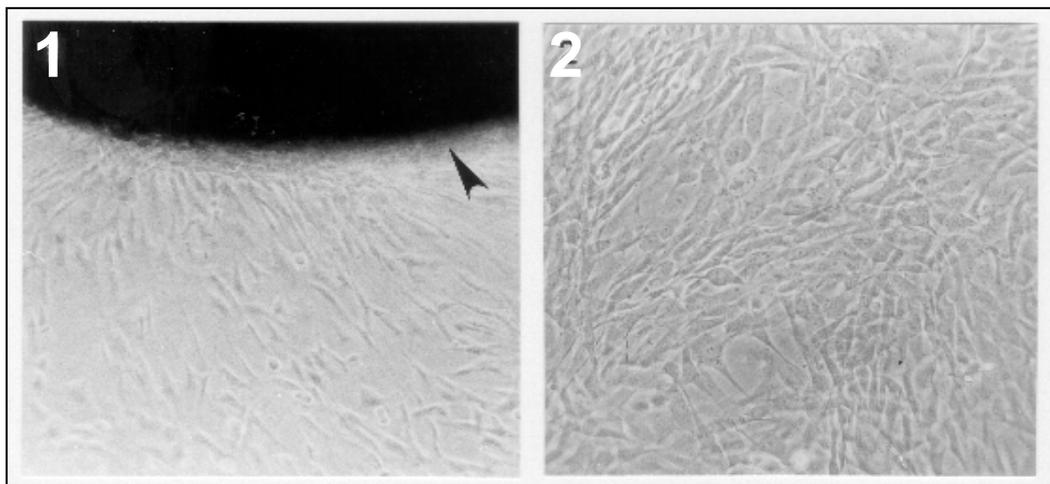


Abbildung 1: Isolierung von Maus-Aorta-Endothelzellen: Aorta-Ringsegmente (Pfeil) wurden auf einer Kollagengel-Matrix implantiert. Nach 3 Tagen wuchsen die ersten Zellen aus den Implantaten in die Trägermatrix aus. **1**, Maus-Aorta-Endothelzellen im subkonfluenten Zustand; **2**, Maus-Aorta-Endothelzellen im konfluenten Zustand. Vergrößerung: 160x

PHÄNOTYP-CHARAKTERISIERUNG VON AORTA-ENDOTHELZELL-KULTUREN DER MAUS

Mit immunzytochemischen Methoden wurde der Phänotyp der isolierten Aorta-Endothelzellen der C57bl6 Mäusen untersucht. Die Charakterisierung der Endothelzellen erfolgte mit den Endothelzell-charakteristischen Antikörpern anti-von-Willebrand-Faktor (anti-vWF) und anti-CD106 (VCAM). Bezüglich der Anfärbarkeit mit den getesteten Endothelzell-spezifischen Antikörpern konnte mit Aorta-Endothelzellen (AEC) der C57bl6-Mäusen der Antigen-Phänotyp vWF^{stark}, CD106^{mittelstark}

festgestellt werden. In der hier gezeigten Untersuchung reagierten alle Zellen einer Kultur mit den verwendeten Antikörpern. Eine Kontamination mit Fremdzellen (Fibroblasten, Muskelzellen) konnte somit ausgeschlossen werden.

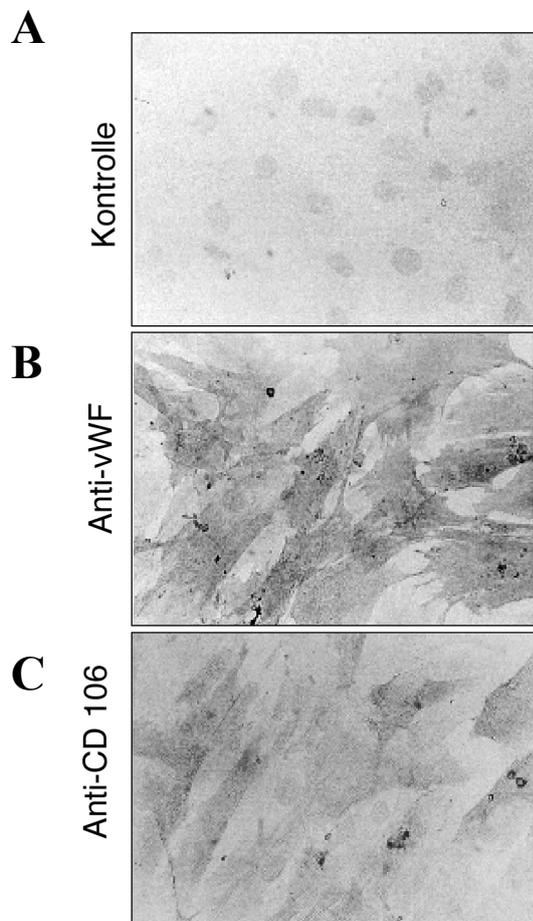


Abbildung 2: Antigen-Phänotyp von Aorta-Endothelzellen aus C57BL6-Mäusen: a) Kontrolle, b) Markierung mit anti-vWF, c) Markierung mit anti-CD106. Vergrößerung: 200x

BESTIMMUNG DES WACHSTUMSVERHALTEN VON MAUS-AORTA-ENDOTHELZELLEN

Das Wachstumsverhalten von Aorta -Endothelzellen (AEC) der Maus wurde unter Kulturbedingungen untersucht. AEC wurden nach dem beschriebenen Versuchsprotokoll vorbereitet. Alle 24 Stunden wurde mit Hilfe der Neutral-Rot-Vitalfärbung über die Bestimmung der Zellzahl das Wachstumsverhalten bestimmt.

Aus der Abbildung 3 wird ersichtlich, dass während der logarithmischen Wachstumsphase die durchschnittliche Generationszeit in AEC-Kulturen ca. 30 Stunden betrug.

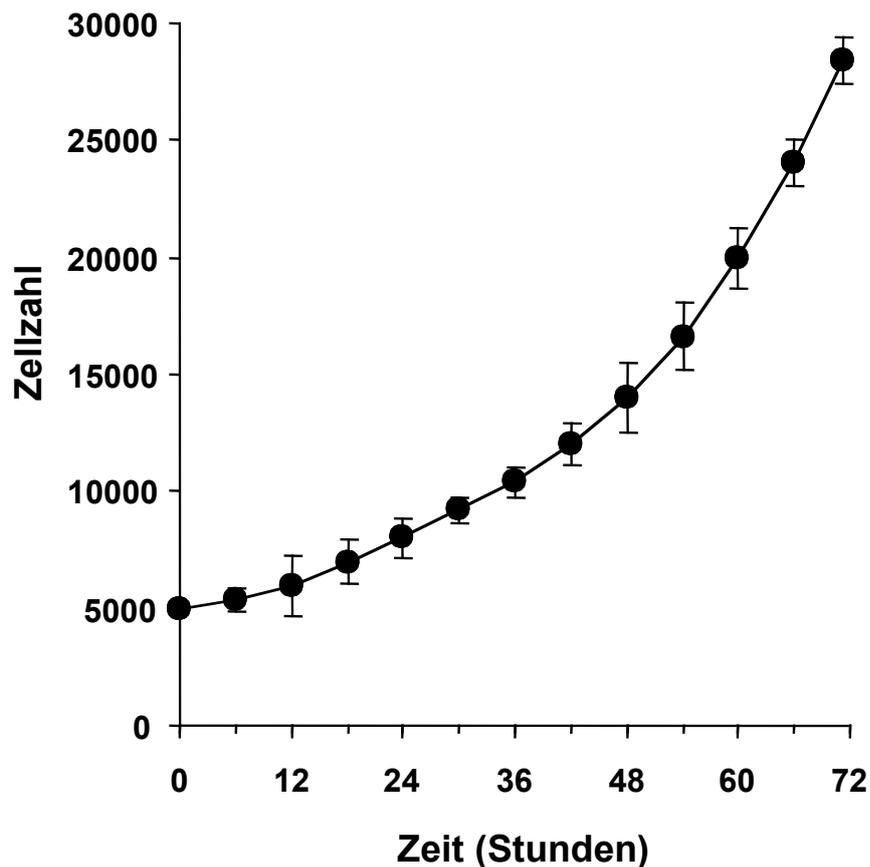


Abbildung 3: Wachstumsverhalten von Aorta-Endothelzellen-Kulturen (AEC) der C57bl6 Maus. In Aorta- Endothelzell-Kulturen der C57bl6 Maus wurde mit Hilfe der Neutral-Rot-Vitalfärbung das Zellwachstum untersucht. AEC wuchsen mit einer durchschnittlichen Generationszeit von ca. 30 Stunden. Die Abbildung zeigt ein repräsentativer Ergebnis aus 3 unabhängigen Versuchen.

BESTIMMUNG DER AKTIVIERUNGS- UND EXPRESSIONSMUSTER DER iNOS IN MAUS-AORTA- ENDOTHELZELLEN

Im Weiteren wurde die Aktivierungs- und Expressionsmuster der induzierbaren NO- Synthase in Maus-Aorta- Endothelzellen untersucht. Als Maßstab der Aktivität der NO- Synthase wurde in Kulturüberständen die Konzentration des Metaboliten des NO-/ Arginin- Stoffwechsels, Nitrit, bestimmt. Mit Hilfe der RT-PCR- Methode wurde die Expression der induzierbaren NO- Synthase charakterisiert. Die Aktivität und die Expression der iNOS aortalen Endothelzellen wurde in residenten Zustand und nach Aktivierung mit der Zytokinen IL-1 β , TNF- α und IFN- γ untersucht.

BESTIMMUNG DER NITRITPRODUKTION RESIDENTER, MIT EINZELNEN ZYTOKINEN UND ZYTOKINKOMBINATION STIMULIERTEN MAUS- AORTA- ENDOTHELZELLEN

Die Nitritproduktion, als Maßstab der NOS-Aktivität, wurde nach dem Griess- Protokoll bestimmt. 1×10^5 Aorta- Endothelzellen wurden in parallelen Ansätzen vorbereitet und mit einzelnen Zytokinen sowie Zytokinkombinationen für 24 Stunden inkubiert. Tabelle 5 und Abbildung 4 umfassen die Versuchsbedingungen sowie die Ergebnisse der Nitritbestimmung.

Tabelle 5

	Zyotokin-Zusatz (Konzentration)	Nitrit (nmol / 1×10^5 Zellenx24 Stunden)	p (vs. Kontrolle)
1	Residente Zellen (Kontrolle)	$0,5 \pm 0,2$	
2	IL-1 β (500 U/ml)	$0,6 \pm 0,4$	0,06
3	TNF- α (500 U/ml)	$0,8 \pm 0,4$	0,07
4	IFN- γ (500 U/ml)	$4,1 \pm 0,8$	0,002
5	IL1- β (500 U/ml) + TNF- α (500 U/ml)	$1,2 \pm 0,6$	0,003
6	IL-1 β (500 U/ml) + IFN- γ (500 U/ml)	$6,7 \pm 0,9$	0,0005
7	TNF- α (500 U/ml) + IFN- γ (500 U/ml)	$12,6 \pm 1,9$	0,0002
8	IL-1 β (500 U/ml) + TNF- α (500 U/ml) + INF- γ (500 U/ml)	$15,4 \pm 1,6$	0,0003

In residentem Zustand sowie nach Aktivierung mit IL-1 β und TNF- α alleine zeigten die Aorta -Endothelzellen keine nennenswerte NO-Bildung; IFN- γ war als einziges Zytokin in der Lage, als Einzelstimulus zu einer NO-Bildung zu führen, mit Nitritwerten um $4,1 \text{ nmol} / 1 \times 10^5 \text{ Zellen} \times 24 \text{ Stunden}$. Alle IFN- γ enthaltenden Zytokinkombinationen führten zu einer signifikanten Verstärkung der Nitritbildung, wobei die Kombination IFN- γ plus TNF- α von allen 2-er Kombinationen die höchste NO₂-Konzentration erreichte. Maximale Nitritkonzentrationen wurden mit der Dreierkombination aller hier getesteten Zytokine mit Werten um $15 \text{ nmol} / 1 \times 10^5 \text{ Zellen} / 24 \text{ Stunden}$ erreicht.

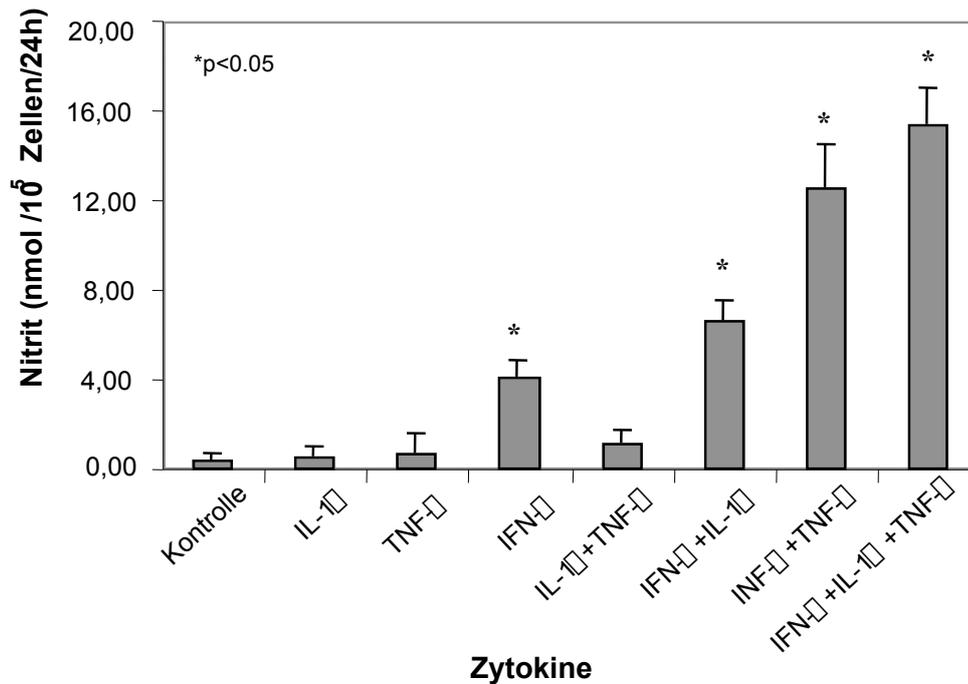


Tabelle 5 & Abbildung 4: Inkubation von Maus-Aorta-Endothelzellen mit einzelnen Zytokinen und Zytokinkombinationen. Zellen wurden 24 Stunden mit verschiedenen Zytokinen sowie Zytokinkombinationen inkubiert. Die Nitritwerte sind in nmol Nitrit pro 1×10^5 Zellen pro 24 Stunden angegeben. Die Werte stellen die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus 4 bis 8 individuellen Versuche dar.

INKUBATION VON MAUS-AORTA-ENDOTHELZELLEN MIT VERSCHIEDENEN IFN- γ -KONZENTRATIONEN

Nachdem festgestellt wurde dass IFN- γ als einziges Einzelzytokin in der Lage ist eine NO- Produktion der Zellen zu induzieren wurde die Konzentrationsabhängigkeit untersucht. Dazu wurden 1×10^5 Aorta-Endothelzellen in parallelen Ansätzen vorbereitet und mit IFN- γ in ansteigender Konzentration für 24 Stunden inkubiert. Die folgende Tabelle und Abbildung umfassen die Versuchsbedingungen sowie die Ergebnisse der Nitritbestimmung.

Die Aktivierung der Endothelzellen mit IFN- γ in ansteigender Konzentration führte bei IFN- γ -Konzentrationen zwischen 2 -50 U / ml zu einer progredienten Steigerung der Nitrit -Produktion und erreichte ein Plateau bei 50 U/ml; eine weitere Steigerung der IFN- γ -Konzentration auf 100 und 500 U/ml führte zu keiner weiteren Zunahme der Nitritproduktion.

Tabelle 6

	Konzentrationen von IFN- γ (U/ml)	Nitrit (nmol/1x10 ⁵ Zellen x 24 Stunden)	p (vs. Kontrolle)
1	Residente Zellen (Kontrolle)	0,3 ± 0,1	
2	2 U/ml	0,6 ± 0,2	0,1
3	4 U/ml	1,1 ± 0,3	0,09
4	8 U/ml	1,9 ± 0,2	0,002
5	10 U/ml	2,9 ± 0,3	0,0004
6	50 U/ml	3,8 ± 0,3	0,0008
7	100 U/ml	3,6 ± 0,5	0,00004
8	500 U/ml	3,8 ± 0,4	0,00001

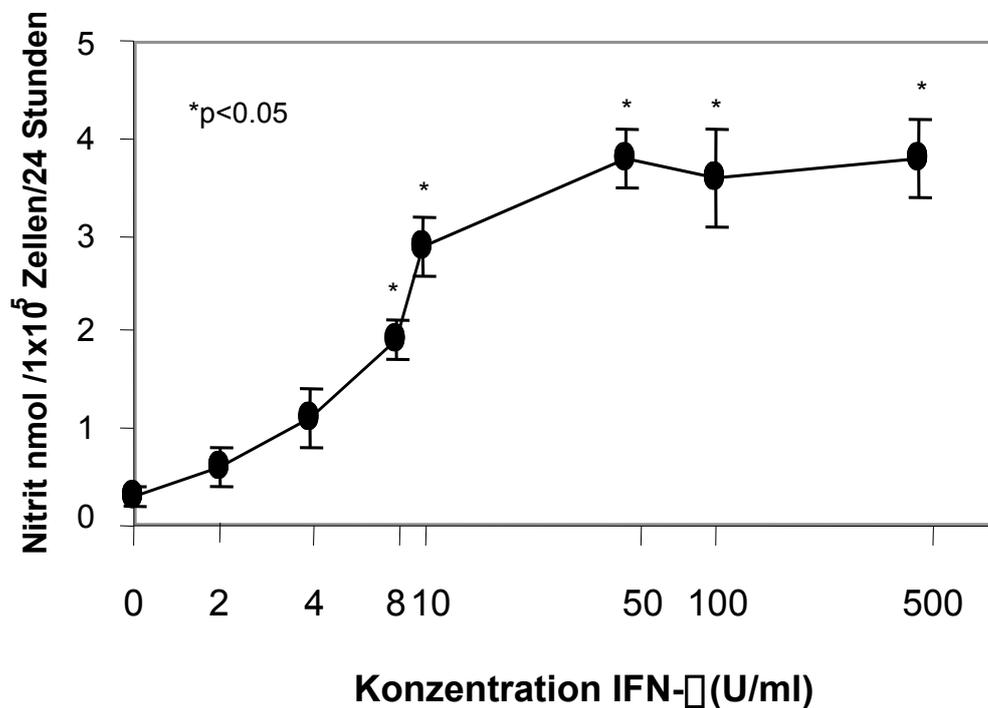


Tabelle 6 & Abbildung 5: Nitritwerte in den Kulturüberständen residenter und IFN- γ in ansteigender Konzentration aktivierter Aorta-Endothelzellen angegeben in nmol Nitrit pro 1 x 10⁵ Zellen pro 24 h. Die Werte stellen die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus 4 bis 8 individuellen Versuchen dar.

WIRKUNG EINER REPETITIVEN IFN- γ STIMULATION AUF DIE NITRITPRODUKTION AORTALEN ENDOTHELZELLEN DER MAUS

Nachdem festgestellt wurde, dass IFN- γ alleine konzentrationsabhängig eine NO- Produktion der Zellen induzieren kann, wurde nun die Zeitabhängigkeit der IFN- γ medierten Induktion der Nitritbildung untersucht. Dazu wurden Aorta-Endothelzellen mit IFN- γ in ansteigenden Konzentrationen für 24 Stunden inkubiert, genau wie zuvor beschrieben, und dann für weitere 24 Stunden mit Zellkulturmedium inkubiert oder mit erneuter IFN- γ Gabe aktiviert (IFN- γ /IFN- γ). Als Kontrollen wurden die Zellen entweder für 24 Stunden in Zellkulturmedium inkubiert und dann für 24 Stunden mit IFN- γ stimuliert (Medium/IFN- γ), oder für die ersten 24 Stunden mit IFN- γ stimuliert gefolgt von 24 Stunden Inkubation in Zellkulturmedium (IFN- γ /Medium). Anschließend wurden die Nitritwerte bestimmt.

Tabelle 7

Konzentration von IFN- γ (U/ml)	Nitrit (nmol/1x10 ⁵ Zellen x 24 Stunden)		
	IFN- γ /Medium	IFN- γ /IFN- γ	Medium/IFN- γ
Kontrolle	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1
2 U/ml	0,4 ± 0,1	2,7 ± 0,4	0,7 ± 0,3
4 U/ml	0,7 ± 0,2	5,2 ± 0,5	1,4 ± 0,4
8 U/ml	1,5 ± 0,2	7,8 ± 0,4	1,8 ± 0,4
10 U/ml	2,2 ± 0,3	11,2 ± 0,5	3 ± 0,6
50 U/ml	4,7 ± 0,4	11,1 ± 0,9	4 ± 0,9
100 U/ml	4,8 ± 0,4	11,7 ± 1,4	3,9 ± 0,8
500 U/ml	4,9 ± 0,5	11,8 ± 1	4,3 ± 0,8

Es zeigt sich eine Persistenz der Nitritproduktion nach insgesamt 48 Stunden, gleichgültig ob INF-g in der ersten oder in der zweiten Inkubationsperiode eingesetzt wurde. Die Stimulation mit IFN- γ gefolgt nach 24 Stunden von einer erneuten Stimulation mit den gleichen Konzentrationen IFN- γ führte zu einer etwa 3-facher Steigerung der gemessenen Nitritwerte. Somit konnte gezeigt werden dass IFN- γ auch

zeitabhängig ein Einfluss auf die NO- Produktion aortaler Endothelzellen ausübt. Die Restimulation der Zellen mit den gleichen Konzentrationen IFN- γ für ein erneutes 24 Stunden Intervall führt zu einer signifikanter Zunahme der Nitritproduktion.

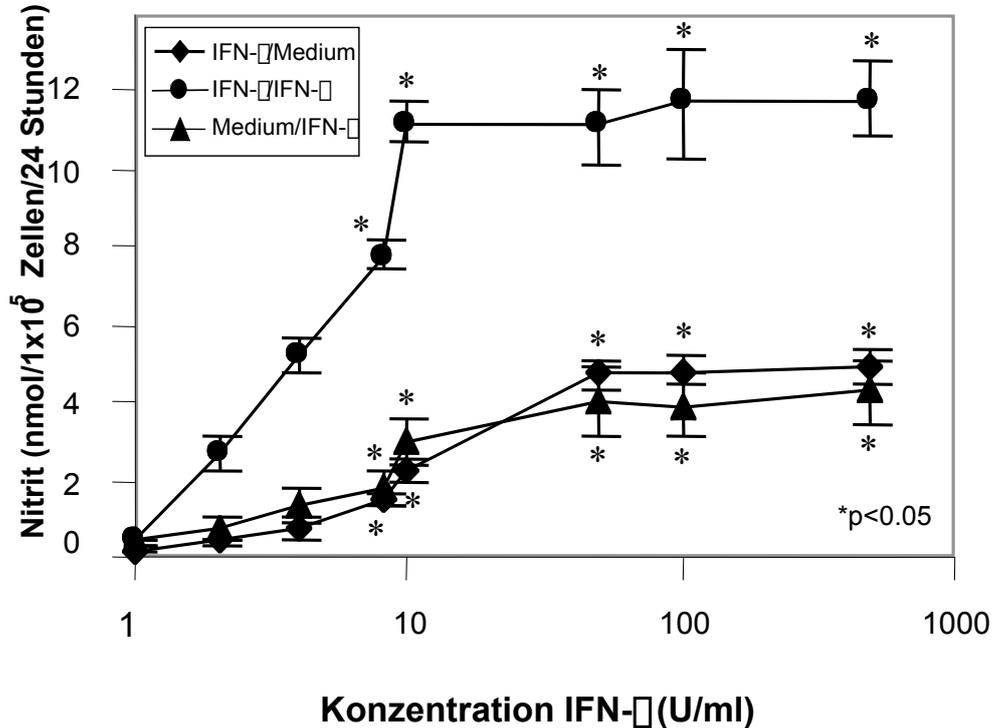


Tabelle 7 & Abbildung 6: Wirkung der wiederholten INF- γ -Stimulation auf die Nitritproduktion von Maus-Aorta-Endothelzellen (MAEC), angegeben in nmol Nitrit pro 1×10^5 Zellen pro 48 Stunden. Die Werte stellen die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus 4 bis 8 individuelle Versuche dar.

NACHWEIS DER iNOS-mRNA AORTALEN ENDOTHELZELLEN DER MAUS

Mit Hilfe der RT-PCR-Methode wurde die iNOS- spezifische-mRNA-Expression in residenten und Zytokin-aktivierten Aorta-Endothelzellen (AEC) dargestellt. Aus residenten und aktivierten Aorta-endothelzellen der C57bl6 Mäusen wurde die gesamte zelluläre RNA isoliert: Die PCR wurden mit den spezifischen Oligonukleotiden für die iNOS-cDNA-Amplifikation zur Detektion der iNOS-spezifischen Amplifikations-Produkt, wie im Abschnitt Materialien und Methoden beschrieben gestartet.

Bei jeder PCR-Reaktionsreihe wurde eine Negativkontrolle für die reverse Transkription und die PCR mitgeführt (statt cDNA bzw. RNA wurde Wasser in die entsprechende Reaktion eingesetzt).

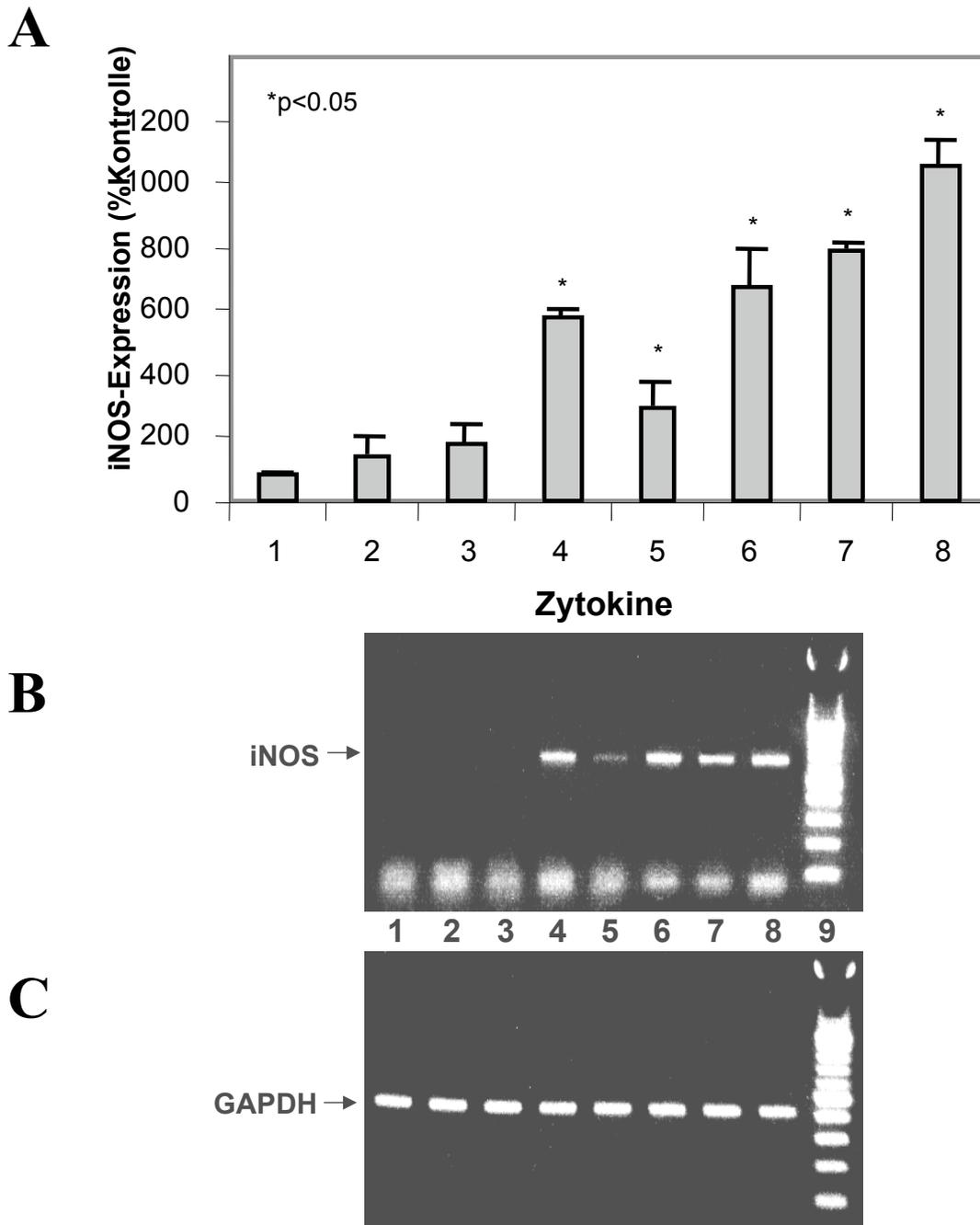


Abbildung 7: Amplifikation der iNOS-cDNA (A) bzw. GAPDH-cDNA (B) mittels PCR aus residenten und mit Zytokinen aktivierten Aortaendothelzellen und deren densitometrische Auswertung (C). Residente Zellen (Kontrolle) (Reihe 1), IL-1 β (500 U/ml) (Reihe 2), TNF- α (500 U/ml) (Reihe 3), IFN- γ (500 U/ml) (Reihe 4), IL-1 β (500 U/ml) + TNF- α (500 U/ml) (Reihe 5), IFN- γ (500 U/ml) + IL-1 β (500 U/ml) (Reihe 6), IFN- γ (500 U/ml) + TNF- α (500 U/ml) (Reihe 7), IFN- γ (500 U/ml) + IL-1 β (500 U/ml) + TNF- α (500 U/ml) (Reihe 8), DNA-Marker (Reihe 9). Die Abbildungen zeigen ein representatives Experiment aus 3 bis 5 individuellen Versuche dar.

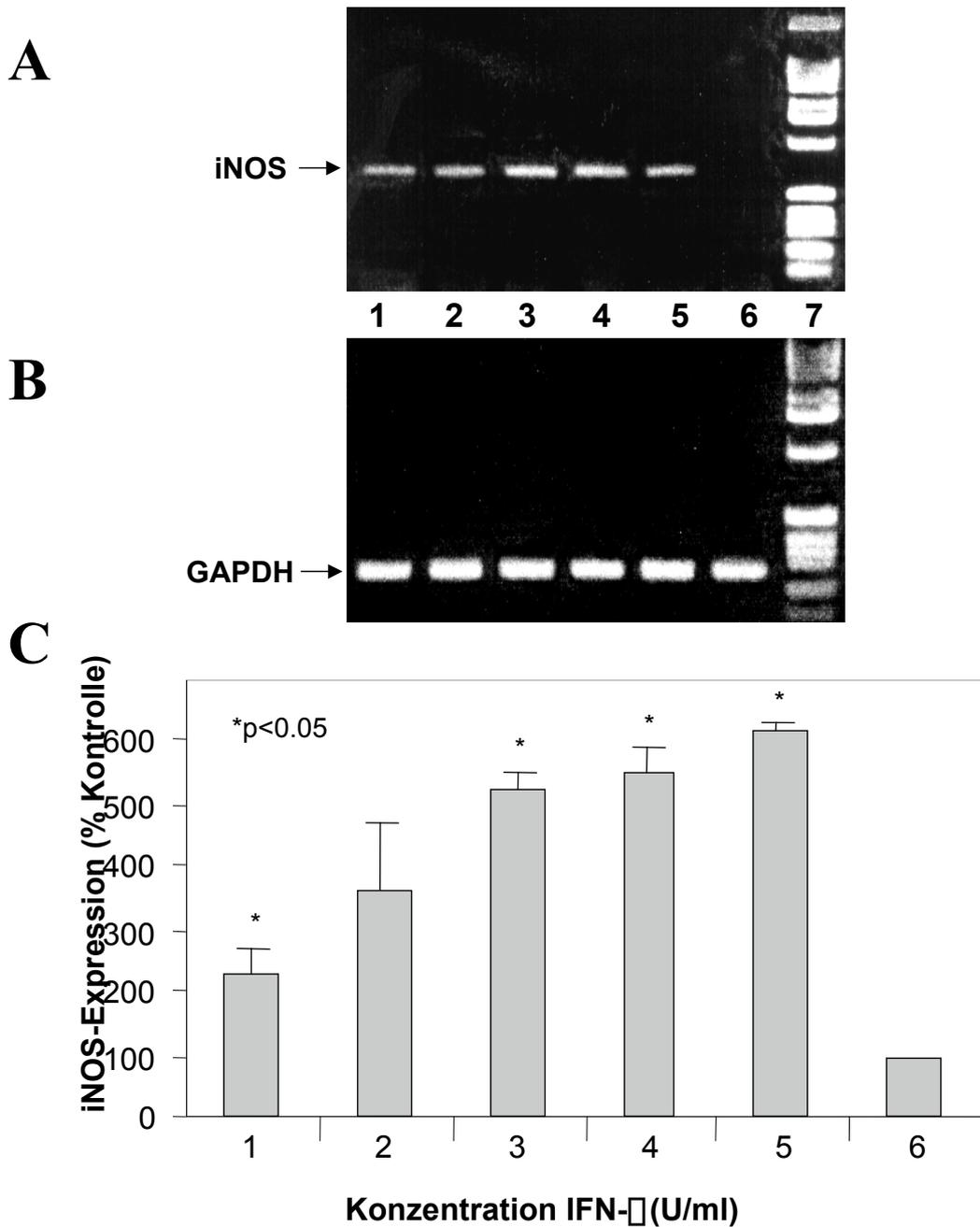


Abbildung 8: Amplifikation der iNOS-cDNA (A) bzw. GAPDH-cDNA (B) mittels PCR aus residenten und mit IFN- γ in ansteigender Konzentration-aktivierten Aortaendothelzellen und deren densitometrische Auswertung (C). IFN- γ (2 U/ml) (Reihe 1), IFN- γ (10 U/ml) (Reihe 2), IFN- γ (50 U/ml) (Reihe 3), IFN- γ (100 U/ml) (Reihe 4), IFN- γ (500 U/ml) (Reihe 5), residente Zellen (Kontrolle), (Reihe 6), DNA-Marker (Reihe 7). Die Abbildungen zeigen einen representatives Experiment aus 3 bis 5 individuellen Versuche dar.

In Abwesenheit von exogenen Zytokinen fand sich keine nachweisbare iNOS-spezifische-mRNA; Aktivierung mit IL-1 α oder TNF- α führte zu

keiner iNOS-mRNA Expression. Nur IFN- γ war als Einzelstimulus in der Lage, die iNOS Expression zu induzieren, genau wie zuvor an den erhöhten Nitritwerten gesehen. Die Kombination IL-1 β plus TNF- α zeigte eine schwache iNOS-Expression, wohingegen jede der Zweierkombinationen mit IFN- γ zu einer deutlichen Verstärkung des Signals führte. Eine Aktivierung der Zellen mit IFN- γ in ansteigender Konzentration führte bereits bei der kleinsten Konzentration (2 U/ml) zu einer deutlichen iNOS-mRNA Expression und zu einer erkennbaren Verstärkung des Signals mit zunehmender Konzentrationen.

Die Ergebnisse auf mRNA-Ebene spiegeln somit genau die Verhältnisse der Nitritmessung unter den verschiedenen Versuchsbedingungen wieder:

Die fehlende Nitritproduktion als Maß der iNOS-Aktivität im residentem Zustand und nach alleiniger Stimulierung mit IL-1 β oder TNF- α wird durch die fehlende iNOS-mRNA Expression erklärt.

Dem Zytokin IFN- γ kommt bei der Induktion der iNOS-mRNA also eine dominante Rolle zu.

Die hohen Nitritwerte nach Stimulierung mit IFN- γ plus IL-1 β oder TNF- α oder der Dreierkombination zeigen auch ein Korrelat auf mRNA-Ebene.

Daraus lässt sich schließen dass die Proteinaktivität der iNOS unter den obigen Versuchsbedingungen ausschließlich auf transkriptioneller Ebene reguliert wird.

NACHWEIS DER ENDOGENEN IL-1 β - UND ICE-mRNA EXPRESSION IN AORTALEN ENDOTHELZELLEN DER MAUS

Die Aktivierbarkeit der Maus-Aorta-Endothelzellen bezüglich der iNOS-mRNA Expression und Proteinaktivität unter den verschiedenen Zytokinstimulationsbedingungen ist durch die zuvor beschriebenen Ergebnisse primär als IFN- γ -responsiv charakterisiert. Frühere Arbeiten aus unserer Gruppe (136) zeigen dass eine endogene Produktion von IL-1 β eine Rolle in der zellulären iNOS-Expression spielen könnte. Daher sollte im weiteren geklärt werden inwiefern auch bei der Aktivierung der Maus- AEC die endogene Expression von funktionellen IL-1 β mit der Expression der iNOS korreliert.

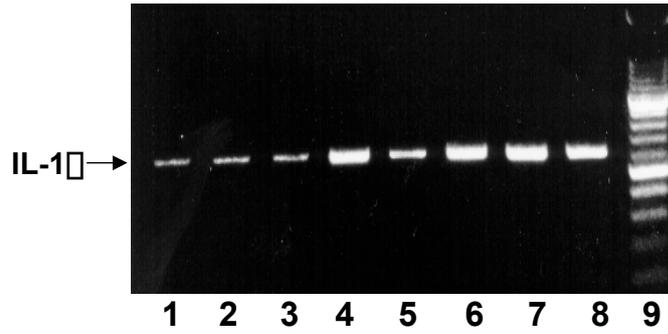
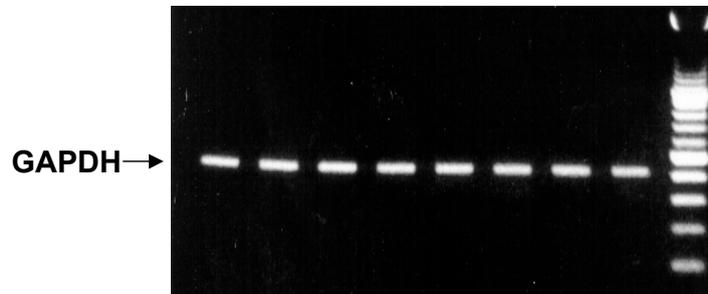
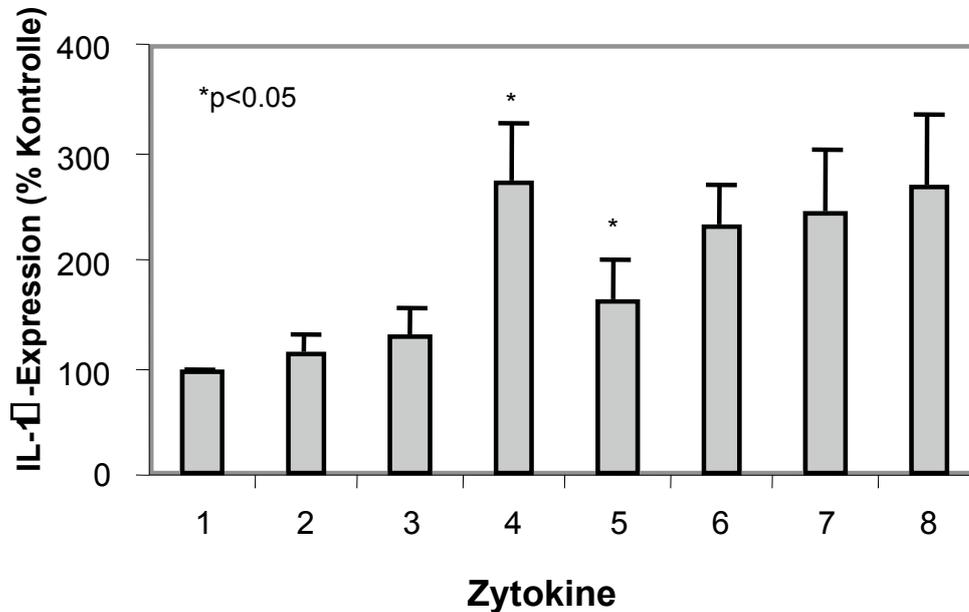
A**B****C**

Abbildung 9: Amplifikation der IL-1 β -cDNA (A) bzw. GAPDH-cDNA (B) mittels PCR aus residenten und mit Zytokinen aktivierten Aortaendothelzellen und deren densitometrische Auswertung (C). Residente Zellen (Kontrolle) (Reihe 1), IL-1 β (500 U/ml) (Reihe 2), TNF- α (500 U/ml) (Reihe 3), IFN- γ (500 U/ml) (Reihe 4), IL-1 β (500 U/ml) + TNF- α (500 U/ml) (Reihe 5), IFN- γ (500 U/ml) + IL-1 β (500 U/ml) (Reihe 6), IFN- γ (500 U/ml) + TNF- α (500 U/ml) (Reihe 7), IFN- γ (500 U/ml) + IL-1 β (500 U/ml) + TNF- α (500 U/ml) (Reihe 8), DNA-Marker (Reihe 9). Die Abbildungen zeigen ein repräsentatives Experiment aus 3 bis 5 individuellen Versuchen dar.

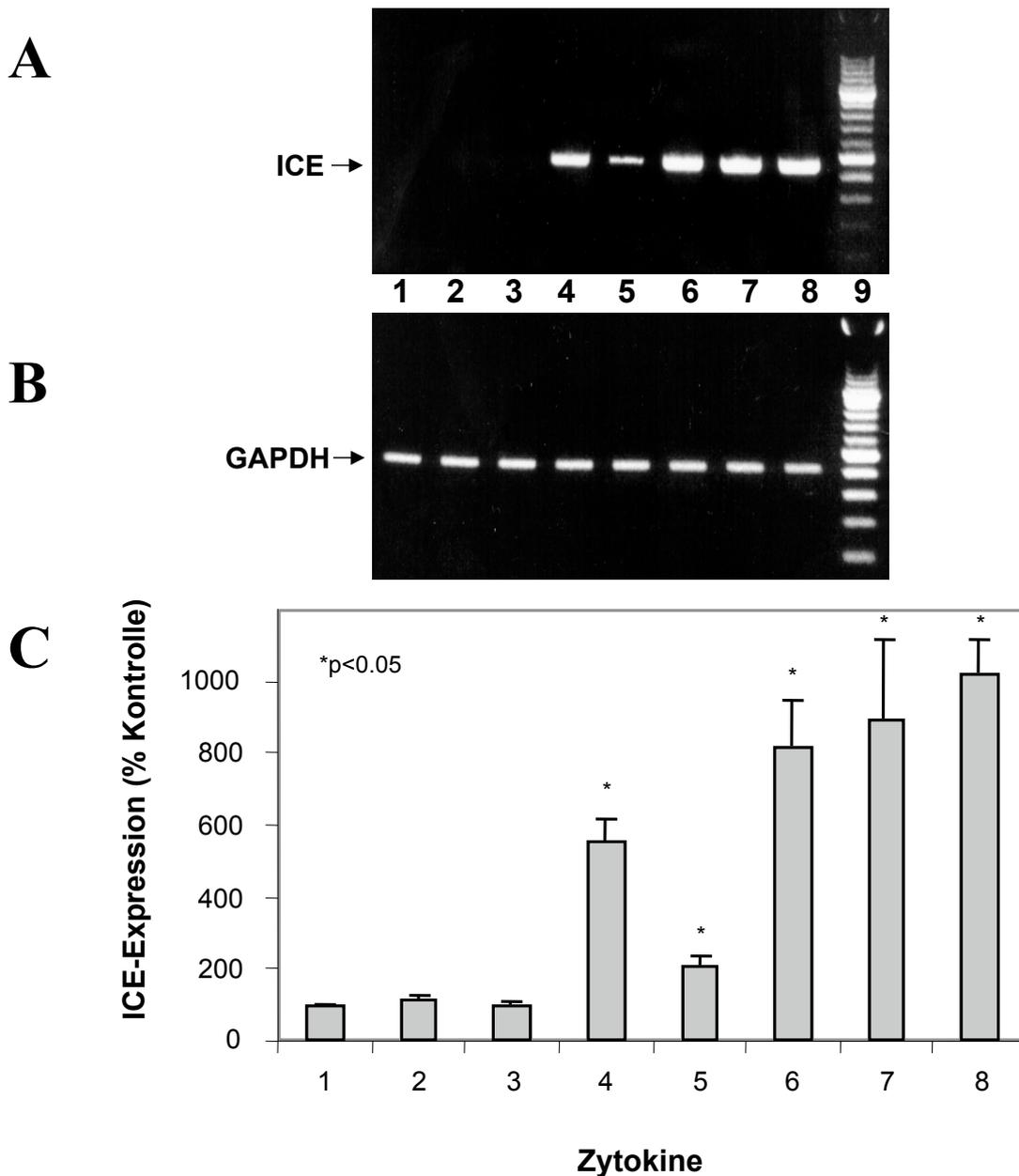


Abbildung 10: Amplifikation der ICE-cDNA (A) bzw. GAPDH-cDNA (B) mittels PCR aus residenten und mit Zytokinen aktivierten Aorta-Endothelzellen und deren desitometrische Auswertung (C). Residente Zellen (Kontrolle) (Reihe 1), IL-1 β (500 U/ml) (Reihe 2), TNF- α (500 U/ml) (Reihe 3), IFN- γ (500 U/ml) (Reihe 4), IL-1 β (500 U/ml) + TNF- α (500 U/ml) (Reihe 5), IFN- γ (500 U/ml) + IL-1 β (500 U/ml) (Reihe 6), IFN- γ (500 U/ml) + TNF- α (500 U/ml) (Reihe 7), IFN- γ (500 U/ml) + IL-1 β (500 U/ml) + TNF- α (500 U/ml) (Reihe 8), DNA-Marker (Reihe 9). Die Abbildungen zeigen einen representatives Experiment aus 3 bis 5 individuellen Versuche dar.

Unter allen Aktivierungsbedingungen, die zur Induktion der iNOS-Expression führten, findet man bei den Maus-Aorta-Endothelzellen (MAEC) ein Koexpression von IL-1 β und Interleukin-konvertierenden-Enzyms (ICE). IFN- γ ist ja das einzige Zytokin, das allein appliziert zur

Expression der iNOS führt, es ist auch der einzige Stimulus, der zur Expression von IL-1 β und der, für die Überführung in die reife Form essentiellen Caspase führt. Somit zeigt sich ein enger Zusammenhang zwischen der endogenen Induktion der iNOS Expression unter Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen und der endogenen Induktion des reifen proinflammatorischen Zytokins IL-1 β .

DISKUSSION

Zytokine sind effektive Modulatoren der Endothelzellfunktion und ein wichtiger Effekt ist die Induktion einer langanhaltenden Stickstoffmonoxid (NO) Produktion durch die induzierbare Stickstoffmonooxid-Synthase (iNOS) (76). Wie bereits in der Einleitung besprochen, spielt NO eine wichtige Rolle in einer Vielfalt von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen *in vivo* und *in vitro*, so z.B. als Mediator der Vasorelaxation, als neuronales Messengermolekül, als Modulator der Genexpression sowie des Immunsystems, aber auch in seiner scheinbar paradoxen Rolle als zytotoxisches sowie protektiv wirkendes Agens während entzündlicher Prozesse.

Die Wirkungen von NO auf die Endothelzellen selbst sind ebenfalls vielfältig und widersprüchlich. Auf der einen Seite hat NO über die Hemmung der Synthese und Expression von proinflammatorischen Zytokinen und Adhäsionsmolekulan antiinflammatorische Eigenschaften. Eine hemmende Wirkung des NO beinhaltet auch die Inhibition der Migrationsaktivität und der Bindung von Entzündungszellen an die Endothelzelloberfläche und damit der anschließenden Infiltration dieser Zellen in das anliegende Gewebe (103). Desweiteren ist NO in der Lage, über die Reaktion mit Superoxidanionen zu Peroxinitrit diese gefährliche Radikalart aus der Zelle zu entfernen (137). Dadurch wird der oxidative Streß vermindert und gleichzeitig die Resistenz der Endothelzellen gegenüber der Toxizität den von durch Neutrophile Granulozyten-oder endogen produzierten Sauerstoffradikalen Signalen erhöht. Andererseits ist bekannt dass NO maßgeblich für die Gewebszerstörung während entzündlicher und/oder autoimmuner Erkrankungen verantwortlich sein kann. Aufgrund seiner vielfältigen Wirkungen in Physiologie und Pathophysiologie bestand seit den ersten Tagen der Entdeckung ein großes Interesse an der Aufklärung der molekularen Grundlagen der NO-Synthese.

Das Ziel unserer Bemühungen war die Untersuchung der Regulation der iNOS-Expression in Endothelzellen der Maus, da das transgene Tiermodell der iNOS-defiziente Maus die Möglichkeit bietet die Spezifitäten der iNOS-Wirkungen zu untersuchen. Dabei wollten wir nicht nur die Zytokin-Antwort-Musters der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS) in Aorta-Endothelzellen der Maus

charakterisieren, sondern auch die Rolle von endogen synthetisierten Zytokinen als mögliche Mediatoren der Induktion untersuchen.

Für die Endothelzelle als Modellzelle haben wir uns entschieden, weil zum Einen in der Arbeitsgruppe bereits umfassende Ergebnisse an Ratten-Endothelzellen bezüglich der iNOS-Induktion vorliegen, vor allem aber kommt der Endothelzelle eine sehr wichtige Funktion in der frühen Entzündungsreaktion zu, wie bereits in der Einleitung ausgeführt. Die Methode der Isolation der Endothelzellen über das Auswachsen in ein Kollagengel (138) wurde hier erstmals mit Aortasegmenten der Maus durchgeführt. Diese Methode der Endothelzellisolierung aus kleinen Gefäßen – eine enzymatische oder gar mechanische Isolierung kann aufgrund des geringen Ausmaßes des Gefäßes nicht durchgeführt werden – hat den Vorteil, dass eine Verunreinigung mit Fibroblasten leicht vermieden werden kann, da Endothelzellen ein schnelleres Auswachsen ins Kollagengel als Fibroblasten oder glatte Muskelzellen aufweisen. Durch das Entfernen der implantierten Aortaringe zu einem Zeitpunkt, zu dem nur wenige Endothelzellen ausgewachsen sind (3-4 Tage) wird eine Kontamination mit Fremdzellen vermieden. Dies konnte durch die immunzytochemische Charakterisierung des Antigenphänotyps mit den Endothelzell-spezifischen Antikörpern anti-von-Willebrand-Faktor und anti-CD 106 bestätigt werden.

Aus der relevanten Fachliteratur lässt sich erkennen (71), dass das Zytokinstimulationsmuster für die iNOS-Expression, sowohl innerhalb der selben Spezies, von Zelltyp zu Zelltyp als auch zwischen verschiedenen Spezies für den gleichen Zelltyp variieren kann. So konnte in unserer Arbeitsgruppe beobachtet werden, dass Aorta-Endothelzellen der Ratte dominant auf einen IL-1 β -Stimulus mit der Induktion der iNOS-Expression antworten (136, 138), wohingegen bei Ratten-Astrozyten das IFN- γ den Hauptstimulus darstellt. Ein analoges Beispiel aus dem humanen Bereich sind Keratinozyten, Fibroblasten und Endothelzellen. Während bei den erst genannten die iNOS nach Inkubation mit IL-1 β plus TNF- α oder IL-8 plus IFN- γ induziert werden kann (139), ist bei humanen Fibroblasten eine Inkubation mit IFN- γ alleine ausreichend (140) und bei humanen Haut-Endothelzellen stellt eine Inkubation mit IL-1 β + TNF- α die notwendige Voraussetzung zur Induktion der iNOS-Expression dar (141).

Zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit war die Maus-Makrophagen-iNOS bereits kloniert und es war bekannt, dass in diesen Maus-Zellen die iNOS durch einen IFN- γ /LPS-Stimulus induziert und aktiviert werden kann. Die hier vorgestellten, detaillierten Versuche zur Aktivierung der iNOS in Maus-Endothelzellen zeigen erstmals, dass von den drei einzelnen proinflammatorischen Zytokinen nur IFN- γ in der Lage war, als einzelner Stimulus eine messbare NO-Produktion über eine Induktion der iNOS Expression auszulösen, während weder IL-1 β noch TNF- α alleine einen signifikanten Effekt hatten. Diese Befunde sind kürzlich von einer anderen Gruppe bestätigt worden (142). Die Kombination von TNF- α oder IL-1 β mit IFN- γ potenziert die IFN- γ -induzierte Stimulation der NO-Produktion; die Mischung aller drei Zytokine stellt den potentesten Stimulus für die NO Produktion und iNOS Expression dar. Eine Inkubation der Zellen mit IL-1 β plus TNF- α in Abwesenheit des IFN- γ führt zwar zur einer schwachen Expression der iNOS-mRNA, jedoch ohne messbare Enzym-Aktivität. Ansonsten ergaben die Experimente, dass die messbare iNOS-Aktivität parallel zur iNOS-mRNA-Expression verlief und somit transkriptionell reguliert wird, obwohl die iNOS Regulationsmechanismen auf translationaler und posttranslationaler Ebene beschrieben wurden (143, 144).

Die hier von uns gefundenen Zytokin-Antwortmuster der Maus-Aorta-Endothelzellen sind unterschiedlich zu denen, wie sie für Ratten-oder Human-Endothelzellen beschrieben wurden (138, 141). Bei Ratten-Zellen wurde ein reines IL-1 β -gesteuertes Muster beobachtet. Bei zusätzlichen Zugabe von TNF- α und IFN- γ wurden lediglich additive Effekte beobachtet. Für die Verstärkung der durch IL-1 β induzierten iNOS-Expression spielt IFN- γ eine deutlichere Rolle als TNF- α . Dieses Phänomen ist wohl damit zu erklären, dass das IFN- γ in der Lage ist, bestimmte Regionen im iNOS-Promotor zu aktivieren und so zu einer Verstärkung einer bereits induzierten iNOS-Transkription beitragen kann (145). Interessant bei den Versuchen mit Ratten-Zellen war auch die Tatsache, dass IFN- γ wenn es gemeinsam mit dem Hauptstimulus IL-1 β eingesetzt wurde, bereits bei kleinsten Konzentrationen (10 U/ml) einen maximalen Effekt bewirkte. Einen analogen Befund haben wir auch mit Maus-Aorta -Endothelzellen erbringen können. Hier führte die Stimulation mit IFN- γ allein schon bei sehr kleinen Konzentrationen (2 U/ml) zu einer erhöhten NO-Produktion mit einer maximalen Induktion bereits bei 10 U/ml.

Eine frühere Arbeit aus unserem Labor lieferte Hinweise darauf, dass die iNOS-Aktivierung in Endothelzellen der Ratte mit einer erhöhten endogenen IL-1 β -Expression einhergeht (136). Unsere Überlegung war nun, dass eine endogene Produktion von bioaktiven IL-1 β ursächlich für die Zytokin-induzierte iNOS-Expression verantwortlich sein könnte. Tatsächlich konnte ich hier im Mausmodell erstmals zeigen, dass eine IFN- γ -induzierte iNOS -Expression und -Aktivität einhergeht mit einer gleichzeitigen endogenen Expression von IL-1 β sowie des für seine Bioaktivität essentiellen Interleukin-1-converting Enzyms (ICE, Caspase-1). Im Folgenden erhielten wir mit humanen Fibroblasten, Ratten-Aorta-Endothelzellen sowie -Astrozyten analoge Ergebnisse, obwohl diese Zellen alle ein unterschiedliches iNOS-induzierendes Zytokinprofil hatten. Diese Befunde unterstützten unsere Hypothese, dass sich Zellen heterogen bezüglich der Aktivierungsbedingungen verhalten können, jedoch über einen gemeinsamen Weg, die endogene Produktion des bioaktiven IL-1 β zur iNOS -Expression führen. Ein Beweis dieser Hypothese wurde von Herrn Dr. Bonmann in unserer Gruppe geführt, indem er mittels eines Pancaspase Inhibitors (ZVAD) in Ratten-Astrozyten eine Blockade des ICE erreichte und auf diese Weise die LPS/IFN- γ -induzierte iNOS-Expression unterdrücken konnte.

Natürlich stellt sich hier die Frage, wenn ein endogener IL-1 β -Stimulus der eigentlicher Induktionsreiz der iNOS darstellt, warum führt die Stimulation der Maus-Aorta-Endothelzellen mit exogen zugesetzten, biologisch aktiven IL-1 β nicht zu einer Induktion der iNOS? Mögliche Erklärungen könnten sein, dass residente Zellen wenig oder keine IL-1-Rezeptoren exprimieren und dazu erst eines inflammatorischen Stimulus bedürfen, oder dass IL-1 β alleine die spezifische Synthese eines weiteren Mitglieds der IL-1 Genfamilie, den Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist induziert wodurch die Bioverfügbarkeit von IL-1 β reduziert wird (146). Diese Fragen müssen noch überprüft werden.

Es ist bekannt, dass exogen zugesetzte proinflammatorische Zytokine in Endothelzellen eine Reihe von weiteren proinflammatorischen Zytokinen induzieren können, wie wir hier an Maus-Aorta -Endothelzellen zeigen konnten auch das IL-1 β sowie vor allem das ICE. Daher ist es nicht verwunderlich, dass repetitive Gaben des einzelnen Zytokins IFN- γ zu einer massiven Zunahme der NO-Bildung führte, mit Werten vergleichbar zu denen nach Stimulation mit der Dreierkombination der hier verwendeten Zytokine. Die IFN- γ -Abhängigkeit der IL-1 β - und ICE-

Expression könnte somit erklären, warum die durch den ersten IFN- γ -Stimulus induzierte iNOS-Expression und -Aktivität durch einen Zweitstimulus "IFN- γ " so deutlich erhöht wird. Hierbei könnte ein zusätzlich endogen aktiver IL-1 β -Mechanismus auf die iNOS-Expression verstärkend wirken. Ein IFN- γ -bedingter Verstärkereffekt im Bezug auf die iNOS-Expression könnte jedoch auch auf ein anderes neu synthetisiertes Protein zurückzuführen sein (147). Untersuchungen von Martin et al. (148) konnten in der "stromaufwärts" gelegenen Promoterregion des Maus γ -iNOS-Promoters fünf potentielle Bindungsstellen für IFN- γ -aktivierte Transkriptionsfaktoren aufzeigen, von denen vier (nämlich ein sog. GAS (gamma activated site), ein IRF-E (interferon regulatory factor element) und zwei ISRE (interferon stimulated response elements) in einer Promotorregion (von -951 bis -911) zusammenliegen. Von diesen Bindungsstellen kommt für eine stringente iNOS-Regulation wohl nur IRF-E in Frage, da es die einzige Region ist, von der bisher eine von der *de novo* Proteinbiosynthese abhängige IFN- γ -induzierte intranukleäre Mobilisation von Bindungsfaktoren bekannt ist. Die Autoren postulieren weiter, dass es sich bei dem Protein, welches an der über IRF-E regulierten Transkriptionskontrolle entscheidend beteiligt ist, um IRF-1 handeln müsse, schließen aber gleichzeitig nicht aus, dass weiter in 3'-Richtung auch weitere, für die iNOS Regulation wichtige Bindungsstellen für IFN- γ -induzierte Faktoren bestehen.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit *a)* dass Maus-Endothelzellen als Modell verwendet werden können, um die Antwort der Endothelzellen unter proinflammatorischen Bedingungen zu untersuchen; *b)* dass der iNOS eine relevante Rolle in der Vermittlung der Produktion von hohen NO-Mengen in Endothelzellen unter Entzündungsbedingungen zukommt; *c)* dass Zytokine die entzündliche Antwort durch Induktion der Produktion und möglicherweise auch der Sekretion von weiteren proentzündlichen Zytokinen verstärken. Diese Studie liefert deutliche Hinweise darauf, dass NO eine Rolle in der Vermittlung von Zytokinsignalen spielt, was wiederum eine proentzündliche Antwort von Endothelzellen auslöst. Die hier gefundene, stringente Abhängigkeit der endothelialen iNOS-Expression und high-output-NO-Synthese von einer endogenen Produktion von bioaktiven IL-1 β könnte die Möglichkeit eröffnen, durch spezifische Inhibitoren wie Interleukin-1-Rezeptor Antagonist (IL-1ra) und ICE-Inhibitoren therapeutisch in diese Endothell-vermittelte Effektorseite des

Immunsystems eingreifen zu können. Weitere Zielsetzungen sind, zu untersuchen ob die endogene IL-1 β Expression unter proinflammatorischen Bedingungen ein ubiquitäres Phänomen darstellt. Dies könnte wichtige Implikationen in der Behandlung inflammatorischer Erkrankungen haben.

MÖGLICHE PATHOPHYSIOLOGISCHE UND THERAPEUTISCHE RELEVANZ DER ERGEBNISSE

Die hier vorgestellten Ergebnisse demonstrieren die herausragende Bedeutung von IFN- γ als Induktor und der endogenen ICE- und IL-1 β -Produktion als Mediatoren der endothelialen Regulation der Expression und Aktivität der iNOS. Entzündliche Prozesse sowie die Aktivierung der iNOS und die daraus resultierende Bildung größerer Mengen von NO stellen, wie oben vorgestellt, einerseits einen wichtigen pathogenetischen Mechanismus bei einer Reihe von Erkrankungen dar, andererseits jedoch auch einen starken protektiven antioxidativen Faktor zur Abwehr von ROS-induzierten Zellschädigungen (149, 150). An den Beispielen Arteriosklerose sowie des Akuten-Koronarsyndroms sollen diese beiden dichotomen Eigenschaften des NO verdeutlicht werden.

iNOS als Promotor der Arteriosklerose?

Die Arteriosklerose ist eine chronische entzündliche Erkrankung. Dabei stellt eine Schädigung des Gefäßendothels einen initiierenden Schritt in der Entstehung der Arteriosklerose dar (151). Die endotheliale Dysfunktion, zumeist charakterisiert durch eine unzureichende NO-Produktion und einer drastischen Verminderung der antithrombogenen Eigenschaften des Endothels, führt zu einer verstärkten Adhäsion von Leukozyten an die Endothelloberfläche und einer anschließend vermehrten Migrationsrate dieser Zellen durch die Endothellzellschicht. Diese Prozesse, zusammen mit der subendothelialen Akkumulation von modifizierten low density Lipoproteinen (LDL), initiieren einen inflammatorischen Zyklus der Synthese von proinflammatorischen Zytokinen und Wachstumsfaktoren. Zusätzlich tragen die Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen und Leukozyten zu einer Progression der arteriosklerotischen Läsion bei.

Dem konstitutiv, ecNOS produzierten NO wurde eine protektive Wirkung in der Entstehung der Arteriosklerose bzw. der Verlangsamung der Progression dieser Erkrankung zugesprochen (152). Hingegen gibt es Hinweise darauf, dass iNOS generiertes NO, aufgrund der hohen Konzentrationen in denen es durch die iNOS über längere Zeiträume produziert werden kann, Arteriosklerose fördernd wirken könnte. In höheren Konzentrationen reagiert NO vorzugsweise mit Superoxide-Anionen, die während ischämischer Vorgänge generiert werden können, zum Peroxynitrit. Peroxynitrit ist ein Produkt mit erhöhtem oxidativen Potential, somit extrem reaktionsfreudig und daher Zelltoxisch. Gestützt werden die Behauptungen einer negativen Rolle der iNOS in der Arteriosklerose durch die Beobachtung, dass eine iNOS-Expression in humanen arteriosklerotischen Läsionen nachgewiesen werden konnte (153-155) und ferner auch Anzeichen für eine Peroxynitrit-Bildung an diesen Stellen gefunden wurden (153, 156). Ein zusätzliches Argument für eine Beteiligung der iNOS in der Arteriosklerose ist die Beobachtung, dass NO bzw. reaktive Nitrogenintermediate die Oxidation von LDL fördern und somit zur Entstehung der Arteriosklerose beitragen (157). Somit hat NO, wenn in höheren Konzentrationen vorhanden, das Potential über seine Zelltoxischen Eigenschaften vaskuläre Läsionen und somit die Arteriosklerose zu verstärken bzw. zu fördern.

Die Rolle der iNOS in der Entstehung von arteriosklerotischen Läsionen wurde in einem Maus Modell untersucht. Dazu wurden Tiere gezüchtet, die sowohl iNOS-defizient waren als auch das hyperlipidämische Apolipoprotein E (apoE)-nicht produzieren konnten, ein bekanntes Tiermodell der Fett-Diät-induzierten Arteriosklerose. Es konnte gezeigt werden, dass bei einer Cholesterinreichen Diät die iNOS^{-/-}/ApoE^{-/-} knockout Mäuse eine deutliche Reduktion der arteriosklerotischen Läsionen im Vergleich zu den mono-defizienten ApoE^{-/-}-Tieren aufwiesen. Diese Resultate waren nach 22 Wochen der Fett-Diät am ausgeprägtesten, was für eine Rolle der iNOS in der Entstehung späterer Läsionen spricht. Diese protektive Wirkung der iNOS-Defizienz ist mit einer Reduktion der Plasma-Lipidperoxide assoziiert, was darauf hindeutet, dass die iNOS hier über eine Erhöhung des oxidativen Stress die Arteriosklerose fördert. Die Mögliche Rolle der iNOS in der Entstehung von Arteriosklerose hat wichtige Relevanz in der Therapie dieser Erkrankung.

Die von mir vorgelegten Ergebnissen in der Aorta-Endothelzellen der Maus die eine stringente Abhängigkeit der endothelialen iNOS-

Expression und high-output-NO-Synthese von einer endogenen Produktion von bioaktiven IL-1 α aufweisen, könnte die Möglichkeit eröffnen, durch spezifische Inhibitoren wie Interleukin-1-Rezeptor Antagonist (IL-1ra) und ICE-Inhibitoren therapeutisch in diese Endothel-vermittelte Effektorseite des Immunsystems eingreifen zu können und somit einer iNOS-vermittelten Progression der Arteriosklerose entgegen wirken.

Trotz der vorgestellten Ergebnisse aus dem oben beschriebenen Tiermodell ist es nicht ausgeschlossen, dass in frühen, initiierten Ereignissen der Arteriosklerose iNOS-generiertes NO, eventuell auch in höheren Konzentrationen anwesend, durchaus vasoprotektiv wirken könnte. Diese Überlegung ist nicht abwegig, wenn man die Eigenschaften des NO betrachtet, welche in einem Arteriosklerose-Modell als benefiziell anzusehen sind. Da ist zunächst seine anti-oxidative Eigenschaft, welche das NO zum stärksten bekannten Antioxidans gegen Lipidperoxidation macht, rund 1000-fach effektiver als zum Beispiel das Vitamin E (158, 159). Diese Eigenschaft würde somit das Endothel vor der toxischen Wirkung von verschiedenen reaktiven Sauerstoffspezies schützen. Aufgrund seiner Möglichkeiten, den Energiehaushalt einer Zelle zu beeinflussen ist das NO ein effektiver Immun-Suppressor, auch von aktivierten Makrophagen und würde somit das vaskuläre Endothel vor diesen Zellen schützen. Nicht zuletzt und wie weiter unten erwähnt greift das NO in das Zellzyklusgeschehen von Zellen ein und je nach Konzentration fördert bzw. inhibiert es das Zellwachstum, so z.B. auch von glatten Muskelzellen, ein entscheidender Schritt in der Entwicklung von Gefäßläsionen (160).

Protektive Rolle der iNOS in der Transplantations-Arteriosklerose

Die Transplantations-Arteriosklerose ist trotz vorhandenen Immunsuppressiven Therapien ein Hauptfaktor für die schlechte Langzeitprognose der kardialen Transplantation. Die pathogenetischen Mechanismen dieser immunmedierten Form der Arteriosklerose sind weitgehend ungeklärt. Ein initialer Schritt ist die akute alloimmune Antwort von T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen des Empfängers und von Endothelzellen des Donors. Es folgt die Infiltration von Makrophagen und Lymphozyten in das Gefäß und die Initiierung der Entzündungskaskade. Zu einem späteren Stadium kommt es zur

Expandierung der neointimalen glatten Muskelzellen und zu einer Intimafibrose (161). NO als ein pleiotrop wirkendes Molekül könnte als ein potentieller Regulator aller diesen Stadien fungieren (162). Die immunmodulatorischen Wirkungen von NO auf das Th1/Th2-System wurde ausführlich in der Einleitung beschrieben. Ebenfalls wirkt NO antiproliferativ über die Hemmung der Migration und Proliferation von vaskulären glatten Muskelzellen. Im Tier-Modell konnte gezeigt werden dass NO eine protektive Wirkung in der Transplantations-Arteriosklerose spielt. So konnte gezeigt werden, dass nach einer gesetzten Verletzung eines Gefäßes des Transplantats iNOS^{-/-}-Mäuse eine signifikant erhöhte Intimaverdickung entwickeln, die auf eine spezifische Erhöhung der Proliferation von glatten Muskelzellen zurückzuführen ist (163).

Die gezielte Stimulation der iNOS-Expression und/oder iNOS-Gentherapie könnte ein wichtiger Schritt in der Therapie der Transplantations-Arteriosklerose sein. Somit könnte die in dieser Arbeit aufgezeigte, für die iNOS-Expression notwendige Koinduktion von IL-1 β und ICE in der Therapie einer Transplantations-Arteriosklerose von Bedeutung sein, insbesondere, wenn man in Betracht zieht, dass weitere wichtige vasoprotektiv wirkende Proteine wie z.B. das antiapoptotische Bcl-2 sowie die Hämoxigenase-1 und VEGF in Endothelzellen unter der Kontrolle von NO stehen (164-167) und ihre Expression über die Aktivität der iNOS reguliert werden kann. Da eine systemische iNOS-Induktion einen Organismus irreversibel schädigen könnte, wird das Hauptproblem einer solchen Therapie darin liegen, eine protektiv wirkende iNOS-Expression lokal auf kleine Bereiche einer Gefäßschädigung zu begrenzen.

LITERATUR

1. Fischman A: Endothelium: A distributed organ of diverse capabilities. *Ann. NY Acad. Sci.* 1982; 401:1
2. Risau W, Flamme I: Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995; 11:73-91
3. Palis J, McGrath KE, Kingsley PD: Initiation of hematopoiesis and vasculogenesis in murine yolk sac explants. *Blood* 1995; 86 (1):156-163
4. Gimbrone MAJ: Endothelium: nature's blood container, in *Vascular endothelium in hemostasis and thrombosis*. Edited by Gimbrone M, A, Jr. Edinburgh, Churchill, Livingstone, 1986, pp 1-13
5. Augustin HG, Kozian DH, Johnson RC: Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. *Bioessays* 1994; 16 (12):901-6
6. Dejana E: Endothelial adherens junctions: implications in the control of vascular permeability and angiogenesis. *J. Clin. Invest.* 1996; 98 (9):1949-53
7. Kumar S, West DC, Ager A: Heterogeneity in endothelial cells from large vessels and microvessels. *Differentiation* 1987; 36 (1):57-70
8. Turner RR, Beckstead JH, Warnke RA, Wood GA: Endothelial cell phenotypic diversity. In situ demonstration of immunologic and enzymatic heterogeneity that correlates with specific morphologic subtype. *Am. J. Clin. Pathol.* 1987; 87 (5):569-75
9. Levin EG, Santell L, Osborn KG: The expression of endothelial cell tissue plasminogen activator in vivo: a function defined by vessel size and anatomic location. *J Cell Sci* 1997; 110 (Pt 2):139-48
10. Wojta J, Hoover RL, Daniel TO: Vascular origin determines plasminogen activator expression in human endothelial cells. Renal endothelial cells produce large amounts of single chain urokinase type plasminogen activator. *J Biol Chem* 1989; 264 (5):2846-52
11. Louise CB, Obrig TG: Human renal microvascular endothelial cells as a potential target in the development of the hemolytic uremic syndrome as related to fibrinolysis factor expression, in vitro. *Microvasc. Res.* 1994; 47 (3):377-87
12. Obrig TG, Louise CB, Lingwood CA, Boyd B, Daniel TO: Endothelial cell heterogeneity in Shiga toxin receptors and responses. *J Biol Chem* 1993; 268 (21):15484-8
13. Drake TA, Cheng J, Chang A, Taylor FBJ: Expression of tissue factor, thrombomodulin, and E-selectin in baboons with lethal *Escherichia coli* sepsis. *Am. J. Pathol.* 1993; 142 (5):1458-70
14. Mitra D, Jaffe EA, Weksler B, Hajjar KA, Doserland C, Laurence J: Thrombotic thrombocytopenic purpura and sporadic hemolytic - uremic syndrome plasmas induce apoptosis in restricted lineages of human microvascular endothelial cells. *Blood* 1997; 89 (4):1224-34
15. Zimmerman GA, Prescott SM, McIntyre TM: Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signalling molecules. *Immunol Today* 1992; 13:93-8
16. Picker LJ, Butcher EC: Physiological and molecular mechanisms of lymphocyte homing. *Annu Rev Immunol* 1992; 10:561-80
17. Pober JS, Cotran RS: Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol Rev* 1990; 70:427-51
18. Mantovani A, Bussolino F, Dejana E: Cytokine regulation of endothelial cell function. *FASEB J.* 1992; 6:2591-2599
19. Dinarello CA: Interleukin-1 and its biologically related cytokines. *Immunol Rev*

1992; 127:119-34

20. Dinarello CA: The interleukin-1 family: 10 years of discovery. *Faseb J* 1994; 8:1314-25
21. Conti B, Jahng JW, Tinti C, Son JH, Joh TH: Induction of interferon-gamma inducing factor in the adrenal cortex. *J Biol Chem* 1997; 272 (4):2035-7
22. Stevenson FT, Torrano F, Locksley RM, Lovett DH: Interleukin 1: the patterns of translation and intracellular distribution support alternative secretory mechanisms. *J Cell Physiol* 1992; 152 (2):223-31
23. Margolin N, Raybuck SA, Wilson KP, Chen W, Fox T, Gu Y, Livingston DJ: Substrate and inhibitor specificity of interleukin-1 beta-converting enzymes and related caspases. *J Biol Chem* 1997; 272 (11):7223-8
24. Libby P, Ordovas JM, Auger KR, Robbins AH, Birinyi LK, Dinarello CA: Endotoxin and tumor necrosis factor induce interleukin gene expression in adult human vascular endothelial cells. *Am J Pathol* 1986; 124:179-85
25. Kurt-Jones EA, Fiers W, Pober JS: Membrane IL-1 induction on human endothelial cells and dermal fibroblasts. *J Immunol* 1987; 139:2317-24
26. Bevilacqua MP: Endothelial-leukocyte adhesion molecules. *Annu Rev Immunol* 1993; 11:767-804
27. Rossi V, Breviario F, Ghezzi P, Dejana E, Mantovani A: Prostacyclin synthesis induced in vascular cells by interleukin-1. *Science* 1985; 229:174-6
28. Paleolog EM, Crossman DC, McVey JH, Pearson JD: Differential regulation by cytokines of constitutive and stimulated secretion of von Willebrand factor from endothelial cells. *Blood* 1990; 75:688-95
29. Schleef RR, Bevilacqua MP, Sawdey M, Gimbrone MA, Loskutoff DJ: Interleukin-1 and tumor necrosis factor activation of vascular endothelium: effects on plasminogen activator inhibitor and tissue-type plasminogen activator. *J Biol Chem* 1988; 263:5797-803
30. Warner SJC, Auger KR, Libby P: Interleukin induces interleukin-1. Recombinant human interleukin 1 induces interleukin 1 production by human vascular endothelial cells. *J Immunol* 1987; 139:1911-7
31. Sironi M, Breviario F, Proserpio P: IL-1 stimulates IL-6 production in endothelial cells. *J Immunol* 1989; 142:549-53
32. Strieter RM, Wiggins R, Phan SH: Monocyte chemotactic protein gene expression by cytokine treated human fibroblasts and endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989; 162:694-700
33. Krishnaswamy G, Kelley J, Yerra L, Smith JK, Chi DS: Human endothelium as a source of multifunctional cytokines: molecular regulation and possible role in human disease. *J Interferon Cytokine Res* 1999; 19(2):91-104
34. Rosenkranz-Weiss P, Sessa WC, Milstien S, Kaufman S, Watson CA, Pober JS: Regulation of nitric oxide synthesis by proinflammatory cytokines in human umbilical vein endothelial cells. Elevation in tetrahydrobiopterin levels enhance endothelial nitric oxide synthase specific activity. *J Clin Invest* 1994; 93:2236-43
35. Gamble JR, Vadas MA: Endothelial adhesiveness for blood neutrophils is inhibited by transforming growth factor-beta. *Science* 1988; 242:97-9
36. Gamble JR, Khew-Goodall Y, Vadas MA: Transforming growth factor-beta inhibits E-selectin expression on human endothelial cells. *J Immunol* 1993; 150:4494-503
37. Hynes RO: Integrins: versatility, modulation, and signalling in cell adhesion. *Cell* 1992; 69:11-25

38. Shimizu Y, Newman W, Tanaka Y, Shaw S: Lymphocyte interaction with endothelial cells. *Immunol Today* 1992; 13:106-12
39. Schuger L, Varani J, Marks RM, Kunkel SL, Jonhson KJ, Ward PA: Cytotoxicity of tumor necrosis factor-alpha for human umbilical vein endothelial cells. *Lab Invest* 1989; 61 (1):62-8
40. Meyrick B, Christman B, Jesmok G: Effects of recombinant tumor necrosis factor-alpha on cultured pulmonary artery and lung microvascular endothelial monolayers. *Am J Pathol* 1991; 138 (1):93-101
41. Goldblum SE, Sun WL: Tumor necrosis factor-alpha augments pulmonary arterial transendothelial albumin flux in vitro. *Am J Physiol* 1990; 258 (2Pt1):L57-L167
42. Campbell WN, Ding X, Goldblum SE: Interleukin-1 alpha and -beta augment pulmonary artery transendothelial albumin flux in vitro. *Am J Physiol* 1992; 263 (1Pt1):L128-L136
43. Robaye B, Mosselmans R, Fiers W, Dumont JE, Galant P: Tumor necrosis factor induces apoptosis (programmed cell death) in normal endothelial cells in vitro. *Am J Pathol* 1990; 138 (2):447-53
44. Pober JS: Immunobiology of human vascular endothelium. *Immunol Res* 1999; 19 (2-3):225-32
45. Rees D, Palmer R, Moncada S: Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci* 1989; 86:3375-81
46. Furchgott RF, Vanhoutte PM: Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J* 1989; 3:2007-18
47. Peach MJ, Loeb AL, Singer HA, Saye J: Endothelium-derived vascular relaxing factor. *Hypertension* 1985; 94:94-100
48. Auch-Schwelk W, Katusic ZS, Vanhoutte PM: Thromboxane A2 receptor antagonists inhibit endothelium dependent contraction. *Hypertension* 1990; 15:699-703
49. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332:411-5
50. Vanhoutte PM: Endothelin-1: A matter of life and breath. *Nature* 1994; 368:693-4
51. Kato T, Iwama Y, Okumura K, Hashimoto H, Ito T, Satake T: Prostaglandin H2 may be the endothelium-derived contracting factor released by acetylcholine in the aorta on the rat. *Hypertension* 1990; 15:475-81
52. Furchgott RF, Zawadzki JV: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288:373-6
53. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA: Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43 (2):109-42
54. Lincoln TM, Cornwell TL: Intracellular cyclic GMP receptors proteins. *FASEB J* 1993; 7 (2):328-38
55. Nathan C: Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J*. 1992; 6 (12):3051-64
56. Furchgott R, F: Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: The basis for the proposal that the acid-activatable inhibitory factor from bovine retractor penis is inorganic nitrite and the endothelium-derived factor is nitric oxide., in *Vasodilatation: Vascular Smooth Muscle, Peptides, Autonomic Nerves, and Endothelium*. Edited by Vanhoutte PM. New York, Raven Press, 1988, pp 401-14
57. Ignarro LJ, Byrns RE, Woods KS: Biochemical and pharmacological properties of endothelium-derived relaxing factor and its similarity to nitric oxide radical., in

Vasodilatation: Vascular Smooth Muscle, Peptides, Autonomic Nerves, and Endothelium. Edited by Vanhoutte PM. New York, Raven Press, 1988, pp 427-36

58. Marletta MA: Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell* 1994; 78 (6):927-30
59. Mayer B, John M, Bohme E: Purification of a Ca²⁺/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum. Cofactor role of tetrahydrobiopterin. *FEBS Lett.* 1990; 277 (1-2):215-9
60. Bredt DS, Snyder SH: Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87 (2)
61. Asano K, Chee C, Gaston B, Lilly CM, Gerard C, Drazen JM, Stamler JS: Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation, and activity in human lung epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91 (21):10089-93
62. Nakane M, Schmidt HHHW, Pollock JS, Forstermann U, Murad F: Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett* 1993; 316 (2):175-80
63. Schmidt HHHW, Gagne GD, Nakane M, Pollock JS, Miller MF, Murad F: Mapping of neural nitric oxide synthase in the rat suggests frequent co-localization with NADPH diaphorase but not with soluble guanylyl cyclase, and novel paraneural function for nitrinergic signal transduction. *J Histochem Cytochem* 1992; 40 (10):1439-56
64. Pollock JS, Förstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HHHW, Nakane M, Murad F: Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88 (23):10480-4
65. Pollock JS, Klinghofer V, Förstermann U, Murad F: Endothelial nitric oxide synthase is myristylated. *FEBS Lett* 1992; 309 (3):402-4
66. Robinson LJ, Busconi L, Michel T: Agonist-modulated palmitoylation of endothelial nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1995; 270 (3):995-8
67. Nishida K, Harrison DG, Navas JP, Fisher AA, Dockery SP, Uematsu M, Nerem RM, Alexander RW, Murphy TJ: Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 1992; 90 (5):2092-6
68. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM: Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 1999; 399 (6736):601-5
69. Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC: Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 1995; 377 (6546):239-42
70. Hevel JM, White KA, Marletta MA: Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. *J Biol Chem* 1991; 266 (34):22789-91
71. Kroncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V: Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1995; 376(6):327-43
72. Liew FY, Li Y, Severn A, Millott S, Schmidt J, Salter M, Moncada S: A possible novel pathway of regulation by murine T-helper type-2 (Th2) cells of a Th1 cell activity via the modulation of the induction of nitric oxide synthase on macrophages. *Eur J Immunol* 1991; 21 (10):2489-94
73. Ding A, Nathan CF, Graycar J, Derynck R, Stuehr DJ, Srinivasan S: Macrophage deactivating factor and transforming growth factors- beta1, -beta2 and -beta3 inhibit

- induction of macrophage nitrogen oxide synthase by IFN-gamma. *J Immunol* 1990; 145 (3):940-44
74. Sies H: Oxidative stress: from basic research to clinical application. *Am J Med* 1991; 91 (Suppl. 3C):31-8
 75. Schmidt K, Desch W, Klatt P, Kukovetz WR, Mayer B: Release of nitric oxide from donors with known half-life: a mathematical model for calculating nitric oxide concentration in aerobic solutions. *Nauny-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1997; 355:457-62
 76. Kroncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofer V: Nitric oxide: cytotoxicity versus cyto-protection-how, why, when and where. *Nitric Oxide Biol Chem* 1997; 1:107-120
 77. Henry Y, Lepoivre M, Drapier JC, Ducrocq C, Boucher JL, Guissani A: EPR characterization of molecular targets for NO in mammalian cells and organelles. *FASEB J* 1993; 7:1124-34
 78. Cleeter MWJ, Cooper JM, Darley-Usmar VM, Moncada S, Schapira AHV: Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. *FEBS Lett* 1994; 345:50-4
 79. Lizasoain I, Moro MA, Knowles RG, Darley-Usmar V, Moncada S: Nitric oxide and peroxynitrite exert distinct effects on mitochondrial respiration which are differentially blocked by glutathione or glucose. *Biochem J* 1996; 314:877-80
 80. Poderoso JJ, Carreras MC, Lisdero C, Riobo N, Schopfer F, Boveris A: Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys* 1996; 328:85-92
 81. Schweizer M, Richter C: Nitric oxide potently and reversibly deenergizes mitochondria at low oxygen tension. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 204:169-75
 82. Nguyen T, Brunson D, Crespi CL, Penman BW, Wishnok JS, Tannenbaum SR: DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:3030-4
 83. Fehsel K, Kolb-Bachofen V, Kolb H: Islet cell DNA is a target of inflammatory attack by nitric oxide. *Diabetes* 1991; 42:496-500
 84. Wink DA, Kasprzak KS, Maragos CM, Elespuru RK, Misra M, Dunams TM, Cebula TA, Koch WH, Andrews AW, Allen JS, Keefer LK: DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science* 1991; 254:1001-3
 85. Zang J, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH: Nitric oxide activity of poly(ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science* 1994; 263:687-9
 86. Radons J, Heller B, Burkle A, Hartmann B, Rodriguez M, Kroncke KD, Burkhardt V, Kolb H: Nitric oxide toxicity in islet cells involves poly(ADP-ribose) polymerase activation and concomitant NAD⁺ depletion. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 199:1270-7
 87. Heller B, Wang ZQ, Wagner EF, Radons J, Burkle A, Fehsel K, Burkart V, Kolb H: Inactivation of the poly(ADP-ribose) polymerase gene affects oxygen radical and nitric oxide toxicity in islet cells. *J Biol Chem* 1995; 270:11176-80
 88. Wink DA, Laval J: The Fpg protein, a DNA repair enzyme, is inhibited by the biomediator nitric oxide in vitro and in vivo. *Carcinogenesis* 1994; 15:2125-9
 89. Nunoshiba T, deRojas-Walker T, Wishnok JS, Tannenbaum SR, Demple B: Activation by nitric oxide of an oxidative stress response that defends *Escherichia coli* against activated macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:9993-7
 90. Bellmann K, Wenz A, Radons J, Burkart V, Kleemann R, Kolb H: Heat shock induces resistance in rat pancreatic islet cells against nitric oxide, oxygen radicals

- and streptozocin toxicity in vitro. *J Clin Invest* 1995; 95:2840-5
91. Schwarz MA, Lazo JS, Yalowich JS, Allen WP, Whitmore M, Bergonia HA, Tzeng E, Billiar TR, Robbins PD, Lancaster JR, Pitt BR: Metallothionein protects against the cytotoxic and DNA-damaging effects of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:4452-6
 92. Albina JF, Martin BA, Henry WL, Louis CA, Reichner JS: B cell lymphoma-2 transfected P815 cells resist reactive nitrogen intermediate-mediated macrophage-dependent cytotoxicity. *J Immunol* 1996; 157:279-83
 93. Sano H, Hirai M, Saito H, Nakashima I, Isobe K: Nitric oxide releasing reagent S-nitroso-N-acetylpenicillamine enhances the expression of manganese superoxide dismutase mRNA in rat vascular smooth muscle cells. *J Cell Biochem* 1996; 62:50-5
 94. Motterlini R, Foresti R, Intaglietta M, Winslow RM: NO-mediated activation of heme oxygenase: endogenous cytoprotection against oxidative stress to endothelium. *Am J Physiol* 1996; 270:H107-H114
 95. Wink DA, Darbyshire JF, Nims RW, Saavedra JE, Ford PC: Reactions of the bioregulatory agent nitric oxide in oxygenated aqueous media: determination of the kinetics for oxidation and nitrosation by intermediates generated in the NO/O₂ reaction. *Chem Res Toxicol* 1993; 6:23-7
 96. Mathews WR, Kerr SW: Biological activity of S-nitrosothiols: the role of nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 267:1529-37
 97. Roy B, du Mouliet d'Hardemare A, Fontecave M: New thionitrites: synthesis, stability and nitric oxide generation. *J Org Chem* 1994; 59:7019-26
 98. Keefer LK, Williams DLH: Detection of nitric oxide via its derived nitrosation products. *Methods in Nitric Oxide Research* 1996; Feelisch, M. and Stamler, J.S., Wiley and Sons Ltd, New York:509-19
 99. Zhang YY, Xu AM, Nomen M, Walsh M, Keaney JF, Loscalzo J: Nitrosation of tryptophan residue(s) in serum albumin and model dipeptides. Biochemical characterization and bioactivity. *J Biol Chem* 1996; 271:14271-9
 100. Kröncke KD, Fehsel K, Schmidt T, Zenke FT, Dasting I, Wesener JR, Bettermann H, Breunig KD, Kolb-Bachofen V: Nitric oxide destroys zinc-sulfur clusters inducing zinc release from metallothionein and inhibition of the zinc finger type yeast transcription activator LAC9. *Biophys Biochem Res Commun* 1994; 200 (2):1105-10
 101. Berendji D, Kolb-Bachofen V, Meyer KL, Grapenthin O, Weber H, Wahn V, Kroncke KD: Nitric oxide mediates intracytoplasmatic and intranuclear zinc release. *FEBS Lett* 1997; 405 (1):37-41
 102. Berendji D, Kolb-Bachofen V, Zipfel PF, Skerka C, Carlberg C, Kroncke KD: Zinc finger transcription factors as molecular targets for nitric oxide-mediated immunosuppression: inhibition of IL-2 gene expression in murine lymphocytes. *Mol Med* 1999; 5 (11):721-730
 103. De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MAJ, Shin WS, Liao JK: Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 1995; 96 (1):60-8
 104. Kang JL, Lee K, Castranova V: Nitric oxide up-regulates DNA-binding activity of nuclear factor-kappaB in macrophages stimulated with silica and inflammatory stimulants. *Mol Cell Biochem* 2000; 215 (1-2):1-9
 105. Kilbourn RG, Traber DL, Szabo C: Nitric oxide and shock. *Dis Mon* 1997; 43 (5):277-348

106. Busse R, Mulsch A: Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 1990; 275 (1-2):87-90
107. Petros A, Bennett D, Vallance P: Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock. *Lancet* 1991; 338 (8782-8783):1557-8
108. MacMicking JD, Nathan C, Hom G, Chartrain N, Fletcher DS, Trumbauer M, Stevens K, Xie QW, Sokol K, Hutchinson N, al. e: Altered response to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Cell* 1995; 81 (4):641-50
109. Hickey MJ, Sharkey KA, Sihota EG, Reinhardt PH, Macmicking JD, Nathan C, Kubes P: Inducible nitric oxide synthase-deficient mice have enhanced leukocytes-endothelium interactions in endotoxemia. *FASEB J* 1997; 11 (12):955-64
110. Pfeilschifter J, Eberhardt W, Hummel R, Kunz D, Muhl H, Nitsch D, Pluss C, Walker G: Therapeutic strategies for the inhibition of inducible nitric oxide synthase-potential for a novel class of anti-inflammatory agents. *Cell Biol Int* 1996; 20:51-8
111. Hibbs JB, Jr., Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM: Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 157(1):87-94.
112. Kubes P, Suzuki M, Granger DN: Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88 (11):4651-5
113. Miller MJS, Clark DA: Nitric oxide synthase inhibition can initiate or prevent gut inflammation: role of enzyme source. *Agents Actions* 1994; 41:C231-C232
114. Billiar TR, Curran RD, Harbrecht BG, Stuehr DJ, Demetris AJ, Simmons RL: Modulation of nitrogen oxide synthesis in vivo: NG-monomethyl-L-arginine inhibits endotoxin-induced nitrate/nitrite biosynthesis while promoting hepatic damage. *J Leukoc Biol* 1990; 48(6):565-9.
115. Stichtenoth DO, Gutzki FM, Tsikas D, Selve N, Bode-Boger SM, Boger RH, Frolich JC: Increased urinary nitrate excretion in rats with adjuvant arthritis. *Ann Rheum Dis* 1994; 53(8):547-9.
116. St Clair EW, Wilkinson WE, Lang T, Sanders L, Misukonis MA, Gilkeson GS, Pisetsky DS, Granger DI, Weinberg JB: Increased expression of blood mononuclear cell nitric oxide synthase type 2 in rheumatoid arthritis patients. *J Exp Med* 1996; 184(3):1173-8.
117. Ralston SH, Todd D, Helfrich M, Benjamin N, Grabowski PS: Human osteoblast-like cells produce nitric oxide and express inducible nitric oxide synthase. *Endocrinology* 1994; 135(1):330-6.
118. McInnes IB, Leung BP, Field M, Wei XQ, Huang FP, Sturrock RD, Kinninmonth A, Weidner J, Mumford R, Liew FY: Production of nitric oxide in the synovial membrane of rheumatoid and osteoarthritis patients. *J Exp Med* 1996; 184(4):1519-24.
119. Worrall NK, Lazenby WD, Misko TP, Lin TS, Rodi CP, Manning PT, Tilton RG, Williamson JR, Ferguson TB, Jr.: Modulation of in vivo alloreactivity by inhibition of inducible nitric oxide synthase. *J Exp Med* 1995; 181(1):63-70.
120. Kolb H, Kiesel U, Kroncke KD, Kolb-Bachofen V: Suppression of low dose streptozotocin induced diabetes in mice by administration of a nitric oxide synthase inhibitor. *Life Sci* 1991; 49(25):L213-7
121. Cross AH, Misko TP, Lin RF, Hickey WF, Trotter JL, Tilton RG: Aminoguanidine, an inhibitor of inducible nitric oxide synthase, ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL mice. *J Clin Invest* 1994; 93(6):2684-90.
122. Ketteler M, Border WA, Noble NA: Cytokines and L-arginine in renal injury and repair. *Am J Physiol* 1994; 267(2 Pt 2):F197-207.

123. Ferrario R, Takahashi K, Fogo A, Badr KF, Munger KA: Consequences of acute nitric oxide synthesis inhibition in experimental glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol* 1994; 4(11):1847-54.
124. Rubbo H, Radi R, Trujillo M, Telleri R, Kalyanaraman B, Barnes S, Kirk M, Freeman BA: Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives. *J Biol Chem* 1994; 269 (42):26066-75
125. Brune B, Gotz C, Messmer UK, Sandau K, Hirvonen MR, Lapentina EG: Superoxide formation and macrophage resistance to nitric oxide-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 1997; 272 (11):7253-8
126. Brune B, Knethen Av, Sandau KB: Nitric oxide (NO): an effector of apoptosis. *Cell Death Differ* 1999; 6(10):969-75
127. Lipton SA: Neuronal protection and destruction by NO. *Cell Death Differ* 1999; 6 (10):943-51
128. Melino G, Catani MV, Corazzari M, Guerrieri P, Bernassola F: Nitric oxide can inhibit apoptosis or switch it into necrosis. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57 (4):612-22
129. Kim YM, Talanian RV, Billiar TR: Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanism. *J Biol Chem* 1997; 272 (49):31138-48
130. Li J, Billiar TR, Talanian RV, Kim YM: Nitric oxide reversibly inhibits seven members of the caspase family via S-nitrosylation. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 240 (2):419-24
131. Mannick JB: Nitric oxide inhibits Fas-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1997; 240:24125-8
132. Wilson MR: Apoptotic signal transduction: emerging pathways. *Biochem Cell Biol* 1998; 76 (4):573-82
133. Kim YH, Kim TH, Seol DW, Talanian RV, Billiar TR: Nitric oxide suppression of apoptosis occurs in association with an inhibition of Bcl-2 cleavage and cytochrome c release. 1998
134. Suschek C, Krischel V, Bruch-Gerharz D, Berendji D, Krutmann J, Kroncke KD, Kolb-Bachofen V: Nitric oxide fully protects against UVA-induced apoptosis in tight correlation with Bcl-2 up-regulation. *J Biol Chem* 1999; 274 (10):6130-7
135. Suschek C, Bribiva D, Bruch-Gerharz D, Sies H, Kroncke KD, Kolb-Bachofen V: Even after toxic insult by reactive oxygen species will nitric oxide protect endothelial cells from apoptosis or necrosis. *Cell Death Diff* 2001; in print
136. Bonmann E, Suschek C, Spranger M, Kolb-Bachofen V: The dominant role of exogenous and endogenous interleukin-1 beta on expression and activity of inducible nitric oxide synthase in rat microvascular brain endothelial cells. *Neurosci Lett* 1997; 230:109-112
137. Kausalya S, Nath J: Interactive role of nitric oxide and superoxide anion in neutrophil-mediated endothelial cell injury. *J Leuk Biol* 1998; 654:185-191
138. Suschek C, Rothe H, Fehsel, Enczmann J, Kolb-Bachofen V: Induction of a macrophage-like nitric oxide synthase in cultured rat aortic endothelial cells. IL-1 beta-mediated induction regulated by tumor necrosis factor-alpha and IFN-gamma. *J Immunol* 1993; 151 (6):3283-91
139. Bruch-Gerharz D, Fehsel K, Suschek C, Michel G, Ruzicka T, Kolb-Bachofen V: A proinflammatory activity of interleukin 8 in human skin: expression of the inducible nitric oxide synthase in psoriatic lesions and cultured keratinocytes. *J Exp Med* 1996; 184 (5):2007-12

140. Wang R, Ghahary A, Shen YJ, Scott PG, Tredget EE: Human dermal fibroblasts produce nitric oxide and express both constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms. *J Invest Dermatol* 1996; 106 (3):419-27
141. Hoffmann G, Schobersberger W, Rieder J, Smolny M, Seibel M, Furhapter C, Fritsch P, Sepp N: Human dermal microvascular endothelial cells express inducible nitric oxide synthase in vitro. 1999 1999; 112 (3):387-90
142. Morikawa A, Koide N, Kato Y, Sugiyama T, Chakravorty D, Yoshida T, Yokochi T: Augmentation of nitric oxide production by gamma interferone in a mouse vascular endothelial cell line and its modulation by tumor necrosis factor alpha and lipopolysaccharide. *Infect Immun* 2000; 68:6209-6214
143. Nathan C, Xie QW: Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 1994; 269:13725-8
144. Nathan C, Wie QW: Nitric oxide synthase: roles, tolls, and controls. *Cell* 1994; 78:915-918
145. Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH: Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Intern Med* 1994; 120:227-237
146. Dinarello CA: The role of the interleukin-1-receptor antagonist in blocking inflammation mediated by interleukin-1. *N Engl J Med* 2000; 343(10):732-734
147. Lorsbach RB, Murphy WJ, Lowenstein CJ, Snyder SH, Russel SW: Expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing. Molecular basis for the synergy between interferone-gamma and lipopolysaccharide. *J Biol Chem* 1993; 268:1908-13
148. Martin E, Nathan C, Xie QW: Role of interferone regulatory factor 1 in induction of nitric oxide synthase. *J Exp Med* 1994; 180:977-84
149. Kröncke KD, Suschek CV, Kolb-Bachofen V: Implications of inducible nitric oxide synthase expression and enzyme activity. *Antioxid Redox Signal* 2000; 2(3):585-605.
150. Kröncke KD, Fehsel K, Suschek C, Kolb-Bachofen V: Inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide in gene regulation, cell death and cell survival. *Int Immunopharmacol* 2001; 1(8):1407-20.
151. Ross R: Atherosclerosis-an inflammatory disease. *New Eng. J. Med.* 1999; 340:115
152. Wever RM, Luscher TF, Cosentino F, Rabelink TJ: Atherosclerosis and the two faces of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation* 1998; 97(1):108-12.
153. Buttery LD, Springall DR, Chester AH, Evans TJ, Standfield EN, Parums DV, Yacoub MH, Polak JM: Inducible nitric oxide synthase is present within human atherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxynitrite. *Lab Invest* 1996; 75(1):77-85.
154. Wilcox JN, Subramanian RR, Sundell CL, Tracey WR, Pollock JS, Harrison DG, Marsden PA: Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17(11):2479-88.
155. Luoma JS, Stralin P, Marklund SL, Hiltunen TP, Sarkioja T, Yla-Herttuala S: Expression of extracellular SOD and iNOS in macrophages and smooth muscle cells in human and rabbit atherosclerotic lesions: colocalization with epitopes characteristic of oxidized LDL and peroxynitrite-modified proteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18(2):157-67.
156. Beckman JS, Ye YZ, Anderson PG, Chen J, Accavitti MA, Tarpey MM, White CR: Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. *Biol. Chem. Hoppe Seyler* 1994; 375:81-5
157. Leewenburgh CM, Hardy M, Hazen SL, Wagner P, Oh-ishi S, Steinbrecher UP,

- Heinecke JW: Reactive nitrogen intermediates promote low density lipoprotein oxidation in human atherosclerotic intima. *J. Biol. Chem* 1997; 272:1433-8
158. Bloodsworth A, O'Donnell VB, Freeman BA: Nitric oxide regulation of free radical- and enzyme-mediated lipid and lipoprotein oxidation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20(7):1707-15.
 159. Hogg N: Free radicals in disease. *Semin Reprod Endocrinol* 1998; 16(4):241-8
 160. Lou H, Kodama T, Wang YN, Katz N, Ramwell P, Foegh ML: L-arginine prevents heart transplant arteriosclerosis by modulating the vascular cell proliferative response to insulin-like growth factor-I and interleukin-6. *J Heart Lung Transplant* 1996; 15(12):1248-57.
 161. Adams DH, Wyner LR, Karnovsky MJ: Experimental graft arteriosclerosis. II. Immunocytochemical analysis of lesion development. *Transplantation* 1993; 56(4):794-9.
 162. Russell ME, Wallace AF, Wyner LR, Newell JB, Karnovsky MJ: Upregulation and modulation of inducible nitric oxide synthase in rat cardiac allografts with chronic rejection and transplant arteriosclerosis. *Circulation* 1995; 92(3):457-64.
 163. Armstrong AT, Strauch AR, Kardan A, Starling RC: Morphometric and immunocytochemical analysis of coronary arterioles in human transplanted hearts. *J Heart Lung Transplant* 1996; 15(8):818-26.
 164. Durante W, Kroll MH, Christodoulides N, Peyton KJ, Schafer AI: Nitric oxide induces heme oxygenase-1 gene expression and carbon monoxide production in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1997; 80(4):557-64.
 165. Tudor RM, Flook BE, Voelkel NF: Increased gene expression for VEGF and the VEGF receptors KDR/Flk and Flt in lungs exposed to acute or to chronic hypoxia. Modulation of gene expression by nitric oxide. *J Clin Invest* 1995; 95(4):1798-807.
 166. Gavin TP, Spector DA, Wagner H, Breen EC, Wagner PD: Nitric oxide synthase inhibition attenuates the skeletal muscle VEGF mRNA response to exercise. *J Appl Physiol* 2000; 88(4):1192-8.
 167. Suschek CV, Krischel V, Bruch-Gerharz D, Berendji D, Krutmann J, Kroncke KD, Kolb-Bachofen V: Nitric oxide fully protects against UVA-induced apoptosis in tight correlation with Bcl-2 up-regulation. *J Biol Chem* 1999; 274(10):6130-7.

DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. V. Kolb-Bachofen für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Christoph Suschek, Seine Hilfe und Unterstützung haben entscheidend zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen.

Ich möchte mich bei PD Dr. Klaus-Dietrich Kröncke und Dr. Karin Fehsel für zahlreiche wissenschaftliche Anregungen bedanken.

Ulla Lamersen, Marjia Lenzen und Christa Wilkens danke ich für die freundliche Hilfe bei labor-technischen Arbeiten.

Ich danke meinen Eltern, die mich stets in allen meinen Entscheidungen unterstützt haben und Pierluigi Nicotera für Seine Hilfe in schwierigen Momenten.

CURRICULUM VITAE

Name, Vorname: **Vasa, Mariuca**
Geburtstag: 3. Juli 1971
Geburtsort: Bukarest, Rumänien
Adresse: Deutschordenstr. 54, 60528 Frankfurt/Main
Tel: 069/67738661

Schul- und Hochschulausbildung

09/77 – 06/89 Grundschole und Gymnasium, Bukarest, Rumänien
06/89 Abitur mit Schwerpunkten in Mathematik und Physik, Bukarest, Rumänien
09/90 – 07/92 Studium der Medizin an der Universität Carol Davila, Bukarest, Rumänien
04/93 – 03/94 Studium der Medizin an der Georg-August-Universität, Göttingen
04/94 – 09/94 Studium der Medizin an der Universität zu Köln
10/94 – 06/98 Studium der Medizin an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
06/98 Abschluss des Medizinstudiums an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf mit der Gesamtnote: Gut

Berufliche Tätigkeiten

12/98 – 01/2000 Ärztin im Praktikum am Hegau-Klinikum, Singen, akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Freiburg
02/00 – 06/00 Ärztin im Praktikum am Universitätsklinikum Frankfurt/Main
06/00 Approbation als Ärztin
06/00 – heute Wissenschaftliche Mitarbeiterin (Assistenzärztin) in der Abteilung für Innere Medizin, Kardiologie, Universitätsklinikum Frankfurt/Main

ZUSAMMENFASSUNG

Bei inflammatorischen Prozessen sind Endothelzellen primär involviert, da eine Funktionsänderung von Endothelzellen zu den Initialschritten der Entzündungsreaktion gehört. Wichtige Modulatoren der Endothelzellfunktionen sind Zytokine, und ein herausragender Effekt von proinflammatorischen Zytokinen ist die Induktion der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS) und die dadurch bedingte langandauernde Produktion und Freisetzung relativ großer Mengen des Stickstoffmonoxidradikals (NO). Dieses kleine Molekül kann aufgrund seiner großen Bandbreite an möglichen Reaktionen die initiiierenden Ereignisse der Entzündungsreaktionen sowohl positiv als auch negativ beeinflussen.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, für Endothelzellen der Maus Aktivierungsbedingungen im Sinne einer iNOS-Induktion zu erarbeiten sowie zu überprüfen, ob und welche induzierbaren endogenen Parameter notwendige Voraussetzungen für eine iNOS-Induktion darstellen.

Es wurden erstmals Primärkulturen von makrovaskulären Aortaendothelien der Maus etabliert und mit diesen Aktivierungsversuche mit den drei wichtigsten proinflammatorischen Zytokinen Interleukin-1 beta (IL-1 β), Tumor Nekrose Faktor-alpha (TNF- α) und Interferon-gamma (IFN- γ) durchgeführt, wobei der Parameter dieser Aktivierung die mRNA-Expression sowie Enzymaktivität der iNOS war. Frühere Arbeiten der Arbeitsgruppe mit Ratten-Endothelzellen lieferten Hinweise darauf, daß die durch eine exogene Gabe von proinflammatorischen Zytokinen induzierte iNOS-Expression eng mit der endogenen Produktion des Zytokins IL-1 β korreliert. Um die Rolle des IL-1 β für die iNOS Expression in Maus-Endothelzellen zu klären, haben wir die endogene endotheliale Expression der Zytokine IL-1 β sowie des Interleukin-1 β -Konversionsenzym (ICE) mit der Zytokin-induzierten iNOS-Expression bzw. -Aktivität korreliert.

Es zeigte sich, daß - anders als in Ratten-Endothelzellen - in Mauszellen dem Zytokin IFN- γ eine entscheidende Rolle bei der Expression und Aktivität der endothelialen iNOS zukommt. Als Einzelstimulus war nur das IFN- γ in der Lage, die iNOS-mRNA-Expression und iNOS-Aktivität in den Endothelzellen zu induzieren. IL-1 β und TNF- α bewirkten lediglich in Kombination miteinander oder mit IFN- γ eine iNOS-Induktion. Auf mRNA-Ebene zeigte sich eine deutliche Korrelation zwischen der Induktion der iNOS und einer endogenen IL-1 β -Produktion. Über diese reine Korrelation hinaus könnte ein für die iNOS-Induktion relevanter auto- oder parakriner IL-1 β -Weg aufgezeigt werden, bei dem durch die Endothelzellen selbst sowohl IL-1 β als auch das für die Produktion des bioaktiven Zytokins notwendige Enzym ICE synthetisiert werden müssen. Es zeigt sich, daß eine iNOS-Expression nur erreicht werden kann, wenn die endogene Synthese von bioaktiven IL-1 β gewährleistet war, wenn also sowohl IL-1 β als auch ICE exprimiert wurden.

Die Modulation der Interleukin-1 β - bzw. Interleukin-1 β -Konversionsenzym-abhängigen endothelialen iNOS-Expression könnte eine mögliche, zukünftige therapeutische Interventionsstrategie bei Entzündungsreaktionen darstellen.

