

Aus der Forschungsgruppe Immunbiologie im Institut für molekulare Medizin
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: **Prof. Dr. rer. nat. V. Kolb-Bachofen**

ZUR ROLLE DER INDUZIERBAREN STICKSTOFFMONOXID-SYNTHASE BEIM
ZELLTOD DURCH UVA IN MAUS-ENDOTHELZELLEN

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Roswitha Voß

2004

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

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab
Dekan

Referentin: Prof. Dr. Kolb-Bachofen

Korreferent: PD Dr. rer. nat. Klotz

INHALTSANGABE

1	EINLEITUNG	1
1.1	Ziele der Arbeit	1
1.2	Stickstoffmonoxid	1
1.3	Stickstoffmonoxid-Synthasen	3
1.4	Funktion der NO-Synthasen in der Haut	4
1.5	Apoptose / Nekrose	5
1.6	Regulation der Apoptose	7
1.7	Endothel	11
1.8	Endothel und NO	12
1.9	UVA	13
1.10	Reaktive Sauerstoffspezies	14
2	MATERIAL UND METHODEN	16
2.1	Material	16
2.2	Methoden	21
3	ERGEBNISSE	39
3.1	Isolierung und Aufzucht von Endothelzellen aus der Aorta der Maus	39
3.2	Phänotyp-Charakterisierung von Aortaendothelzell-Kulturen der Maus	40
3.3	Einfluß der Zytokine auf die Expression und Aktivierung der induzierbaren NO-Synthase	42
3.4	Toxizität von DETA-NO auf iNOS knock-out und Wildtyp-Endothelzellen	48
3.5	Bestrahlung mit UVA ₁	50
3.6	Beschreibung des UVA ₁ -induzierten Zelltodes der iNOS knock-out und Wildtyp-Endothelzellen mittels Bestimmung von morphologischen Veränderungen	65
3.7	DNA-Strangbrüche als Parameter der Apoptose	69
3.8	Einfluß von Neutralisatoren der Reaktiven Sauerstoffspezies auf die Zellmorphologie und Membranpermeabilität von Wildtyp-Endothelzellen nach Einwirkung von UVA ₁ oder H ₂ O ₂	73
4	DISKUSSION	78
4.1	iNOS-Expression und NO-Produktion in Maus-Endothelzellen	79
4.2	Der Einfluß von iNOS-generiertem NO auf die Haut	81
4.3	Charakterisierung des Zelltodes der Endothelzellen nach UVA-Exposition und nach Inkubation mit NO	84
4.4	ROS als Vermittler des UVA-induzierten Zelltodes	88
4.5	NO als Inhibitor der Lipidperoxidation	90
4.6	Ausblick: Therapeutische Anwendung von NO-Präparaten	91
5	ZUSAMMENFASSUNG	93
6	ABKÜRZUNGEN	96
7	DANKSAGUNG	99
8	LITERATUR	100

1 EINLEITUNG

1.1 ZIELE DER ARBEIT

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Rolle der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) und den Einfluß von Stickstoffmonoxid (NO) auf den UVA-induzierten endothelialen Zelltod zu untersuchen. Basis der Untersuchung war der Befund, dass endogen synthetisiertes NO in Rattenendothelzellen einen potenten Schutz vor UVA-induzierter Apoptose darstellt (1).

Hier sollten Aortenendothelzellen aus iNOS defizienten knock-out und Wildtyp-Mäusen isoliert und in Kultur genommen werden. Mit immunzytochemischen Methoden sollten die Zellkulturen als Endothelzellen identifiziert werden. Über die Amplifikation der iNOS-mRNA in der Reversen Transkription-Polymerase Ketten Reaktion (RT-PCR) als Mass der Expression sowie die Bestimmung der Nitritmenge im Kulturüberstand als Mass der Enzymaktivität der iNOS sollte der Einfluss einer Zytokinstimulation in beiden Endothelzellpopulationen charakterisiert werden. Die erste Zielsetzung war, ein Maximum an NO-Produktion zu generieren, daher sollte der Einfluß verschiedener Faktoren (LPS, L-Arginin, NO-Konzentration) auf die Aktivität der iNOS untersucht werden.

Im Mittelpunkt der Arbeit standen Ausführungen über die Empfindlichkeit beider Endothelzellkulturen gegenüber der zytotoxischen Wirkung von UVA₁ und die Modifikation dieser Sensibilität durch exogen zugeführtes oder endogen generiertes NO. Das Ausmaß sowie der Modus des UVA-induzierten Zelltodes sollte mit Hilfe verschiedener Vital- und Fluoreszenzfarbstoffe weiter charakterisiert werden.

1.2 STICKSTOFFMONOXID

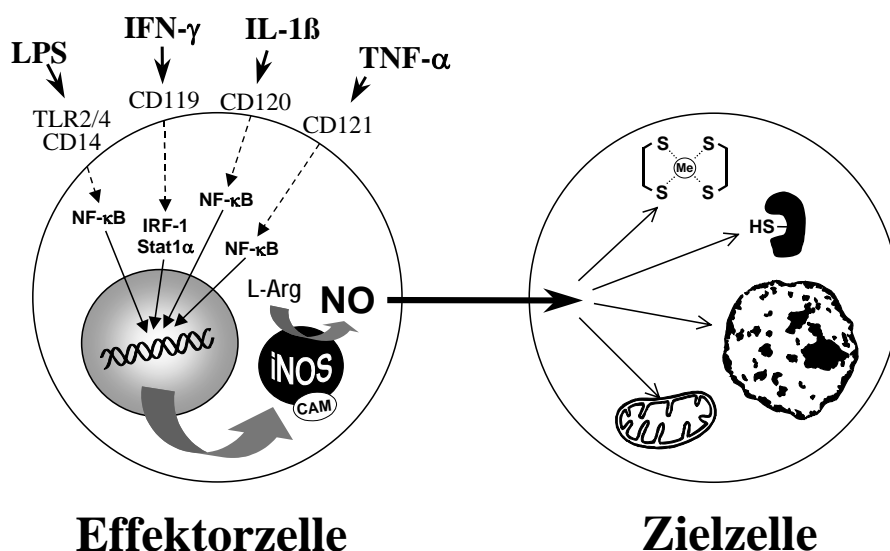
Das gasförmige freie Radikal Stickstoffmonoxid ist ein ubiquitäres biologisches Signalmolekül mit physiologischen und pathophysiologischen Eigenschaften. NO kann darüber hinaus auch ein wirksames zelluläres Toxin darstellen und somit einerseits in seiner Funktion als Effektormolekül der unspezifischen Immunantwort den Organismus vor eindringenden pathogenen Keimen (2) und Tumorzellen (3) schützen, andererseits aber auch zur Zerstörung von körpereigenen Zellen und Geweben (4) beitragen. Die Lebensdauer von NO in biologischen Systemen beträgt je nach Konzentration mehrere Sekunden bis Minuten (5), wobei es mit Sauerstoff sowohl in vivo als auch in vitro hauptsächlich über Distickstofftrioxid zu Nitrit und Nitrat reagiert (6). Die jeweilige spezifische Wirkung von NO hängt einerseits von den beteiligten Zellen und Zellsystemen, andererseits aber auch von der lokalen Konzentration an NO, der gleichzeitigen Bildung von Reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS) und der Zeitdauer der NO-Bildung ab, die durch die unterschiedlichen Isoformen der NO-Synthase vermittelt wird: Die kurzdauernde repetitive NO-Synthase durch die konstitutiv exprimierte endotheliale (eNOS) oder neuronale NO-Synthase (nNOS) vermittelt kurzfristige Reaktionen, wie z.B. die Vasorelaxation und Neurotransmission (7). Im Rahmen dieser zellulären Signalübertragung diffundiert NO in die Nachbarzelle, aktiviert dort die lösliche Guanylat-Zyklase und bewirkt so eine

Erhöhung der cGMP-Konzentration als second messenger (8). Die induzierbare Isoform der NO-Synthase (iNOS) hingegen synthetisiert große Mengen an NO über einen vergleichsweise langen Zeitraum hinweg und wirkt als Regulator und Effektor im Rahmen entzündlicher und autoimmuner Prozesse (9-11).

NO reagiert sowohl mit Nukleinsäuren als auch mit Proteinen. Dies kann unter anderem in sensitiven Zielzellen zu NO-bedingten DNA-Desaminierungen und DNA-Strangbrüchen (12) führen sowie zur Nitrosylierung von Thiolgruppen verschiedener zytosolischer oder membrangebundener Proteine, wie z.B. K⁺-Kanäle, G-Proteine, Transkriptionsfaktoren oder Enzyme. Daraus resultiert eine Modifikation von Enzymaktivitäten (13) oder eine indirekte NO-vermittelte Veränderung der Expression verschiedener Gene (14).

Die vielfältigen biologischen Funktionen von NO werden durch die Kombination zweier bedeutender Eigenschaften ermöglicht: Zum einen geht NO – anders als praktisch jeder andere Botenstoff – chemische (kovalente) Bindungen mit seinem Rezeptormolekül ein, zum anderen wird seine Verbreitung durch die physikalischen Gesetze der freien Diffusion bestimmt (15), wobei Zellmembranen für NO als hydrophobes Molekül kein Diffusionshindernis darstellen. Desweiteren führt die Vielfalt an Funktionen zu der Vermutung, daß die verschiedenen Effekte von NO vielmehr durch verwandte Moleküle hervorgerufen werden.

Insbesondere hohe NO-Konzentrationen können durch Schädigung der DNA und Störung des Energiestoffwechsels, der Kalzium-Homöostase und der mitochondrialen Funktion in Abhängigkeit von der Schwere der zellulären Dysfunktion zum apoptotischen oder nekrotischen Zelltod führen (9, 16). Neuere Daten geben jedoch zunehmend Hinweise darauf, dass selbst hohe NO-Konzentrationen einen potenten Schutz vor Zellschäden, ausgelöst durch unterschiedliche Stimuli, darstellen und damit den apoptotischen oder nekrotischen Zelltod verhindern können. In Endothelzellen basiert dieser protective Mechanismus von NO nach oxidativer Zellschädigung auf einer erhöhten Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 und einer Hemmung der Lipidperoxidation mit der Folge einer verbesserten Membranintegrität (17).



1.3 STICKSTOFFMONOXID-SYNTASEN

Stickstoffmonoxid-Synthasen (NO-Synthasen) katalysieren die Bildung von NO in Anwesenheit von molekularem Sauerstoff mittels einer 5-Elektronen-Oxidation aus der Aminosäure L-Arginin, wobei als Nebenprodukt Citrullin entsteht. Bis heute konnten drei unterschiedliche Isoformen der NO-Synthase identifiziert werden, welche in verschiedenen subzellulären Kompartimenten vorliegen (18, 19) und deren Gene auf verschiedenen Chromosomen lokalisiert sind (20, 21).

Die beiden konstitutiv exprimierten Isoformen der NO-Synthase ließen sich erstmals in neuronalen Zellen (nNOS oder NOS-1) (22, 23) und in Endothelzellen (eNOS oder NOS-3) (24) nachweisen, jedoch findet man beide Enzyme auch in anderen Säugetierzellen (20). Die dritte Isoform wird typischerweise durch entzündliche und immunogene Stimuli wie z.B. durch die proinflammatorischen Zytokine Interferon- γ (IFN- γ), Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) und Interleukin-1 β (IL-1 β) (25) oder Bakterienbestandteile wie Lipopolysaccharid (LPS) induziert. Eine Hemmung der iNOS-Transkription erfolgt durch Glukokortikoide, Cyclophiline und Retinoide sowie durch die TH2-Zytokine TGF- β , IL-4 und IL-10 (26). Die induzierbare NO-Synthase (iNOS oder NOS-2) kann in vielen verschiedenen Zelltypen, wahrscheinlich in fast allen somatischen Zellen, induziert werden, wurde jedoch erstmals in aktivierten Makrophagen beschrieben (27).

NO-Synthasen sind Homodimere von 130 bis 160 kDa-großen Untereinheiten und enthalten in ihrem katalytischen Zentrum ein Cytochrom-P450-Hämoprotein (28). Alle NO-Synthasen benötigen NADPH, Flavin adenin dinucleotid (FAD), Flavin mononucleotid (FMN) und Tetrahydrobiopterin (BH₄) als essentielle Kofaktoren (29-31), sowie als weitere Voraussetzung für die Aktivierung die Bindung von Kalmodulin, die je nach Isotyp entweder Ca²⁺-abhängig (nNOS, eNOS) oder -unabhängig (iNOS) verläuft (23, 32). Die iNOS wird überwiegend transkriptionell reguliert, weshalb zu ihrer Aktivierung eine de-novo- mRNA- und Proteinsynthese erforderlich ist (32), während die Aktivitäts-Regulation der konstitutiven NO-Synthasen vornehmlich auf der posttrans-

Abbildung 1: *Induktion der iNOS und Interaktionen von iNOS-generiertem NO mit Zielmolekülen der Nachbarzelle: NO wird von der iNOS in das zelluläre Zytosol freigesetzt und beeinflusst in der Nachbarzelle Transport-Proteine, Ionenkanäle, das Plasma-Membranpotential und die mitochondriale Atmungskette, bindet kovalent an Metal-Schwefel-Verbindungen wie z.B. Zink-Finger in Proteinen, hemmt oder aktiviert Enzyme mit freien SH-Gruppen und führt zu DNA-Schäden und Aktivierung der Poly(ADP-ribose)polymerase im Zellkern sowie zur Veränderung der Genexpression.*

Abkürzungen: IRF-1: interferon regulatory factor 1, STAT1 α : signal transducer and activator of transcription, L-Arg: L-Arginin, CAM: Calmodulin; TLR2/4 und CD 14: LPS-Rezeptoren; CD 119, CD 120, CD 121: Zytokin-Rezeptoren.

Nach Kröncke et al. (38).

lationalen Ebene und somit meist unabhängig von neuer Proteinsynthese stattfindet. Anders als die konstitutive endotheliale NO-Synthase und die neuronale NOS, welche picomolare Mengen an NO produzieren, bildet die induzierbare NOS nanomolare NO-Mengen (11), wobei jedoch der Hauptunterschied zwischen der konstitutiven und der induzierbaren NO-Synthase vielmehr in dem Zeitraum, in dem sie aktiv sind, liegt (33). Die iNOS produziert NO über einen Zeitraum von Tagen solange die Zelle und das Protein funktionell intakt sind und in ausreichender Menge Substrat (L-Arginin) und Kofaktoren zu Verfügung stehen. In vitro können iNOS-exprimierende Zellen eine steady state Konzentration von bis zu 5 μ M NO für 24 Stunden oder länger aufrechterhalten (33).

Tabelle 1: Isoformen der NO-Synthase

	NOS-I	NOS-II	NOS-III	Literatur
Synonyme	Neuronale NO-Synthase (nNOS)	Induzierbare NO-Synthase (iNOS)	Endotheliale NO-Synthase (eNOS)	
Chromosom (Mensch)	12	17	7	(21, 34)
Expression	konstitutiv	induzierbar	konstitutiv	
erstmaliger Nachweis	Cerebellum	stimulierte Makrophagen	Endothelzellen	
Lokalisation	Membran assoziiert >> Zytoplasma	Zytoplasma	Zytoplasma >> Membran assoziiert	(35-37)
Ca ⁺⁺ -Abhängigkeit	Ja	nein	ja	(32)
Molekulargewicht (kDa)	150-160	131	ca. 135	
Kofaktoren	NADPH; FAD; FMN; Tetrahydrobiopterin;			(29-31)
NO-Freisetzung	picomolare Konzentrationen	nanomolare Konzentrationen	picomolare Konzentrationen	(11)
Dauer der NO-Freisetzung	Sekunden - Minuten	Stunden - Tage	Sekunden - Minuten	

1.4 FUNKTION DER NO-SYNTHASSEN IN DER HAUT

Alle NOS-Isoformen können in der menschlichen Haut nachgewiesen werden (39, 40). Die regulatorischen und homöostatischen Funktionen von NO in der Haut betreffen den kutanen Blutfluß (41), die Melanogenese nach ultravioletter Strahlung (42) sowie den Schutz vor eindringenden pathogenen Mikroorganismen (43) und Tumorzellen (44). Durch seinen Einfluß auf die Proliferation und Differenzierung von Keratinozyten und Fibroblasten (45)(46) kommt NO in der Wundheilung eine besondere Bedeutung zu (47). NO werden auch immuno-

dulatorische Funktionen wie z.B. die Regulation der T-Zell-medierten Immunantwort zugesprochen (48). Ein Hinweis darauf ergibt sich durch die Beobachtung, daß iNOS-knock out Mäuse eine signifikant stärkere Th 1-Immunantwort entwickeln als ihre wildtyp Verwandten (49). Aus diesem und weiteren Befunden kann man schließen, dass die iNOS-Aktivität für die Regulation der Entzündungsreaktion essentiell ist.

Die induzierbare NO-Synthase wird während einer Vielzahl menschlicher Hauterkrankungen exprimiert, so beispielsweise in der Haut von Patienten mit Psoriasis (50-52), Lupus erythematosus (53) oder Lepra (54). Dabei steht nicht immer fest, ob die iNOS-Expression als regulatorische Antwort auf pathogenetisch relevante Faktoren zu verstehen ist oder selbst am pathogenetischen Prozess beteiligt ist. Von großer Bedeutung ist die Funktion von NO in der Tumorentstehung. NO könnte über eine gesteigerte Angiogenese und die Entstehung von DNA-Mutationen das Tumorstadium begünstigen (55). Beim Spinozellulären Karzinom konnte eine erhöhte Expression der iNOS nachgewiesen werden (56). Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass eine erhöhte iNOS-Expression die Metastasierung des murinen Melanoms verhindert (57).

UVA-Bestrahlung führt in der Haut zur Expression der iNOS in Keratinozyten (53) und vaskulärem Endothel (58). Dies kann als entzündliche Reaktion auf den UVA-Reiz verstanden werden und entsprechend der zytotoxischen Wirkungskomponente von NO zu UV-induzierten Hautschäden führen. Im Gegensatz dazu konnte jedoch gezeigt werden, daß die Aktivierung der iNOS oder 24 Stunden vor dem UVA-Stimulus exogen appliziertes NO Endothelzellen vor UVA-induzierter Apoptose schützt (59). Diese schützende Wirkung ist eng korreliert mit dem NO-vermittelten Anstieg der Bcl-2 mRNA und Protein Expression und geht mit einer Hemmung der UVA-induzierten Bax-Expression einher. In anderen Studien wiederum wird postuliert, daß eine durch ein gesteigertes Substratangebot erhöhte Aktivität der NO-Synthase in Keratinozyten die zerstörerischen Auswirkungen von UVA (DNA-Schäden sowie Zytotoxizität) verstärkt, wobei dem Verhältnis der NO-Radikale zu O₂-Radikalen (O₂⁻) eine entscheidende Bedeutung zugesprochen wird (60).

1.5 APOPTOSE / NEKROSE

In einem aktiv proliferierenden Gewebe wie der Epidermis wird die Zellzahl durch die Balance zwischen Proliferation, Wachstumsstillstand, Differenzierung und schließlich durch den geregelten Zelltod eng kontrolliert (61). Insbesondere der postulierte Zusammenhang zwischen dem apoptotischen Zelltod und der Karzinomentstehung in der Haut (62, 63) erklärt das hohe Interesse an den Vorgängen des geregelten Zelltodes.

Man unterscheidet grundsätzlich zwei Arten von Zelltod: den programmierten Zelltod, auch Apoptose genannt, und den lytischen Zelltod, die Nekrose (Abb. 2).

Bei der Apoptose handelt es sich um einen physiologischen Prozeß: auf bestimmte Signale hin oder auch nach einer Zell- oder DNA-Schädigung (z.B. durch UV-Strahlung) begeht die Zelle aktiv Selbstmord. Im Zytosol werden

Proteasen aktiviert und die DNA wird zu einem frühen Zeitpunkt in Oligonukleotide mit etwa 200 Basenpaaren zerlegt, was in der Agarosegelelektrophorese zu der Bildung einer sog. DNA-Leiter führt (64). Die einzelnen Zellorganellen, insbesondere die Mitochondrien, und auch die Membranen bleiben intakt (64, 65). Im Zellkern kondensiert das Chromatin (Pyknose) und bildet in dieser frühen Phase der Apoptose einen gleichmäßigen Rand entlang der „nuclear envelope“. Dabei nimmt das Chromatin eine Halbmond- oder kugelige Form an und schließlich fragmentiert der Kern. Zum Schluß fragmentiert die Zelle zu kleinen, membranumhüllten sogenannten „apoptotic bodies“, die anschließend von Phagozyten oder auch von Nachbarzellen phagozytiert werden (65). Die Apoptose kann als Gegenspieler der Proliferation z.B. beim natürlichen Erneuerungsprozeß in Schleimhäuten angesehen werden und stellt einen bedeutenden Mechanismus zur Eliminierung von Zellen in der Morphogenese (66, 67), Immunologie (68) und Tumorbilogie dar.

Bei der Nekrose dagegen handelt es sich um einen „Unfalltod“: Eine Zelle wird meist durch ein direkt membranschädigendes Ereigniss so stark geschädigt, daß es zu einer unkontrollierten und raschen Lyse der betreffenden Zelle kommt. Dem lytischen Zelltod gehen, wenn er nicht ganz plötzlich einsetzt, adaptive Zellveränderungen voraus. Somit kann die Nekrose in eine reversible und irreversible Phase unterteilt werden. Die reversible Phase der letalen Zellschädigung ist durch eine Schwellung und Membranschädigung der Mitochondrien und des endoplasmatischen Retikulums charakterisiert. Später erfolgt eine Lysosomenschädigung. In der irreversiblen Phase laufen die verschiedenen Stoffwechselvorgänge immer unvollständiger und unkoordinierter ab, und die Zelle bildet die typische Morphologie der Nekrose aus: Es kommt zu einem Anschwellen der Zelle und zur Ruptur der Lysosomen mit nachfolgender Freisetzung hydrolytischer Enzyme, die die intrazellulären Organellen einschließlich der Mitochondrien sowie die Plasmamembran zerstören (69). Während der Nekrose schwillt der Zellkern an, die genomische DNA verklumpt und wird schließlich so degradiert, daß sie als ein Schmierfleck („smear“) in der Agaroseelektrophorese erscheint (70). Durch die Zerstörung der Plasmamembran und die Aktivierung von Zellen des Immunsystems durch den unkontrollierten Kontakt mit dem freiwerdenden Zellinhalt kommt es zum Auftreten von Entzündungen.

Die Art des Zelltodes hat somit schwerwiegende Konsequenzen, da die Nekrose eine Entzündungsreaktion und Aktivierung des Immunsystems hervorrufen kann, während die Apoptose eben dieses vermeidet (65).

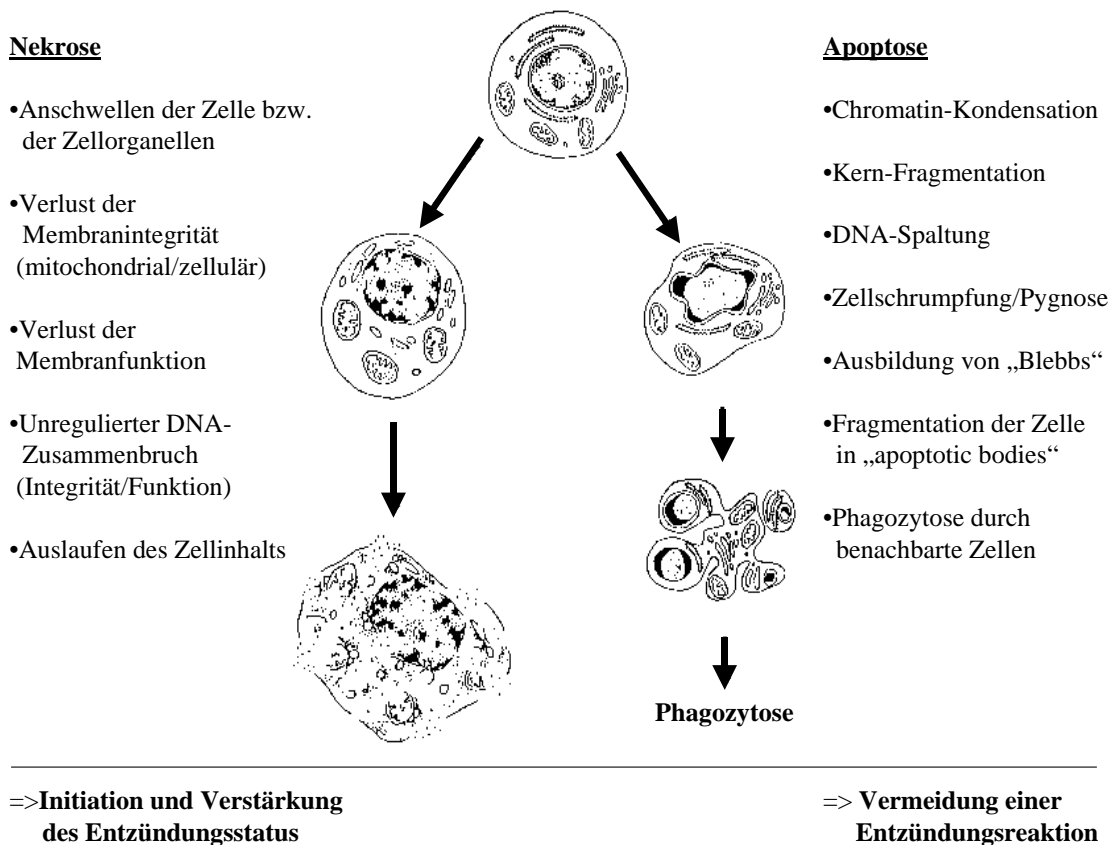


Abbildung 2: *Morphologische und strukturelle Veränderungen während der Apoptose und Nekrose im Vergleich. Zeichnung nach Kerr et al, (71).*

1.6 REGULATION DER APOPTOSE

Die Apoptose wird gesteuert durch Cystein Proteasen, die sogenannten Caspasen (72) (Abb. 3). Diese werden entsprechend ihrer Funktion in Initiatoren oder Effektoren der Apoptose eingeteilt. Die „Initiator-Caspasen“ werden als Antwort auf ein Stress-Signal hin proteolytisch aktiviert und bewirken ihrerseits die proteolytische Aktivierung der „stromabwärts“ gelegenen „Effektor-Caspasen“, welche an der Degradierung verschiedener Substrate beteiligt sind (73). Apoptose kann durch unterschiedliche Initialisierungsereignisse ausgelöst werden, z.B. durch die Freisetzung von Cytochrom c (Cyt c) aus den Mitochondrien als Folge einer Störung der mitochondrialen Funktionen (74). Das zytosolische Cytochrom c bildet einen essentiellen Teil des sog. „Apoptosoms“, welches sich aus Cyt c, Apaf-1 (apoptosis protease-activating factor 1) und Caspase 9 zusammensetzt und in einem ATP- oder dATP-abhängigen Prozeß Caspase 9 und über diese vor allem Caspase 3, Caspase 5 und andere aktiviert (75).

Die Apoptose unterliegt einem Regulationsprozeß von pro- und antiapoptotischen Faktoren. Hierzu zählen insbesondere Proteine der Bcl-2 Familie, die sich aus proapoptotischen (Bax, Bad, Bak u.a.) und aus antiapoptotischen Faktoren, wie das Bcl-2 selbst, zusammensetzt (76, 77). Durch Integration mit der mitochondrialen Membran steuern sie über noch ungeklärte Mechanismen, möglicherweise durch die Bildung von Ionen-Kanälen und Komplex-Bildung mit an-

deren Proteinen, die Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien (78-80).

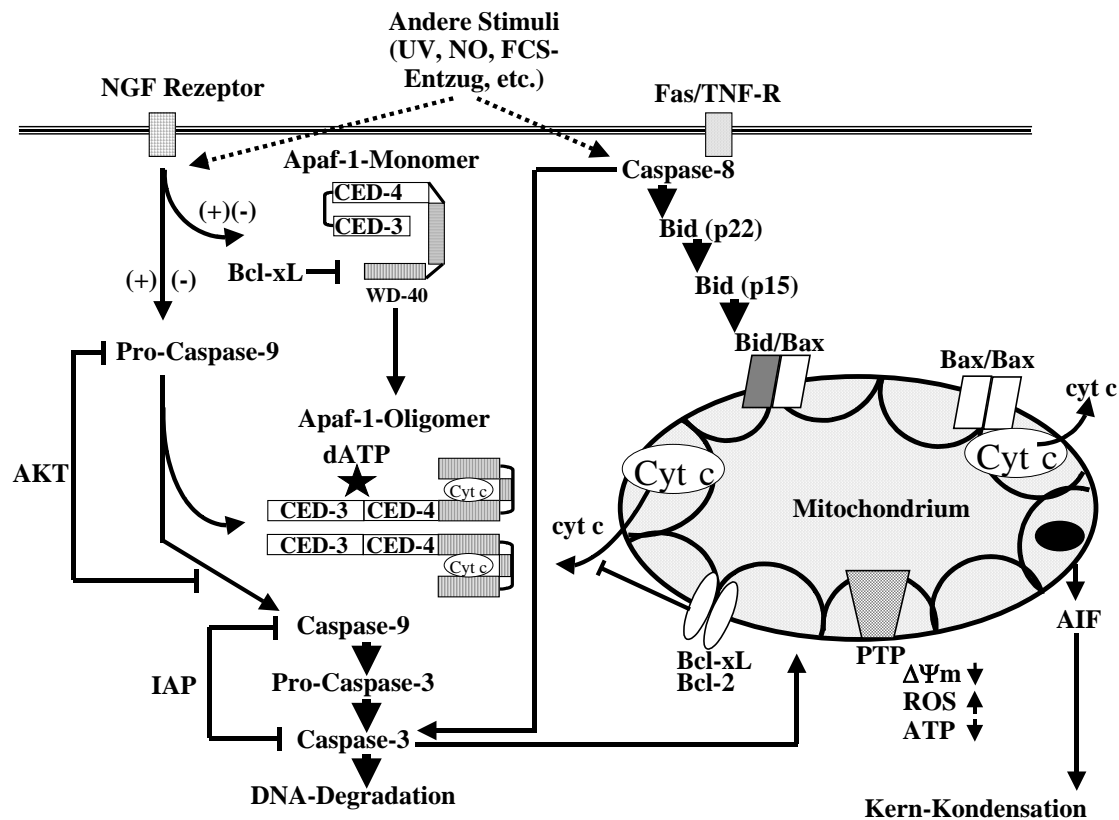


Abbildung 3: Schematische Darstellung der verschiedenen Apoptose-Wege.

Als mögliche Auslösemechanismen des Apoptose-Vorgangs spielen verschiedene Todes-Rezeptoren wie der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor (TNF-R) als auch mitochondriale Veränderungen eine bedeutsame Rolle. Beide Signalwege können sich gegenseitig z.B. durch Aktivierung von Caspase-3 beeinflussen aber auch unabhängig voneinander agieren (81, 82).

Abkürzungen: AIF: apoptosis inducing factor, $\Delta\Psi_m$: inneres Membranpotential, PTP: permeability transition pore, AKT: protektiv wirkende Kinase, IAPs: Apoptose-inhibierende Proteinfamilie.

1.6.1 REGULATION DER APOPTOSE DURCH NO

Stickstoffmonoxid (NO) besitzt die Fähigkeit, an verschiedenen Punkten in das apoptotische Geschehen eingreifen zu können, z.B. durch Interaktion mit sog. Todes-Rezeptoren und ihren Liganden, insbesondere Fas (CD 95) bzw. FasL (83). Auch die Funktion als Radikal-Fänger (84) und die Induktion protektiver Proteine wie das Hitzeschockprotein Hsp 70 (85) zählen zum antiapoptotischen Wirkungsspektrum von NO. Neuere Untersuchungen haben einen p53-abhängigen NO-medierten Schutz vor UV-induzierter Apoptose nachgewiesen (86). Des weiteren hemmt NO die Apoptose durch Inhibition aktiver Caspasen

(87, 88) oder durch Hemmung ihrer Aktivierung (89). Die Aktivierung der Caspasen kann durch cGMP-abhängige Mechanismen (90), durch S-Nitrosylierung von vorgeschalteten Signal-Systemen (88) oder durch Inhibition mitochondrialer Komplexe (91, 92), die zu ATP-Verlusten führen, gehemmt werden. Dabei können sowohl NO-Mengen, die von den konstitutiven NO-Synthasen als auch solche, die von der induzierbaren NO-Synthase generiert werden, die Apoptose verhindern. So ist in Endothelzellen die konstitutive eNOS ausreichend, um TNF-induzierte Apoptose zu hemmen, während die Überproduktion der iNOS genauso effektiv die LPS-induzierte Apoptose supprimiert (93). Bemerkenswert ist, daß die protektive Funktion von NO weitgehend unabhängig von dem apoptotischen Stimulus zu sein scheint.

Auf der anderen Seite kann sowohl endogen generiertes als auch über NO-Donoren exogen hinzugefügtes NO in verschiedenen menschlichen und tierischen Zellen Apoptose auslösen (94, 95). Endogen generiertes NO von inflammatorischen Zellen scheint an der Entstehung der Toxischen Epidermalen Nekrolyse und dem Stevens-Johnson Syndrom beteiligt zu sein (96). Beide Krankheitsbilder sind histologisch durch Apoptose und Nekrose von Keratinozyten in der Epidermis gekennzeichnet (97).

Die Signalwege, über die NO den apoptotischen Zelltod vermittelt, sind weitgehend unbekannt. Die NO-induzierte Apoptose geht häufig einher mit dem Anstieg des Tumor Suppressor Gens p53, Veränderungen der Expression von pro- und antiapoptotischen Proteinen der Bcl-2-Familie, der Aktivierung von Caspase 3-ähnlichen Proteasen und Cytochrom c-Translokation (98) (Abb. 4).

Die Entscheidung, ob sich eine Zelle der Apoptose unterzieht, ist somit das Ergebnis einer Verschiebung in der Balance zwischen den antiapoptotischen und proapoptotischen Kräften in einer Zelle. Die bisher gesammelten Daten lassen vermuten, daß physiologisch relevante NO-Spiegel zu diesem Gleichgewicht beitragen, indem sie den apoptotischen Pfad an verschiedenen Stellen und durch unterschiedliche Mechanismen hemmen. Eine höhere NO-Produktionsrate überwindet in einigen Zelltypen die zellulären Schutzmechanismen und verschiebt die Balance zugunsten des apoptotischen Zelltodes.

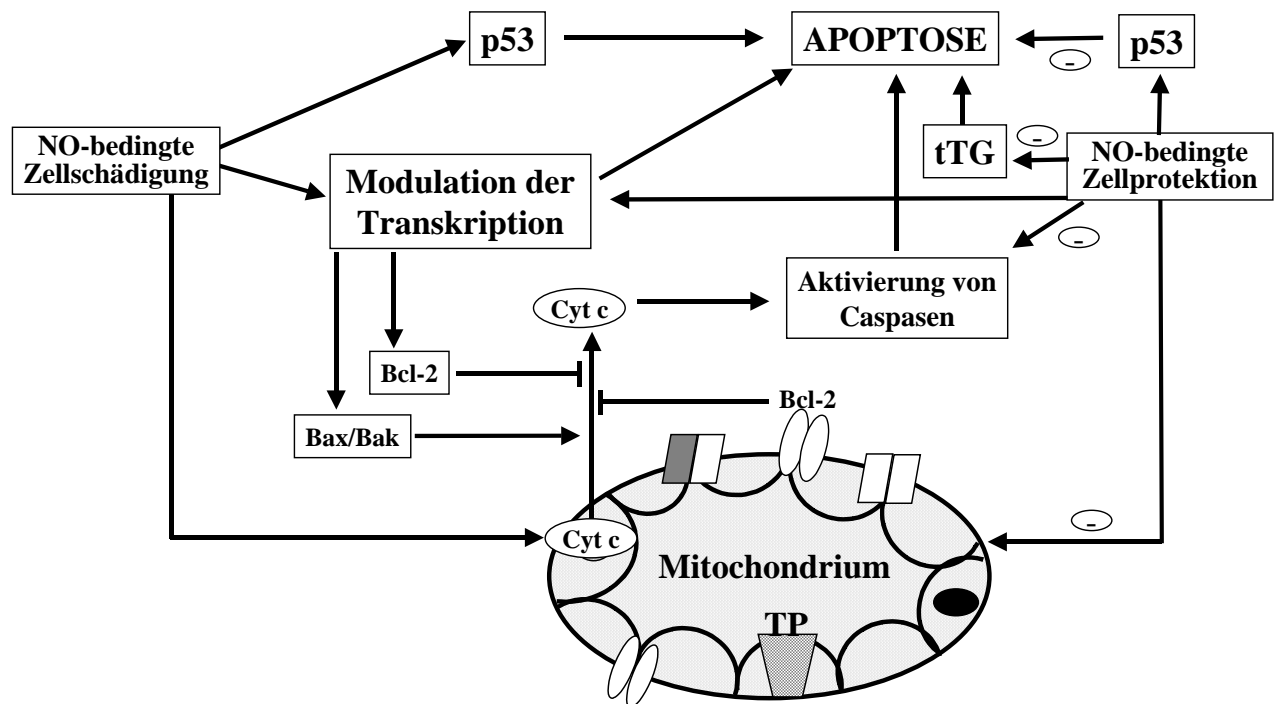


Abbildung 4: Regulation der Apoptose durch NO.

Stickstoffmonoxid (NO) kann über die Synthese pro- bzw. antiapoptotischer Proteine (Bax / Bak, Bcl-2) die mitochondriale Cytochrom c (Cyt c)-Freisetzung beeinflussen und damit durch die Aktivierung von Caspasen den Apoptose-Mechanismus in Gang setzen. Das Tumor-Suppressor-Gen p53, auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet, kann bei schwersten DNA-Schäden ebenfalls zur Apoptose führen.

NO hemmt apoptotische Moleküle einschließlich Initiator- und Effektor-Caspasen und transkriptionale Faktoren wie AP-1 und NF- κ B oder inhibiert direkt die mitochondriale Atmungskette (99).

1.6.2 ÜBERGÄNGE VON APOPTOSE UND NEKROSE

Lange Zeit wurden der apoptotische und der nekrotische Zelltod als unvereinbare Gegensätze angesehen. Viele Signalwege wie die Todes-Rezeptoren, die Kinase Kaskade und die Mitochondrien sind jedoch am Ablauf beider Zelltod-Prozesse beteiligt. Antiapoptotische Mechanismen (z.B. Bcl-2 / Bcl-x Proteine, Hitzeschockproteine) können gleichermassen effektiv vor beiden Formen des Zelltodes schützen. Durch Modulation der Zelltod-Signalwege wie z.B. durch die pharmakologische Intervention mit Caspase-Inhibitoren (100) oder die Reduktion von intrazellulärem ATP (101, 102) sind Übergänge zwischen Apoptose und Nekrose möglich.

Die endogenen Faktoren, welche unter pathophysiologischen Bedingungen für den Übergang von Apoptose zu Nekrose entscheidend sind, sind weitgehend unbekannt. Ein möglicher Kandidat ist NO, von dem bekannt ist, daß es die Apoptose in vielen experimentellen Versuchskonstellationen verhindern kann (90, 103-105). Auch hier wird spekuliert, ob die Hemmung der Apoptose durch

NO in einigen Zelltypen nur von kurzzeitiger Dauer ist (87) und letztendlich in Nekrose mündet (106).

So konnte gezeigt werden, daß NO die Apoptose von Jurkat Zellen, hervorgerufen durch Staurosporine, anti-CD95 oder Chemotherapeutika, blockiert und in Nekrose umwandelt (107). Der Wechsel zwischen den Zelltodformen ist abhängig von einem durch NO hervorgerufenen Verlust an ATP. Neben der Verfügbarkeit von ATP könnte auch die S-Nitrosylierung und die damit verbundene Inaktivierung von regulatorischen Faktoren des Apoptoseprogramms die Balance zwischen Apoptose und Nekrose beeinflussen.

Entscheidend für die Modulation des Zelltodes durch NO ist möglicherweise der Angriffspunkt innerhalb der apoptotischen Kaskade. Es ist bekannt, dass NO unterschiedliche Schritte des Apoptosevorgangs vor und nach der Freisetzung von Cytochrom c beeinflussen kann. Die Inaktivierung des Apoptosevorganges vor einem „point of no return“ führt zum Weiterleben der betroffenen Zelle. Die Blockade unterhalb eines „point of no return“ würde dagegen den apoptotischen Zelltod in Nekrose umwandeln, wobei ein solcher „point of no return“ jedoch noch nicht genau definiert werden konnte.

1.7 ENDOTHEL

Das Endothel kleidet in Form eines einschichtigen Epithels von weniger als 300 nm Dicke (108) Blut- und Lymphgefäße aus und bedeckt dabei beim Menschen eine Fläche von ca. 7000 m². Es besitzt damit eine einzigartige Position an der Grenzfläche zwischen zirkulierendem Blut und umgebenden Gewebe. Dort beeinflusst es eine Vielzahl lebenswichtiger Funktionen einschließlich der Regulation der Blutgerinnung und des Gefäßtonus (109). Darüber hinaus spielen Endothelzellen eine wichtige Rolle als Initiatoren, Modulatoren und Effektoren von Entzündungsprozessen. Das Endothel kontrolliert über seine Barrierefunktion neben dem passiven und aktiven Transport auf molekularer Ebene auch die Adhäsion immunkompetenter Zellen und ihre Invasion in das umliegende Gewebe (110). Dieser Invasionsvorgang wird durch verschiedene Mediatoren ermöglicht, zu denen Zytokine, das aktivierte Komplementsystem, von Bakterien freigesetzte chemotaktische Peptide (111) und Endotoxine (112) zählen. Das Endothel reagiert auf diese Reize unter anderem mit der Expression spezifischer Adhäsionsmoleküle, welche mittels komplementärer Erkennungsstrukturen die Adhäsion, Aktivierung und Migration der Lymphozyten und Monozyten steuern (113-115). Die Beteiligung des Endothels an immunologischen und immunregulatorischen Prozessen findet des weiteren in Form der Expression von MHC-Klasse-II-Antigenen und der Antigenpräsentation (116, 117) und auch durch direkte Effektorwirkung bei der Tumorerkennung und der Tumorbabwehr (118, 119) statt.

Morphologisch unterscheidet man kontinuierliche, diskontinuierliche und fenestrierte Typen des Endothels. Lückenloses, kontinuierliches Endothel findet sich vor allem in großen Gefäßen wie der Aorta, aber auch an den Wänden kleiner und kleinster Gefäße wie beispielweise in der Retina. Fenestriertes Endothel bedeckt luminal die Gefäße in endokrinen Organen und im Gastroin-

testinaltrakt (120). Zwischen den Endothelzellen befinden sich hier in regelmäßigen Abständen runde Öffnungen mit einem Durchmesser von 60-80 nm, welche mit einem dünnen Diaphragma verschlossen sind. Das Vorkommen von diskontinuierlichem Endothel ist auf die Gefäße der Milz, Leber und des Knochenmarks beschränkt (121).

Das Endothel ist kein homogener Zellverband, sondern zeigt je nach Lokalisation und der daraus resultierenden unterschiedlichen Funktion und Spezialisierung in vitro als auch in vivo große Heterogenität bezüglich der Morphologie, des Wachstums, des Phänotyps, der Zytokinexpression, der Zytokin-Antwort und der Expression von Adhäsionsmolekülen. Diese Heterogenität besteht nicht nur zwischen Endothelzellen aus unterschiedlichen Geweben oder Organen, sondern auch innerhalb eines Organs zwischen dem Endothel der Makro- und Mikrogefäße (122, 123).

Endothelzellen können dramatisch durch Veränderungen in ihrer mechanischen, chemischen oder humoralen Umwelt beeinflusst werden und damit zur Ausbildung von kapillären Lecks, zellulärer Dysfunktion und schließlich zum Organversagen beitragen (124, 125). Die Integrität der endothelialen Zellschicht ist entscheidend für die Aufrechterhaltung ihrer Funktionen. Der programmierte oder akzidentelle Tod von Endothelzellen kann diese Integrität auf kritische Weise beeinträchtigen und darüber das Auftreten proinflammatorischer Ereignisse begünstigen.

1.8 ENDOTHEL UND NO

Die physiologische Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) durch das Endothel spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der vaskulären Homöostase (11, 126, 127).

Endothelzellen produzieren über die endotheliale NO-Synthase (eNOS oder NOS-3) geringe, pulsatil freigesetzte Mengen an NO, die zu einer basalen Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur führen. Zusätzlich zu der Regulation des systemischen Blutdrucks kann NO auch den lokalen Blutfluß in bestimmten Gefäßbetten kontrollieren, so z.B. im Gehirn, im Herzen, in der Lunge, im Gastrointestinaltrakt und in der Haut (8, 35). Ein lokaler Mangel an NO kann daher zu einem Vasospasmus in lokal begrenzten Regionen führen. Dieser Mechanismus liegt vermutlich dem Hepatorenalen Syndrom, der Präeklampsie und auch dem Raynaud Syndrom zugrunde (11).

Desweiteren konnte gezeigt werden, daß mikrovaskuläre Endothelzellen der menschlichen Haut NO als Antwort auf die vasodilatorisch wirkenden Neuropeptide „Calcitonin gene-related peptide“ und Substanz P freisetzen. Dies wird verstanden als eine molekulare Verbindung zwischen dem Nervensystem und der Haut (128).

Endothelzellen können aber auch, z.B. unter Einfluß proinflammatorischer Zytokine die induzierbare NO-Synthase exprimieren und dann große Mengen NO produzieren (129, 130). Dieser Mechanismus dient z.B. dem Schutz vor infektiösen Mikroorganismen (4) und dem Tumorwachstum (118), wurde aber auch in

Zusammenhang mit autoimmunvermittelter Gewebeschädigung beim Diabetes mellitus Typ 1 oder dem septischen Schock gebracht (38, 131).

Zusätzlich ist aus den Endothelzellen freigesetztes NO ein endogener Inhibitor des Zellwachstums der glatten Gefäßmuskulatur und der Migration, der NF- κ B – Aktivität, der Expression proinflammatorischer Moleküle und von Adhäsionsmolekülen, wie z.B. VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), ELAM-1 (endothelial leukocyte adhesion molecule-1 oder E-selectin) und auch ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1). Durch die Hemmung der Adhäsion von Neutrophilen (132, 133) und die verminderte Expression von chemotaktischen Proteinen (134) kann NO Entzündungsprozesse eindämmen. Daher kann die Expression der iNOS in Endothelzellen die natürliche Entwicklung von Gefäß-erkrankungen, einschließlich der Gefäßentzündung (Vaskulitis) und der Arteriosklerose, beeinflussen. In diesem Kontext ist weiterhin die Beobachtung interessant, daß die Expression der induzierbaren NO-Synthase in vaskulären Endothelzellen die basale Freisetzung des Fibroblasten-Wachstumsfaktors in kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen bewirkt, was eine bedeutsame Rolle von NO beim Mechanismus der Neovaskularisierung arteriosklerotischer Plaques nahelegt (135).

1.9 UVA

Die ultraviolette (UV) Strahlung ist ein bedeutsamer, natürlicher Induktor des apoptotischen und nekrotischen Zelltodes in der Haut. Das Spektrum der ultravioletten Strahlung setzt sich aus drei Regionen zusammen: UVC (200 – 290 nm), UVB (290 – 320 nm) und UVA (320 – 400 nm), welches wiederum in UVA₁ (340 – 400 nm) und UVA₂ (320 – 340 nm) unterteilt wird. Aufgrund der Absorption durch die Atmosphäre kann das kurzwellige UVC die Erdoberfläche nicht erreichen. Die Menge an UVA Strahlung, die an der Erdoberfläche auftrifft, liegt annähernd zwanzigfach höher als diejenige von UVB (136). Eine durch UVA Strahlung hervorgerufene Rötung auf normaler Haut erfordert jedoch eine tausendfach höhere Energie als UVB (137). Die Minimale-Erythem-Dosis von UVA bei einem kaukasischen Hauttyp beträgt ca. 200-300 kJ/cm² (138). Anders als UVB penetriert bis zu 30 % der UVA-Strahlung die Dermis und die dermalen Gefäße (139) und hat daher möglicherweise einen größeren direkten Effekt auf die systemische Immunität. Histologische Veränderungen nach UVA-Exposition zeigen sich in Form einer epidermalen Spongiose mit auffallend wenig sog. „sunburn cells“ verglichen mit UVB-Strahlung, einem dichten mononucleärem perivaskulären Infiltrat aus Leukozyten und einer ausgeprägten vaskulären Schädigung (140). Unter „sunburn cells“ versteht man heute apoptotische Keratinozyten, wie sie typischerweise nach UVB-Exposition auftreten.

Die zytotoxischen Wirkungen von UVA und UVB werden über unterschiedliche Mechanismen vermittelt: UVB verursacht durch Absorption von Photonen überwiegend eine direkte DNA-Schädigung z.B. über Photodimerisation des Thymidins (Pyrimidin-Dimere) (141, 142), während die UVA-vermittelten Effekte auf die DNA vor allem auf der Sensibilisierung bzw. Aktivierung von Se-

kundär-Molekülen, sog. endogener „Chromophoren“, basieren (143). Zu diesen Molekülen, welche das UV-Licht absorbieren und die Energie in ein biochemisches Signal transferieren, zählen Porphyrine, reduzierte Nikotinamid Coenzyme, Flavine, Kynureinsäure und Pterine (144). Die endogenen Chromophoren induzieren eine Schädigung der Zellmembran sowie bestimmte Arten von DNA-Schäden, meistens in Form von Einzelstrangbrüchen und Protein-DNA „crosslinks“ (142, 145-147). Eine durch Chromophoren vermittelte direkte (photodynamische) oder indirekte Folge der UVA-Strahlung ist die Bildung von aktivierten Sauerstoff-Spezies (ROS), die u.a. für die Schädigung der Zellmembranen durch Peroxidation von Membranlipiden verantwortlich gemacht werden (148, 149). In vitro Studien haben die Beteiligung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) (150), Superoxidanion ($\text{O}_2^{\cdot-}$), Hydroxyl-Radikal (OH^{\cdot}) (151) und Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) (152) an UVA-induzierten zytotoxischen Prozessen nachgewiesen.

Die Haut verfügt über drei verschiedene Schutzeinrichtungen gegenüber der Lichtenergie, die zusammengenommen zu einer Steigerung der Lichtunempfindlichkeit bis zum 40fachen führen können. Hierzu zählen die Pigmentierung mit Melanin, die Hyperkeratose (Lichtschwiele) sowie DNA-Reparaturmechanismen.

Epidemiologische, klinische und biologische Studien erhärten die Auffassung, daß die UV-Strahlung des Sonnenlichtes ätiologisch an der Mehrzahl der verschiedenen Formen des menschlichen Hautkrebses beteiligt ist (153). Schätzungen zufolge soll UVA zu 10 – 20% an der Karzinogenese des Sonnenlichtes beteiligt sein (154). Kumulative Dosen von UVA können zu genetischen Schäden der zellulären DNA führen, welche das Altern der Haut (sog. „photoaging“), die veränderte Expression von Onkogenen und Tumor Suppressor Genen und so die Entstehung von Hautkrebs fördern können (155-157).

Zusätzlich zu der natürlichen UVA Strahlung der Sonne wird die menschliche Haut in zunehmenden Maße UVA Strahlung von UVA Strahlenquellen hoher Intensität zu kosmetischen und therapeutischen Zwecken ausgesetzt (158, 159). UVA₁-Phototherapie findet Anwendung unter anderem in der Behandlung der Atopischen Dermatitis (160, 161), des Lupus erythematoses (162, 163), der Urticaria pigmentosa (164), der Panklerotischen Morphaea (165) und der lokalisierten Sklerodermie (166), wobei die krankheitsverursachenden Zellen durch Apoptose zerstört werden (167). Dies alles macht es zu einer wichtigen Aufgabe, die Mechanismen der UVA-induzierten Zellveränderungen zu verstehen sowie die menschliche Haut vor ungewollten Folgeschäden der UVA-Strahlung zu schützen.

1.10 REAKTIVE SAUERSTOFFSPEZIES

Im Rahmen einer UVA-induzierten Zellschädigung spielen reaktive Sauerstoffspezies (ROS) eine bedeutsame Rolle.

Zellen scheinen aber auch über eine physiologische, basale Produktion von Reaktiven Oxidativen Spezies zu verfügen, welche als essentielle Bestandteile von Redox-Signalsystemen verschiedene Vorgänge wie z.B. das Zellwachstum, die

Zelladhäsion, die Apoptose, den Ionentransport oder die Transkription modulieren können (168-171). In pathologischen Zuständen kommt es häufig zu einer charakteristischen Steigerung der ROS-Produktion über gewebständige Oxidase-Enzyme, die dann als Oxidativer Stress bezeichnet wird. Ihnen steht von Seiten der Säugetierzelle eine Vielzahl anti-oxidativer Verteidigungsmechanismen gegenüber einschließlich der Superoxiddismutase (SOD), der Katalase, verschiedenen Peroxidasen, Ascorbinsäure (Vitamin C), Harnsäure, der Carotinoide, der Thioredoxin-Reduktase, Melanin, α -Tocopherol (Vitamin E), Vitamin D, Glutathion (GSH) sowie NO (172, 173).

Am Beispiel der Haut läßt sich zeigen, daß Reaktive Sauerstoffspezies an den unterschiedlichsten Vorgängen wie Hautkrebs, Hautalterung, Autoimmunerkrankungen und vielen entzündlichen Veränderungen der Haut beteiligt sind (174). ROS werden in der Haut nicht nur durch oxidativen Metabolismus generiert, sondern entstehen auch infolge exogenen Einflusses durch Ozon oder Luftverschmutzung. UV-Strahlung, insbesondere UVA, gilt als stärkste exogene Quelle der ROS-Bildung in der Haut (175) und greift in das antioxidative Schutz-System der Hautzellen ein. Als Reaktion auf eine einzelne UV-Bestrahlung kommt es zu einer verminderten Aktivität vor allem der antioxidativen Enzyme Katalase und Superoxid-Dismutase, jedoch auch zu verringerten Konzentrationen der nicht-enzymatischen Antioxidantien α -Tocopherol, Ascorbinsäure und Glutathion. Im Gegensatz dazu führt die wiederholte chronische UV-Bestrahlung zu einer gesteigerten Aktivität antioxidativer Enzyme (176-178). Die UVA-induzierte Bildung von O_2^- und H_2O_2 kann über die O_2^- -modulierte Fenton-Reaktion zur Entstehung von hochreaktiven OH-Radikalen führen, welche sowohl die Lipidperoxidation von Membranen als auch DNA-Schäden einschließlich DNA-Strangbrüche verursachen können (143). Die Beteiligung von H_2O_2 als Hauptvermittler der UVA-induzierten DNA-Schäden und Zelltod wird kontrovers diskutiert (179, 180), da möglicherweise Unterschiede zwischen den DNA-Strangbrüchen nach H_2O_2 und UVA bestehen (181).

Man muß unterscheiden zwischen pathologischen Zuständen, die durch ROS initiiert werden, und solchen, in deren Verlauf es zur Entstehung von ROS kommt. Da im Rahmen von Gewebeschäden endogen Reaktive Sauerstoff Spezies gebildet werden, wurden Kriterien aufgestellt, um den ursächlichen Zusammenhang zwischen ROS und einer Erkrankung nachzuweisen:

1. Die ROS oder ihre Metabolite sollten am Ort der Gewebeschädigung stets präsent sein.
2. Die direkte Exposition mit ROS in physiologischen Konzentrationen sollte die Gewebeveränderung reproduzieren können.
3. Die Entfernung der ROS durch Hemmung ihrer Entstehung oder durch Zugabe von Antioxidantien sollte die Gewebeschädigung verhindern.

Schwierigkeiten bereitet der Nachweis der ROS aufgrund der kurzen Halbwertszeiten, so daß es noch weiterer intensiver Forschung bedarf, die Rolle der unterschiedlichen ROS in den verschiedenen Krankheitsbildern und Regelkreisen zu beschreiben.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 CHEMIKALIEN

Acridinorange	Serva, Heidelberg
Agarose	Serva
Arginin	Sigma, Deisenhofen
Aqua injectabilia	Braun, Melsungen
Bisbenzimidazole (Hoechst 33342)	Sigma
Bromphenolblau	Serva
bovine serum albumine (BSA)	Sigma
butyliertes Hydroxytoluen (BHT)	Sigma
Chloroform	Merck, Darmstadt
Collagenase (0,3 U/mg)	Serva
Collagen Typ III	Sigma
Cystein	Sigma
Diaminobenzidin (DAB):	Serva
3,3-Diaminobenzidin-Tetrachlorid	
Diethylether	Merck
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Merck
Dinatriumhydrogenphosphat (Na_2HPO_4)	Merck
Dithiothreitol (DDT)	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO - Einfriermedium)	Sigma
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck
Ethanol	Merck
Ethidiumbromid (1% wässrige Lösung)	Serva
Eukitt-Einbettungsmedium	O. Kindler GmbH, Freiburg
Ficoll 400	Pharmacia, Heidelberg
Formaldehyd: 37%ige Lösung	Merck
Gelatine	Serva
Glutaraldehyd	Merck
Glycerin	Merck
Guanidiniumthiocyanat	Boehringer, Mannheim
Hämatoxylin-Gebrauchslösung	Serva
Histidin	Sigma
Isopropanol	Merck
Kaliumcarbonat (K_2CO_3)	Merck
Kaliumchlorid (KCl)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck
Katalase	Sigma
L-N ⁵ -(1-iminoethyl)-ornithin (NIO)	Boehringer Mannheim
L-N ^G -monomethyl-L-arginin (L-NMMA)	Sigma
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Merck
Mercaptoethanol	Serva
Methanol (98%)	Merck
Mangan(III)tetrakis(4-benzoesäure)porphyrin	

(MnTBAP)	Alexis
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumnitrit (NaNO ₂)	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Natriumpyruvat	Gibco, Eggenstein
N-1-Naphtylethylendiamindihydrochlorid (NEDDC)	Sigma
Neutralrot (3 % Lösung)	Sigma
Ortho-Phosphorsäure (H ₃ PO ₄)	Merck
Paraffinöl	Sigma
Propidiumiodid	Sigma
Salzsäure (HCl)	Merck
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	Merck
Trypanblau (20%ige Lösung)	Gibco
Trypsin (50 U/mg; Ca und Mg frei, pH: 7,2))	PAA Linz, Austria
Wasserstoff-Peroxid (H ₂ O ₂)	Merck
wässrige Phenollösung (gesättigt)	Merck
Xylol	Merck

2.1.2 EINWEGARTIKEL FÜR DIE ZELLKULTUR

Plastikartikel für die Zellkultur	Falcon (Becton Dickinson), Heidelberg
Lab-Tek Chamber slides (glass slides)	Nunc, Wiesbaden

Arbeitsvolumina für Zellkulturgefäße:

	Medium-Füllvolumen	Effektive Wachstumsfläche (pro well in cm ²)
Multiwell-Platte	(pro well in ml)	
6-well Platte	2 - 3	9,60
12-well Platte	1,5 - 2	3,80
Schalen		
100 mm-Schale	10	78,5

2.1.3 PUFFER, MEDIEN UND ZUSÄTZE FÜR DIE ZELLKULTUR

endothelial cell growth supplement (ECGS)	Sigma
Dulbeccos minimal essential medium (DMEM)	Gibco, Eggenstein
fetal calf serum (FCS)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
1. FCS Standard-Qualität, LOT Nr. AO1127-454 (Endotoxingehalt von 2,4 ng / ml)	

2. FCS Hohe-Qualität, LOT Nr. AO1128-128 (Endotoxingehalt von 0,48 ng/ml)
Hanks buffered salt solution (HBSS) Gibco
HEPES (1 M) PAA
Natriumpyruvat (100 mM) PAA
Nicht-essentielle Aminosäuren (100x) (MEM) PAA
Penicillin-Streptomycin (1000 U/mg) PAA
RPMI 1640-Medium: PAA
(LPS-Gehalt < 0,1 ng/ml)
Zellkulturmedium (RPMI⁺⁺⁺):
RPMI 1640 - Medium wurde mit 1 mM Natrium-Pyruvat, 60 U/ml Penicillin-Streptomycin, 2 mM L-Glutamin, 1:100 non-essentielle Aminosäuren („MEM“ 100x) und 10 mM HEPES versetzt und bei 4°C gelagert.
(LPS-Gehalt der Zusätze (HBSS, HEPES, MEM, Penicillin-Streptomycin < 0,1 ng/ml)

2.1.4 ZYTOKINE

Rekombinantes Maus-Interleukin-1-beta (IL-1 β):
1 x 10⁶ Units/mg (LPS-Gehalt: < 0,1ng/ μ g) Biosource International, Rattigen
Rekombinanter Maus-Tumor-Nekrose-Faktor-alpha (TNF- α):
1 x 10⁶ U/mg (LPS-Gehalt: < 0,1ng/ μ g) PBH, pharma biotechnology, Hannover
Rekombinantes Maus-Interferon-gamma (IFN- γ):
1 x 10⁵ U/mg (LPS-Gehalt: < 0,1ng/ μ g) Hbt, HyCult biotechnology, Leiden, Niederlande

2.1.5 MATERIALIEN FÜR DIE REVERSE TRANSKRIPTION UND DIE PCR

DNA-Größen-Marker:
DNA-Leiter XIV (100 Basen-Leiter) Boehringer Mannheim
DNase, RNase-frei (50U/ μ l) Boehringer Mannheim
dNTPs: Boehringer Mannheim
100 mM Stamm-Lösung:
dATP, dGTP, dCTP, dTTP
Oligo-p(dT)₁₅ Primer (20 pmol/ μ l) Life Technologies (Eggenstein)
Rnase-Inhibitor (Promega (40U/ μ l): Promega
Reverse Transkriptase (AMV) Promega
Taq Polymerase (5U/ μ l) Gibco
Primer Life Technologies

Primersequenzen:

Primer	GenBank-Zugangs-Nr. Oligonucleotidlänge	Produkt-länge in Basen
Antisense-Maus-iNOS Primer 5'-CTG GGT CCT CTG GTC AAA CTC TT- 3'	Gen-Bank: 1187039 Basen: 604-626	648
Sense Maus-iNOS Primer 5' TGC AAA ATA GCT CTG CAG AGC CT-3'	Gen-Bank: L09126 Basen: 1529-1551	648
Antisense-Human-GAPDH Primer 5'-GGA CTG TGG TCA TGA GTC CT- 3'	Gen-Bank: 1117851 Basen: 549 - 568	416
Sense-Human-GAPDH Primer 5' -CAA CTA CAT GGT TTA CAT GTT CC -3'	Gen-Bank: 1117851 Basen: 153 - 175	416

2.1.6 MATERIALIEN FÜR DIE IN SITU NICK TRANSLATION

Biotin-16-2'-desoxyuridin-5'-triphosphat
(Biotin-16-dUTP)
dATP, dGTP, dCTP (100 mM)
DNA-Polymerase I
VectaStain Kit

Boehringer Mannheim
Boehringer Mannheim
Boehringer Mannheim
Camon, Wiesbaden

2.1.7 NO-DONOREN

DETA-NO
((Z)-1-[N-(2-aminoethyl)-N-(2-ammonioethyl)amino]diazon-1-ium-1,2-diolate)
Synthese von Priv. Doz. Dr. K.D. Kröncke, Institut für Immunbiologie, Düsseldorf
nach Hrabie et al. (182)
DETA
Bis-(2-Aminoethyl)-Amin
SNOC: S-Nitrosocystein (eigene Herstellung nach Mirna und Hoffmann, 1969 (183))

Aldrich, Steinheim

2.1.8 ANTIKÖRPER

Kaninchen-anti-human von Willebrand
Faktor-Antikörper
monoklonaler Ratten anti-Maus - CD 31
IgG-Antikörper
monoklonaler Ratten anti-Maus - CD 106 -
IgG-Antikörper
monoklonaler Ratten anti-Maus - CD 105 -
IgG-Antikörper
Peroxidase-konjugierte-Ziege-anti-Ratte-IgG-
Antikörper

Peroxidase-konjugierter-Schwein-anti-
Kaninchen- Antikörper

Sigma

Serotec, Wiesbaden

Serotec

Serotec

Zymed Laboratories, San Francisco, CA, USA

Dako, Dänemark

2.1.9 TIERE

Homozygot iNOS defiziente knock-out Mäuse und Wildtyp-Mäuse (C57BL6) mit dem selben genetischen Background

Männliche Tiere, ca. 30 g schwer und 50 Tage alt, stammen aus der Zucht von Volker Burkard, Diabetes Forschungsinstitut (DFI), Düsseldorf. Die Tiere erhielten Standard-Futter und Trinkwasser nach Belieben.

2.1.10 GERÄTE

Analysenwaage

Mettler, Giessen

Brutschrank:

Heraeus, Osterode

37°C, 90% Luftfeuchtigkeit,

5% CO₂, 95% Luft

Einfrierbox

Roth-Laborbedarf, Düsseldorf

ELISA-Reader: Titertek Multiscan Plus

Flow Laboratories, Heidelberg

Exikator

Eppendorf

Fluoreszenzmikroskop

Zeiss, Jena

Fluoreszenz-Photometer (RNA-Messung)

Beckmann, Düsseldorf

Gelkammern für DNA-Gelelektrophorese

Serva

Photosystem (für DNA-Gele)

AGS, Heidelberg

Photometer: Multiscan Plus MK2

(enzyme linked immunosorbent assay
microplate reader)

Helsinki, Finnland

PCR-Thermo-Cycler: Mastercycler 5330 plus

Eppendorf, Hamburg

Pipetten

Eppendorf

Sellas-2000 UV-Lampe

(Spektrum: 340-390 nm)

Sellas Medizinische Geräte

GmbH, Gevelsberg

Sterilbank: Lamin Air

Heraeus

Tischzentrifuge: Zentrifuge 5412

Eppendorf

UV-Messgerät

Gröbel, Ettlingen

UV-Transluminator (Wellenlänge:312 nm)

AGS, Heidelberg

Zentrifuge (RNA-Isolation): Universal 30 RF

Hettich, Tuttlingen

Zellzentrifuge: Minifuge GL

Heraeus

2.2 METHODEN

2.2.1 ARBEITSMETHODEN DER ZELLKULTUR

2.2.1.1 Inaktivierung von FCS

Fetales Kälber Serum wird bei 4°C aufgetaut und dann 45 min unter regelmäßigem Schwenken bei 56°C im Wasserbad inaktiviert. Anschließend läßt man das Serum bei 4°C im Eisbad abkühlen und lagert es in Portionen von 50 ml bei -20°C.

2.2.1.2 Ablösung adhärenter Zellen von der Kulturoberfläche – Trypsinierung

Lösungen:

10 x PBS-Stammlösung:

80,03 g NaCl	(1,370 M)
2,01 g KCl	(0,027 M)
14,24 g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	(0,080 M)
2,04 g KH ₂ PO ₄	(0,015 M)
ad 1000 ml H ₂ O-bidest	

1 x PBS-Gebrauchslösung:

Die 10 x PBS-Stammlösung wird im Verhältnis 1 : 10 mit Aqua bidest verdünnt und mit 0,02 % EDTA versetzt. Anschließend wird die Lösung auf einen pH von 7,4 eingestellt, steril filtriert und bei 4°C gelagert.

Vor dem Ansatz einer 1 x PBS-Lösung müssen eventuell auskristallisierte Substanzen durch Erwärmung und Rühren wieder in Lösung gebracht werden.

Durchführung:

Nach Bildung eines konfluenten Zellrasens werden die Aortenendothelzellen zur Subkultivierung mittels einer sterilen, frisch aufgetauten 0,25%igen Trypsinlösung in PBS in der Verdünnung 1 : 10 von der Oberfläche der Kulturplatte abgelöst. Zunächst wird das alte Kulturmedium abgesaugt und die verbleibende Zellschicht drei Mal mit je 10 ml 1 x PBS / EDTA (37°C) gewaschen, um alle Serum- sowie Kalziumreste zu entfernen. Anschließend werden die Zellen mit einem Gemisch aus 4 ml 1 x PBS / EDTA und 400 µl 0,25 %iger Trypsinlösung vollständig bedeckt und bei 37°C im Brutschrank für ca. 1 – 2 Minuten inkubiert. Wenn sich alle Zellen abgerundet haben und in Suspension befinden, wird die Trypsinierung nach Kontrolle unter dem Invers-Mikroskop durch Zugabe von FCS-haltigem Medium gestoppt. Die Zellen werden durch vorsichtiges Aufziehen in einer Pipette resuspendiert, um Zellklumpen aufzulösen, in ein 50 ml – Falcon-Röhrchen aufgenommen und dann für 5 Minuten bei 1200 rpm abzentrifugiert. Anschließend wird der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in einem definierten Volumen (3 – 5 ml) des Kulturmediums erneut resuspendiert. Die Bestimmung der Zellkonzentration erfolgte durch das Auszählen in der Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop und anschließender Multiplikation mit dem Zählkammerfaktor (10⁴). Die gewünschte Zellzahl wird durch Zugabe von Kulturmedium zu der Zellsuspension eingestellt. Zuletzt werden die Zellen auf vorbereitete Kulturplatten mit RPMI / FCS in

entsprechender Konzentration neu ausgesät. Sie werden bis zur 10. Passage subkultiviert.

2.2.1.3 *Kryokonservierung lebender Zellen*

Einfriermedium:

RPMI⁺⁺⁺ mit:

17 % FCS und 20 % DMSO

pH 7,5; steril filtriert, 4°C

Nach Trypsinierung und Zentrifugation in RPMI⁺⁺⁺ / 17 % FCS werden die Aortenendothelzellen 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 und in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox bei -80°C eingefroren. Die Einfrierbox gewährleistet eine Abkühlung von 1°C/min.

2.2.1.4 *Auftauen eingefrorener Zellen*

Eingefrorene Zellen werden unverzüglich im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, in einem Falconröhrchen mit 15 ml RPMI⁺⁺⁺ / 17 % FCS mit 1200 rpm für 5 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert, resuspendiert, auf vorbereitete 10 cm - Kulturplatten mit 15 ml Medium ausgesät und im Brutschrank bei 37°C weiterkultiviert. Das Zellmedium wird nach 24 Stunden erneuert.

2.2.2 ISOLATION UND KULTIVIERUNG DER AORTENENDOTHELZELLEN

2.2.2.1 *Herstellung eines Kollagen-Gels:*

Kollagenstammlösung:

3 mg Kollagen Typ III / ml 0,013 M HCl

Zur Herstellung eines Kollagengels, das vor jeder Gewebepreparation frisch angesetzt wird, werden folgende Inhaltsstoffe unter sterilen Bedingungen bei 4°C sorgfältig vermischt:

3 Teile Kollagenstammlösung

1 Teil 5 x DMEM

1 Teil 0,14 M NaOH

Das Gelgemisch (neutraler pH) wird mit je 400 µl/well auf eine 24-Loch Gewebekulturplatte pipettiert. Diese wird anschließend 30 Minuten mittels UV-Licht (UVC) mit einem maximalen Abstand von 10 cm sterilisiert. Dann läßt man die Gele ca. 30 – 60 Minuten bei 37°C polymerisieren und äquilibriert sie über Nacht im Brutschrank mit 1 ml/well 17% FCS und 50 µg/ml ECGS in RPMI 1640⁺⁺⁺.

2.2.2.2 Gewebepräparation

Die Aorta einschließlich des Aortenbogens wird aus einer mit Diethyläther frisch getöteten Maus nach Eröffnung des Brust- und Bauchraumes stumpf mobilisiert, entnommen und mit HBSS / 10 mM HEPES blutfrei gespült. Sie wird anschließend mit einer Pinzette von dem restlichen Binde- und Fettgewebe freipräpariert und in kleine Ringe von ca. 1 - 2 mm Breite geschnitten. Nachdem das Äquibrierungsmedium entfernt wurde, werden zwei dieser Aortenringe pro well in das Kollagengel in der Gewebekulturplatte implantiert. Anschließend werden sie vorsichtig mit je 1 ml/well RPMI / 17% FCS und 50 µg/ml ECGS überschichtet, ohne daß die Aortenringe den Kontakt zum Kollagengel verlieren. Die Aortensegmente werden nun 4 - 6 Tage im Brutschrank bei 37°C unter regelmäßiger lichtmikroskopischer Kontrolle inkubiert; das Medium wird bei Bedarf erneuert. Die Aortenstücke werden mit einer sterilen Pinzette entfernt und die verbleibenden Endothelzellen noch für 2-4 Tage je nach Dichte weiterkultiviert. Sind genügend Zellen ausgewachsen wird das Gel durch Zugabe von 1 ml Kollagenaselösung / well (0,75 U/ml HBSS / HEPES) lysiert. Dabei wird das Gel mehrfach mit einer Pipette aufgewirbelt und dann kurz bei 37°C inkubiert. Der Inhalt aus allen wells wird zusammen mit 50 ml HBSS / HEPES in ein Falconröhrchen gefüllt und bei 1200 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die sedimentierten Zellen werden in frischen RPMI / FCS / ECGS aufgenommen und auf 10 cm - Kulturplatten mit je 9 ml Mediumvorlage (RPMI mit 17% FCS und 50 µg/ml ECGS) pipettiert. Wenn die Zellen nach 24 Stunden angewachsen sind, werden sie gespült und erhalten erneut frisches Medium, dessen ECGS-Konzentration über die nächsten Tage auf null reduziert wird.

2.2.2.3 Kulturbedingungen

Die Kultur der Endothelzellen erfolgte auf 10 cm - Zellkultur-Petrischalen in 15 ml RPMI 1640⁺⁺⁺ - Medium mit 17% inaktiviertem FCS unter Standard-Kulturbedingungen (37°C, 90% Luftfeuchtigkeit; 95% Luft, 5% CO₂). Die adhärend wachsenden Endothelzellen wurden nach Bildung eines konfluenten Zellrasens durch Trypsinierung von der Platte gelöst und in einer Konzentration von ca. 1×10^5 Zellen / Platte erneut ausgesät, in die Versuche eingesetzt oder eingefroren.

2.2.3 ZELLCHARAKTERISIERUNG DURCH ANTIKÖRPER-FÄRBUNG

Lösungen:

Hämatoxylin-Lösung:

Hämatoxylin	1,00 g
NaJO ₃	0,20 g
KAl (SO ₄) ₂ · 12H ₂ O	50,00 g
Essigsäure (konz.)	15,00 ml
H ₂ O-bidest	ad 1000 ml

Die Lösung wird vor Gebrauch filtriert.

Versuchsdurchführung:

Für die immunhistochemische Färbung werden 10^4 unbehandelte oder Zytokin-aktivierte (je 500 U/ml IL-1 β , TNF- α und IFN- γ) Aortenendothelzellen / well auf 8-well Glas- Kulturkammern für 24 - 48 Stunden in je 400 μ l RPMI ⁺⁺⁺/ well im Brutschrank kultiviert.

Schließlich wird der Überstand entfernt und die Zellen unter Kaltluft ca. 10 Minuten getrocknet. Bis zur Weiterverarbeitung können die Präparate bei -20 °C bis zu vier Wochen aufbewahrt werden.

2.2.3.1 *Antikörper-Nachweis des vWF-Antigens:*

In einem ersten Arbeitsschritt werden die Objektträger mit den Proben für 10 Minuten in Aceton fixiert und anschließend 5 Minuten in 1 x PBS gewaschen. Zur Blockierung der endogenen Peroxidaseaktivität werden die Proben 5 Minuten in einer frisch angesetzten Wasserstoffperoxidlösung (0,3% H₂O₂ in Aqua bidest) inkubiert und erneut 5 min in ein PBS-Pufferbad gestellt. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, werden die Zellen für 60 min bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer mit 0,5% BSA in 1 x PBS inkubiert. Überschüssiger Puffer wird sorgfältig abgeklopft und der anti-vWillebrand Faktor als Primärantikörper für 30 Minuten in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur in der Verdünnung 1 : 200 und 1 : 400 mit PBS so aufgetragen, daß die Proben vollständig bedeckt sind (100 μ l / Kammer). Die Zellkulturen eines weiteren Objektträgers werden als Negativkontrolle mit einem nicht relevanten Hyperimmunserum unter ansonsten gleichen Bedingungen inkubiert und anschließend separat gewaschen. Nachdem die Proben mit Aqua bidest abgespült und in PBS gewaschen wurden, werden alle Objektträger einschließlich der Negativkontrolle 15 Minuten bei Raumtemperatur mit einem biotinylierten Brückenantikörper inkubiert, der sich spezifisch gegen den Primärantikörper aus Kaninchen richtet. An das Biotin des Sekundärantikörpers können mehreren Peroxidase (HRP-) konjugierten Streptavidin-Molekülen binden, wodurch eine Verstärkung des Signals möglich wird. Die Inkubationszeit mit dem Streptavidin-Peroxidase-Konjugats beträgt 15 Minuten bei Raumtemperatur. Nach einem erneuten Waschvorgang erfolgt die Substratfärbung mit 100 μ l / Kammer 0,05 % Diaminobenzidinlösung mit 0,05 % H₂O₂ für 5 Minuten bei Raumtemperatur, wobei an den Stellen der spezifisch gebundenen Antikörper ein gefärbtes Präzipitat entsteht. Zur Kerngegenfärbung werden die in PBS gereinigten (5 min bei Raumtemperatur) Objektträger für 20 Sekunden in ein Hämatoxylinbad getaucht und anschließend zwei Mal in Leitungswasser gewaschen. Die Präparate werden nun zur Entwässerung in einer aufsteigenden Alkoholreihe für je eine Minute in eine 50%, 70%, 80%, 90% und 100%ige Alkohollösung getaucht; es folgt eine Inkubation in Isopropanol, Xylol und schließlich Xylolersatz für je eine Minute. Nach dem Eindecken mit Eukitt läßt man die Präparate 24 Stunden trocknen.

Auswertung:

Unter dem Lichtmikroskop wird die Zahl sowie die Intensität der Braunfärbung der positiven Zellen bewertet und photographisch dokumentiert, sowie die Spezifität der Färbung durch Vergleich mit der ungefärbten Negativkontrolle nachgewiesen.

Nur intakte Zellen sind zur Interpretation geeignet, da sich nekrotische oder degenerierte Zellen häufig unspezifisch anfärben.

In Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit Hämatoxylin färben sich die Zellkerne bei der Gegenfärbung blaßblau bis dunkelblau an.

2.2.3.2 *Antikörper-Nachweis der Antigene VCAM-1 und Endoglin*

Zur Detektion der Zellantigene VCAM-1 (vascular adhesion molecule) und Endoglin werden die gereinigten, monoklonalen Ratten-anti Maus CD 106- und CD 105- Antikörper eingesetzt.

Hierbei wird nach demselben oben erwähnten Protokoll vorgegangen. Die in 0,5% BSA-PBS gelösten Primärantikörper werden in den Verdünnungen 1 : 25, 1: 50 und 1: 100 (CD 106) und 1:10, 1 : 25 und 1: 50 (CD 105) mit einer Inkubationszeit von 60 Minuten (feuchte Kammer) aufgetragen. Die Negativkontrollen werden mit einem nicht relevanten Hyperimmunserum abgedeckt und bei allen folgenden Waschvorgängen separat gewaschen. Nach dreimaligem Waschen in PBS werden die Objektträger 30 Minuten bei RT mit dem biotinylierter anti-Ratte Sekundärantikörper (zwei Tropfen auf 10 ml 0,5% BSA-PBS) inkubiert. Wieder werden die Präparate in PBS gewaschen und dann mit dem ABC Reagenz (je zwei Tropfen A und B in 10 ml PBS) für 60 Minuten bei RT in der feuchten Kammer abgedeckt.

Substratfärbung mit DAB und Kerngegenfärbung mit Hämatoxylin erfolgen nach vorherigem Protokoll.

2.2.4 BESTRAHLUNG KULTIVierter ENDOTHELZELLEN MIT UVA₁

Zellmedium (farblos):

Zur Herstellung von 1000 ml farblosem Medium werden 10,1 g RPMI-Pulver (ohne Phenolrot) mit folgenden Supplements versetzt:

- 2,2 g NaHCO₃
- 10 ml HEPES (1 M)
- 10 ml non-essentielle Aminosäuren („MEM“ 100x)
- 10 ml Natrium-Pyruvat (100 mM)
- 11 ml L-Glutamin (200 mM)
- 6 ml Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml)

Nach dem Auffüllen mit H₂O bidest auf 1000 ml wird ein pH von 7,3 eingestellt, die Lösung 30 min gerührt, steril filtriert und bei 4°C gelagert.

Durchführung:

Die Endothelzellen werden auf 8-well-Chamber Slides, 6-, oder 12-well-Kulturplatten im Brutschrank zur Adhärenz gebracht. Der Überstand auf den Platten wird vorsichtig abgesaugt und durch RPMI⁺⁺⁺ ohne Phenolrot (37 °C) und entsprechende Zusätze ersetzt. Die jeweilige Menge des eingesetzten farblosen Überstandes ist abhängig von der Art des Kulturgefäßes und beträgt auf 12-well Platten 600 µl/well, auf 6-well Kulturplatten 1 ml/well und auf 8-well Chamber Slides 100 µl/well. Im Anschluß daran werden die Platten mit UVA - Licht bestrahlt, wobei darauf geachtet wird, daß sie im Zentrum des Bestrahlungsfeldes stehen. Es werden fünf verschiedene UV-Dosen appliziert, die bei einer Leistung der UV-Quelle von 50 mW/cm² folgende Bestrahlungszeiten bedingen: 15 Joule/cm² (5 min), 25 Joule/cm² (8 min, 20 sec), 35 Joule/cm² (11 min, 40 sec) und 45 Joule/cm² (15 min). Die UVA-Dosis, die das Bestrahlungsfeld erreicht, wurde regelmäßig mit einem UV-Messgerät überprüft. Unmittelbar nach der Bestrahlung wird das farblose Medium in den Platten wieder entfernt; dann werden die Platten mit Standard - Medium für weitere 24 Stunden im Brutschrank inkubiert. Die Menge des Mediums beläuft sich hierbei auf 1,5 ml (12-well Platten), 2 ml (6-well Kulturplatten) oder 400 µl (8-well Chamber Slides).

2.2.4.1 *Bestimmung der Zahl vitaler Zellen - Neutralrotfärbung:*

Vitalfärbungslösung:

30%ige Neutralrot-Lösung in PBS

Lysier-Lösung:

Isopropanol + 10 mM HCl

Da der Einbau der Neutralrot-Kristalle in vitalen Zellen proportional mit der Zellzahl steigt, eignet sich diese Methode zur Überwachung des Zellwachstums (184, 185).

Nachdem der Überstand mit der Neutralrotlösung in einer Verdünnung von 1 : 100 entsprechend einer Endkonzentration von 0,03 % versetzt und vermischt wurde, werden die Platten für 90 Minuten bei 37 °C im dunkeln inkubiert. Danach werden die Zellen zwei Mal mit PBS / EDTA gewaschen, so daß sich die Lösung nicht mehr verfärbt, kurz getrocknet und anschließend durch Zugabe der Indikator-Lösung lysiert. Je nach Kulturgefäß beträgt die Menge der Indikator-Lösung 600 µl (12-well Platte) bzw. 200 µl (8-well Chamber Slides) pro well. Dabei werden die in die lebenden Zellen eingebauten Neutralrot - Kristalle herausgewaschen und gehen in Lösung. Ist eine gleichmäßige Färbung der Lösung eingetreten, werden 150 µl aus jedem well zwei Mal auf eine 96 - well - Platte aufgetragen. Über den Referenzwert von 150 µl Lysier-Lösung wird die Extinktion bei 530 nm im Photometer gemessen und aufgezeichnet.

Auswertung:

Da nur lebende Zellen den roten Farbstoff aktiv aufnehmen, bedeutet eine verminderte Extinktion eine geringere Zellzahl entsprechend eines geringeren Anteils an lebenden Zellen.

Die Extinktionswerte werden über den Mittelwert aus den Proben aller gleich behandelten Wells (einschließlich der doppelt aufgetragenen Proben) ermittelt.

Derjenige Extinktionsmittelwert, der durch die Lyse der unbestrahlten Zellen gewonnen wird, wird mit 100 % gleichgesetzt.

2.2.5 BESTIMMUNG DER VITALITÄT MIT TRYPANBLAU ODER PROPIDIUMIODID:

Trypanblau-Lösung:

0,5 % Trypanblau in einer 0,9%igen NaCl-Lösung

Propidiumiodid-Lösung:

1 mg/ml in H₂O (1,5 mM)

Die Bestimmung der Zahl toter Zellen wird mit einer Trypanblaulösung in der Verdünnung 1 : 5 durchgeführt. Die Methode der Trypanblau-Färbung beruht auf dem Prinzip, daß lebende Zellen den Farbstoff nicht aufnehmen, während tote Zellen blau angefärbt werden. Nach einer Inkubationszeit von einer Minute wird der Überstand abgezogen; bei zu langer Inkubationszeit nehmen auch lebende Zellen den Farbstoff auf.

Zur statistischen Auswertung werden pro Messpunkt jeweils 500 Zellen gezählt.

Das kationische Fluorochrom Propidiumiodid wird aus lebenden Zellen ausgeschleust und kennzeichnet ebenso wie Trypanblau nekrotische Zellen, indem es Zellmembranschäden nachweist (186). Propidiumiodid bindet an die DNA geschädigter Zellen und zeigt eine rote Fluoreszenz.

Nach 10-minütiger Inkubation mit der Propidiumiodid-Lösung im Verhältnis 1:200 (Endkonzentration: 7,5 µM), werden die Endothelzellen unter dem Fluoreszenzmikroskop (Extinktion: 520 nm, Emission: 600 nm) betrachtet und fotografiert.

2.2.6 IN SITU NICK - TRANSLATION

DNA-Strangbrüche in Einzelzellen können am besten mit der in situ Nick Translation (INT) nachgewiesen werden (187, 188).

Die Methode basiert auf der spezifischen Bindung der DNA-Polymerase I an DNA-Strangbrüche, wobei der beschädigte alte DNA-Strang durch einen neuen ersetzt wird, in den markierte Nukleotide eingebaut werden können. Die immunhistochemische Färbung dieser markierten Nukleotide ermöglicht den

Nachweis von DNA-Strangbrüchen, die eines der Merkmale der Apoptose darstellen (189, 190). Proliferierende Zellen werden durch die in situ Nick Translation nicht gekennzeichnet.

Lösungen:

Abdecklösung:

1% BSA in PBS

Avidin-Peroxidase-Lösung (Vectastain Kit):

4 µl Reagenz A (avidin)

4 µl Reagenz B (biotinylated horse radish peroxidase)

ad 1 ml 0,5 % BSA-PBS-Lösung

DAB - Substratlösung:

10 mg 3,3-Diaminobenzidin in 10 ml Aqua dest. gelöst (entsprechend 0,05 %),
unmittelbar vor Gebrauch werden 0,015 % H₂O₂ hinzugefügt

10 x NTP - Lösung:

je 30 µM dGTP, dCTP und dATP in 50 mM Tris-HCl, pH 7,5

10 x Biotin - dUTP - Lösung:

30 µM Biotin - dUTP in 50 mM Tris - HCl, pH 7,5

10 x NT-Puffer:

0,5 M Tris-HCl pH 7,5, 50 mM MgCl₂, 1mM DTT (Dithiothreitol)

INT-Lösung (100 µl):

10 µl 10 x NTP - Lösung

10 µl 10 x Biotin - dUTP - Lösung

10 µl 10 x NT - Puffer

70 µl Aqua dest.

5 units DNA polymerase 1

Durchführung:

Zur Durchführung der in situ Nick Translation wurden je 10⁴ Aortenendothelzellen pro well auf 8-well Glas-Kulturrkammern zur Adhärenz gebracht und mit je 400 µl Medium im Brutschrank bei 37 °C für 48 Stunden inkubiert. 24 Stunden nach der Bestrahlung mit UVA₁ (45 bzw. 35 Joule/cm²) wurde die

Zellzahl eines wells mittels Trypanblau- und / oder Neutralrotfärbung bestimmt. Anschließend wurde der Überstand verworfen, die Kulturkammern unter kaltem Luftstrom getrocknet und bei -20 °C aufbewahrt bzw. der INT zugeführt.

Zunächst werden die Proben für 10 min in Aceton fixiert. Zur Unterdrückung der Aktivität der endogenen Peroxidasen und zwecks besserer Durchlässigkeit der Zellwände werden die Präparate 30 Minuten in 0,3 % H₂O₂ in Methanol inkubiert. Danach werden sie drei Mal in PBS für je 5 Minuten gewaschen. Pro Kammer werden 50 µl der INT-Lösung aufgetragen; als Negativkontrolle wird eine INT-Lösung ohne Biotin - dUTP angewendet. Die Inkubationszeit der Nick Translation beträgt 15 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer.

Nach einem erneuten Waschvorgang (3 x 5min in PBS) werden 100 µl/Kammer der Abdecklösung aufgetragen und damit alle unspezifischen Bindungen blockiert. Nach 10 Minuten Inkubation läßt man die Abdecklösung abtropfen und ersetzt sie durch die Avidin - Peroxidase - Lösung. Die Kulturkammern verbleiben nun für 2 Stunden in der feuchten Kammer und werden anschließend dreimal je 5 Minuten in PBS gewaschen.

Das an Stelle von Thymidin in die DNA eingebaute Biotin-dUTP wird nun mittels Streptavidin-Peroxidase und nachfolgender Peroxidase-Reaktion mit Diaminobenzidin als Substrat (brauner Niederschlag) sichtbar gemacht. Die Inkubation mit 100 µl/well DAB-Substratlösung wird für alle Kulturkammern nach genau 5 Minuten zeitgleich beendet.

Dann werden die Präparate in PBS geschwenkt und zwecks besserer Lokalisation der Zellen für 15 sec in Hämatoxylin-Lösung getaucht. Die Kerngegenfärbung mit Hämatoxylin wird in H₂O gestoppt; anschließend werden die Kulturkammern in aufsteigenden Konzentrationen von Ethanol (50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100%), in Isopropanol und Xylol (Inkubation je 1 Minute) entwässert. Mit Eukitt werden die Deckgläser an die noch feuchten Objektträger geheftet, welche dann für 24 Stunden aushärten.

Auswertung:

Die Auswertung erfolgt mit dem Lichtmikroskop. Die Zellen, die ein braunes Reaktionsprodukt gebildet haben, sind leicht von den (bis auf den Zellkern) ungefärbten Zellen zu unterscheiden. Pro Kammer werden 500 Zellen gezählt.

2.2.7 RNA-PCR

Einleitung:

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die Amplifikation von DNA-Segmenten mit Hilfe von Oligonukleotiden, die spezifisch an flankierten Bereichen 5' und 3' der zu amplifizierenden Sequenzen hybridisieren.

Als Matrize für die Polymerase-Kettenreaktion können neben chromosomaler und Plasmid-DNA auch RNA direkt bzw. ihre DNA-Kopie (copy DNA, cDNA) dienen.

Die Analyse der mRNA-Population gibt Aufschluß darüber, welche Gene zum aktuellen Zeitpunkt in der jeweiligen Zelle exprimiert werden, wobei die Häufigkeit eines Transkriptes von der Expressionsrate des betreffenden Gens abhängig ist.

Inkubation der Endothelzellen mit Zytokinen:

10⁵ Endothelzellen pro well werden auf 6-well Kulturplatten in 3 ml Medium für 48 Stunden im Brutschrank kultiviert. Nach Erneuerung des Zellmediums durch 2 ml RPMI⁺⁺⁺/ well werden die Kammern und in unterschiedlicher Weise mit Zytokinen (jedes Zytokin in einer Konzentration von 500 U/ml) inkubiert:

Versuchs- bedingung	Zusätze
Nr. 1	ohne Zytokin-Zusatz
Nr. 2	IL-1 β
Nr. 3	TNF- α
Nr. 4	IFN- γ
Nr. 5	IL-1 β + TNF- α
Nr. 6	IL-1 β + IFN- γ
Nr. 7	TNF- α + IFN- γ
Nr. 8	IL-1 β + TNF- α + IFN- γ

In einem weiteren Versuch wurde dem Zellmedium (RPMI⁺⁺⁺) der Wildtyp Endothelzellen bereits im Stadium der Zellkultur ein qualitativ unterschiedliches FCS, welches mit 2,4 ng/ml FCS einen deutlich höheren Endotoxingehalt als das bislang verwendete FCS aufwies, zugesetzt. Dadurch stieg die LPS-Konzentration im Zellüberstand von zuvor 0,08 ng/ml auf 0,4 ng/ml RPMI⁺⁺⁺.

Nach 24 Stunden wurde die Nitritkonzentration im Überstand über die Griess – Reaktion bestimmt.

2.2.7.1 RNA-Isolierung

Als Ausgangsprodukt für die Analyse der endothelialen iNOS in der Polymerase-Kettenreaktion wird die RNA aus aktivierten und unbehandelten Endothelzellen isoliert.

DEPC-Wasser (RNase / DNase freies Reinstwasser):

0,1 % Diethylpyrocarbonat in H₂O-Bidest; autoklaviert

Lysierlösung:

GTC-Puffer:

Guanidinthiocyanat	4 M
Na-Citrat pH 4,0	25 mM
Sacrosyl	0,5 %

in DEPC-H₂O

Unmittelbar vor Gebrauch werden 0,1 M Mercaptoäthanol hinzugefügt.

Durchführung:

Der Kulturüberstand wird verworfen und die adhärennten Zellen werden sofort in 500 µl/well GTC – Puffer / Mercaptoäthanol lysiert. Das Zelllysate jedes einzelnen wells wird nach Aufrühren mit einer Pipettenspitze in ein steriles 1,5 ml-Eppendorfgefäß aufgenommen und sofern es nicht unmittelbar weiterverarbeitet wird, sofort bei -20°C eingefroren.

Auf Eis werden dann 500 µl Zelllysate mit 50 µl einer 2 M Na-Acetatlösung (Rnase freies H₂O; pH 4,4) vermischt und für 2 – 3 sec. gevortext. Anschließend werden zunächst 100 µl Chloroform-Isoamylalcohollösung (Volumenverhältnis 49 : 1), dann 500 µl Phenol in die Proben pipettiert, die nun bis zum Auftreten einer milchig-weißen Trübung erneut gemischt werden. Nach 15 Minuten Inkubation auf Eis wird die Lösung für weitere 15 Minuten in der auf 4°C vorgekühlten Eppendorfzentrifuge bei 15000 U/min zentrifugiert. Dann werden 450 µl der oberen, wässrigen, Nukleinsäure-haltigen Phase abgenommen, in neue 1,5 ml Eppendorfgefäße gebracht und mit je einem Volumen (450 µl) Isopropanol (4°C) versetzt. Nach sorgfältiger Durchmischung (vortex) können die Proben für 24 h bei -20°C eingefroren oder alternativ für 1 – 2 h bei -80°C gelagert werden.

In den aufgetauten Proben wird dann die Kälte-kondensierte RNA 15 Minuten mit 15000 U/min bei 4°C herunterzentrifugiert, der Überstand wird vorsichtig abgegossen und das am Boden des Eppendorfgefäßes zurückgebliebene Pallet mit 1,5 ml 70 % Äthanol in DEPC-H₂O vermischt (vortex). Dieser Zentrifugationswaschschritt wird nochmals wiederholt, um die wässrigen Reste zu entfernen. Nach einer letzten Zentrifugation unter gleichen Bedingungen wird der Überstand bis auf einen geringen Rest abgekippt, der anschließend nach einminütigem Stehenlassen vorsichtig bis auf ca. 20 µl mit einer Pipette abgezogen wird. Die geöffneten Eppendorfgefäße kommen nun für 20 – 30 min in den Exsikkator bei 95°C. Schließlich werden die getrockneten RNA-Pallets in 50 µl DEPC-H₂O aufgenommen und durch wiederholtes Pipettieren sorgfältig aufgelockert.

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration entnimmt man jeder Probe 2µl und bringt diese in ein neues Eppendorfgefäß mit 98 µl DEPC-Wasser und vermischt beide Lösungen. Im UV- Photometer wird aus der Extinktion bei 260 nm die RNA-Konzentration dieser Verdünnungsproben im Vergleich zu einer Was-serkontrolle und der Reinheitsgrad durch das Extinktionsverhältnis bei 260 nm

nm (Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren) und 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) bestimmt.

Die Originalproben werden mit Reinstwasser auf eine Konzentration von 0,1 µg/µl RNA verdünnt und bei -20°C eingefroren.

2.2.7.2 Reverse Transkription (RT) der RNA

Lösungen:

10 x RT-Puffer:

Tris / HCl pH 8,3 100 mM
KCl 500 mM

Desoxynucleotid (dNTP)-Mix:

jeweils 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP in Aqua ad inj.

MgCl₂: 25 mM
Gelatine: 0,5 mg/ml
Oligo-p(dT)₁₅Primer 20 pmol
Rnase - Inhibitor 40 U/µl
AMV Reverse Transkriptase >25 U/µl in Reinstwasser

Durchführung:

Für die Verwendung der DNA-abhängigen Taq-Polymerase wird die isolierte RNA vor der PCR durch eine Reverse Transkription in c-DNA überführt.

Für die cDNA-Synthese werden jeweils 1 µg der aus aktivierten oder unbehandelten Endothelzellen isolierten RNA verwendet.

Zu 10 µl RNA-Probe (1 µg RNA) werden 10 µl des folgenden, auf Eis vorbereiteten RT-Mixes hinzugefügt:

Substanz	Menge / Probe	Konzentration
10 x RT-Puffer	2 µl	1 x
Desoxynucleotid -Mix	2 µl	je 1 mM / Nucleotid
MgCl ₂	4 µl	5 mM
Gelantine	0,4 µl	0,01 mg / ml
Oligo-p(dT) ₁₅ Primer	1 µl	20 pmol
Rnase - Inhibitor	0,5 µl	20 U
AMV Reverse Transkriptase	0,25 µl	2,5 U

Zunächst wird dieser RT-Ansatz 10 Minuten bei 25 °C anschließend für weitere 60 min bei 42 °C im Wasserbad inkubiert. Bis zum Einsatz in der RT-PCR ist eine Lagerung der cDNA-Proben bei -20 °C möglich.

2.2.7.3 RT-PCR

Lösungen für die PCR:

dNTP-Mix:

je 5 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP in Aqua ad inj.

10 x PCR Puffer:

Tris / HCl pH 8,3	100 mM
KCl	500 mM
MgCl ₂	15 mM
Gelatine	0,01 %

Durchführung:

In 0,5 ml-Eppendorfgefäßen werden 5 µl der entsprechenden cDNA-Probe aus der reversen Transkription (ca. 0,25 µg cDNA) mit 5 µl Reinstwasser, je 20 pmol der beiden jeweiligen Primer in 20 µl Reinstwasser und 20 µl des nachfolgenden PCR-Reaktionsgemisches vermischt :

dNTP-Mix	2 µl / Probe
10 x PCR Puffer	5 µl / Probe
Taq-Polymerase	0,25 µl (entspricht: 1,25 U / 50 µl PCR-Ansatz)
DEPC-H ₂ O	12,75 µl / Probe

Die Ansätze werden mit je zwei Tropfen Paraffinöl überschichtet, um ein Verdampfen zu vermeiden, und anschließend im Thermo-Cycler mit folgendem für jeden Primer spezifischen Zyklus-Profil inkubiert:

Sense und antisense Maus-iNOS-Oligonukleotide:

	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
initiale Denaturierung	94°C	5 min	
zyklusinterne Denaturierung	94°C	30 sec	39
Annealing	62°C	30 sec	
zyklusinterne Synthese	72°C	30 sec	
abschließende Synthese	72°C	10 min	
Kühlung	4°C		

Sense und antisense Human-GAPDH-Oligonukleotide:

Durch Alignment der drei Sequenzen der GAPDH der Ratte, der Maus und der humanen GAPDH im Bereich der durch die Primer gewährleisteten Amplifikation konnte gezeigt werden, daß die drei Sequenzen eine 100%ige Homologie besitzen.

	Temperatur	Zeit	Zyklenzahl
initiale Denaturierung	94°C	5 min	
zyklusinterne Denaturierung	94°C	30 sec	23
Annealing	58°C	30 sec	
zyklusinterne Synthese	72°C	30 sec	
abschließende Synthese	72°C	10 min	
Kühlung	4°C		

Die Annealingtemperaturen wurden so gewählt, daß die Möglichkeit unspezifischer Bindungen während des Annealings minimalisiert wurde.

2.2.7.4 Nachweis der PCR-Amplifikationsprodukte mittels Gelelektrophorese

Lösungen:

Ethidiumbromidlösung:

0,1% in H₂O bidest

TAE-Puffer (50-fach):

Tris/acetat 2 M

EDTA 0,1M

Der Puffer wurde vor Gebrauch 1 : 50 in H₂O bidest verdünnt.

Agarose-Lösung 1,5%:

Agarose: 0,75g

1 x TAE-Puffer: 50 ml

Die Lösung wird bis zum Kochen erhitzt und nach Auflösung der Agarose wieder auf ca. 60 °C abgekühlt. Vor dem Auffüllen der Kammer werden 2,5 µl Ethidiumbromidlösung / 50 ml Agarose-Lösung hinzugegeben und durch Schwenken vermischt.

Aufnahme-Puffer (5-fach konz.):

0,25% Bromphenolblau

15% Ficoll 400

15% Glycerin

in H₂O bidest

Durchführung:

Nach Polymerisation des Geles werden pro Geltasche jeweils 10 µl der amplifizierten cDNA der jeweiligen Probe zusammen mit 2,5 µl Aufnahme-Puffer eingesetzt und in 1 x TAE-Puffer bei einer Spannung von 130 V und einer Laufzeit von 30 min. elektrophoretisch aufgetrennt. Als DNA-Längenstandard dienen zwei Proben mit je 2 µl DNA-Marker, 8 µl Reinstwasser und 2,5 µl Aufnahme-Puffer.

Die Identifikation der PCR-Amplifikate erfolgt unter dem UV-Transluminator durch Vergleich der sichtbaren Banden mit dem mitgeführten DNA-Längenstandard. Zur Dokumentation der Ergebnisse wird das Gel mit dem Polaroidkammerasystem photographiert.

Eine gleich starke GAPDH-Amplifikation aller mitgeführten Proben zeigt an, daß die RT-Reaktion erfolgreich durchgeführt wurde und die zu untersuchenden Proben die gleiche Menge an cDNA enthielten.

2.2.8 QUANTITATIVE NITRITBESTIMMUNG NACH GRIESS

In wässrigen Lösungen wird NO spontan innerhalb weniger Sekunden zu Nitrit (NO_2^-) und Nitrat (NO_3^-), den beiden stabilen Endprodukten des NO-Metabolismus, oxidiert (191, 192).

Lösungen:

Griess Reagenz I:

1 % Sulfanilamid in 2,5 % H_3PO_4

Griess Reagenz II:

Naphthylethylendiamin-Lösung mit 0,3 % NEDDC in 2,5 % H_3PO_4

Durchführung:

Die Nitritkonzentrationen in Zellüberständen werden mittels Diazotierungsreaktion (193) bestimmt.

Unmittelbar vor jeder Messung wird eine Standardreihe mit NaNO_2 in Aqua bidest in den Konzentrationen 0 µM, 2,5 µM, 5 µM, 10 µM, 50 µM und 100 µM angesetzt, die bei jeder Nitritbestimmung doppelt mitgeführt wird.

Aus jedem Kulturüberstand werden zwei 100 µl – Proben entnommen und zusammen mit 100 µl der Eichreihe und einem zweifachen Mediumreferenzwert, der aus 100 µl Medium ohne Zellen, das über den jeweiligen Versuchszeitraum mitinkubiert wurde, besteht, auf eine 96-well Elisaplatte gebracht. Für den Testansatz gibt man zu jeder 100 µl Probe 50 µl der Griess Reagenz I – Lösung. Nach einer Inkubationszeit von fünf Minuten bei Raumtemperatur kommen 50 µl Griess Reagenz II-Lösung hinzu. Anschließend werden durch Zugabe von 20 µl Methanol potentiell störende Luftblasen entfernt.

Die rötliche Farbentwicklung kann dann bei 540 nm durch Absorption im Elisasphotometer quantifiziert und nach Abzug des Extinktionswertes der Mediumkontrolle mit der NaNO₂ - Konzentrationsreihe verglichen werden.

2.2.9 FLUORESZENZFÄRBUNG MIT HOECHST - REAGENZ UND ACRIDINORANGE

Der Farbstoff bis-benzimidazole (Hoechst 33342) diffundiert durch die intakte Zellmembran lebender Zellen, bindet von außen an AT-reiche Regionen in der kleineren Furche der DNA und färbt so das Chromatin der Kerne der behandelten Zellen. Unfixierte Zellen zeigen unter UV-Licht eine blaue Fluoreszenz der Kerne, die im Falle apoptotischer Zellen einen leuchtend hellen Charakter annimmt.

Der Fluoreszenzfarbstoff Acridinorange besitzt zwei unterschiedliche Färbeeigenschaften: In fixierten Geweben wird es als „metachromatischer“ Farbstoff verwendet, der Einzelstrang-Nukleinsäuren orange und doppelsträngige Nukleinsäuren grün färbt (194). In lebenden Zellen dient er jedoch als pH-Indikator, der in sauren Kompartimenten wie Lysosomen und Phagosomen angereichert wird, welche dann leuchtend orange-rot fluoreszieren (195). Die Beobachtung, daß die Kerne apoptotischer Zellen ebenfalls orange-rot angefärbt werden, wurde mit der Ansäuerung apoptotischer Zellkerne, möglicherweise aufgrund der Fusion von Lysosomen, in Zusammenhang gebracht (196).

Unmittelbar vor der Auswertung unter dem Fluoreszenzmikroskop werden 5 µl/ml Hoechst - Reagenz (9 mM) oder alternativ 3 µl/ml 3,3 mM Acridinorange in Ethanol (Endkonzentration: 10 µM) in den Zellüberstand pipettiert und durch leichtes Schwenken der Kulturplatte gleichmäßig verteilt. Zur Visualisierung des Hoechst-Farbstoffes wird ein Filter für blaue Fluoreszenz verwendet (Extinktion: 355 nm, Emission: 465 nm), bei Acridinorange kommt ein Filter für grüne Fluoreszenz zur Anwendung.

2.2.10 INDUKTION DER iNOS MIT VERSCHIEDENEN ZYTOKINEN

Diese Versuche dienen dazu, das Zytokin-Antwort-Muster der induzierbaren NO-Synthase in iNOS knock-out und Wildtyp-Aortenendothelzellen der Maus auf Proteinaktivitätsebene zu untersuchen.

Pro well einer 12-well-Kulturplatte werden 1×10^5 Zellen in 2 ml Medium kultiviert und nach 24 Stunden mit 600 µl neuem Medium und den entsprechenden Zytokinzusätzen (je 500 U/ml pro Zytokin) versehen.

Das Versuchsschema umfaßt 9 verschiedene Versuchsbedingungen:

Versuchs- bedin- gung	Zusätze
Nr. 1	keine Zusätze im Medium
Nr. 2	IL-1 β
Nr. 3	TNF- α
Nr. 4	IFN- γ
Nr. 5	IL-1 β + TNF- α
Nr. 6	IL-1 β + IFN- γ
Nr. 7	TNF- α + IFN- γ
Nr. 8	IL-1 β + TNF- α + IFN- γ
Nr. 9	IL-1 β + TNF- α + IFN- γ + 0,25 μ M NIO

Als Kontrollproben wurden zum einen Zellen nur mit Medium (ohne Zytokin-zusatz, siehe Versuchsbedingung Nr. 1), zum anderen nur Medium ohne Zellen mitgeführt. Nach einer Inkubation von 24 Stunden im Brutschrank wurde mit jeweils 100 μ l Überstand eine Nitritbestimmung nach Griess auf einer Elisaplatte durchgeführt.

2.2.11 EINSATZ VON NEUTRALISATOREN DER REAKTIVEN SAUERSTOFFSPEZIES:

Lösung:

SNOC: 100 mM Stammlösung

(wurde vor jedem Gebrauch frisch nach Mirna und Hofmann (183) hergestellt)

0,2 M Cys-HCl in H ₂ O	und
0,2 M NaNO ₂ in H ₂ O	werden im Verhältnis 1 : 1 vermischt. Die Lösung wird dann mit
1 M HCl im Verhältnis 1 : 50	vermischt und anschließend mit
1 M NaNOH im Verhältnis 1 : 100	neutralisiert.

Wildtyp-Aortenendothelzellen werden auf 6-well Kulturplatten mit einer Zelldichte von 100.000 pro well ausgesät und nach 48 Stunden mit 45 Joule/cm² UVA1 bestrahlt bzw. 24 Stunden mit 0,8 mM H₂O₂ inkubiert. Während oder zu angegebenen Zeitpunkten vor und nach UVA-Bestrahlung werden die Endothelzellen mit potentiellen Hemmstoffen der chemischen Reaktivität (Neutralisatoren) der Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) inkubiert.

Die Hemmung der Bildung und Aktivität von Singulett-sauerstoff (¹O₂) wird durch Zusatz von Natriumazid (NaN₃, 20 mM) (197) oder Histidin (40 mM) vermittelt. (Im Gegensatz dazu bewirkt die Anwesenheit von Schwerem Wasser (D₂O, 99% atom) eine Erhöhung der ¹O₂-Halbwertszeit und damit seiner Aktivi-

tät (23-25).) Diese Substanzen wurden 10 min vor der Bestrahlung mit UVA in den Überstand der Zellkulturen gegeben und lagen bis 5 min nach Beendigung der Bestrahlung einschließlich der Bestrahlung selbst im Medium vor. Die Verbindung Mangan (III)tetrakis(4-benzoessäure)porphyrin (MnTBAP, 80 μ M) imitiert die Wirkung der Superoxid Dismutase (198, 199) und wurde unmittelbar nach der UVA-Bestrahlung für 20 min dem Zellüberstand hinzugefügt, da sie unter UV-Einwirkung über eine Radikalfreisetzung toxisch auf die Zellen wirkt.

Wasserstoffperoxid (H_2O_2) wird durch Katalase (2000 U/ml) degradiert (200). Da das Enzym in Lösung eine schwache Grünfärbung annimmt, wurde es eine Stunde vor der Bestrahlung dem Überstand beigelegt und für die Zeitdauer der Bestrahlung entfernt, um anschließend wieder für 5 min hinzugefügt zu werden. Als Inhibitor der Lipidperoxid-Bildung werden Zellen mit butyliertem Hydroxytoluen (BHT, 10 μ M) (201) für 30 min vor, während bis einschließlich 5 min nach der UVA-Bestrahlung inkubiert.

Als NO-Donoren werden DETA-NO (5 mM) und SNOC (1 mM, HWZ: ca. 20 – 25 min.) bzw. als Kontrolle DETA (5 mM) und Cystein (1 mM) als Bestandteil von SNOC während der Bestrahlung eingesetzt.

Keine der Substanzen führte innerhalb der Inkubationszeit in der angegebenen Konzentration zu zytotoxischen Effekten gegenüber den Endothelzellen.

2.2.12 STATISTIK

Bei der statistischen Auswertung der Experimente wurde aus zusammengehörigen Einzelwerten identischer Versuche der Mittelwert \pm Standardabweichung errechnet.

Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mittels des Student-t-Tests mit Hilfe des Excel-Programms untersucht. Unterschiede werden als signifikant bezeichnet bei $p < 0,05$.

3 ERGEBNISSE

3.1 ISOLIERUNG UND AUFGUHT VON ENDOTHELZELLEN AUS DER AORTA DER MAUS

Aorta-Endothelzellen wurden mit Hilfe der „Explant-Technik“ (129, 202) über die Implantation von Aorta-Segmenten auf eine Kollagengel-Matrix in Kultur genommen. Das Prinzip dieser Auswuchsmethode beruht auf der Tatsache, daß Endothelzellen aus der Aorta wesentlich früher in ein entsprechendes Medium herauswachsen als z.B. glatte Muskelzellen oder Fibroblasten (203).

Nach drei Tagen kann ein Auswachsen von Zellen aus dem Gewebe in das Kollagengel beobachtet werden. Abbildung 5A zeigt die aus den Aortenringen auswachsenden Endothelzellen (Tag 3) im semikonfluenten Zustand mit der für diese Wachstumsmatrix (Kollagengel) typischen langgestreckten, spindelförmigen Morphologie und netzartigen Koloniestruktur. Nach sechs Tagen zeigen die Aortenendothelzellen bereits an einigen Stellen ein beginnendes, im konfluenten Zustand für Endothelzellen typisches Pflasterstein-Muster (Abb. 5B) bei einer insgesamt einheitlichen Zellmorphologie. Um eine Kontamination der Endothelzell-Kulturen mit Fibroblasten bzw. Muskelzellen zu vermeiden, werden nach vier bis sechs Tagen die Implantate entfernt, das Kollagengel enzymatisch verdaut und die isolierten Zellen in Kultur genommen, wo sie dann adhärent weiter wachsen.

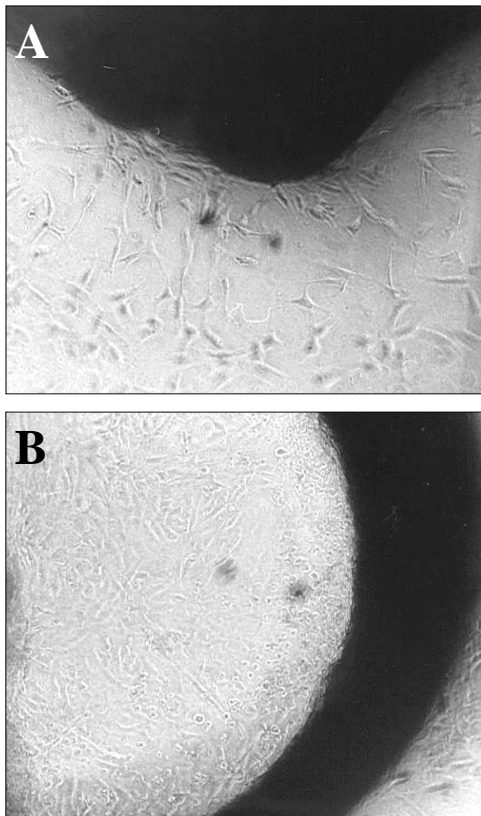


Abbildung 5A und 5B:
Auswachsen der AEC aus
Aortenringen der Maus in
ein Kollagengel; Durch-
lichtmikroskopische Auf-
nahme (Vergrößerung:
160x). A: Tag 3 nach Im-
plantation, B: Tag 6

3.2 PHÄNOTYP-CHARAKTERISIERUNG VON AORTA-ENDOTHELZELL-KULTUREN DER MAUS

Das Faktor-VIII-assoziierte-Antigen, der von-Willebrand-Faktor (vWF), gilt als charakteristischer Marker für Endothelzellen (204). Da jedoch selbst zwischen Endothelzellen verschiedener Gefäßtypen funktionale Unterschiede einschließlich der Anzahl und Verteilung zellspezifischer Epitope (Antigene) bestehen (205, 206) und diese Heterogenität auch die Expression des von-Willebrand-Faktor betrifft, wurden zur Kontrolle und Charakterisierung der Reinheit der Endothelzellkultur noch das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül VCAM (CD 106) und Endoglin (CD 105) als weitere Endothelzell-Antigene herangezogen.

Die Zellcharakterisierung erfolgte über den Nachweis des vWF-Antigens und der Bindung der anti-Maus-CD 106- und CD 105-Antikörper im konfluenten Stadium einer Kultur in der dritten Passage im ruhenden oder Zytokin-aktivierten Zustand. Sie wurde für jede neue Charge durchgeführt.

Zytokine wie das IFN- γ , IL-1 β und der TNF- α können im Rahmen von entzündlichen Prozessen morphologische und funktionelle Veränderungen in vaskulären Endothelzellen hervorrufen (113-115). So wird im Zytokin-aktivierten Zustand u.a. die Expression spezifischer Adhäsionsmoleküle des Endothels wie beispielsweise des Vaskulären Zelladhäsionsmoleküls (VCAM) induziert (207-209).

Bezogen auf die unter dem Lichtmikroskop betrachtete Intensität der Anfärbung konnte für Wildtyp- und iNOS knock-out Zellkulturen folgendes Antigen-Phänotyp-Muster erstellt werden (Tabelle 2 I und II):

Tabelle 2:

	Kontrolle	anti-vWF	CD 106 (VCAM-1)	CD 105 (Endoglin)
AEC (wt) ruhend	-	+++	+	+
AEC (wt) aktiviert	-	+++	++(+)	+
AEC (iNOS $^{-/-}$) ruhend	-	+++	+	+
AEC (iNOS $^{-/-}$) aktiviert	-	+++	++(+)	+

Tabelle 2: Immunzytochemische Untersuchung der Aorta-Endothelzell-Kulturen: Auf isolierten Aorten-Endothelzellen (AEC) der Maus wurde die Expression der Antigene von Willebrand-Faktor (vWF), CD 106 und CD 105 untersucht. (-) keine Reaktion, (+) schwache Reaktion, (++) mittelstarke Reaktion, (+++) starke Reaktion.

Es zeigte sich kein phänotypischer Unterschied zwischen Wildtyp- und iNOS knock-out Endothelzellen weder im ruhenden noch im aktivierten Zustand.

Es konnte gezeigt werden, daß iNOS knock-out und Wildtyp-Aortenendothelzellen bezogen auf das Adhäsionmolekül VCAM und die Antigene CD 105 und CD 106 phänotypisch identisch sind. In sämtlichen Versuchen reagierten alle Zellen auf dem Objektträger mit dem jeweiligen spezifischen Antikörper, womit eine Kontamination mit Fremdzellen ausgeschlossen werden konnte.

Die Negativkontrolle, die mit einem nicht relevantem Immuns serum inkubiert wurde, blieb in allen Versuchen ungefärbt.

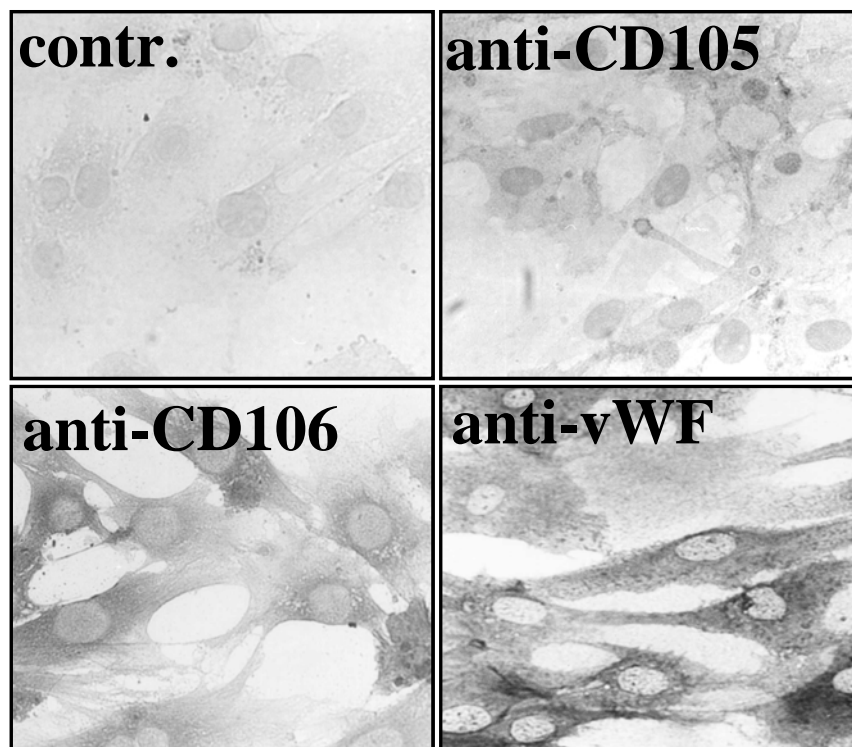


Abbildung 6: *Antigen-Phänotyp von Wildtyp-Aortenendothelzellen nach Aktivierung): Die Reaktion des anti-vWF-Antikörpers deutlich fällt stärker aus als die Antigen-Reaktion des anti-CD 105-Antikörpers. Der anti-CD 106-Antikörper führt nach Zytokin-Stimulation der Endothelzellen ebenfalls zu einer starken Reaktion. Die Kontrolle zeigt ungefärbte Zellen. Vergrößerung: 200x.*

Die ebenfalls durchgeführte Antikörper-Markierung des Zellantigens PECAM-1 (CD 31) fiel sowohl bei Wildtyp- als auch bei iNOS-knock-out Endothelzellen in allen Verdünnungen (1:10, 1 : 25 und 1: 50) eindeutig negativ aus, auch ohne daß eine Teilanfärbung von Zellen zu beobachten wäre. Es wäre durchaus denkbar, daß durch die Kultivierung der Zellen und den damit verbundenen „künstlichen“ Bedingungen diese spezielle antigene Eigenschaft verloren gegangen ist. Aufgrund der Tatsache, daß CD 31 an interendothelialen Bindungen konzentriert ist, könnte man auch eine zu geringe Zelldichte als Ursache in Betracht ziehen.

3.3 EINFLUß DER ZYTOKINE AUF DIE EXPRESSION UND AKTIVIERUNG DER INDUZIERBAREN NO-SYNTHASE

Ziel dieser Versuche war es, eine maximale iNOS-Aktivität der Endothelzellen zu induzieren, um in weiteren Versuchen den Einfluß endogener NO-Produktion auf den UVA-vermittelten Zelltod studieren zu können. Wie bereits von verschiedenen Autoren beschrieben (129, 210), so sollte auch hier die iNOS-Expression und Aktivität durch Aktivierung mit einzelnen Zytokinen oder Kombinationen verschiedener Zytokine erreicht werden, wie in Material und Methoden angegeben.

Als Maßstab für die Aktivität der endothelialen iNOS wurde in Kulturüberständen die Nitrit-Konzentration mit Hilfe der Griess-Reaktion bestimmt. Die Messung des stabilen Endprodukts Nitrit aus der Reaktion von NO mit Sauerstoff stellt einen indirekten und sicheren Parameter für die ursprünglich gebildete NO-Menge dar (211, 212). Des weiteren wurde der NO-Synthase-Hemmstoff L-N⁵-(1-iminoethyl)-ornithin (NIO) eingesetzt, der sowohl die Aktivität der konstitutiven als auch der induzierbaren NO-Synthase irreversibel hemmt (213-215).

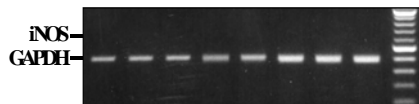
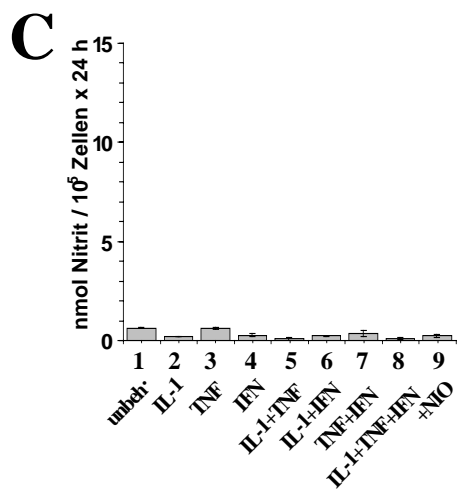
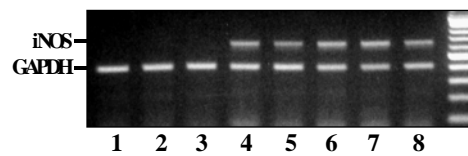
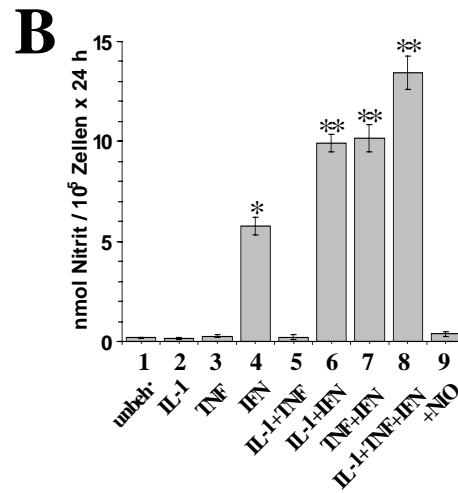
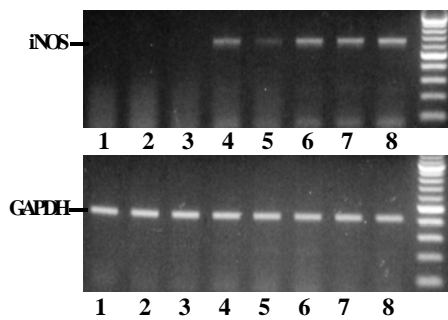
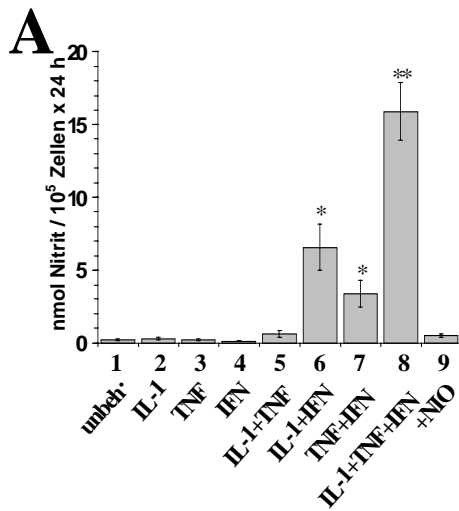
Abbildungen 7A-C: Zytokin-Aktivierung von wt EC führt zur Expression von iNOS-mRNA und NO-Produktion:

Abb. 7A: Kultivierte wt Endothelzellen wurden mit unterschiedlichen Zytokinen in einer Konzentration von je 500 U/ml für 24 h inkubiert. Im Anschluß wurde mittels Griess-Reaktion die Nitrit-Konzentration im Überstand bestimmt und über die RT-PCR die spezifische iNOS- und GAPDH-mRNA nachgewiesen. Die Zytokin-Kombinationen IL-1 β +IFN- γ , TNF- α +IFN- γ und IL-1 β +IFN- γ +TNF- α führten zu einer signifikanten (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$) NO-Produktion, die durch zusätzliche Inkubation mit NIO (0,25 mM) vollständig (** $p < 0,005$) inhibiert werden konnte. Ein spezifisches iNOS-mRNA-Produkt konnte nach Inkubation mit IFN- γ allein und nach Inkubation mit den Zytokin-Kombinationen IL-1 β +IFN- γ , TNF- α +IFN- γ und IL-1 β +IFN- γ +TNF- α nachgewiesen werden. Ruhende wt Zellen zeigen weder eine iNOS-Expression noch eine NO-Produktion. Die GAPDH-mRNA zeigte als expressionsstabiles Kontroll-Gen eine gleichmäßige Signal-Intensität.

Abb. 7B: Unter gleichen Versuchsbedingungen aber mit LPS-verunreinigtem Kulturmedium (0,4 ng/ml) zeigte sich eine signifikante NO-Produktion und ein iNOS-spezifisches Amplifikationsprodukt nach Inkubation mit IFN- γ . Zusätzlich läßt sich nach Inkubation mit und IL-1 β +TNF- α eine spezifische iNOS-mRNA nachweisen, aber keine NO-Produktion.

(* $p < 0,005$ gegenüber ruhenden Zellen, ** $p < 0,005$ gegenüber ruhenden Zellen und $p < 0,05$ gegenüber IFN-aktivierten Zellen, *** $p < 0,005$ gegenüber aktivierten Zellen mit IL-1 β + TNF- α + IFN- γ).

Abb. 7C: iNOS-ko EC zeigen weder im ruhenden noch im Zytokin-aktivierten Zustand eine iNOS-Expression oder eine NO-Produktion. Die gezeigten Daten entsprechen den Mittelwerten aus drei unabhängigen Versuchen und deren Standardabweichung.



Neben den Zytokinen spielen die proinflammatorischen Lipopolysaccharide (LPS) eine bedeutsame Rolle bei der Aktivierung der iNOS (216). In der folgenden Versuchsserie konnten wir zeigen, dass eine ca. 5-fache Erhöhung des LPS-Gehalts im Kulturmedium, entstanden durch eine leichte LPS-Kontamination der FCS-Charge (Endotoxingehalt von 2,4 ng/ml FCS versus 0,48 ng/ml FCS), zu Veränderungen im iNOS-Expressionsprofil führen können.

3.3.1 NACHWEIS DER iNOS-mRNA IN ZYTOKIN-AKTIVIERTEN ENDOTHELZELLEN

In dieser ersten Versuchserie wurde die iNOS-mRNA nach 24-stündiger Zytokin-Inkubation bestimmt. Die hier eingesetzten Zytokine Interferon- γ (IFN- γ), Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) und Interleukin-1 β (IL-1 β) zählen zu den TH1-Lymphokinen, welche bekanntermaßen zu einer Aktivierung der iNOS in murinen Zellen führen (217).

Die Expression der iNOS-mRNA wurde mit Hilfe der spezifischen RT-PCR nachgewiesen wie in Material und Methoden beschrieben. Untersucht wurde die RNA von iNOS knock-out und Wildtyp-Endothelzellen im ruhenden Zustand oder nach Inkubation mit einzelnen Zytokinen oder bestimmten Zytokin-Kombinationen. Als Kontrolle erfolgte parallel für jede der untersuchten RNA-Proben die spezifische Amplifikation der GAPDH-mRNA.

Bei den Wildtyp-Endothelzellen der Maus konnte ein iNOS spezifisches Amplifikationsprodukt nach Induktion mit IFN- γ allein, sowie mit allen Kombinationen, in denen IFN- γ enthalten war, gefunden werden (Abb. 7A).

Durch den Einsatz eines Kulturmediums mit ca. fünffach erhöhtem LPS-Gehalt (Endotoxingehalt ca. 0,4 ng/ml) entstand unter ansonsten gleichen Versuchsbedingungen ein weiteres iNOS-mRNA spezifisches Amplifikationsprodukt nach Inkubation mit der Zytokin-Kombination IL-1 β + TNF- α (Versuchsbedingung Nr. 5 in Abbildung 7B). Daß die relativ geringe LPS-Konzentration nicht für eine Zytokin-unabhängigen iNOS-Expression ausreichend ist, zeigt die fehlende iNOS-Bande bei den ruhenden Zellen sowie nach Einzel-Zytokin-Inkubation mit IL-1 β oder TNF- α (Versuchsbedingung Nr. 1-3 in Abbildung 7B). Endotoxin spielt somit in dieser Konzentration eine Rolle als Ko-Aktivatoren der iNOS-Expression der Endothelzellen.

Sowohl bei ruhenden und Zytokin-aktivierten iNOS knock-out Endothelzellen ebenso wie bei ruhenden Wildtyp-Zellen konnte keine iNOS-mRNA nachgewiesen werden (Abb. 7C).

3.3.2 NITRIT-KONZENTRATION IM ÜBERSTAND VON WILDTYP-ZELLKULTUREN IN ABHÄNGIGKEIT VON DER ZELLZAHL UND DER MENGE AN ÜBERSTAND

Durch Veränderung der Zahl der eingesetzten Zellen und der Menge des Kulturüberstandes sollte in diesem Vorversuch nach den optimalen Bedingungen für die NO-Produktion durch die Wildtyp-Zellen gesucht werden.

Es zeigte sich (Abb. 8), dass 24 Stunden nach Aktivierung durch die Dreifach-Kombination mit den Zytokinen IL-1 β , TNF- α und IFN- γ bei einer Menge von 500 μ l, 750 μ l und 1000 μ l Überstand pro well auf 12-well-Kulturplatten eine lineare Korrelation zwischen der Nitritmenge und der Zellzahl besteht. Der Nitritgehalt erreicht bei 1000 μ l Kulturüberstand die höchsten Werte und liegt bei 10^5 eingesetzten Zellen bei 18,8 nmol. Bei Einsatz von 250 μ l Kulturmedium zeigt sich nach anfänglich linearem Anstieg der Nitritmenge mit steigender Zellzahl eine Sättigung der Nitrit-Bildung ab einer Zellzahl von 6×10^4 . Die maximale Nitritmenge beträgt hier bei 1×10^5 eingesetzten Zellen nach 24 Stunden nur 8,3 nmol Nitrit.

In der Zusammenfassung der Daten stellt sich somit die Menge des Überstandes ab 500 μ l pro well für die NO-Produktion von bis zu 10^5 Endothelzellen als ausreichend dar. Die Frage nach der Ursache für die auftretende Sättigung der Nitrit-Konzentration bei 250 μ l Überstand pro well läßt sich aus den Meßwerten dieses Versuches allein nicht eindeutig beantworten: Sie könnte zum einen in dem limitierten Angebot an Substrat und weiteren Faktoren für die NO-Synthasen begründet liegen zum anderen kann aber auch eine hemmende Wirkung auf die NO-Synthasen durch die hohen NO oder Nitrit-Konzentrationen im Überstand nicht ausgeschlossen werden. Wie bereits von Park et al. beschrieben, kann NO die transkriptionelle Induktion der iNOS hemmen (218).

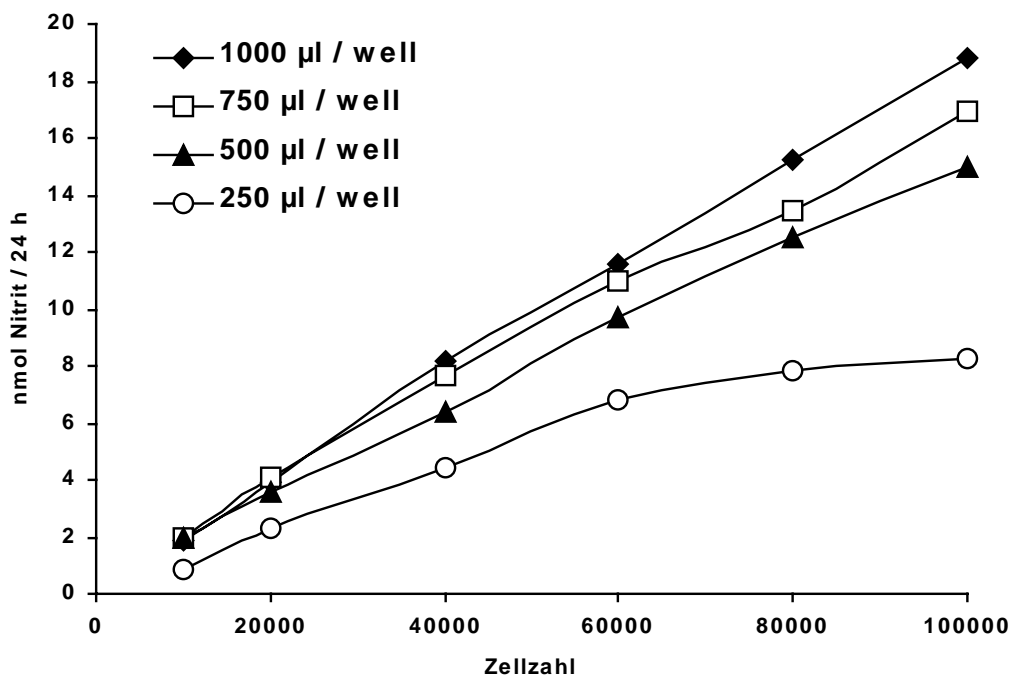


Abbildung 8: *Aktiviert Wildtyp-Endothelzellen produzieren NO in Abhängigkeit von der Zellzahl und der Menge an Kulturüberstand: Gezeigt wird die Nitrit-Menge im Überstand 24 Stunden nach Aktivierung der Endothelzellen mit je 500 U/ml der Zytokine IL-1 β + TNF- α + IFN- γ . Variiert wird einerseits die Zahl der pro well eingesetzten Zellen, sowie die Menge an Kulturüberstand (12-well-Platten).*

3.3.3 NITRIT-KONZENTRATION IN ZYTOKIN-/LPS-AKTIVIERTEN iNOS KNOCK-OUT UND WILD-TYP-ENDOTHELZELL-KULTUREN

Bei den Wildtyp-Endothelzellen zeigt sich in Abhängigkeit vom Lipopolysaccharid (LPS) -Gehalt des Zellmediums ein unterschiedliches Aktivitätsmuster (Abb. 7 A und 7B): Während sich bei niedrigem LPS-Gehalt (ca. 0,08 ng/ml Überstand) der Nitritgehalt bei der Inkubation mit einzelnen Zytokinen nicht signifikant vom Medium-Referenzwert ruhender Zellen unterscheidet, findet

sich bei höherem LPS-Gehalt (ca. 0,4 ng/ml Überstand) und Inkubation mit 500 U/ml IFN- γ eine iNOS-Aktivierung im Sinne einer signifikanten ($p < 0,005$ im Vergleich zu ruhenden Zellen) und nahezu halbmaximalen NO-Produktion ($5,8 \pm 0,4$ nmol Nitrit). Auch bei den Zytokin-Kombinationen IFN- γ + IL-1 β und IFN- γ + TNF- α zeigen sich leichte Unterschiede: Zwar führen beide Zytokin-Kombinationen im Vergleich zum jeweiligen Medium-Referenzwert zu einer signifikant erhöhten Nitritbildung, verglichen mit den jeweiligen Maximalwerten ist diese jedoch im LPS-„verunreinigtem“ Medium deutlich höher. In LPS-„verunreinigtem“ Medium konnte somit durch die Kombination von IFN- γ und einem zweiten Zytokin (TNF- α oder IL-1 β) eine signifikante ($p < 0,05$) Verstärkung der NO-Bildung verglichen mit IFN- γ als Einzelstimulus beobachtet werden. In beiden Versuchskonstellationen wurden maximale Werte bei den Zellen gemessen, die mit einer Kombination aus allen drei Zytokinen vorbehandelt worden waren, wobei der höhere LPS-Gehalt im Überstand dann zu keiner weiteren Steigerung der NO-Synthase Aktivität führte. Durch Koinkubation mit 0,25 mM NIO konnte in beiden Fällen die NO-Produktion nahezu auf den Ausgangswert (ohne Zytokine) gedrosselt werden. Ruhende Zellen produzieren über ihre konstitutive NO-Synthase eine kaum detektierbare Nitritmenge von $0,2 \pm 0,1$ nmol. Der erhöhte LPS-Gehalt des Serums reichte nicht aus, eine iNOS-Expression in Abwesenheit von Zytokinen zu induzieren (vgl. RT-PCR).

Die Ergebnisse der RT-PCR und der Griess-Reaktion zeigen eine Differenz zwischen iNOS-mRNA-Expression und iNOS-Aktivität der Wildtyp-Zellen: Zwar konnte in der Probe, die zuvor mit dem Zytokin IFN- γ inkubiert worden war, ein spezifisches iNOS-mRNA-Amplifikationsprodukt gefunden werden, dies führte jedoch nicht zu einer signifikanten NO-Produktion (Nitritmenge: $0,1 \pm 0,03$ nmol).

Zu einem ähnlichen Phänomen kommt es auch bei Wildtyp-Zellen mit erhöhtem LPS-Gehalt im Überstand: Nach Inkubation mit der Zytokin-Kombination IL-1 β + TNF- α kommt es trotz positiver Reaktion mit dem iNOS-spezifischen Primer zu keinen signifikant erhöhten Nitritwerten. Hier drängt sich die Frage nach der Stabilität der iNOS-mRNA auf, der durch Nachweis des iNOS-Proteins nachgegangen werden könnte.

iNOS-knock out Zellen zeigen unter gleichen Bedingungen im unbehandelten Zustand eine sehr geringe NO-Produktion mit einem Nitritgehalt im Überstand von $0,6 \pm 0,1$ nmol (Abb. 7C). Die NO-Produktion der iNOS-knock out Zellen läßt sich durch Zytokin-Inkubation nicht beeinflussen (Nitritmenge zwischen 0,1 und 0,6 nmol), wie es aufgrund der fehlenden iNOS-mRNA-Expression zu erwarten war. Der fehlende Nachweis der iNOS-mRNA sowie die ausbleibende starke NO-Produktion sprechen dafür, daß es sich in der Tat um iNOS $-/-$ Zellen handelt und daß es in der Zellkultur zu keiner Kontamination mit iNOS exprimierenden Fremdzellen gekommen ist.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß es durch die synergistische Wirkung von IL-1 β + IFN- γ und TNF- α + IFN- γ sowie nach Erhöhung der LPS-Konzentration auch durch die alleinige Inkubation mit IFN- γ zu einem signifikanten Anstieg der NO-Produktion kommt. Eine optimale Aktivierung der

Wildtyp-Zellen im Sinne einer maximalen NO-Produktion konnte durch die Kombination der drei Zytokine IL-1 β + TNF- α + IFN- γ erreicht werden, die zu einer maximalen Nitritmenge von $15,9 \pm 2,0$ nmol führte.

3.3.4 NO-PRODUKTION ZYTOKIN-AKTIVIERTER WILD-TYP-ZELLEN BEI ERHÖHTEM ARGININ-ANGEBOT

Um die NO-Produktion der Wildtyp-Endothelzellen noch weiter zu steigern, wurde in einem anderen Versuch die Aminosäure Arginin und damit das Substrat-Angebot für die induzierbare NO-Synthase im Überstand erhöht.

Zeitgleich mit der maximalen Aktivierung der Endothelzellen durch die Zytokinkombination IL-1 β + TNF- α + IFN- γ (je 500 U/ml) wurde dem Medium 5 mM bzw. 10 mM Arginin hinzugefügt; als Referenzwert dienten aktivierte Zellen ohne weiteren Argininzusatz. Ebenso wurde mit ruhenden Zellen verfahren.

Wie Abbildung 9 demonstriert, konnte durch eine Erhöhung des Arginin-Gehalts im Kulturmedium weder im ruhenden noch im maximal aktivierten Zustand der Zellen eine Steigerung der NO-Produktion erzielt werden. Die Aktivierung der Endothelzellen ohne zusätzliches Arginin führte hier zu einer Nitrit-Konzentration von $18,5 \pm 0,56$ nmol versus $0,5 \pm 0,1$ nmol im ruhenden Zustand.

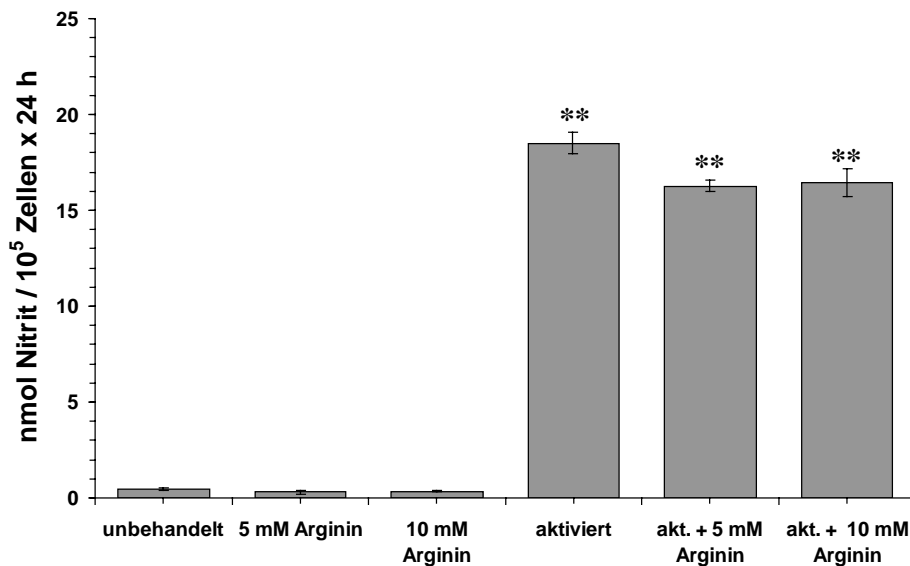


Abbildung 9: Die Erhöhung des Arginin-Angebotes führt zu keiner Steigerung der NO-Produktion bei aktivierten wt-Endothelzellen: Aufgeführt ist die Nitritmenge in nmol/10⁵ Zellen, die innerhalb von 24 Stunden von ruhenden und Zytokin-aktivierten Zellen (unter Zugabe der Zytokine TNF- α , IFN- γ und IL-1 β ; je 500 U/ml) gebildet wird. Die 600 μ l Überstand/well werden zusätzlich mit 0 mM, 5 mM und 10 mM Arginin versetzt. Die Arginin-Stammlösung wurde mit HCl auf einen pH von 7,4 titriert. Mittelwert und Standardabweichung beruhen auf 4 bzw. 8 Versuchen (** $p < 0,005$ gegenüber ruhenden Zellen).

3.4 TOXIZITÄT VON DETA-NO AUF INOS KNOCK-OUT UND WILDTYP-ENDOTHELZELLEN

DETA-NO ist ein NO-Donor aus der Gruppe der Polyamin/NO-Komplexe, welche in Lösung unter physiologischen Bedingungen spontan NO freisetzen (182), ohne jedoch gleichzeitig Sauerstoff-Radikale zu generieren. Der NO-Donor DETA-NO zeichnet sich durch einfache Handhabung, eine lange Halbwertszeit von 7,7 Stunden (219, 220) und eine spontane NO-Freisetzung mit einer vorhersagbaren Kinetik erster Ordnung aus und gewährleistet somit eine kontinuierliche, der iNOS ähnlichen NO-Freisetzung über viele Stunden.

Da bei Einsatz von exogenen NO-Donoren zytotoxische Effekte beobachtet werden können (221) und verschiedene Zelltypen sowie Zellen verschiedener Spezies unterschiedlich suszeptibel gegenüber der toxischen Wirkung von NO sind, sollte in diesem Versuch zunächst das toxische Potential von DETA-NO gegenüber iNOS knock-out und Wildtyp-Endothelzellen überprüft werden.

Hierfür wurden beide Endothelzellkulturen für 24-Stunden mit DETA-NO bzw. der Kontroll-Substanz DETA in verschiedenen Konzentrationen zwischen 10 und 1000 μM inkubiert. Mit der Neutralrotfärbung wurde anschließend die relative Zahl der vitalen Zellen ermittelt und in Beziehung zu mitgeführten unbehandelten Endothelzellen gesetzt.

Bei der Inkubation von Wildtyp-Endothelzellen mit DETA-NO (Abb. 10) führten Konzentrationen von mehr als 33 μM zu einer linearen Abnahme der relativen Zahl an vitalen Zellen. 1 mM DETA-NO führte nach 24 Stunden zum Zelltod von $47,9 \% \pm 12,6\%$ der Zellen. Ab einer Konzentration von 100 μM DETA-NO unterschieden sich die Zellzahlen signifikant von den Zahlen, die nach Inkubation mit DETA oder bei unbehandelten Zellen gemessen wurden. Die Inkubation mit DETA führte zu keinen signifikanten Veränderungen der Zellzahl. Somit liegt ein NO-vermittelter Zelltod vor.

iNOS knock-out Endothelzellen reagieren im Bereich subtoxischer DETA-NO-Konzentrationen bereits auf geringere NO-Konzentrationen mit einer Wachstumshemmung. Ab 33 μM DETA-NO kommt es zu einem signifikanten ($p < 0,05$) Zelluntergang im Vergleich zur Inkubation mit DETA gleicher Konzentration (Abb. 10). Die halbmaximale Toxizität liegt bei den iNOS knock-out Endothelzellen bei ca. 100 μM DETA-NO und damit bei einer 10fach niedrigeren Konzentration als bei der Wildtyp-Variante. Nach Inkubation mit DETA zeigten sich ebenso wie bei den Wildtyp-Zellen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Zellzahl im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

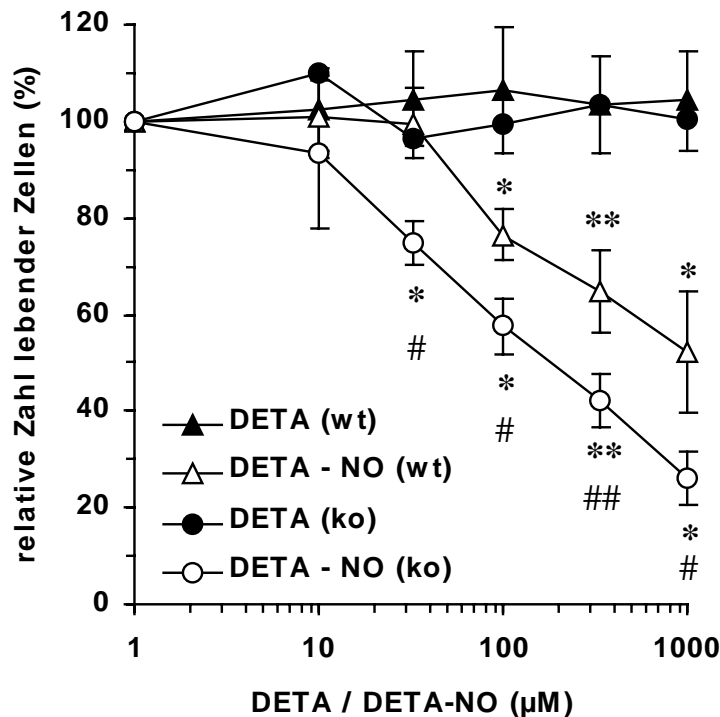


Abbildung 10: Die toxische bzw. wachstumshemmende Wirkung von DETA-NO ist NO-spezifisch - iNOS knock-out Endothelzellen sind sensibler gegenüber exogenem NO als Wildtyp-Endothelzellen: Wildtyp-Aortenendothelzellen sowie iNOS-knock-out Zellen wurden mit aufsteigenden Konzentrationen an DETA bzw. DETA-NO (jeweils zwischen 0 - 1000 μM) für 24 h inkubiert. Dargestellt ist die relative Zahl lebender Zellen gemittelt aus vier unabhängigen Versuchen einschließlich St.abw. mit * $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ (DETA-NO versus DETA) und # $p < 0,05$, ## $p < 0,005$ (wt-EC versus ko-EC).

Neben der quantitativen Toxizität von DETA-NO auf iNOS knock-out und Wildtyp-Endothelzellen sollte auch die Art des Zelltodes untersucht werden. Hierzu wurden die Zellen zunächst 24 Stunden mit DETA-NO bzw. DETA in hohen Konzentrationen (1 mM) inkubiert und anschließend simultan mit den Fluoreszenzfarbstoffen Hoechst 33342 und Propidiumiodid, sowie in einem getrennten Ansatz mit Acridinorange inkubiert.

Die Inkubation der iNOS knock-out Endothelzellen mit DETA-NO führte zum apoptotischen Zelltod (Abb. 11). In den Färbungen mit Hoechst sowie mit Acridinorange wurden viele Zellen mit einer Chromatin-Kondensation und Kernfragmentierung beobachtet. Dieselben Zellen wurden mit Propidiumiodid nicht angefärbt, was ebenfalls einen nekrotischen Zelltod ausschließt.

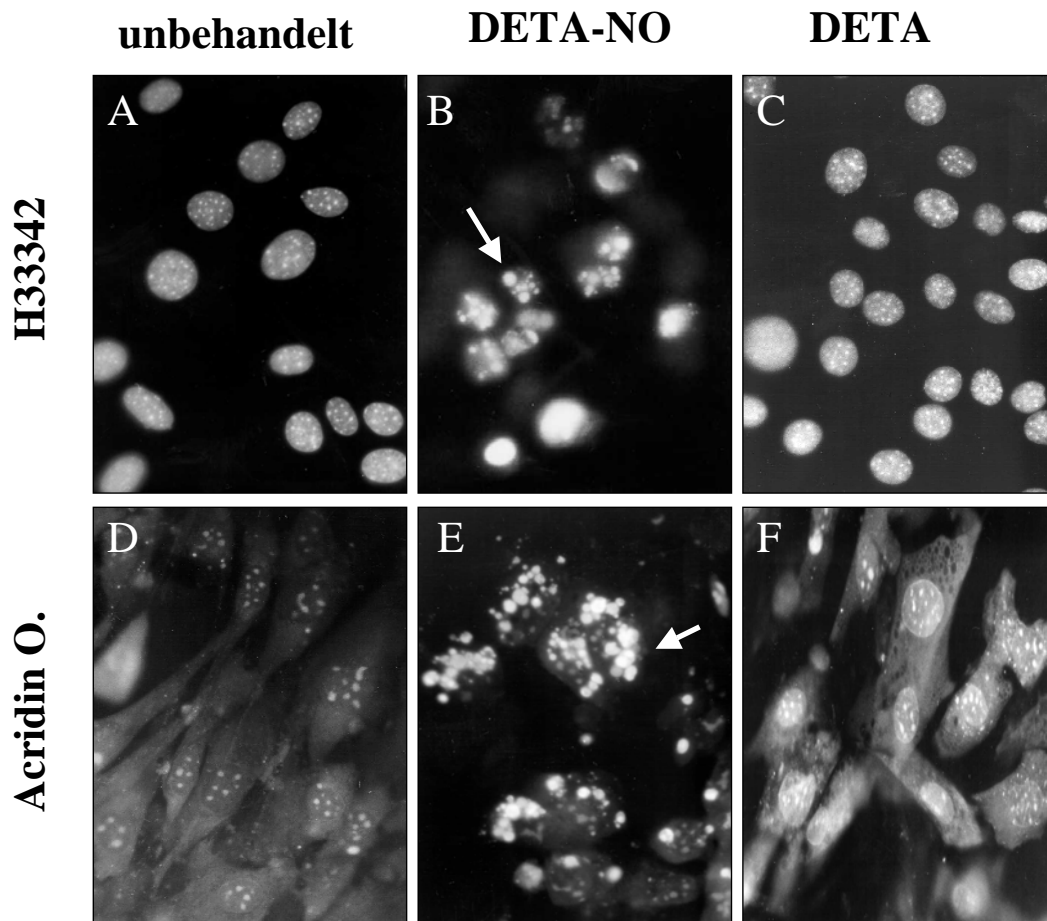


Abbildung 11: Toxische NO-Konzentrationen führen zu typischen apoptotischen Kernveränderungen (Chromatinkondensation und -fragmentierung) bei ko und wt EC

Gezeigt werden exemplarisch die Ergebnisse der Fluoreszenzfärbungen Hoechst 33342 (9 mM) und Acridinorange (10 μ M) 24 h nach Inkubation der Wildtyp-Endothelzellen mit DETA-NO bzw. DETA (je 1 mM). Die NO-behandelten Zellen (B + E) weisen eine Chromatin-Kondensation und Kernfragmentierung auf (Pfeil). A + D zeigen unbehandelte Endothelzellen.

3.5 BESTRAHLUNG MIT UVA₁

Die folgenden Versuche sollen den Einfluß von iNOS-generiertem NO auf UVA-induzierte Zytotoxizität bei Endothelzellen untersuchen.

Hierzu wurden 7×10^4 Aortenendothelzellen pro well auf 12-well-Kulturplatten zur Adhärenz gebracht und nach 48 Stunden mit UVA₁ unterschiedlicher Intensität bestrahlt. Um die Auswirkungen von NO auf die UVA-induzierte Toxizität darzustellen, wurde die iNOS durch Zugabe von Zytokinen induziert oder durch Arginin-Analoga gehemmt. Nach 24 Stunden wurde ebenfalls mittels der Neutralrot-Vitalfärbung die relative Anzahl der lebenden Endothelzellen bestimmt. Dabei wurden in parallelen Ansätzen Aortenendothelzellen aus iNOS knock-out oder Wildtyp-Mäusen eingesetzt.

3.5.1 BESTRAHLUNG UNBEHANDELTEN ZELLEN

Die Bestrahlung mit UVA₁ führte sowohl bei Wildtyp- als auch bei iNOS-ko Endothelzellen zu einer von der Strahlungsintensität abhängigen, linearen Abnahme der relativen vitalen Zellzahl (Abb. 12). Die halbmaximale Toxizität (50% tote Zellen im Vergleich zu unbestrahlten Zellen) liegt bei Wildtyp- und iNOS knock-out Endothelzellen bei einer Strahlungsintensität von ca. 30 Joule/cm². 24 Stunden nach maximaler Bestrahlung mit 45 Joule/cm² lebten noch $17,5 \pm 14,1$ % (ko) bzw. $25,5 \pm 7$ % (wt) der unbestrahlten Zellen (=100%). Insgesamt zeigten sich in den Versuchen mit $n = 24$ (wt) und $n = 18$ (ko) keine signifikanten Unterschiede in der Sensibilität der iNOS knock-out und Wildtyp-Endothelzellen gegenüber der UV-Strahlung.

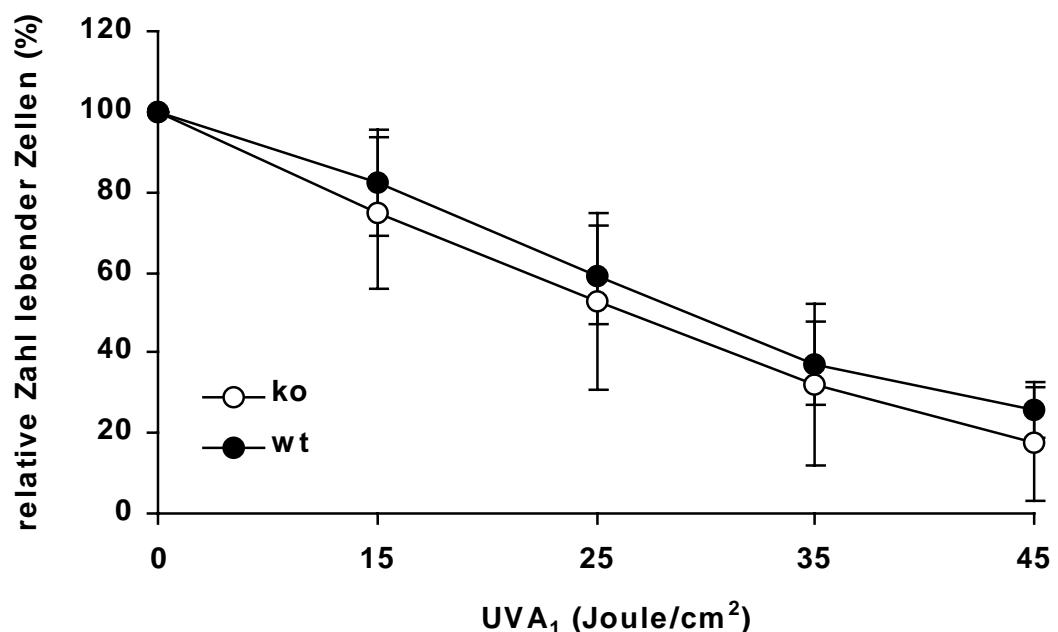


Abbildung 12: UVA₁-Bestrahlung von Wildtyp- und iNOS knock-out Aortenendothelzellen führt dosisabhängig zum Zelltod: Unbehandelte Wildtyp- (wt) und iNOS knock-out (ko) Aortenendothelzellen wurden mit ansteigenden Intensitäten UVA₁ bestrahlt. Die relative Anzahl lebender Zellen wurde 24 Stunden nach der Exposition mit UVA₁ mit Hilfe der Neutralrotfärbung ermittelt und im Vergleich zu unbestrahlten Zellen (0 Joule/cm²) in Prozent angegeben. Es werden Mittelwert und Standardabweichung aus 24 (wt-Zellen) bzw. 18 (ko-Zellen) unabhängigen Versuchen angegeben.

3.5.2 BESTRAHLUNG NACH AKTIVIERUNG DER iNOS

Die folgenden Versuche mit iNOS knock-out und Wildtyp-Endothelzellen dienten der Klärung der Frage, ob eine Zytokin-Behandlung vor der UVA-Exposition die zytotoxische Wirkung der UVA-Strahlung auf die Zellen modifi-

zieren kann, sowie ob eine iNOS-mediierte NO-Freisetzung als Folge der Zytokin-Aktivierung daran wesentlich beteiligt ist.

Dazu wurden beide Zellpopulationen in identischen Versuchen 24 Stunden mit der Zytokin-Kombination $\text{TNF-}\alpha + \text{IL-1}\beta + \text{INF-}\gamma$ (je 500 U/ml) inkubiert, die, wie bereits gezeigt, zu einer maximalen Aktivität der iNOS führt. Vor der anschließenden Bestrahlung mit UVA_1 wurde die iNOS-Aktivität mittels Griess-Reaktion überprüft. Um Zytokin-spezifische Wirkungen auf die Endothelzellen von der reinen NO-Wirkung unterscheiden zu können, wurden parallel dazu Zellen mit Zytokinen + 0,25 mM des NO-Synthase-Inhibitors NIO inkubiert.

Die Bestrahlung der Zytokin-aktivierten Wildtyp-Endothelzellen, die von einer hohen NO-Freisetzung begleitet war, führte mit steigender UVA_1 -Intensität zu einer linearen Abnahme der Zahl lebender Zellen (Abb. 13A). Die halbmaximale Toxizität wurde bei einer UVA-Strahlung zwischen 30 und 35 Joule/cm² gemessen. Bei einer relativ hohen Streubreite der Meßergebnisse (Standardabweichungen zwischen 3,2 und 17,3%) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Zellzahlen zwischen Zytokin-aktivierten und unbehandelten Endothelzellen. Somit führte die Induktion der iNOS und die damit verbundene NO-Freisetzung zu keiner Beeinflussung des UVA-vermittelten Zelltores. Auch die Zytokin-aktivierten Zellen, deren iNOS-Aktivität durch NIO vollständig supprimiert wurde, zeigten keinen signifikanten Überlebensvorteil im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Ein Einfluß der drei Zytokine auf den Zelluntergang nach UVA-Exposition konnte somit ausgeschlossen werden.

iNOS knock-out Endothelzellen, die mit $\text{TNF-}\alpha + \text{IL-1}\beta + \text{INF-}\gamma$ oder $\text{TNF-}\alpha + \text{IL-1}\beta + \text{INF-}\gamma + \text{NIO}$ inkubiert worden waren, zeigten in der Griess-Reaktion keine erhöhte NO-Produktion. In beiden Fällen kam es unter UVA-Einwirkung steigender Intensität zu einem linear verlaufenden Zelluntergang, der bei 25 Joule/cm² zu einer halbmaximalen Toxizität führte (Abb. 13B). Die Zellzahlen der Zytokin-inkubierten Zellen mit oder ohne NIO verhielten sich identisch. Unbehandelte iNOS knock-out Endothelzellen hingegen zeigten eine stärkere Sensitivität gegenüber der UVA_1 -Strahlung, die zu einer rascheren Abnahme der Zahl lebender Zellen mit einer halbmaximalen Toxizität bei 15 Joule/cm² führte. Signifikante Unterschiede der Zellzahlen zwischen unbehandelten Zellen und Zytokin-aktivierten Zellen mit oder ohne NIO wurden bei Strahlungsintensitäten von 15 , 25 und 35 Joule/cm² gemessen (*p < 0,05). Strahlungsintensitäten von 45 Joule/cm² führten in dieser Versuchsserie bei allen iNOS knock-out Zellen zu einer sehr hohen Toxizität mit Zellzahlen lebender Zellen zwischen 5,0 % \pm 1,8% (unbehandelt) und 12,4% \pm 3,5% (Zytokine + NIO).

Da aufgrund dieser Ergebnisse ein Zytokin-mediiertes Schutz der iNOS knock-out Endothelzellen vor UVA-Schäden durch Induktion von Schutzmechanismen, wie z.B. Hitzeschockproteinen, aber eben nicht NO-vermittelt, vermutet werden darf, sollten mögliche Zytokin-spezifische Wirkungen im einzelnen untersucht werden. Hierzu wurden iNOS knock-out Endothelzellen separat mit $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ oder $\text{INF-}\gamma$ in einer Konzentration von je 500 U/ml inkubiert und nach 24 Stunden mit UVA_1 steigender Intensität bestrahlt (Abb. 13C). Dabei

fürte jedoch keines der einzeln eingesetzten Zytokine zu einem signifikanten Schutz verglichen mit unbehandelten Zellen – entscheidend für die Zellprotektion ist somit das Zusammenwirken der drei Zytokine. Allerdings war in dieser Versuchsserie die sehr hohe Sterberate der iNOS knock-out Zellen nicht mehr zu beobachten, die halbmaximale Toxizität lag bei ca. 30 Joule/cm².

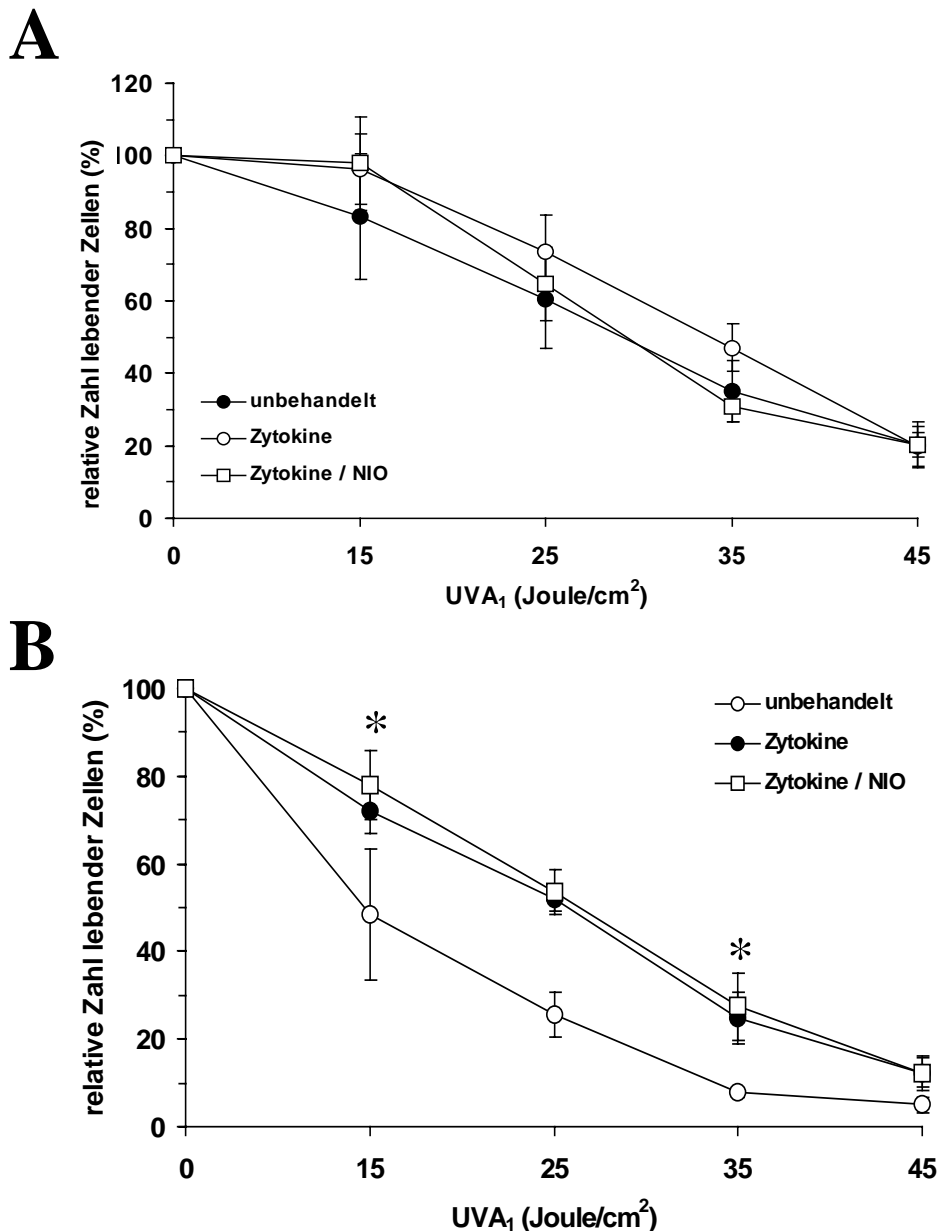


Abbildung 13 A+B: iNOS-Aktivierung schützt nicht vor UVA-Strahlung: Gezeigt wird der Zusammenhang zwischen der Zahl lebender Zellen (%) von Wildtyp- (13A) und knock-out (13B) Endothelzellen und der Intensität der UVA₁ Bestrahlung. Die Zellen wurden vor der Bestrahlung für 24 Stunden mit der Zytokin-Kombination TNF- α + IFN- γ + IL-1 β (je 500 U/ml) inkubiert. Zum Vergleich wurden Zellen neben der Zytokin-Kombination zusätzlich mit 0,25 mM NIO versetzt oder erhielten keinerlei Zusätze. Die Ergebnisse basieren auf drei (ko EC) bzw. vier (wt EC) unabhängigen Experimenten (* $p < 0,05$).

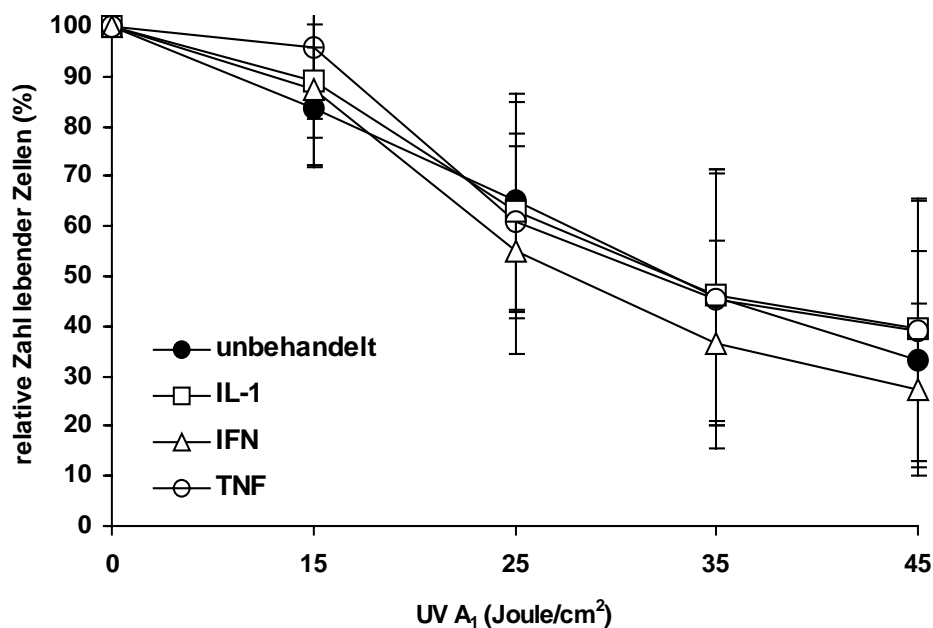


Abbildung 13C: *iNOS knock-out Endothelzellen werden mit einzelnen Zytokinen inkubiert -und anschließend bestrahlt:* Vor der Bestrahlung mit UVA₁ unterschiedlicher Intensität werden iNOS knock-out Endothelzellen mit einem der Zytokine IL-1 β , TNF- α oder IFN- γ (500 U/ml) für 24 Stunden inkubiert. Gezeigt sind die Ergebnisse der Neutralrotfärbung als relative Zellzahl (%) im Vergleich zu unbestrahlten Zellen aus drei unabhängigen Versuchen.

3.5.3 BESTRAHLUNG VON ENDOTHELZELLEN BEI GLEICHZEITIGER HEMMUNG DER NO-SYNTHASSEN

Bei der Frage nach dem Einfluß von NO auf den UVA-vermittelten Zelltod, muß man berücksichtigen, daß neben der iNOS-medierten NO-Produktion auch die konstitutiv exprimierte NO-Synthase (eNOS), die zur Aufrechterhaltung eines basalen NO-Spiegels beiträgt, an NO-vermittelten Schutzmechanismen Anteil haben könnte.

Um eNOS-vermittelte Effekte erfassen zu können, sollte versucht werden, durch kontinuierliche Inkubation der iNOS knock-out und Wildtyp-Endothelzellen mit dem NO-Synthase Hemmstoff NIO in einer Konzentration (0,25 mM), die sich als ausreichend zur Hemmung der iNOS nach maximaler Zytokin-Aktivierung erwiesen hatte, sowohl die konstitutive als auch die induzierbare NO-Synthase möglichst vollständig in ihrer Aktivität zu hemmen. Nach dem Sistieren jeglicher NO-Produktion sollten beide Endothelzellpopulationen mit UVA₁ steigender Intensität bestrahlt werden. Die vollständige Unterdrückung der NO-Bildung, die durch Inkubation mit NIO 24 Stunden vor, während und nach der Bestrahlung gewährleistet werden sollte, ließ sich jedoch mittels Griess-Reaktion aufgrund der zu geringen Sensitivität der Methode nicht nachweisen. Die Nitrit-Konzentrationen der unbehandelten Zellen sind

nicht signifikant verschieden von den Nitrit-Werten der mit NIO behandelten Zellen (Daten nicht gezeigt).

Da die konstitutive und induzierbare Isoform der NO-Synthase ein unterschiedliches Bindungsverhalten bezüglich L-Arginin und Argininanaloge aufweisen, sollte die Rolle der iNOS bzw. eNOS in der UVA-induzierten Toxizität ferner durch den Gebrauch eines weiteren NOS-Inhibitors untersucht werden. NG-monomethyl-L-arginin (L-NMMA) hemmt sowohl kompetitiv als auch kovalent (irreversibel) bevorzugt die Aktivität der konstitutiven und in geringerem Maße die der induzierbaren NO-Synthase (222, 223).

Die Ergebnisse in der Neutralrot-Färbung ergaben, daß unbehandelte Wildtyp-Endothelzellen eine nahezu identische Sensibilität bezüglich UVA-induzierter Toxizität aufweisen wie diejenigen Zellen, deren NO-Produktion mittels NIO unterdrückt wurde (Abb. 14A). Bei einer halbmaximalen Toxizität bei ca. 25 Joule/cm² und Zellzahlen von 24,2 % \pm 5% bei maximaler Strahlungsintensität (45 Joule/cm²) sowohl bei unbehandelten Zellen als auch nach Inkubation mit NIO ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Anzahl lebender Zellen.

Auch der L-Arginin analoge NOS-Inhibitor L-NMMA, der in einem einzelnen Experiment bei Wildtyp-Endothelzellen in der Konzentration von 1 mM ebenfalls vor, während und nach der Bestrahlung mit UVA₁ eingesetzt wurde, führte zu keiner Änderung der Zellzerstörung verglichen mit unbehandelten Zellen (Abb. 14B).

iNOS knock-out Zellen scheinen trotz Hemmung der eNOS mittels NIO ebenfalls eine verglichen mit unbehandelten Zellen unveränderte Abnahme der vitalen Zellen nach UVA-Exposition aufzuweisen (Abb. 14C). Eine definitive Aussage kann hier nicht getroffen werden, da nur ein einzelnes Experiment mit iNOS knock-out Endothelzellen durchgeführt wurde.

In der Zusammenfassung zeigen die Ergebnisse, daß die Unterdrückung der iNOS und eNOS-Aktivität durch den NOS-Hemmstoff NIO keinen Einfluß auf die UVA-induzierte Zellzerstörung bei Wildtyp- und möglicherweise auch bei iNOS knock-out Endothelzellen aufweist. Der Einsatz des Arginin-Analogons L-NMMA bestätigt dies.

3.5.4 BESTRAHLUNG VON WILDTYP-ENDOTHELZELLEN NACH VORINKUBATION MIT EXOGENEM NO

Der Einsatz von chemischen NO-freisetzenden Verbindungen wie beispielsweise DETA-NO ermöglicht über eine einfache und kontrollierte Exposition von Zielzellen mit NO die in vitro Analyse von NO-medierten Effekten und insbesondere einer simulierten iNOS-Aktivität. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, daß exogenes NO in beliebig hoher Konzentration eingesetzt werden kann. Nachdem eine maximale endogene NO-Produktion über eine Aktivierung der

iNOS zu keinen Auswirkungen auf UVA-medierte Zytotoxizität geführt hatte und es denkbar ist, daß diese (natürliche) iNOS-Aktivität nicht ausreichend war, sollten in den folgenden Versuchen iNOS knock-out und Wildtyp-Endothelzellen mit exogenem NO inkubiert werden.

Zunächst wurden Wildtyp-Endothelzellen 24 Stunden vor der Bestrahlung mit UVA₁ mit unterschiedlichen Konzentrationen von DETA-NO (10µM, 33µM und 100 µM) bzw. zur Kontrolle mit 100 µM DETA inkubiert. Höhere Konzentrationen von DETA-NO hatten, wie bereits gezeigt, nach 24-stündiger Inkubation eine signifikante Apoptose zur Folge.

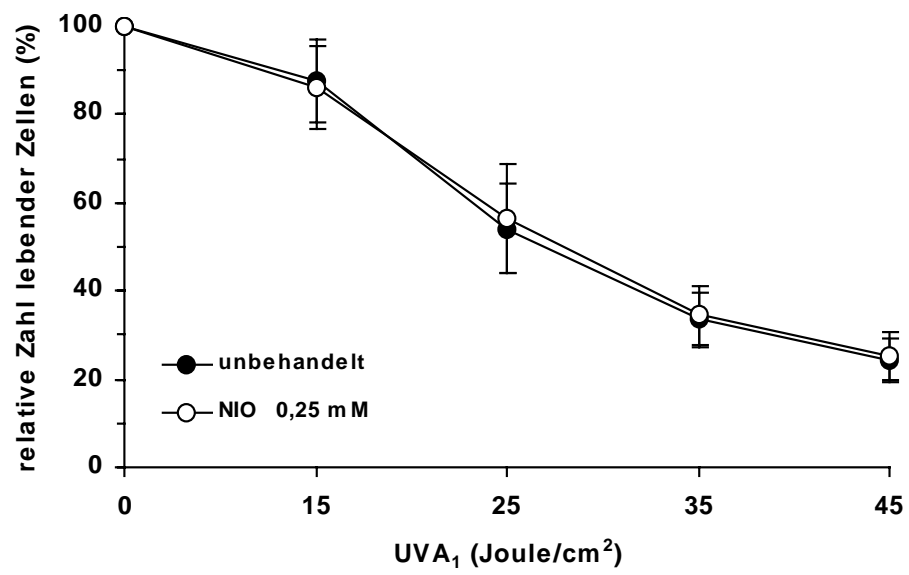
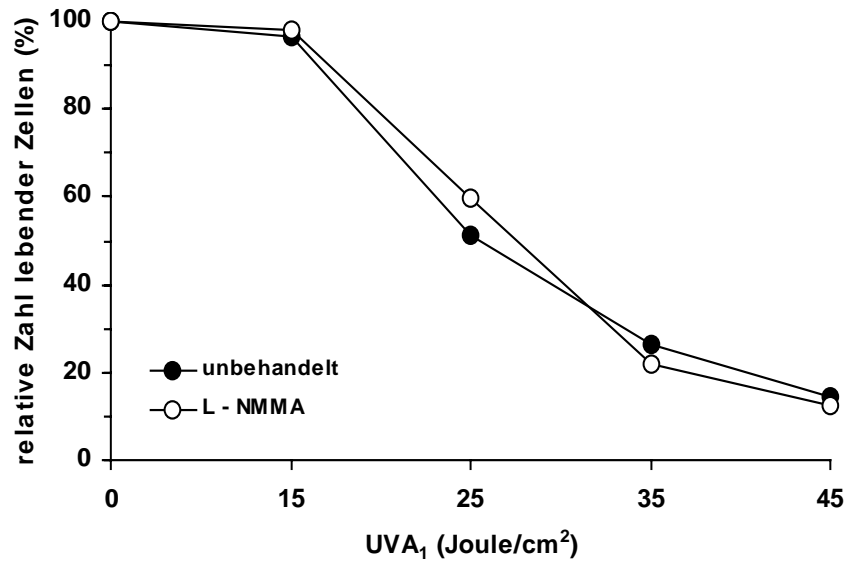
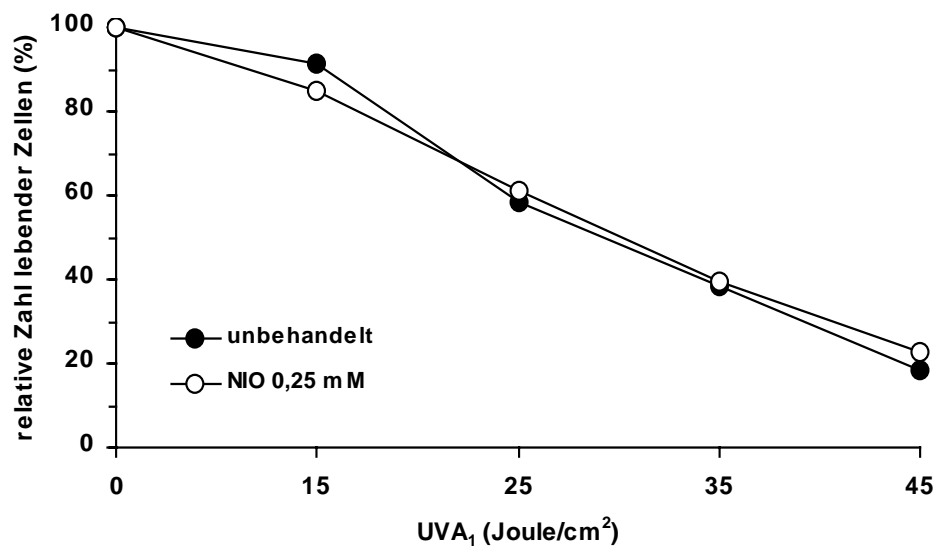
Verglichen mit unbehandelten Zellen führte die Vorinkubation der Wildtyp-Endothelzellen mit DETA-NO zu keiner signifikanten Änderung der Zytotoxizität nach der UVA-Bestrahlung (Abb. 15).

Abbildung 14 A+B+C: Die Hemmung der NO-Synthasen führt zu keiner veränderten Reaktion auf die Bestrahlung mit UVA₁:

Abb. 14 A: Wildtyp-Endothelzellen wurden mit 0,25 mM NIO inkubiert und nach 24 h mit UVA₁ der Intensitäten 0, 15, 25, 35 und 45 Joule/cm² bestrahlt. Während und auch nach der Bestrahlung bis zur Lyse der Zellen nach weiteren 24 h bei der Neutralrotfärbung wird der Zellüberstand erneut mit 0,25 mM NIO versehen. Gezeigt wird hier die relative Zellzahl der mit NIO behandelten Zellkulturen im Vergleich zu unbehandelten Zellen als Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen.

Abb. 14 B: Wildtyp-Endothelzellen wurden vor, während und nach der Bestrahlung mit UVA₁ mit 1 mM L-NMMA inkubiert oder blieben unbehandelt. 24 Stunden nach der UVA-Exposition wurde anhand eines Versuches die relative Anzahl lebender Zellen mit Hilfe der Neutralrot Vitalfärbung bestimmt.

Abb. 14 C: iNOS knock-out Endothelzellen wurden mit 0,25 mM NIO inkubiert und nach 24 h mit UVA₁ bestrahlt. Während und auch nach der Bestrahlung bis zur Lyse der Zellen nach weiteren 24 h bei der Neutralrotfärbung wird der Zellüberstand erneut mit 0,25 mM NIO versehen (n=1).

A**B****C**

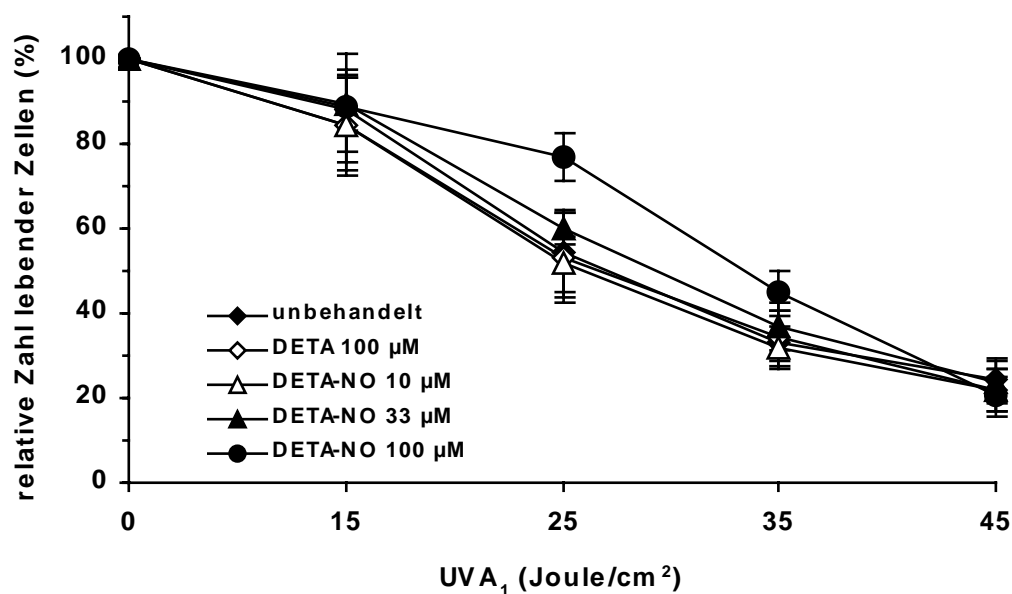


Abbildung 15: *Die Vorinkubation der Wildtyp-Zellen mit exogenem NO zeigt keine Auswirkungen auf den UVA bedingten Zelltod: Gezeigt wird hier die relative Zellzahl von Wildtyp-Zellen nach Inkubation mit DETA - NO (10 µM, 33 µM und 100 µM) bzw. DETA (100 µM) für 24 Stunden und anschließender Bestrahlung mit UVA₁ folgender Intensitäten: 0, 15, 25, 35 und 45 Joule/cm². Mittelwerte und Standardabweichung stammen aus drei unabhängigen Versuchen.*

3.5.5 BESTRAHLUNG VON ENDOTHELZELLEN IN ANWESENHEIT VON EXOGENEM NO UND NATRIUMAZID

Da exogen hinzugeführtes NO, wenn es vor der UV-Bestrahlung der Endothelzellen eingesetzt wird, keinen Effekt auf UVA-induzierte Zyotoxizität aufwies, sollte nun der Einfluß von exogenem NO während der UVA-Bestrahlung der Endothelzellen untersucht werden.

Dazu wurden iNOS knock-out und Wildtyp-Endothelzellen während der Bestrahlungszeit mit 5 mM des chemischen NO-Donors DETA-NO oder 5 mM DETA inkubiert. Die gewählte Konzentration von DETA-NO ergab sich aus früheren Untersuchungen an Ratten-Aortenendothelzellen (1, 59).

Die Versuche zeigen, daß exogenes NO, wenn es während der UVA-Bestrahlung anwesend ist, iNOS knock-out ebenso wie Wildtyp-Aortenendothelzellen vor dem Zelltod schützt (Abb. 16 A+B). Eine signifikant schützende Wirkung zeigt sich bei Wildtyp-Endothelzellen ab einer Bestrahlungsintensität von 15 Joule/cm², bei iNOS knock-out Zellen ab 25 Joule/cm² gemessen als relative Zahl lebender Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen bei gleicher UVA-Strahlungsintensität. Bei den Wildtyp-Endothelzellen führt eine Strahlungsintensität von 30 Joule/cm² zu einem halbmaximalen Zelluntergang der unbehandelten sowie der mit DETA inkubierten Zellen wäh-

rend in Anwesenheit von DETA-NO bei gleicher UVA-Intensität mehr als 80% der Zellen überlebten. Auch nach maximaler UVA-Exposition (45 Joule/cm²) kommt es nach Inkubation mit DETA-NO bei weniger als 20 % der Zellen zu Zeichen der Zellerstörung, während nach Inkubation mit DETA sowie bei unbehandelten Zellen die Zahl überlebender Zellen auf $30,4 \pm 3,5\%$ (unbehandelt) bzw. $33,1 \pm 4,5\%$ (DETA) sinkt.

Ein Großteil der UVA-induzierten Zellschäden wird über Reaktive Sauerstoffspezies (ROS), zu denen insbesondere Singulett-Sauerstoff (¹O₂) zählt, vermittelt (201). Natriumazid (NaN₃) hemmt die Aktivität von Singulett-Sauerstoff (197), zu dessen Nachweis es verbreitet eingesetzt wird (224).

Im folgenden sollte der Effekt von NaN₃ durch Hemmung von Singulett-Sauerstoff auf den UVA-induzierten Zelltod von Endothelzellen untersucht werden. Dazu wurden iNOS knock-out und Wildtyp-Aortenendothelzellen während der UVA₁-Bestrahlung mit 20 mM NaN₃ inkubiert.

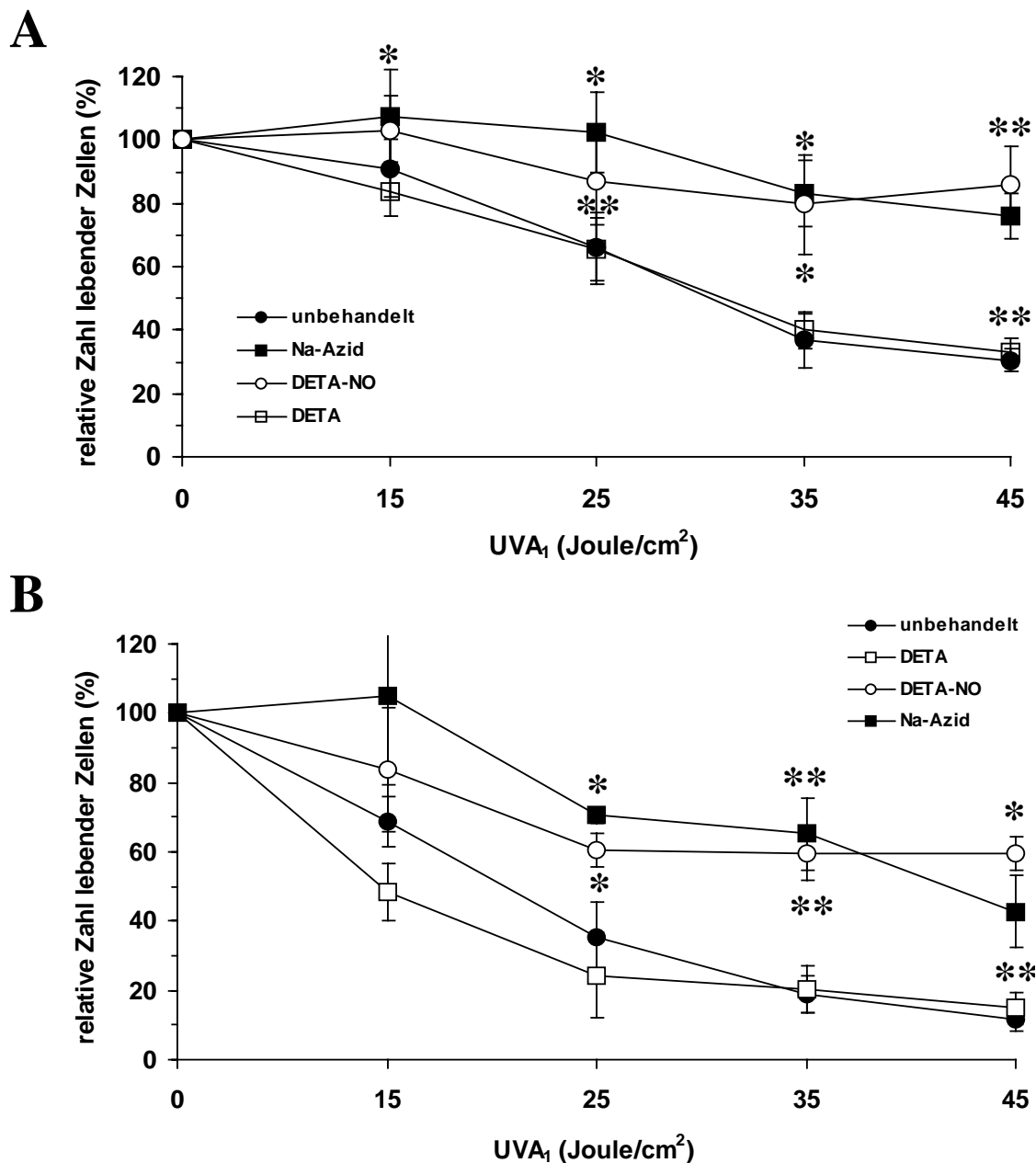
Die Inkubation mit NaN₃ während der Bestrahlung führt sowohl bei Wildtyp- als auch bei iNOS knock-out Endothelzellen zu einem signifikanten Schutz vor UVA-induzierter Zytotoxizität ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,005$) ab einer Strahlenintensität von 25 Joule/cm²: Nach einer Bestrahlung von 45 Joule/cm² leben 24 Stunden später noch $76 \pm 7,3\%$ der mit NaN₃ behandelten Wildtyp-Zellen im Gegensatz zu $30,4 \pm 3,5\%$ der unbehandelten Zellen. Das bedeutet, daß 45,6 % der Wildtyp-Zellen – also beinahe die Hälfte – durch die Inkubation mit NaN₃ vor dem Zelltod bewahrt wurden, natürlich unter der Prämisse, daß NaN₃ nicht selbst toxisch wirkt. In Vorversuchen ($n=4$) fanden sich nach 60-minütiger Inkubation mit NaN₃ (20 mM) $92,8 \pm 11,2\%$ lebende Wildtyp-Zellen im Vergleich zu 100 % bei den unbehandelten Zellen.

Unbehandelte iNOS knock-out Zellen zeigen erneut eine starke Sensibilität gegenüber der UVA₁-Strahlung mit einer halbmaximalen Toxizität bei ca. 20 Joule/cm². Bei einer Strahlenintensität von 35 Joule/cm² leben bereits weniger als 20% ($19,1 \pm 5,3\%$) der unbestrahlten Zellen. Durch Anwesenheit von NO während der Bestrahlung kommt es bei gleicher Intensität der UV-Strahlung zu einer signifikant höheren Überlebensrate ($p < 0,005$) mit $59,6 \pm 4,6\%$ lebenden Zellen. Dies entspricht einer Verdreifachung der relativen Zellzahl der iNOS knock-out Zellen durch NO. Bei den Endothelzellen aus Wildtyp-Mäusen verdoppelt sich bei Bestrahlungsintensitäten von 35 Joule/cm² die relative Zahl lebender Zellen durch Inkubation mit DETA-NO von $36,79 \pm 8,5\%$ auf $79,58 \pm 15,7\%$. Auch bei den anderen Strahlungsintensitäten führt NO bei den iNOS knock-out Endothelzellen zu einem höheren relativen Schutz vor UVA-Schäden als bei Wildtyp-Endothelzellen.

Die Inkubation mit DETA führt sowohl bei iNOS knock-out als auch bei Wildtyp-Endothelzellen zu keiner signifikanten Änderung der Zahl überlebender Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen, jedoch zu signifikanten Unterschieden verglichen mit den Überlebensraten in Anwesenheit von DETA-NO. Daraus kann geschlossen werden, daß NO (und nicht die Trägersubstanz DETA) für den protektiven Mechanismus verantwortlich ist.

Bei hier erneut beobachteter hoher Sensibilität der iNOS knock-out Zellen gegenüber UVA und der damit verbundenen raschen Abnahme der Zahl lebender Zellen mit steigender Intensität der UVA₁-Bestrahlung konnten bei halbmaximalem Zelluntergang unbehandelter Zellen (ca. 20 Joule/cm²) durch Inkubation mit NaN₃ mehr als 80 % lebende Zellen beobachtet werden. Eine UVA-Strahlungsintensität von 35 Joule/cm² überlebten 19,1 ± 5,3% der unbehandelten iNOS knock-out Zellen, nach Zusatz von NaN₃ während der Bestrahlung waren es 80,1 ± 20,2%.

Hier besteht jedoch die Möglichkeit, daß NaN₃ selbst toxisch bzw. wachstumshemmend auf die iNOS knock-out Zellen wirkt. So führte die Inkubation mit NaN₃ zu einer Verminderung der unbestrahlten iNOS knock-out Zellen auf 74,3 ± 5,8 % verglichen mit unbehandelten Zellen.



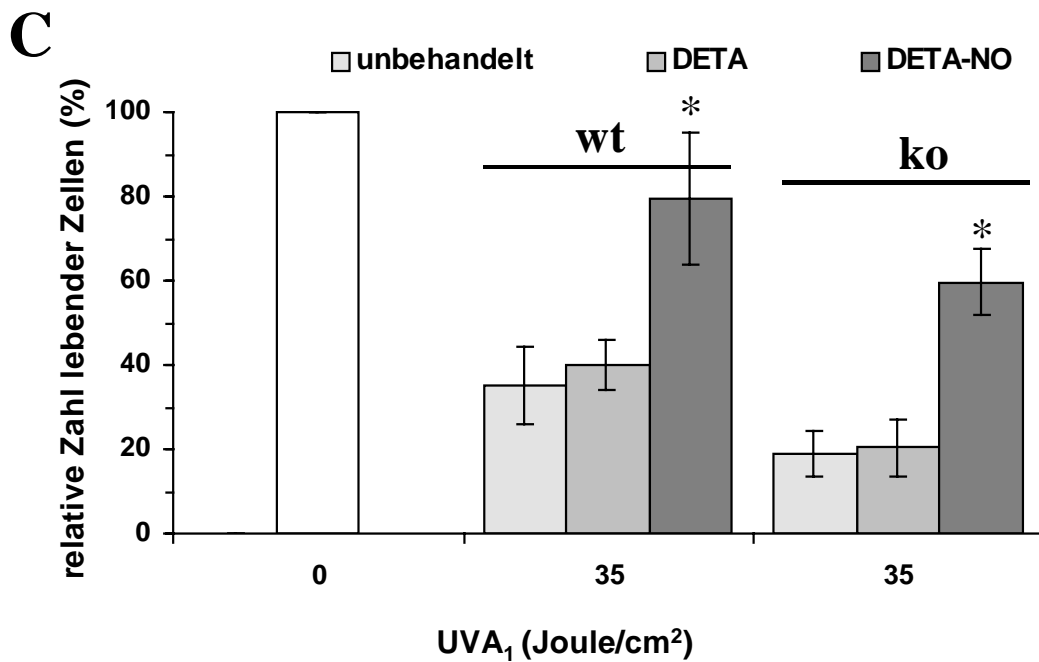


Abbildung 16 A+B+C Exogenes NO und NaN₃ schützen EC vor dem UVA induzierten Zelltod:

Wildtyp- (Abb. 16A) und knock-out (Abb. 16B) Endothelzellen wurden während der UVA₁ Bestrahlung (0, 15, 25, 35 und 45 Joule/cm²) mit 5 mM DETA-NO, 5 mM DETA oder 20 mM NaN₃ inkubiert bzw. blieben unbehandelt. Die Abbildungen fassen die Ergebnisse aus vier (wt) bzw. drei (ko) Versuchen zusammen (**p* < 0,05, ***p* < 0,005 gegenüber unbehandelten Zellen).

Abb. 16 C zeigt noch einmal die schützende Wirkung von DETA-NO auf iNOS ko und wt Endothelzellen bei einer Bestrahlungsintensität von 35 Joule/cm².

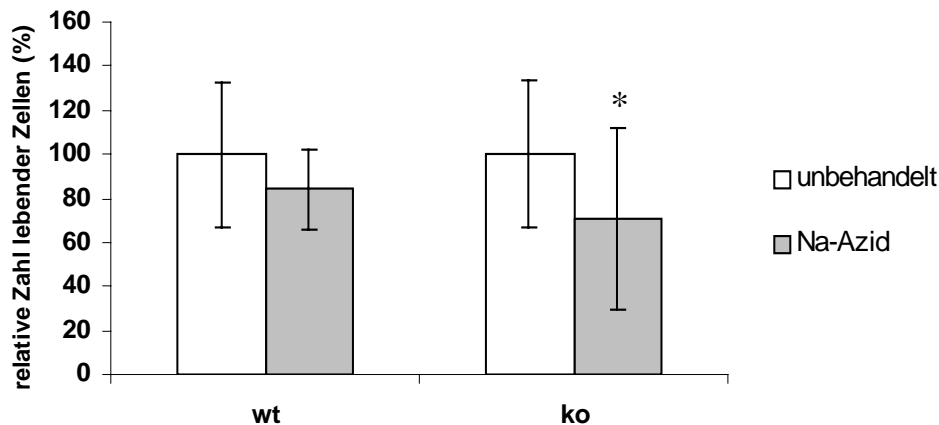


Abbildung 17: *Toxizitätsbestimmung von Natriumazid: 24 h nach 60-minütiger Inkubation mit Natriumazid (20 mM) weisen wt Endothelzellen eine nicht signifikant verminderte relative Zahl lebender Zellen in der Zellkultur auf. Im Gegensatz dazu führt die Inkubation mit Natriumazid bei iNOS ko Endothelzellen unter gleichen Bedingungen zu einer signifikanten Reduktion (* < 0,05) der vitalen Zellen.*

Vergleicht man die schützenden Effekte, die DETA-NO und NaN_3 auf die Endothelzellen ausüben, so ist der Wirkungsgrad des Schutzes von beiden Substanzen bei beiden Endothelzell-Populationen vergleichbar. Dies könnte darauf hinweisen, daß NO über einen ähnlichen Wirkmechanismus durch Interaktion mit ROS die Endothelzellen vor dem Zelluntergang schützt.

3.5.6 BESTRAHLUNG VON ENDOTHELZELLEN IN ANWESENHEIT VON NITRIT

Für den beobachteten NO-vermittelten Schutz vor UVA-Schäden an Endothelzellen könnte neben der absoluten Menge an NO möglicherweise die Freisetzungskinetik des verwendeten NO-Donors von entscheidender Bedeutung sein.

Die Stickstoffverbindung NaNO_2 (Nitrit) setzt in physiologischen Pufferlösungen unter UVA-Einwirkung (365 nm) verglichen mit „Raumlicht“ verstärkt NO frei (225). Diese photochemische Produktion von NO ist abhängig von der Intensität der UV-Strahlung sowie von der Konzentration der eingesetzten Nitritlösung.

In der folgenden Versuchsserie sollten die Auswirkungen von NO, freigesetzt aus den beiden unterschiedlichen NO-Donoren Nitrit und DETA-NO, auf den Zelltod von Endothelzellen nach UVA-Bestrahlung miteinander verglichen werden.

Wildtyp-Endothelzellen wurden für den Zeitraum der UVA_1 -Bestrahlung mit NaNO_2 -Konzentrationen von 10, 20, 30 und 40 mM inkubiert.

Auch hier führt die Inkubation mit diesem „NO-Donor“ verglichen mit unbehandelten Endothelzellen zu signifikant höheren Überlebensraten (Abb. 18). Signifikant höhere Zellzahlen nach UVA-Exposition traten ab einer Bestrahlungsintensität von 35 Joule/cm² bei allen NaNO₂-Konzentrationen auf, bei NaNO₂-Konzentrationen von 10 und 20 mM bereits ab 25 Joule/cm². Die geringsten UV-induzierten Zellschäden fanden sich nach Anwesenheit von 20 mM NaNO₂: Bei halbmaximalem Zelluntergang unbehandelter Zellen bei 25 Joule/cm² konnten infolge der Inkubation mit NaNO₂ noch 76,9 ± 7,6% lebende Zellen ermittelt werden. Am deutlichsten fiel die Protektion der Endothelzellen vor UVA-induziertem Zelltod nach Bestrahlung mit 35 Joule/cm² aus: Hier fanden sich nach Einsatz von NaNO₂ 61,0 ± 14,6% lebende Zellen versus 33,8 ± 9,7% lebende Zellen bei unbehandelten Endothelzellen. Es bestanden keine signifikanten Unterschiede der relativen Zellzahlen zwischen den unterschiedlichen NaNO₂-Konzentrationen bei gleicher UVA-Strahlungsintensität.

Somit schützt NaNO₂ ebenso wie DETA-NO durch Freisetzung von NO-Radikalen während der Bestrahlung vor UVA-induzierten Schäden an Wildtyp-Endothelzellen, wobei die jeweiligen protektiven Wirkungen trotz einer möglicherweise anderen Freisetzungskinetik vergleichbar sind.

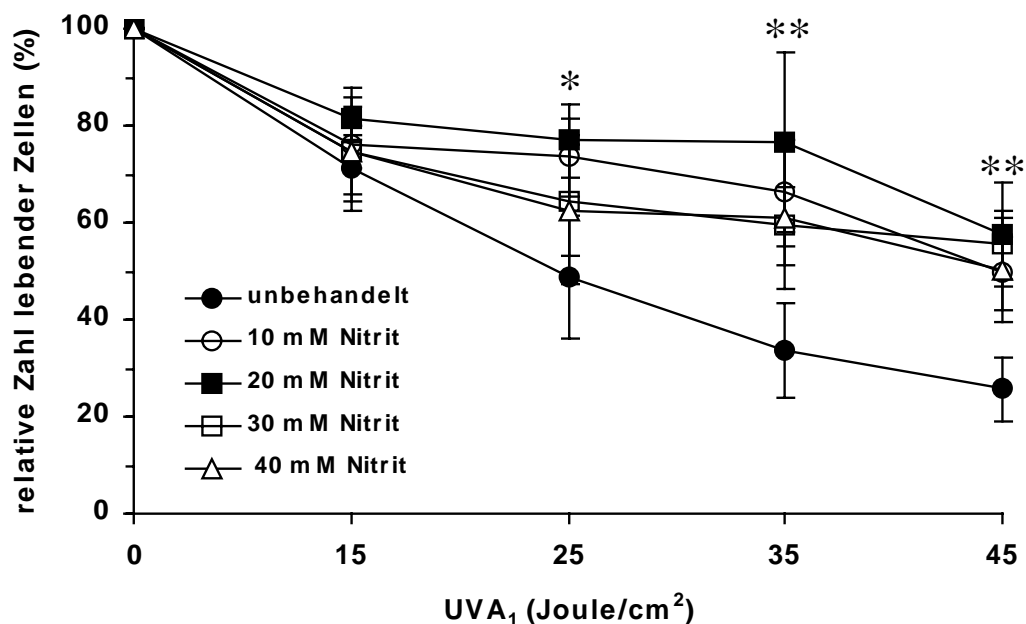


Abbildung 18: *NaNO₂-Inkubation während der Bestrahlung reduziert den UVA₁ bedingten Zelluntergang: Gezeigt wird die relative Zellzahl von Wildtyp-Zellen, die 24 Stunden nach Bestrahlung mit UVA₁ der Stärke 0, 15, 25, 35 und 45 Joule/cm² anhand drei bis vier Versuche mittels der Neutralrotfärbung gemessen wurde. Während der Bestrahlungszeit blieben die Zellen unbehandelt oder wurden mit 10, 20, 30 oder 40 mM NaNO₂ inkubiert. Die Standardabweichung schwankt zwischen Werten von 3,3 bis 18,6 (**p* < 0,05, ***p* < 0,005 gegenüber unbehandelten Zellen).*

3.5.7 BESTRAHLUNG VON WILDTYP-ZELLEN UNTER INKUBATION MIT NaCN

Unter der Vorstellung, daß CN^- über eine Hemmung der Atmungskette an der Cytochrom-Oxidase (Komplex IV) die endogene Generierung von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) blockiert, aber auch das Angebot an ATP in den Zellen vermindert und dadurch Einfluß auf die Apoptoserate nehmen könnte, wurde folgende Versuchsserie durchgeführt: Endothelzellen aus Wildtyp-Mäusen wurden während der Bestrahlungszeit von maximal 15 Minuten mit 1 mM, 2 mM oder 3 mM NaCN inkubiert und 24 Stunden später in der Neutralrotfärbung auf die relative Anzahl lebender Zellen untersucht (Abb. 19).

Erst ab Bestrahlungsintensitäten von 35 Joule/cm² zeigen sich bei den hohen NaCN-Konzentrationen von 2 mM und 3 mM signifikante Unterschiede der relativen Zahl lebender Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Nach Inkubation mit 1 mM NaCN werden keine signifikant unterschiedlichen relativen Zellzahlen im Vergleich zu unbehandelten Zellen gemessen.

Um eine mögliche toxische Wirkung von NaCN auf Endothelzellen unabhängig von der UV-Strahlung aufzuzeigen, wurden Wildtyp-Zellen für 60 Minuten mit NaCN in den verschiedenen Konzentrationen inkubiert (Abb. 19). Dabei zeigten sich in der Neutralrotfärbung 24 Stunden nach der NaCN-Inkubation nur geringe Schwankungen der Zellzahl von weniger als 20% verglichen mit unbehandelten Zellen (100%).

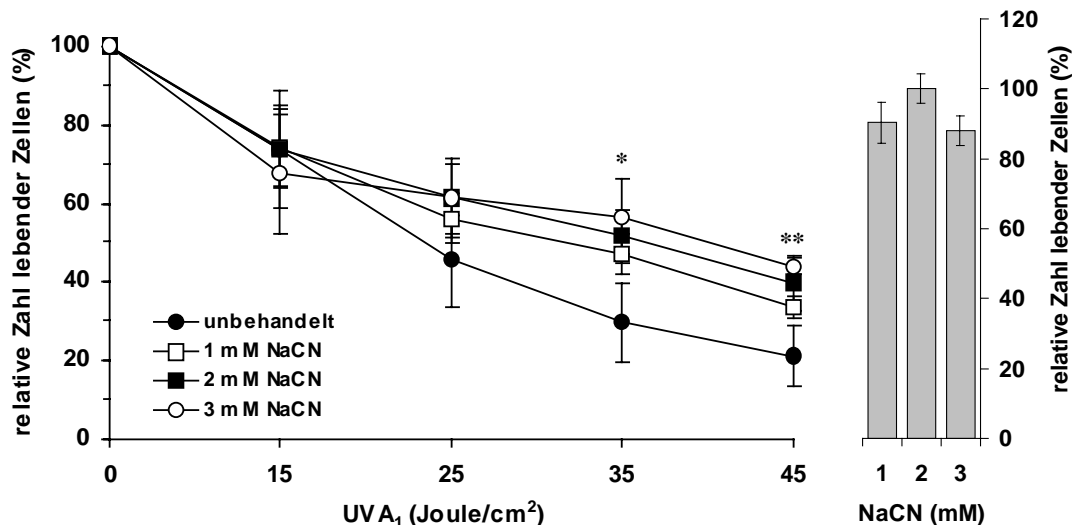


Abbildung 19: *NaCN erhöht in bestimmten Konzentrationen die relative Zahl lebender Wildtyp-Endothelzellen nach Bestrahlung mit UVA₁ hoher Intensität:* In der Neutralrotfärbung wurde die relative Anzahl lebender Zellen nach Bestrahlung mit UVA₁ der Intensitäten 0, 15, 25, 35 und 45 Joule/cm² bestimmt. Für die Zeit der Bestrahlung wurden unterschiedliche Konzentrationen von NaCN dem Überstand hinzugefügt. Wiedergegeben sind die Mittelwerte aus drei / vier Versuchen. Die Standardabweichung schwankt zwischen 2,3 - 14,9% (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$).

Die relative Zellzahl von Wildtyp-Endothelzellen 24 Stunden nach Inkubation mit NaCN unterschiedlicher Konzentration (1 – 3 mM) zeigt in der Neutralrotfärbung nur geringfügige Abweichungen im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

3.6 BESCHREIBUNG DES UVA₁-INDUZIERTEN ZELLTODES DER INOS KNOCK-OUT UND WILDTYP-ENDOTHELZELLEN MITTELS BESTIMMUNG VON MORPHOLOGISCHEN VERÄNDERUNGEN

Wie einleitend beschrieben gelten spezifische morphologische Veränderungen als Basiskriterien, um zwischen Nekrose und Apoptose differenzieren zu können (65). Die Fluoreszenzfärbung Propidiumiodid kennzeichnet nekrotische Zellen, indem es Zellmembranschäden nachweist, während Hoechst 33342 und Acridinorange zum Nachweis von Chromatin-Kondensation und Kernfragmentierung apoptotischer Zellen geeignet sind.

Zum Nachweis von apoptotischen oder nekrotischen Zellveränderungen nach Bestrahlung der Maus-Endothelzellen mit UVA₁ wurden 1×10^5 iNOS knock-out oder Wildtyp-Endothelzellen pro well in 3 ml Zellmedium auf 6-well-Kulturplatten inkubiert und nach 48 Stunden mit 45 Joule/cm² UVA₁ bestrahlt. Die jeweilige Fluoreszenzfärbung erfolgte 24 Stunden später wie in Material und Methoden beschrieben. Dabei wurde die Propidiumiodid-Färbung hier ausschließlich bei Wildtyp-Endothelzellen simultan mit der Hoechst-Färbung angewendet.

Um eine mögliche Einflußnahme von exogenem oder endogenem NO auf den Zelltod aufzuzeigen, wurde ein Teil der Endothelzellen vor der Bestrahlung für 24 Stunden mit den Zytokinen IL-1 β + IFN- γ + TNF- α (je 500 U/ml) in An- oder Abwesenheit des iNOS-Inhibitors NIO inkubiert, während ein anderer Teil während der Bestrahlung mit 5 mM DETA bzw. 5 mM DETA-NO behandelt wurde. Zur Ausschaltung von Singulett-Sauerstoff wurde wiederum NaN₃ in einer Konzentration von 20 mM während der Bestrahlung eingesetzt.

Die Kerne der unbestrahlten iNOS knock-out und Wildtyp-Endothelzellen zeigen in der Hoechst-Färbung eine schwache gleichmäßige blaue Fluoreszenz mit einer charakteristischen Anfärbung intranukleärer Chromatin-Abschnitte sowie eine einheitliche Größe (Abb. 20). 24 Stunden nach Bestrahlung mit UVA₁ (35 Joule/cm²) sieht man in der Hoechst-Färbung viele Kerne mit stärkerem Fluoreszenz-Signal, welche gleichmäßig angefärbt jedoch nur etwa halb so groß sind wie die Kerne der unbestrahlten Zellen. Die Zellen mit diesen Zellkernen haben sich in der Mehrzahl vom Untergrund gelöst und treiben aneinandergelagert an der Oberfläche (daher war eine genauere Auszählung der kondensierten Zellen nicht möglich). Neben diesen kondensierten Zellkernen erkennt man überwiegend vereinzelt stehende schwach fluoreszierende Zellkerne, deren Morphologie den Kernen der unbestrahlten Zellen entspricht. Während die Inkubation mit Zytokinen, Zytokinen + NIO oder DETA weder im bestrahlten noch im unbestrahlten Zustand Auswirkungen auf die Morphologie der Endothelzellen zeigte, führte die Inkubation der Zellen mit NaN₃ während der Bestrahlung zu einer verminderten Zahl dieser kondensierten Kerne. Nach UVA₁-Bestrahlung

der Endothelzellen in Anwesenheit von DETA-NO wurden gar keine kondensierten mehr Zellkerne gefunden.

In keinem Versuch wurde ob mit oder ohne Bestrahlung der Zellen eine Kern-Fragmentierung beobachtet.

Auch in einer Untersuchungen von Wildtyp-Endothelzellen mit Hoechst-Reagenz im Zeitverlauf (nach 4, 6, 20, 24 und 48 Stunden) konnten zu keinem Zeitpunkt nach UVA₁-Bestrahlung morphologische Anzeichen für eine Kernfragmentierung als Indikator für einen apoptotischen Zelltod gefunden werden. Der Zeitverlauf zeigte ferner, daß nach 4 und 6 Stunden nur eine geringe Zahl von Zellen (max. 5 – 10%) von den beschriebenen morphologischen Veränderungen betroffen waren, während nach 20, 24 und 48 Stunden nach der Bestrahlung mit 45 J/cm² UVA₁ ca. 80 % der Zellen eine starke Chromatin-Kondensation aufwiesen.

Die Acridinorange-Färbung lieferte folgende Ergebnisse (Abb. 20): Unbestrahlte Zellen zeigen eine schwache (Grün-) Färbung der gesamten Zelle, wobei sich der Zellkern deutlich abgrenzen läßt und einige stärker fluoreszierende Strukturen aufweist. Bestrahlte Zellen zeigen nach 24 Stunden mehrheitlich sehr stark fluoreszierende Zellkerne, die gleichmäßig angefärbt sind. Die Größe des Zellkerns liegt bei einem Drittel bis der Hälfte verglichen mit der Zellkern-Größe unbestrahlter Zellen. Das Zytoplasma ist nicht mehr abgrenzbar. Die restliche Zellpopulation zeigt keine Unterschiede zu unbestrahlten Zellen. Übergänge zwischen den verschiedenen Zellmorphologien sind selten. Eine Fragmentierung der Zellkerne wurde auch bei dieser Färbung nicht beobachtet. Die Inkubation mit DETA-NO während der Bestrahlung verhindert das Auftreten kondensierter Zellkerne fast vollständig, während die Inkubation der Endothelzellen mit DETA, Zytokinen oder Zytokinen + NIO erneut keinen Effekt zeigt. Die Anwesenheit von NaN₃ reduziert die Anzahl der kondensierten Zellkerne nach Bestrahlung um ca. zwei Drittel. Weder in der Hoechst- noch in der Acridinorange-Färbung sind morphologische Unterschiede zwischen iNOS knock-out und Wildtyp-Endothelzellen im bestrahlten oder unbestrahlten Zustand erkennbar.

In der Propidiumiodid-Färbung konnte bei der Mehrzahl der untersuchten Zellen eine Schädigung der Zellmembran nach Bestrahlung der Wildtyp-Endothelzellen mit UVA₁ gezeigt werden (Abb. 20). Im Unterschied zu unbestrahlten Zellen, die sich nicht anfärben ließen, kam es zu einer starken Rotfluoreszenz der Zellen. Diese wurde durch Inkubation mit DETA-NO, nicht jedoch mit DETA, aufgehoben. Durch die Simultan-Färbung mit Propidiumiodid und Hoechst konnte gezeigt werden, daß die Wildtyp-Endothelzellen mit kondensierten Zellkernen mit denen, die eine Membranschädigung aufwiesen, identisch waren.

Somit läßt sich feststellen, daß NO vor UVA₁-induzierten Membranschäden schützt, die Art des Zelltodes ließ sich durch die Fluoreszenzfärbungen jedoch nicht eindeutig auf eine der beiden klassischen Formen des Zelltodes (Apoptose versus Nekrose) festlegen. Gegen eine UVA-vermittelte Apoptose spricht die gleichzeitige Anfärbbarkeit mit Propidiumiodid sowie das Fehlen der Kern-

fragmentierung. Die Nekrose ließe sich zwar durch die mittels Propidiumiodid nachgewiesenen Membranschäden bestätigen, jedoch ist die Kernpyknose untypisch für den nekrotischen Zelltod.

Die folgende Tabelle faßt noch einmal die nekrotischen sowie apoptotischen Parameter der oben genannten Versuche zusammen.

Tabelle 3A: *Fluoreszenzfärbung der Wildtyp-Endothelzellen*

INOS ^{+/+} EC	EC unbestrahlt			EC bestrahlt (UVA ₁)		
	Hoechst	Acridinorange	Propidiumiodid	Hoechst	Acridinorange	Propidiumiodid
unbehandelt	-	-	-	++	++	++
Zytokine	-	-	-	++	++	
Zytokine / NIO	-	-		++	++	
NaN ₃	-	-		+	+	
DETA-NO	-	-	-	-	-	-
DETA	-	-	-	++	++	++

Tabelle 3B: *Fluoreszenzfärbung der iNOS knock-out Endothelzellen*

INOS ^{-/-} EC	EC unbestrahlt		EC bestrahlt (UVA ₁)	
	Hoechst	Acridinorange	Hoechst	Acridinorange
unbehandelt	-	-	++	++
Zytokine	-	-	++	++
Zytokine / NIO	-	-	++	++
NaN ₃	-	-	+	+
DETA-NO	-	-	-	-
DETA	-	-		++

Tabelle 3A + B: (-) ausschließlich schwach fluoreszierende Zellen / Zellkerne, (+) vereinzelt stark fluoreszierende, kondensierte Zellen / Zellkerne, (++) überwiegend stark fluoreszierende, kondensierte Zellen / Zellkerne. Die Propidiumjodidfärbung wurde nur bei unbehandelten wt Endothelzellen und nach Bestrahlung der wt Endothelzellen mit DETA bzw. DETA-NO durchgeführt. Fluoreszenzfarbstoffe: Hoechst 33342 (9 mM), Acridinorange (10 µM), Propidiumiodid (7,5 µM); UVA₁: 45 Joule/cm²

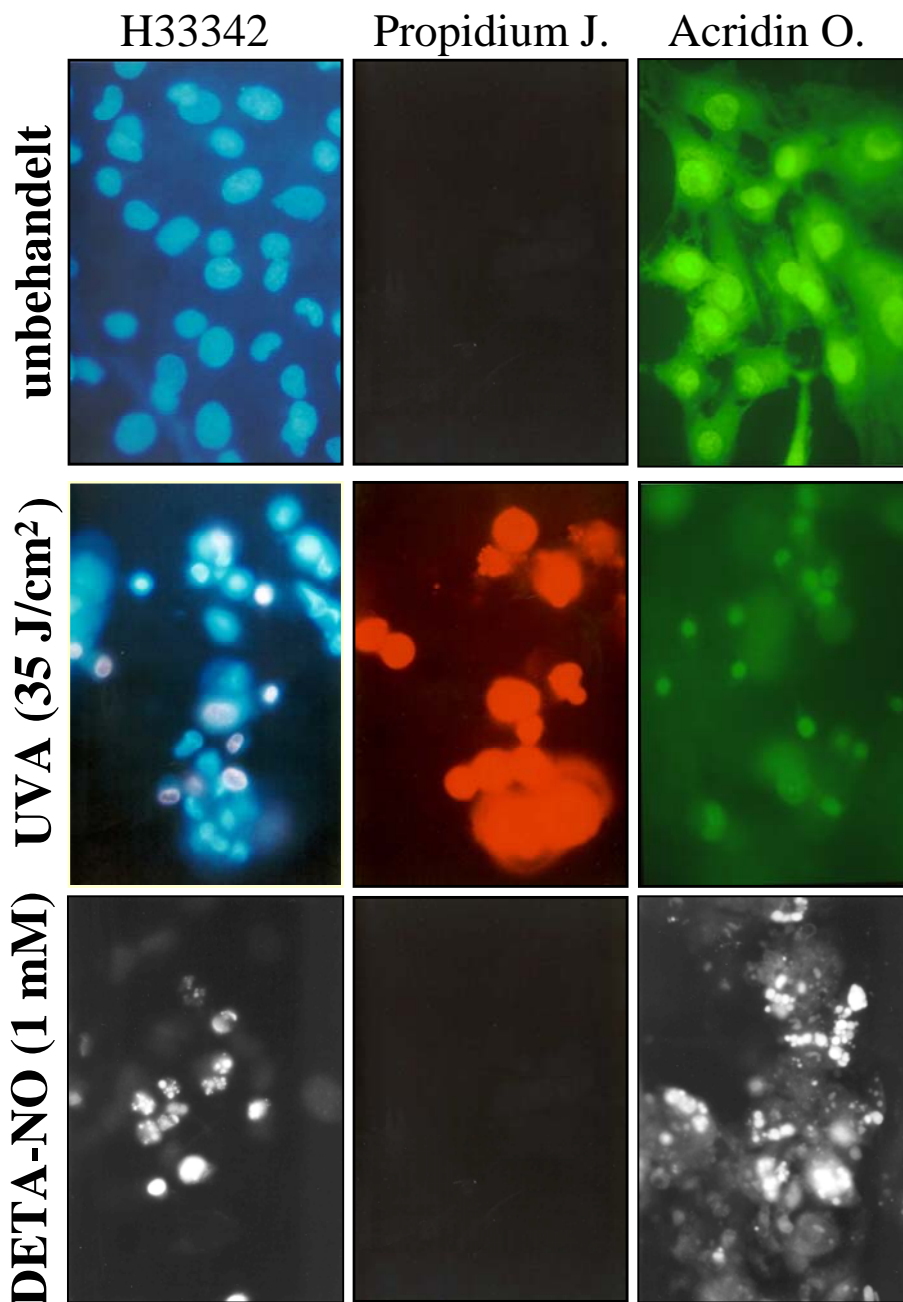


Abbildung 20: EC weisen 24 h nach UVA-Bestrahlung sowohl apoptotische als auch nekrotische Merkmale auf: Die Fluoreszenzfärbungen Hoechst (H 33342) und Acridinorange zeigen nach UVA-Exposition (35 J/cm²) eine Kernkondensation mit deutlicher Verstärkung der Fluoreszenz. Gleichzeitig weist die Färbung mit Propidiumiodid eine Membraninsuffizienz über eine Rotfluoreszenz der Zellen nach UVA-Bestrahlung nach. Eine Kernfragmentierung ist in keiner der Färbemethoden sichtbar. In der exemplarischen Darstellung werden Wildtyp-Endothelzellen gezeigt.

Im Vergleich zu den UVA-bestrahlten Zellen zeigen Aortenendothelzellen (hier ko EC) nach 24-stündiger Exposition mit 1 mM DETA-NO typische Apoptose-Merkmale (Chromatinkondensation und Kernfragmentierung).

3.7 DNA-STRANGBRÜCHE ALS PARAMETER DER APOPTOSE

Neben der Kondensation und Fragmentierung des Kerns stellen DNA-Strangbrüche einen weiteren Parameter der Apoptose dar sofern sie mit einer zeitlichen Verzögerung zum toxischen Ereignis auftreten. Die Anfärbbarkeit einer Zelle mit Trypanblau basiert auf dem Verlust der Plasmamembran-Integrität und wird daher häufig zur Identifikation nekrotischer Zellen herangezogen.

Da mit Hilfe der hier verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe eine eindeutige Klassifikation des Zelltodes nicht möglich war, sollte nun anhand der *in situ* nick Translation (INT) zum Nachweis von DNA-Strangbrüchen und der Trypanblau-Färbung als Hinweis auf einen Verlust der Zellmembranintegrität die Art des Zelltodes von iNOS knock-out und Wildtyp-Endothelzellen nach UVA₁-Bestrahlung erneut untersucht werden.

24 Stunden nach Bestrahlung der Endothelzellen aus Wildtyp-Mäusen mit UVA₁ wurde die *in situ* nick Translation sowie die Trypanblau- bzw. Neutralrot-Färbung wie in Material und Methoden beschrieben durchgeführt.

Morphologisch erkennt man in der *in situ* nick Translation bei einem Teil der bestrahlten Endothelzellen eine eindeutige Größenabnahme und eine Braunfärbung der Zellkerne. Die Zellkerne der unbestrahlten Endothelzellen färben sich in der Hämatoxylin-Färbung hellblau an (Abb. 22). In allen Versuchen ist eine eindeutige Unterscheidung zwischen *in situ* nick-positiven und -negativen Zellkernen möglich.

3.7.1 AUFTRETEN VON DNA-STRANGBRÜCHEN UND ZELLMEMBRANSCHÄDEN VON WILDTYP-ENDOTHELZELLEN IM VERLAUF VON 24 STUNDEN NACH UVA EXPOSITION

Um die Frage zu klären, ob die DNA-Schädigung eine Folge der Nekrose ist, also spät auftritt, oder ob die hier beobachtete „nicht klassische“ Nekrose einen Übergang aus der Nekrose darstellt, ist eine Zeitkinetik notwendig, die das Auftreten der DNA-Strangbrüche und der Zellmembranschädigung nach UVA in einen zeitlichen Zusammenhang stellt.

Zu diesem Zweck wurden Wildtyp-Endothelzellen mit 45 Joule/cm² UVA₁ bestrahlt, anschließend nach 0, 4, 8, 10, 12 und 24 Stunden auf den Anteil Trypanblau-gefärbter Zellen hin untersucht, im Anschluß daran eingefroren und schließlich der *in situ* nick Translation zugeführt (Abb. 21).

In der *in situ* nick Translation zeigten sich 4 Stunden nach UVA Exposition ebenso wie unmittelbar nach der Bestrahlung nur sehr wenige Zellen mit DNA-Strangbrüchen. Die DNA-Strangbrüche sind somit keine unmittelbare Konsequenz der UVA-Einwirkung. Erst danach kam es zu einem Anstieg der DNA-Strangbrüche, der bis zu 12 Stunden nach UVA Bestrahlung anhielt und dann etwas abflachte. Nach 24 Stunden waren bei 50 % der Zellen DNA-Strangbrüche nachweisbar; ebenso hoch war der Prozentsatz Trypanblau-positiver Zellen. Die Trypanblau-Färbung zeigte 4 Stunden nach UVA-Exposition einen Anstieg toter Zellen auf 10 % und nach 8 Stunden auf 15 %,

womit sich der Anteil Trypanblau-gefärbter Zellen dem Anteil von Zellen mit DNA-Strangbrüchen anzugleichen begann.

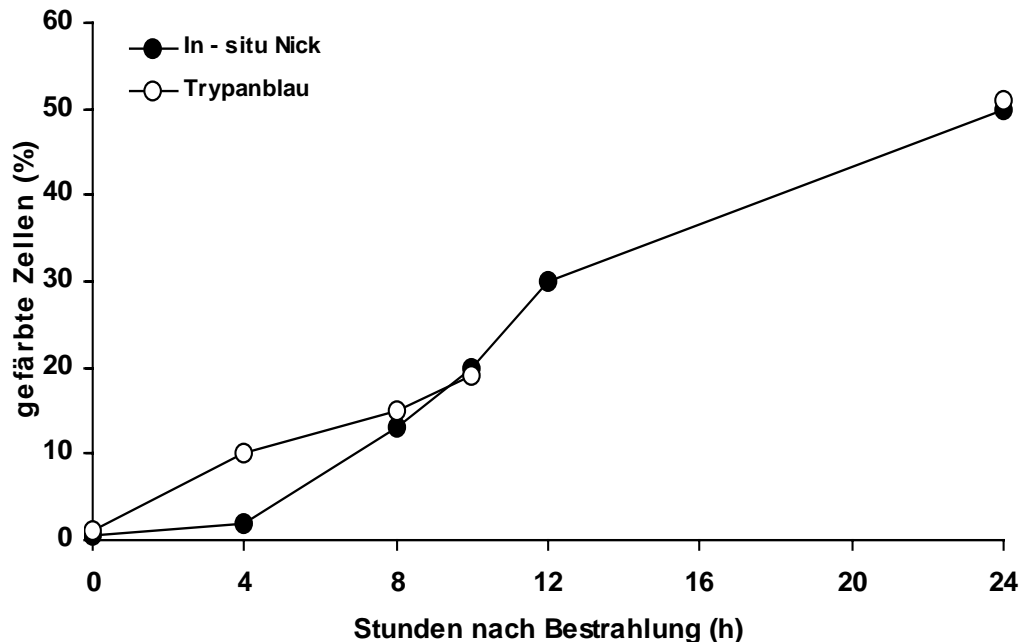


Abbildung 21: *in situ nick Translation und Trypanblau-Färbung nach Bestrahlung von Wildtyp-Aortenendothelzellen mit UVA₁: Wildtyp-Endothelzellen werden auf sechs 8-well Kulturkammern mit 45 Joule/cm² UVA₁ bestrahlt und anschließend nach 0, 4, 8, 10, 12 und 24 Stunden im Anschluß an die Trypanblau-Färbung getrocknet und bei -20 °C gelagert. Gemeinsam werden sie in der in situ nick Translation auf die durch Braunfärbung der Zellen gekennzeichneten DNA-Strangbrüche untersucht.*

Die Ergebnisse sprechen somit eher für einen atypischen, aber nekrotischen Zelltod, da die Membranschäden den DNA-Strangbrüche zunächst um etwa 4 Stunden vorausgehen. Die Nekrosen treten verzögert auf; das Maximum der Trypanblau-positiven Zellen wird erst nach 24 Stunden erreicht. Reparaturvorgänge an der DNA als alleinige Ursache der positiven in situ nick Translation erscheinen unwahrscheinlich, da die Membranschäden ja bereits etwas früher messbar sind und die Zahl der Trypanblau-positiven Zellen mit der Zahl der INT -positiven Zellen übereinstimmt.

3.7.2 DNA-STRANGBRÜCHE IN iNOS KNOCK-OUT UND WILDTYP-ENDOTHELZELLEN NACH UVA₁-BESTRAHLUNG

Neben der Klassifikation des Zelltodes anhand von DNA-Strangbrüchen und Membranschäden sollte ferner der Einfluß von endogenem und exogenem NO sowie von NaN₃ auf diese Zelltod-Parameter untersucht werden.

Für die Aktivierung der endothelialen iNOS-Expression wurden die Proben vor der UV-Bestrahlung für 24 Stunden mit TNF- α + IL-1 β + IFN- γ (je 500 U/ml) inkubiert. Bei einem Teil dieser Proben wurde die iNOS mit 0,25 mM NIO gehemmt. DETA-NO sowie DETA wurden während der Bestrahlung in einer Konzentration von 5 mM pro well, NaN₃ in einer Konzentration von 20 mM pro well eingesetzt. Jeweils eine von zwei völlig identisch vorbereiteten Kulturkammern wurde mit 45 Joule/cm² teilweise auch mit 35 Joule/cm² UVA₁ bestrahlt, während die andere unbestrahlt blieb.

Nach der Bestrahlung mit 45 Joule/cm² UVA₁ zeigten 35 \pm 10 % der Wildtyp-Aortenendothelzellen DNA-Strangbrüche (Tab. 4 A), während unbestrahlte Zellen nur in 0,5 \pm 0,5 % DNA-Strangbrüche aufwiesen. In der Trypanblaufärbung fanden sich nach Bestrahlung 90 % positive (blau gefärbte) Zellen. Hierbei gilt es zu berücksichtigen, daß vermutlich ein Großteil der vom Untergrund losgelösten Zellen der in situ nick Translation durch den Verlust des Zellüberstandes verloren gingen, der Trypanblaufärbung jedoch erhalten blieben. Ein ebenfalls hoher Anteil von DNA-Strangbrüchen wurde nach Bestrahlung mit 45 Joule/cm² bei Zellen gefunden, die vor der Bestrahlung mit Zytokinen (85 %) oder Zytokinen + NIO (80 %) oder während der Bestrahlung mit DETA (40 \pm 25 %) oder NaN₃ (55 \pm 15 %) inkubiert worden waren. Gleichzeitig findet man bei bestrahlten Zellen nach Inkubation mit Zytokinen einen hohen Prozentsatz toter Zellen (99 %), ebenso nach Inkubation mit DETA (85 %). Die Anwesenheit von DETA-NO während der Bestrahlung führte hingegen zu einer sehr geringen Zahl von DNA-Strangbrüchen (4 \pm 1 % aller Zellen). Hier liegt auch die Zahl der Trypanblau-positiven Zellen nur bei 20 %; bei unbestrahlten Zellen beträgt sie 1 %.

Ebenso wie bei den Wildtyp-Endothelzellen induziert UVA₁ auch bei iNOS knock-out Zellen in der in situ nick Translation nachweisbare DNA-Strangbrüche (Tab. 4 B): Ein hoher Anteil von Zellen mit DNA-Strangbrüchen (> 50 %) fand sich 24 Stunden nach der Bestrahlung mit UVA₁ (45 Joule/cm²) sowohl bei unbehandelten Zellen als auch nach Inkubation mit Zytokinen, Zytokinen + NIO, DETA und NaN₃. Durch Inkubation mit DETA-NO während der Bestrahlung verminderte sich die Zahl der DNA-Strangbrüchen auf 17,5 \pm 0,5 %. Sie lag jedoch noch deutlich höher als bei unbestrahlten Zellen (1 – 5 %).

Der Anteil lebender Zellen in der Neutralrotfärbung nach UVA-Exposition lag bei 53,9 % bei Inkubation mit DETA-NO und bei 82 % bei Inkubation mit NaN₃ verglichen mit unbehandelten, unbestrahlten Zellen. Dagegen sank der Anteil lebender Zellen auf weniger als 21 % bei unbehandelten Zellen sowie bei Inkubation mit Zytokinen oder DETA nach der Bestrahlung.

Sowohl iNOS knock-out als auch Wildtyp-Endothelzellen zeigten somit erneut gleichzeitig typische Kennzeichen der Nekrose (Membranpermeabilität) als auch der Apoptose (DNA-Strangbrüche). Es ließ sich bei beiden Zellpopulationen ein NO-vermittelter Schutz bezüglich dieser Zelltod-Kriterien nachweisen, während NaN₃ zwar einen Rückgang der Zell-Sterblichkeit (um den Faktor 4 !) jedoch keinen eindeutigen Einfluß auf die DNA-Strangbrüche zeigte.

Tabelle 4A

Wildtyp-EC			
	in situ nick positive EC (%)	Trypanblau- positive EC (%)	
unbehandelt	0,5 (\pm 0,5)	1	
UVA	35 (\pm 10)	90	
DETA	2 (\pm 1)	1	
DETA + UVA	40 (\pm 25)	85	
DETA-NO	3,5 (\pm 1,5)	1	
DETA-NO + UVA	4 (\pm 1)	20	
NaN ₃	0,5 (\pm 0,5)	1	
NaN ₃ + UVA	55 (\pm 15)	1	
Zytokine	1	1	
Zytokine + UVA	85	99	
Zytokine + NIO	1		
Zytokine + NIO + UVA	80		

Tabelle 4B

iNOS knock-out EC			
	in situ nick positive EC (%)	Trypanblau positive EC (%)	Neutralrot-positive Zellen (%)
unbehandelt	4,5 (\pm 0,5)	3,5 (\pm 3,5)	100
UVA	60 (\pm 10)	67,5 (\pm 7,5)	19
DETA	5 (\pm 2)	2,5 (\pm 2,5)	
DETA + UVA	80 (\pm 10)	87,5 (\pm 7,5)	16
DETA-NO	1,5 (\pm 0,5)	1 (\pm 1,0)	
DETA-NO + UVA	17,5 (\pm 7,5)	12,5 (\pm 7,5)	54
NaN ₃	1 (\pm 0)	0,5 (\pm 0,5)	
NaN ₃ + UVA	57,5 (\pm 12,5)	13	83
Zytokine	1 (\pm 0)	1	
Zytokine + UVA	80 (\pm 15)	92,5 (\pm 2,5)	21
Zytokine + NIO	1,5 (\pm 0,5)	1	
Zytokine + NIO + UVA	75 (\pm 5)	95	

Tabelle 4 A und B: *In situ* nick Translation, Trypanblau- und Neutralrotfärbung bei *wt* und *ko* EC: Prozentualer Anteil in situ nick positiver (braun gefärbter) und Trypanblau-positiver Zellkerne aus zwei unabhängigen Versuchsreihen mit Wildtyp- (A) und iNOS knock-out (Tabelle B) Endothelzellen. Je sechs 8-well Kultukammern mit

konfluenten Aortenendothelzellen werden mit 45 Joule/cm² UVA₁ in 100 µl Überstand bestrahlt, sechs weitere Kulturkammern bleiben unter gleichen Bedingungen unbestrahlt. Die Aktivierung der iNOS erfolgte durch die Zytokine TNF-α + IL-1β + IFN-γ mit je 500 U/ml bei einer Inkubationszeit von 24 h. Die Konzentration von DETA und DETA-NO im Überstand während der Bestrahlung betrug 5 mM, von NaN₃ 20 mM und von NIO 0,25 mM. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung.

Die Neutralrotfärbung wurde nur bei iNOS ko EC durchgeführt; bei nur einfach durchgeführten Versuchen fehlt die Standardabweichung.

3.8 EINFLUSS VON NEUTRALISATOREN DER REAKTIVEN SAUERSTOFFSPEZIES AUF DIE ZELLMORPHOLOGIE UND MEMBRANPERMEABILITÄT VON WILDTYP-ENDOTHELZELLEN NACH EINWIRKUNG VON UVA₁ ODER H₂O₂

Zur Untersuchung der Rolle der Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) bezüglich UVA₁-induzierter Zytotoxizität werden Wildtyp-Endothelzellen während oder zu angegebenen Zeitpunkten vor und nach UVA₁-Bestrahlung mit potentiellen Neutralisatoren der ROS inkubiert wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben. Parallel dazu wurden Zellen anstelle der UVA₁-Bestrahlung für 24 Stunden mit 0,8 mM H₂O₂ inkubiert. Wasserstoffperoxid wird hier zur Verifizierung der Hypothese eingesetzt, daß es nach UVA-Einwirkung als endständiges Glied einer Reaktionskette über Lipidperoxidation zum ROS-medierten Zelltod beiträgt. Die Zellmorphologie sollte mit Hilfe der Hoechst-Färbung anhand der Kriterien Chromatinkondensation bzw. Intensität der Fluoreszenz und mögliche Kernfragmentierung beurteilt werden, die Membranpermeabilität sollte simultan mittels Propidiumiodid-Färbung untersucht werden.

iNOS-knock out Endothelzellen wurden lediglich im Hinblick auf die Fragestellung untersucht, welche morphologischen Veränderungen nach 24-stündiger Inkubation mit 0,8 mM H₂O₂ zu erwarten sind.

Die Bestrahlung mit UVA₁ führte zum zahlreichen Auftreten kondensierter Zellkerne (Hoechst-positiv), deren zugehörige Zellen eine starke Rotfluoreszenz aufwiesen (Propidiumiodid-positiv) (Abb. 23). Diese beiden Parameter traten in allen Versuchen ausschließlich gemeinsam an einer Zelle (oder gar nicht) auf und werden hier daher als Zelltod-spezifisch beschrieben. Die Inkubation mit dem NO-Donor SNOC führte zu einer Abnahme des Zelltodes nach Bestrahlung, während DETA-NO, Histidin, MnTBAP, BHT und Katalase in der angegebenen Konzentration den Zelltod vollständig inhibierten. Die Inkubation mit DETA und Cystein als Bestandteil von SNOC zeigte hingegen keine Auswirkung auf den UVA-induzierten Zelltod.

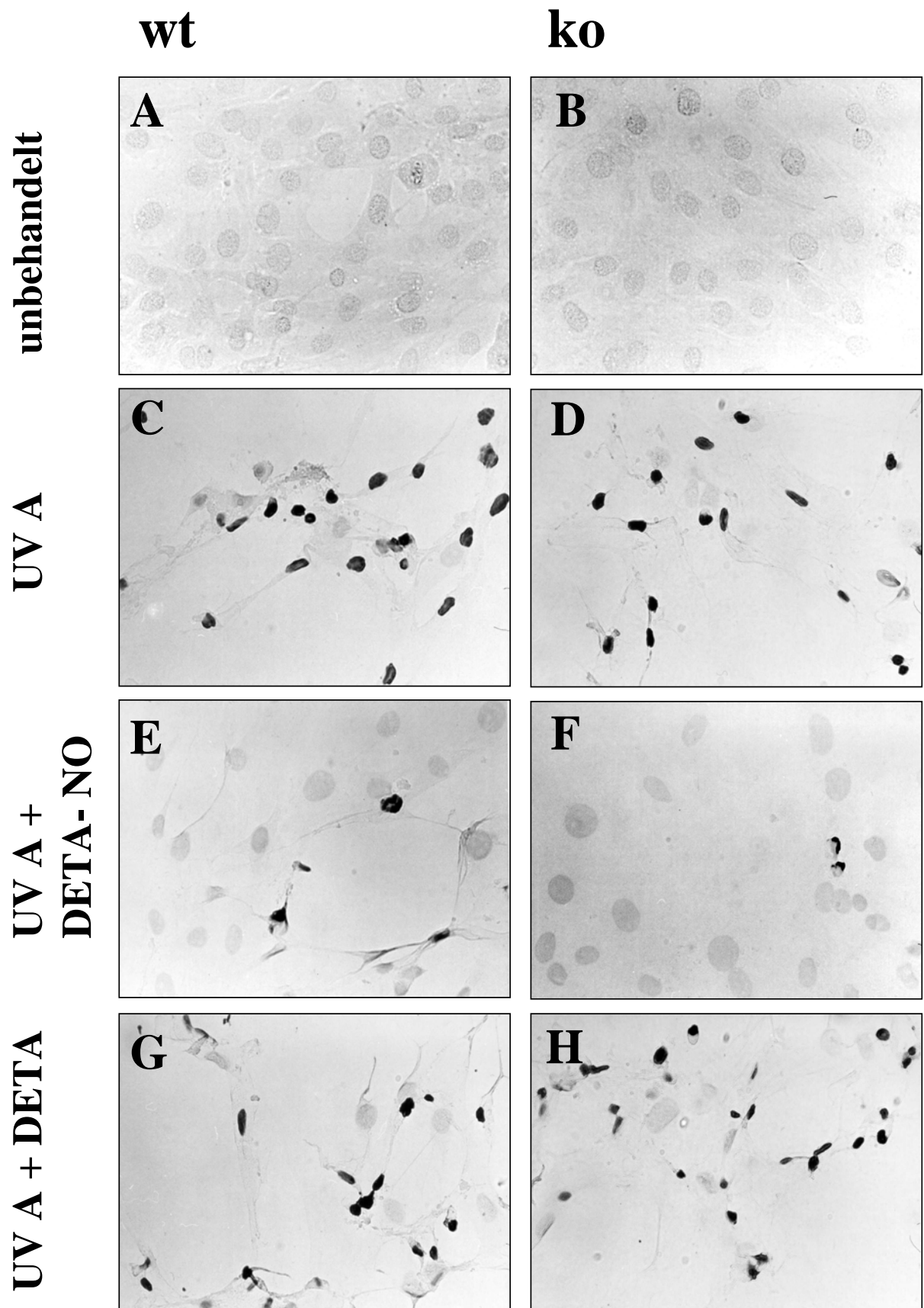


Abbildung 22: *NO reduziert UVA-induzierte DNA-Strangbrüche bei ko und wt EC: INOS-knock out (ko) und Wildtyp- (wt) Endothelzellen wurden mit der Hämatoxylin-Kernfärbung dargestellt und der in situ nick Translation unterzogen. Durch die in situ nick Translation lassen sich nach der Bestrahlung mit UVA im Gegensatz zu unbestrahlten, unbehandelten Zellen ca. 50% der Zellkerne braun anfärben; ferner ist eine Kernkondensation zu beobachten. Die Inkubation mit DETA-NO, nicht jedoch mit DETA, reduziert die Zahl der in situ nick-positiven Zellen auf wenige Prozent. A + B: unbehandelte Zellen; C + D: unbehandelte Zellen nach Bestrahlung mit UVA₁ (45 Joule/cm²); E + F: Zellen nach Inkubation mit 5 mM DETA-NO während der Bestrahlung mit UVA₁; G + H: Zellen nach Inkubation mit 5 mM DETA während der Bestrahlung mit UVA₁*

H₂O₂ führte bei den Wildtyp- und iNOS-knock out Endothelzellen zu den gleichen morphologischen Veränderungen, wie sie nach UVA-Bestrahlung auftraten. Auch hier kam es zu einer deutlichen Anfärbung der Endothelzellen mit Propidiumiodid bei gleichzeitiger Kern-Kondensation. Wiederum führte DETA-NO aber auch die Inkubation mit SNOC zu einem NO-spezifischen Schutz der Zellen. Dieser Schutz im Sinne fehlender Kern-Kondensation und fehlender Fluoreszenz in der Propidiumiodid-Färbung zeigte sich auch nach Inkubation mit dem Inhibitor der Lipidperoxid-Bildung BHT.

H₂O₂ und UVA₁ führen somit nicht nur zu den gleichen morphologischen Veränderungen der Endothelzellen (soweit sie mit den beiden hier verwendeten Färbemethoden aufgezeigt werden können), sondern lassen sich bezüglich ihrer zelltoxischen Wirkung durch exogenes NO in Form von DETA-NO in gleicher Weise beeinflussen. Dies und die Tatsache, daß das Wasserstoffperoxid-degradierende Enzym Katalase die zytotoxische UVA-Wirkung aufhebt, macht eine Beteiligung von H₂O₂ an der UVA-vermittelten Toxizität wahrscheinlich. Als weitere bedeutsame Faktoren hat sich die Beteiligung von Superoxidanion (O₂⁻) und Singulett-Sauerstoff (¹O₂) an der UVA-vermittelten Zytotoxizität bestätigt. Eine beschleunigte Umwandlung von Superoxidanion zu H₂O₂ und molekularem Sauerstoff durch MnTBAP führte ebenso zu einer Aufhebung dieser zytotoxischen Wirkung wie die Hemmung der Aktivität von Singulett-Sauerstoff durch Histidin. Die Hemmung des Zelltodes durch BHT, einem Inhibitor der Lipidperoxidation, bestätigt möglicherweise die Annahme, daß sowohl H₂O₂ als auch UVA₁ als wesentlichen Mechanismus über eine Lipidperoxidation zum Zelltod führen.

Die nachfolgende Tabelle stellt die Ergebnisse der in vitro Fluoreszenzfärbungen Hoechst und Propidiumiodid einander gegenüber.

Tabelle 5

	Hoechst	Propidium-iodid		Hoechst	Propidium-iodid
unbehandelt	-	-	unbehandelt	-	-
UVA	++	++	H₂O₂	++	++
UVA + SNOC	+ / -	+ / -	H₂O₂ + SNOC	-	-
UVA + Cystein	++	++	H₂O₂ + Cystein)	++	++
UVA + DETA-NO	-	-	H₂O₂ + DETA-NO	-	-
UVA + DETA	++	++	H₂O₂ + DETA	++	++
UVA + Histidin	-	-			
UVA + MnTBAP	-	-			
UVA + BHT	-	-	H₂O₂ + BHT	-	-
UVA + Katalase	-	-			

Tabelle 5: Bestimmung der Zelltod-Kriterien Kernkondensation und Membraninsuffizienz: Anfärbbarkeit von Wildtyp-Endothelzellen mit den Fluoreszenzfarbstoffen Hoechst und Propidiumiodidid einer simultanen Färbung 24 Stunden nach Inkubation mit H₂O₂ (0,8 mM) bzw. nach Bestrahlung mit UVA1 (45 Joule/cm²). Als (potentielle) Neutralisatoren der ROS wurden folgende Substanzen eingesetzt: SNOC (1 mM), Cystein (1 mM), DETA-NO (5 mM), DETA (5 mM), Histidin (40 mM), MnTBAP (80 µM), BHT (10 µM) und Katalase (2000 U/ml).

Hoechst-Färbung: (++) positiv im Sinne kondensierter, stark fluoreszierender Endothelzellen, (-) schwach fluoreszierende Zellen, (+/-) vereinzelt kondensierte, stark fluoreszierende Endothelzellen

Propidiumiodid-Färbung: (++) stark fluoreszierender Endothelzellen, (+/-) vereinzelt stark fluoreszierender Endothelzellen, (-) keine Fluoreszenz

Tabelle 6

	Hoechst	Propidiumiodid	Acridinorange
unbehandelt	-	-	-
H₂O₂	++	++	++

Tabelle 6: Bestimmung der Zelltod-Kriterien Kernkondensation und Membraninsuffizienz: Fluoreszenzmuster von iNOS-knock out Endothelzellen nach Anfärbung mit den Fluoreszenzfarbstoffen Hoechst und Propidiumiodidid einer simultanen Färbung und Acridinorange 24 Stunden nach Inkubation mit H₂O₂ (0,8 mM)

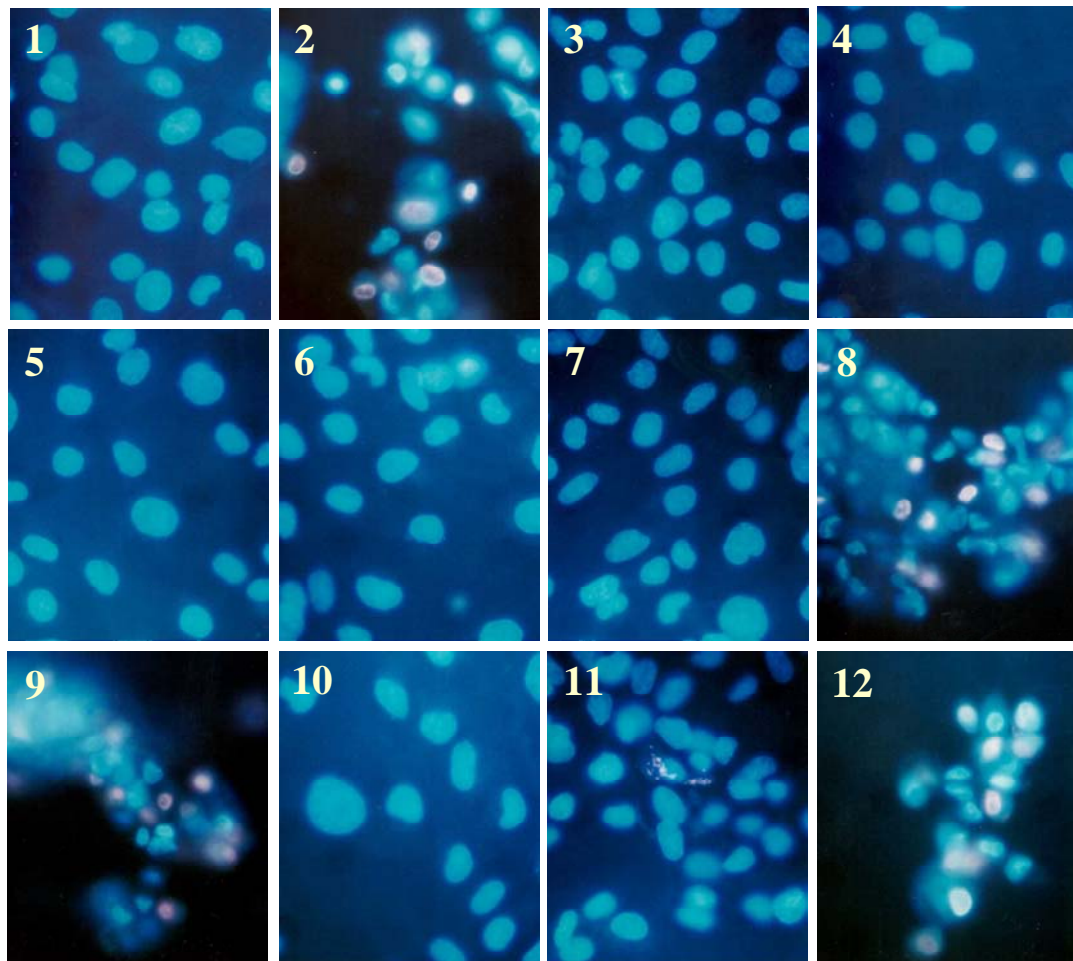


Abbildung 23: Neutralisatoren der ROS hemmen die Kern-Kondensation und Membranschäden bei wt-Endothelzellen: In der Simultan-Fluoreszenzfärbung mit Hoechst 33342 und Propidiumiodid zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen unbehandelten Endothelzellen (1) und Zellen nach Bestrahlung mit UVA₁ (2) oder Inkubation mit H₂O₂ (9), welche zum Großteil Propidiumjodid-positive Zellen (rot gefärbt) mit stark kondensierten Zellkernen aufweisen. Die Inkubation mit Natriumazid (3), MnTBAP (4), Katalase (5), BHT (6) oder DETA-NO (7) vor, während u./o. nach der Bestrahlung mit UVA₁ (45 Jouel/cm²) führt zum vollständigen Schutz der Endothelzellen nicht jedoch die Inkubation mit DETA (8). Durch Inkubation mit BHT (10) oder DETA-NO (11) lassen sich ebenso H₂O₂-induzierte Veränderungen inhibieren; DETA (12) zeigt hier keinen schützenden Effekt.

4 DISKUSSION

Das Endothel hat eine essentielle Bedeutung in der Entstehung und im Verlauf von Entzündungsprozessen, welche begleitet werden von einer Endothelzellaktivierung. Diese Modulation der Endothelzellfunktion während einer Entzündung wird im wesentlichen durch den Einfluß unterschiedlicher, proinflammatorischer Zytokine vermittelt (208). Zytokin-aktivierte Endothelzellen zeichnen sich unter anderem durch die langanhaltende Generierung großer Mengen von NO aus, welche durch die Induktion der induzierbaren NO-Synthase ermöglicht wird (207). Eine hohe NO-Synthase ist häufig maßgeblich für die Gewebszerstörung während entzündlicher und / oder autoimmuner Erkrankungen verantwortlich: Sie spielt eine wichtige Rolle in der lokalen Abwehr infektiöser Organismen (4), der autoimmunvermittelten Zellzerstörung wie beim Diabetes mellitus Typ 1 oder beim Septischen Schock (131). Mit Hilfe verschiedener Modelle der akuten und chronischen Entzündung konnte gezeigt werden, daß die Hemmung der NO-Synthase vor entzündlichen Gewebeschäden schützt (226-228).

Andererseits entfaltet NO über die Hemmung der Synthese und Expression von proinflammatorischen Zytokinen und Adhäsionsmolekülen antiinflammatorische Eigenschaften (229). Neuere Untersuchungen weisen auf den protektiven Charakter von NO bei oxidativer Zell- und Gewebeschädigung hin: In vitro Untersuchungen zeigen, daß NO die $O_2^{\bullet-}$ -Radikal-vermittelte und durch Eisen (oder Hämoprotein) katalysierte Lipidperoxidation zu hemmen vermag (230, 231). Es wird vermutet, daß die Interaktion zwischen NO und Superoxidanion ($O_2^{\bullet-}$) schädliche $O_2^{\bullet-}$ -vermittelte Reaktive Sauerstoffspezies inaktivieren kann oder in einem komplexen biologischen Milieu $O_2^{\bullet-}$ von spezifischen, toxischen Zielmolekülen oder Signalmolekülen fernhält und somit ein mögliches endogenes Schutzsystem vor Entzündungen darstellen könnte. In geringerer Konzentration könnte Peroxynitrit aus der Reaktion von NO mit Superoxidanionen auch als Signalmolekül funktionieren, was die beobachteten zytoprotektiven Effekte in Thrombozyten oder dem vaskulären System erklären könnte (232, 233).

Die Gründe für die diskrepanten Wirkungen von NO sind noch nicht vollständig geklärt. Es wird vermutet, daß bei der Entstehung der beiden freien Radikale NO und $O_2^{\bullet-}$ unter anderem ihre relative Menge zueinander dafür entscheidend sein könnte, ob NO die Wirkung der Reaktiven Sauerstoffspezies verstärkt oder hemmt (234). So hemmen hohe Konzentrationen an NO aufgrund der reduzierenden, antioxidativen Eigenschaft von NO die Lipidperoxidation, während hohe Konzentrationen an $O_2^{\bullet-}$ oder equimolare Konzentrationen von NO und $O_2^{\bullet-}$ die Lipidperoxidation fördern. Die Modulation dieser Balance zwischen oxidativen und antioxidativen Eigenschaften von NO ist von herausragender klinischer Bedeutung, auch in anderen Bereichen, in denen oxidativer Stress an pathogenen Mechanismen beteiligt ist, wie der Atherosklerose oder dem Diabetes mellitus (235).

Der bedeutsame Einfluß von NO und der iNOS auf proinflammatorische und oxidative Prozesse steht somit außer Frage. In dieser Arbeit sollten Maus-Aortenendothelzellen als Modellzellen eingesetzt werden, um eine protektive

Wirkung von NO nach UVA-induzierter, oxidativer Zellschädigung nachzuweisen. Da ein iNOS knock-out Genotyp bislang nur in Mäusen etabliert werden konnte, ist das Maus-Tiermodell zur Untersuchung der Rolle von NO und der iNOS im antioxidativen Zellgeschehen von besonderer Bedeutung. Um die spezifische Rolle der iNOS von anderen möglichen Zytokin-vermittelten Effekten differenzieren zu können, habe ich Endothelzellen aus iNOS knock-out und Wildtyp-Endothelzellen eingesetzt.

4.1 INOS-EXPRESSION UND NO-PRODUKTION IN MAUS-ENDOTHELZELLEN

Die bereits beschriebene Heterogenität der Endothelzellen verschiedener Spezies bedingt nicht nur ein unterschiedliches Ansprechen der iNOS-Expression auf Zytokine, sondern auch einen unterschiedlichen Aktivitätsgrad der iNOS. Daher habe ich in dieser Arbeit zunächst das iNOS-Expressions- und Aktivitätsprofil der Maus-Aortenendothelzellen charakterisiert.

Die Regulation des iNOS-Gens beim Menschen und bei Mäusen weist sowohl Unterschiede als auch Gemeinsamkeiten auf. Im allgemeinen sind Nagetierzellen sensibler gegenüber verschiedenen biologischen und pharmakologischen Substanzen, so daß häufig eine einzige Substanz wie z.B. LPS, TNF- α , IL-1 β oder IFN- γ , ausreicht, um eine hohe iNOS-Expression zu erzielen. So ist IL-1 β das potenteste Zytokin, das als Einzelstimulus bei Rattenendothelzellen (129) und auch bei Rattenhepatozyten eine iNOS Expression hervorrufen kann (236). Dennoch kann eine iNOS-Expression, die durch einen Einzelstimulus hervorgerufen wurde, von der autokrinen Synthese und Funktion einer weiteren Substanzen abhängig sein, wie es das Beispiel der Rattenhepatozyten weiter zeigt. So war die IL-1 β -induzierte iNOS-Expression nur durch die endogene Synthese von IFN- γ möglich (237).

In den von mir an Mäusezellen durchgeführten Versuchen war IFN- γ in Abhängigkeit vom LPS-Gehalt des Mediums als einziges Zytokin in der Lage, als Einzelstimulus zu einer NO-Produktion zu führen, während weder TNF- α noch IL-1 β alleine einen signifikanten Effekt hatten. Die IFN- γ -enthaltenden Zytokin-kombinationen mit TNF- α und/oder IL-1 β führten zu einer weiteren, signifikanten Verstärkung der NO-Produktion. Die Mischung aller drei Zytokine stellt den potentesten Stimulus für die NO-Synthese dar. Bei Mäusen wurde IFN- γ schon häufiger als alleiniger Auslöser der iNOS-Expression beschrieben, so z.B. für Hepatozyten und glatte Gefäßmuskulatur, jedoch nur bei wenigen menschlichen Zellen wie beispielsweise in Hepatozyten und den Zelllinien AKN-1 und DLD-1. IFN- γ führt, wie von Amoah-Apraku *et al* beschrieben (238), in der renalen Endothelzelllinie MCT der Maus zu einer starken Induktion von NF κ B, welches als DNA-bindendes Protein die Gen-Transkription reguliert. Die Kooperation von IFN- γ und LPS bezüglich der Aktivierung der iNOS-Expression wurde bereits von vielen Autoren beschrieben (239-244).

Die meisten humanen Zelltypen verlangen eine Kombination von Zytokinen, um die iNOS-Expression zu aktivieren (239). Daß es auch hier Ausnahmen gibt, wurde am Beispiel Chondrozyten (245) gezeigt.

Neben der synergistischen Wirkung von Zytokinen sind für eine maximale NO-Ausbeute noch weitere Faktoren von Bedeutung wie die Konzentration des Substrates Arginin. Der K_M -Wert der verschiedenen NO-Synthasen für Arginin liegt bei 2-20 μM (246). Neue Erkenntnisse zeigen, daß Induktoren der iNOS wie LPS in der Lage sind, den Arginin-Transport in die Zelle über eine Ko-induktion des Arginin-Transport-Proteins-2 (sog. „CAT-2“ = kationischer Aminosäuren Transporter) zu erhöhen (247).

Plasma Arginin-Spiegel liegen bei erwachsenen, gesunden Mäusen wie auch beim Menschen bei 50 - 100 μM (248). In dem Standard-Kulturmedium RPMI 1640 sind jedoch 1150 μM Arginin enthalten. Man sollte deshalb den Umstand nicht vernachlässigen, daß in kultivierten Zellen mit intaktem Arginin-Transport-System die NO-Produktion weit über der physiologischen, in vivo gebildeten NO-Menge liegen könnte. Dann müßte man auch die beobachteten und daraus abgeleiteten Effekte als möglicherweise „unphysiologisch“ bezeichnen. Andererseits werden kultivierte Zellen nicht kontinuierlich mit frischen Substraten wie Arginin versorgt, wie dies in vivo der Fall ist, so daß die Verfügbarkeit von Arginin in den Zellkulturen mit der Zeit abnimmt. Daher habe ich bei der Bestimmung der maximalen NO-Produktion durch die iNOS neben der absoluten Zellzahl das Volumen des Kulturmediums mitberücksichtigt und optimiert. Bei ausreichendem Kulturüberstand mit RPMI war keine weitere Steigerung der NO-Produktion durch zusätzliches Arginin möglich. Die Stagnation der NO-Produktion bei hohen Zellzahlen und geringem Kulturüberstand könnte sowohl auf Substratmangel aber auch auf eine Produkthemmung der iNOS zurückzuführen sein. In vitro konnte gezeigt werden, daß authentisches NO-Gas sowie NO-Donoren die NOS-Aktivität in einigen Zelltypen hemmen (249-253), jedoch bleibt die Fähigkeit von NO, die NOS unter physiologischen Bedingungen über eine negative Feedback Regulation in vivo zu inhibieren, fraglich. Ein natürlicher Mechanismus, die iNOS-Aktivität in vivo zu regulieren, besteht in der Verminderung des Substrates L-Arginin durch eine induzierte Expression der Arginase-1 (2, 254) und transkriptionell über die TH2 Zytokine IL-4 und IL-10 oder PGE_2 (255).

In der RT-PCR konnte ich eine iNOS spezifische mRNA bei denjenigen Endothelzellen nachweisen, die nach Zytokin-Stimulation eine signifikante NO-Produktion zeigten. Ferner zeigte sich ein mRNA-Produkt nach Inkubation mit dem Zytokin $\text{IFN-}\gamma$ in „LPS-armen“-Kulturmedium ohne daß der Nachweis einer erhöhten NO-Produktion erbracht werden konnte. Ebenso gelang nach Inkubation mit der Zytokin-Kombination $\text{IL-1}\beta$ + $\text{TNF-}\alpha$ in einem Medium mit fünffach höherer LPS-Konzentration der Nachweis von iNOS mRNA bei fehlender NO-Produktion. Ein vergleichbares Phänomen zeigte sich auch bei Versuchen von de Vera et al, wo es nach $\text{IFN-}\gamma$ -Stimulation von humanen Leberzellen (AKN-1) ebenfalls trotz Nachweis der iNOS mRNA nicht zu einer verstärkten NO-Bildung kam. Dies läßt vermuten, daß das iNOS mRNA Transkript unter diesen Bedingungen hoch labil ist und möglicherweise in Abwesenheit von Zytokinen rasch degradiert wird. Seit der Klonierung von Mäuse- und humaner iNOS cDNAs scheint klar, daß die Regulation der iNOS-Expression überwiegend auf der Ebene der mRNA-Transkription erfolgt (240, 241, 256). Es werden

jedoch auch iNOS-Regulationsmechanismen auf translationaler und posttranslationaler Ebene beschrieben (25, 35). Interessant in diesem Zusammenhang ist auch, daß in unstimulierten menschlichen Zellen ein basales nukleäres iNOS-Transkript gefunden wurde (256), während jedoch eine basale iNOS mRNA Expression in Northern blot Experimenten bei ruhenden Zellen nicht nachgewiesen werden konnte.

iNOS knock-out Endothelzellen zeigten wie erwartet weder im ruhenden noch im Zytokin-aktivierten Zustand eine iNOS-Gen-Amplifikation oder eine messbar gesteigerte NO-Produktion.

4.2 DER EINFLUSS VON iNOS-GENERIERTEM NO AUF DIE HAUT

Wie in anderen biologischen Systemen übt NO auch in der Haut pathogene und protektive Funktionen aus. So wird iNOS-generiertem NO die Beteiligung an pathogenen Mechanismen verschiedener Hauterkrankungen (Vitiligo, Toxische epidermale Nekrolyse (39) u.a.) zugesprochen einschließlich der kutanen Karzinogenese (56). Neuere Erkenntnisse deckten protektive und Differenzierungssteuernde Funktionen von NO in der Haut auf. So zeigte sich, daß in iNOS knock-out Mäusen oder in Mäusen, bei denen die iNOS inhibiert wurde, die epidermale Wundheilung gestört war und durch Transfektion mit dem iNOS-Gen korrigiert werden konnte (257). Andere Studien hatten gezeigt, daß UVA-Strahlung zu einer zeitlich begrenzten Induktion der iNOS in Keratinozyten (53) und kapillären Endothelzellen führt und damit die lokale NO-Produktion in der menschlichen Haut beeinflussen kann (258) vergleichbar mit der NO-Entstehung nach Induktion der iNOS durch Zytokine. Es wird vermutet, daß die iNOS-Aktivität Ursache des beobachteten anhaltenden Anstiegs des lokalen Blutflusses sowie ursächlich für die Erythem- und Ödementstehung nach längerer Sonnenexposition sein könnte. Hierfür spricht das zeitgleiche Auftreten der epidermalen iNOS-Expression mit der Hautrötung nach UV-Exposition (53) sowie die signifikante Reduktion des Erythems durch Inhibitoren der NO-Synthese in menschlicher Haut (41). Damit ergaben sich erste Hinweise auf eine direkte oder indirekte Beteiligung von NO an der lokalen Reaktion der Haut auf UVA-Strahlung.

In vitro schützt die endogene NO-Produktion durch Aktivierung der iNOS sowie exogen hinzugefügtes NO menschliche Endothelzellen der Haut vor UVA-induzierter DNA-Fragmentierung und nachfolgender Apoptose (1). Durch in vitro Experimente mit Ratten-Aortenendothelzellen konnte gezeigt werden, daß dieser Schutz eng korreliert war mit der NO-vermittelten Erhöhung der Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 und mit einer Hemmung der UVA-induzierten Expression des proapoptotischen Proteins Bax einher ging (59). Somit könnte in der Annahme, daß eine gesteigerte NO-Produktion UV-induzierte Schäden vermindert, ein Hinweis auf eine protektive Funktion der iNOS in menschlicher Haut gegeben sein.

Diese These sollte nun in dieser Arbeit am Maus-Modell geprüft werden, indem iNOS-knock out Endothelzellen hier erstmals bezüglich ihrer Empfindlichkeit gegenüber UVA-Strahlung untersucht und mit Wildtyp-Endothelzellen des

gleichen genetischen Backgrounds verglichen wurden. Die Bestrahlung der iNOS-knock out und Wildtyp-Endothelzellen mit UVA₁ steigender Intensität führte zu einem dosisabhängigen Zellsterben, welches 24 h nach der Bestrahlung mit Hilfe der Neutralrot-Vitalfärbung dokumentiert wurde. Dabei stellte sich heraus, daß Maus-Aortenendothelzellen mit einer halbmaximalen Toxizität von ca. 30 Joule/cm² sehr viel höhere UVA₁-Dosen tolerieren als Ratten-Aortenendothelzellen, welche im gleichen Labor und gleicher UVA₁-Quelle bereits bei einer UVA₁-Dosis von 6 Joule/cm² eine halbmaximale Toxizität aufwiesen. Damit ähnelt die UVA-Sensibilität der Maus-Aortenendothelzellen eher der Sensibilität von menschlichen Endothelzellen der Haut (58).

Entgegen den Erwartungen zeigten in der Zusammenfassung der Daten ruhende iNOS-knock-out Endothelzellen keine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber der Bestrahlung mit UVA₁ verglichen mit Wildtyp-Zellen. Wie bereits erwähnt besitzt eine Zelle verschiedene antioxidative Schutzmechanismen, so daß hierüber möglicherweise eine Kompensation der fehlenden NOS-Induktion erfolgt ist. Auch bei den Wildtyp-Endothelzellen kam es bei fehlender NO-Produktion, in Anwesenheit eines Hemmers der NO-Synthasen, zu keiner Veränderung der Empfindlichkeit gegenüber UVA. Dies unterstützt die These, daß NO nur einen von vielen sich ergänzenden zellulären antioxidativen Schutzmechanismen darstellt.

Nach den Untersuchungen an ruhenden Zellen habe ich anschließend den Einfluß der endogenen, Zytokin-medierten NO-Produktion auf den UVA-bedingten Zelltod am Mausmodell untersucht. Anders als bei Ratten-Aortenendothelzellen, bei denen endogen synthetisiertes NO einen potenten Schutz vor UVA-induziertem Zelltod darstellt (1), zeigte die iNOS-Induktion der Wildtyp-Endothelzellen mit proinflammatorischen Zytokinen keine Auswirkungen auf die UVA-vermittelte Zytotoxizität. Man könnte vermuten, daß bei diesem Zelltyp im Gegensatz zu Ratten-Aortenendothelzellen die endogen generierten NO-Mengen vielleicht nicht ausreichend sind, einen effektiven antioxidativen Schutz zu gewährleisten. Allerdings zeigen die Maus-Endothelzellen in vitro eine vergleichbare NO-Produktion zu der von Ratten-EC bei entsprechender Stimulation (129).

Die Feststellung, dass die NO-vermittelte Protektion vor UVA-induziertem Zelltod bei Ratten- und Maus-Aortenendothelzellen einem völlig unterschiedlichen Mechanismus unterliegt, ist von entscheidender Bedeutung in der Frage der Übertragbarkeit der Daten auf den menschlichen Organismus. Die unterschiedlichen Ergebnisse im Ratten- und Mausmodell zeigen nicht nur die bedeutsamen speziesspezifischen Eigenheiten auf sondern führen auch zu der Feststellung, dass das Tiermodell im allgemeinen die entsprechenden Untersuchungen an humanen Zellen nicht ersetzen kann.

Während in den von mir durchgeführten Versuchen bei den Wildtyp-Endothelzellen ein Einfluß der Zytokine selbst oder Zytokin-mediierter Schutzfaktoren wie beispielsweise Hitzeschockproteine oder antiapoptotische Proteine wegen der identischen Dosis-Wirkungskurve ausgeschlossen werden konnte, zeichnete sich bei den iNOS-knock out Endothelzellen ein geringer, NO-unabhängiger schützender Effekt bei Einsatz aller drei Zytokine und mittleren

Bestrahlungsintensitäten ab. Dieser schützender Effekt konnte für keines der Zytokine als Einzelstimulus nachgewiesen werden. Somit scheinen iNOS-knock out Endothelzellen geringfügig empfänglicher gegenüber der protektiven Wirkung Zytokin-medierter Schutzfaktoren zu sein als Wildtyp-Endothelzellen.

Während also ein erhöhtes, endogen- generiertes NO-Angebot zu keinen Auswirkungen auf das UV-vermittelte Zellsterben führte, konnte ich sowohl bei Wildtyp- als auch iNOS-knock out Endothelzellen durch Gabe von exogenen NO-Donoren eine UVA-protektive Wirkung erzielen. Durch diese Zellprotektion überlebten bis zu 40% mehr Zellen die UVA-Bestrahlung verglichen mit unbehandelten, bestrahlten Zellen. Der Schutzmechanismus stellte sich als NO-spezifisch heraus, da die Inkubation mit der Trägersubstanz DETA ohne Auswirkungen blieb. Er bezog sich jedoch nur auf die Anwesenheit von NO während der UV-Bestrahlung, da eine 24-stündige Vorinkubation der Wildtyp-Endothelzellen mit DETA-NO (1 μ M, 33 μ M und 100 μ M) keine Veränderungen der Zellsterblichkeit ergab. Die kurze Zeitdauer, in der die Anwesenheit von NO zum Schutz der Zellen erforderlich ist, macht es unwahrscheinlich, daß die schützende Wirkung von NO über eine Regulation der pro- bzw. antiapoptotischen Proteine Bax oder Bcl-2 erfolgen könnte. Die Ergebnisse sprechen vielmehr für eine direkte antioxidative NO-Aktivität durch Hemmung UVA-induzierter Reaktiver Sauerstoffspezies.

Es ist allerdings schwierig, eine exakte Angabe über die Konzentration von exogenem NO zu machen, die auf die Zellen letztendlich einwirkt. Es existiert ein großer Unterschied zwischen zellulären und chemischen NO-Quellen. Während beispielsweise Makrophagen oder Endothelzellen lokal NO in unmittelbarer Nachbarschaft der Zielzellen bilden, generieren NO-Donoren NO im gesamten Kulturüberstand. Somit wird wahrscheinlich ein Großteil des gebildeten NO in die Gasphase treten bzw. autooxidiert, bevor es den Zellrasen erreicht.

Ebenso wie durch den Einsatz des NO-Donors DETA-NO habe ich auch in Anwesenheit von Nitrit während der Bestrahlung einen Schutz der Zellen nachweisen können. Die besten protektiven Resultate wurden bei Wildtyp-Endothelzellen bei Nitrit-Konzentrationen von 20 mM erzielt. Dieser Befund wirft ein ganz neues Licht auf die Bedeutung von Nitrit im Schweiß. NO wird kontinuierlich auf der menschlichen Hautoberfläche gebildet. Aufgrund der Tatsache, daß Patienten mit antibiotischer Dauertherapie eine verminderte NO-Produktion zeigen, wird vermutet, daß Bakterien der Hautoberfläche Nitrat aus dem Schweiß zu Nitrit reduzieren. Dieser wird nachfolgend nicht-enzymatisch zu NO reduziert in Abhängigkeit von den sauren pH-Bedingungen auf der Hautoberfläche (43). Messungen von Nitrit auf menschlicher Haut ergaben Werte um 3,4 μ M (43); vermutlich sind zur unspezifischen Abwehr von Mikroorganismen Nitrit-Konzentrationen von 1 μ M ausreichend (259). Es wurde bereits postuliert, daß NO an der Hautoberfläche als Schutzschild vor pathogenen Mikroorganismen fungiert, jedoch könnte nun auch eine protektive Wirkung zum Schutz vor UV-Strahlung angenommen werden.

Eine der vielen verschiedenen Möglichkeiten, eine Apoptose zu unterdrücken, besteht wie einleitend erwähnt in der Reduktion des intrazellulären ATP (101, 102). So wird auch vermutet, daß NO seine antiapoptotische Eigenschaft unter

anderem über eine Hemmung der mitochondrialen Atmungskette entfaltet (260-262). Während der Apoptose vollziehen sich irreversible mitochondriale Veränderungen, die durch eine Freisetzung von Cytochrom c aus dem intermembranösen Raum der Mitochondrien in das Zytosol gekennzeichnet sind (263). Dadurch gehen die Mitochondrien von der Energieproduktion zur Superoxidanion-Produktion über (264). Eine Verzögerung der Cytochrom c-Freisetzung in Zellen mit vermindertem ATP-Angebot könnte die Bildung von schädlichen Reaktiven Sauerstoffverbindungen verringern und der Zelle Zeit geben, den möglichen lethalen Schaden zu beheben.

Die Inkubation der Wildtyp-Endothelzellen während der UVA-Bestrahlung mit subtoxischen Konzentrationen von Natriumcyanid (NaCN), das ebenfalls die Atmungskette hemmt, zeigte jedoch nur eine geringe Abnahme der Sterberate. Erst bei hohen Bestrahlungsintensitäten wurde bei einer NaCN-Konzentration von 3 mM eine signifikant höhere Zahl überlebender Zellen als bei den entsprechend bestrahlten Kontrollzellen gemessen. Weiterhin besteht die Möglichkeit, daß die beobachtete Zellprotektion nur von begrenzter Dauer ist, da nicht ausgeschlossen werden kann, daß die Zellen aus Mangel an ATP schließlich in den nekrotischen Zelltod übergehen. Somit ließe sich die antiapoptotische Wirkung von NO nicht allein aus seiner Fähigkeit, die mitochondriale Atmungskette zu inhibieren, erklären.

4.3 CHARAKTERISIERUNG DES ZELLTODES DER ENDOTHELZELLEN NACH UVA-EXPOSITION UND NACH INKUBATION MIT NO

Die oben genannten Untersuchungen zur Rolle der iNOS im UVA-induzierten Zelltod wurden unter der Vorstellung konzipiert, daß sich die Maus-Aortenendothelzellen einer Apoptose im klassischen Sinne unterziehen. Die in der Einleitung beschriebene typische Konstellation von Apoptose-Merkmalen konnte nach der Bestrahlung der Endothelzellen mit UVA₁ anders als in analogen Versuchen mit Rattenendothelzellen jedoch nicht beobachtet werden. Hier habe ich vielmehr bei beiden Zelltypen ein weitgehend simultanes Auftreten sowohl apoptotischer Parameter wie Kernkondensation (Fluoreszenzfärbung mit Hoechst 33342 und Acridinorange) und Zellschrumpfung (durchlichtmikroskopisch) als auch Zeichen der Membraninsuffizienz (Propidiumiodid- und Trypanblau-Färbung) als Hinweis für eine Zellschädigung im Sinne einer Nekrose nachweisen können. Das charakteristische apoptotische Merkmal der Kern-Fragmentierung wurde zu keinem Zeitpunkt beobachtet. Deshalb wurde als weiterer Apoptose-Parameter das Auftreten von DNA-Strangbrüchen in die Beobachtungen mit einbezogen. Die In situ Nick Translation zeigte 24 Stunden nach der Bestrahlung bei 50 % der bestrahlten Zellen DNA-Strangbrüche, die nicht unmittelbar nach der UVA-Exposition, sondern mit einer Latenzzeit von 4-8 Stunden auftraten, was ebenfalls für einen induzierten Mechanismus im Sinne einer Apoptose spricht. Dieser Zeitverlauf bezüglich des Auftretens der Apoptose ähnelt der Bildung der „sunburn cells“, wie sie nach UVA-Exposition beobachtet wird (265, 266). Sie treten frühestens nach 8 Stunden auf, zeigen ein Maximum nach 24-48 Stunden und verschwinden wieder nach 60-72 Stunden (267). Nicht vereinbar mit dem apoptotischen Zelltod ist das frühe Auftreten

trypanblau-positiver Zellen bereits nach vier Stunden. Es ist denkbar, daß die UVA-Exposition hier bei beiden Endothelzelltypen zu einer Form der Nekrose führt, welche in ihrem Anfangsstadium durch apoptotische Abläufe gekennzeichnet ist. Während „frühe“ DNA-Strangbrüche noch vor wenigen Jahren als sicheres Zeichen für eine Apoptose galten, weiß man heute, daß dies weder ein notwendiges noch ein hinreichendes Kriterium für einen apoptotischen Tod ist. So kommt es auch im Verlauf der Nekrose zu einem Auftreten von nukleären DNA-Strangbrüchen (268), jedoch zu einem späten Zeitpunkt des nekrotischen Prozesses, an dessen Beginn Schäden der Zellmembran und der zytoplasmatischen Organellen stehen. Dies kann zu einer Überschätzung der apoptotischen Zellpopulation führen insbesondere in Zellfraktionen mit einem hohen Anteil nekrotischer Zellen.

Während die Bestrahlung mit UVA einen atypischen nekrotischen Zelltod auslöste, konnte ich zeigen, daß toxische Konzentration von NO sowohl bei iNOS knock-out als auch bei Wildtyp-Endothelzellen ausschließlich zu typischen apoptotischen Zellveränderungen führen: 24 Stunden nach Inkubation der Zellen mit 1 mM DETA-NO ließen sich in den Fluoreszenzfärbungen Hoechst-Reagenz und Acridinorange bei zahlreichen Zellen eine Chromatinkondensation und Kernfragmentierung nachweisen. Die negative Propidiumiodid-Färbung läßt auf eine unbeeinträchtigte äußere Zellmembran schließen, wie es für die Apoptose während eines Großteils des apoptotischen Prozesses typisch ist.

Der durch langdauernde, hochdosierte NO-Belastung hervorgerufene Nitrosative Streß führte nicht nur zu einer morphologisch unterschiedlichen Form des Zelltodes verglichen mit UVA-Bestrahlung, sondern zeigt hier erstmals eine stärkere Empfindlichkeit der iNOS knock-out Endothelzellen gegenüber toxischen NO-Konzentrationen als bei Wildtyp-Zellen. DETA-NO-Konzentrationen von 33 μ M, 100 μ M, 333 μ M und 1000 μ M führten nach 24-stündiger Inkubation zu einem signifikant stärkeren Rückgang der Zellpopulation bei iNOS knock-out Endothelzellen. Dies läßt bei iNOS knock-out Endothelzellen aufgrund des genetischen Defektes eine Schwachstelle im „Verteidigungssystem“ bei Induktoren des klassischen apoptotischen Zelltodes, wie NO es hier darstellt, vermuten.

Der Vergleich zu den Ratten-Aortenendothelzellen zeigt, dass Endothelzellen der Ratte zwar empfindlicher auf UVA-Bestrahlung reagieren, jedoch unter identischen Inkubationsbedingungen deutlich höhere NO-Mengen tolerieren als Maus-Endothelzellen (9). Gegenüber UVA-induziertem oxidativen Streß und NO-vermittelter Toxizität scheinen somit aufgrund unterschiedlicher zytotoxischer Mechanismen verschiedene zelluläre Verteidigungssysteme wirksam zu werden. Des weiteren spielen natürlich auch die Konzentration und Einwirkdauer der ROS als auch die Anwesenheit anderer toxischer Produkte eine Rolle.

Da bislang kein ausreichendes Kriterium existiert, um eindeutig zwischen Apoptose und Nekrose unterscheiden zu können, basieren die herkömmlichen Methoden auf einem Kompromiß zwischen der Feststellung der Plasmamembran-Integrität (durch die Aufnahme von Vitalfärbungen oder dem Aus-

strömen intrazellulären Materials) und verschiedenen Untersuchungen auf der Grundlage der Morphologie und der DNA-Fragmentierung.

Ein großes Problem dieser Methoden ist, daß sich die Endstadien der Apoptose in der Zellkultur häufig mit der Nekrose überlagern, da kultivierte Zellen in späten Apoptose-Stadien ihre Membran-Integrität verlieren und Vitalfarbstoffe wie z.B. Trypanblau aufnehmen. Dieser Prozeß wird häufig als „sekundäre Nekrose“ bezeichnet (269). In den von mir durchgeführten Untersuchungen kam es jedoch zu einem frühzeitigen Auftreten der Membraninsuffizienz zeitgleich mit der Kernkondensation und Zellschrumpfung bei identischen Zellen, was einer „sekundären Nekrose“ in diesem Sinne widerspricht.

Zur Übersicht werden in folgender Tabelle noch einmal die Ausprägungen der nekrotischen und apoptotischen Parameter nach Bestrahlung der Endothelzellen mit UVA₁ zusammengefaßt:

Zelltod-Parameter	„klassische“ Apoptose	„klassische“ Nekrose	Maus-AEC nach UVA₁
DNA-Strangbrüche	frühes Auftreten von DNA-Strangbrüchen	keine DNA-Strangbrüche	erste DNA-Strangbrüche treten mit einer Latenz von 4-8 h auf
Membranpermeabilität	Membranpermeabilität bleibt erhalten	rascher Permeabilitätsanstieg	die Schädigung der Zellmembran läuft in etwa parallel mit dem Auftreten der DNA-Strangbrüche
Chromatin	Chromatinkondensation	Zellschwellung	hoher Anteil kondensierter Kerne
Zellkern	Kernschrumpfung	Kernschwellung	zahlreiche kondensierte Kerne
Kern-Fragmentierung	„apoptotic bodies“	keine	wurde zu keinem Zeitpunkt beobachtet

***Tabelle 7:** Diese Zusammenfassung beinhaltet Ergebnisse der in situ Nick Translation und aus den Färbemethoden mit Hoechst-Reagenz, Trypanblau, Propidiumiodid und Acridinorange mit iNOS knock-out und Wildtyp-Endothelzellen.*

Das gleichzeitige Auftreten von apoptotischen und nekrotischen Zellmerkmalen wurde auch von Melino et al. beschrieben (99), die Jurkat-T-Zellen mit anti-CD 95-Antikörpern und dem NO-Donor SNAP ko-inkubierten und elektronenmikroskopisch untersuchten. Während die Zellen nach alleiniger Inkubati-

on mit anti-CD 95 typische apoptotische Veränderungen aufwiesen, zeigte sich nach Ko-Inkubation mit anti-CD 95 und SNAP bei den meisten Zellen charakteristische nekrotische Zeichen einschließlich großer Vakuolen, einer Zellschwellung und Lyse und geschwollenen Mitochondrien. Jedoch kam es bei den gleichen Zellen ebenso zum Auftreten der apoptotischen Merkmale der Chromatinkondensation und Kernschrumpfung, aber nicht zu Kern-Fragmentationen (87).

Es ist denkbar, daß diese und die von mir beschriebene Zellmorphologie der Endothelzellen nach UVA-Exposition Folge des Aufeinandertreffens apoptotischer und nekrotischer Zellsignale sind.

Die neuere Literatur trägt der Beobachtung Rechnung, daß eine eindeutige Zuordnung des Zelltodes zu der klassischen Form der Apoptose bzw. Nekrose nicht immer möglich ist. Kitanaka et al postulierende Existenz eines „Nekrose-ähnlichen“ Zelltodes, der durch ein intrinsisches zelluläres Todesprogramm reguliert wird, welches sich von dem der Apoptose unterscheidet (270). Diese Auffassung basiert auf der Beobachtung, daß durch eine Hemmung der Caspasen die Morphologie des Zelltodes von typisch „apoptotisch“ in eher „nekrotisch“ umgewandelt wird, ohne daß der Zelltod selbst inhibiert wird (100, 271). Ferner gibt es Berichte über eine direkte Induktion des programmierten Zelltodes mit primär nekrotischer Morphologie, beispielsweise durch TNF-vermittelte Toxizität (272).

In den von mir mit UVA bestrahlten Endothelzellen kam es – möglicherweise bedingt durch den Einfluß unbekannter Faktoren der Zellkultur bzw. ohne den Einfluß ihrer natürlichen Umgebung - zu einem „morphologischen Gemisch“ beider Zelltod-Arten als würden beiden Formen des Zelltodes parallel zueinander ablaufen. Ich möchte daher in Abgrenzung zur „sekundären Nekrose“ von einer „apoptotischen Nekrose“ sprechen. Dies kommt der Theorie nahe, daß Apoptose und Nekrose einen gemeinsamen Initiationsmechanismus besitzen und die Art des Zelltodes letztendlich von der Verfügbarkeit von Effektor-Caspasen abhängig ist. Unterstützt wird diese Theorie durch Versuche, in denen die Apoptose, ausgelöst durch Wachstumsfaktorentzug, Etoposide, Actinomycin D, UV-Strahlung, Staurosporine und Überexpression von Myc, Bax oder Bak, durch Hemmung der Caspasen in eine sog. „langsame Nekrose“ überführt wurde (271, 273-276). Es wird postuliert, daß die Hemmung von Caspasen in diesen apoptotischen Zellen im Gegensatz zum Fas-Rezeptor - mediierten Zelltod (79, 275, 277, 278) keinen Einfluß auf die Freisetzung von Cytochrom c besitzt. Cytochrom c, das in Anwesenheit von Caspasen zu einem schnellen, Caspase-abhängigen Zelltod führt, hat möglicherweise ohne die Verfügbarkeit von Caspasen langanhaltende Effekte, wie die Beeinträchtigung des Elektronentransports, dem Abfall der intrazellulären ATP-Spiegel und der Anreicherung von ROS, die letztendlich einen nekrotischen Zelltod herbeiführen (264). Eine andere Erklärung für den langsamen Zelltod nach Caspase-Inhibition könnte in der mitochondrialen Freisetzung von AIF liegen, einem Flavoprotein, welches Homologien mit der bakteriellen Oxidoreduktase aufweist. Dieses mitochondriale Protein zeigte sich in der Lage, eine Chromatinkondensation als auch in großem Umfang DNA-Fragmentationen auszulösen

(279). Mikroinjektionen von AIF in das Zytoplasma führten zu einer Chromatin-Kondensation, einem Verlust an mitochondrialem Membranpotential und der Exposition von Phosphatidylserine an der Zelloberfläche. Keiner dieser Effekte wurde durch Hemmung der Caspasen inhibiert. Ob letztendlich die Freisetzung von Cytochrom c oder AIF aus den Mitochondrien für den nekrotischen Zelltod in Abwesenheit von Caspasen verantwortlich ist, bleibt somit offen.

4.4 ROS ALS VERMITTLER DES UVA-INDUZIERTEN ZELLTODES

UVA-Strahlung führt im Gewebe zur Entstehung von ROS einschließlich Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$), Superoxidanion ($\text{O}_2^{\cdot-}$), Hydroxyl-Radikale (OH^\cdot) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2), die bei Überschreitung der antioxidativen Kapazität reversible und irreversible Schäden an Nucleinsäuren, Lipiden, Lipoproteinen und Makromolekülen zur Folge haben. Singulett-Sauerstoff wird neben H_2O_2 infolge seiner Reaktion mit Membranlipiden für die Bildung von Lipidperoxiden (LOOH) verantwortlich gemacht. Es führt ferner zu einer Erhöhung des Transkriptionsfaktors NF κ B, der wiederum für die Aktivierung von Leukozyten und nachfolgender Bildung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1, IL-6 und TNF- α verantwortlich ist. $^1\text{O}_2$ -generierte LOOH stimulieren zusammen mit anderen ROS die Phospholipase C und A-Aktivität und führen damit zur erhöhten Prostaglandin-Bildung und Adhäsionsmolekül-Produktion und zu einer Aktivierung von Leukozyten und Lymphozyten. Diese verstärken den Prozeß durch weitere ROS-Bildung. Lipidperoxid wiederum zerstört zelluläre Membranen einschließlich Lysosomen mit der Folge der Freisetzung von intrazellulären proinflammatorischen Mediatoren.

In dieser Arbeit habe ich die Beteiligung von Singulett-Sauerstoff an den UVA-induzierten Zellschäden des Endothels durch Inkubation mit Natriumazid, einem spezifischen Inhibitor der Singulett-Sauerstoff-Aktivität, aufgezeigt. Die Inkubation der Wildtyp- und iNOS-knock out Endothelzellen mit Natriumazid (NaN_3) führte zu einer signifikanten Abnahme toter Zellen, nicht jedoch zu einer Senkung der beobachteten DNA-Strangbrüche. Theoretisch wäre Singulett-Sauerstoff durch die Modulation der Apoptose im Sinne einer Verstärkung oder Hemmung des programmierten Zelltodes und durch den Übergang der Apoptose in Nekrose ein möglicher Regulator der Zelltodes, der durch die Menge des generierten NO leicht steuerbar wäre.

Ein vollständiger Schutz vor der UVA-Strahlung wurde durch NaN_3 nicht erzielt, woraus man schließen kann, daß neben Singulett-Sauerstoff noch andere ROS an den UVA-induzierten Zellschäden beteiligt sind.

Ein weiterer Hinweis für die Beteiligung von Singulett-Sauerstoff an UVA-vermittelten Zellschäden ergab sich aus Versuchen, in denen ich Wildtyp-Endothelzellen während der UVA-Bestrahlung mit Histidin, ebenfalls einem Hemmstoff von Singulett-Sauerstoff, inkubiert habe. Hier konnte eine Aufhebung der durch UVA-Bestrahlung hervorgerufenen Kernkondensierung und Membranpermeabilität beobachtet werden.

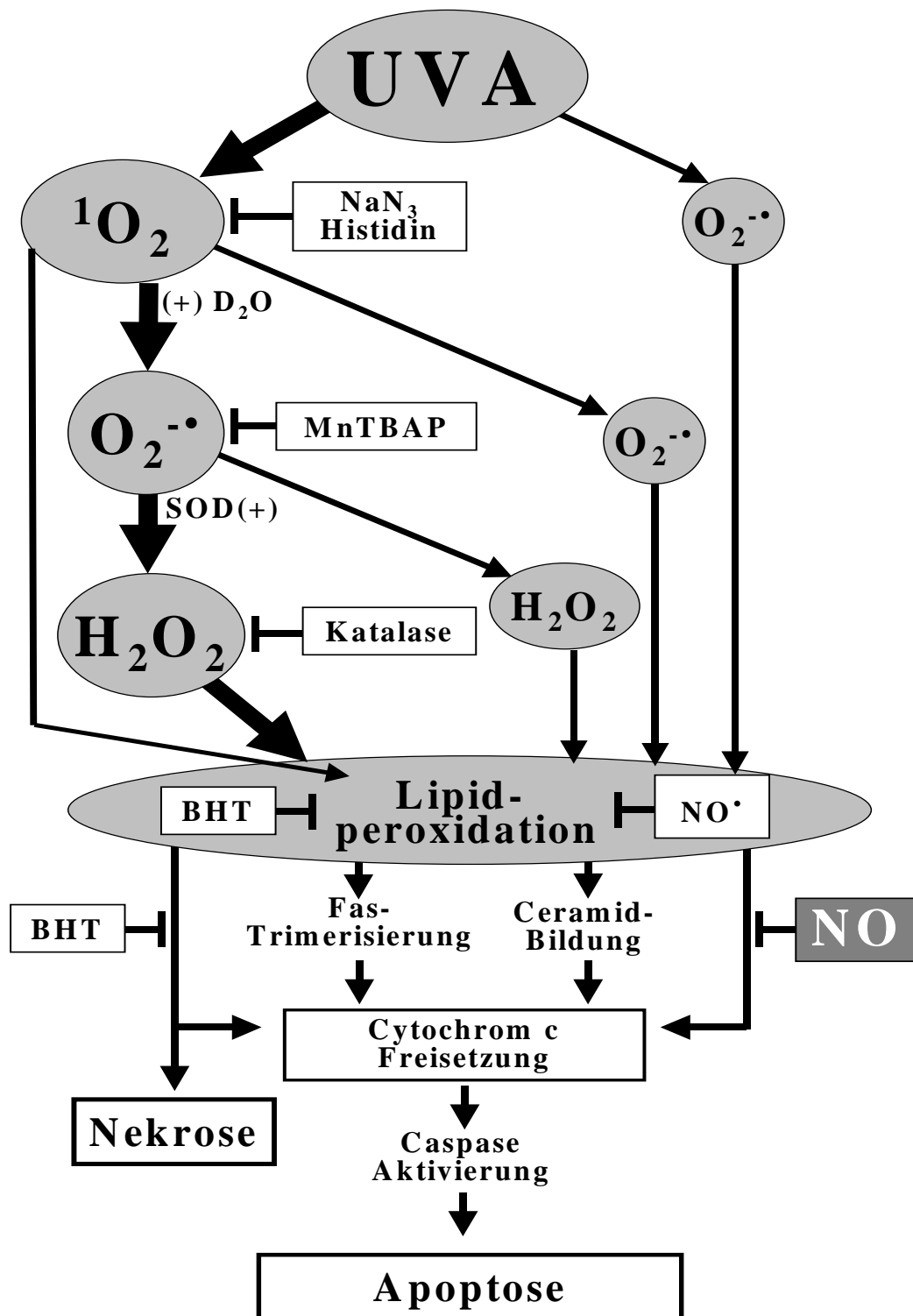


Abbildung 24: Hemmung des UVA-induzierten und ROS-medierten Zelltodes durch Neutralisatoren der ROS:

Während Deuterium (D_2O) durch Stabilisierung von 1O_2 die Lipidperoxidation fördert (280), hemmen NO und andere ROS-Neutralisatoren die Lipidperoxidation und damit den Zelltod.

Als weiterer Faktor in der Vermittlung UVA-bedingter Zellschäden wurde die Bedeutung von Hydrogenperoxyd (H_2O_2) hervorgehoben, indem ich gezeigt habe, daß durch Inkubation der Zellen mit dem Enzym Katalase, welches H_2O_2 zu Wasser und Sauerstoff metabolisiert, ebenfalls die durch UVA-Strahlung hervorgerufenen Zellveränderungen vermieden werden konnten. Es ist wahrscheinlich, daß H_2O_2 als endständiges Glied der ROS-Reaktionskette den entscheidenden Mediator der Lipidperoxidation darstellt. Hinweise darauf ergaben sich dadurch, daß nach Inkubation der Wildtyp-Endothelzellen mit H_2O_2 die gleichen morphologischen Zellveränderungen (Kernkondensation und Membraninsuffizienz) beobachtet wurden wie nach UVA_1 -Bestrahlung und daß diese sowohl nach H_2O_2 -Inkubation als auch nach UVA_1 -Exposition durch die Gabe von BHT als Hemmstoff der Lipidperoxidation vermieden werden konnten.

Abbildung 24 zeigt schematisch die von uns dargelegte Beteiligung von ROS am UVA-induzierten Zelltod und den möglichen zellprotektiven Einfluß von NO.

4.5 NO ALS INHIBITOR DER LIPIDPEROXIDATION

Der aktuelle Kenntnisstand über die vielfältigen protektiven Effekte von NO beinhaltet

- a.) die NO-medierte Stimulation der Expression protektiver /antioxidativer Proteine, wie z.B. GSH (281), Hitzeschockproteine (Hsp 70) (85), Cyclooxygenase-2, Häm-Oxygenase 1 (282, 283) und Metallothionein (284)
- b.) die Protektion von Membranen und Lipoproteinen vor der Oxydierung (234, 285, 286)
- c.) die Inhibition der Produktion von inflammatorischen Mediatoren (Zytokinen, Eicosanide und Integrin-Synthese / Expression)

Es spricht viel dafür, daß in diesem Modellsystem die protektive Wirkung von NO gegenüber der UVA-vermittelten Schädigung von Endothelzellen größtenteils auf der Inhibition der Lipidperoxidation beruht. Wir konnten zeigen, daß exogenes NO in Form der NO-Donoren DETA-NO oder SNOC sowohl nach UVA_1 -Bestrahlung als auch nach Inkubation der Wildtyp-Endothelzellen mit H_2O_2 die daraus resultierenden Zellveränderungen wie Kernkondensation und Membraninsuffizienz inhibiert. Sein ungepaartes Elektron ermöglicht es NO, mit anderen intermediären Radikalen, die im Verlauf der Lipidperoxidation entstehen, zu reagieren und damit die Abfolge der Radikal-Reaktionen zu beenden. Die Neutralität von NO, seine Lipophilie und sein geringer Radius erlauben diesem Molekül sowohl eine leichte Diffusion aber auch die Anreicherung in Membranen und Lipoproteinen (287).

Die Lipidperoxidation kann durch ein einzelnes, initizierendes Ereignis hervorgerufen werden, welches zu einer Destruktion zahlreicher Lipidmoleküle führt und damit die Integrität von Zellmembranen beeinträchtigt. Die Lipidperoxidation beginnt mit der Initiation, bei der ein Wasserstoff-Atom von einer ungesättigten Fettsäure [LH] abgespalten wird. Diese Reaktion, in der ein Alkyl-

Radikal $[L\cdot]$ entsteht, wird nicht nur durch Radikale sondern ebenso durch Metall-Komplexe und Metalloproteine wie z.B. durch die Lipooxygenase und die Cyclooxygenase initiiert. In Anwesenheit von molekularem Sauerstoff entsteht schließlich ein Alkyl-Peroxyl Radikal $[LOO\cdot]$. Die darauf folgenden, langsam ablaufenden Reaktionen von Peroxyl-Radikal-Intermediaten mit ungesättigten Fettsäuren können leicht durch lipophile Antioxidantien wie z.B. Tocopherol, Carotinoide oder Lycopene durch Reduktion der Peroxyl Radikale zu Hydroperoxid $[LOOH]$ terminiert werden. Durch Reaktion von $LOOH$ mit reduzierten Metallen kann jedoch die Lipid-Oxidation erneut in Gang gesetzt werden durch Bildung von Alkoxyl Radikalen $[LO\cdot]$ und Epoxyalkyl-Verbindungen $[L(O\cdot)]$. NO kann auf zweierlei Arten in diesen Reaktionsablauf eingreifen und damit die Lipidperoxidation inhibieren. Der kinetisch bevorzugte Weg besteht in der Termination der Entstehung von Lipid-Peroxyl-Radikalen durch Reaktion mit $LOO\cdot$ -Intermediaten. Als weitere Möglichkeit kann NO mit katalytischen (Metall-) Zentren reagieren und damit enzymatische Reaktionen, die oxidative Lipid-Signal-Moleküle generieren, inhibieren. Jedoch sind diese „Sekundär-Produkte“ von NO – insbesondere Wasserstoffperoxid – ebenso in der Lage, die Lipidperoxidation zu initiieren.

Die Bedeutung der Membranintegrität im NO -vermittelten Schutz vor UVA-induziertem Zelltod konnte in späteren Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe an Ratten-Aortenendothelzellen bestätigt werden (288). Während der UVA-Bestrahlung und bis zu zwei Stunden danach konnte durch exogenes NO (SNOC) ein effektiver Schutz vor Apoptose und Nekrose erzielt werden. Hier konnte ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der NO -vermittelten Zell-Protektion und der Hemmung der Lipidperoxidation durch Bestimmung der Malondialdehyd-Bildung nachgewiesen werden.

4.6 AUSBLICK: THERAPEUTISCHE ANWENDUNG VON NO -PRÄPARATEN

Durch die Interaktion von NO mit Reaktiven Sauerstoffspezies lassen sich zahllose therapeutische Einsatzmöglichkeiten von NO -modulierenden Substanzen konstruieren. Dies gilt im besonderen für Erkrankungen, in denen aktivierte neutrophile Leukozyten zu einem starken Anstieg der ROS („respiratory burst“) und nachfolgenden entzündlichen Gewebeschäden führen wie dies in der Haut z. B. bei der Psoriasis, der leukozytoklastischen Vasculitis, dem Sweet-Syndrom, dem Morbus Behcet, der Linearen Ig A-Dermatose, der Akne und der Rosazea der Fall ist (289-291). ROS-inhibierende Substanzen werden bei diesen Erkrankungen bereits erfolgreich eingesetzt. So haben Retinoide, die sich als effektiv in der Behandlung der Psoriasis gezeigt haben, eine direkte inhibierende Wirkung auf die Bildung von Superoxidanion (292) aber auch die in der Akne / Rosazea-Therapie eingesetzten Antibiotika wie Tetrazyklin und Erythromycin führen zu einer Hemmung der ROS-Produktion (293).

Aufgrund des weiten Wirkungsspektrums von NO bestehen viele weitere therapeutische Optionen sowohl von NO -Donoren als auch von Inhibitoren der NO -Produktion (11, 294-296). Eines der bekanntesten Beispiele ist der pharma-

kologische Einsatz von NO in Form von Nitraten (z.B. Nitroglyzerin) zur Therapie der Angina pectoris bei koronarer Herzerkrankung.

Die therapeutische Anwendung von NO-Präparaten wurde bislang neben der toxischen Wirkung von NO vor allem dadurch limitiert, daß NO in viele verschiedene physiologische Funktionen eingebunden ist (297). Mit zunehmendem Wissen über die mannigfachen Wirkungen von NO und der Entwicklung von spezifischen Antagonisten der verschiedenen NO-Synthasen und von NO-Donoren mit einer pharmakokinetisch spezifischen NO-Freisetzung wird der therapeutische Einsatz von NO weiter an Bedeutung gewinnen.

Eine therapeutische Option für den topischen Einsatz von NO-Donoren auf der Haut wäre beispielsweise für das Raynaud-Syndrom denkbar auf dem Hintergrund der vasodilatatorischen Wirkung von NO (11). Die antimikrobielle Wirksamkeit von NO führte zu einer erfolgreichen Behandlung der Tinea pedis (Fußpilz) mittels einer angesäuerten Nitrit-Creme, welche NO über das Intermediat Dinitrogen Trioxid freisetzte (298). NO in Form eines topisch aufgetragenen NO-Donors kam ebenso in der Wundheilung mit Erfolg zum Einsatz (299). Die verbesserte Reepithelialisierung durch NO wurde auf die gesteigerte Proliferation der Keratinozyten zurückgeführt (47).

Der initiale Einsatz von NO-Antagonisten in der Therapie von Hauterkrankungen ist vielversprechend: So konnte durch topische Inhibition der NO-Produktion in der Haut die Symptome der Rosazea ebenso wie das UV- oder Dithranol-induzierte Erythem gemildert werden (41, 258, 300, 301). Auch hier gilt noch die Einschränkung, daß die meisten bislang verfügbaren NOS-Inhibitoren sowohl die konstitutive NOS als auch die induzierbare NOS inhibieren wenn auch in unterschiedlichen Konzentrationen. Die Konzentration der iNOS-Inhibitoren oder auch der NO-Donoren zu kontrollieren und gleichzeitig die Gefahr von Nebenwirkungen durch systemische Verfügbarkeit zu minimieren gestaltet sich bei topischer Applikation jedoch sehr schwierig.

Schließlich stellt sich auch die Frage einer möglichen therapeutischen Intervention im Sinne einer Gentherapie. Hierbei gilt es jedoch zu beachten, daß ein genetisches Produkt in verschiedenen Stadien der Entwicklung eine unterschiedliche Bedeutung und verschiedene Funktionen besitzen kann. Das konventionelle Ausschalten (knock-out) eines Gens bedeutet einen lebenslangen Verlust des entsprechenden Genproduktes und ist somit nicht gleichbedeutend mit der pharmakologischen Inhibition bei Beginn einer Erkrankung.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Zur Rolle der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase beim endothelialen Zelltod durch UVA

UVA führt dosisabhängig zu Zellschädigung und Zelltod. Diese Vorgänge werden durch Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) mediiert, die über eine Membranschädigung und DNA-Strukturveränderungen das Apoptose-Programm initiieren können. Neben einer Vielzahl anti-oxidativer Verteidigungsmechanismen innerhalb einer Zelle kann auch Stickstoffmonoxid (NO) über eine Radikal-Radikal-Interaktion eine anti-oxidative Wirkung entfalten. In Experimenten mit unbehandelter, menschlicher Haut hatte gezeigt werden können, daß nach Bestrahlung mit UVA die induzierbare NO-Synthase (iNOS) in Gefäßendothelien exprimiert wird. Im Ratten-Modell haben in vitro Versuche mit Endothelzellen ergeben, daß NO, sowohl iNOS-generiert als auch in Form eines NO-Donors, wenn es 24 Stunden vor der UVA-Bestrahlung präsent ist, das Apoptose-Programm hemmen und somit schützend wirken kann. Dabei führte die Vorinkubation mit NO vor dem toxischen Lichtstimulus zu einer gesteigerten Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 und einer Hemmung der Expression des proapoptotischen Proteins Bax. Um den Mechanismus der protektiven Wirkung der iNOS differenzierter untersuchen zu können, sollten in dieser Arbeit analoge und weiterführende Versuche mit Endothelzellen aus iNOS defizienten und Wildtyp-Mäusen etabliert werden.

Zunächst wurde bei den Maus-Aortenendothelzellen durch UVA₁-Bestrahlung der Zelltod provoziert und charakterisiert. UVA führte dosisabhängig zum Zelltod der Endothelzellen, ohne daß sich hierbei quantitative oder qualitative Unterschiede zwischen den beiden Mäuse-Stämmen zeigten. Die Art des Zelltodes wurde anhand morphologischer Untersuchungen mittels Fluoreszenzfärbungen sowie mit Hilfe der Detektion von DNA-Strangbrüchen als eine Art „apoptotische Nekrose“ identifiziert.

Um den Einfluß des intrazellulär freigesetzten NO auf den Zelltod zu untersuchen, habe ich in Wildtyp-Endothelzellen mit proinflammatorischen Zytokinen die iNOS induziert und die Menge des iNOS-generierten NO im Zellkultur-Überstand bestimmt. Eine maximale NO-Produktion wurde durch die Inkubation mit einem Mix der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β und IFN- γ in einer Konzentration von je 500 U/ml erzielt. Sie entspricht der NO-Menge, die nach iNOS-Aktivierung auch in Ratten-Endothelzellen beobachtet wird. Wie nicht anders zu erwarten, wurde bei iNOS defizienten Endothelzellen bei gleicher Behandlung weder eine Induktion noch eine Aktivität der iNOS nachgewiesen.

Im Gegensatz zu den Versuchen an Ratten-Endothelzellen führte die Vorinkubation der Zellen mit NO in Form von endogenem NO nach maximaler Zytokin-Aktivierung oder in Form von exogenem NO durch den NO-Donor DETA-NO zu keiner protektiven Wirkung nach UVA-Bestrahlung. Die Konzentration des eingesetzten NO-Donors wurde eingeschränkt durch die Tatsache, daß Maus-Zellen verglichen mit Ratten-Endothelzellen eine etwa zehnfach höhere Empfindlichkeit gegenüber exogenem NO aufwiesen. Ein Effekt durch die Zy-

tokine selbst bzw. Zytokin-induzierbare Schutzfaktoren konnte in Versuchen mit iNOS-defizienten Mäusezellen negiert werden.

Dennoch zeigte sich exogenes NO, wenn es während der UVA-Bestrahlung präsent ist, in der Lage, die Endothelzellen beider Mäusestämme signifikant vor dem UV-induzierten Zelltod zu schützen. Unter gleichen Bedingungen führte auch Nitrit, welches unter UVA-Einwirkung in NO umgewandelt wird, zu einem Schutz der Zellen. Diese Befunde werfen ein ganz neues Licht auf die Bedeutung von Nitrit im Schweiß auf der Haut und damit auf eine mögliche Protektion vor UV-Strahlung.

Die anhand von Ratten-Endothelzellen gesammelten Daten über eine iNOS-medierte Hemmung der UV-induzierten Apoptose konnten somit nicht völlig auf die Spezies Maus übertragen werden. Diese Arbeit zeigt demnach Spezies-spezifische Unterschiede der antioxidativen Antwort auf und schränkt dadurch auch die Übertragbarkeit der Daten auf den Menschen ein.

Zur weiteren Charakterisierung des UVA-medierten Zelltodes und zur Aufklärung des Mechanismus des NO-vermittelten Schutzes habe ich die Rolle der beteiligten Reaktiven Sauerstoffspezies untersucht. Hierzu wurden die Zellen während der Bestrahlung mit unterschiedlichen Antioxidantien inkubiert. Es zeigte sich, daß spezifische Inhibitoren der Singulett-sauerstoff-Wirkung wie Azid oder Histidin zu einem Schutz der Endothelzellen führte. Ein Schutz der Zellen vor der toxischen UV-Wirkung wurde ebenfalls erreicht durch Substanzen, die Superoxidanionen-Radikale ($O_2^{\cdot -}$) eliminieren wie die Porphyrinverbindung MnTBAP (80 μ M), welche Superoxidanion in Wasser umwandelt, aber auch durch Katalase (2000 U/ml) und butyliertes Hydroxytoluen (BHT) (10 μ M) als spezifischem Inhibitor der Lipidperoxid-Bildung.

In anderen Versuchen konnten die UVA-induzierten Zellschäden durch Inkubation der Endothelzellen mit Wasserstoffperoxid mimikriert werden. Diese toxische Wirkung von Wasserstoffperoxid wurde ebenfalls durch BHT, und auch durch NO inhibiert. Diese Befunde deuten darauf hin, daß H_2O_2 als Folge der UV-Bestrahlung als endständiges Glied der Reaktionskette entscheidend zum Zelltod via Lipidperoxidation beiträgt. Sie führen ferner zu der Annahme, daß NO die beobachtete Hemmung des UVA-induzierten und ROS-vermittelten Zelltodes somit durch eine Inhibition der Lipidperoxidation ermöglicht.

Die hier gesammelten Daten zeigen eine protektive Wirkung der iNOS als Reaktion auf oxidativen Stress auf, weisen jedoch auf Spezies-spezifische Unterschiede hin. Es sind daher weitere Anstrengungen erforderlich, um sich möglicherweise in Zukunft die protektive Wirkung von Stickstoffmonoxid in ROS-medierten, pathologischen Gewebeeränderungen therapeutisch nutzbar zu machen.

6 ABKÜRZUNGEN

AEC	Aortenendothelzellen
BHT	butyliertes Hydroxytoluen
Biotin-16-dUTP	Biotin-16-2'-desoxyuridin-5'-triphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
Cyt c	Cytochrom c
DAB	Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DETA	Bis-(2-Aminoethyl)-Amin
DETA-NO	((Z)-1-[N-(2-aminoethyl)-N-(2-ammonioethyl)amino]diazen-1-ium-1,2-diolate)
DDT	Dithiothreitol
DMEM	dulbeccos minimal essential medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC	Endothelzellen
ECGS	endothelial cell growth supplement
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FAD	Flavin Adenin Dinukleotid
FCS	Fetales Kälberserum (fetal calf serum)
FMN	Flavin Mononukleotid
GAPDH	Glycerinaldehyd-6-phosphatdehydrogenase
HBSS	Hanks buffered salt solution
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-tetraessigsäure
IFN- γ	Interferon-gamma
IL-1 β	Interleukin-1beta
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
INT	in situ Nick Translation
ko	iNOS – Gen defiziente Endothelzellen
L-NMMA	L-N ^G -monomethyl-L-arginin
LPS	Lipopolysaccharid
MnTBAP	Mangan(III)tetrakis(4-benzoesäure)porphyrin
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NEDDC	N-1-Naphtylethylendiamindihydrochlorid
NF κ B	Nuklear Faktor-kappa B
NIO	L-N ⁵ -(1-iminoethyl)-ornithin
NO	Stickstoffmonoxid (nitric oxide)
NOS	Sickstoffmonoxid Synthase
PBS	Phosphat-Pufferlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PECAM-1	platelet endothelial adhesion molecule
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Reverse Transkription
SNOC	S-Nitrosocystein
S.D.	Standardabweichung
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor-alpha

TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
VCAM-1	vascular adhesion molecule
vWF	von Willebrand Faktor
wt	iNOS Wildtyp-Endothelzellen

7 DANKSAGUNG

Mein erster Dank gilt Frau Prof. Dr. Viktoria Kolb-Bachofen für die Überlassung des Themas und ihre freundliche Unterstützung während der experimentellen Phase meiner Dissertation sowie bei der Korrektur der Arbeit. Ihre konstruktive Kritik und wertvollen Anregungen haben wesentlich zur Erstellung dieser Arbeit beigetragen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. Christoph Suschek für seine kompetente Betreuung der Arbeit, die Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten und seine unermüdliche Hilfsbereitschaft in allen Bereichen. Die von ihm ausgehende Begeisterung an wissenschaftlicher Arbeit erwies sich als sehr ansteckend.

Ferner danke ich Frau Dr. Karin Fehsel und Herrn Priv. Doz. Dr. Klaus-Dietrich Kröncke für ihre hilfreichen Ratschläge und Informationen und ihre Bereitschaft, mir bei fachlichen Fragen zur Seite zu stehen.

Frau Ulla Lammersen danke ich für die Hilfe bei der Erlangung labortechnischer Fähigkeiten, für ihre unermüdlichen Anregungen zum gewissenhaften Umgang mit der Zellkultur.

Frau Marija Lovrencic sei gedankt für ihre freundliche Einarbeitung zur Durchführung immunhistochemischer Färbungen.

Frau Martha Turken möchte ich für die professionelle Erstellung der zahlreichen Fotoarbeiten danken.

Frau cand. med. Ulrike Tartler danke ich herzlich für ihre Freundschaft und ihren persönlichen Beitrag zu einem sehr schönen Forschungssemester.

Schließlich geht mein Dank und die Widmung dieser Arbeit an meine Eltern für ihre nie hinterfragte Bereitschaft, mich in jeder Beziehung zu unterstützen.

8 LITERATUR

1. Suschek C, Schuy V, Bruch-Gerhartz D, Kröncke KD, Krutmann J, Kolb-Bachofen V: Nitric oxide protects endothelial cells from UV A-induced apoptosis. *Immunobiol.* 1997; 197:297
2. Granger DL, Hibbs JB, Perfect JR, Durack DT: Metabolic fate of L-arginine in relation to microbistatic capability of murine macrophages. *J. Clin. Invest.* 1990; 85:264-273
3. Stuehr DJ, Nathan CF: Nitric oxide, a macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. *J. Exp. Med.* 1989; 169:1543-1555
4. Liew FY, Cox FEG: Nonspecific defence mechanism: the role of nitric oxide. *Immunol. Today* 1991; 12:A17-A21
5. 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 concentrations in aerobic solutions. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 1997; 355:457-462
6. Feelisch M: The biochemical pathways of nitric oxide formation from nitrovasodilators: appropriate choice of exogenous NO donors and aspects of preparation and handling of aqueous NO solutions. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 1991; 17 (Suppl. 3):S25-S33
7. Nathan C: Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* 1992; 6:3051-3064
8. Schmidt HHW, Walter U: NO at work. *Cell* 1994; 78:919-925
9. Kröncke K-D, Fehsel K, Kolb-Bachofen V: Nitric oxide: cytotoxicity versus cytoprotection-How, why, when, and where? *NO* 1997; 1:107-120
10. Kolb H, Kolb-Bachofen V: Nitric oxide: a pathogenetic factor in autoimmunity. *Immunol. Today* 1992; 13:157-160
11. Anggard E: Nitric oxide: mediator, murderer and medicine. *Lancet* 1994; 343:1199-1206
12. Wink DA, Kasprzak KS, Maragos CM, Elespuru RK, Misra M, Dunams TM, Cebula TA, Koch WH, Andrews AW, Allen JS, Keefer JK: DNA deaminating ability and genotoxicity of nitric oxide and its progenitors. *Science* 1991; 254:1001-1003
13. Molina Y, L. V, McDonald B, Reep B, Brune B, DiSilvio M, Billiar TR, Lapetina EG: Nitric oxide-induced S-nitrosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibits enzymatic activity and increases endogenous ADP-ribosylation. *J. Biol. Chem.* 1992; 267:24929-24932
14. Gopalakrishna R, Chen ZH, Gundimeda U: Nitric oxide and nitric-oxide generating agents induce a reversible inactivation of protein kinase C activity and phorbol ester binding. *J. Biol. Chem.* 1993; 268:27180-27185
15. Lancaster J: A tutorial on the diffusibility and reactivity of free nitric oxide. *Nitric Oxide* 1997; 1:18-30
16. Bolanos JP, Almeida A, Stewart V, Peuchan S, Land JM, Clark JB, Heales SJR: Nitric oxide-mediated mitochondrial damage in the brain: mechanisms and implications for neurodegenerative diseases. *J. Neurochem.* 1997; 68:2227-2240
17. Kröncke KD, Fehsel K, Suschek C, al. e: Inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide in gene regulation, cell death and cell survival. *Int. Immunopharmacol.* 2001; 1:1407-1420
18. Förstermann U, Pollock JS, Schmidt HHW, Heller M, Murad F: Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor / nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fraction of bovine aortic endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; 88:1788-1792
19. Pollock J, Klinghofer V, Förstermann U, Murad F: Endothelial nitric oxide synthase is myristylated. *FEBS Lett.* 1992; 309:402-404

20. Knowles RG, Moncada S: Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.* 1994; 298:249-258
21. Marsden PA, Heng HHQ, Scherer SW, al. e: Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene. *J. Biol. Chem.* 1993; 268:17478-17488
22. Mayer B, John M, Böhme E: Purification of a calcium/calmodulin-dependent nitric oxide synthase from porcine cerebellum. Cofactor role of tetrahydrobiopterin. *FEBS-Letters* 1990; 277:215-9
23. Bredt DS, Snyder SH: Isolation of nitric oxide synthase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990; 87:682-685
24. Pollock JS, Förstermann U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HW, 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.* 1991; 88:10480-4
25. Nathan C, Xie QW: Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell* 1994; 78:915-918
26. Becherel PA, Le Goff L, Ktorza S, Chosidow O, Frances C, Issaly F, Mencia-Huerta JM, Debre P, Mossalayi MD, Arock M: CD23-mediated nitric oxide synthase pathway induction in human keratinocytes is inhibited by retinoic acid derivatives. *J. Invest. Dermatol.* 1996; 106(6):1182-1186.
27. Hevel JM, White KA, Marletta MA: Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase as a flavoprotein. *J. Biol. Chem.* 1991; 266:22789-91
28. White KA, Marletta MA: Nitric oxide synthase is a cytochrome P-450 type hemoprotein. *Biochemistry* 1992; 31:6627-6631
29. Kwon NS, Nathan CF, Stuehr DJ: Reduced biopterin as a cofactor in the generation of nitrogen oxides by murine macrophages. *J. Biol Chem.* 1989; 204:96-501
30. Stuehr DJ, Kwon NS, Nathan-CF: FAD and GSH participate in macrophage synthesis of nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Communications* 1990; 168:558-65
31. Pollock JS, Werner ER, Mitchell JA, Försterman U: Particulate endothelial nitric oxide synthase: requirement and content of tetrahydrobiopterin, FAD and FMN. *Endothelium.* 1993; 1:147-52
32. Cho HJ, Xie QW, Calaycay J, Mumford RA, Swiderek KM, Lee TD, Nathan C: Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J. Exp. Med.* 1992; 176:599-604
33. Laurent M, Lepoivre M, Tenu JP: Kinetic modelling of the nitric oxide gradient generated *nin vitro* by adherent cells expressing inducible nitric oxide synthase. *Biochem. J.* 1996; 314:109-113
34. Kishimoto J, Spurr N, Liao M, Lizhi L, Emson P, Xu W: Localization of brain nitric oxide synthase (NOS) to human chromosome 12. *Genomics* 1992; 14(3):802-804
35. Nathan C, Xie QW: Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J. Biol. Chem.* 1994; 269:13725
36. Kobzik L, Reid MB, Bredt DS, Stamler JS: Nitric oxide in skeletal muscle. *Nature* 1994; 372:546-548
37. Hendriks W: Neuronal nitric oxide synthase contains a discs-large homologous region (DHR) sequence motif. *Biochem. J.* 1995; 305:687-688
38. Kröncke KD: Über die Rolle von Stickstoffmonoxid bei der Entstehung des Typ 1 Diabetes. Aachen, Shaker Verlag, 1998

39. Qureshi AA, Lerner LH, Lerner EA: From bedside to the bench and back. Nitric oxide and the cutis. *Arch. Dermatol.* 1996b; 132:889-893
40. Bruch-Gerharz D, Ruzicka T, Kolb-Bachofen V: Nitric oxide in human skin: current status and future prospects. *J. Invest. Dermatol.* 1998; 110:1-7
41. Goldsmith PC, Leslie TA, Hayes NA, Levell NJ, Dowd PA, Foreman JC: Inhibitors of nitric oxide synthase in human skin. *J. Invest. Dermatol.* 1996; 106:113-118
42. Romero-Graillet C, Aberdam E, Clement M, Ortonne JP, Balloti R: Nitric oxide produced by ultraviolet-irradiated keratinocytes stimulates melanogenesis. *J. Clin. Invest.* 1997; 99:635-642
43. Weller R, Pattullo S, Smith L, Golden M, Ormerod A, Benjamin N: Nitric oxide is generated on the skin surface by reduction of sweat nitrate. *J. Invest. Dermatol.* 1996; 107:327-331
44. Cui S, Reichner JS, Mateo RB, al. e: Activated murine macrophages induce apoptosis in tumor cells through nitric oxide-dependent or -independent mechanisms. *Cancer Res.* 1994; 54:2462-2467
45. Krischel V, Bruch-Gerharz D, Suschek C, Kroncke KD, Ruzicka T, Kolb-Bachofen V: Biphasic effect of exogenous nitric oxide on proliferation and differentiation in skin derived keratinocytes but not fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* 1998; 111(2):286-291
46. Wang R, Ghahary A, Shen YJ, al. e: Nitric oxide synthase expression and nitric oxide production are reduced in hypertrophic scar tissue and fibroblasts. *J. Invest. Dermatol.* 1997; 108:438-444
47. Stallmeyer B, Kämpfer H, Kolb N, Pfeilschifter J, Frank S: The function of nitric oxide in wound repair: inhibition of inducible nitric oxide-synthase severely impairs wound reepithelization. *J. Invest. Dermatol.* 1999; 113:1090-1098
48. Liew FY: Regulation of lymphocyte functions by nitric oxide (Review). *Curr. Opin. Immunol.* 1995; 7:396-399
49. Wei XQ, Charles IG, Smith A, Ure J, Feng GJ, Huang FP, Xu D, Muller W, Moncada S, Liew FY: Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature* 1995; 375(6530):408-411.
50. Kolb-Bachofen V, Fehsel K, Michel G, Ruzicka T: Epidermal keratinocyte expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of psoriasis vulgaris. *Lancet* 1994; 344:139
51. 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; 184:2007-2012
52. Ormerod AD, Weller R, Copeland P, Benjamin N, Ralston SH, Grabowski P, Herriot R: Detection of nitric oxide and nitric oxide synthases in psoriasis. *Arch. Dermatol. Res.* 1998; 290:3-8
53. Kuhn A, Fehsel K, Lehmann P, Krutmann J, Ruzicka T, Kolb-Bachofen V: Abberant timing in epidermal expression of inducible nitric oxide synthase after UV-irradiation in Lupus patients. *J. Invest. Dermatol.* 1998; (in press)
54. Schön T, Hernandez-Pando RH, Negesse Y, Leekassa R, Sundqvist T, Britton S: Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in borderline leprosy lesions. *Br. J. Dermatol.* 2001; 145:809-815
55. Doi K, Akaike T, Horie H, al. e: Excessive production of nitric oxide in rat solid tumor and its implication in rapid tumor growth. *Cancer* 1996; 77:1598-1604
56. Villiotou V, Deliconstantinos G: Nitric oxide, peroxynitrite and nitroso-compounds formation by ultraviolet A (UVA) irradiated human squamous cell carcinoma: potential role of nitric oxide in cancer prognosis. *Anticancer Res.* 1995; 15(3):931-942.

57. Xie K, Huang S, Dong Z, al. e: Transfection with the inducible nitric oxide synthase gene suppresses tumorigenicity and abrogates metastasis by K-1735 murine melanoma cells. *J. Exp. Med.* 1995; 181:1333-1343
58. Suschek CV, Bruch-Gerharz D, Kleinert H, Forstermann U, Kolb-Bachofen V: Ultraviolet A1 radiation induces nitric oxide synthase-2 expression in human skin endothelial cells in the absence of proinflammatory cytokines. *J. Invest. Dermatol.* 2001; 117(5):1200-1205.
59. 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):6130-6137
60. Didier C, Emonet-Piccardi N, Beani JC, Cadet J, Richard MJ: L-arginine increases UV A cytotoxicity in irradiated human keratinocyte cell line: potential role of nitric oxide. *FA-SEB J.* 1999; 13:1817-1824
61. Tomlinson IPM, Bodmer WF: Failure of programmed cell death and differentiation as causes of tumors: some simple mathematical models. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92:11130-11134
62. Carson DA, Lois A: Cancer progression and p53. *Lancet* 1995; 346:1009-1011
63. Kamb A: Sun protection factor p53. *Nature.* 1994; 372:730-731
64. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR: Cell death: the significance of apoptosis. *Int. Rev. Cytol.* 1980; 68:251-305
65. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 1972; 26:239-257
66. Raff MD: Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 1992; 356:397
67. Ellis RE, Yuan J, H.R. H: Mechanism and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1991; 7:663
68. Cohen JJ: Programmed cell death in the immune system. *Adv. Immunol.* 1991; 50:55
69. Trump BF, Goldblatt PJ, Stowell RE: Studies of mouse liver necrosis *in vitro*: Ultrastructural and cytochemical alterations in hepatic parenchymal cell nuclei. *Lab. Invest.* 1965; 14:1969-1999
70. Kerr JFR, Hammon BV: Definition and incidence of apoptosis: an historical perspective. In *Apoptosis: The molecular basis of cell death* (Edited by L.D. Tomei and F.O. Cope), pp. 5-20. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1991
71. Kerr JFR: Neglected opportunities in apoptosis research. *Trends Cell Biol.* 1995; 5:55-57
72. Thornberry NA, Lazebnik Y: Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281(5381):1312-6.
73. Cohen GM: Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997; 326(Pt 1):1-16.
74. Zamzami N, Susin SA, Marchetti P, Hirsch T, Gomez-Monterrey I, Castedo M, Kroemer G: Mitochondrial control of nuclear apoptosis. *J. Exp. Med.* 1996; 183:1533-1544
75. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X: Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997; 91(4):479-89.
76. Adams JM, Cory S: The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281(5381):1322-6.
77. Chao DT, Korsmeyer SJ: BCL-2 family: regulators of cell death. *Annu Rev Immunol* 1998; 16:395-419
78. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng T-I, Jones DP, Wang X: Prevention of apoptosis by bcl-2: Release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997; 275:1129-1132

79. Vander Heiden MG, Chandel NS, Williamson EK, Schumacker PT, Thompson CB: Bcl-xL regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell* 1997; 91(5):627-37.
80. Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD: The release of cytochrome c from mitochondria: A primary site for bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997; 275:1132-1136
81. Gross A, al. e: Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J. Biol. Chem.* 1999; 274:1156-1163
82. Yin XM, al. e: Bid-deficient mice are resistant to Fas-induced hepatocellular apoptosis. *Nature* 1999; 400:886-891
83. Chlichlia K, Peter ME, Rocha M, al e: Caspase activation is required for nitric oxide-mediated, CD95 (APO-1/Fas) -dependent and independent apoptosis in human neoplastic lymphoid cells. *Blood* 1998; 91:4311-4320
84. Wink DA, Hanbauer I, Krishna MC, DeGraff W, Gamson J, Mitchell JB: Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1993; 90:9813-9817
85. Kim YM, Talanian RV, Billiar TR: Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3- like activity via two distinct mechanisms. *J Biol Chem* 1997; 272(49):31138-48.
86. Fukunaga-Takenaka R, Fukunaga K, Tatemichi M, Ohshima H: Nitric oxide prevents UV-induced phosphorylation of the p53 tumor-suppressor protein at serine 46: a possible role in inhibition of apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; 308(4):966-974
87. Melino G, Bernassola F, Knight RA, Corassaniti MT, Nistico G, Finazzi-Agro A: S-nitrosylation regulates apoptosis. *Nature* 1997; 388:432-433
88. Dimmeler S, Haendeler J, Nehls M, Zeiher AM: Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1 β -converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. *J. Exp. Med.* 1997; 185:601-607
89. Mannick JB, Hausladen A, Liu L, Hess DT, Zeng M, Miao QX, Kane LS, Gow AJ, Stamler JS: Fas-induced caspase denitrosylation. *Science* 1999; 284:651-654
90. Genaro AM, Hortelano S, Alvarez A, Martinez C, Bosca L: Splenic B lymphocyte programmed cell death is prevented by nitric oxide release through mechanisms involving sustained Bcl-2 levels. *J. Clin. Invest.* 1995; 95:1884-1890
91. Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P: Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 1995; 15:1-13
92. Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton SA: Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92:7162-7166
93. Tzeng E, Kim YM, Pitt BR, Lizonova A, Kovesdi I, Billiar TR: Adenoviral transfer of the inducible nitric oxide synthase gene blocks endothelial cell apoptosis. *Surgery* 1997; 122:255-263
94. Brüne B, von Knethen A, Sandau KB: Nitric oxide and its role in apoptosis. *Eur J Pharmacol* 1998; 351(3):261-72.
95. Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HS, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, Stamler JS: A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 1993; 364:626-632

96. Lerner LH, Qureshi AA, Reddy BV, Lerner EA: Nitric oxide synthase in toxic epidermal necrolysis and Stevens-Johnson-syndrome. *J. Invest. Dermatol.* 2000; 114:196-199
97. Paul C, Wolkenstein P, Adie H, Wechsler J, Garchon HJ, Revuz J, Roujeau JC: Apoptosis as a mechanism of keratinocyte death in toxic epidermal necrolysis. *Br. J. Dermatol.* 1996; 134:710-714
98. Brune B, von Knethen A, Sandau KB: Nitric oxide (NO): an effector of apoptosis. *Cell Death Differ* 1999; 6(10):969-75.
99. 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):612-622.
100. Hirsch T, Marchetti P, Susin SA, Dallaporta B, Zamzami N, Marzo I, Geuskens M, Kroemer G: The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene* 1997; 15:1573-1581
101. Leist M, Single B, Castoldi AF, Kühnle S, Nicotera P: Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* 1997; 185(8):1481-6.
102. Eguchi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y: Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res.* 1997; 57(10):1835-1840.
103. Bohlinger I, Leist M, Barsig J, Uhlig S, Tiegs G, Wendel A: Interleukin-1 and nitric oxide protect against tumor necrosis factor alpha-induced liver injury through distinct pathways. *Hepatology* 1995; 22(6):1829-37.
104. Beauvais F, Michel L, Dubertret L: The nitric oxide donors, azide and hydroxylamine, inhibit the programmed cell death of cytokine-deprived human eosinophils. *FEBS Lett* 1995; 361(2-3):229-32.
105. Mannick JB, Asano K, Izumi K, Kieff E, Stamler JS: Nitric oxide produced by human B lymphocytes inhibits apoptosis and Epstein-Barr virus reactivation. *Cell* 1994; 79(7):1137-46.
106. Leist M, Single B, Naumann H, Fava E, Simon B, Kühnle S, Nicotera P: Inhibition of mitochondrial ATP generation by nitric oxide switches apoptosis to necrosis. *Exp. Cell Research* 1999; 249:396-403
107. Leist M, Single B, Naumann H, Fava E, Simon B, Kühnle S, Nicotera P: Nitric oxide inhibits execution of apoptosis at two distinct ATP-dependent steps upstream and downstream of mitochondrial cytochrome c release. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999; 258:215-221
108. Palade GE: The microvascular endothelium revisited. In: *Endothelial cell biology in health and disease*. Ed.: Simionescu, N., Simionescu, M., Plenum Press, New York. 1979
109. Lüscher TF, Noll G: The pathogenesis of cardiovascular disease: role of the endothelium as a target and mediator. *Atherosclerosis* 1995; 118:S81-S90
110. Griendling KK, Alexander RW: Endothelial control of the cardiovascular system: recent advances. *FASEB. J.* 1996; 10:283-292
111. Schiffmann E, Showell HJ, Corcoran BA, Ward PA, Smith E, Becker EL: The isolation and partial characterisation of neutrophil chemotactic factors from *Escherichia coli*. *J.Immunol.* 1975; 114:1831-1837
112. Jose PJ: Complement-derived peptide mediators of inflammation. *Br. Med. Bull* 1987; 43:336-349
113. Zimmerman GA, Prescott SM, McIntyre TM: Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signal molecules. *Immunol. Today* 1992; 13:93-98

114. Jalkanen S, Steere AC, Fox RI, Butcher EC: A distinct endothelial cell recognition system that controls lymphocyte traffic into inflamed synovium. *Science* 1986; 233:556-558
115. Picker LJ, Butcher EC: Physiological and molecular mechanisms of lymphocyte homing. *Annu. Rev. Immunol.* 1992; 10:561-580
116. Hirschberg H, Gergh OJ: Antigen-presenting properties of human vascular endothelial cells. *J. Exp. Med.* 1980; 152:249S-255S
117. Hirschberg H: Presentation of viral antigens by human vascular endothelial cells in vitro. *Hum. Immunol.* 1981; 2:235-246
118. Li L, Nicolson GL, Fidler IJ: Direct in vitro lysis of metastatic tumor cells by cytokine-activated murine endothelial cells. *Cancer Res.* 1991; 51:245-251
119. Li L, Kilbourn R, Adams J, Fidler IJ: Role of nitric oxide in lysis of tumor cells by cytokine-activated endothelial cells. *Cancer Res.* 1991; 51:245-249
120. Palade GE, Simionescu M, Simionescu N: Structural aspects of the permeability of the microvascular endothelium. *Acta. Physiol. Scand. Suppl.* 1979; 463:11-32
121. Cho Y, DeBruyn PPH: The passage of red blood cells through the sinusoidal wall of the spleen. *Amer. J. Anat.* 1975; 142:91-106
122. Gerritsen M: Functional heterogeneity of vascular endothelial cells. *Biochem. Pharmacol.* 1987; 36:2701-2711
123. Kuzu I, Bicknell R, Harris AL, Jones M, Gatter KC, Mason DY: Heterogeneity of vascular endothelial cells with relevance to diagnosis of vascular tumours. *J. Clin. Pathol.* 1992; 45:143-148
124. Gibbs LS, Lai L, Malik AB: Tumor necrosis factor enhances the neutrophil-dependent increase in endothelial permeability. *J. Cell Physiol.* 1992; 145:496-500
125. Martin MA, Silverman HJ: Gram negative sepsis and the adult respiratory distress syndrome. *Clin. Infect. Dis.* 1992; 14:1213-1228
126. Moncada S, Higgs A: The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.* 1993; 329:2002-2012
127. Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS: Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; 84:9265-9269
128. Bull HA, Hothersall J, Chowdhury N, Cohen J, Dowd PM: Neuropeptides induce release of nitric oxide from human dermal microvascular endothelial cells. *J. Invest. Dermatol.* 1996; 106:655-660
129. Suschek C, Rothe H, Fehsel K, Enczmann J, Kolb-Bachofen V: Induction of a macrophage-like nitric oxide synthase in cultured rat aortic endothelial cells. *J. Immunol.* 1993; 151:3283-3291
130. Suschek C, Fehsel K, Kröncke K-D, Sommer A, Kolb-Bachofen V: Primary cultures of rat capillary endothelial cells: constitutive and cytokine-inducible macrophage-like nitric oxide synthases are expressed and activities regulated by glucose concentration. *Am. J. Pathol.* 1994; 145:485-695
131. Kröncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V: Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin. Exp. Immunol.* 1998; 113(2):147-56.
132. Khan BV, Harrison DG, Olbrych MT, Alexander RW, Medford RM: Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(17):9114-9.

133. Niu XF, Smith CW, Kubes P: Intracellular oxidative stress induced by nitric oxide synthesis inhibition increases endothelial cell adhesion to neutrophils. *Circ Res* 1994; 74(6):1133-40.
134. Zeiher AM, Fisslthaler B, Schray-Utz B, Busse R: Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells. *Circ Res* 1995; 76(6):980-6.
135. Fukuo K, Inoue T, Morimoto S, Nakahashi T, Yasuda O, Kitano S, Sasada R, Ogihara T: Nitric oxide mediates cytotoxicity and basic fibroblast growth factor release in cultured vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 95:669-676, 1995. *J. Clin. Invest.* 1995; 95:669-676
136. Frederick JE, Alberts AD: *Biological Responses to Ultraviolet A Radiation*, ed. Urbach, F. (Valdemar, Overland Park, KS) 1992:7-18
137. Kochevar I: Action spectrum and mechanisms of UV radiation-induced injury in lupus erythematosus. *J. Invest. Dermatol.* 1985; 85:140-3
138. Parrish JA, Jaenicke KF, Anderson RR: Erythema and melanogenesis action spectra of normal human skin. *Photochem. Photobiol.* 1982; 36(2):187-191.
139. Bruls WAG, Slaper H, van der Leun JC, Berrens L: Transmission of human epidermis and stratum corneum as a function of thickness in the ultraviolet and visible wavelengths. *Photochem. Photobiol.* 1984; 40:485-494
140. Hitchins VM, Withrow TJ, Olvey KM, Harleston BA, Ellingson OL, Bostrom RG: The cytotoxic and mutagenic effects of UVA radiation on L5178Y mouse lymphoma cells. *Photochem. Photobiol.* 1986; 44:53-57
141. Moan J, Peak MJ: Effects of UV radiations on cells. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 1989; 4:21-34
142. Peak MJ, Peak JG, Jones CA: Different: direct and indirect mechanisms for the induction of DNA-protein crosslinks in human cells by far- and near-ultraviolet radiations: 290 and 405 nm. *Photochem. Photobiol.* 1985; 42:141-146
143. Peak MJ, Peak JG: Solar ultraviolet-induced damage to DNA. *Photodermatol.* 1989; 6:1-15
144. Tyrrell RM, Keyse SM: The interaction of UVA radiation with cultured cells. *J. Photochem. Photobiol.* 1990; 4B:349-361
145. Godar DE, Thomas DP, Miller SA, Lee W: Long-wavelength UVA radiation induces oxidative stress, cytoskeletal damage, and hemolysis. *Photochem. Photobiol.* 1993; 57:1018-1026
146. Peak JG, Peak MJ: Comparison of initial yields of DNA-to-protein crosslinks and single-strand breaks induced in cultured human cells by far- and near-ultraviolet light, blue light and X-rays. *Mutat. Res.* 1991; 246:187-191
147. Churchill ME, Peak JG, Peak MJ: Correlation between cell survival and DNA single-strand break repair proficiency in the Chinese hamster ovary cell lines AA8 and EM9 irradiated with 365-nm ultraviolet-A radiation. *Photochem Photobiol* 1991; 53(2):229-36.
148. Emerit I, Michelson A: Mechanism of photosensitivity in systemic lupus erythematosus patients. *Sci. USA* 1981; 78:2537-40
149. Gange R, Rosen C: UV A effects on mammalian skin and cells. *Photochem. Photobiol.* 1987; 46:1046-50
150. McCormick JP, Fischer JR, Pachlatko JP: Characterization of a cell-lethal product from the photooxidation of tryptophan: hydrogen peroxide. *Science* 1976; 191:468-469

151. Peak JG, Peak MJ, Foote CS: Effects of glycerol upon the biological action of near-ultraviolet light: spectra and concentration dependence for transforming DNA and for *Escherichia coli* B/r. *Photochem. Photobiol.* 1982; 3:413-416
152. Tyrrell RM, Pidoux M: Singlet oxygen involvement in the inactivation of cultured human fibroblasts by UVA (334 nm, 365 nm) and near-visible (405 nm) radiation. *Photochem. Photobiol.* 1989; 49:407-412
153. Elder DE: Human melanocytic neoplasms and their etiologic relationship with sunlight. *J. Invest. Dermatol.* 1989; 92:297s-303s
154. Kelfkens G, de Gruijl FR, van der Leun JC: Ozone depletion and increase in annual carcinogenic ultraviolet dose. *Photochem. Photobiol.* 1990; 52(4):819-823.
155. Gilchrest BA: *Photodamage*. New York, 1995
156. Lavker RM, Gerberick GF, Veres DA, Irwin CJ, Kaidbey KH: Cumulative effects from repeated exposures to suberythral doses of UV B and UV A in human skin. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1995; 32:53-62
157. Seite S, Moyal D, Richard S, al e, Mexoryl SX: A broad absorption UV A filter protects human skin from the effects of repeated suberythral doses of UV A. *J. Photochem. Photobiol.* 1998; 44:69-76
158. Roza L, Baan RA, van der Leun JC, Kligman L, Young AR: UVA hazards in skin associated with the use of tanning equipment. *J Photochem Photobiol B* 1989; 3(2):281-7.
159. Krutmann J, Czech W, Diepgen T, Niedner R, Kapp A, Schopf E: High-dose UVA1 therapy in the treatment of patients with atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 1992; 26(2 Pt 1):225-30.
160. Krutmann J: Phototherapie for atopic dermatitis. *Dermatol. Therapie* 1996; 1(24-31)
161. Krutmann J: High-dose ultraviolet A1 phototherapie for inflammatory skin diseases. *Dermatol. Therapie* 1997; 4:123-128
162. McGrath H: Ultraviolet-A1 irradiation decreases clinical disease activity and autoantibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin. Exp. Rheum.* 1994; 12:129_135
163. McGrath H: Ultraviolet-A1 phototherapie for lupus erythematosus. *Dermatol. Therapie* 1997; 4:109-117
164. Stege H, Schopf E, Ruzicka T, Krutmann J: High-dose UV A1 for urticaria pigmentosa. *Lancet* 1996; 347:64
165. Gruss C, Stucker M, von Kobyletzki G, Schreiber D, Altmeyer P, Kerscher M: Low dose UVA1 phototherapie in disabling pansclerotic morphea of childhood. *Lancet* 1997; 136:293-294
166. Stege H, Berneburg M, Humke S, al e: High-dose UVA1 radiation therapie for localized scleroderma. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1997; 36:938-944
167. Morita A, Werfel T, Stege H, al e: Evidence that singlet oxygen-induced human T-helper cell apoptosis is the basic mechanism of ultraviolet-A radiation phototherapie. *J. Exp. Med.* 1997; 186:1763-1768
168. Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T: Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science* 1995; 270(5234):296-299
169. Suzuki YJ, Forman HJ, Sevanian A: Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic. Biol. Med.* 1997; 22(1-2):269-285
170. Wolin MS: Reactive oxygen species and vascular signal transduction mechanisms. *Microcirculation* 1996; 3(1):1-17

171. Lander HM: An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. *Faseb J.* 1997; 11(2):118-124
172. Cadenas E: Biochemistry of oxygen toxicity. *Annu. Rev. Biochem.* 1989; 58:79-110
173. Sies H: Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp. Physiol.* 1997; 82(2):291-295
174. Cross CC, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, McCord JM, Harman D: Davis conference: oxygen radicals and human disease. *Ann. Intern. Med.* 1987; 107:526-545
175. Black HS: Potential involvement of free radical reactions in ultraviolet light-mediated cutaneous damage. *Photochem. Photobiol.* 1987; 46:213-221
176. Maeda K, Naganuma M, Fukuda M: Effects of chronic exposure to ultraviolet-A including 2% ultraviolet-B on free radical reduction systems in hairless mice. *Photochem. Photobiol.* 1991; 54:737-740
177. Iizawa O, Kato T, Tagami H, Akamatsu H, Niwa Y: Long-term follow-up study of changes in lipid peroxide levels and the activity of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in mouse skin after acute and chronic UV irradiation. *Arch. Dermatol. Res.* 1994; 286:47-52
178. Okada K, Takahashi Y, Ohnishi K, Ishikawa O, Miyachi Y: Time-dependent effect of chronic UV irradiation on superoxide dismutase and catalase activity in hairless mice skin. *J. Dermatol. Sci.* 1994; 8:183-186
179. Peak MJ, Jones CA, Sedita BA, Dudek EJ, Spitz DR, Peak JG: Evidence that hydrogen peroxide generated by 365 nm UV A radiation is not important in mammalian cell killing. *Radiat. Res.* 1990; 123:220-223
180. Pilas B, Sarna T, Korytowski W, Peak JG, Peak MJ: Role of hydrogen peroxide in DNA damage caused by UVA radiation. *Photochem. Photobiol.* 1990; 51 (supp):32S
181. Peak JG, Pilas B, Dudek EJ, Peak MJ: DNA breaks caused by monochromatic 365 nm ultraviolet-A radiation or hydrogen peroxide and their repair in human epithelioid and xeroderma pigmentosum cells. *Photochem. Photobiol.* 1991; 54:197-203
182. Hrabie JA, Klose JR, Wink DA, Keefer LK: New nitric oxide-releasing zwitterions derived from polyamines. *J. Org. Chem.* 1993; 58:1472-1476
183. Mirna A, Hofmann K: Über den Verbleib von Nitrit in Fleischwaren. I. Umsetzung von Nitrit mit Sulfhydryl-Verbindungen. *Fleischwirtschaft* 1969; 49:1361-1366
184. Finter NB: Dye uptake methods of assessing viral cytopathogenicity and their application to interferon assays. *J. Gen. Virol.* 1969; 5:419-425
185. McLaren C: Influence of cell age on production and assay of mouse interferon in L-cells. *Archiv für die gesamte Virusforschung* 1970; 32:13-18
186. Belloc F, Dumain P, Boisseau MR, Jalloustre C, Reiffers J, Bernard P, Lacombe F: A flow cytometric method using Hoechst 33342 and propidium iodide for simultaneous cell cycle analysis and apoptosis determination in unfixed cells. *Cytometry* 1994; 17:59-65
187. Fehsel K, Kolb-Bachofen V, Kolb H: Analysis of TNF-alpha-induced DNA strand breaks at the single cell level. *Am. J. Path.* 1991; 139:251-157
188. Gold R, Schmied M, Rothe G, Zischler H, Breitschopf H, Wekerle H, Lassmann H: Detection of DNA fragmentation in apoptosis: application of in situ nick translation to cell culture systems and tissue sections. *J. Histochem. Cytochem.* 1993; 41:1023
189. Wyllie AH: Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endonuclease activation. *Nature* 1980; 284:555-556
190. Wyllie AH, Morris RG, Smith AL, Dunlop D: Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J. Pathology* 1984; 142:67-77

191. Marletta MA, Yoon PS, Iyengar R, Leaf CD, Wishnok JS: Macrophage oxidation of L-arginin to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry*. 1988; 27:8706-11
192. Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J: Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 1992; 258:1898-1902
193. Griess P: Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt "Über einige Azoverbindungen". *Ber. Chem. Ges.* 1879; 12:426-428
194. Darzynkiewicz Z: Simultaneous analysis of cellular RNA and DNA content. In Darzynkiewicz Z, Robinson J, Crissman H, eds. *Methods in Cell Biology*. San Diego, Academic Press 1990; 41:401-420
195. Zelenin A: Fluorescence microscopy of lysosomes and related structures in living cells. *Nature* 1966; 212:425-426
196. Mpoke SS, Wolfe J: Differential staining of apoptotic nuclei in living cells: Application to macronuclear elimination in *Tetrahymena*. *J. Histochem. Cytochem.* 1997; 45(5):675-683
197. Hasty N, Merkel PB, Radlick P, Kearns DR: Role of azide in singlet oxygen reactions: reaction of azide with singlet oxygen. *Tetrahedron. Lett.* 1972; 1:49-52
198. Faulkner KM, Stevens RD, Fridovich I: Characterization of Mn(III) complexes of linear and cyclic deferrioxamines as mimics of superoxide dismutase activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 1994; 310:341-346
199. Faulkner KM, Liochev SI, Fridovich I: Stable Mn(III) porphyrins mimic superoxide dismutase in vitro and substitute for it in vivo. *J. Biol. Chem.* 1994; 269:23471-23476
200. Chance B, Sies H, Boveris A: Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 1979; 59(3):527-605
201. Bose B, Agarwal S, Chatterjee SN: UV-A induced lipid peroxidation in liposomal membrane. *Radiat. Environ. Biophys.* 1989; 28:59-65
202. McGuire PG, Orkin RW: Isolation of rat aortic endothelial cells by primary explant techniques and their phenotypic modulation by defined substrates. *Lab. Invest.* 1987; 57:94-104
203. Merrilees MJ, Scott L: Culture of rat and pig aortic endothelial cells. *Artherosclerosis* 1981; 38:19-26
204. Weibel ER, Palade GE: New cytoplasmic components in arterial endothelia. *J. Cell. Biol.* 1964; 23:101-106
205. Lawley TJ, Kubota Y: Introduction of morphologic differentiation of endothelial cells in culture. *J. Invest. Dermatol.* 1989; 93:59S-61S
206. Kumar S, West DC, Ager A: Heterogeneity in endothelial cells from large vessels and microvessels. *Differentiation* 1987; 36:57-70
207. Brevilacqua JR, Pober JS, Majeau GR, Fiers W, Cotran RS, Gimbrone MA: Recombinant tumor necrosis factor induces procoagulant activity in cultured human vascular endothelium: characterisation and comparison with action of interleukin-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1986; 83:4533-4537
208. Prober JS, Cotran RS: Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol. Rev.* 1990; 70:427-451
209. Gorski A: The role of cell adhesion molecules in immunopathology. *Immunol. Today* 1994; 15:251-255
210. 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

211. Kilbourn RG, Belloni P: Endothelial cell production of nitrogen oxides in response to interferon-gamma, with tumor necrosis factor, interleukin-1, or endotoxin. *J. Natl. Cancer. Inst.* 1990; 82:772-776
212. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR: Analysis of nitrate, nitrite, and (¹⁵N)nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 1982; 126:131-138
213. Knowles RG, Palacios M, Palmer RMJ, Moncada S: Kinetic characteristics of nitric oxide synthase from rat brain. *Biochem. J.* 1990; 269:207-210
214. Rees DD, Palmer RMJ, Schulz R, Hodson HF, Moncada S: Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br. J. Pharmacol.* 1990; 101:746-752
215. McCall T, Feelisch M, Palmer RMJ, Moncada S: Identification of N-iminoethyl-L-ornithine as an irreversible inhibitor of nitric oxide synthase in phylogocytic cells. *Br. J. Pharmacol.* 1991a; 102:234-238
216. Lorsbach RB, Murphy WJ, Lowenstein CJ, Snyder SH, Russell SW: Expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing. Molecular basis for the synergy between interferon-gamma and lipopolysaccharide. *J. Biol. Chem.* 1993; 268(3):1908-1913.
217. Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ: Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J. Immunol.* 1988; 141(7):2407-2412
218. Park SK, Lin HL, Murphy S: Nitric oxide limits transcriptional induction of nitric oxide synthase in CNS glial cells. *Biophys. Res. Commun.* 1994; 201:762-768
219. Maragos CM, Wang JM, Hrabie JA, Oppenheim JJ, Keefer LK: Nitric oxide/nucleophile complexes inhibit the in vitro proliferation of A375 melanoma cells via nitric oxide release. *Cancer Res* 1993; 53(3):564-8.
220. Berendji D, Kolb-Bachofen V, Meyer KL, Grapenthin O, Weber H, Wahn V, Kröncke K-D: Nitric oxide mediates intracytoplasmic and intranuclear zinc release. *FEBS Lett.* 1997; 405:37-41
221. Muhl H, Sandau K, Brüne B, Briner VA, Pfeilschifter J: Nitric oxide donors induce apoptosis in glomerular mesangial cells, epithelial cells and endothelial cells. *Eur. J. Pharmacol.* 1996; 317:137-149
222. Gross SS, Stuehr DJ, Aisaka K, Jaffe EA, Levi R, Griffith OW: Macrophage and endothelial cell nitric oxide synthesis: cell-type selective inhibition by N^G-aminoarginine, N^G-nitroarginine and N^G-methylarginine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990; 170:96-103
223. Lambert LE, Whitten JP, Baron BM, Cheng HC, Doherty NS, McDonald IA: Nitric oxide synthesis in the CNS, endothelium and macrophages differs in its sensitivity to inhibition by arginine analogues. *Life Sci.* 1991; 48:69-75
224. Hall RD, Chignell CF: Steady-state near infrared detection of singlet molecular oxygen: a stern-volmer Quenching experiment with sodium azide. *Photochem. Photobiol.* 1987; 45:459-464
225. Bauer JA, Fung HL: Photochemical generation of nitric oxide from nitro-containing compounds: possible relation to vascular photorelaxation phenomena. *Life Sciences* 1994; 54:1-4
226. Grisham MB, Specian RD, Zimmerman TE: Effects of nitric oxide synthase inhibition on the pathophysiology observed in a model of chronic granulomatous colitis. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 271(2):1114-21.

227. McCartney-Francis N, Allen JB, Mizel DE, Albina JE, Xie QW, Nathan CF, Wahl SM: Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J Exp Med* 1993; 178(2):749-54.
228. Mulligan MS, Moncada S, Ward PA: Protective effects of inhibitors of nitric oxide synthase in immune complex-induced vasculitis. *Br J Pharmacol* 1992; 107(4):1159-62.
229. De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA, Jr., 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):60-68.
230. Harbrecht BG, Billiar TR, Stadler J, Demetris AJ, Ochoa JB, Curran RD, Simmons RL: Nitric oxide synthesis serves to reduce hepatic damage during acute murine endotoxemia. *Crit Care Med* 1992; 20(11):1568-74.
231. Wink DA, Cook JA, Pacelli R, Liebmann J, Krishna MC, Mitchell JB: Nitric oxide (NO) protects against cellular damage by reactive oxygen species. *Toxicol. Lett.* 1995; 82/83:221-226
232. Go YM, Patel RP, Maland MC, Park H, Beckman JS, Darley-Usmar VM, Jo H: Evidence for peroxynitrite as a signaling molecule in flow-dependent activation of cJun N-terminal kinase in endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 1999; 277:H1647-H1653
233. Brown AS, Moro MA, Masse JM, Cramer EM, Radomski M, Darley-Usmar V: Nitric oxide-dependent and independent effects on human platelets treated with peroxynitrite. *Cardiovasc. Res.* 1998; 40:380-388
234. 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; 269:26066-26075
235. Pieper G.M. LP, Siebeneich W.: Diabetic-induced endothelial dysfunction in rat aorta, role of hydroxyl radicals. *Cardiovasc. Res.* 1997b; 34:145-156
236. Geller DA, de Vera ME, Russell DA, Shapiro RA, Nussler AK, Simmons RL, Billiar TR: A central role for IL-1 beta in the in vitro and in vivo regulation of hepatic inducible nitric oxide synthase. IL-1 beta induces hepatic nitric oxide synthesis. *J. Immunol.* 1995; 155(10):4890-4898.
237. Schroeder RA, Gu JS, Kuo PC: Interleukin 1beta-stimulated production of nitric oxide in rat hepatocytes is mediated through endogenous synthesis of interferon gamma. *Hepatology* 1998; 27(3):711-719.
238. Amoah-Apraku B, Chandler LJ, Harrison JK, Tang SS, Ingelfinger JR, Guzman NJ: NF-kappa B and transcriptional control of renal epithelial-inducible nitric oxide synthase. *Kidney Int.* 1995; 48(3):674-682.
239. Geller DA, Nussler AK, Di Silvio M, Lowenstein CJ, Shapiro RA, Wang SC, Simmons RL, Billiar TR: Cytokines, endotoxin, and glucocorticoids regulate the expression of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1993; 90(2):522-526.
240. Lorsbach RB, Murphy WJ, Lowenstein CJ, Snyder SH, Russell SW: Expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophages activated for tumor cell killing. *J. Biol. Chem.* 1993; 268:1908-1913
241. Xie Q-w, Whisnant R, Nathan C: Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon-gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J. Exp. Med.* 1993; 177:1779-1784
242. Lowenstein CJ, Alley EW, Raval P, Snowman AM, Snyder SH, Russell SW, Murphy WJ: Macrophage nitric oxide synthase gene: two upstream regions mediate induction by in-

- terferon gamma and lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1993; 90(20):9730-9734.
243. Deng W, Thiel B, Tannenbaum CS, Hamilton TA, Stuehr DJ: Synergistic cooperation between T cell lymphokines for induction of the nitric oxide synthase gene in murine peritoneal macrophages. *J. Immunol.* 1993; 151(1):322-329.
 244. Stuehr DJ, Marletta MA: Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection, lymphokines, or interferon-gamma. *J. Immunol.* 1987; 139(2):518-525.
 245. Charles IG, Palmer RM, Hickery MS, Bayliss MT, Chubb AP, Hall VS, Moss DW, Moncada S: Cloning, characterization, and expression of a cDNA encoding an inducible nitric oxide synthase from the human chondrocyte. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1993; 90(23):11419-11423.
 246. Morris SMJ: Arginine synthesis, metabolism, and transport: regulators of nitric oxide synthesis., in *Cellular and Molecular Biology of Nitric oxide*. Edited by Laskin JD, Laskin DL. New York, Dekker, 1999, pp 57-85
 247. Messeri Dreissig MD, Hammermann R, Mossner J, Gothert M, Racke K: In rat alveolar macrophages lipopolysaccharides exert divergent effects on the transport of the cationic amino acids L-arginine and L-ornithine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2000; 361(6):621-8
 248. Böger R.H. B-BSM, Thiele W., Junker W., Alexander K., Frolich J.C.: Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation* 1997a; 95:2068-2074
 249. Assreuy J, Cunha FQ, Liew FY, Moncada S: Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.* 1993; 108:833-837
 250. Buga GM, Griscavage JM, Rogers NE, Ignarro LJ: Negative feedback regulation of endothelial cell function by nitric oxide. *Circ. Res.* 1993; 73:808-812
 251. Rengasamy A, Johns RA: Regulation of nitric oxide synthase by nitric oxide. *Mol. Pharmacol.* 1993; 44:124-128
 252. Rogers NE, Ignarro LJ: Constitutive nitric oxide synthase from cerebellum is reversly inhibited by nitric oxide formed from L-arginine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992; 189:242-249
 253. Griscavage JM, Rogers NF, Sherman MP, Ignarro LJ: Inducible nitric oxide synthase from rat macrophage cell line is inhibited by nitric oxide. *J. Immunol.* 1993; 151:6329-6337
 254. Vodovotz Y, Kwon NS, Pospischil M, Manning J, Paik J, Nathan C: Inactivation of nitric oxide synthase after prolonged incubation of mouse macrophages with IFN-g and bacterial lipopolysaccharide. *J. Immunol.* 1994; 152:4110-4118
 255. Corraliza IM, Soler G, Eichmann K, Modolell M: Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE₂) in murine bone-marrow-derived macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995; 206:667-673
 256. de Vera ME, Shapiro RA, Nüssler AK, Mudgett JS, Simmons RL, Morris SM, Jr., Billiar TR, Geller DA: Transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase (NOS2) gene by cytokines: Initial analysis of the human NOS2 promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996; 93(3):1054-1059
 257. Yamasaki K, Edington HD, McClosky C, Tzeng E, Lizonova A, Kovesdi I, Steed DL, Billiar TR: Reversal of impaired wound repair in iNOS-deficient mice by topical adenoviral-mediated iNOS gene transfer. *J. Clin. Invest.* 1998; 101(5):967-971.
 258. Deliconstantinos G, Villiotu V, Stravides JC: Release by ultraviolet B (u.v.B.) radiation of nitric oxide (NO) from human keratinocytes: a potential role for nitric oxide in erythema production. *Br. J. Pharmacol.* 1995; 114:1257-1265

259. Mancinelli R, Mc Kay C: Effects of nitric oxide and nitrogen dioxide on bacterial growth. *Appl. Environ. Mikrobiol.* 1983; 46:198-202
260. Stadler J, Curran RD, Ochoa JB, Harbrecht BG, Hoffman RA, Simmons RL, Billiar TR: Effect of endogenous nitric oxide on mitochondrial respiration of rat hepatocytes in vitro and in vivo. *Arch Surg* 1991; 126(2):186-91.
261. Schweizer M, Richter C: Nitric oxide potently and reversibly deenergizes mitochondria at low oxygen tension. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 204(1):169-75.
262. 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. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett.* 1994; 345:50-54
263. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X: Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996; 86:147-157
264. Cai J, Jones DP: Superoxide in apoptosis. Mitochondrial generation triggered by cytochrome c loss. *J Biol Chem* 1998; 273(19):11401-4.
265. Kumakiri M. HK, Willis I.: Biologic changes due to long-wave ultraviolet irradiation on human skin: ultrastructural study. *J. Invest. Dermatol.* 1977; 69:392-400
266. Young AR: The sunburn cell. *Photodermatology* 1987; 4:127-134
267. Woodcock A. MIA: The sunburn cell in mouse skin: preliminary quantitative studies on its production. *Br. J. Dermatol.* 1976; 95:459-468
268. Vinken PJ, Bruyn GW, Klawans HL: *Handbook of clinical neurology.* Amsterdam, Elsevier, 1988
269. Paddenbergh R, Wulf S, Weber A, Heimann P, Beck LA, Mannherz HG: Internucleosomal DNA fragmentation in cultured cells under conditions reported to induce apoptosis may be caused by mycoplasma endonucleases. *Eur. J. Cell Biol.* 1996; 71(1):105-119.
270. Kitanaka C, Kuchino Y: Caspase-independent programmed cell death with necrotic morphology. *Cell Death Differ.* 1999; 6:508-515
271. McCarthy NJ, Whyte MK, Gilbert CS, Evan GI: Inhibition of Ced-3/ICE-related proteases does not prevent cell death induced by oncogenes, DNA damage, or the Bcl-2 homologue Bak. *J. Cell. Biol.* 1997; 136:215-227
272. Schulze-Osthoff K, Krammer PH, Droge W: Divergent signalling via APO-1/Fas and the TNF receptor, two homologous molecules involved in physiological cell death. *EMBO J.* 1994; 13:4587-4596
273. Jurgensmeier JM, Xie Z, Deveraux Q, Ellerby L, Bredesen D, Reed JC: Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1998; 95(9):4997-5002.
274. Finucane DM, Bossy-Wetzel E, Waterhouse NJ, Cotter TG, Green DR: Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome c release from mitochondria is inhibitable by Bcl-xL. *J. Biol. Chem.* 1999; 274(4):2225-2233.
275. Bossy-Wetzel E, Green DR: Caspases induce cytochrome c release from mitochondria by activating cytosolic factors. *J. Biol. Chem.* 1999; 274(25):17484-17490.
276. Xiang J, Chao DT, Korsmeyer SJ: BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1996; 93(25):14559-14563.
277. Longthorne VL, Williams GT: Caspase activity is required for commitment to Fas-mediated apoptosis. *Embo. J.* 1997; 16(13):3805-3812.

278. Sun XM, MacFarlane M, Zhuang J, Wolf BB, Green DR, Cohen GM: Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 1999; 274(8):5053-5060.
279. Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Jurgensmeier JM, Susin SA, Vieira HL, Prevost MC, Xie Z, Matsuyama S, Reed JC, Kroemer G: Bax and adenine nucleotide translocator co-operate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* 1998; 281(5385):2027-2031.
280. Kaiser S, DiMascio P, Murphy ME, Sies H: Physical and chemical scavenging of singlet molecular oxygen by tocopherols. *Arch. Biochem. Biophys.* 1990; 277:101-108
281. Kuo PC, Abe KY, Schroeder RA: Interleukin-1-induced nitric oxide production modulates glutathione synthesis in cultured rat hepatocytes. *Am J Physiol* 1996; 271(3 Pt 1):C851-62.
282. Kim YM, Bergonia HA, Muller C, Pitt BR, Watkins WD, Lancaster JR: Loss and degradation of enzyme-bound heme induced by cellular nitric oxide synthesis. *J. Biol. Chem.* 1995; 270(11):5710-5713.
283. Kim YM, Bergonia H, Lancaster JR: Nitrogen oxide-induced autoprotection in isolated rat hepatocytes. *FEBS Lett.* 1995; 374(2):228-232.
284. Schwarz MA, Lazo JS, Yalowich JC, Allen WP, Whitmore M, Bergonia HA, Tzeng E, Billiar TR, Robbins PD, Lancaster JR, et al.: Metallothionein protects against the cytotoxic and DNA-damaging effects of nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1995; 92(10):4452-4456.
285. Hogg N, Kalyanaraman B, Joseph J, Struck A, Parthasarathy S: Inhibition of low-density lipoprotein oxidation by nitric oxide. Potential role in atherogenesis. *FEBS Lett.* 1993; 334(2):170-174
286. O'Donnell VB, Chumley PH, Hogg N, Bloodsworth A, Darley-Usmar VM, Freeman BA: Nitric oxide inhibition of lipid peroxidation: kinetics of reaction with lipid peroxyl radicals and comparison with alpha-tocopherol. *Biochemistry* 1997; 36(49):15216-23.
287. Liu X, Miller MJS, Joshi MS, Thomas DD, Lancaster JR: Accelerated reaction of nitric oxide with O₂ within the hydrophobic interior of biological membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998a; 95:2175-2179
288. Suschek CV, Briviba K, Bruch-Gerharz D, Sies H, Kroncke KD, Kolb-Bachofen V: Even after UVA-exposure will nitric oxide protect cells from reactive oxygen intermediate-mediated apoptosis and necrosis. *Cell Death Differ* 2001; 8(5):515-27.
289. Miyachi Y, Imamura S, Niwa Y: Anti-oxidant action of metronidazole: a possible mechanism of action in rosacea. *Br J Dermatol* 1986; 114(2):231-4.
290. Niwa Y, Somiya K, Michelson AM, Puget K: Effect of liposomal-encapsulated superoxide dismutase on active oxygen- related human disorders. A preliminary study. *Free Radic Res Commun* 1985; 1(2):137-53
291. Sedgwick JB, Bergstresser PR, Hurd ER: Increased superoxide generation by normal granulocytes incubated in sera from patients with psoriasis. *J Invest Dermatol* 1981; 76(3):158-63.
292. Yoshioka A, Miyachi Y, Imamura S, Niwa Y: Anti-oxidant effects of retinoids on inflammatory skin diseases. *Arch Dermatol Res* 1986; 278(3):177-83
293. Miyachi Y, Yoshioka A, Imamura S, Niwa Y: Effect of antibiotics on the generation of reactive oxygen species. *J. Invest. Dermatol.* 1986; 86(4):449-53.
294. Kerwin JFJ, Heller M: The arginine-nitric oxide pathway: a target for new drugs. *Med. Res. Rev.* 1994; 14:23-74
295. Lassen LH, Ashina M, Christiansen I, Ulrich V, Olesen J: Nitric oxide synthase inhibition in migraine. *Lancet* 1997; 349(9049):401-402.

296. Mulligan MS, Hevel JM, Marletta MA, Ward PA: Tissue injury caused by deposition of immune complexes is L-arginine dependent. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1991; 88(14):6338-6342.
297. Kröncke K-D, Fehsel K, Kolb-Bachofen V: Inducible nitric oxide synthase and its product nitric oxide, a small molecule with complex biological activities. *Biol. Chem.* 1995; 376:327-343
298. Weller R, Ormerod AD, Hobson RP, Benjamin NJ: A randomized trial of acidified nitrite cream in the treatment of tinea pedis. *J. Am. Acad. Dermatol.* 1998; 38(4):559-563.
299. Shabani M, Pulfer SK, Bulgrin JP, Smith DJ: Enhancement of wound repair with a topically applied nitric oxide releasing polymer. *Wound Rep. Regul.* 1996; 4:353-362
300. Sauermann G, Jaspers S, Hoppe U, Salzer B, Steinkraus V: Influence of NO-Synthase antagonists in rosacea patients. *J. Invest. Dermatol.* 1997; 108:657
301. Hayes NA, Foreman JC, Dowd PM: Nitric oxide synthase in dithranol-induced erythema. *J. Invest. Dermatol.* 1994; 103:135

LEBENS LAUF

Name, Vorname: Voß, Roswitha Maria
Geburtsdatum: 11.01.1975
Nationalität: deutsch
Wohnort: Johannes-Hesse-Str. 31, 40597 Düsseldorf

Eltern: Dipl. Ing. Bernhard Ludger Voß
Dipl. Päd. Dietlinde Voß, geb. Drexler

Familienstand: ledig

Schul Ausbildung: 1981-1985: Grundschule in Hasselroth und Bottrop
1985-1994: Heinrich-Heine Gymnasium, Bottrop und
Gymnasium Rückertstraße, Düsseldorf
Juni 1994: Allgemeine Hochschulreife

Berufsausbildung: WS 1994/1995: Studium der Humanmedizin an der
Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
9/96: Ärztliche Vorprüfung
8/97: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
9/97-4/98: Promotionsarbeit am Institut für Immunbio-
logie der Universität Düsseldorf, Prof. Dr. rer. Nat. V.
Kolb-Bachofen
9/00: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/00 – 10/01: Praktisches Jahr an der Heinrich-Heine
Universität Düsseldorf mit dem Wahlfach Dermatologie
11/01: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung.
Gesamtnote: gut

Berufliche
Tätigkeit: 2/02–7/03: Ärztin im Praktikum an der Hautklinik des
Universitätsklinikums Düsseldorf
8/03-1/04: Assistenzärztin an der Hautklinik des Uni-
versitätsklinikums Düsseldorf
seit 2/04: Weiterbildungsassistentin in der hautärztlichen
Praxis von Frau Dr. Billmann-Krutmann in Wegberg

Zur Rolle der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase beim Zelltod durch UVA in Maus-Endothelzellen

UVA führt dosisabhängig zu Zellschädigung und Zelltod. Diese Vorgänge werden durch Reaktive Sauerstoff Spezies (ROS) über eine Membranschädigung und DNA-Strukturveränderungen mediert. Neben einer Vielzahl anti-oxidativer Verteidigungsmechanismen innerhalb einer Zelle kann auch Stickstoffmonoxid (NO) über eine Radikal-Radikal-Interaktion eine anti-oxidative Wirkung entfalten. Im Ratten-Modell haben in vitro Versuche mit Endothelzellen gezeigt, dass durch die induzierbare NO-Synthase (iNOS) freigesetztes NO den UVA-vermittelten Zelltod inhibieren kann. Um den Mechanismus der protektiven Wirkung der iNOS differenzierter untersuchen zu können, wurden in dieser Arbeit analoge und weiterführende Versuche mit Endothelzellen aus iNOS defizienten und wildtyp Mäusen etabliert.

Zunächst wurde bei den Maus-Aortenendothelzellen durch UVA₁-Bestrahlung der Zelltod provoziert und charakterisiert. UVA führte dosisabhängig zum Zelltod der Endothelzellen, ohne dass sich hierbei quantitative oder qualitative Unterschiede zwischen den beiden Mäuse-Stämmen zeigten. Die Art des Zelltodes wurde anhand morphologischer Untersuchungen mittels Fluoreszenz-Färbungen sowie mit Hilfe der Detektion von DNA-Strangbrüchen als eine Art „apoptotische Nekrose“ identifiziert.

Um den Einfluss des intrazellulär freigesetzten NO auf den Zelltod zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit die iNOS in wildtyp Endothelzellen mit proinflammatorischen Zytokinen induziert und die Menge des iNOS-generierten NO im Zellkultur-Überstand bestimmt. Eine maximale NO-Produktion wurde durch die Inkubation mit einem Mix der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β und IFN- γ in einer Konzentration von je 500 U/ml erzielt. Im Gegensatz zu den Versuchen an Ratten-Endothelzellen führte die Vorinkubation der Zellen mit NO in Form von endogenem NO nach maximaler Zytokin-Aktivierung oder in Form von exogenem NO durch den NO-Donor DETA-NO zu keiner protektiven Wirkung nach UVA-Bestrahlung. Dennoch zeigte sich exogenes NO, wenn es während der UVA-Bestrahlung präsent ist, in der Lage, die Endothelzellen beider Mäusestämme signifikant vor dem UV-induzierten Zelltod zu schützen. Unter gleichen Bedingungen führte auch Nitrit, welches unter UVA-Einwirkung in NO umgewandelt wird, zu einem Schutz der Zellen. Die anhand von Ratten-Endothelzellen gesammelten Daten über eine iNOS-mediierte Hemmung der UV-induzierten Apoptose konnten somit nicht völlig auf die Spezies Maus übertragen werden. Diese Arbeit zeigt demnach Spezies-spezifische Unterschiede der antioxidativen Antwort auf und schränkt dadurch auch die Übertragbarkeit der Daten auf den Menschen ein.

Zur weiteren Charakterisierung des UVA-mediierten Zelltodes und zur Aufklärung des Mechanismus des NO-vermittelten Schutzes wurde in dieser Arbeit die Rolle der beteiligten Reaktiven Sauerstoff-Spezies untersucht. Hierzu wurden die Zellen während der Bestrahlung mit unterschiedlichen Antioxidantien inkubiert. Es zeigte sich, dass spezifische Inhibitoren der Singulett Sauerstoff-Wirkung wie Azid oder Histidin zu einem Schutz der Endothelzellen führte. Ein Schutz der Zellen vor der toxischen UV-Wirkung wurde ebenfalls durch Substanzen erreicht, die Superoxidanionen-Radikale ($O_2^{\cdot-}$) eliminieren wie die Porphyrinverbindung MnTBAP (80 μ M), welche Superoxidanion in Wasser umwandelt, aber auch durch Katalase (2000 U/ml) und butyliertes Hydroxytoluen (BHT) (10 μ M) als spezifischem Inhibitor der Lipidperoxid-Bildung.

In anderen Versuchen konnten die UVA-induzierten Zellschäden durch Inkubation der Endothelzellen mit Hydrogenperoxid (H_2O_2) nachgeahmt werden. Diese toxische Wirkung von Hydrogenperoxid wurde ebenfalls durch BHT, und auch durch NO inhibiert. Diese Befunde deuten darauf hin, dass H_2O_2 als Folge der UV-Bestrahlung als endständiges Glied der Radikalkette entscheidend zum Zelltod via Lipidperoxidation beiträgt. Sie führen ferner zu der Annahme, dass NO die beobachtete Hemmung des UVA-induzierten und ROS-vermittelten Zelltodes somit durch eine Inhibition der Lipidperoxidation ermöglicht.