

Aus der Medizinischen Poliklinik, Kardiologie, der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Direktor: Prof. Dr. M. Reincke

in Zusammenarbeit mit dem

Walter-Brendel Zentrum, Institut für experimentelle Medizin, Ludwig-Maximilians-
Universität München

Vorstand: Prof. Dr. U. Pohl

Einfluss der endothelialen DNA abhängigen Proteinkinase, DNA- PK, auf wachstumsfaktorabhängige angiogene Prozesse und Sig- naltransduktion

Dissertation

Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

An der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorgelegt von: Ariane Hammitzsch
aus München, im Jahr 2011

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter:	PD Dr. med. Florian Krötz
Mitberichterstatter:	PD Dr. med. Sebastian Strieth Prof. Dr. med. Wolfgang Siess
Mitbetreuung durch die promovierte Mitarbeiterin:	Dr. rer. nat. H. Mannell
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	21.07.2011

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung	1
1.1 Das Endothel	1
1.2 Neovaskularisation	1
1.3 Regulation der Angiogenese	2
1.3.1 Rolle der Wachstumsfaktoren VEGF, FGF und des Zytokins TNF α bei endothelabhängigen Vorgängen	3
1.3.2 Signalwege der Angiogenese	6
1.4 DNA abhängige Proteinkinase	9
1.5 Fragestellung	12
2 Material und Methoden	14
2.1 Chemikalien, molekularbiologische Reagenzien, Geräte und andere Materialien	14
2.1.1 Chemikalien und molekularbiologische Reagenzien	14
2.1.2 Geräte und anderweitiges Material	14
2.2 Zellkultur und Zelllinien	14
2.2.1 Isolierung und Kultivierung von Endothelzellen aus humanen Umbilikalvenen (HUVEC)	16
2.2.2 Isolierung und Kultivierung von Endothelzellen aus porcinen Aorten (PAEC)	16
2.2.3 Kultivierung von humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC)	17
2.2.4 Passagieren von Zellen	17
2.2.5 Einfrieren von Zellen	17
2.3 Molekularbiologie	18
2.3.1 siRNA Transfer	18
2.3.2 RNA-Extrakte für PCR	19
2.3.3 RT-PCR	20
2.4 Proteinchemie	22
2.4.1 Zellextrakte für Western Blot Analyse	22
2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration	24
2.4.3 Fraktionierung von Endothelzellen	25
2.5 Immunologische Methoden	26
2.5.1 Western Blot Analyse	26
2.5.2 Immunfluoreszenz	30

2.6 Funktionelle Assays	31
2.6.1 Behandlung mit Wachstumsfaktoren und Inhibitoren	31
2.6.2 Zell-Proliferations-Assay	32
2.6.3 Capillary-like Structure Assay (CLS)	34
2.7 Statistische Analysen	36
3 Ergebnisse	37
3.1 Expression und Lokalisierung von DNA-PKcs in humanen und porcinen Endothelzellen	37
3.2 Einfluss der DNA-PKcs auf endotheliale Prozesse	39
3.2.1 Hemmung der DNA-PKcs in Endothelzellen	39
3.2.2 DNA-PKcs hat keinen Einfluss auf die Bildung von kapillarähnlichen Strukturen in vitro	41
3.2.3 DNA-PKcs-Inhibition/Suppression steigert die basale Proliferationsrate in Endothelzellen	46
3.2.4 DNA-PKcs-Inhibition steigert die wachstumsfaktorabhängige Proliferation in Endothelzellen	48
3.3 DNA-PKcs abhängige Signalwege in Endothelzellen	52
3.3.1 Akt ist im Nukleus von Endothelzellen vorhanden und ändert unter Stimulation mit FGF-2 und Inhibition mit NU7026 nicht seine zelluläre Lokalisation	52
3.3.2 DNA-PKcs-Inhibition führt zu erhöhter Phosphorylierung von Akt und ERK in Endothelzellen	54
3.4 Einfluss von Wachstumsfaktoren und Zytokinen auf die Expression der DNA-PK	57
3.4.1 FGF-2 erhöht die Expression von DNA-PKcs in Endothelzellen, ändert aber nicht die intrazelluläre Lokalisation	57
3.4.2 TNF α -Stimulation erhöht die Expression von DNA-PKcs, aber verändert nicht die zelluläre Lokalisation	61
4 Diskussion	64
4.1 DNA-PK in Endothelzellen	64
4.1.1 Spezifische Untersuchung durch gezielte Hemmung oder „Silencing“	64
4.1.2 Vorkommen und Verteilungsmuster in Endothelzellen	65
4.2 DNA-PKcs als Protagonist endothelabhängiger Prozesse	66

4.2.1	DNA-PKcs spielt im Gegensatz zur PI3-K bei der Bildung endothelialer Gefäßstrukturen keine Rolle	66
4.2.2	DNA-PKcs als negativer Regulator der Proliferation in Endothelzellen	67
4.3	DNA-PK abhängige endotheliale Signalwege	69
4.3.1	Akt als Mediator DNA-PK gesteuerter Proliferationsmechanismen	69
4.3.2	ERK als Mediator DNA-PK abhängiger Proliferation	72
4.4	Wechselwirkungen zwischen DNA-PK und Wachstumsfaktoren/Zytokinen	73
4.4.1	VEGF und DNA-PK	73
4.4.2	FGF-2 und die Expression von DNA-PKcs	73
4.4.3	TNF α und DNA-PK	75
4.5	DNA-PKcs als therapeutischer Ansatz in der Medizin	76
4.5.1	Hemmung der DNA-PKcs als supportive Maßnahme in der Therapie von Tumoren	76
4.5.2	DNA-PKcs als Zielstruktur in der Therapie ischämischer Krankheiten	77
4.6	Limitationen	77
4.6.1	Verwendung unterschiedlicher Zelltypen	77
4.6.2	DNA-PKcs und FGF-2/TNF α : Einzelspieler in einem konzertierten Prozess	78
4.6.3	Fehlende in vivo Versuche	78
5	Zusammenfassung	80
6	Anhang	82
6.1	Verzeichnis verwendeter Materialien	82
6.2	Abkürzungen	83
6.3	Veröffentlichungen	86
7	Literaturverzeichnis	87
8	Danksagung	94

1 Einleitung

1.1 Das Endothel

Das Endothel kleidet als einschichtiger Zellverband von innen das Gefäßsystem aus und stellt ein dynamisches, heterogenes und verstreutes Organ dar, welches im Erwachsenen eine Oberfläche von 1-7 m² einnimmt. Es erfüllt sekretorische, synthetische, metabolische und immunologische Funktionen [1, 2]. So stellt es z.B. eine selektive Barriere zwischen Flüssigkeit und umgebenden Geweben dar. Diese wird über membrangebundene Rezeptoren für Proteine, Lipidtransportpartikel, Metaboliten und Hormone, aber auch über spezifische Verbindungsmoleküle, die Zell-Zell- und Zell-Matrixinteraktionen regulieren, aufrechterhalten. In der Regulation des Gefäßtonus, der Gerinnungshomöostase und bei inflammatorischen Reaktionen spielt das Endothel ebenfalls eine bedeutende Rolle [1, 3]. Endothelzellen (EZ) sezernieren und nehmen eine Reihe von vasoaktiven Substanzen auf, die auf parakrinem Weg die Gefäßfunktion regulieren [1, 3]. So beruhen oder gehen zahlreiche Erkrankungen mit einer Dysregulation endothelialer Integrität einher. Folgen dieser Dysregulation sind Störungen im vasculären System und multisystemische Erkrankungen wie Atherosklerose, Sepsis, inflammatorische Syndrome, angeborene und erworbene Gerinnungsstörungen und wachstumsfaktorinduzierte Angiogenese im Rahmen von Tumoren und Metastasierung [1, 3, 4].

1.2 Neovaskularisation

Die Entstehung von neuen Blutgefäßen aus endothelialen Vorläuferzellen des Knochenmarks wird Vaskulogenese genannt. Diese Vorläuferzellen oder Hämangioblasten migrieren in avaskuläre Gebiete und beginnen ein primitives Netzwerk aus Gefäßen zu formen, bevor sie vor Ort zu Endothelzellen differenzieren. Dies findet hauptsächlich in der Embryonalentwicklung statt, aber auch im Knochenmark von Erwachsenen sind Hämangioblasten zu finden und tragen zur physiologischen und pathologischen Gefäßneubildung bei [5-8].

Während die Umbildung von bereits bestehenden arteriellen Kollateralen zu großen funktionsfähigen Umgehungskreisläufen, wie z.B. bei einem Gefäßverschluss, als Arteriogenese bezeichnet wird [5, 9], nennt man das Aussprosseln neuer Gefäße aus bereits etablierten Blutgefäßen Angiogenese. Dies läuft physiologisch während des Wachstums, des reproduktiven Kreislaufs oder der Wundheilung ab. Pathologische Angiogenese ist verbunden mit Tumoren [4], Atherosklerose [4], Übergewicht [10, 11], rheumatoider Arthritis, Diabetes mellitus [12, 13], sowie pulmonalem und systemischem Hochdruck [1, 3].

1.3 Regulation der Angiogenese

Angiogenese unterliegt im menschlichen Organismus physiologischer Weise einem genau gesteuerten Gleichgewicht anregender und hemmender Faktoren. Im Grundzustand besitzen Endothelzellen eine niedrige Teilungsaktivität; nur 0.01 % der Zellen teilen sich pro Tag [4]. Die einzelnen Abschnitte der Angiogenese werden von verschiedenen Faktoren beeinflusst [5, 6, 14]:

Zu Beginn kommt es durch Modulation endothelialer Adhäsionsmoleküle wie PECAM-1 und VE-Cadherin zu Gefäßdilatation gefolgt von erhöhter Gefäßpermeabilität [5, 6, 14, 15]. Plasmaproteine wie Fibrinogen oder Plasminogen treten aus und bereiten den Endothelzellen in der extrazellulären Matrix (EZM) den Weg.

Um endotheliale Migration zu ermöglichen, werden daraufhin bestehende interzelluläre Verbindungen aufgelöst und das periendotheliale Stützgerüst und die EZM aufgelockert, was vor allem von VEGF und Ang2 induziert wird [5, 6, 14].

Unter Einfluss von Wachstumsfaktoren wie VEGF, FGF, EGF, IGF-1, Ang1, Ang2, und PDGF-BB kommt es zu Proliferation. Einige dieser Faktoren wie z.B. VEGF sind endothelspezifisch, andere hingegen wie FGF-2 induzieren Proliferation und Migration in einer Vielzahl von Zellarten [5, 6, 14]. FGF-2 wirkt jedoch stärker wachstumsfördernd auf Endothelzellen als VEGF [16].

Die Bildung eines Lumen aus dem soliden Zellstrang wird von verschiedenen Subtypen von VEGF oder von Ang1 in Kombination mit VEGF kontrolliert [5, 6, 14]. Zell-Zell-Kontakte werden über Oberflächenrezeptoren wie PECAM-1 und VE-Cadherin wieder hergestellt [1].

Zur Stabilisierung entstandener Gefäße setzen Endothelzellen PDGF-BB als Lockstoff für glatte Gefäßmuskelzellen und Perizyten und VEGF zur Akkumulation dieser Zellen frei. Ang1 und sein Rezeptor Tie2 tragen ebenfalls zur Stabilisierung bei. Ein weiterer wichtiger Faktor in diesem Vorgang ist TGF- β , welcher bei Kontakt von Endothelzellen mit ortsständigen Zellen endotheliales Wachstum und endotheliale Migration begrenzt [6, 14].

Dann kehren die Endothelzellen wieder in den Ruhezustand zurück und überleben mehrere Jahre. VEGF wirkt mit VEGFR-2, β -Catenin und VE-Cadherin als wichtiger Überlebensfaktor. FGF-2 hemmt apoptotische Signale und stimuliert über PI3-K/Akt die Expression von Genen des Zellüberlebens. Ang1 gilt im Gegensatz zu Ang2 ebenfalls als Überlebenssignal. Mechanische Faktoren wie die Schubspannung des Blutflusses regulieren den Umsatz von Endothelzellen und verhindern TNF α induzierte Apoptose [5, 6]. Zur Anpassung an lokale Anforderungen differenzieren die Endothelzellen zu Zellen mit speziellen Eigenschaften, wie

Einleitung

z.B. im Gehirn bei der Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke. Die Beanspruchung der Blutgefäße im Organismus erfordert weiterhin stetiges „Remodeling“ [5, 6].

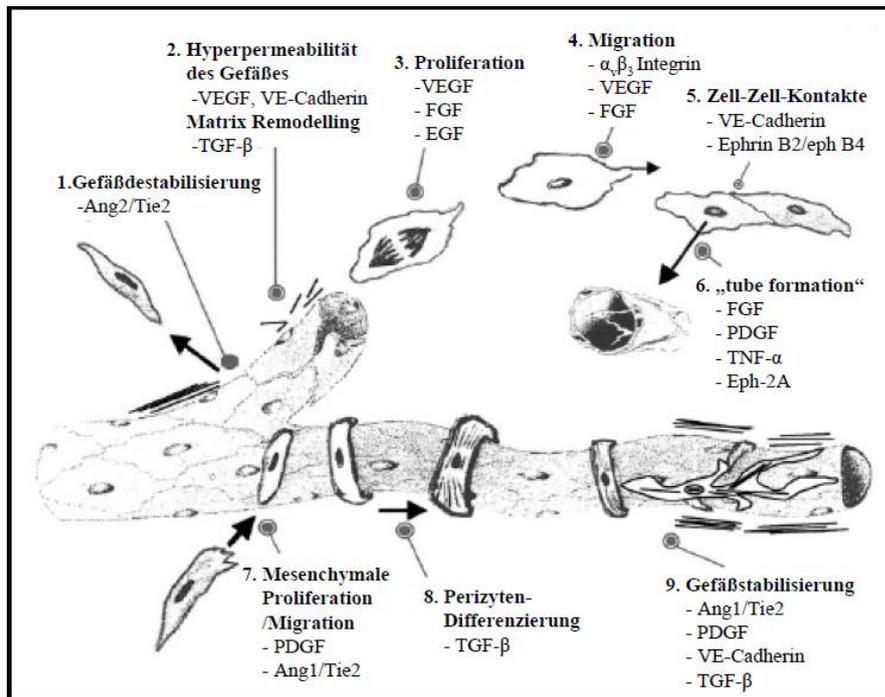


Abb. 1.1 Mechanismus der Angiogenese (nach Papetti et al. 2000)

Physiologische Angiogenese erfordert ein genaues Zusammenspiel mehrerer Faktoren. Es kommt zum zeitlichen Ablauf von Gefäßdilatation, -permeabilisierung und -destabilisierung, gefolgt von Proliferation und Migration. Auf Zell-Zell-Kontakte hin beginnt die Bildung gefäßähnlicher Strukturen. Der Prozess mündet in der Differenzierung von Endothelzellen und der Stabilisierung der entstandenen Struktur durch Perizyten und glatte Muskelzellen.

1.3.1 Rolle der Wachstumsfaktoren VEGF, FGF und des Zytokins TNF α bei endothel-abhängigen Vorgängen

VEGF

„Vascular Endothelial Growth Factor“ (VEGF) ist ein endothelspezifischer Wachstumsfaktor. Er bestimmt das Schicksal von Angioblasten und vermag Angiogenese auszulösen. O₂-Mangel induziert in verschiedenen Zellarten die VEGF-Bildung [17]. Es sind fünf Formen (VEGF-A, B, C, D und PlGF („Placental Growth Factor“)) und drei unterschiedliche Rezeptoren (VEGFR-1, -2 und -3) bekannt. Des Weiteren existieren strukturell verwandte Proteine im Parapoxvirus (VEGF-E) und in Schlangengift (VEGF-F). Korezeptoren sind Heparansulfatproteoglykane (HSPGs) und Neuropiline [15]. VEGF-A und -B, sowie PlGF binden an VEGFR-1, VEGF-A und -E an VEGFR-2, und VEGF-C und -D an VEGFR-3 [14, 15]. VEGFR-1 ist ein positiver Regulator für Monozyten- und Makrophagenmigration, sowie ein positiver und negativer Regulator der VEGFR-2-abhängigen Signaltransduktion [18].

Einleitung

VEGFR-2 spielt eine essentielle Rolle bei physiologischer und pathologischer Proliferation, Migration, Differenzierung und Überleben von Endothelzellen, sowie Permeabilität und Regulation von Gefäßdurchmesser [6, 14, 15, 18]. VEGFR-3 übt seine Funktion bei der Entwicklung und Funktion des Lymphsystems aus [15]. VEGF-A ist mit einer Vielzahl an Subtypen (VEGF-A₁₂₁, ₁₄₅, ₁₆₅, ₁₈₉, ₂₀₆) durch alternatives „Splicing“ die am weitläufigsten exprimierte Form im Menschen [6, 14, 19-21]. Diese Subtypen haben unterschiedliche Eigenschaften bei der Signalübertragung und werden gewebespezifisch exprimiert, wobei VEGF-A₁₆₅ das höchste angiogene Potential hat. Folgen eines VEGF induzierten Signals sind in Endothelzellen über den Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg Proliferation, Migration, EZM-Degradation, und Differenzierung [12, 21, 22] und über den PI3-K/Akt-Weg und NO Proliferation, Migration und Zellüberleben. Die Bedeutung von VEGF und seiner Rezeptoren für das vaskuläre System wird durch den Phänotyp von VEGF defizienten (VEGF^{-/-}) und VEGFR-Knockout-Mäusen deutlich. Diese sterben an Defekten in der Gefäßneubildung [18, 21-23]. Bereits moderate Überexpression von VEGF-A führt zu aberranter Herzentwicklung und embryonaler Letalität. Postnatale Deletion von VEGF-A hingegen resultiert in Mäusen in reduziertem Wachstum und erhöhter Apoptose von Endothelzellen. Kurzfristige Blockierung der Interaktion zwischen VEGF-A und VEGFR-2 bewirkt Gefäßregression in erwachsenen Mäusen [15].

FGF

"Fibroblast Growth Factors" (FGF) sind pleiotrope Wachstumsfaktoren, die auf eine Vielzahl von Zellen einschließlich Endothelzellen wirken, und umfassen 22 strukturverwandte Mitglieder. Bindungspartner sind HPSGs und spezifische Rezeptor-Tyrosin-Kinasen (RTK) [24]. Die wichtigsten Formen sind FGF-1 und -2 (aFGF und bFGF) [25]. Sie werden nicht sezerniert, sondern befinden sich im Zytoplasma oder binden mit hoher Affinität an HSPGs der Zelloberfläche oder der EZM [25]. So bilden sie einen Pool an FGF, der bei Bedarf durch Heparanasen reguliert abgegeben oder bei Verlust der zellulären Integrität frei gesetzt wird [26]. Es existieren vier spezifische RTKs für FGF: FGFR-1, -2, -3 und -4, wobei auf Endothelzellen primär FGFR-1 und -2 gefunden wurden [24, 27]. Mausexperimente zeigten, dass FGFR-1 für die Entwicklung und Aufrechterhaltung des Gefäßnetzes im Embryo notwendig ist [59, 67] und FGFR-2-Mutationen führten wegen nicht funktionierender Plazenta und fehlenden Extremitätenanlagen zu embryonaler Letalität [27]. Während ein Ausfall von FGF-1 keinen offensichtlichen Phänotyp erzeugt, führt das Fehlen von FGF-2 zu erniedrigtem vaskulären Tonus und Hypotension [28]. Beide Knockout-Varianten zeigen Defekte in der Wundheilung [14]. Neutralisierende FGF-2-Antikörper verhinderten im „Chick Chorioallan-

Einleitung

toic Membrane Assay“ Neovaskularisation und verdeutlichten damit die Rolle von FGF-2 in der Entwicklung des Gefäßsystems [24].

Die Bindung von FGF-2 an FGFR-1 oder -2 führt in Endothelzellen über die Aktivierung des ERK/MAPK- und des PI3-K/Akt-Signalweges zu Proliferation [12]. Der MAPK-Signalweg ist auch für den Abbau der EZM, die FGF-1,-2 und -4 regulierte Produktion von u-PA und MMPs und die PKC abhängige Endothelzellmigration zuständig. FGF-2 und FGFR-1 eingeleitete Überlebenssignale werden über den PI3-K/Akt-Signalweg weitergegeben [24]. Auch endotheliale Differenzierung wird durch FGF-2 aktiviert. Zwischen FGF und VEGF bestehen intensive Wechselwirkungen und es scheint wahrscheinlich, dass FGF Neovaskularisation direkt über Aktivierung des VEGF/VEGFR-Systems induziert. VEGFR-2-Antagonisten inhibieren sowohl VEGF, als auch FGF-2 abhängige Angiogenese in vitro und in vivo. Expression von dominant-negativem FGFR-1 oder -2 in Gliomzellen führt simultan zur Abnahme von VEGF und der Tumolvaskularisation. Endo- und exogenes FGF-2 moduliert die Expression von VEGF in Endothelzellen und erhöht die Expression von FGFR und VEGFR [64].

TNF α

Beim Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) handelt es sich um ein potentes proinflammatorisches Zytokin [29, 30]. Primäre Zielzellen von TNF α sind Endothelzellen, auf welche es in vitro antiproliferativ wirkt, aber Chemotaxis und „Tube Formation“ anregt [30]. In vivo stimuliert TNF α in niedrigen Dosen endotheliale Proliferation [29] und leitet in höheren Dosen Apoptose ein [30]. Die Signaltransduktion erfolgt über zwei Membranrezeptoren für membrangebundene und lösliche Formen; TNFR-1 und TNFR-2. Expression von TNFR-1 ist in den meisten Geweben konstitutiv, TNFR-2-Expression dagegen streng reguliert und auf Zellen des Immunsystems beschränkt. Beide Rezeptoren geben nach Proteolyse die extrazellulären Domänen ab, die dann als neutralisierende Antikörper wirken. Ligandenbindung an TNFR-1 aktiviert eine Vielzahl von Adapterproteinen, darunter „TNF Receptor-1-associated Death Domain Protein“ (TRADD) und „Suppressor of Death Domains“ (SODD) [31]. TRADD rekrutiert das „Receptor Interacting Protein 1“ (RIP-1) und „TNFR Associated Factor 2“ (TRAF2) und führt zur Aktivierung von NF- κ B, welches die Transkription proliferativer Proteine induziert [32]. TNFR-1 selbst enthält auch eine „Death Domain“ (DD), welche in Kombination mit der „Death Effector Domain“ (DED) des „Fas-associated Death Domain Protein“ (FADD) über Caspase-8 TNF α induzierte Apoptose veranlasst [32, 33]. Der PI3-K/Akt-Signalweg kann in ruhenden Endothelzellen durch TNF α aktiviert werden [34, 35] und über Akt z.B. eNOS aktivieren [32] und apoptotische Proteine [36, 37] inhibieren. Auch ERK-1/-2

Einleitung

(extrazelluläre Rezeptor aktivierte Kinase 1 und 2) wird in ruhenden Endothelzellen von TNF α aktiviert [38].

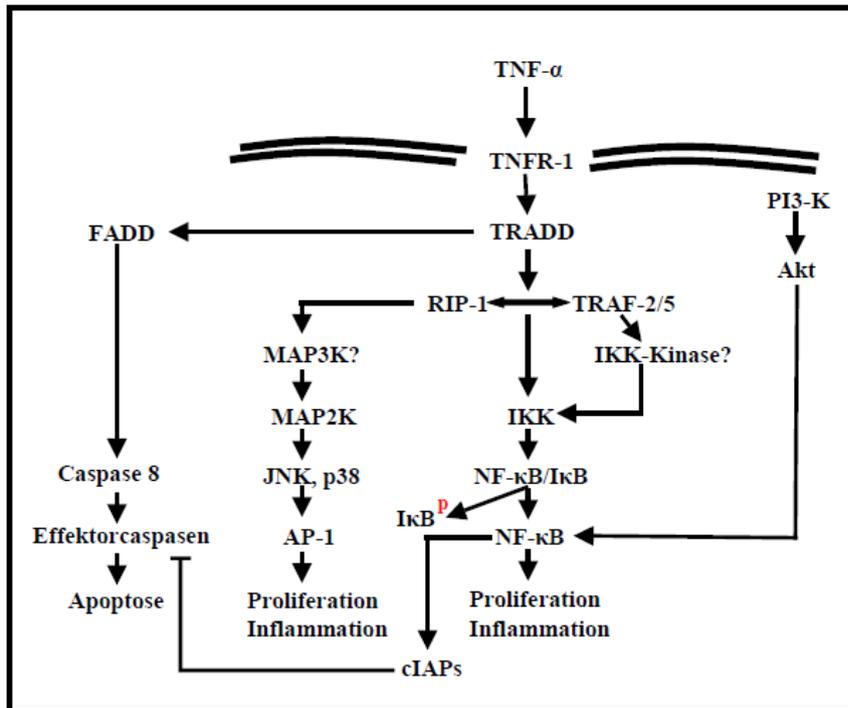


Abb. 1.2 Vereinfachte Darstellung der TNF α -Signalwege (nach Baud et al. 2001 und Madge et al. 2001)

TNF α kann über TNFR-1 und spezifische Adaptermoleküle unterschiedliche Signalwege in Endothelzellen stimulieren. Primär wird Proliferation eingeleitet und Apoptose kontrolliert.

Als sehr variabler Faktor spielt TNF α eine ausgeprägte Rolle bei Geweberegeneration und -destruktion. So ist z.B. in TNFR-1-defizienten Tieren nach einer partiellen Hemihepatektomie die DNA-Synthese beeinträchtigt [39], während in Modellen der akuten Hepatotoxizität TNF α über TNFR-1 zur Zerstörung führt [40]. Die Gewebsart, der exakte zelluläre Kontext und die TNFR-Komposition, die zeitlichen Abläufe und die Dauer der TNF-Aktion sind ausschlaggebend für den in vivo Effekt.

1.3.2 Signalwege der Angiogenese

Der PI3-Kinase-Signalweg

Für endotheliales Überleben müssen antiapoptotische Signale vorhanden sein. Eine Reihe sehr unterschiedlicher Überlebensstimuli wie z.B. FGF-2, VEGF, Integrine und Shear Stress aktivieren meist den PI3-K/Akt-Signalweg [12, 13], welcher auch Zellproliferation, -migration, -differenzierung und Zytoskelettveränderungen modulieren kann.

PI3-Kinasen bilden eine Familie von Lipid- und Proteinkinasen, die trotz sehr verschiedener Strukturen die D3-Hydroxylgruppe von Phosphatidylinositol phosphorylieren [41]. Dies er-

Einleitung

folgt über Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, G-Protein-gekoppelte-Rezeptoren oder Ras-Aktivierung [42]. Drei Klassen von PI3-K werden unterschieden [43]; Klasse I PI3-K sind Heterodimere, die aus einer katalytischen (p110 α , β , δ und γ) und einer regulatorischen (p85- oder p101-Familie) Untereinheit bestehen. Nur diese können Phosphatidylinositol 3, 4, 5-Triphosphat (PIP₃) produzieren und im vaskulären System sind PI3-K α und β ubiquitär exprimiert. Zielmoleküle der PI3-K enthalten eine Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH), über die der Kontakt zu Lipiden wie PIP₃ hergestellt wird. Aktivierte Moleküle werden dann zur Plasmamembran transloziert [42], darunter befinden sich die Serin-/Threonin-Kinase PKB/Akt, aber auch die Glykogen-Synthase-Kinase-3 (GSK3), Raf, RhoA und Phospholipase C (PLC) [44]. Akt/PKB stellt einen kritischen Regulator des Zellüberlebens, der Apoptose, der Proliferation, der Migration und des Zellmetabolismus dar.

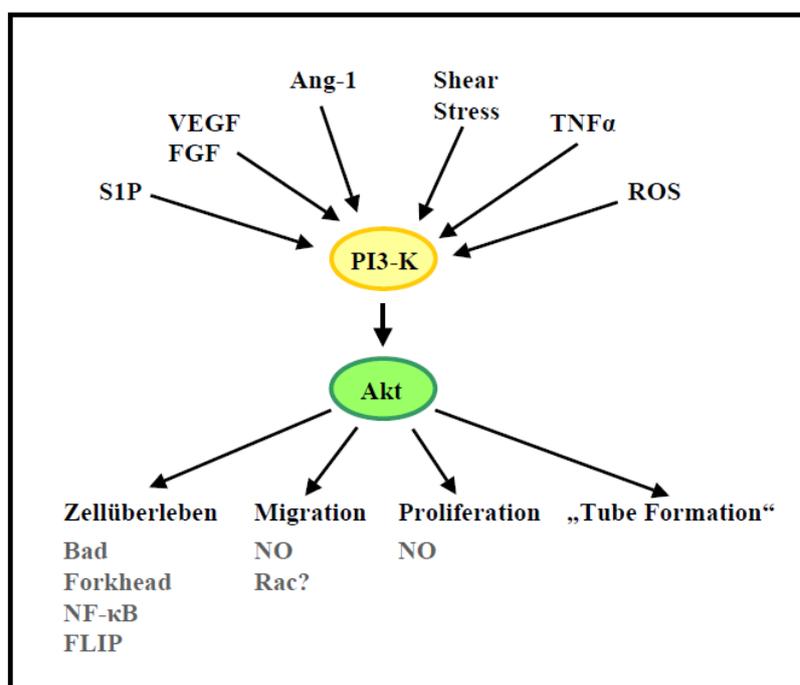


Abb. 1.3 Vereinfachte Darstellung des PI3-K/Akt-Signalweges in Endothelzellen (nach Shiojima et al. 2002)

Unterschiedlichste Stimuli wie Wachstumsfaktoren, Zytokine, Shear Stress, reaktive Sauerstoffmetaboliten (ROS) und Sphingosin-1-Phosphat aktivieren in Endothelzellen die PI3-K/Akt-Signalkaskade. Die Art des Stimulus bestimmt über unterschiedliche Effektoren die Endwirkung, darunter Zellüberleben, Migration, Proliferation und „Tube Formation“.

Es gibt drei sehr ähnliche Varianten: PKB α /Akt1, PKB β /Akt2 und PKB γ /Akt3, wobei Akt1 die entscheidende Rolle in Endothelzellen spielt [45]. Akt ist aus einer aminoterminalen Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH), einer zentralen Kinase-Domäne und einer carboxyterminalen regulatorischen Domäne aufgebaut. Nach Wachstumsfaktorstimulation wird über PIP₃ und die PH-Domäne Akt an die Zellmembran rekrutiert, wo es seine Konfiguration

Einleitung

verändert und im Weiteren durch PDK1 und 2 (3-Phosphoinositide-dependent Protein Kinase) [46, 47] an Thr308 und Ser473 phosphoryliert und vollständig aktiviert wird. Als PDK2 wurden die „Integrin-linked Kinase“ (ILK), die p38 MAP Kinase, PKC-Isoformen, mTOR/RICTOR und DNA-PK vorgeschlagen [48, 49]. Die Ser473-Phosphorylierung scheint stark abhängig vom Zelltyp und dem stimulierten Signalweg zu sein. Aktiviertes Akt wird schließlich durch Proteinphosphatasen wie PP2A deaktiviert und gelangt wieder ins Zytoplasma [13, 50].

In der Regulation der Apoptose und des Zellüberlebens durch Akt spielt die Inhibition apoptotischer Moleküle [12, 13, 36] wie der „Family of Forkhead Transcription Factors“ (FKHR) und der I κ -B Kinase [51, 52] eine wichtige Rolle. Auch die Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) und damit erhöhte Freisetzung von NO beeinflussen über Akt Apoptose [53, 54]. Zellmigration kann durch den PI3-K/Akt-Signalweg, aber auch über Rho-Familie-GTPasen wie Rac gesteuert werden [13].

Der Raf-MEK-ERK-Signalweg

Ein zweiter wesentlicher Signalweg der Angiogenese ist der Mitogen aktivierte Proteinkinase (MAPK) Weg, der auf einer Signalkette über Raf-MEK-ERK aufbaut. Zellen werden über diesen Signalweg vor Apoptose geschützt [55], Proliferation und Zellzyklusprogression kontrolliert [56] und Endothelzellmigration und –differenzierung reguliert [12].

Raf ist eine Serin-/Threonin-Kinase, die durch i) Rekrutierung zur Plasmamembran über Ras [57], ii) Dimerisierung von Raf [58] und iii) Phosphorylierung aktiviert wird [56, 59]. Es gibt drei unterschiedliche Raf-Formen: Raf-1 (entspricht C-Raf), A-Raf und B-Raf, die sich deutlich in ihren Eigenschaften unterscheiden. Es ist bekannt, dass VEGF und FGF die Aktivität von Raf-1 induzieren, wohingegen B-Raf nur schwach durch FGF und gar nicht durch VEGF aktiviert wird [55]. An der Zellmembran wird Raf durch p21 aktivierte Proteinkinase (PAK) [60] oder PKC [61] phosphoryliert und aktiviert [56]. Im weiteren Verlauf der Signalkette, aktiviert Raf MEK1 und 2 durch zweifache Phosphorylierung. Hierauf inaktivieren PKA [56] oder Akt [62] Raf. Abhängiges Enzym der MEK1/2 ist die „extracellular Signal Regulated Kinase“ (ERK) 1 und 2 (auch p42 und p44), die über Phosphorylierung an einem Tyrosin und einem Threonin aktiviert wird [63]. ERK phosphoryliert direkt mehrere Transkriptionsfaktoren darunter Ets-1, c-Jun und c-myc und über die ribosomale S6 Kinase (RSK) das „Cyclic AMP-responsive Element Binding Protein“(CREB) [56]. Endothelzellmigration wird über den Raf-MEK-ERK-Signalweg mittels der „Focal Adhesion Kinase“ (FAK) nach VEGF-Stimulation veranlasst. Auch der Abbau der extrazellulären Matrix wird über den MAPK-Signalweg nach VEGF-/FGF-Stimulus reguliert, wobei es zur erhöhten Expression von Ets-1

und zur Hochregulierung der Matrixmetalloproteinase 9 (MMP-9) kommt. Endotheldifferenzierung wird durch Raf-MEK-ERK auf VEGF und FGF hin kontrolliert [12].

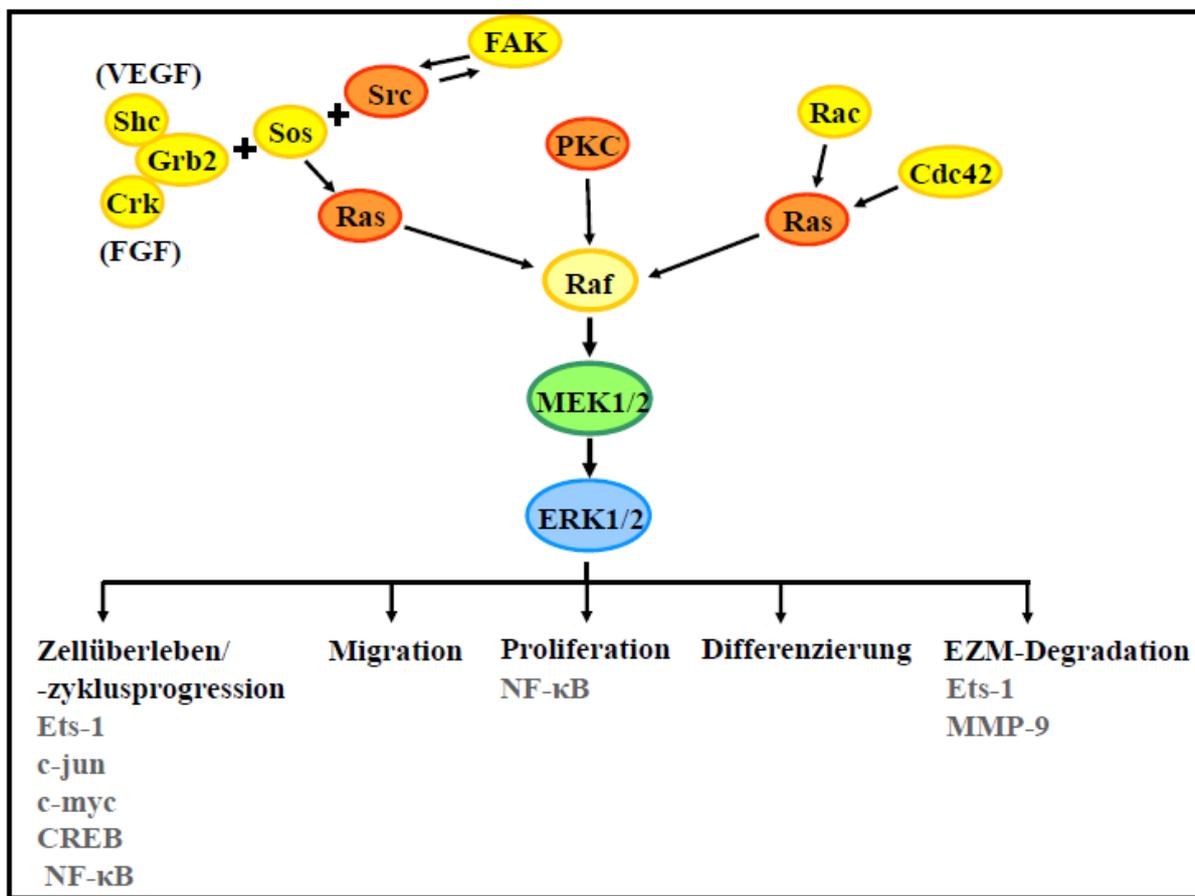


Abb. 1.4 Schematische Darstellung des Raf/MEK/ERK-Signalweges in Endothelzellen (nach Chang et al. 2003 und Munoz-Chápuli et al. 2004)

Der Raf/MEK/ERK-Signalweg spielt eine essentielle Rolle in der Angiogenese und kann durch sehr unterschiedliche Stimuli eingeleitet werden. Er beeinflusst unter anderem die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie Ets-1, c-myc, c-jun, NF-κB und CREB. Der Prozess der Raf-Aktivierung ist stark abhängig vom jeweiligen Stimulus.

1.4 Die DNA abhängige Proteinkinase - DNA-PK

Die Serin/Threonin-Proteinkinase DNA-PK aus der PI3-K-Superfamilie wurde 1990 von Lees-Miller et al. entdeckt. Sie besteht aus einer 470 kDa großen katalytischen Untereinheit (DNA-PKcs) und einem regulatorischen Faktor (Ku70 oder Ku80) [64]. Primär kommt DNA-PK in Zellkernen (ca. 1 % der Proteinmenge in HeLa-Zellkernen [65, 66]), aber auch in Zytoplasma und Zellmembran vor. Besonders in „Lipid Rafts“ [67] konnten geringe Mengen nachgewiesen werden. Die Verteilung, aber auch die Expression der DNA-PK sind vom Zellzyklus abhängig [67, 68], so dass z.B. in Stadien des Zellwachstums Ku erhöht ist [69] und die Aktivität des Komplexes in der G₀-/frühen S-Phase und in der G₂-Phase ansteigt [66].

Einleitung

DNA-PK ist wegen ihrer Funktion bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen (DSB), die physiologisch z.B. während der V(D)J-Rekombination der Immunoglobulin- und T-Zell-Rezeptorgene des Immunsystems, aber auch pathologisch auftreten können, bekannt [70]. DSB entstehen z.B. durch reaktive Sauerstoffmetaboliten, ionisierende Strahlung und Chemotherapeutika wie Bleomycin [71]. Unter den zahlreichen Reparaturmechanismen eukaryontischer Zellen spielt das „Non-Homologous End Joining“ (NHEJ) über DNA-PK besonders während der G1- und G0-Phase des Zellzyklus eine bedeutende Rolle [71]. Weiter scheint DNA-PK wichtig für die Stabilisierung der Telomere, dem Verhindern der Fusion von Chromosomen an deren Enden und die Regulation des Zellzyklus zu sein [87, 88].

Trotz einer deutlichen Homologie zwischen der katalytischen Einheit der DNA-PK und der PI3-Kinase-Superfamilie (c-terminal, ca. 500 Aminosäuren) [72, 73] handelt es sich um eine Proteinkinase- und nicht um eine Lipidkinaseaktivität [72]. Diese Homologie führt unter anderem dazu, dass Inhibitoren der PI3-Kinase wie Wortmannin und LY294002 auch auf DNA-PKs Wirkung zeigen. Hill et al. fanden im Jahr 2002 in Plasmamembran-Rafts von HEK293-Zellen einen hochmolekularen Komplex, der konstitutiv Akt an Ser473 phosphorylierte [74]. In weiteren Zelllinien konnte diese Ser473-Aktivität DNA-PKs zugeordnet werden [75]. Stimulation von murinen, aus Knochenmark abgeleiteten Makrophagen, denen DNA-PKs fehlt, führte zu einer defekten Phosphorylierung und Aktivierung von PKB durch CpG-DNA [76].

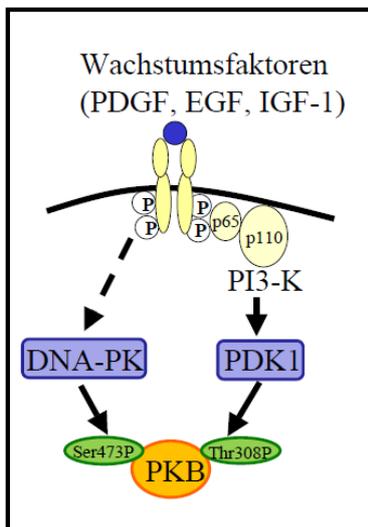


Abb. 1.5 Vereinfachte Darstellung der DNA-PK als PDK2 (nach Feng et al. 2004)

Auf Stimulation mit Wachstumsfaktoren folgend rekrutieren PIP3 PKB/Akt an die Zellmembran. So gerät Akt in direkte Nachbarschaft mit PDK1 und DNA-PK, die zur Phosphorylierung und somit Aktivierung an spezifischen Residuen führen. Die Funktion von DNA-PKs als PDK2 scheint von Zellart und Stimulus abhängig zu sein.

Einleitung

DNA-PK wird unter anderem durch Interaktion mit Ku und/oder DNA [88, 95, 96], sowie in vitro durch ADP-Ribosylierung durch die Poly-ADP-Ribosyl-Transferase (PARP) aktiviert [77]. Auch posttranslationale Modifizierung wie inhibitorische Autophosphorylierung regulieren die Aktivität der DNA-PK [78]. Die Proteinphosphatasen 1, 2A, 5 und 6 dephosphorylieren DNA-PKcs und stellen die Aktivität der DNA-PK wieder her [79-81]. In-vitro-Substrate der DNA-PK umfassen Transkriptionsfaktoren wie E2F-1 [104] und p53 [64]. Über E2F-1 wird der Übergang von G0/G1- zur S-Phase nach Phosphorylierung durch DNA-PK in Mäuseleberzellen negativ reguliert [104]. Die Ausschaltung von DNA-PKcs mittels siRNA führte in HeLa-Zellen zu einem veränderten Transkriptionsprofil von Genen der Proliferation und Differenzierung [21, 105] wie z.B. CDKN1B (p27/Kip1) und CDKN1A (p21/Cip1) [105]. So ist z.B. die Hochregulierung von p21 nach DNA-Schädigung von PKB und DNA-PK abhängig [106].

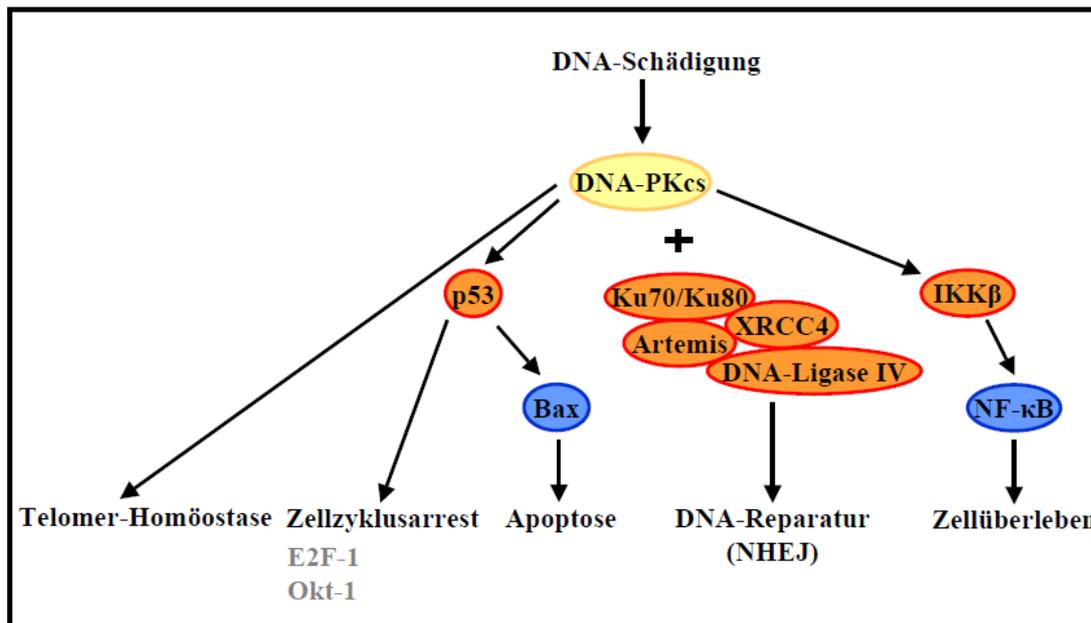


Abb. 1.6 Schematische Darstellung der DNA-PKcs-Funktion auf DNA-Schädigung hin (nach Bozulic et al. 2009 [82], Collis et al. 2005, Panta et al. 2004, Smith et al. 1999 und Dip et al. 2005 [83])

DNA-PKcs erfüllt in Zellen mehr Funktionen als nur die Reparatur von DSB während des NHEJ. Sie hat Bedeutung für die Homöostase der Telomere, die Apoptose, das Zellüberleben und die Zellzyklussteuerung. Dies bewirkt DNA-PKcs über unterschiedliche Signalwege.

Abgesehen von der Wirkung von DNA-Schäden auf DNA-PK gibt es Hinweise auf Interaktionen mit Wachstumsfaktoren, Hormonen und Zytokinen. So führt FGF-2 zu erhöhter Expression und Aktivität von DNA-PKcs [107], die Zunahme nukleären EGFR zu erhöhter DNA-PK-Aktivität im Nukleus [108, 109] und TGFβ in Hep3B-Zellen zum Abbau von DNA-PK [110]. DNA-PK-Phosphorylierung von „Insulin-like Growth Factor Binding Protein-3“ ist

essentiell für Apoptoseinduktion in Prostatakarzinomzellen [84] und Octreotid, ein Somatostatin-Analogon, stimuliert in Magenkrebszellen die DNA-PK-Aktivität [112]. Im Rahmen der Apoptose wird DNA-PKs spezifisch durch Caspase-3 oder Caspase-3-like Proteasen gespalten und inaktiviert, was effektiv die Reparatur beschädigter Zellen verhindert. PKC ϵ aktiviert nach Stimulation mit TNF α in MCF-7-Zellen über DNA-PK Akt und wirkt somit antiapoptotisch [85].

Spontane SCID-Mäuse (Severe Combined Immunodeficiency), welche ein defunktionales Immunsystem und Hypersensitivität auf ionisierende Strahlung aufweisen, sowie frühzeitig altern, exprimieren nur ca. 5 % des normalen Proteinlevels an funktionaler DNA-PK. DNA-PK^{-/-}- und DNA-PK^{kin -/-}-Knockout-Mäuse sind ebenfalls immunkomprimiert und zeigen ein verlangsamtes Wachstum. Bei all diesen Mäusen treten Lymphome besonders nach Bestrahlung häufiger auf. Die radiosensitive humane Gliom-Zelllinie M059J ist defekt in DNA-PK-Expression und -Aktivität [86].

1.5 Fragestellung

DNA-PKs ist ein äußerst vielseitiges Enzym, das in Zellüberleben, -proliferation und -zykluskontrolle eingreift. Primär ist es in der Wissenschaft in Zusammenhang mit Bestrahlung und Tumoren untersucht worden. Obwohl Genomanalysen gezeigt haben, dass DNA-PKs eine eindeutige Homologie zur PI3-Kinase aufweist [72] und des weiteren Hinweise auf Interaktionen mit Wachstumsfaktoren wie FGF-2 bestehen [87], wurde DNA-PK noch nicht in ihrer Rolle in Endothelzellen untersucht. Die primären Schritte der Angiogenese sind stark abhängig von ausreichender Endothelzellproliferation. VEGF gilt als der endothelspezifische Wachstumsfaktor, FGF-2 als potenter unspezifischer proliferativer Stimulus und TNF α kann als Apoptoseauslöser als negativer Kontrollstimulus gewertet werden. Proliferative Signalkaskaden in Endothelzellen sind der PI3-K/Akt- und Raf/MEK/ERK-Weg. Akt wird durch Phosphorylierungen an zwei Stellen aktiviert. Es wurde nachgewiesen, dass die Serin/Threonin-Kinase DNA-PK in der Lage ist Akt zu phosphorylieren und zu aktivieren [75]. In der folgenden Arbeit soll untersucht werden, ob auch in primären humanen (HUVEC) bzw. porcinen (PAEC) Endothelzellen und in mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC) angiogene Prozesse von DNA-PK beeinflusst werden.

Folgende Fragestellung sollen beantwortet werden:

- Wie wird DNA-PK in unterschiedlichen Endothelzellarten exprimiert und in welchen zellulären Kompartimenten ist sie lokalisiert?

Einleitung

- Nimmt DNA-PK Einfluss auf basale, wachstumsfaktor- und zytokinabhängige endotheliale Prozesse wie z.B. „Tube Formation“, Proliferation und Zellüberleben?
- Welche Signalwege, die für diese Prozesse wichtig sind, werden durch DNA-PK in Endothelzellen beeinflusst?
- Spielen diese Wachstumsfaktoren und das Zytokin TNF α eine Rolle in der Regulation, respektive Expression und intrazellulären Lokalisation von DNA-PK?

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, molekularbiologische Reagenzien, Geräte und andere Materialien

2.1.1 Chemikalien und molekularbiologische Reagenzien

Endotheliales Wachstumsmedium wurde von PromoCell (Heidelberg) gekauft. Kollagenase A kam von Roche (Mannheim) und Kollagenase Typ I von Genaxxon (Biberach). Wachstumsfaktor reduzierte Matrigel Matrix wurde von BD Biosciences (Heidelberg) bestellt. „Protease Inhibitor Cocktail“ (Halt) und BCATM Protein Assay Reagenz Kit wurden von ThermoScientific (Schwerte) verwendet. Fettfreies Trockenmilchpulver für den Westen Blot war von Saliter (Obergünzburg). Wachstumsfaktoren VEGF-A₁₆₅ und FGF-2 wurden von Tebu-Bio (Offenbach), das Zytokin TNF α von Reliatech (Wolfenbüttel) bestellt. Anti-FGF-2-Antikörper kamen von Millipore (Darmstadt) und ein Kontroll-Antikörper von Santa Cruz (Heidelberg). CombiMAG für die Magnetofektion wurden von Chemicell (Berlin) hergestellt. Es wurden das Effectene[®] Transfection Kit und siRNA von Qiagen (Hilden) verwendet. Für RT-PCR kamen dTNPs von Qbiogene (Heidelberg), DNA-PKcs- und Aktin-Primer von Biomers.net (Ulm) und RNasin von Promega (Mannheim). Log2-Marker wurde von New England Biolabs (Frankfurt am Main) und HiMark von Invitrogen (Darmstadt) erworben.

Alle weiteren Chemikalien und Reagenzien sind im Anhang 6.1 aufgelistet.

2.1.2 Geräte und anderweitiges Material

Im Anhang 6.1 befindet sich eine detaillierte Liste mit verwendeten Geräten und Materialien.

2.2 Zellkultur und Zelllinien

Medien und Lösungen

<i>HUVEC-Wachstumsmedium (20 %)</i>		<i>HUVEC-Hungermedium (10 %)</i>	
DMEM		DMEM	
+ Neugeborenen Kälberserum (NBCS)	20 %	+ Neugeborenen Kälberserum (NBCS)	1 %
+ Endotheliales Wachstumsmedium	10 %	+ Penicillin/Streptomycin	1 %
+ Penicillin/Streptomycin	1 %	pH 7.4	
pH 7.4			

Material und Methoden

HMEC-Wachstumsmedium (10 %)

DMEM

+ fetales Kälberserum (FCS) 10 %
 + Endotheliales Wachstumsmedium 10 %
 + Penicillin/Streptomycin 1 %
 pH 7.4

HMEC-Hungermedium (1 %)

DMEM

+ fetales Kälberserum (FCS) 1 %
 + Penicillin/Streptomycin 1 %
 pH 7.4

PAEC-Wachstumsmedium (10 %)

Dulbeccos´ s modifiziertes Eagle´ s Medium (DMEM)

+ fetales Kälberserum (FCS) 10 %
 + Penicillin (10.000 U)/ Streptomycin (10 mg)/ Amphotericin B (25 µg/ml) 1 %
 pH 7.4

PAEC-Wachstumsmedium (1 %)

Dulbeccos´ s modifiziertes Eagle´ s Medium (DMEM)

+ fetales Kälberserum (FCS) 1 %
 + Penicillin (10.000 U)/ Streptomycin (10 mg)/ Amphotericin B (25 µg/ml) 1 %
 pH 7.4

HUVEC-Einfriermedium

Dimethylsulfoxid (DMSO) 10 %
 in Neugeborenen Kälberserum

HMEC- und PAEC-Einfriermedium

DMSO 10 %
 in fetalem Kälberserum

Phosphatgepufferte Salzlösung

	PBS+	PBS-
NaCl	8.00 g	8.00 g
KCl	0.20 g	0.20 g
Na ₂ HPO ₄	1.15 g	1.15 g
KH ₂ PO ₄	0.20 g	0.20 g
MgCl ₂	0.04 g	0.04 g
CaCl ₂	0.50 g	
<hr/>		
Destilliertes Wasser H ₂ O	ad 1000 ml	ad 1000 ml

pH 7.4

Kollagenase-A-Lösung

Kollagenase Typ I (1700 U/mg) (Roche)	1 g
PBS+	ad 1000 ml
Kollagenase (Genaxxon)	1 mg/ml

Die Lösung wurde zur Sterilisierung durch einen Filter mit einer Porengröße von 0.2 µm gegeben.

2.2.1 Isolierung und Kultivierung von Endothelzellen aus humanen Umbilikalvenen (HUVEC)

Menschliche Nabelschnüre wurden freundlicherweise von der Universitätsfrauenklinik (Maistrasse) der Ludwig-Maximilians-Universität und der Frauenklinik Dr. Geisenhofer am Englischen Garten zur Verfügung gestellt. Alle Patientinnen wurden aufgeklärt und eine schriftliche Einwilligung eingeholt. Um humane Endothelzellen aus den Umbilikalvenen (HUVEC) zu isolieren, wurde die Nabelschnurvene zuerst mit warmer, kalziumangereicherter, phosphatgepufferter Salzlösung (PBS+) durchgespült. Zur Ablösung der Endothelzellen von der Gefäßwand wurde die Nabelschnurvene anschließend mit 1 mg/ml Kollagenase-A-Lösung für 10 min in einem Gefäß mit 0.9 % NaCl-Lösung in einem feuchten Inkubator bei 37° C behandelt. Mit DMEM (Dulbeccos's modifiziertes Eagle's Medium) wurden dann die primären Endothelzellen aus dem Gefäß gespült. Die Zellen wurden in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 1,200 rpm für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die isolierten primären Endothelzellen wurden dann in 25 cm² T-Flaschen mit Filter in endotheliale Wachstumsmilieu mit 1 % PS (Penicillin (10.000 U)/Streptomycin (10 mg)) aufgenommen und in einem feuchten Brutschrank bei 37° C und 5 % CO₂ gehalten. Täglich wurden die Zellen mit PBS+ und 1 % PS gewaschen und das Medium erneuert. Bei Erreichen von Konfluenz wurden die HUVEC passagiert, und in HUVEC-Wachstumsmilieu (20 % Serum) mit zusätzlichen 20 % endotheliale Wachstumsmilieu bei 37° C und 5 % CO₂ im Brutschrank weiter gezüchtet. Primäre HUVEC wurden nur bis zur dritten Passage benutzt.

2.2.2 Isolierung und Kultivierung von Endothelzellen aus porcinen Aorten (PAEC)

Die Isolierung von porcinen arteriellen Endothelzellen fand wie schon von Gloe et al. beschrieben statt [88]. Frische Schweineaorten vom Münchner Schlachthof wurden in PBS+ bis zur Präparierung aufbewahrt. Bevor die Aorta eröffnet wurde, wurden sorgfältig Fett und

Bindegewebe entfernt. Die Aorta wurde dann der Länge nach eröffnet, so dass die Gefäßinnenseite mit PBS+ gewaschen werden konnte. Die Gefäßstücke wurden mit der Innenseite nach oben in eine Isolierkammer eingespannt und mit steriler Kollagenase-A-Lösung für 1 Stunde bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Die Endothelzellen wurden anschließend mit Kulturmedium und Hilfe eines Zellschabers von der Gefäßinnenseite abgelöst und in einem Reaktionsgefäß für 25 min bei 1,200 rpm zentrifugiert. In Kulturschalen aus Plastik wurden die PAEC bis zur Konfluenz in PAEC Wachstumsmedium (10 % Serum) kultiviert. Auch zur weiteren Passagierung wurde PAEC-Wachstumsmedium (10 % Serum) verwendet. Der Brutschrank wurde auf 37° C und 5 % CO₂ gestellt.

2.2.3 Kultivierung von humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC)

Humane mikrovaskuläre Endothelzellen (HMEC) wurden von Ades et al. zur Verfügung gestellt [89]. HMEC wurden in HMEC-Wachstumsmedium (10 % Serum) gezüchtet und im Brutschrank bei 37° C und 5 % CO₂ gehalten.

2.2.4 Passagieren von Zellen

Kulturmedium wurde unter sterilen Bedingungen abgesaugt und konfluente Endothelzellen anschließend mit warmer phosphatgepufferter Salzlösung ohne Kalzium (PBS-) einmal gewaschen. Nach dem Absaugen von PBS- wurden 1000 µl Trypsin-EDTA-Lösung zum Ablösen der Zellen vom Untergrund aufgegeben und für ca. 1 min bei Raumtemperatur belassen. Nach Kontrolle des Fortschritts am Mikroskop wurde der enzymatische Vorgang mit 1000 µl entsprechendem endothelialen Wachstumsmedium (10 % Serum) gestoppt. Eventuell noch nicht gelöste Zellen wurden vorsichtig mit einem Zellschaber vom Untergrund gelöst. Die Zellsuspension wurde verdünnt und im entsprechenden Zellmedium auf neue Kulturschalen/-flaschen ausgesät.

2.2.5 Einfrieren von Zellen

Zur Kryokonservierung von Endothelzellen wurde regelmäßig ein Teil der konfluenten Zellen eingefroren und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Konfluente Endothelzellen (HMEC, HUVEC und PAEC) wurden mit PBS- gewaschen und mit 1000 µl Trypsin für ca. 1 min bei RT inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde mit 1000 µl des entsprechenden Einfrieremediums gestoppt. Die Zellen wurden rasch mit einem Zellschaber vom Untergrund gelöst und in ein Kryoröhrchen überführt. Über 72 h wurden die Zellen schrittweise auf -80° C gekühlt, bevor sie zur Langzeitlagerung in einen Tank mit flüssigem Stickstoff gelegt wurden.

2.3 Molekularbiologie

2.3.1 siRNA Transfer

Lösungen

siRNA

Anti-DNA-PKcs-siRNA

Hs_PRKDC_6_HP validated siRNA

Kontroll-siRNA

Allstars Negative Control siRNA

Transfektionslösung

Tabelle 1: Mischungsschema für Transfektionslösungen

Chemikalien	Konzentration	Menge/well auf einer 24 well-Platte	Menge in einer 6 cm Kulturschale	Menge in einer 10 cm Kulturschale	Verhältnis Chemikalie/siRNA
siRNA	0.297 µg/µl	0.18 µg (0.6 µl)	0.89 µg (3.0 µl)	1.78 µg (6.0 µl)	
Enhancer-Lösung	1 mg/ml	1.42 µl	7.13 µl	14.26 µl	8 µl/µg siRNA
CombiMAG	1 mg/ml	0.36 µl	1.78 µl	3.56 µl	2 µl/µg siRNA
EC-Puffer		29.62 µl	20.09 µl	8.18 µl	
Effectene	1 mg/ml	1.78 µl	8.91 µl	17.82 µl	10 µl/µg siRNA
Medium		166.22 µl	891.09 µl	1882.18 µl	
Medium auf Zellen vor Transfektion		200.00 µl	1 ml	2 ml	
Gesamtvolumen		400.00 µl	2 ml	4 ml	

Medien

HMEC-Wachstumsmedium (10 %)

HMEC-Hungermedium (1 %)

PAEC-Wachstumsmedium (10 %)

PAEC-Hungermedium (1 %)

„Small Interfering RNA“ (siRNA) wurde mittels der von Krötz et al. beschriebenen Methode der Magnetofektion [90, 91] mit Hilfe des Effectene® Transfektionskit in Endothelzellen eingeschleust, um die Expression des Proteins DNA-PKcs zu verringern.

Alle Reagenzien wurden während der Transfektion auf Eis gestellt. siRNA wurde mit Enhancer-Lösung, EC-Puffer und CombiMAG (Magnetpartikel) nach Tabelle 1 in 15 ml Reaktionsgefäßen zusammengefügt und für ca. 5 sec gevortext. Nach 2-5 min bei RT wurde Effectene-Lösung nach Tabelle 1 hinzugegeben, 10 sec gevortext und die Mischung für 10 min bei RT stehen gelassen. In den zu transfizierenden Petrischalen wurde Hungermedium in folgenden

Material und Methoden

Menge vorgelegt: 200 μl /well in 24-well-Platten, 1000 μl in 6 cm-Kulturschalen und 2000 μl in 10 cm-Kulturschalen. Hungermedium wurde entsprechend der Tabelle 1 zur Transfektionslösung hinzugegeben, bevor die Lösung auf die Zellen gegeben wurde. Dann wurden die Kulturgefäße mit den Zellen für 30 min zum Transfer der siRNA auf Neodymium-Eisen-Boron Magnetplatten im Brutschrank bei 37° C und 5 % CO₂ gestellt. Anschließend wurden die Schalen abgesaugt, die Zellen dreimal vorsichtig mit PBS+ gewaschen und frisches Wachstumsmedium aufgegeben. Für Experimente wurden die Zellen bis zu 48 h nach der Transfektion weiter kultiviert, zunächst in PAEC/HMEC-Wachstumsmedium (10 %), dann 24 h in PAEC/HMEC-Hungermedium (1 %).

Kontrolle der Transfektionseffizienz

Die Kontrolle der Transfektionseffizienz und die Bestimmung der optimalen Dauer wurden mittels Western Blot über die Analyse des Proteins DNA-PKcs durchgeführt. Zellen wurden regelmäßig unter dem Mikroskop auf Zeichen von Apoptose gescreent. Fluoreszenzstoff gebundene siRNA wurde verwendet, um am Mikroskop zu überprüfen, ob siRNA mittels Magnetofektion in die Zellen eingedrungen war. Ein Spektrometer wurde benutzt, um Vergleiche zwischen transfizierten Zellen und Kontrollen zu erstellen.

2.3.2 RNA-Extrakte für PCR

Materialien

PeqGOLD Total RNA Kit

RNase-freie DNase I 20 kU/ μl

DNase I Digestion-Buffer

Wachstumsmedium

Hungermedium

100 % Ethanol

70 % Ethanol in RNase-freiem Wasser

Zellen

HUVEC

HMEC

PAEC

Endothelzellen wurden in 10 cm Petrischalen in entsprechendem Wachstumsmedium bis zur Konfluenz gezüchtet. Für Stimulationsversuche wurden die Zellen zuvor für mindestens 12 h auf Hungermedium gesetzt und mit den entsprechenden Substanzen behandelt.

Material und Methoden

Um die gesamte RNA aus Endothelzellen zu isolieren, wurde das PeqGOLD Total RNA Kit laut Protokoll, inklusive eines DNase-Schritts, verwendet. Dies basiert auf der Zentrifugationssäulenmethode über Silikamembranen. Es können bis zu 100 µg nicht degradierte RNA mit Längen ab 200 Basenpaaren aufgereinigt werden. Für den DNase-Schritt wurde folgende Verdünnung je Reaktionsgefäß angesetzt:

73.5 µl DNase I Digestion Buffer + 1.5 µl RNase-freie DNase I

Anschließend wurde die Konzentration der RNA mit einem GeneQuant II RNA/DNA Calculator bestimmt.

2.3.3 RT-PCR

Lösungen

TE-Puffer 1x

Tris	121,14 g
Na ₂ EDTA	186,12 g
destilliertes Wasser ad 1 l	
pH 8.0	

TBE-Puffer 10x

Tris	108 g
Borsäure	55 g
Na ₂ EDTA 0.5 M pH 0.8	40 ml
destilliertes Wasser ad 1 l	

Materialien

RNA	2 µg/Probe
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs)	0.2 mM
MgCl ₂	2 mM
DNA-PKcs Primer	1 µM
Forward: 5' GGCCATGACGAGAGGGAACAC 3'	
Reverse: 5' TGAGAGCTGGCGAAGTGGGAGC 3'	
Aktin Primer	1 µM
Forward: 5' TGTCCACCTTCCAGCAGATGTG 3'	
Reverse: 5' AGTCCTCGGCCACATTGTGAAC 3'	
Taq-DNA-Polymerase	2.5 U
RNasin	25 U
M-MLV-Reverse-Transkriptase	200 U

Material und Methoden

Taq-DNA-Polymerase-Puffer

Millipore Wasser

Agarose

Ethidiumbromid

Log2-Marker

6x Auftragspuffer

Tabelle 2: Mix 1

Substanz	Stock-Lösung	Arbeits-Lösung	Menge
Forward-Primer 1 μ M	100 pmol/ μ l	10 pmol/ μ l	1.5 μ l
Reverse-Primer 1 μ M	100 pmol/ μ l	10 pmol/ μ l	1.5 μ l
RNA			2.0 μ g
Millipore-Wasser			ad 15 μ l

Tabelle 3: Mix 2

Substanz	Menge
M-MLV 5x Puffer	5.00 μ l
dTNPs	1.25 μ l
RNasin	0.625 μ l
M-MLV-RT	1.00 μ l
Millipore Wasser	17.125 μ l
Gesamtvolumen	25.00 μ l

Tabelle 4: Mix 3

Substanz	Menge
dTNPs	1.8 μ l
MgCl ₂	7.5 μ l
Taq-DNA-Polymerase Puffer 10x	10.0 μ l
Forward Primer 0.5 μ M	5.0 μ l
Reverse Primer 0.5 μ M	5.0 μ l
Taq-DNA-Polymerase	0.5 μ l
Millipore Wasser	50.4 μ l
Gesamtvolumen	80.0 μ l

Primer wurden aus der Sequenz der DNA-PKcs so gewählt, dass alle Unterformen berücksichtigt wurden. Entsprechende Primer wurden von der Firma Biomers.net hergestellt. RNA wurde in ein Reaktionsgefäß pipettiert und laut Tabelle 2 auf 15 μ l aufgefüllt. Es wurde für wenige Sekunden zentrifugiert und dann in einer PCR-Maschine 5 Minuten bei 70° C inkubiert. Die Proben wurden auf Eis gestellt.

Die RNA wurde für 45 Minuten mit den Substanzen aus Tabelle 3 bei 45° C in der PCR-Maschine inkubiert. Die M-MLV-RT wurde anschließend bei 94° C für 5 min inaktiviert und

die Proben wieder auf Eis gestellt.

Mit 60 µl Millipore Wasser wurde die cDNA auf 100 µl pro Reaktionsgefäß verdünnt und von dieser Lösung wurden 10 µl mit 40 µl der Mischung aus Tabelle 4 vermischt. Die Reste der cDNA wurden bei -20° C aufbewahrt. Folgendes Programm wurde in der PCR-Maschine mit einer Lid-Temperatur von 105° C durchgeführt:

- 1) 94° C 3.0 min
- 2) 94° C 0.5 min
- 3) 60° C 0.5 min
- 4) 72° C 2.0 min
- 5) 72° C 10.0 min
- 6) 4° C end

Schritte 2), 3) und 4) wurden je 35 Mal wiederholt.

Jeweils 20 µl der Proben wurden auf ein 1.2 % Agarose-Ethidiumbromid-Gel geladen und die Reste über Nacht im Kühlschrank bei 4° C aufbewahrt. Das Gel wurde bei 126 V für ca. 40 min laufen gelassen und dann auf einem UV-Tisch analysiert. Aufnahmen wurden mit einer Kamera der Firma Canon gemacht und die Dichte der Banden analysiert. Als Negativkontrolle wurde eine Probe ohne RNA demselben Protokoll unterworfen. Normalisiert wurde durch Verhältnissetzung zur Aktinexpression.

2.4 Proteinchemie

2.4.1 Zellextrakte für Western Blot Analyse

Puffer und Lösungen

Lysispuffer für konfluente Endothelzellen

KH ₂ PO ₄	20 mM
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	1 mM
Pefablock	1 mM
Leupeptin	1 µM
Pepstatin	1 µM
NaF	50 nM
Na ₄ O ₇ P ₂	40 mM
Na ₃ VO ₄	2 mM
pH 7.3	

Material und Methoden

Vor Einsetzen des Puffers wurde noch Triton X-100 in einer Endkonzentration von 1 % zum Puffer gegeben.

Modifizierter RIPA-Puffer

NaCl	150 mM
Tris-Base	50 mM
NaF	1 mM
<u>destilliertes Wasser</u>	<u>ad 200 ml</u>
pH 7.4	
EDTA	1 mM
Nonidet P40	1 %
SDS	0.1 %
<u>Desoxycholat</u>	<u>0.25 %</u>
Pepstatin	1 μ M
PIC (“Protein Inhibitor Cocktail”)	1 μ M
Na ₃ VO ₄	1 mM

Pepstatin, PIC und Natriumorthovanadat wurden erst unmittelbar vor Benutzung zu den Aliquots hinzugefügt.

Natriumorthovanadat (Na₃VO₄) 200 mM

Natriumorthovanadat ist ein unspezifischer Inhibitor von Tyrosinphosphatasen. Um eine maximale Inhibition von Tyrosinphosphatasen zu erreichen, muss Natriumorthovanadat aktiviert sein. Die Aktivierung erfolgte durch die Depolymerisierung von Natriummetavanadat (NaVO₃) zu Natriumorthovanadat (Na₃VO₄) auf folgendem Weg:

- 1) NaVO₃ wurde in destilliertem Wasser in einer Konzentration von 200 mM gelöst und der pH-Wert wurde auf 10 eintitriert. Eine gelbe Lösung entstand.
- 2) Die Lösung wurde im Wasserbad solange gekocht, bis sie farblos erschien.
- 3) Nachdem die Lösung auf RT abgekühlt war, wurde der pH-Wert wieder auf 10 eingestellt.
- 4) Die Schritte 2 und 3 wurden so oft wiederholt, bis sich der pH-Wert bei 10 einstellte und die Lösung unabhängig von der Temperatur farblos blieb.

Die Proben wurden dann bei -20° C bis zum weiteren Gebrauch aufgehoben.

Lysepuffer für konfluente Endothelzellen

Zur Gewinnung von Proteinlysaten aus Zellen wurde wie folgt vorgegangen. Zellen wurden mit eiskaltem PBS+ einmal gewaschen und anschließend mit eiskaltem Lysispuffer bedeckt.

Dann wurden sie 10 min auf Eis gelagert. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Untergrund abgeschabt, und im Folgenden mehrmals durch eine 29 G Nadel auf- und abpipetiert. Zentrifugation bei 10,000 g und 4° C für 10 min wurde eingesetzt, um die Zelldebris vom Proteinlysate zu trennen. Die Proteinkonzentration wurde mit einem BCA (Bicinchoninsäure) Protein Assay Reagenz Kit dem Herstellerprotokoll folgend bestimmt. Sofern die Proteinlysate nicht umgehend analysiert wurden, wurden die Proben bei -20° C bis zum Gebrauch gelagert.

Zellyse durch modifizierten RIPA-Puffer

Die Zellen wurden auf Eis gestellt und zweimal mit kaltem PBS+ gewaschen. Anschließend wurde eiskalter Lysepuffer aufgegeben und die Proben wurden für einige Stunden bei -20° C bis -85° C eingefroren. Nachdem sie auf Eis wieder aufgetaut waren, wurden sie mit einem Zellschaber vom Untergrund gelöst und in gekühlte Eppendorfgefäße überführt. Nach weiteren 10 min in Eiswasser wurden die Proben bei 10,000 g und 4° C für 10 min zentrifugiert. Die Proben konnten ebenfalls eingefroren werden.

2.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Materialien

BCA™ Protein Assay Reagenz Kit

Lösung aus bovinem Serumalbumin 2mg/ml in destilliertem Wasser

Das BCA (Bicinchoninsäure) Assay Reagenz Kit basiert auf der Biuret-Reaktion. Hierbei werden Cu^{2+} Ionen durch Proteine in einem alkalischen Medium zu Cu^{1+} Ionen reduziert. Die Zugabe von Bicinchoninsäure zum Proteinlysate führt zu einem lila Farbumschlag, der durch Photometrie bei 562 nm bestimmt werden kann. Dieses farbige Endprodukt entsteht durch die Chelierung von zwei Molekülen BCA mit einem Cu^{1+} Ion. Die Entstehung ist annähernd linear mit einer zunehmenden Proteinkonzentration. 10 µl eines Proteinlysats werden in einem Well einer 96-well-Platte mit 200 µl BCA-Lösung (gemischt nach dem Protokoll des Herstellers) vereint. Jede Probe wird in Triplikaten aufgetragen. Eine Eichreihe wird gleichzeitig zu den Proteinlysaten mit einer Verdünnungsreihe von BCA gemessen und zur Erstellung einer Standardkurve verwendet. Die 96-well-Platte wird für 30 min bei 37° C inkubiert und anschließend die Absorption bei einer Wellenlänge von 550 nm an einem Spektrometer gemessen. Die Proteinkonzentration der Lysate wird dann mit der folgenden Formel berechnet:

$$f(x) = m \cdot x + b$$

Dabei entspricht x dem Proteingehalt in μg . M bezieht sich auf den Gradient der Standardkurve und b ist der Wert, an welchem die Standardkurve die y -Achse schneidet. $F(x)$ entspricht der Absorption der gemessenen Probe.

2.4.3 Fraktionierung von Endothelzellen

Puffer und Lösungen

HMEC Wachstumsmedium (10 %)

HMEC Hungermedium (1 %)

Andere Materialien

ProteoExtract®Subcellular Proteome Extraction Kit

FGF-2 10 ng/ml

TNF α 5 ng/ml

DMSO v/v

Zellen

HMEC

HMEC wurden in 10 cm Kulturschalen bis zur Konfluenz in Wachstumsmedium aufgezogen. Anschließend wurden sie über Nacht auf Hungermedium gesetzt und am nächsten Tag entsprechend mit Wachstumsfaktoren in Hungermedium für 10 min bzw. 30 min stimuliert. Die Stimulationslösung wurde umgehend abgesaugt und Zellen mit PBS- gewaschen. Hierauf wurden die Zellen mit Trypsin vom Untergrund gelöst, der enzymatische Vorgang mit Medium gestoppt und die Zellsuspension bei 2,000 rpm für 2 min bei RT zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Zellpellet im Waschpuffer des ProteoExtract Kit gelöst und wie in der Anleitung des Herstellers für Zellsuspensionen in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Dann wurden die Zellen für die angegebenen Zeiten mit den entsprechenden fraktionsspezifischen Lysepuffern des Kits inkubiert und zentrifugiert. Es erwies sich als ausreichend ein Viertel der im Protokoll angegebenen Mengen an Puffer zu verwenden. Dies war notwendig, um eine ausreichende Konzentration an Proteinen in den einzelnen Fraktionen zu erhalten. Die Fraktionen für das Zytosol, Organellen und Membranen, den Zellkern und das Zytoskelett wurden, soweit nicht unmittelbar weiter gearbeitet wurde, bei -20°C eingelagert. Die Fraktionen wurden dann auf ausgesuchte Proteine im Western Blot wie nachfolgend beschrieben analysiert.

2.5 Immunologische Methoden

2.5.1 Western Blot Analyse

Reagenzien und Lösungen

SDS-PAGE

Trenngel (10 %):

Destilliertes Wasser	20.00 ml
Tris 1.5 M pH 8.8	12.50 ml
Natriumdodecylsulfat (SDS) 10 %	0.50 ml
Acrylamid/Bisacrylamid 30 %/0.8 % (w/v)	16.60 ml
Ammoniumpersulfat 10 % (w/v)	0.250 ml
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	0.025 ml

Sammelgel (4 %):

Destilliertes Wasser	6.00 ml
Tris 0.5 M pH 8.8	2.50 ml
Natriumdodecylsulfat (SDS) 10 %	0.10 ml
Acrylamid/Bisacrylamid 30 %/0.8 % (w/v)	1.30 ml
Ammoniumpersulfat 10 % (w/v)	0.05 ml
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	0.01 ml

Für beide Gel-Lösungen wurden zunächst destilliertes Wasser, Tris-Puffer, SDS und Acrylamid/Bisacrylamid vorsichtig vermengt. Direkt vor dem Gießen des Gels wurden jeweils die entsprechenden Mengen an Ammoniumpersulfat und TEMED hinzugegeben. Auf das Trenngel wurde unverzüglich eine Lage von destilliertem Wasser aufgebracht, um Austrocknung während der Polymerisierung zu verhindern. Das Wasser wurde vor Aufbringen des Sammelgels sorgfältig abgegossen und dann ein Kamm eingesteckt, damit keine Luftblasen den Ablauf der Auftrennung behindern.

Ladepuffer (4 x)

Tris-HCl pH 6.8	0.25 M
SDS	8 %
Glycerin	40 %
Bromphenolblau	0.02 %
Mercaptoethanol	400 mM

Material und Methoden

Laufpuffer (5 x)

Tris-Base	123.8 mM
Glycin	959.1 mM
SDS	17.3 mM

Transferpuffer (5 x)

Tris-Base	150 mM
Glycin	1.2 M
pH 8.4	

Im Weiteren wurde der Transferpuffer vor Gebrauch 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt und dann mit 20 % Methanol versetzt.

Tris gepufferte Salzlösung (TBS) (10 x)

Tris	24.2 g
NaCl	58.44 g
<hr/>	
Destilliertes Wasser	ad 1000 ml

Tris gepufferte Salzlösung mit Tween (TBS/T)

TBS	1 x
Tween 20	0.1 %
pH 7.6	

Blocking Puffer A

TBS/T	1 x
Fettfreies Trockenmilchpulver	3 %

Blocking Puffer B

TBS/T	1 x
Fettfreies Trockenmilchpulver	5 %

Blocking Puffer C

TBS/T	1 x
Albumin aus bovinem Serum (BSA)	5 %

Stripping Puffer

Tris-HCl	62.5 mM
SDS	2 %
β -Mercaptoethanol	100 mM

pH 6.7

Zum Strippen wurde der Stripping Puffer zunächst im Wasserbad auf 50° C erhitzt und dann mit der Membran in einer Plastiktüte eingeschweißt. Die Membran wurde für 20 min bei 50° C im Brutschrank inkubiert. Es wurde dreimal für 5 min mit TBS/T gewaschen und anschließend neu geblockt.

Verdünnungen für Erst-Antikörper

Tabelle 5: Erst-Antikörper für die Verwendung im Western Blot (MC: Monoklonal, PC: Polyclonal)

Antikörper	Wirt	Verdünnung und Puffer	Hersteller
Anti-DNA-PKcs (G4)	mouse (MC)	1:200 A	Santa Cruz, Heidelberg, DE
Anti-VEGFR-2	rabbit (MC)	1:1000 C	Cell Signalling, Frankfurt a.M., DE
Anti-Akt	rabbit (PC)	1:1000 C	Cell Signalling, Frankfurt a.M., DE
Anti-pAkt (Ser473)	rabbit (MC)	1:1000 C	Cell Signalling, Frankfurt a.M., DE
Anti-ERK	rabbit (MC)	1:1000 C	Cell Signalling, Frankfurt a.M., DE
Anti-pERK (Thr202/204)	mouse (MC)	1:1000 B	Cell Signalling, Frankfurt a.M., DE
Anti-GAPDH	mouse (MC)	1:5000 A/C	Chemicon, Hampshire, GB
Anti-Lamin A/C (N18)	goat (PC)	1:500 A	Santa Cruz, Heidelberg, DE

Verdünnungen für Zweit-Antikörper

Tabelle 6: Zweit-Antikörper für den Western Blot

Antikörper	Wirt	Verdünnung und Puffer	Hersteller
Anti-Rabbit	goat	1:5000	Calbiochem, Darmstadt, DE
Anti-Mouse	goat	1:10000	Calbiochem, Darmstadt, DE
Anti-Goat	rabbit	1:5000	Calbiochem, Darmstadt, DE

Enhanced Chemiluminescence-Lösung (ECL)

Destilliertes Wasser	4,500 µl
1M Tris-Base pH 8.5	500 µl
Luminol 44 mg/ml	50 µl
p-Coumarsiure 15 mg/ml	22 µl

Material und Methoden

H₂O₂ 30 %

3 µl

H₂O₂ wurde auf Grund seiner Lichtempfindlichkeit erst unmittelbar vor Verwendung der ECL-Lösung dazugegeben. Die Membran wurde für 1 min in 5 ml der Lösung geschwenkt. Proteinlysate wurden auf Eis aufgetaut und 25-40 µg wurden mit 1 x Ladepuffer in einem Verhältnis von 3:1 gemischt. Dann wurden die Proben bei 95° C für 5 min im Heizblock denaturiert, bevor sie auf ein 10 % SDS-PAGE-Gel (4 % Sammelgel, 10 % Trenngel) geladen wurden. Die Elektrophoresekammer wurde mit 1 x Laufpuffer aufgefüllt. Die Spannung an der Kammer wurde für das Sammelgel auf 100 V eingestellt und für das Trenngel auf 200 V. Die Proteine liefen bis der Ladepuffer nur noch ca. 1 cm vom Ende des Gels entfernt war. Die aufgetrennten Proteine wurden dann auf eine Nitrocellulosemembran in einem Tank- Blot-Verfahren übertragen. Hierfür wurde die Nitrocellulosemembran zusammen mit Filterpapieren für 5 min in Transferpuffer vorgetränkt. Dann wurde in folgender Weise vorgegangen: die Membran wurde auf ein Filterpapier gelegt, hierauf das Gel positioniert und dann kam ein weiteres Filterpapier darauf. Mit einem Glasstab wurden vorsichtig durch Rollen Luftblasen entfernt. Dieser Verbund wurde dann zwischen nasse Schwämme gelegt und in die Apparatur eingespannt. Entsprechend der Größe des Blots wurden dann 50 V Spannung angelegt und für 2 h geblottet. Die Beladung der Membran wurde wahlweise mit einer Ponceau S Lösung geprüft und mit Waschpuffer (TBS/T) wieder gereinigt. Um die Bindung von unspezifischen Antikörpern zu verhindern wurde die Membran abhängig vom späteren Erst-Antikörper (siehe Tabelle 5) für 1 h in Blockingpuffer geblockt. Bei Mehrfachfärbungen wurde der Blockingpuffer nach dem empfindlichsten Erst-Antikörper gewählt. In diesem Fall wurde zwischen Blocken und Erst-Antikörperinkubation ein Waschschrift eingefügt (dreimal 5 min in TBS/T). Mit dem verdünnten Erst-Antikörper wurde die Membran anschließend für 1 h bei 37° C im Wärmeschrank oder über Nacht bei 4° C inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde dann durch dreimaliges Waschen für 5 min in TBS/T entfernt und die Membran in der zugehörigen Zweit-Antikörperlösung für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4° C inkubiert. Zweit-Antikörper waren an Meerrettichperoxidase (HRP) gebunden, deren Aktivität mit einem Biolumineszenzdetektionssystem mit einer digitalen CCD Kamera und zugehöriger Software „Wasabi“ detektiert wurde. Dies erfolgte nach erneutem dreimaligem Waschen mit einer selbst hergestellten Enhanced Chemiluminescence-Lösung.

Analyse von Phosphorylierungszuständen einzelner Proteine

Zur Untersuchung von Aktivitätszuständen von Proteinen wurden mit der Western Blot Methode bestimmte Phosphorylierungsstellen nach Stimulation bzw. Inhibition untersucht. Sti-

Material und Methoden

mulationen fanden wie unter Abschnitt 2.6.1 angegeben statt. Die Lysate wurden mit modifiziertem RIPA-Puffer lysiert und anschließend wie unter 2.4.1 und 2.5.1 verarbeitet. Die Membranen wurden zuerst mit Antikörpern gegen Phosphoproteine inkubiert, bevor anschließend weitere Proteine untersucht wurden. Zwischen den unterschiedlichen Antikörpern wurde die Membran einmal mit Stripping-Puffer von den bereits gebundenen Antikörpern befreit, da die getesteten Proteine in ihrer Größe sehr ähnlich waren. Die Auswertung erfolgte durch die Messung der Dichte der Proteinbanden. Phosphorylierte Proteine wurden in Relation zu ihrem unphosphorylierten Zustand gesetzt.

2.5.2 Immunfluoreszenz

Puffer und Lösungen

HUVEC Wachstumsmedium (20 %)

HUVEC Hungermedium (1 %)

HMEC Wachstumsmedium (10 %)

HMEC Hungermedium (1 %)

Formalin 3 % in PBS+

PBS+

Triton-X100 0,2 % in 1 % BSA

BSA 1 % in PBS+

Andere Substanzen

FGF-2 10 ng/ml

NU7026 500 nM

DAPI 1 µg/ml

DMSO v/v

Erst-Antikörper

Tabelle 7: Erst-Antikörper für Immunfluoreszenz

Antikörper	Wirt	Verdünnung in PBS+	Hersteller
Anti-DNA-PKcs (G4)	mouse (MC)	1:200	Santa Cruz, Heidelberg, DE
Anti-Lamin A/C (N18)	goat (PC)	1:200	Santa Cruz, Heidelberg, DE
Anti-Akt	rabbit(PC)	1:200	Cell Signalling, Frankfurt a.M., DE

Zweit-Antikörper

Tabelle 8: Zweit-Antikörper für Immunfluoreszenz

Antikörper	Wirt	Verdünnung in PBS+	Hersteller
Anti-Mouse-AF488	rabbit	1:1000	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Anti-Mouse-AF546	goat	1:1000	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Anti-Goat-AF546	donkey	1:1000	Invitrogen, Karlsruhe, DE
Anti-Rabbit-AF488	chicken	1:1000	Invitrogen, Karlsruhe, DE

Zellen

HUVEC

HMEC

Endothelzellen wurden in „Chamber Slides“ mit 8 Fächern in Wachstumsmedium ausgesät. Nach Erreichen von Konfluenz wurden die Zellen über Nacht mit Hungermedium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 30 min mit Lösungen von Hungermedium und NU7026, bzw. DMSO vorinkubiert und im weiteren für 10 bzw. 30 min mit Wachstumsfaktoren stimuliert. Dann wurden die Zellen einmal mit PBS+ gewaschen und gleich mit Formalin für 15 min fixiert. Formalin wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS+ entfernt und die Slides, falls sie nicht sofort weiter verwendet wurden, im Kühlschrank bei 4° C aufbewahrt. Zur Permeabilisierung der Zellmembran wurden die Zellen dann für 2 min mit 0,2 % Triton-X100 inkubiert und dreimal mit 1 % BSA-Lösung gewaschen. Geblockt wurde mit 1 % BSA-Lösung für 1 h, bevor für 1 h bei RT die entsprechenden Proben gemäß obiger Tabelle mit Erst-Antikörpern und DAPI auf einem Schaukeltisch inkubiert wurden. Dann wurde dreimal mit 1 % BSA-Lösung gewaschen und für 10 min bei RT mit den entsprechenden Zweit-Antikörpern inkubiert. Die Inkubation mit den fluoreszierenden Zweit-Antikörpern fand im Dunklen statt. Es wurde noch dreimal mit 1 % BSA-Lösung gewaschen, bevor die Zellen in PBS+ am Mikroskop im ApoTom Modus bei RT aufgenommen wurden. Es wurde ein 63faches Ölimmersionsobjektiv verwendet.

2.6 Funktionelle Assays

2.6.1 Behandlung mit Wachstumsfaktoren und Inhibitoren

Wachstumsfaktoren und angewandte Konzentrationen

VEGF-A ₁₆₅	10 ng/ml
FGF-2	10 ng/ml
TNFα	5-20 ng/ml

Inhibitoren

Tabelle 9: Anwendung der spezifischen Inhibitoren

Inhibitor (Name)	Inhibiertes Protein	Anwendungskonzentration	Inkubationszeit
NU7026 (Calbiochem)	DNA-PKcs	300-500 nM	24 h Vorinkubation, für die gesamte Dauer des Experiments
NU7026 (Calbiochem)	PI3-Kinase	300 µM	24 h Vorinkubation, für die gesamte Dauer des Experiments
Akt-Inhibitor (Calbiochem)	Akt	10 µM	30 min Vorinkubation, für die gesamte Dauer des Experiments
LY294002 (Calbiochem)	PI3-Kinase	10 µM	60 min Vorinkubation, für die gesamte Dauer des Experiments

Neutralisierende Antikörper

Tabelle 10: Anwendung neutralisierender Antikörper

Anti-FGF-2 (Millipore)	mouse (MC)	5 µg/ml	1 h Vorinkubation, für die gesamte Dauer des Experiments
---------------------------	------------	---------	--

Medien

HMEC Hungermedium (1 %)

HUVEC Hungermedium (1 %)

PAEC Hungermedium (1 %)

Um die Effekte von Wachstumsfaktoren im Zusammenhang mit DNA-PKcs zu untersuchen, wurden sowohl HUVEC, als auch HMEC und PAEC für mindestens 12 h, bzw. 24 h vor Beginn der Versuche auf Hungermedium (1 %) gesetzt. VEGF- A₁₆₅ und FGF-2 wurden entsprechend der Tabelle mit Hungermedium (1 %) gemischt und für 10 min mit den Zellen im Brutschrank bei 37° C und 5 % CO₂ inkubiert. TNFα wurde abhängig von der Versuchsart für 10 bzw. 30 min in Hungermedium zu den Zellen gegeben. Für Versuche zur Abhängigkeit der DNA-PKcs-Expression von FGF-2 wurden Zellen für bis zu 72 h mit FGF-2 stimuliert. Dabei wurde alle 24 h der Wachstumsfaktor erneuert. Anschließend wurden die Proben wie in Abschnitt 2.4.1 beschrieben lysiert.

Wurden pharmakologische Inhibitoren benutzt, wurden die Zellen ebenfalls zuvor für mindestens 12 h mit Hungermedium inkubiert. Dann wurden die Inhibitoren in den angegebenen Verdünnungen aufgegeben und für mindestens 30 min belassen. Wachstumsfaktoren wurden je nach Experiment appliziert und die Zellen lysiert.

Waren Experimente mit einer Dauer von mehr als 24 h geplant, wurden täglich die entsprechenden Wachstumsfaktoren und/oder Inhibitoren mit Hungermedium gemischt und frisch auf die Zellen aufgegeben.

2.6.2 Zell-Proliferations-Assay

Lösungen

Farbloses DMEM (1 %)

Dulbeccos´ s modifiziertes Eagle´ s Medium (DMEM) ohne Phenolrot

Fetales Kälberserum (FCS) 1 %

Penicillin (10,000 U)/ Streptomycin (10 mg) 1 %

Farbloses DMEM (10 %)

Dulbeccos´ s modifiziertes Eagle´ s Medium (DMEM) ohne Phenolrot

Fetales Kälberserum (FCS) 10 %

Penicillin (10,000 U)/ Streptomycin (10 mg) 1 %

Methylthiazoltetrazolium (MTT) Lösung

MTT 5 mg/ml

in PBS+

Die MTT-Lösung wurde für jedes Experiment in ausreichender Menge für einen Durchlauf frisch angesetzt. Vor dem Aufbringen auf die Zellen wurde die Lösung weiter mit farblosem DMEM (1:10) verdünnt.

Weitere Reagenzien

VEGF- A₁₆₅, FGF-2 10 ng/ml

TNF α 20 ng/ml

NU7026 300 nM

Anti-DNA-PKcs-siRNA 30 nM

Kontroll-siRNA 30 nM

Kontroll-Antikörper 10 μ M

FGF-2-Antikörper 5 ng/ml

Akt-Inhibitor 10 μ M

2-Propanol 100 %

PBS+

Zellen

HMEC

PAEC

Um das Proliferationsverhalten von HMEC zu untersuchen, wurden diese über Nacht in Wachstumsmedium auf mit Kollagen (10 µg/ml) beschichtete 24 Well-Platten ausgesät. Anschließend wurden sie, falls nötig, für 24 h auf Hungermedium gesetzt. PAEC wurden über Nacht in Wachstumsmedium in 24 Well-Platten ausgesät und anschließend wie vorhergehend beschrieben mit siRNA magnetofiziert. Für die folgenden 48 h wurden sie in Hungermedium gehalten. Es wurde mit der von Mosmann [92] beschriebenen Methode mittels der Reduktion von MTT ein Nullwert gemessen. Anschließend wurden die Zellen entsprechend mit Lösungen von Wachstumsfaktoren bzw. Inhibitoren oder neutralisierenden Antikörpern in Hungermedium für 24, 48 und 72 Stunden inkubiert. Die Lösungen wurden entsprechend alle 24 h ausgewechselt.

MTT wird durch Enzyme der Atmungskette in den Zellen zu Formazan reduziert. Die Menge an Formazan kann demnach genutzt werden, um indirekt die Anzahl der lebenden Zellen zu bestimmen. Formazan erscheint als ein farbloches Produkt, welches an einem UV-Spektrometer bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen werden kann.

Zellen wurden mit PBS+ gewaschen und mit 400 µl MTT-Lösung bei 37° C für 2 h inkubiert. Dann wurden die Zellen erneut zweimal mit PBS+ gewaschen und mit 400 µl Isopropanol, welches die Formazan-Kristalle löst, bedeckt. Die 24 Well-Platte wurde vorsichtig geschwenkt und dann jeweils 200 µl der Proben zur Messung in Micro-Küvetten überführt. An einem Photospektrometer wurde bei 595 nm und 650 nm die Absorption gemessen. Die Proliferation wurde dann durch Subtraktion des Hintergrundes (650 nm) vom eigentlichen Messwert (595 nm) bestimmt. Die Wachstumsrate wurde durch Bezugsetzen zum Wert der Kontrolle nach 24 h ermittelt, da nach diesem Zeitraum die höchste Wirksamkeit für NU7026 erwartet wird. Bei den Experimenten mit transfizierten Zellen wurde als Bezugspunkt der Nullwert gewählt.

2.6.3 Capillary-like Structure Assay (CLS)

Puffer und Lösungen

HUVEC Wachstumsmedium (20 %)

HUVEC Hungermedium (1 %)

HMEC Wachstumsmedium (10 %)

HMEC Hungermedium (1 %)

Material und Methoden

PAEC Wachstumsmedium (10 %)

PAEC Hungermedium (1 %)

Formalin 3 % in PBS+

PBS+

Andere Substanzen

LY294002 10 μ M

NU7026 0.3 μ M, 0.3 mM

Anti-DNA-PKcs-siRNA 30 nM

Kontroll-siRNA 30 nM

DMSO v/v

Wachstumsfaktor reduzierte Matrigel Matrix

Zellen

HUVEC

HMEC

PAEC

Zur Beobachtung der Fähigkeit von Endothelzellen zur Bildung von kapillarähnlichen Strukturen wurden HMEC und HUVEC auf 6 cm Kulturschalen ausgesät und bis zur Konfluenz im Brutschrank kultiviert. Im Weiteren wurden die Endothelzellen für ca. 6 h mit Hungermedium inkubiert. PAEC wurden wie vorhergehend beschrieben mit siRNA transfiziert und 48 h in Wachstumsmedium gehalten, bevor sie ebenfalls für 6 h mit Hungermedium behandelt wurden. In diesem Zeitraum wurden die Wells einer 24-Well-Platte mit jeweils 400 μ l Matrigel unter Vermeidung von Luft einschlüssen auf Eis beschichtet. Anschließend wurden die Platten zur Aushärtung für 30 min im Brutschrank aufbewahrt. Währenddessen wurden die Endothelzellen einmal mit PBS+ gewaschen und mit 500 μ l Trypsin vorsichtig von den 6 cm Kulturschalen abgelöst. Die enzymatische Reaktion wurde mit dem entsprechenden Medium gestoppt und die Zellen für 3 min bei 2,000 rpm in einer Zentrifuge vom Medium getrennt. Das Zellpellet wurde in der gewünschten Mischung aus Hungermedium und Inhibitor so aufgelöst, dass eine Menge von 30,000 Zellen pro Well erzielt wurde. Anschließend wurden jeweils 500 μ l pro Well auf die Matrigel Matrix aufgebracht. Dann wurden die Zellen über Nacht im Brutschrank bei 37° C und 5 % CO₂ inkubiert und am folgenden Tag ausgewertet. Dazu wurden die 24-Well-Platten mit PBS+ einmal gewaschen und die Zellen mit 3 % Formalinlösung für 15 min fixiert. Mikroskopaufnahmen wurden in PBS+ bei RT mit einem 5fach Objektiv durchgeführt. Es wurden jeweils vier Aufnahmen pro Well analysiert, indem manuell die An-

zahl der vollständig gebildeten kapillarähnlichen Strukturen ausgezählt wurde. Diese Daten wurden statistischen Analysen unterworfen.

2.7 Statistische Analysen

Alle Daten wurden statistisch mit dem Programm Sigma Stat Version 3.5 analysiert. Für Vergleiche von normalverteilten kontinuierlichen Variablen wurde der „Student’s t-Test“ verwendet. Handelte es sich um Vergleiche von mehreren Gruppen stetiger und normalverteilter Daten, kam die univariante Varianzanalyse („one-way ANOVA“) zur Anwendung. Bei multiplen Testungen wurde eine post-Hoc Analyse mittels des Bonferroni-Tests vorgenommen. Der Mann-Whitney-Test wurde benutzt, um zwei Gruppen von unabhängigen, nicht normalverteilten, stetigen Variablen zu vergleichen. Mehr als zwei nicht normalverteilte, stetig, unabhängige Variablen wurden mit dem „ANOVA on ranks-Test“ analysiert. Zur Korrektur für multiple Vergleiche wurde in diesem Fall „Dunn’s Method“ verwendet. Zu Darstellungszwecken sind alle Daten als Mittelwerte mit Standardfehler abgebildet. Ergebnisse wurden als signifikant gewertet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit p kleiner als das vorgegebene Signifikanzniveau ($\alpha=0.05$) war.

3 Ergebnisse

3.1 Expression und Lokalisierung von DNA-PKcs in humanen und porcinen Endothelzellen

DNA-PKcs konnte mittels Western Blot Analyse von Proteinlysaten sowohl in humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMEC), als auch in primären humanen umbilikal-venösen Endothelzellen (HUVEC) nachgewiesen werden. Als Negativkontrolle der Expression von DNA-PKcs wurde ein Thrombozytenlysat verwendet, da Thrombozyten keinen Zellkern enthalten. Entsprechend der bisher bekannten zellulären Verteilung von DNA-PKcs konnte keine Proteinbande in Thrombozyten gezeigt werden (Abb. 3.1 A, n=3, HMEC, HUVEC, Thrombozyten).

Weiterhin wurde die subzelluläre Verteilung von DNA-PKcs in HMEC, primären porcinen Endothelzellen der Aorta (PAEC) und HUVEC mit Immunfluoreszenzfärbung untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass DNA-PKcs (grün) vorrangig in den Zellkernen der drei Zellarten vorkommt. Zur Kontrolle wurde mit Lamin A/C (rot) als Marker der Kernmembran gegengefärbt. In geringem Ausmaß lassen sich jedoch auch Spuren von DNA-PKcs in unmittelbarer Umgebung der Kernmembran nachweisen (Abb. 3.1 B, n=3, HMEC, HUVEC, PAEC).

Abb. 3.1

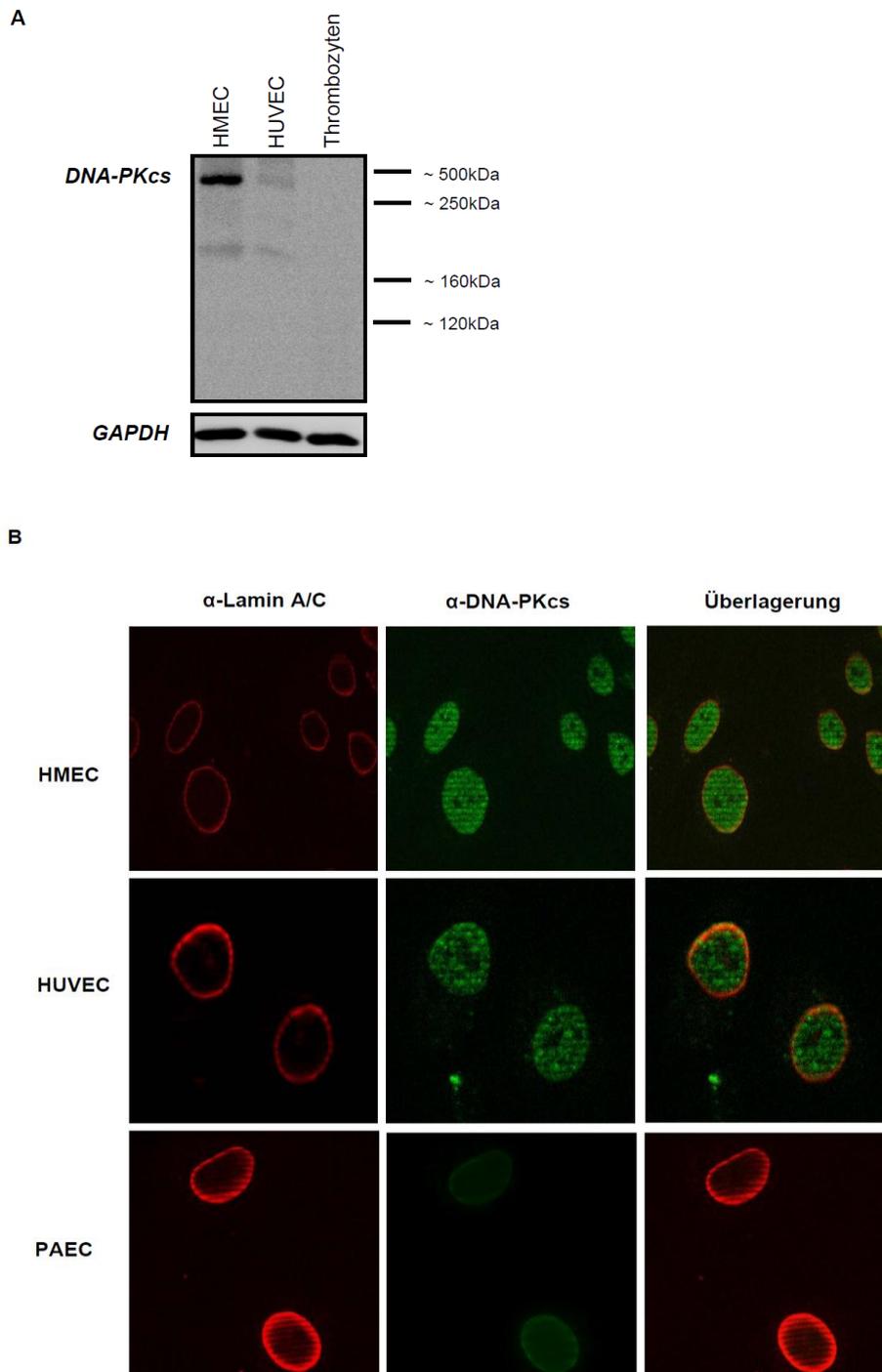


Abb. 3.1 Expression und zelluläre Verteilung von DNA-PKcs in humanen und porcinen Endothelzellen

(A) Die Western Blot Analyse zeigt, dass DNA-PKcs in HMEC und HUVEC im Gegensatz zu Thrombozyten, die keinen Zellkern besitzen, exprimiert wird ($n=3$).

(B) In einer Immunfluoreszenzfärbung von HMEC, HUVEC und PAEC ist DNA-PKcs (grün) gut im Nukleus sichtbar. Die Kernmembran wurde mit Lamin A/C (rot) gegengefärbt ($n=3$). Geringe Mengen an DNA-PKcs sind in unmittelbarer Nähe zur Kernmembran sichtbar. Die Bildgebung erfolgte an einem Axiovert 200M Mikroskop von Zeiss im ApoTom-Modus (63fache Vergrößerung).

3.2 Einfluss der DNA-PKcs auf endotheliale Prozesse

3.2.1 Hemmung der DNA-PKcs in Endothelzellen

Um die Rolle der DNA-PKcs in verschiedenen Schritten der Angiogenese zu untersuchen, war es notwendig das Protein soweit wie möglich auszuschalten. Dies geschah entweder durch pharmakologische Hemmung auf Proteinebene oder durch siRNA-Silencing auf mRNA-Ebene.

In den letzten Jahren wurden mehrere neue Inhibitoren der DNA-PKcs beschrieben. Unter diesen wurde für die folgenden Versuche NU7026 gewählt, da seine spezifische EC:50 für DNA-PKcs (260 nM) weit unter der Konzentration liegt, die zur Hemmung der PI3-Kinase (13 μ M) erforderlich ist [93]. Die spezifische Wirkung von NU7026 wurde im Vergleich mit einem PI3-Kinaseinhibitor mittels des „Capillary-like Structures Assay“ (CLS) nachgewiesen (Abb. 3.2.2 A+B+C, HUVEC und HMEC).

Um zu untersuchen, ob eine Minderung der Expression der DNA-PKcs zu Effekten in Endothelzellen führt, wurde DNA-PKcs-mRNA durch validierte siRNA abgebaut. Mit der etablierten Methode der Magnetofektion [90, 91] wurden zunächst HMEC transfiziert. Hierbei wurden unterschiedliche Inkubationszeiten zwischen 6 und 48 Stunden gewählt. Dabei konnte keine signifikante Herunterregulation der DNA-PKcs mit 50 nM siRNA mittels Magnetofektion in HMEC erzielt werden. Deshalb wurde im Weiteren versucht primäre PAEC mit 30 nM siRNA zu transfizieren. Hier zeigte sich, dass es nach 48 h zu einer deutlichen Reduktion der Menge an DNA-PKcs im Vergleich zu Kontroll-siRNA im Western Blot kam ($p < 0.05$, $n=4$, PAEC).

Abb. 3.2.1

A

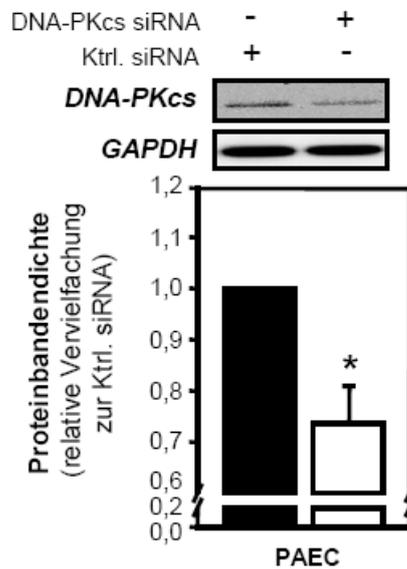


Abb. 3.2.1 Hemmung der DNA-PKcs in Endothelzellen mit NU7026, und siRNA mittels Magnetofektion

(A) Die Expression von DNA-PKcs in PAEC wird durch Transfektion mit siRNA (30 nM, 48 h) signifikant gemindert (* $p < 0.05$, $n = 4$, PAEC). Zellysate wurde im Western Blot aufgetragen und die optische Dichte der Proteinbanden im Vergleich zur Ladungskontrolle (GAPDH) analysiert.

3.2.2 DNA-PKcs hat keinen Einfluss auf die Bildung von kapillarähnlichen Strukturen in vitro

Um zu untersuchen, ob DNA-PKcs einen Einfluss auf Kapillarbildung haben könnte, wurde zunächst die Rolle von DNA-PKcs bei der Bildung von kapillarähnlichen Strukturen in HMEC und HUVEC mittels des „Capillary-like Structures Assay“ (CLS) in wachstumsfaktor-reduziertem Matrigel ermittelt. Zur Hemmung der DNA-PKcs wurde der spezifische Hemmstoff NU7026 verwendet. Da eine Hemmung der verwandten PI3-K bekanntlich die Gefäßstrukturbildung unterbindet [41], wurde als positive Kontrolle der PI3-Kinase-Inhibitor LY294002 benutzt.

Wurde LY294002 in 10 μM in HUVEC eingesetzt, konnte die Bildung von gefäßähnlichen Strukturen signifikant gemindert werden (Abb. 3.2.2 A+C, $p < 0.01$, $n=3$, HUVEC). Der Einsatz von NU7026 in DNA-PKcs-wirksamer Konzentration (0.3 μM) führte im Gegensatz dazu nicht zu einem signifikanten Effekt auf die Formation von gefäßähnlichen Strukturen (Abb. 3.2.2 A+C, ns, $n=5$, HUVEC). Wurde aber die Konzentration von NU7026 auf Bereiche, die auch die PI3-Kinase-Aktivität hemmen (0.3 mM), erhöht, kam es ebenfalls zu einer signifikanten Verminderung der Ausbildung von kapillarähnlichen Strukturen (Abb. 3.2.2 A+C, $p < 0.001$, $n=9$, HUVEC).

Da die Western Blot Analyse von Endothelzellen gezeigt hatte, dass in HMEC die Expression von DNA-PKcs höher zu sein scheint als in HUVEC, wurde das CLS-Assay in HMEC wiederholt, um auszuschließen, dass das Ausbleiben eines signifikanten Effekts der Hemmung der DNA-PKcs-Aktivität auf die Bildung von gefäßähnlichen Strukturen nicht auf die geringere Menge an DNA-PKcs in HUVEC zurückzuführen ist. Auch in HMEC konnte kein Effekt der DNA-PKcs-Inhibition durch NU7026 (0.3 μM) auf die Bildung von gefäßähnlichen Strukturen nachgewiesen werden (Abb. 3.2.2 B+C, ns, $n=7$, HMEC). Wurden allerdings LY294002 oder PI3-Kinase wirksame Konzentrationen von NU7026 (0.3 mM) im CLS-Assay an HMEC angewendet, konnte nachgewiesen werden, dass es zu einer signifikant verminderten Bildung von kapillarähnlichen Strukturen kam (Abb. 3.2.2 B+C, $p < 0.05$, $n=6$, HMEC und $p < 0.001$, $n=6$, HMEC).

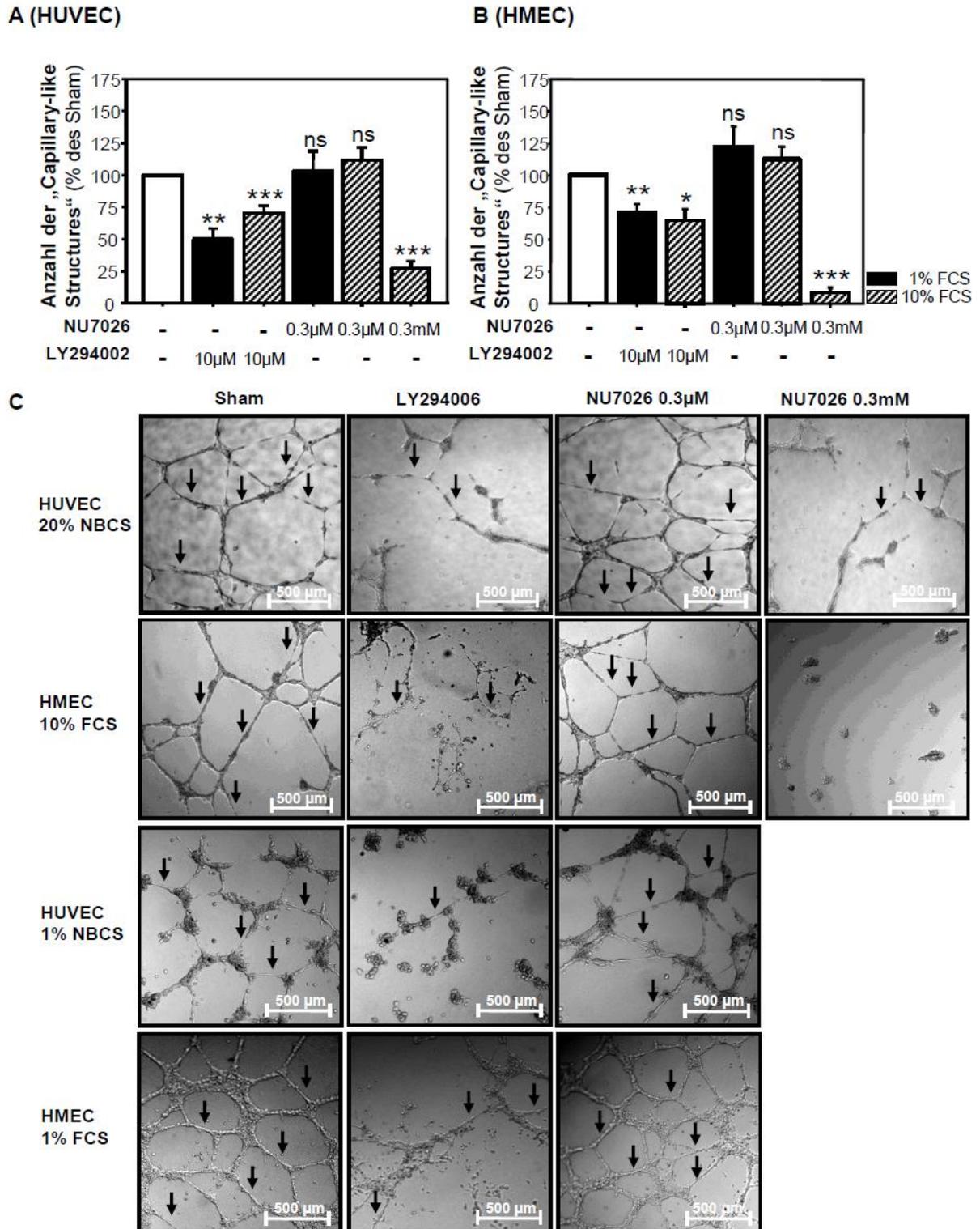
Im Folgenden zeigte sich, dass diese Effekte unabhängig vom Ernährungszustand der HUVEC bzw. HMEC waren. Vergleichsgruppen mit Hungermedium (1% FCS oder 1% NBCS) und normalem Kulturmedium (10 % FCS oder 20 % NBCS mit einem Zusatz von verschiedenen Wachstumsfaktoren) zeigten keinen Unterschied in der Fähigkeit zur Bildung von gefäßähnlichen Strukturen nach pharmakologischer Hemmung der DNA-PKcs (Abb. 3.2.2 A+B+C).

Ergebnisse

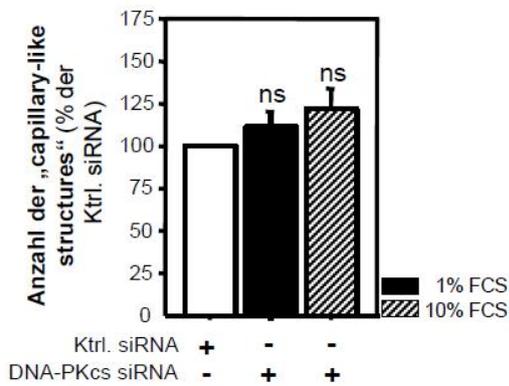
Um die Spezifität der Inhibition von DNA-PKcs weiter zu erhöhen, wurden porcine Endothelzellen der Aorta (PAEC) mit siRNA gegen DNA-PKcs transfiziert. DNA-PKcs-siRNA-Behandlung für 48 h konnte ebenfalls nicht die Bildung von gefäßähnlichen Strukturen vermindern, unabhängig davon, ob PAEC in Hungermedium (n=8) oder normalem Kulturmedium (n=6) gewachsen waren (Abb. 3.2.2 D+E, ns, PAEC).

Sogar eine leichte Steigerung der Gefäßstrukturbildung, wenn gleich nicht signifikant, konnte unter Ausschaltung der DNA-PKcs beobachtet werden.

Abb. 3.2.2



D



E

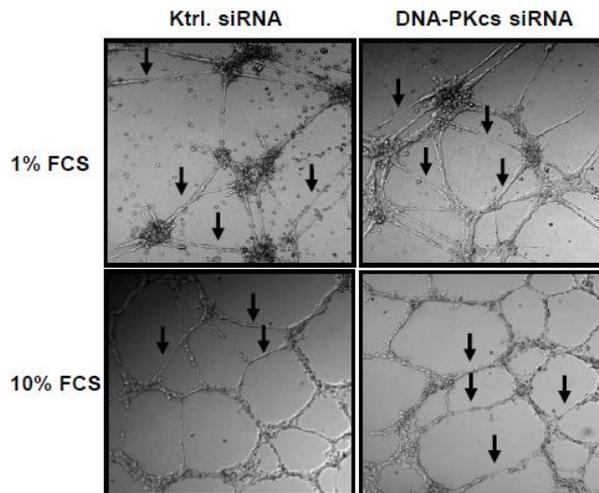


Abb. 3.2.2 DNA-PKcs hat keinen Effekt auf die Bildung von gefäßähnlichen Strukturen

Die Bildung von kapillarähnlichen Strukturen auf wachstumsfaktorreduziertem Matrigel wurde 16 h nach Aussaat der Zellen analysiert. Während dieses Zeitraumes wurden die Zellen entweder in Hungermedium (1 % Serum) oder in normalem Kulturmedium (20 % Serum für HUVEC und 10 % Serum für HMEC) gehalten. Die Analyse erfolgte durch Auszählung der komplett gebildeten gefäßähnlichen Strukturen.

(A) Hemmung der PI3-Kinase mit LY294002 (10 μ M) führt zu einer signifikanten Minderung der gebildeten Strukturen (** $p < 0.01$, $n=3$, HUVEC). Behandlung mit dem spezifischen DNA-PKcs-Inhibitor NU7026 (0.3 μ M) hat keinen Effekt auf die Formation von „Capillary-like Structures“ (ns: nicht signifikant, $n=5$ (1 % Serum) und $n=9$ (20 % Serum), HUVEC). Nur die Erhöhung der Konzentration von NU7026 um das 1000fache (0.3 mM) führt zu einer signifikanten Minderung der Gefäßbildung (** $p < 0.001$, $n=9$, HUVEC).

(B) In HMEC führt ebenfalls nur die Hemmung mit LY294002 (10 μ M) oder der 1000fachen Konzentration an NU7026 (0.3 mM) zu einer signifikanten Minderung an kapillarähnlichen Strukturen (** $p < 0.01$, $n=8$ (1 % Serum) und * $p < 0.05$, $n=6$ (10 % Serum) und *** $p < 0.001$,

Ergebnisse

n=3 (10 % Serum), HMEC). Bei einer Inhibition der DNA-PKcs mit NU7026 (0.3 μ M) blieb ein Effekt aus (ns: nicht signifikant, n=6 (1 % Serum) und n=7 (10 % Serum), HMEC).

(C) Aufnahmen des CLS-Assays in HUVEC und HMEC mit für den Versuch beispielhaften Darstellungen (schwarze Pfeile: Capillary-like Structures). Von links nach rechts: Kontrolle (DMSO v/v), LY294002 (10 μ M), NU7026 (0.3 μ M) und NU7026 (0.3 mM).

(D) Inhibition der DNA-PKcs mittels siRNA-Transfektion im Vergleich zu Kontroll-siRNA beeinflusst die Fähigkeiten zur Bildung von gefäßähnlichen Strukturen in PAEC nicht (ns: nicht signifikant, n=8 (1 % Serum), PAEC).

(E) Auswahl von repräsentativen Photos des CLS-Assays in PAEC nach Transfektion mit DNA-PKcs-siRNA und Kontroll-siRNA (schwarze Pfeile: Capillary-like Structures). Von links nach rechts: Kontroll-siRNA (30 nM, 48 h) und DNA-PKcs-siRNA (30 nM, 48 h).

3.2.3 DNA-PKcs-Inhibition/Suppression steigert die basale Proliferationsrate in Endothelzellen

Da kein Effekt von DNA-PKcs-Hemmung auf die Bildung von kapillarähnlichen Strukturen beobachtet werden konnte und dieser Prozess eher durch Migration und Differenzierung der Endothelzellen (EZ) charakterisiert ist, wurde als nächstes der Einfluss der DNA-PKcs auf die Proliferation von EZ untersucht. Hierzu wurde die Fähigkeit zur Reduktion von MTT in HMEC nach 48 h Behandlung ermittelt. Die Werte wurden in Relation zur Kontrollgruppe nach 24 h gesetzt. Wurden HMEC nur in 1 % Hungermedium gehalten, kam es zu keiner Steigerung der Proliferation im beobachteten Zeitraum. Dagegen führte die Inhibition von DNA-PKcs mit NU7026 (0.3 μ M) innerhalb von 48 h zu einer signifikanten Zunahme der Proliferation um das 1.6fache (± 0.2 , Abb. 3.2.3 A, $p < 0.01$, $n = 27$, HMEC) wenn mit der Kontrollgruppe verglichen. Um den beobachteten Effekt der DNA-PKcs-Inhibition auf die Proliferationsrate von Endothelzellen zu bestätigen, wurden die Versuche mit DNA-PKcs-siRNA transfizierten PAEC (30 nM) wiederholt. Auf Grund der optimalen Transfektionseffizienz nach 48 h wurde das MTT-Assay auf die Proliferation der Zellen hin ebenfalls nach 48 h ausgewertet. Auch in diesen Versuchen führte die Herunterregulierung von DNA-PKcs zu einer Steigerung der Proliferation um das 2.8fache (± 0.5 , Abb. 3.2.3 B, $p < 0.05$, $n = 12$, PAEC) im Vergleich zur Kontrolle.

Abb. 3.2.3

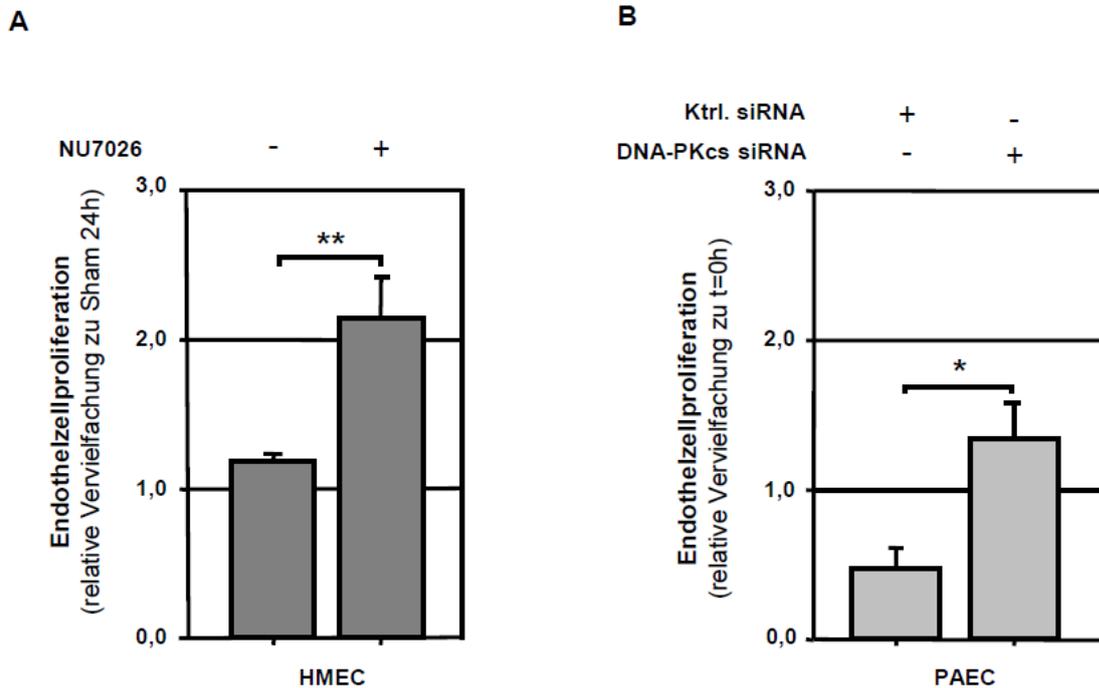


Abb. 3.2.3 Hemmung von DNA-PKcs steigert die basale Proliferationsrate in Endothelzellen

Proliferationsraten von Endothelzellen wurden in einem MTT-Assay nach 48 h mittels der Reduktion von MTT gemessen. Die Zellen wurden auf kollagenbeschichteten (10 µg/ml) Schalen ausgesät.

(A) Hemmung von DNA-PKcs in HMEC mit NU7026 (0.3 µM) induziert im Vergleich zu Kontrollzellen, die in 1 % Serum gehalten werden, signifikant höhere Proliferationsraten (** $p < 0.01$, $n = 27$, HMEC).

(B) siRNA-Knockdown (30 nM, 48 h) von DNA-PKcs in PAEC zeigt ebenfalls eine signifikant erhöhte Proliferationsrate im Vergleich zu mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen (* $p < 0.05$, $n = 12$, PAEC).

3.2.4 DNA-PKcs-Inhibition steigert die wachstumsfaktorabhängige Proliferation in Endothelzellen

Nachdem Effekte von DNA-PKcs auf die basale Proliferationsrate von Endothelzellen in Hungermedium (1 % Serum) mittels des MTT-Reduktions-Assays gezeigt werden konnten, sollte untersucht werden, inwieweit die Hemmung von DNA-PKcs Einfluss auf die wachstumsfaktorabhängige Proliferation nehmen kann. Zunächst wurden hierfür HMEC in Kulturmedium mit 10 % Serum und einem 10-prozentigen Zusatz eines endothelialen Wachstumsmediums mit einer Mischung verschiedener Wachstumsfaktoren (PromoCell) beobachtet. Nach 48 h zeigte sich in dieser Gruppe eine signifikante Steigerung der Wachstumsrate (Abb. 3.2.4 A, $p < 0.001$, $n = 24$, HMEC) im Vergleich zur Kontrollgruppe (1 % Serum). Wurden Zellen unter diesen Bedingungen zusätzlich mit dem DNA-PK-Inhibitor NU7026 ($0.3 \mu\text{M}$) behandelt, dann kam es zu einer Steigerung der Proliferationsrate um das 2fache (± 0.13 , Abb. 3.2.4 A, $p < 0.001$, $n = 24$, HMEC) im Vergleich zur Kontrolle mit Wachstumsmedium (10 % Serum und Supplement).

Weiter sollte geklärt werden, welcher spezifische Wachstumsfaktor des Supplements für diesen Effekt eine entscheidende Rolle spielt. Hierfür wurden VEGF als endothelspezifischer und FGF-2 als universeller Wachstumsfaktor zur weiteren Untersuchung ausgewählt. Der Apoptoseinduktor $\text{TNF}\alpha$ diene als Negativkontrolle.

Behandelte man HMEC im gleichen Ansatz wie oben mit einem anti-FGF-2-Antikörper ($5 \mu\text{g/ml}$), blieb die Steigerung der Proliferationsrate aus (Abb. 3.2.4 A, $p < 0.01$, $n = 12$, HMEC). Um auszuschließen, dass dieser Effekt nicht spezifisch für den FGF-2-Antikörper ist, wurde ein Versuch mit einem Kontroll-Antikörper unternommen und es zeigte sich kein Einfluss des Antikörpers auf die Proliferation von HMEC in Wachstumsmedium. Diese Versuche veranlassten uns in einem weiteren Schritt gezielt die Wirkung von FGF-2 in Abhängigkeit von DNA-PKcs auf die Proliferation von Endothelzellen zu untersuchen.

In den nächsten Versuchen wurden deshalb HMEC mit FGF-2 (10 ng/ml) über einen Zeitraum von 48 h stimuliert und mit dem MTT-Reduktions-Assay ausgewertet. Stimulation mit FGF-2 führte im Vergleich mit der nicht stimulierten Kontrollgruppe zu einer signifikanten Steigerung der Proliferation in HMEC ($p < 0.001$, $n = 32$, HMEC). Wurde gleichzeitig mit der FGF-2-Stimulation auch die DNA-PKcs-Funktion durch NU7026 ($0.3 \mu\text{M}$) inhibiert, stieg die Proliferation noch deutlicher, nämlich um das 1.6fache (± 0.17 , Abb. 3.2.4 A, $p < 0.001$, $n = 27$, HMEC). Da FGF-2 in der Endothelzelle proliferative Signale unter anderem über PI3-K und Akt weitergibt [94], wurde ein Versuch mit einem Akt-Inhibitor ($10 \mu\text{M}$) angeschlossen. Dieser sollte zeigen inwieweit die DNA-PKcs-Aktivität mit der Aktivität von Akt verknüpft ist.

Ergebnisse

Hemmung von Akt bei simultaner Stimulation mit FGF-2 und Inhibition von DNA-PKcs führte dazu, dass der steigernde Effekt auf die Proliferationsrate von HMEC im Vergleich zur Kontrollgruppe (DMSO v/v) ausblieb ($p < 0.001$, $n = 18$, HMEC).

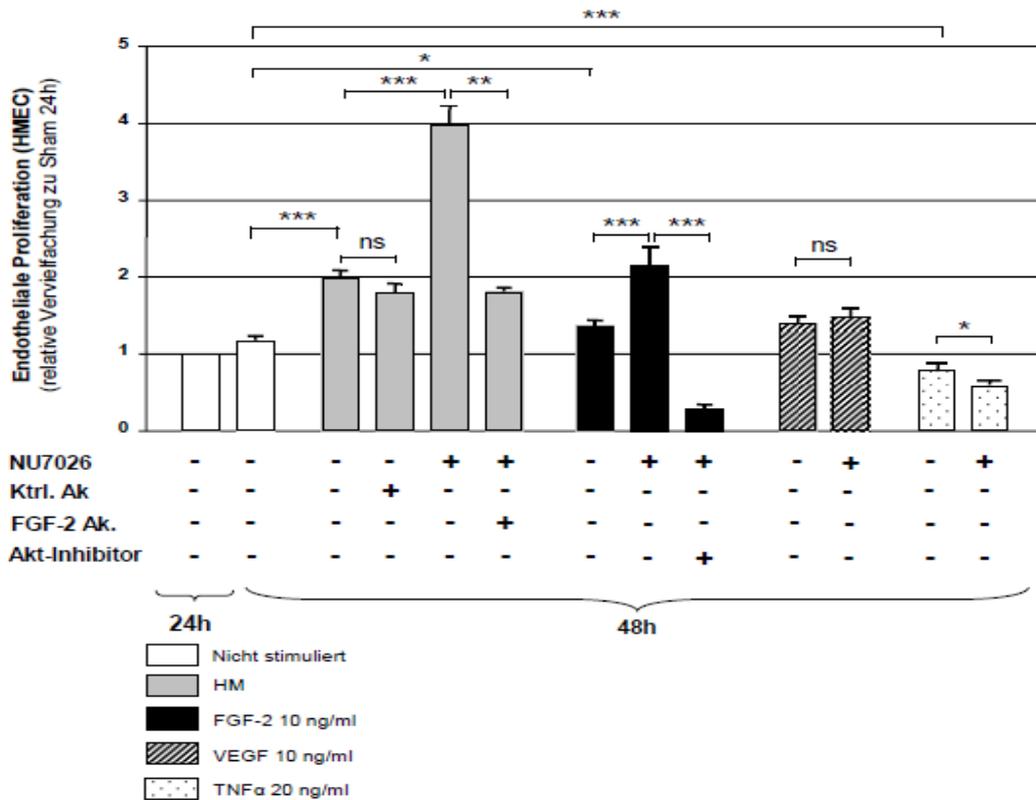
Als nächstes wurde die Wirkung des bedeutendsten endothelialen Wachstumsfaktors VEGF im Zusammenhang mit DNA-PKcs auf die Proliferation von Endothelzellen untersucht. Stimulation von HMEC mit VEGF-A (10 ng/ml) in Kombination mit NU7026 hatte überraschenderweise keinerlei Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Endothelzellen (ns, $n = 18$, HMEC).

HMEC wurden im Weiteren nach Stimulation mit TNF α (20 ng/ml) und Inhibition mit NU7026 (0.3 μ M) im MTT-Reduktions-Assay untersucht. TNF α -Stimulation führte in der angewendeten Konzentration im Vergleich mit der Kontrollgruppe zum Absterben der Zellen im beobachteten Zeitraum ($p < 0.001$, $n = 28$, HMEC). Gleichzeitige Inhibition von DNA-PKcs und Stimulation mit TNF α führte sogar zu einem vermehrten Sterben der Zellen ($p < 0.05$, $n = 28$, HMEC).

Da die Versuche mit FGF-2 die eindrucklichsten Ergebnisse in Kombination mit der Inhibition von DNA-PKcs durch den Inhibitor NU7026 gezeigt hatten, sollten die proliferativen Effekte in Versuchen mit transfizierten Zellen reproduziert werden. Hierzu wurden wie im vorhergegangenen CLS-Assay wegen ihrer besseren Transfizierbarkeit PAEC gewählt. Suppression von DNA-PKcs mit siRNA (30 nM) führte nach 48 h Stimulation mit FGF-2 zu einer Erhöhung der Wachstumsrate um das 2.9fache im Vergleich zu kontrolltransfizierten Zellen (± 0.52 , Abb. 3.2.4 B, $p < 0.001$, $n = 12$, PAEC).

Abb. 3.2.4

A



B

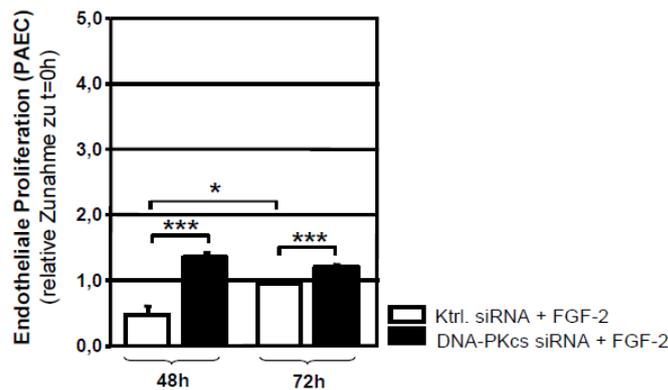


Abb. 3.2.4 DNA-PKcs-Inhibition steigert die wachstumsfaktorabhängige Proliferation in Endothelzellen

(A) Im Vergleich mit in Hungermedium (1 % Serum) gehaltenen HMEC führt die Behandlung mit um Wachstumsfaktoren angereichertem HMEC-Medium (10 % Serum) zu einer höheren Proliferationsrate nach 48 h (***) $p < 0.001$, $n = 24$, HMEC, weiß: nicht stimuliert und grau: HMEC-Medium). Wenn HMEC-Zellen in HMEC-Medium mit NU7026 (0.3 μM) für 48 h behandelt werden, dann kommt es nach Analyse im MTT-Reduktions-Assay zu einer eindeutigen Steigerung der Proliferationsrate im Vergleich zu einer Kontrolle von Zellen in HMEC-

Ergebnisse

*Medium allein (** $p < 0.001$, $n=24$, HMEC, grau: HMEC-Medium). Dieser Effekt kann durch die Zugabe eines anti-FGF-2-Antikörpers (5 $\mu\text{g/ml}$, 1 h Präinkubation) komplett rückgängig gemacht werden (** $p < 0.01$, $n=12$, HMEC). Wird statt des FGF-2-Antikörpers ein Kontroll-Antikörper eingesetzt, dann beeinflusst dieser nicht das Wachstumsverhalten der HMEC.*

*Nur mit FGF-2 (10 ng/ml) stimulierte HMEC zeigen nach 48 h im Vergleich zu Kontrollzellen eine gering gesteigerte Wachstumsrate ($p < 0.05$, $n=31$, HMEC, schwarz: FGF-2-stimuliert). Wird zu diesem Versuchsansatz NU7026 hinzugegeben, dann steigt die Proliferationsrate deutlich an (** $p < 0.001$, $n=27$, HMEC, schwarz: FGF-2-stimuliert). Bei Zugabe eines Akt-Inhibitors geht der Effekt von FGF-2 und NU7026 verloren (** $p < 0.001$, $n=18$, HMEC).*

Behandlung mit VEGF (10 ng/ml) führt zu einer geringen Stimulation des Wachstumsverhaltens von HMEC, welches auch bei simultaner Inhibition der DNA-PKcs-Aktivität nicht weiter erhöht werden kann (ns, $n=18$, HMEC, gestreift: VEGF-stimuliert).

*Stimulation von HMEC mit TNF α (20 ng/ml) führt in diesem Versuchsansatz zu einem Absterben der Zellen (** $p < 0.001$, $n=28$, HMEC, getupft: TNF α -stimuliert). Wird TNF α mit NU7026 kombiniert, nimmt das Sterben weiter zu ($p < 0.05$, $n=28$, HMEC, getupft: TNF α -stimuliert).*

*(B) Mit anti-DNA-PKcs-siRNA transfizierte PAEC (30 nM) zeigen unter Stimulation mit FGF-2 im Vergleich zu einer mit Kontroll-siRNA transfizierten Gruppe signifikant erhöhte Proliferationsraten im MTT-Reduktions-Assay, sowohl nach 48 h, als auch nach 72 h (** $p < 0.001$, $*p < 0.05$, $n=12$, PAEC).*

3.3 DNA-PK abhängige Signalwege in Endothelzellen

3.3.1 Akt ist im Nukleus von Endothelzellen vorhanden und ändert unter Stimulation mit FGF-2 und Inhibition mit NU7026 nicht seine zelluläre Lokalisation.

Die im Proliferations-Assay sowohl unter basalen Bedingungen, als auch unter Wachstumsfaktoreinfluss (FGF-2) beobachteten Auswirkungen der DNA-PKcs-Inhibition auf das Überleben von Endothelzellen warfen die Frage nach darin involvierten Signalkaskaden auf.

Zu diesem Zweck wurde zunächst Akt mittels einer Zellfraktionierung in HMEC unter basalen Bedingungen untersucht. Akt konnte in Kern, Zytoplasma und Membran im Western Blot sichtbar gemacht werden. Seine Lokalisation konnte allerdings nicht vom FGF-2 beeinflusst werden (Abb. 3.3.1 A, n=3, HMEC).

Mittels Immunfluoreszenzfärbungen auf Akt wurde in HMEC (1 % Serum) die Lokalisation dieses Mitglieds des PI3-K/Akt-Signalwegs überprüft. Akt konnte deutlich im Nukleus, und in schwachen Spuren im Zytoplasma in unstimulierten Zellen nachgewiesen werden. Unter Einfluss von FGF-2 (10 ng/ml, 10 min) konnte Akt ebenfalls im Kern und schwach im Zytoplasma gezeigt werden, so dass festgestellt werden kann, dass FGF-2 in diesen Versuchen keinen starken Einfluss auf die subzelluläre Lokalisation von Akt zu haben scheint (Abb. 3.3.1 B, n=3, HMEC). Auch unter einer Kombination von FGF-2 und NU7026 (10 ng/ml, 10 min und 0.5 μ M, 30 min, n=3, HMEC) veränderte Akt ebenso wenig seine intrazelluläre Verteilung.

Allerdings konnte die Akt-Phosphorylierung an Ser473 und somit Akt-Aktivierung durch FGF-2-Stimulation induziert werden (Abb. 3.3.1 C, $p < 0.05$, n=6, HMEC).

Abb. 3.3.1

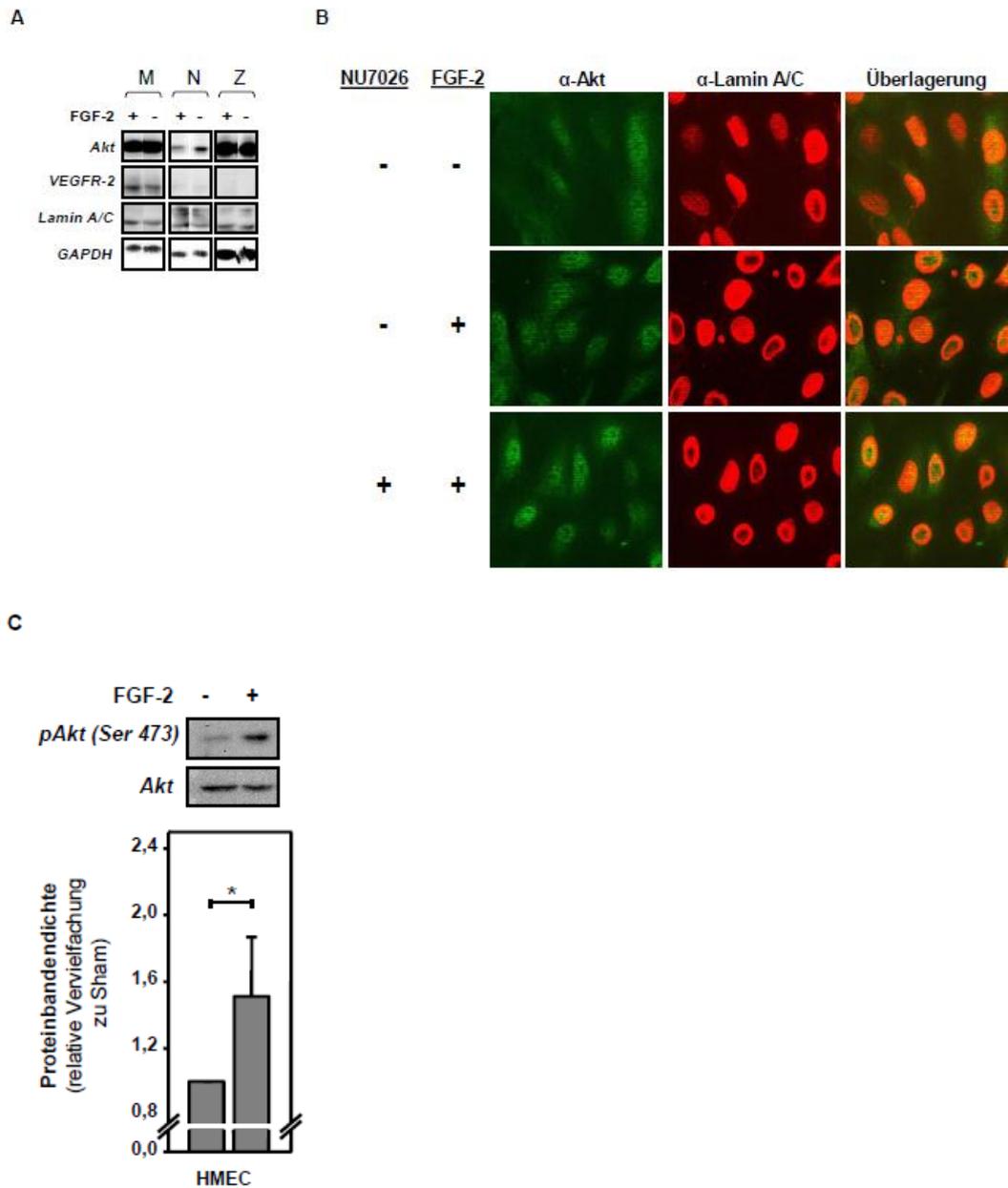


Abb. 3.3.1 Akt ist im Nukleus lokalisiert und verändert seine Lokalisation nicht auf FGF-2 hin.

(A) Fraktionierung von HMEC (1 % Serum) weist Akt in Membran, Nukleus und Zytosol nach. Es besteht kein Einfluss von FGF-2-Stimulation (10 ng/ml, 10 min) auf die Lokalisation von Akt ($n=3$, HMEC). Alle Banden entstammen demselben Blot.

(B) In HMEC (1 % Serum) kann Akt wie DNA-PKcs hauptsächlich im Nukleus mit schwachen Spuren im Zytoplasma mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Stimulation mit einem Wachstumsfaktor wie FGF-2 (10 ng/ml, 10 min, $n=3$, HMEC) hat keinen Einfluss auf die intrazelluläre Lokalisation. Simultane Inhibition von DNA-PKcs mittels NU7026 (500 nM, 30 min, $n=3$, HMEC) hat keinen weiteren Einfluss auf die Lokalisation von Akt in Endothelzellen.

(C) Akt-Phosphorylierung an Ser473 in HMEC kann durch Stimulation mit FGF-2 (10 ng/ml, 10 min) eindeutig induziert werden ($*p<0.05$, $n=6$, HMEC). Totales Akt-Protein wurde zur Normierung der Ergebnisse benutzt.

3.3.2 DNA-PKcs-Inhibition führt zu erhöhter Phosphorylierung von Akt und ERK in Endothelzellen.

Da in den Versuchen zur wachstumsfaktorabhängigen Proliferation im MTT-Reduktions-Assay gezeigt werden konnte, dass unter Stimulation mit FGF-2 die pharmakologische Hemmung von Akt zu einer Aufhebung des proliferativen Effekts der DNA-PKcs-Inhibition führt, wurde im Folgenden die Wirkung von NU7026 und FGF-2 auf die Phosphorylierung von Akt als einem zentralen Signalmolekül in der wachstumsfaktorabhängigen Angiogenese untersucht.

HMEC wurden mit dem DNA-PKcs-Inhibitor NU7026 (0.5 μ M) für 24 h inkubiert und PAEC für 48 h mit siRNA gegen DNA-PKcs (30 nM) behandelt. In beiden Versuchsansätzen konnte eine signifikante Steigerung der Phosphorylierung von Akt an Ser473 im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollgruppen beobachtet werden. Die Analyse erfolgte mittels eines spezifischen Antikörpers gegen Ser473 des Akt-Proteins im Western Blot (Abb. 3.3.2 A, $p < 0.05$, $n=6$, HMEC und $n=9$, PAEC). Die Phosphorylierung von Akt an Ser473 darf in diesem Zusammenhang als Zeichen erhöhter Aktivität gewertet werden.

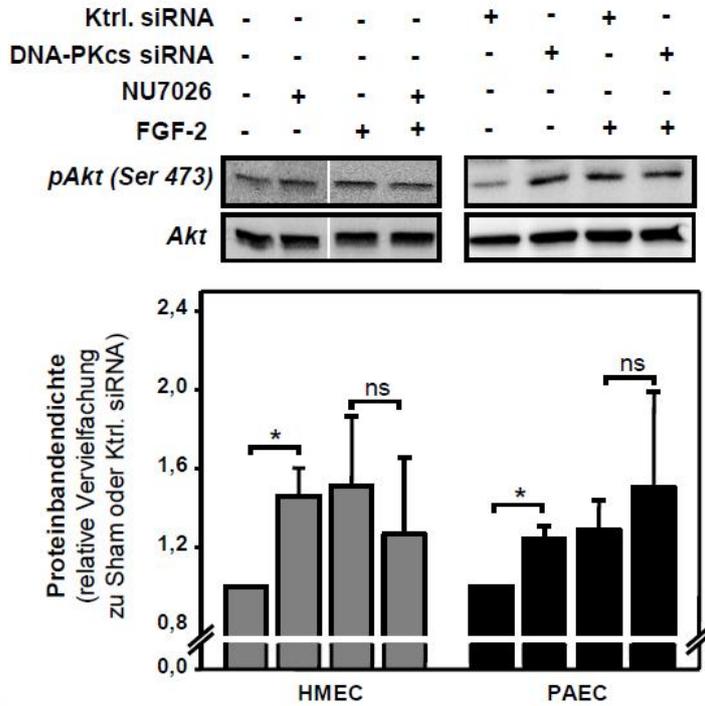
Stimulation von HMEC und PAEC mit FGF-2 (10 ng/ml, 10 min) wies in der Analyse mit pAkt-Antikörper (Ser473) im Western Blot ebenfalls erhöhte Werte des phosphorylierten Akt-Proteins auf. Bei gleichzeitiger Hemmung der DNA-PKcs mittels NU7026 in HMEC (Abb. 3.3.2 A, $n=3$, HMEC) und mittels siRNA in PAEC (Abb. 3.3.2 A, $n=4$, PAEC) kam es nach FGF-2-Stimulation jedoch nicht zu einer weiteren Erhöhung der Akt-Aktivität im Vergleich zu alleiniger Stimulation mit FGF-2.

In einem weiteren Schritt wurde in HMEC nach Inkubation mit NU7026 (0.5 μ M, 1 h) pERK als Mitglied des Raf-MEK-ERK-Signalweges untersucht. Im Vergleich zu unbehandelten Kontrollgruppen zeigten Zellen mit eingeschränkter DNA-PKcs-Aktivität eine signifikant höhere Phosphorylierung von ERK im Western Blot. ERK wurde zur Normierung verwendet (Abb. 3.3.2 B, $p < 0.05$, $n=4$, HMEC).

Wurden HMEC mit FGF-2 stimuliert (10 ng/ml, 10 min) zeigte sich analog eine erhöhte Phosphorylierung von ERK. Synergistische Effekte konnten bei gleichzeitiger Gabe von NU7026 nicht beobachtet werden (ns, $n=4$, HMEC).

Abb. 3.3.2

A



B

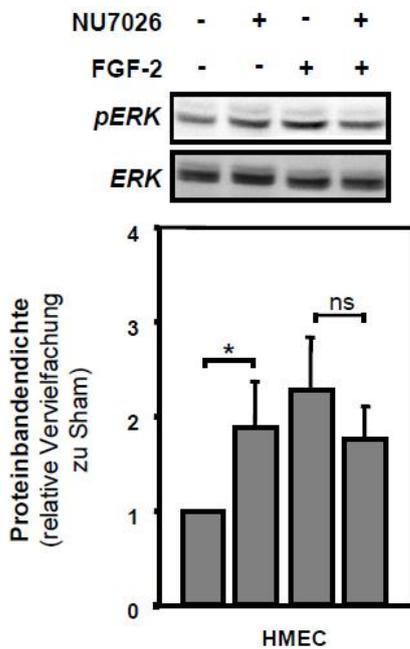


Abb. 3.3.2 DNA-PKcs-Inhibition erhöht die basale Aktivität von Akt und ERK

(A) HMEC wurden mit NU7026 (0.5 μ M, 24 h) und PAEC mit DNA-PKcs-siRNA (30 nM, 48 h) in Hungermedium (1 % Serum) behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und mittels eines pAkt-Antikörpers (Ser473) im Western Blot analysiert. Die basale Phosphorylierung von Akt an Ser473 steigt unter diesen Bedingungen im Vergleich mit den zugehörigen Kontrollgruppen (DMSO v/v und Kontroll-siRNA) signifikant an (* p <0.05, n =6, grau: HMEC

Ergebnisse

und $n=9$, schwarz: PAEC). Die Abbildungen für die Akt-Phosphorylierung in HMEC entstammen aus einem Blot. Um die gleichmäßige Ladung mit Proteinmenge zu bestätigen wurden die jeweiligen Werte in Beziehung zur Gesamtmenge an Akt gesetzt. Behandlung mit FGF-2 führt ebenfalls zu einer Erhöhung der Akt-Aktivität. Kombination von Inhibition/Suppression von DNA-PKcs und Stimulation mit FGF-2 zeigt allerdings keinen synergistischen Effekt in Bezug auf die Phosphorylierung von Akt an Ser473.

(B) In HMEC wurde auch die Phosphorylierung von ERK unter Hemmung mit NU7026 (0.5 μM , 1 h) untersucht. Hemmung der DNA-PKcs führt unter basalen Bedingungen (1 % Serum) zu signifikant erhöhten Mengen an pERK ($*p<0.05$, $n=4$, HMEC). Die Menge an pERK wurde in Beziehung zu totalem ERK-Protein gesetzt. FGF-2-Stimulation führt auch zur Erhöhung von pERK (10 ng/ml, 10 min). Kombination von Wachstumsfaktorstimulus und DNA-PKcs-Inhibition kann diesen Effekt nicht verstärken (ns, $n=4$, HMEC).

3.4 Einfluss von Wachstumsfaktoren und Zytokinen auf die Expression der DNA-PK

3.4.1 FGF-2 erhöht die Expression von DNA-PKcs in Endothelzellen, ändert aber nicht die intrazelluläre Lokalisation

Die Effekte der Hemmung bzw. Ausschaltung von DNA-PKcs in Kombination mit FGF-2-Stimulation in Bezug auf die Proliferationsrate von Endothelzellen warfen die Frage auf, ob ein regulatorischer Zusammenhang zwischen FGF-2 und DNA-PKcs besteht. In dieser Hinsicht sollte geklärt werden, ob FGF-2 die subzelluläre Lokalisation von DNA-PKcs beeinflussen kann z.B. indem DNA-PKcs aus dem Zellkern an die Zellmembran transloziert, und inwieweit FGF-2 z.B. über die Expression von DNA-PKcs auf deren antiproliferative Wirkung Einfluss nehmen kann.

Hierzu wurden HMEC für unterschiedliche Zeiträume mit FGF-2 (10 ng/ml) behandelt und anschließend im Western Blot auf die Expression und Lokalisation von DNA-PKcs hin analysiert. HMEC wurden mittels des Proteo Extract Kit anhand des vorgeschriebenen Protokolls fraktioniert und mit entsprechenden fraktionsspezifischen Antikörpern ausgewertet. Es zeigte sich wie auch in den ersten Versuchen zur Lokalisation von DNA-PKcs (Abb. 3.1 B), dass DNA-PKcs am stärksten im Kern vorhanden ist. Hierfür diente ein Antikörper gegen Lamin A/C als Kontrolle. In der Membranfraktion ließen sich geringe Spuren von DNA-PKcs nachweisen. Die Membranfraktion wurde durch einen Antikörper gegen VEGF-Rezeptor-2 bestätigt. Jedoch konnte nach Stimulation mit FGF-2 keine Veränderung in der subzellulären Verteilung von DNA-PKcs beobachtet werden (Abb. 3.4.1 A, n=3, HMEC).

Um die Lokalisation von DNA-PKcs weiter zu untersuchen, wurden HMEC mit FGF-2 stimuliert (10 min und 30 min) und immunhistochemisch am Mikroskop im ApoTom-Modus untersucht. In den Zellkernen war auch mit dieser Methode unabhängig von der Stimulation mit FGF-2 eine deutliche Darstellung von DNA-PKcs zu beobachten (Abb. 3.4.1 B und C, n=3, HMEC, rot: DNA-PKcs und blau: DAPI). In der perinukleären Region einzelner Zellen konnten geringe Menge von DNA-PKcs nachgewiesen werden, die ebenfalls nicht durch die Stimulation mit FGF-2 beeinflusst wurde. Zwischen den beiden Stimulationszeiten zeigte sich im Verteilungsmuster der DNA-PKcs kein Unterschied.

In einem weiteren Schritt wurde die langfristige Wirkung einer Stimulation mit FGF-2 (10 ng/ml, 24 bis 48 h) auf DNA-PKcs Expression in HMEC untersucht. Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume mit FGF-2 in Hungermedium (1 % Serum) inkubiert, anschließend lysiert und die Proteinmenge an DNA-PKcs im Western Blot bestimmt. Bereits nach einer

Ergebnisse

Stimulation über 24 h hinweg konnte eine erhöhte Menge an DNA-PKcs nachgewiesen werden. Nach 48 h Inkubation mit FGF-2 zeigte sich eine signifikant gesteigerte Menge an DNA-PKcs (Abb. 3.4.1 C, $p < 0.05$, $n=7$, HMEC). Ein Antikörper gegen GAPDH diente zur Normierung der Werte.

Um den Effekt von FGF-2 auf die Expression von DNA-PKcs in Endothelzellen zu bestätigen, sollten die Ergebnisse des Western Blots auf mRNA-Ebene wiederholt werden. Aus HMEC wurde die Gesamt-RNA extrahiert und mittels RT-PCR weiter ausgewertet. Die Analyse der mRNA-Menge von DNA-PKcs auf Agarose-Gel zeigte nach 24 h und 48 h Stimulation mit FGF-2 eine Erhöhung, ähnlich zu den Ergebnissen aus dem Western Blot. Zur Normierung wurde die Menge an β -Aktin verwendet (Abb. 3.4.1 D, $n=4$, HMEC).

Abb. 3.4.1

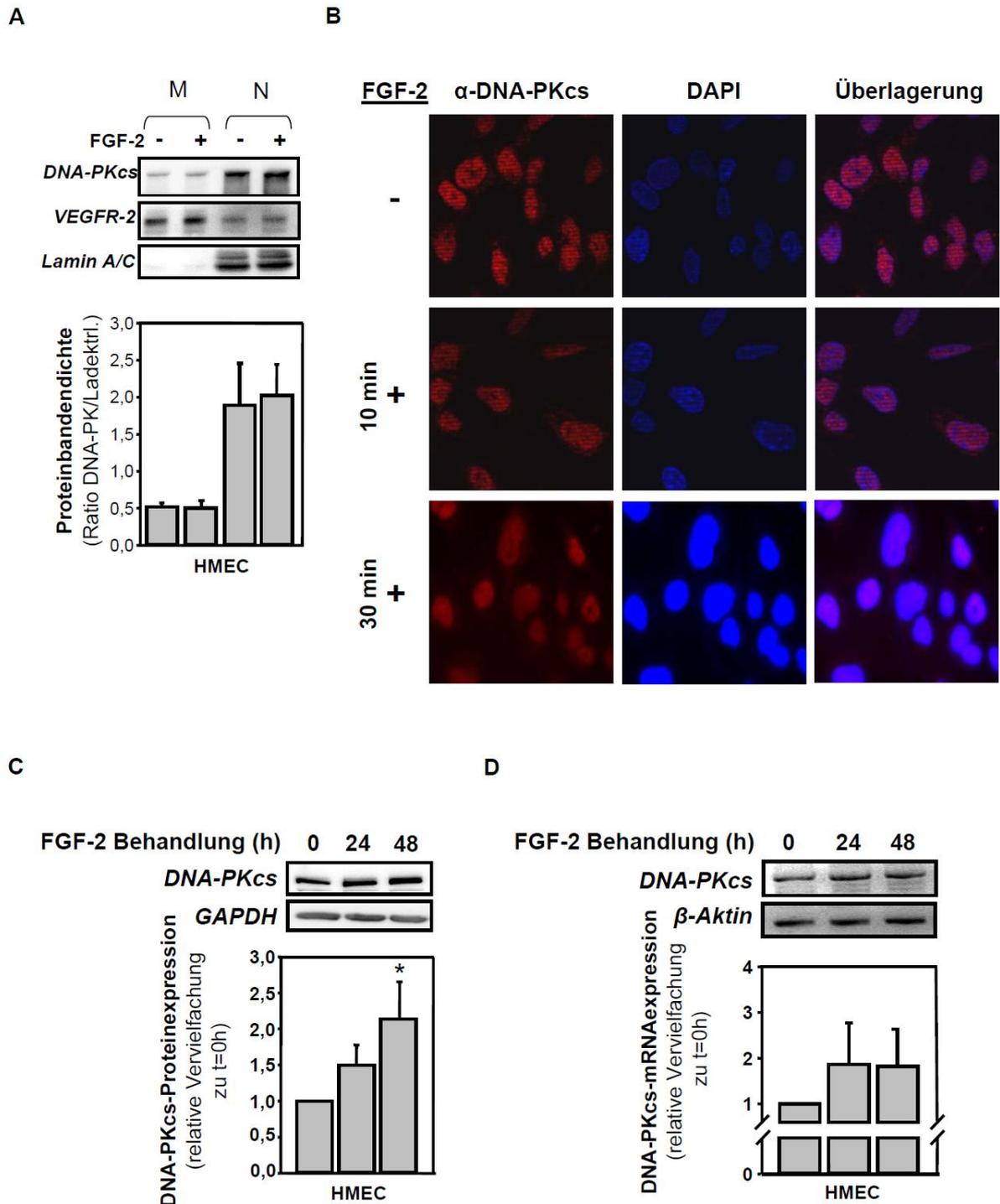


Abb. 3.4.1 FGF-2 erhöht die Expression von DNA-PKcs in Endothelzellen

(A) Western Blot Analyse zur Aufklärung der zellulären Lokalisation von DNA-PKcs unter Einfluss von FGF-2 (10 ng/ml, 10 min) zeigt nach protokollgerechter Fraktionierung keine Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe (n=3, HMEC). DNA-PKcs ist in beiden Gruppen primär im Zellkern lokalisiert und nur in geringen Mengen in der Membran. Die Fraktionen wurden durch kompartmentspezifische Antikörper bestätigt (M=Membran, VEGF-Rezeptor-2-Antikörper und Kernfraktion=N, Lamin A/C-Antikörper). Beide Antikörper wur-

Ergebnisse

den ebenfalls genutzt um eine gleichmäßige Ladung im Vergleich mit der DNA-PKcs-Menge zu bestätigen.

(B) Immunhistochemische Färbungen von HMEC wurden an einem Axiovert 200M Mikroskop der Firma Zeiss in 63facher Vergrößerung im ApoTom-Modus analysiert. DNA-PKcs (rot) ist primär nukleär und gering perinukleär lokalisiert (DAPI: blau, Zellkern). Stimulation mit FGF-2 (10 ng/ml, 10 min, n=3, HMEC) verändert diese Lokalisation nicht.

(C) In HMEC steigt nach Stimulation mit FGF-2 (10 ng/ml) in 1 % Serum die Menge an DNA-PKcs nach 24 h an und erreicht nach 48 h Signifikanz (* $p < 0.05$ vs. 0 h, n=7, HMEC). Färbungen mit GAPDH-Antikörpern dienten zum Nachweis der gleichmäßigen Beladung.

(D) Die Transkription von mRNA für DNA-PKcs ist nach Stimulation mit FGF-2 (10 ng/ml) in HMEC leicht erhöht (n=4, HMEC). Zellen wurden für 24 h und 48 h stimuliert, Gesamt-RNA wurde extrahiert und anschließend eine RT-PCR durchgeführt. Zur Kontrolle der Beladung wurde β -Aktin verwendet.

3.4.2 TNF α -Stimulation erhöht die Expression von DNA-PKcs, aber verändert nicht die zelluläre Lokalisation

TNF α hatte im Proliferations-Assay eine negative Wirkung auf das Überleben von Endothelzellen, die sich in Kombination mit NU7026 verstärkte. Um dies auf DNA-PKcs-Expressionsebene weiter zu untersuchen, wurden HMEC-Zellen nach Behandlung mit dem Zytokin fraktioniert und im Western Blot die intrazelluläre Verteilung von DNA-PKcs analysiert. Hier zeigte sich kein Unterschied in der zellulären Lokalisation unter Einfluss von TNF α (5 ng/ml, 30 min) im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (Abb. 3.4.2 A, n=3, HMEC).

TNF α -Stimulation wurde ebenfalls in seiner Wirkung auf die subzelluläre Lokalisation von DNA-PKcs mittels Immunfluoreszenz untersucht. Hierfür wurden HMEC mit TNF α (20 ng/ml) für 10 bzw. 30 min inkubiert. Unabhängig von der gewählten Inkubationsdauer zeigte sich keine Veränderung der Lokalisation von DNA-PKcs auf diesen Stimulus hin (Abb. 3.4.2 B, n=4, HMEC). DNA-PKcs (DNA-PKcs: grün) war primär im Zellkern zu detektieren. Lamin A/C (Lamin A/C: rot) wurde zur Darstellungen des Zellkerns verwendet.

HMEC wurden ebenfalls für einen Zeitraum von 0 bis 48 h mit TNF α (20 ng/ml) in Hungermedium (1 % Serum) stimuliert und im Western Blot auf die Expression von DNA-PKcs hin ausgewertet. Im Vergleich zu Ladekontrollen (GAPDH) konnte nach 48 h eine signifikant erhöhte Menge an DNA-PKcs festgestellt werden (Abb. 3.4.2 C, p<0.05, n=4, HMEC).

Abb. 3.4.2

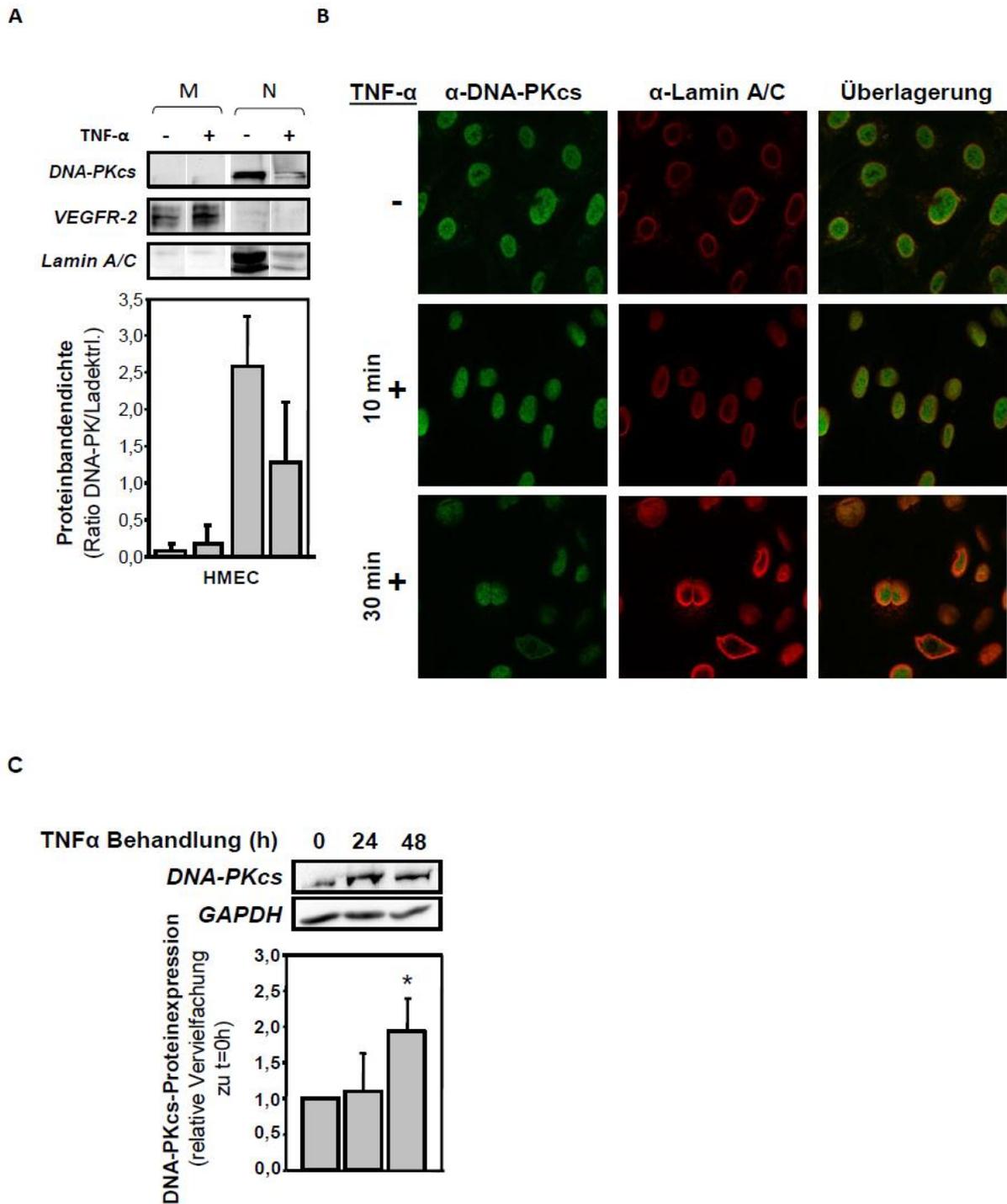


Abb. 3.4.2 TNF α erhöht die Expression von DNA-PKcs in Endothelzellen

(A) Mit TNF α stimulierte HMEC-Zellen (5 ng/ml, 30 min) zeigen in Western Blots mit fraktionierten Zelllysaten keine Veränderung der intrazellulären Lokalisation von DNA-PKcs im Vergleich zu unstimulierten Kontrollen. DNA-PKcs liegt in stimulierten und Kontrollzellen primär im Zellkern vor ($n=3$, HMEC). Minimale Spuren sind in der Membranfraktion zu er-

Ergebnisse

kennen. Zur Bestätigung der Fraktionen wurden VEGFR-2 für die Membran und Lamin A/C für den Nukleus gewählt. Gleichzeitig konnten diese Antikörper für die Kontrolle der Beladung verwendet werden. Alle Ausschnitte entstammen aus einem Blot.

(B) TNF α zeigt in Immunfluoreszenzanalysen von HMEC keine Veränderung der DNA-PKcs-Lokalisation. DNA-PKcs ist im Nukleus lokalisiert (DNA-PKcs: grün). Zur Kontrolle diente Lamin A/C als Marker des Zellkerns (Lamin A/C: rot). Die Lokalisation ist unabhängig von der Expositionsdauer des Zytokins (20 ng/ml, 10 und 30 min, n=4, HMEC)

*(C) DNA-PKcs-Expression steigt nach TNF α -Stimulation (20 ng/ml, 48 h, *p<0.05, n=4, HMEC) signifikant an.*

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die Rolle der DNA-PK in Endothelzellen untersucht. Es wurden unterschiedliche Teilprozesse der Angiogenese wie Migration, Differenzierung und Proliferation im Hinblick auf DNA-PK untersucht. Die PI3-Kinase erfüllt in der Proliferation von Endothelzellen, wie sie für eine funktionierende Angiogenese notwendig ist, eine Schlüsselrolle [6, 12, 42]. DNA-PK teilt einige wichtige strukturelle Komponenten mit der klassischen PI3-K z.B. die katalytische Einheit [72]. DNA-PK kann in HEK293-Zellen Akt phosphorylieren [75]. So lag zu Beginn dieser Arbeit die Frage nahe, ob DNA-PK über Akt oder andere Enzyme in endotheliale Signaltransduktionsprozesse verwickelt ist und ob DNA-PKs eine ähnliche Funktion wie PI3-K für endothelabhängige Prozesse einnimmt.

4.1 DNA-PK in Endothelzellen

4.1.1 Spezifische Untersuchung durch gezielte Hemmung oder „Silencing“

Die meisten Studien zu DNA-PK wurden bis zu Beginn dieser Arbeit an Zelllinien aus verschiedenen Tumoren ausgeführt, die bereits vorbestehende Mutationen im Gen der DNA-PK beherbergen wie z.B. die humane Gliomzelllinie M059J [86, 95]. Eine weitere natürlich vorkommende Zelllinie mit Defekten in der Aktivität von DNA-PK entstammt aus SCID-Mäusen [96]. Andere Modelle beinhalteten Zellen, in denen DNA-PK durch gezielte Ausschaltung des Gens auf DNA-/RNA-Ebene oder über pharmakologische Mediatoren gehemmt wurde. Ein großes Problem, welches bei Verwendung der oben genannten „natürlichen“ mutierten Zelllinien auftritt, ist, dass häufig neben der DNA-PK-Mutation noch weitere Mutationen vorliegen. So gestaltet es sich schwierig den Wert der DNA-PK-Fehlfunktion auf das Verhalten der Zellen und Gewebe zu beurteilen, da nicht ausgeschlossen werden kann, ob die weiteren Mutation nicht ebenfalls z.B. Einfluss auf das Zellwachstum nehmen [97-99]. Die Ergebnisse aus der vorliegenden Doktorarbeit wurden neben der Verwendung der Zelllinie HMEC-1 zum Großteil an primären humanen und porcinen Endothelzellen erhoben. Dies hat den Vorteil, dass die oben beschriebene Problematik der multiplen Mutationen entfällt. Allerdings erfordert sie eine „exogene“ Hemmung der DNA-PK, die in diesem Fall zum einen durch den relativ neuen und spezifischen pharmakologischen Inhibitor NU7026 und zum anderen über Herunterregulierung der DNA-PKs auf mRNA-Ebene über spezifische siRNA gegen DNA-PKs erreicht wurde. Der Vorteil von NU7026 liegt in einer extrem niedrigen EC₅₀ für DNA-PKs von 0,23 µM, die eine unerwünschte simultane Wirkung auf die PI3-K fast komplett ausschließt. Um PI3-K wirksam mit NU7026 zu inhibieren sind wesentlich höhere Konzentrationen

nen, EC:50 ca. 13 μM (um das 56fache), notwendig. In den meisten Studien mit NU7026 werden Konzentration von 10 μM verwendet [93, 100].

4.1.2 Vorkommen und Verteilungsmuster in Endothelzellen

Wie bereits erwähnt, wurden in dieser Arbeit zum ersten Mal grundlegende Untersuchungen zum Vorkommen und zur zellulären Lokalisation von DNA-PKcs in Endothelzellen erhoben. Zugleich wurden Vergleiche zur Expression von DNA-PKcs in primären Endothelzellen (HUVEC) und in der humanen mikrovaskulären Zelllinie (HMEC-1) angestellt. Es konnte festgestellt werden, dass DNA-PKcs in HMEC-1 wesentlich stärker exprimiert wird als in HUVEC. Dies lässt sich vermutlich durch die Immortalisierung der Endothelzellen in der Zelllinie HMEC-1 mit dem SV40 „Large-T Antigen“ erklären [101]. SV40 „Large-T Antigen“ (LT) führt in Zellen zu unbegrenzter Zellteilung über Interaktionen mit pRb und p53. LT bindet an pRb und führt zum Freiwerden von E2F und vermehrtem Wachstum [102]. p53 wird ebenfalls gebunden und inaktiviert [103]. Es ist auch bekannt, dass über „p53 Binding Protein 1“ in Krebszelllinien der DNA-Reparatur-Signalweg aktiviert wird. Dies geschieht über den DNA-PK-Verwandten ATM [104]. In die gleiche Richtung weisen Erkenntnisse, dass während normaler Zellalterung unreparierte Doppelstrangbrüche akkumulieren [105]. HMEC-Zellen zeigen unter basalen Bedingungen mit der 3-4fachen Menge an DNA-Synthese eine wesentlich höhere Proliferationsrate als HUVEC [106]. Die gesteigerte DNA-Synthese könnte über die erhöhte Notwendigkeit von Reparaturmechanismen für defekte DNA-Abschnitte [107] zur kompensatorischen Erhöhung der DNA-PK-Expression in HMEC führen.

Die Lokalisation von DNA-PKcs unterschied sich in den durchgeführten Studien nicht zwischen primären und immortalisierten Endothelzellen. Die Beobachtung, dass DNA-PK in HUVEC, PAEC und HMEC primär nukleär lokalisiert ist, deckt sich mit den bisher angenommen Funktionen der DNA-PK innerhalb des Nukleus. Erste Hinweise auf DNA-PK in anderen Zellkompartimenten wurden von Lucero et al. erbracht. Dieser konnte in sogenannten „Lipid Rafts“, welche lipidreiche Mikroumgebungen an der Zelloberfläche darstellen und auch unter dem Namen „Detergent-insoluble Glycolipid-enriched Complexes“ (DIGs) bekannt sind, DNA-PK-Komponenten nachweisen, darunter auch die katalytische Untereinheit [67]. Dies gelang in M057K-Zellen, Lymphozyten, MEFs und „Chinese Hamster Ovary“ (CHO)-Zellen. „Lipid rafts“ begünstigen in Signaltransduktionsprozessen spezifische Protein-Protein-Interaktionen zwischen Liganden, Rezeptoren und Kinasen. Darunter befinden sich Proteine aus den Kategorien der Glykophosphatidylinositol-verankerten Proteine, Transmembranproteine, doppelt azetylierten Tyrosinkinasen der Src-Familie und der α -Untereinheit

der heterotrimeren GTP-bindenden Proteine, sowie Cholesterol verknüpfte Proteine wie „Hedgehog“ [67]. Die Hinweise auf das Vorhandensein von DNA-PKcs in der Membran [75] lassen die Vermutung aufkommen, dass es im lipiden Mikromilieu zur Interaktion mit Molekülen kommen könnte, die auch in der Angiogenese eine entscheidende Rolle spielen. Dies wären z.B. Akt, PI3-K und die Familie der Rho-GTPasen, um nur einige Beispiele zu nennen. In den untersuchten Endothelzellen (HUVEC, PAEC und HMEC-1) konnte DNA-PKcs allerdings nur eindeutig im Zellkern nachgewiesen werden. Perinukleär ließen sich mittels Immunfluoreszenz nur sehr geringe Mengen darstellen. Dies steht im Gegensatz zu Ergebnissen einer Studie von Huston et al. aus dem Jahr 2008, die in ruhenden HEKB2-Zellen DNA-PKcs im Nukleus lokalisierten, aber unter Forskolin-Behandlung eine eindeutige Anreicherung von DNA-PKcs im Zytoplasma erreichten. Forskolin ist ein Aktivator der Adenylzyklase. cAMP aktiviert „Exchange Protein Activated by cAMP 1 and 2“ (EPAC1 and 2) und im folgenden Rap1 und Rap2 (GTPasen); cAMP steuerte in den Versuchen den nukleären Export von DNA-PKcs. Proteinkinase A (PKA) dagegen regulierte den Wiedereintritt von DNA-PKcs in den Zellkern [108]. In diesen Versuchen war die Anfärbung von DNA-PKcs im Zytoplasma so eindrucklich, dass angenommen werden darf, dass die minimalen perinukleären Spuren des Enzyms in unserem Fall vernachlässigt werden dürfen. Wir stellen fest, dass in HUVEC und HMEC als Beispiele für humane Endothelzellen DNA-PKcs primär nukleär lokalisiert ist. Auch die Stimulation mit FGF-2 oder TNF α konnte die Lokalisation nicht beeinflussen. Hieraus folgt der Schluss, dass DNA-PKcs nicht nur in seiner Funktion stark zwischen unterschiedlichen Zell- und Gewebearten variiert, sondern auch in seiner Lokalisation von der untersuchten Zellform abhängig ist. Weiter scheint der Stimulus für die Lokalisation und Funktion der DNA-PKcs entscheidend zu sein.

4.2 DNA-PKcs als Protagonist endothelabhängiger Angiogenese

In den Versuchen zur Rolle der DNA-PK in Endothelzellen wurden die initialen Schritte der Angiogenese wie Proliferation, Zellüberleben und Differenzierung zu gefäßähnlichen Strukturen beobachtet. Ergebnisse aus dem CLS- und dem MTT-Assay veranlassten uns zu folgenden Feststellungen.

4.2.1 DNA-PKcs spielt im Gegensatz zur PI3-K bei der Bildung endothelialer Gefäßstrukturen keine Rolle

„Tube Formation“ im CLS-Assay wird primär als Ergebnis endothelialer Migration gesehen. In diesem Assay zeigte Verwendung von NU7026 in adäquaten Konzentrationen zur Hemmung der DNA-PKcs keinerlei Auswirkungen auf die in vitro „Tube Formation“ in primären

humanen Endothelzellen (HUVEC) [100]. Im Gegensatz dazu konnte durch eine 1000fache Erhöhung der NU7026-Konzentration, welche zur wirksamen Hemmung der PI3-K-Aktivität ausreicht, eine signifikante Reduzierung in der Ausbildung von kapillarähnlichen Strukturen erreicht werden. Der Einsatz des PI3-K-Inhibitors LY294002 zeigte ebenfalls deutliche hemmende Effekte auf die „Tube Formation“. Dies entspricht den bekannten Daten zur Rolle der PI3-K in der Migration und Differenzierung von Endothelzellen. Die fehlende Hemmung der „Tube Formation“ durch DNA-PKcs-Inhibition lässt sich nicht durch den geringen Gehalt an DNA-PKcs in HUVEC erklären. Auch Versuche in HMEC-1, die entsprechend der durchgeführten Western Blots einen deutlich höheren Gehalt des Proteins aufweisen, ergaben keinen inhibierenden Effekt der DNA-PKcs-Ausschaltung auf die Migration und Organisation, bzw. die Bildung von CLS („Capillary-like Structures“). Aus diesen Gründen kann ausgeschlossen werden, dass DNA-PKcs in diesem migrationsabhängigem Schritt der Angiogenese eine der PI3-K ähnliche Rolle spielt.

4.2.2 DNA-PKcs als negativer Regulator der Proliferation in Endothelzellen

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen zur Abhängigkeit der endothelialen Proliferation von DNA-PK zeigten, dass eine Inhibition von DNA-PKcs zu einer Steigerung des Wachstums führt. Dies konnte nicht nur für Zellen im basalen Zustand beobachtet werden, sondern auch wenn Zellen entweder einem Gemisch an Wachstumsfaktoren oder einem spezifischen Wachstumsfaktor wie FGF-2 unterworfen werden. Der proliferationssteigernde Effekt der DNA-PKcs-Inhibition, der unabhängig vom äußeren Milieu der Zelle zu sein scheint, lässt vermuten, dass DNA-PKcs unter normalen Umständen eine wachstumshemmende Rolle in Endothelzellen erfüllt. Diese Ergebnisse werden von anderen Studien bestärkt, in denen DNA-PK den Übergang von der G0/G1-Phase in die S-Phase negativ regulierte, was von der Tatsache abgeleitet wurde, dass in SCID-Mäusen die S-Phase-Progression schneller stattfand als in normalen Kontrollen [109]. Auch die Transkription des E2F-1 Promoters war in diesen Tieren um das 4-5fache und konsekutive auch die Expression von Cyclin A und E leicht erhöht. In vitro kann DNA-PK E2F-1 phosphorylieren. Es wurde auch beobachtet, dass DNA-PK-defiziente Gliomzellen schneller wachsen. Dies könnte bedeuten, dass hier DNA-PK in ihrer Funktion als „Bremse“ des Zellzyklus fehlt [109]. Es wurde weiter beobachtet, dass am Übergang von der G1- zur S-Phase DNA-PK aus dem Zytoplasma in den Nukleus transloziert [68], was als Indiz für eine Rolle bei der Kontrolle des Checkpoints vor der S-Phase dienen könnte. Silencing von DNA-PK mittels siRNA führte in HeLa-Zellen zu erhöhter Gen-Aktivität von CDKN1B und 1A [110]. Dies impliziert, dass in der Abwesenheit von DNA-PK der Zellzyklus über die hemmende Wirkung dieser beiden Proteine am Voranschreiten gehin-

dert wird [111], um die Weitergabe geschädigter DNA zu verhindern. Auch die DNA-PK-abhängige Phosphorylierung von p53, dem „Wächter des Genoms“, führte über nukleäre Akkumulation des Proteins und Aktivierung von p21 zum Stopp des Zellzyklus [65]. Auch weitere Modulatoren des Zellzyklus wie c-fos und c-myc werden von DNA-PK beeinflusst [65, 111]. So nimmt das Proteinlevel von c-myc unter anti-DNA-PKcs-siRNA drastisch ab (80 %) [110]. Dies kann wiederum zur erhöhten Menge an p21/p27 und erniedrigter Menge an Cyclin D führen, was im Endeffekt die Progression von der G1-Phase zur S-Phase verhindert [111]. Das Anhalten des Zellzyklus ist notwendig, um entstandene DNA-Doppelstrangbrüche (DSB) reparieren zu können; ein kritischer Schritt für das Verhindern von Mutationen, die wiederum zu unkontrolliertem Wachstum führen können [65].

Auch die Bildung und Aufrechterhaltung eines funktionierenden Blutgefäßes setzt die strikte Kontrolle von Wachstum und Zellsterben durch positive und negative Regulatoren voraus. DNA-PK könnte unabhängig von Doppelstrangbrüchen übermäßiges Wachstum verhindern und einen Kontrollmechanismus für die Entstehung von Tumoren darstellen. So wäre DNA-PK im streng regulierten Prozess der Angiogenese ein negativer Regulator endothelialen Wachstums.

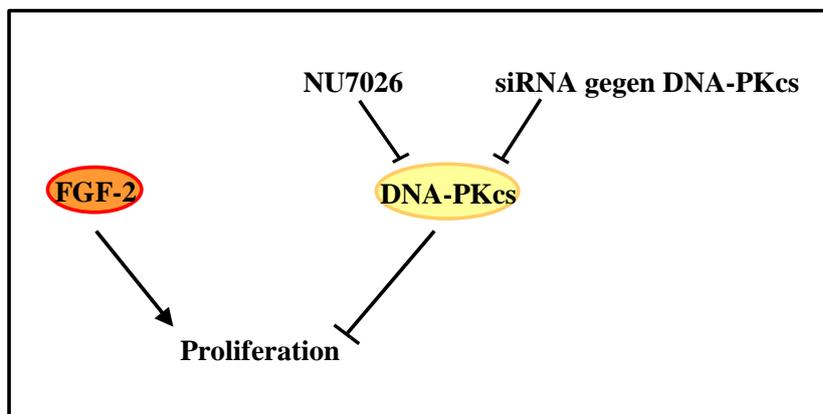


Abb. 4.1 DNA-PKcs als negativer Regulator der Endothelzellproliferation

Inhibition von DNA-PKcs, sei es durch ein Pharmakon oder spezifische siRNA, führt zu gesteigerter Proliferation in Endothelzellen.

Der wachstumshemmende Effekt von DNA-PKcs scheint spezifisch für die FGF-2 gesteuerte Proliferation zu sein, denn es konnte kein signifikanter Einfluss auf die VEGF induzierte Proliferation unter Einwirkung von NU7026 observiert werden. Weiterhin konnte durch Einsatz eines spezifischen Antikörpers gegen FGF-2 in Kombination mit wachstumsfaktorreichem Medium und NU7026 die steigernde Wirkung auf die Proliferation eindrücklich aufgehoben werden.

TNF α induzierte in den verwendeten Konzentrationen in den durchgeführten Versuchen Zellsterben; unter Einfluss von NU7026 fiel dieser Effekt noch stärker aus. Es ist bekannt, dass die Inhibition des PI3-K/Akt-Signalweges die TNF α induzierte Zytotoxizität signifikant erhöht [35]. Im Einklang mit diesen Beobachtungen stehen Hinweise aus der Literatur, dass DNA-PK-defiziente Zellen hoch sensitiv gegenüber Apoptosesignalen sind [112]. Beobachtungen aus humanen Keratinozyten zeigen, dass UV-Strahlung über Caspase-3 zur Spaltung/Aktivitätsverlust von DNA-PKcs und damit Apoptose führt [113]. Dasselbe Phänomen konnte nach Behandlung von Zellen mit Doxorubicin oder Etoposid gesehen werden. Hier kam es primär zu DNA-Schädigung und sekundär zu Aktivierung der Caspase-3. Hemmung dieser Caspase führte zu erhöhter Aktivität von DNA-PK. DNA-PK-Inhibition führte zu gesteigerter Caspase-Aktivität, vermehrten DNA-Schäden und erhöhter Apoptose [112]. Bharti et al. fanden in apoptotischen Zellen ebenfalls erniedrigte Aktivität von DNA-PK [114].

Die durchgeführten Experimente legen die Vermutung nahe, dass die negative Wirkung von TNF α auf das endotheliale Zellüberleben durch DNA-PK-Hemmung positiv verstärkt wird. Besonders interessant ist TNF α im Hinblick auf seine konzentrationsabhängig pro- oder antiangiogene Wirkung, die auch unter therapeutischen Aspekten von Bedeutung ist. Es ist vorstellbar, dass DNA-PK in Abhängigkeit von der TNF α -Konzentration endotheliale Prozesse wie Zellüberleben und Proliferation beeinflusst.

4.3 DNA-PK abhängige endotheliale Signalwege

4.3.1 Akt als Mediator DNA-PK gesteuerter Proliferationsmechanismen

PKB/Akt übt in Endothelzellen positiven Einfluss auf Proliferation und Überleben aus. Wachstumsfaktoren wie FGF-2 können Akt über die Produkte der PI3-Kinase in Kontakt mit PDK1 und PDK2 bringen und so zur Aktivierung führen [12, 13]. DNA-PKcs wurde in HEK293-Zellen als PDK2 identifiziert [75]. Dies wurde in einer weiteren Studie in HEK293-Zellen auf Stimulation mit Forskolin hin bestätigt [108]. 2009 wurde die spezifische Erkennungssequenz für die DNA-PKcs-abhängige Phosphorylierung von Akt aufgedeckt [115]. Es ist auch bekannt, dass Akt auf Stimulation mit Wachstumsfaktoren wie IGF-1 und EGF hin aus dem Zytosol in den Nukleus transloziert [116], was mit unseren Beobachtungen zur nukleären Lokalisation von Akt in humanen Endothelzellen auf FGF-2- und TNF α -Stimulation übereinstimmt.

Die Erhöhung der Phosphorylierung von Akt an Ser473 in Endothelzellen auf NU7026 oder siRNA gegen DNA-PKcs hin wurde in dieser Arbeit unter basalen Bedingungen nachgewiesen. Dies legt den Schluss nahe, dass DNA-PKcs eine hemmende Wirkung auf Endothelzellen

Diskussion

im nicht stimulierten Zustand über die Modifikation von Akt hat. Die Tatsache, dass DNA-PKcs in ruhenden Endothelzellen eine proliferationshemmende Wirkung entfaltet, steht im Einklang mit der Erkenntnis, dass Endothel ein zum Großteil nicht replikatives Gewebe darstellt. Weniger als 0,1 % Replikationen/Tag finden sich unter normalen Umständen in vivo im Endothel [1]. Unsere Untersuchungen lassen vermuten, dass DNA-PK in Endothelzellen die Funktion eines „Wächters des Ruhezustandes“ erfüllen könnte.

Stimulation mit FGF-2 oder DNA-PKcs-Hemmung, sei es durch NU7026 oder durch siRNA, konnten die Phosphorylierung von Akt an Ser473 eindeutig erhöhen, wenn sie mit nicht behandelten Zellen verglichen wurden. In der erhöhten Phosphorylierung besteht kein signifikanter Unterschied zwischen einem FGF-2-Stimulus oder einer DNA-PKcs-Hemmung. Allerdings lässt eine Kombination von FGF-2-Stimulus und DNA-PKcs-Inhibition keine weitere Erhöhung in Bezug auf die Phosphorylierung von Ser473 erkennen. Möglicherweise hat in unseren Versuchen FGF-2 als potenter Initiator von Proliferationssignalen Akt bereits maximal aktiviert, so dass die Inhibition von DNA-PKcs, obwohl für sich genommen ebenfalls ein starker Aktivator der Akt-Phosphorylierung, keinen weiteren Einfluss auf den Phosphorylierungszustand von Akt hat. Eine weitere Möglichkeit könnte sein, dass DNA-PKcs nur unter basalen Bedingungen die Phosphorylierung von Akt bewirkt. Akt muss trotz der nachgewiesenen Phosphorylierungserhöhung sowohl unter FGF-2, als auch unter DNA-PKcs-Inhibition, nicht notwendigerweise das übermittelnde Signalmolekül der erhöhten Proliferationsrate sein. Es könnten andere abhängige Substrate oder Transkriptionsfaktoren der DNA-PKcs für den beobachteten Effekt verantwortlich sein. Eine Möglichkeit wäre die Aktivierung der MAPK/p90^{rsk}-Signalkaskade und folgend eine erhöhte Aktivität von NF-κB, da gezeigt wurde, dass DNA-PKcs auf Doxorubicin und AD 288 hin diese aktivieren kann [117].

Die vorher erfolgten Untersuchungen zur Proliferation unter Wachstumsfaktoreinfluss und DNA-PKcs-Inhibition hatten allerdings gezeigt, dass eine Kombination von NU7026 und FGF-2-Stimulus in der Lage ist, die Proliferationsrate in Endothelzellen weiter zu erhöhen, wenn man sie mit alleiniger FGF-2-Stimulation vergleicht. Es war aber keine Steigerung der Proliferation unter FGF-2- und NU7026-Einfluss im Vergleich mit einer mit NU7026 und 10 % Serummedium behandelten Kontrollgruppe zu beobachten, was sich mit den Ergebnissen der Untersuchungen zur Akt-Phosphorylierung deckt.

Wurde allerdings simultan zur FGF-2 und NU7026-Behandlung Akt durch einen spezifischen Inhibitor gehemmt, so wurde dieser additive Effekt eindeutig aufgehoben. Dies beleuchtet erneut die Bedeutung von Akt für die Proliferation in Endothel, und lässt vermuten, dass es zumindest für einen Teil der FGF-2- und DNA-PKcs-Hemmungs-induzierten Proliferations-

steigerung verantwortlich ist. Diese Beobachtung stimmt mit Observationen aus Untersuchungen zum Proliferationsverhalten von SCID-Mäusezelllinien von Watanabe et al. überein. Dieser hatte erkannt, dass Zellen dieser Linie, die eine eingeschränkte Aktivität der DNA-PKcs besitzen, schneller proliferieren [109]. Jedoch zeigen andere Studien, dass DNA-PK-Knockout zu einer verlangsamten Proliferationsrate führen kann, darunter Experimente in einer humanen Adenokarzinom-Zelllinie [118]. Diese widersprüchlichen Ergebnisse ergeben einen Sinn, wenn man sie in Zusammenhang mit einer von Surucu et al. 2008 veröffentlichten Arbeit sieht. Insulinstimulation von Leber-, Fettgewebs-, Skelett- und Herzmuskelzellen führte zwar zu einer signifikanten Erhöhung der Akt-Phosphorylierung *in vivo*, ergab aber keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und DNA-PKcs-defizienten-Mäusen (DNA-PKcs^{-/-}). Im Folgenden konnten sie zeigen, dass auch in DNA-PKcs^{-/-} MEFs („Mouse Embryonic Fibroblasts“) die Akt-Phosphorylierung an Ser473 nicht wachstumsfaktorabhängig (es wurden IGF-1 und Serum verwendet) verändert wird. Die Arbeitsgruppe folgert daraus, dass DNA-PKcs zumindest in dieser Zellart keine Rolle in der wachstumsfaktorabhängigen Akt-Aktivierung hat. Allerdings konnten im Vergleich zwischen Wildtyp- und DNA-PKcs^{-/-}-Mäusen eine leicht erhöhte Akt-Phosphorylierung in Fettgewebe und braunem Fett, und eine 8fache Erhöhung im Thymus gefunden werden. Dort war gleichzeitig der FoxO4-Transkriptionsfaktor, ein Modulator des PI3-K/Akt-Signalweges, stark phosphoryliert. In DNA-PKcs^{-/-}-Mäusen kam es signifikant häufiger und schneller zur Ausbildung von größeren Lymphomen des Thymus. Da bekannt war, dass Akt-Dysregulation auch in Thymuslymphomen nachgewiesen wurde [119], ergaben diese Befunde die Frage nach der DNA-PKcs-Rolle in Zusammenhang mit der entdeckten persistierenden Aktivität von Akt in Thymustumorzellen. DNA-PKcs^{-/-}- und Akt α ^{-/-}-Doppelknockout-Mäuse zeigten eine erhöhte Lebenserwartung im Vergleich mit reinen DNA-PKcs^{-/-}-Mäusen, so dass ein Einfluss von Akt auf die reduzierte Lebensspanne von DNA-PKcs^{-/-}-Mäusen angenommen werden darf [120].

DNA-PKcs scheint nur in bestimmten Zellen und unter sehr spezifischen Bedingungen in die Phosphorylierung von Akt und damit das Proliferationsverhalten von Zellen einzugreifen. DNA-PKcs gesteuerte Akt-Phosphorylierung konnte auch nach Bestrahlung bzw. dem Entstehen von Doppelstrangbrüchen unter Einfluss von CpG-DNA und Insulin nachgewiesen werden [75, 76, 120]. So ergeben auch die in dieser Arbeit erhobenen Daten an Endothelzellen einen Sinn. In diesen Zellen scheint DNA-PKcs über die eingeschränkte Phosphorylierung von Akt unter normalen Bedingungen die Proliferation zu hemmen und exzessives Wachstum zu verhindern.

Des Weiteren führte Inhibition von Akt1 in einer Lungenkrebszelllinie zur verminderten DNA-PK-Phosphorylierung und Doppelstrangbruch-Reparatur nach Bestrahlung. Immunpräzipitationsversuche zeigten in diesen Zellen Komplexe aus DNA-PK und Akt1. Eventuell besteht also eine gegenseitige Aktivierung zwischen Akt und DNA-PK [121], wodurch die über Akt vermittelte Proliferation mit einer erhöhten Reparatur von Doppelstrangbrüchen über DNA-PK verbunden wäre. Auf diese Weise würde dafür gesorgt, dass nur genomisch intakte Zellen proliferieren.

4.3.2 ERK als Mediator DNA-PK abhängiger Proliferation

Da die Versuche mit NU7026 gezeigt haben, dass ERK unter DNA-PK-Inhibition ebenfalls vermehrt phosphoryliert wird, stellte sich die Frage, ob ERK über DNA-PK eine Funktion in der Übermittlung proliferativer Signale in Endothelzellen übernimmt und als alternativer Signaltransduktionsweg zur PI3-K/Akt-Kette in Frage kommt. Es ist bekannt, dass ERK in Endothelzellen proliferative Signale übermittelt [12] und die erhöhte ERK Aktivität ist nahezu analog zu den Untersuchungen von Akt, DNA-PK, und FGF-2 (siehe Abb. 4.2). Eventuell kann entweder der eine oder der andere Signalweg zur Weiterleitung des Proliferationsstimulus genutzt werden. Daraus würde sich erklären, dass die Kombination von FGF-2 und NU7026 die Phosphorylierung weder von Akt, noch von Erk mehr steigert als die Einzelsubstanzen.

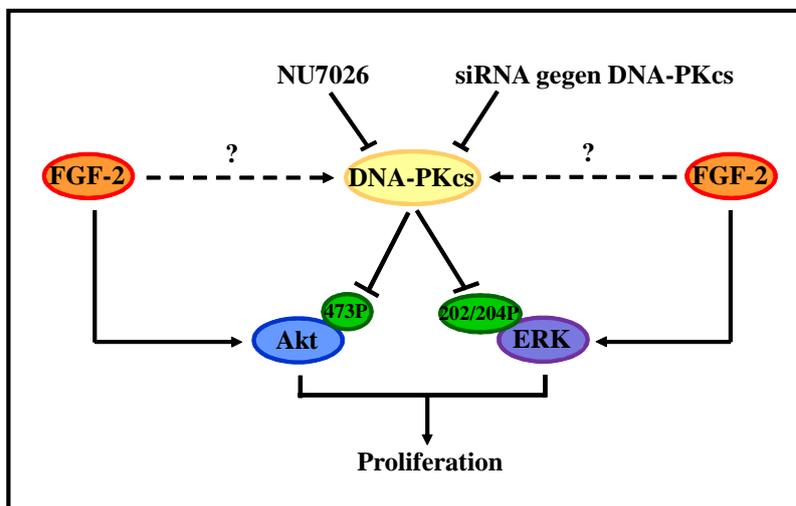


Abb. 4.2 Postuliertes Schema der DNA-PKcs induzierten Proliferationshemmung in Endothelzellen mit Akt und ERK als Regulatoren

DNA-PKcs-Inhibition (pharmakologisch oder mittels siRNA) führt in Endothelzellen zur gesteigerten Phosphorylierung von Akt an Ser473 bzw. ERK an Thr202/204 und zur gesteigerten Proliferation.

4.4 Wechselwirkungen zwischen DNA-PK und Wachstumsfaktoren/Zytokinen

4.4.1 VEGF und DNA-PK

Brown et al. wiesen 2004 nach, dass HUVEC, die in Kokultur mit Glioblastomzellen gezogen wurden, resistent gegen bestrahlungsinduzierte Apoptose wurden [122]. Expressionsanalysen dieser Endothelzellen zeigten, dass DNA-PKcs um das 10fache erhöht war. Anwendung eines spezifischen Antikörpers gegen VEGF hob die erhöhte Expression auf und ließ vermehrt Apoptose zu [122]. Es könnte also sein, dass trotz der nicht signifikanten Ergebnisse zur Proliferation von Endothelzellen unter Einfluss von VEGF und NU7026 im MTT-Assay eine Rolle für diese Kinase in VEGF abhängigen endothelialen Prozessen besteht. Weiterhin stehen diese Beobachtungen in Einklang mit den Befunden von Ader et al. zu FGF-2 und erhöhter Expression von DNA-PK in einigen Zellarten [87]. Grundsätzlich wäre jedoch zu klären, ob bei diesen Erkenntnissen ein direkter Zusammenhang zwischen den spezifischen Wachstumsfaktoren und der Expression von DNA-PK besteht oder ob vielmehr Bestrahlung oder die proliferative Wirkung der Wachstumsfaktoren ursächlich sind.

4.4.2 FGF-2 und die Expression von DNA-PKcs

Ader et al. berichteten 2002 in Untersuchungen an radioresistenten HeLa 3A- und CAPAN A3-Zelllinien, dass Expression und Aktivität (nur HeLa 3A-Zellen) von DNA-PK unter Überexpression einer 24 kDa großen FGF-2 Isoform stark zunehmen. Diese Expressionserhöhung kam durch eine Hochregulierung der DNA-PKcs-Gen-Transkription zustande. Die Zelllinien zeigten eine schnellere Reparatur von Doppelstrangbrüchen und unter Einfluss von Wortmannin, einem Inhibitor der PI3-K, eine Sensibilisierung gegenüber radioaktiver Bestrahlung [87]. Es ist anzumerken, dass HeLa-Zellen im Vergleich mit anderen Zellarten relativ wenig DNA-PK besitzen [123]. In einer anderen Arbeit wurde gezeigt, dass die Zugabe von exogenem FGF-2 bovine Endothelzellen vor bestrahlungsinduzierter Toxizität schützen konnte. Hierbei veränderte das Vorhandensein oder Fehlen von FGF-2 nicht die Fähigkeit der Endothelzellen Doppelstrangbrüche zu reparieren, aber die DNA-Fragmentierung, die für die Durchführung der Apoptose notwendig ist, war unter FGF-2-Stimulation eingeschränkt [124]. Xu et al. deckten 2000 in einer Studie an einer NO produzierenden Zelllinie (humane fetale Nierenzellen) auf, dass die Einwirkung von NO (Stickoxid) ebenfalls die Expression von DNA-PKcs über Transkriptionserhöhung um das 4-5fache erhöht. Die Transkription wurde in diesen Experimenten über Sp-1 reguliert [123]. NO ist ein universelles und auch im Endothel häufig verwendetes Signalmolekül. Bei der wachstumsfaktor gesteuerten Proliferation und

dem Überleben übermittelt es Signale, die z.B. zur Aktivierung von verschiedenen Transkriptionsfaktoren führen [12].

In unseren Experimenten konnte nach Exposition gegenüber FGF-2 eine vermehrte Expression von DNA-PKcs auf Protein- und mRNA-Ebene beobachtet werden, was in Einklang mit den Ergebnissen von Ader et al. steht. Es konnte durch Zellfraktionierung und Immunfluoreszenz ausgeschlossen werden, dass die FGF-2-abhängige Proteinerhöhung von DNA-PKcs durch intrazelluläre Verschiebung zwischen unterschiedlichen Kompartimenten wie Nukleus und Zytoplasma entstand.

FGF-2 führt in Endothelzellen über FGFR-1 und mehrere unterschiedliche Signalwege zu Proliferation und Zellüberleben [12]. Positive Wachstumssignale müssen strikt reguliert werden, damit es nicht zur unkontrollierten und unerwünschten Zellteilung kommt. Dies kann im schwersten Fall zur Entstehung von Tumoren führen. Die Tatsache, dass FGF-2 in Endothelzellen DNA-PKcs-Expression hochreguliert, deutet in diesem Zusammenhang darauf hin, dass DNA-PKcs endotheliales Wachstum inhibiert. Das positive Wachstumssignal durch FGF-2 wird in einem negativen Mechanismus über DNA-PKcs reguliert. Die Erhöhung der Expression von DNA-PKcs erbringt also eine vermehrte Inhibition der Proliferation auf FGF-2-Stimulus hin.

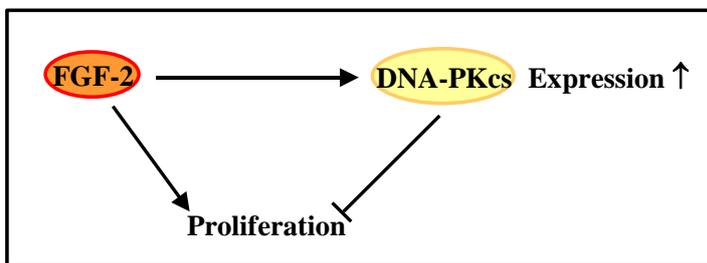


Abb. 4.3 Postulierter Regulationskreislauf zwischen FGF-2 und DNA-PKcs in Endothelzellen

FGF-2 erhöht in HMEC DNA-PKcs auf Protein- und mRNA-Ebene. Somit steigt gleichzeitig mit der proliferativen Wirkung von FGF-2 auch die antiproliferative Wirkung von DNA-PKcs in Endothelzellen. Unkontrolliertes Wachstum wird verhindert.

Über welche Moleküle FGF-2 zur Erhöhung der DNA-PKcs führt bleibt aufzuklären. Eine ausgiebige Literaturrecherche konnte nur wenige Hinweise auf die Regulation der DNA-PKcs-Gen-Transkription liefern z.B. einen Zusammenhang mit dem Transkriptionsfaktor SP-1 [125]. In kolorektalen Tumorzellen waren die DNA-PKcs-Aktivität und die Proteinmenge in Korrelation mit erhöhten SP-1-Leveln erhöht [126]. Medunjanin et al. konnten 2010 nachweisen, dass Östrogen die Aktivität des DNA-PKcs-Promotors und nachfolgend die Proteinmenge in Brustkrebszellen über ER α erhöht [127]. Über den Promotor der DNA-PKcs ist

bekannt, dass er ein Inr-Element, zwei Interaktionsstellen für SP-1 und eine potentielle E2F Erkennungsstelle besitzt. Als Startstelle für die Transkription von DNA-PKcs wird ein Med-1 Element vermutet [125]. Es wäre interessant, die Aktivität von bekannten FGF-2-induzierten Transkriptionsfaktoren in diesem Zusammenhang zu untersuchen. Transkriptionsfaktoren und Onkogene, die über FGF-2 reguliert werden, sind unter anderem CREB, SRF, Egr-1, STAT-1, Fos und Jun. Antiapoptotische Faktoren sind Bcl-2 und Bcl-xL. Im Rahmen der Zellzyklusregulation übt FGF-2 Einfluss auf p21, pRb, Cyclin D1 und Cyclin E-CDK2 aus [128]. Weiterhin gibt es Hinweise, dass auch die Modifikation des Transkriptionsprodukts eine entscheidende Rolle in der Regulierung von DNA-PKcs spielt. Es konnte gezeigt werden, dass in M059J-Zellen die mRNA für DNA-PKcs eine wesentlich kürzere Halbwertszeit von nur 1,5 h hat (normal sind 24 h) und eine kürzere Variante des alternativen Splicing fehlt. So wurde versucht, die um das 20fache verminderte Aktivität der DNA-PKcs in diesen Zellen zu erklären [129]. Es bleibt weiter zu untersuchen, auf welche Weise Wachstumsfaktoren und im Besonderen FGF-2 in Endothelzellen die Expression von DNA-PKcs beeinflussen können.

4.4.3 TNF α und DNA-PKcs

TNF α erhöht in MEF-7-Zellen die Aktivität von DNA-PKcs und Akt [85]. Ein Einfluss von TNF α auf die Expression von DNA-PKcs ist nicht bekannt. In den untersuchten Endothelzellen (HMEC) war allerdings eine Erhöhung der Menge an DNA-PKcs-Protein nach 48 h Stimulation mit TNF α im Western Blot zu beobachten. In Zusammenschau mit der deutlich erhöhten Rate an Zellsterben unter einer Kombination von TNF α und Inhibition von DNA-PKcs kann die erhöhte Expression von DNA-PKcs eventuell als Hemmschalter von Proliferationsmechanismen z.B. über Akt-Signalwege gewertet werden. Dies würde in zweifacher Hinsicht Sinn ergeben; erhöhte Menge und Aktivität von DNA-PKcs könnte einen Kontrollmechanismus des durch TNF α eingeleiteten Zellsterbens darstellen und vermehrte Hemmung der Proliferation über Akt einen unsinnigen Energieverbrauch bereits geschädigter Zellen verhindern. DNA-PKcs scheint abhängig vom Stimulus Einfluss auf die Proliferation bzw. das Zellsterben von Endothelzellen zu nehmen. Der Wachstumsfaktor FGF-2 führt unter Hemmung von DNA-PKcs zu einer deutlich erhöhten Proliferation, während TNF α zum vermehrten Zellsterben führt. Weitere Untersuchung der abhängigen Signalwege und Vorgänge in Endothelzellen unter TNF α und DNA-PKcs-Inhibition könnten detailliertere Einsicht in zelluläre Prozesse bringen.

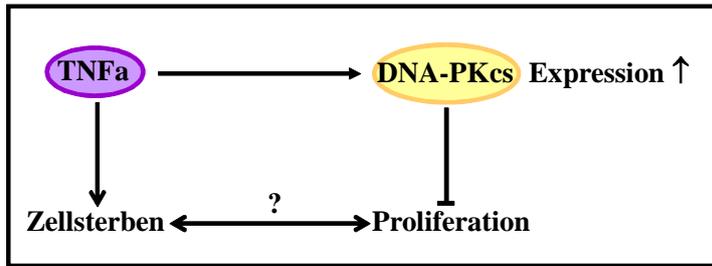


Abb. 4.4 Schema der Interaktion zwischen TNF α und DNA-PKcs in Endothelzellen

TNF α und Inhibition der DNA-PKcs führen zum Absterben von Endothelzellen. Gleichzeitig erhöht TNF α nach 48 h die Expression der DNA-PKcs. Gehemmte Proliferation und gesteigertes Zellsterben potenzieren sich.

4.5 DNA-PKcs als therapeutischer Ansatz in der Medizin

Der DNA-PK-Komplex, insbesondere DNA-PKcs und Ku70 bzw. Ku80, wird schon seit längerem und zum Teil erfolgreich auf Möglichkeiten der therapeutischen Intervention hin untersucht.

4.5.1 Hemmung der DNA-PKcs als supportive Maßnahme in der Therapie von Tumoren

Primär wurde DNA-PK wegen ihrer führenden Rolle in der Reparatur von Doppelstrangbrüchen über den Mechanismus des NHEJ in humanen Zellen beachtet. Denn die zelluläre Toxizität von Chemotherapeutika und radioaktiver Bestrahlung beruht hauptsächlich auf der Fähigkeit Doppelstrangbrüche in Zellen zu induzieren. Zelluläre Antworten auf solche schädigende Einflüsse beinhalten Induktion von Apoptose, Modulation der Zellzyklusprogression und Toleranz oder Reparatur des Schadens. Antwortmechanismen, die zum Zellüberleben führen, haben einen negativen Einfluss auf die Effektivität der antitumorösen Therapie und können sogar zu Therapieresistenz führen [130].

Inhibitoren der PI3-K-verwandten Kinasen, darunter DNA-PK, stellen eine Möglichkeit dar die zelluläre Antwort in der Therapie von Tumoren zu modifizieren, da sie die Reparatur von Doppelstrangbrüchen behindern sollten und zur Anhäufung von zytotoxischen Veränderungen oder Reparatur-Intermediaten führen [130]. NU7026, ein kompetitiver Inhibitor der DNA-PKcs, wurde in dieser Doktorarbeit verwendet und konnte in DNA-PKcs-haltigen Zellen die Zytotoxizität ionisierender Strahlung potenzieren [93]. Zusätzlich konnte NU7026 auch die wachstumshemmenden Effekte von Topoisomerase-II-Giften wie Idarubicin, Daunorubicin, Doxorubicin, Etoposid und Mitoxantron verstärken [131]. Weitere DNA-PKcs-Inhibitoren wie NU7441 zeigen ähnliche Effekte. Die Komponenten IC87102 und IC87361 verstärken zusätzlich die zytotoxische Wirkung der Bestrahlung auf die Mikrogefäße des Tumors, was für einen endothelspezifischen Ansatzpunkt spricht [130].

4.5.2 DNA-PKcs als Zielstruktur in der Therapie ischämischer Krankheiten

Da sich in den hier durchgeführten Versuchen gezeigt hat, dass die Funktion von DNA-PK sehr stark von der Art der Zellen und des Stimulus abhängig ist, besteht die Möglichkeit, dass sie in Bezug auf das Endothel und damit das vaskuläre System ein interessantes Ziel in der Therapie vaskulärer Erkrankungen einnehmen könnte. Im Besonderen könnte ihre Modulation für die Therapie von lokalen und systemischen Krankheiten, die mit mangelnder Durchblutung bzw. Ischämie einhergehen, eingesetzt werden.

Die beobachtete proliferationsfördernde Wirkung der DNA-PK-Inhibition, sei es unter basalen Umständen oder unter Einfluss von FGF-2, veranlasst zur Überlegung, ob dieser Effekt nicht bei der Wiedererschließung ischämischer Areale genutzt werden könnte. Über einen derartigen proangiogenen Mechanismus könnte aufgrund von Gefäßneubildung die Oxygenierung und Nährstoffversorgung minderversorgter Gebiete verbessert werden. So könnten DNA-PK-Inhibitoren z.B. in der Therapie der PAVK, der diabetischen Mikroangiopathie und koronarischemischer Erkrankungen einen erfolgversprechenden Ansatz darstellen. Da der proliferative Effekt spezifisch für Endothelzellen zu sein scheint, bestünde vor allem unter einer gewebespezifischen und lokalen Administration keine Gefahr, dass andere ortständige Gewebe zur Zellteilung veranlasst werden. Des Weiteren sollte es auf Grund dieses spezifischen Mechanismus nicht zur Induktion von Tumoren kommen.

Für die entsprechenden Inhibitoren und adäquaten Konzentrationen wären weitere und ausführliche Untersuchungen, besonders auch in in vivo Modellen erforderlich.

4.6 Limitationen

4.6.1 Verwendung unterschiedlicher Zelltypen

Ein Schwachpunkt der durchgeführten Versuche liegt in der Tatsache, dass in den Versuchen auf verschiedene Endothelzelltypen zurückgegriffen werden musste. HMEC ließen sich primär nicht in befriedigendem Maße mit siRNA gegen DNA-PKcs transfizieren, so dass für alle Versuche, die eine Inhibition der DNA-PKcs auf mRNA-Ebene erforderten, auf PAEC zurückgegriffen werden musste. Trotz der relativ ausgeprägten genetischen Homologie zwischen Mensch und Schwein ist unklar, ob davon ausgegangen werden kann, dass sich primäre Endothelzellen dabei in ihrer Funktion bezüglich der DNA-PKcs entsprechen.

Ebenso entstammen die von uns verwendeten Endothelzelltypen unterschiedlichen Funktionseinheiten innerhalb des vaskulären Systems. HMEC-Zellen sind eine immortalisierte Zelllinie dermalen mikrovaskulärer Gefäße [89]. PAEC entstammen aus der Aorta von Schweinen und HUVEC aus humanen Umbilikalvenen. Es handelt sich also im ersteren Fall um eine Zelllinie

und in letzterem um primäre Zellen. Weiterhin repräsentieren HMEC mikrovaskuläre Endothelzellen, PAEC Endothelzellen aus dem größten arteriellen Gefäß mit sehr starker mechanischer Beanspruchung und HUVEC venöse Endothelzellen aus einem Gefäß, welches sehr spezifischen Anforderungen im pränatalen Kreislauf ausgesetzt ist. Außerdem muss angenommen werden, dass zwischen den primären Endothelzellen unterschiedlicher Spender eine deutliche Variabilität besteht. Inwieweit sich diese Zellen in ihren Eigenschaften unterscheiden und wie sich dies auf die Versuche auswirkt, ist unklar. Auch gewebespezifische Faktoren der Mikroumgebung haben einen schwer definierbaren Einfluss auf den Phänotyp von Endothelzellen, so dass es zu bevorzugen wäre spezifische Endothelzellen in entsprechenden Fragestellungen zu untersuchen [106]. Andererseits scheint durch die ähnlichen Ergebnisse trotz Verwendung unterschiedlicher Endothelzellen die Übertragbarkeit der von uns erhobenen Daten auf andere Endothelzelltypen wahrscheinlich.

4.6.2 DNA-PKcs und FGF-2/TNF α : Einzelspieler in einem konzertierten Prozess

Alle Versuche wurden unter sehr spezifischen Bedingungen in Zellkulturen durchgeführt. Natürlicherweise findet Angiogenese in einem streng regulierten Gleichgewicht von pro- und antiangiogenen Faktoren im biologischen System statt [12]. In welchem Maße isolierte Untersuchungen einzelner Faktoren dieses vielfach gesteuerten Prozesses die wahren Vorgänge veranschaulichen können, ist fraglich. Dies gilt sowohl für die singuläre Stimulation mit einzelnen, ausgesuchten Wachstumsfaktoren wie in diesem Fall FGF-2 und TNF α , als auch für die Ausschaltung einzelner Enzyme wie der DNA-PK in multiple abgestimmten Signalkaskaden.

4.6.3 Fehlende in vivo Versuche

Primär bieten sich Zelllinien und hier im besten Fall primäre Zellen zu ersten Untersuchungen von Fragestellungen in der Aufklärung angiogenetischer Prozesse an. So wurden auch in dieser Arbeit Untersuchungen zu den initialen Abschnitten der Angiogenese wie Migration und Proliferation in HMEC, HUVEC und PAEC unternommen. Hier zeigten sich eindeutige Tendenzen z.B. die proliferationshemmende Rolle von DNA-PKcs in Endothelzellen. Allerdings stehen Endothelzellen im Organismus in stetem Kontakt mit weiteren Zellen z.B. Perizyten und glatten Muskelzellen und beeinflussen sich gegenseitig. Auch die Rolle des Blutflusses und der Schubspannung auf das Verhalten von Endothelzellen in vivo ist in der Erforschung der Angiogenese nicht zu vernachlässigen [101]. Es wäre wünschenswert, die erhaltenen Ergebnisse in einfachen in vivo Experimenten zu überprüfen. Erste Versuche dazu wurden in einem „Aortic Ring Assay“ unternommen. Dieses Assay untersucht an Aorten frisch verstor-

Diskussion

bener Mäuse das Wachstumsverhalten von Endothelzellen unter spezifischen Bedingungen – Stimuli oder Enzyminhibition – in einer Matrix aus Matrigel. Leider konnten in der aufgewendeten Zeit auf Grund methodischer Schwierigkeiten keine aussagekräftigen Ergebnisse in diesem „ex vivo“-Assay, welches ein Verbindungsstück zwischen in vitro und in vivo Experimenten darstellt, erzielt werden [101].

Des Weiteren stände zur in vivo Überprüfung beispielsweise das „Chick Chorioallantoic Membrane Assay“ (CAM-Assay) zur Verfügung, um die Effekte von FGF-2 und DNA-PK zu überprüfen. Am besten wäre es jedoch, die in vitro Ergebnisse in einem Mausmodell evtl. mit SCID-Mäusen zu verifizieren. Diese Versuche konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht vorgenommen werden und sind Gegenstand weiterer Untersuchungen.

5. Zusammenfassung

Endothelzellen spielen im Organismus eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Gefäßfunktion und der Entwicklung von vaskulären Erkrankungen. Auch für die Gefäßentwicklung (Angiogenese) sind sie von entscheidender Bedeutung. Angiogene Vorgänge finden normalerweise in einem hoch regulierten Milieu von fördernden und hemmenden Faktoren statt [1, 3]. Bekannte Faktoren, die Endothelzellen zum Zellüberleben und zur Proliferation veranlassen, sind Wachstumsfaktoren wie FGF-2 und VEGF, aber auch Zytokine wie z.B. TNF α [14, 22, 29]. Auf diese Signale hin werden unterschiedliche Signalkaskaden in Endothelzellen aktiviert, darunter der PI3-K/Akt- und der Raf/MEK/ERK-Signalweg. Diese aktivieren Zellüberleben und proliferative Signale [6]. Die DNA abhängige Proteinkinase (DNA-PK) gehört zur Superfamilie der PI3-K. Sie ist für ihre Rolle in der Reparatur von Doppelstrangbrüchen der DNA schon lange bekannt, kann aber auch Einfluss auf Zellzyklusprogress und Zellüberleben nehmen [71]. Es wurde festgestellt, dass DNA-PK Akt in HEK293-Zellen phosphorylieren und aktivieren kann [75]. Bis jetzt lagen keine Untersuchungen zur Rolle der DNA-PK in Endothelzellen und ihrer möglichen Regulation endothelialer wachstumsfaktorabhängiger Signalkaskaden vor. Aufgrund der überragenden Bedeutung von Endothelzellen für die Angiogenese wurde in dieser Arbeit die Funktion der DNA-PK in den frühen Abschnitten dieses Prozess untersucht.

Mittels Immunfluoreszenz und Western Blot konnten wir zeigen, dass DNA-PK grundsätzlich in HMEC-1 und HUVEC vorhanden ist und dort primär im Zellkern lokalisiert ist. Im Gegensatz zu PI3-K Hemmung konnte nach Hemmung der DNA-PKs Aktivität oder durch eine Herunterregulierung der DNA-PK Expression auf mRNA-Ebene kein Einfluss auf die Bildung von gefäßähnlichen Strukturen aus Endothelzellen beobachtet werden.

Untersuchungen zum basalen und wachstumsfaktorabhängigen Proliferationsverhalten von Endothelzellen in vitro ließen jedoch einen signifikant positiven Effekt der DNA-PK-Ausschaltung auf diese Vorgänge erkennen. Inhibition von DNA-PK erhöhte die Proliferationsrate unter basalen Bedingungen deutlich und dies war unter Stimulation mit dem Wachstumsfaktor FGF-2 noch ausgeprägter. TNF α -Stimulation hingegen führte unter denselben Bedingungen zum vermehrten Absterben von Endothelzellen, während in VEGF-A stimulierten Zellen DNA-PK-Inhibition keinen Einfluss auf die Proliferation hatte.

Untersuchungen zu den abhängigen Signalwegen dieses gesteigerten Proliferationsverhaltens ergaben eine erhöhte Phosphorylierung von Akt in Endothelzellen, wenn DNA-PK gehemmt wurde. Die basale ERK-Aktivität war ebenfalls unter DNA-PK-Inhibition erhöht. TNF α und

Zusammenfassung

FGF-2 führten darüber hinaus zu einer erhöhten Expression von DNA-PK, änderten aber nicht die subzelluläre Lokalisation des Enzyms.

In der vorliegenden Arbeit wurden also erstmals Untersuchungen zur Rolle der DNA-PK in Endothelzellen angestellt. So konnten wichtige Hinweise auf die Funktion der DNA-PK in der Regulation der Proliferation von Endothelzellen gewonnen werden: obwohl die DNA-PK aus der PI3-K Subfamilie stammt und eine gewisse Homologie mit der PI3-K hat, scheint die DNA-PK von der PI3-K unterschiedliche Aufgaben bei endothelialen Wachstumsvorgängen zu haben. Im Gegensatz zur PI3-K scheint die DNA-PK vor allem unter FGF-2-Einfluss ein negativer Regulator des endothelialen Wachstums zu sein. Sie könnte daher als intrinsischer Hemmschalter dienen, um unter Wachstumsfaktoreinfluss eine pathologische Vermehrung von Endothelzellen zu verhindern.

Da die Funktionen der DNA-PK stark von äußeren Bedingungen und Zell-/Gewebeart abhängig zu sein scheinen, könnte sie als Zielmolekül zur Therapie ischämischer oder maligner Erkrankungen genutzt werden. Zu diesem Zweck scheinen weitere Untersuchungen gerechtfertigt.

6 Anhang

6.1 Verzeichnis verwendeter Materialien

“Protease Inhibitor Cocktail” (PIC)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
„Chamber Slides“ (8 Fächer)	Ibidi, Martinsried, Deutschland
2-Propanol	Appllichem, Darmstadt, Deutschland
4‘6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Appllichem, Darmstadt, Deutschland
6x Auftragspuffer	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Acrylamid/Bisacrylamid 30 %/0.8 % (w/v)	Appllichem, Darmstadt, Deutschland
Agarose	Appllichem, Darmstadt, Deutschland
Akt-Inhibitor	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumpersulfat 10 % (w/v)	Appllichem, Darmstadt, Deutschland
Axiovert 200M Mikroskop (ApoTom Modus)	Zeiss, Jena, Deutschland
Bovines Serum Albumin (BSA)	Appllichem, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
CaCl ₂	Merck, Darmstadt, Deutschland
CCD Kamera digital	Hamamatsu Photonics, Herrsching, Deutschland
Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Desoxycholat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DMEM	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DNase I Digestion-Buffer	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Elektorphoresekammer	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Ethanol	Appllichem, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Appllichem, Darmstadt, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Filterpapier	Whatman, Dassel, Deutschland
Formalin	Appllichem, Darmstadt, Deutschland
GeneQuant II RNA/DNA Calculator	Pharmacia Biotech, Nümbrecht, Deutschland
Glycin	Appllichem, Darmstadt, Deutschland
H ₂ O ₂ 30 %	Appllichem, Darmstadt, Deutschland
Heraeus Megafuge 1.0R	Kendro, Langenseldbold, Deutschland
Immersionsöl	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Kamera (Powershot)	Canon, München, Deutschland
KCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kollagen G	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Kryoröhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Leupeptin	Appllichem, Darmstadt, Deutschland
Luminol	Fluka Biochemika, Steinheim, Deutschland
LY294002	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Magnetplatten	IBA GmbH, Göttingen, Deutschland
Mastercycler@personal	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Methanol	Appllichem, Darmstadt, Deutschland
Methylthiazoltetrazolium (MTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
MgCl ₂	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
MgCl ₂	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Mikroskop Olympus CKX 4	Olympus, Hamburg, Deutschland
M-MLV-Reverse-Transkriptase	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt, Deutschland
Na ₃ VO ₄	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Na ₄ O7P ₂	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
NaCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaF	Merck, Darmstadt, Deutschland
Neugeborenen Kälberserum (NBCS)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Nitrozellulosemembran	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Nonidet P40	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
NU7026	Merck, Darmstadt, Deutschland
Pageruler (#SM06701)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
p-Coumarsiure	Fluka Biochemika, Steinheim, Deutschland
Pefablock	Appllichem, Darmstadt, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Penicillin/Streptomycin/Amphotericin B	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Pepstatin	Appllichem, Darmstadt, Deutschland
PeqGOLD Total RNA Kit	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Ponceau S Lösung	Fluka Biochemika, Steinheim, Deutschland
ProteoExtract@Subcellular Proteome Extraction Kit	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
RNase-freie DNase I	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Appllichem, Darmstadt, Deutschland
Spektrometer SpectraFlour	Tecan, Crailsheim, Deutschland

Anhang

Sterilfilter (Sartolab, BT 150 Bottle Top Filter 0.2 µm)	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Taq-DNA-Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Taq-DNA-Polymerase-Puffer	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Tris	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Tris-Base	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Tris-HCl	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trypsin EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tween 20	Applichem, Darmstadt, Deutschland
UV-1602 UV-VISIBLE SPECTROMETER	SHIMADZU, Duisburg, Deutschland
UV-Tisch	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Zellkultur Gefäße	BD, Heidelberg, Deutschland

6.2 Abkürzungen

AD 288	N-Benzyladriamycin, Inhibitor of DNA-Topoisomerase II
ADP	Adenosinediphosphat
aFGF	acidic Fibroblast Growth Factor
AK	Antikörper
Akt	Proteinkinase B
Ang1/2	Angiotensin 1 and 2
AP-1	Activator Protein 1
Artemis	Nuklease
ATM	Ataxia Telangectasia Mutated Protein
Bad	Bcl-2-associated Death Promoter
Bax	Bcl-2-associated X Protein (Kofaktor von p53)
BCA	Bicinchoninic Acid
Bcl-2	B-cell Lymphoma 2 (Protein)
Bcl-xL	B-cell Lymphoma-extra Large
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BSA	Bovine Serum Albumin
c-DNA	C-Form der Desoxyribonukleinsäure
c-fos	Transkriptionsfaktor
c-jun	Transkriptionsfaktor
c-myc	Protoonkogen
CAM-Assay	Chorioallantoic Membrane Assay
cAMP	Cyclic Adenosine Monophosphate
CAPAN A3-Zellen	Human Pancreatic Adenocarcinoma Cells Stably Transfected with the cDNA Encoding the 22.5 kDa FGF-2
Cdc42	Cell Division Control Protein 42 Homolog
CDK2	Cyclin-dependent Kinase 2
CDKN1A	Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 1A (p21)
CDKN1B	Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 1B (p27 ^{Kip1})
CHO-Zellen	Chinese Hamster Ovary Cell Line
cIAPs	Unterform der "Inhibitors of Apoptosis"
CLS-Assay	"Capillary-like Structure"-Assay
CpG-DNA	"—C—phosphate—G—" DNA
CREB	Cyclic AMP-responsive Element Binding Protein
Crk	Adaptorprotein
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol
DD	Death Domain
DE	Deutschland
DED	Death Effector Domain
DIGs	Detergent-insoluble Glycolipid-enriched Complexes
ECDMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNA-PK	DNA-dependent Protein Kinase
DNase	Desoxyribonuklease
DSB	Doppelstrangbruch
dTNPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
E2F-1	Transkriptionsfaktor
EC:50	mittlere effektive Konzentration
ECL	Enhanced Chemiluminescence Lösung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
Egr-1	Early Growth Response Protein 1
ELISA	Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay
eNOS	endotheliale NO-Synthase
EPAC1/2	cAMP-stimulated GDP Exchange Factors 1 and 2
Eph	Ephrine
ER α	Östrogenrezeptor α
ERK1/2	Extracellular Signal Regulated Kinase 1 and 2
Ets-1	Transkriptionsfaktor

Anhang

EZ	Endothelzellen
EZM	Extrazelluläre Matrix
FADD	Fas-associated Death Domain Protein
FAK	Focal Adhesion Kinase
FCS	Fetales Kälberserum
FGF-1/2	Fibroblast Growth Factor 1/2
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
FKHR	Forkhead in Human Rhabdomyosarcoma
FLIP	FLICE Inhibitory Protein
Fos	Gen für c-Fos (Transkriptionsfaktor)
FoxO4	Forkhead Box Protein O4
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GB	Großbritannien
Grb-2	Growth Factor Receptor gebundenes Protein 2
GSK3	Glykogensynthase-Kinase 3
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
HeLa-Zellen	Zelllinie zervikaler Karzinomzellen von Henrietta Lacks
HEK293-Zellen	Human Embryonic Kidney 293 cells
HEKB2-Zellen	HEK293 Cell Lines Stably Overexpressing FLAG-tagged β_2 -AR-GFP
Hep3B-Zellen	Human Hepatoma Cell Line
HMEC	Humane mikrovaskuläre Endothelzellen
HRP	Meerrettichperoxidase
HSPGs	Heparansulfatproteoglykane
HUVEC	Humane umbilikalvenöse Endothelzellen
IC87102	Arylmorpholinderivat, DNA-PK-Inhibitor
IC87361	Arylmorpholinderivat, DNA-PK-Inhibitor
IGF-1	Insulin like Growth Factor 1
I κ B	Inhibitor of NF κ B
I κ BK	I-kappa-B Kinase
IKK	Inhibitor of Nuclear Factor Kappa-B Kinase
ILK	Integrin-linked Kinase
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
InR	Initiator Element
Jun	Transkriptionsfaktor Jun
kDa	Kilodalton
Ktrl.	Kontrolle
Ku70/80	DNA-bindendes Protein
LT	Large T Antigen
LY294002	2-(4-Morpholinyl)-8-phenyl-1(4H)-benzopyran-4-one Hydrochloride, PI3-K-Inhibitor
M059J-Zellen	Human Glioblastoma Cells Expressing a Mutant Form of DNA-PK
M059K-Zellen	Human Glioblastoma Cells Expressing Wild-type DNA-PK
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
MC	Monoklonal
MCF-7-Zellen	Michigan Cancer Foundation - 7, Human Breast Cancer Cell Line
Med-1	Mediator of RNA Polymerase II Transcription Subunit 1
MEF-Zellen	Mouse Embryonic Fibroblast Cell Line
MEK1/2	MAPK Kinase 1 and 2
M-MLV-RT	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
mTOR/RICTOR	Mammalian Target of Rapamycin/ Rapamycin-insensitive Companion of mTOR
MTT	Methylthiazolotetrazolium
n	Anzahl
NBCS	Neugeborenenkälberserum
NF κ B	Nuclear Factor Kappa B
NHEJ	Non-homologous End Joining
NO	Stickstoffmonoxid
ns	nicht signifikant
NU7026	2-(Morpholin-4-yl)-benzo[h]chromen-4-one, DNA-PK-Inhibitor
NU7441	8-(4-Dibenzothienyl)-2-(4-morpholinyl)-4H-1-benzopyran-4-one, DNA-PK-Inhibitor
Okt-1	Octamer Binding Transcription Factor 1
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
p38MAPK	p38 Mitogen Activated Protein Kinase
p53	protein 53 (Tumorsuppressor)
PAEC	Porcine aortale Endothelzellen
PAK	p21 Activated Protein Kinase
pAkt	phosphorylierte Akt
PARP	Poly (ADP-ribose) Polymerase
PAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PC	Polyklonal
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDK 1/2	3-Phosphoinositide-dependent Protein Kinase 1 and 2

Anhang

PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1
pERK	phosphorylierte ERK
PH	Pleckstrin Homology
PI3-K	Phosphoinositide-3-Kinase
PIC	Protein Inhibitor Cocktail
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate
PKA	Protein Kinase A
PKB	Proteinkinase B (Akt)
PKC	Protein Kinase C
PLC	Phospholipase C
PIGF	Placental Growth Factor
PP2A	Protein Phosphatase 2A
pRb	Retinoblastom-Protein
PS	Penicillin/Streptomycin
Rac	GTPase aus der Rho-Subfamilie
Raf	Proteinkinase aus Rapidly Growing Fibrosarcoma
Rap1/2	Ras-proximate-1/-2, kleine GTPase
Ras	kleines G-Protein
RhoA	Ras Homolog Gene Family, Member A
RIP-1	Receptor Interacting Protein 1
RIPA-Puffer	Radioimmunoprecipitation Assay Buffer
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNasin	Ribonuklease Inhibitor
ROS	Reactive Oxygen Species
rpm	Revolutions per Minute
RSK	Ribosomal Protein S6 Kinase
RT	Raumtemperatur
RTKs	Rezeptor-Tyrosin-Kinasen
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
SIP	Sphingosine-1-phosphate
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Ser	Serin
Shc	Src Homology 2 Domain Containing Transforming Protein
siRNA	Short interfering RNA
SODD	Suppressor of Death Domains
Sos	Son Of Sevenless
Sp-1	Transkriptionsfaktor
Src	Sarcoma, Proto-oncogenic Tyrosine Kinases
SRF	c-fos Serum Response Element-binding Transcription Factor
STAT-1	Signal Transducer and Activator of Transcription A
SV40	Simian-Virus 40
Taq-DNA-Polymerase	DNA-Polymerase des Thermus aquaticus Bakterium
TBE-Puffer	Tris/Borate/EDTA-Puffer
TBS	Tris-Buffered Saline
TBS/T	Tris-Buffered Saline and Tween 20
TEMED	Tetramethylethylenediamine
TE-Puffer	Tris/EDTA-Puffer
Thr	Threonin
Tie1/2	Tyrosine Kinase with Immunoglobulin-like and EGF-like Domains 1/2
TGFβ	Transforming Growth Factor β
TNFα/β	Tumor Necrosis Factor α/ Lymphotoxin
TNFR	TNF-Rezeptor
TRADD	TNFR-1 Associated Death Domain Protein
TRAF2	TNFR Associated factor 2
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
u-PA	U-plasminogen Activator/Urokinase
VE-Cadherin	Vascular Endothelial Cadherine
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
XRCC4	DNA Repair Protein

6.2 Veröffentlichungen

Teile dieser Doktorarbeit sind in einem wissenschaftlichen Artikel veröffentlicht worden.

Originalartikel

Suppression of DNA-PKcs enhances FGF-2 dependent human endothelial cell proliferation via negative regulation of Akt.

*Mannell H**, *Hammitzsch A**, *Mettler R*, *Pohl U*, *Krötz F*
Cell Signal. 2010;22(1):88-96

* geteilte Erstautorenschaft

7 Literaturverzeichnis

1. Cines, D.B., et al., *Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders*. Blood, 1998. **91**(10): p. 3527-61.
2. Augustin, H.G., et al., *Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009. **10**(3): p. 165-77.
3. Sumpio, B.E., J.T. Riley, and A. Dardik, *Cells in focus: endothelial cell*. Int J Biochem Cell Biol, 2002. **34**(12): p. 1508-12.
4. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Angiogenesis in cancer and other diseases*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 249-57.
5. Carmeliet, P., *Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis*. Nat Med, 2000. **6**(4): p. 389-95.
6. Distler, O., et al., *The molecular control of angiogenesis*. Int Rev Immunol, 2002. **21**(1): p. 33-49.
7. Peichev, M., et al., *Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors*. Blood, 2000. **95**(3): p. 952-8.
8. Takahashi, T., et al., *Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization*. Nat Med, 1999. **5**(4): p. 434-8.
9. Heil, M. and W. Schaper, *Insights into pathways of arteriogenesis*. Curr Pharm Biotechnol, 2007. **8**(1): p. 35-42.
10. Silverman, K.J., et al., *Angiogenic activity of adipose tissue*. Biochem Biophys Res Commun, 1988. **153**(1): p. 347-52.
11. Sierra-Honigmann, M.R., et al., *Biological action of leptin as an angiogenic factor*. Science, 1998. **281**(5383): p. 1683-6.
12. Munoz-Chapuli, R., A.R. Quesada, and M. Angel Medina, *Angiogenesis and signal transduction in endothelial cells*. Cell Mol Life Sci, 2004. **61**(17): p. 2224-43.
13. Shiojima, I. and K. Walsh, *Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis*. Circ Res, 2002. **90**(12): p. 1243-50.
14. Papetti, M. and I.M. Herman, *Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis*. Am J Physiol Cell Physiol, 2002. **282**(5): p. C947-70.
15. Olsson, A.K., et al., *VEGF receptor signalling - in control of vascular function*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006. **7**(5): p. 359-71.
16. Jih, Y.J., et al., *Distinct regulation of genes by bFGF and VEGF-A in endothelial cells*. Angiogenesis, 2001. **4**(4): p. 313-21.
17. Shweiki, D., et al., *Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis*. Nature, 1992. **359**(6398): p. 843-5.
18. Cebe-Suarez, S., A. Zehnder-Fjallman, and K. Ballmer-Hofer, *The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships*. Cell Mol Life Sci, 2006. **63**(5): p. 601-15.
19. Matsumoto, T. and L. Claesson-Welsh, *VEGF receptor signal transduction*. Sci STKE, 2001. **2001**(112): p. re21.
20. Robinson, C.J. and S.E. Stringer, *The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 5): p. 853-65.
21. Byrne, A.M., D.J. Bouchier-Hayes, and J.H. Harmey, *Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF)*. J Cell Mol Med, 2005. **9**(4): p. 777-94.
22. Distler, J.H., et al., *Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis*. Q J Nucl Med, 2003. **47**(3): p. 149-61.
23. Yancopoulos, G.D., et al., *Vascular-specific growth factors and blood vessel formation*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 242-8.

24. Presta, M., et al., *Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis*. Cytokine Growth Factor Rev, 2005. **16**(2): p. 159-78.
25. Cross, M.J. and L. Claesson-Welsh, *FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition*. Trends Pharmacol Sci, 2001. **22**(4): p. 201-7.
26. Miller, D.L., et al., *Compensation by fibroblast growth factor 1 (FGF1) does not account for the mild phenotypic defects observed in FGF2 null mice*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(6): p. 2260-8.
27. Eswarakumar, V.P., I. Lax, and J. Schlessinger, *Cellular signaling by fibroblast growth factor receptors*. Cytokine Growth Factor Rev, 2005. **16**(2): p. 139-49.
28. Dono, R., et al., *Impaired cerebral cortex development and blood pressure regulation in FGF-2-deficient mice*. EMBO J, 1998. **17**(15): p. 4213-25.
29. Frater-Schroder, M., et al., *Tumor necrosis factor type alpha, a potent inhibitor of endothelial cell growth in vitro, is angiogenic in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(15): p. 5277-81.
30. Leibovich, S.J., et al., *Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor-alpha*. Nature, 1987. **329**(6140): p. 630-2.
31. Jiang, Y., et al., *Prevention of constitutive TNF receptor 1 signaling by silencer of death domains*. Science, 1999. **283**(5401): p. 543-6.
32. Hsu, H., et al., *TRADD-TRAF2 and TRADD-FADD interactions define two distinct TNF receptor 1 signal transduction pathways*. Cell, 1996. **84**(2): p. 299-308.
33. Baud, V. and M. Karin, *Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives*. Trends Cell Biol, 2001. **11**(9): p. 372-7.
34. Madge, L.A. and J.S. Pober, *A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway, activated by tumor necrosis factor or interleukin-1, inhibits apoptosis but does not activate NFkappaB in human endothelial cells*. J Biol Chem, 2000. **275**(20): p. 15458-65.
35. Zhou, Z., et al., *Role of NF-kappaB and PI 3-kinase/Akt in TNF-alpha-induced cytotoxicity in microvascular endothelial cells*. Am J Physiol Renal Physiol, 2008. **295**(4): p. F932-41.
36. Datta, S.R., et al., *Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery*. Cell, 1997. **91**(2): p. 231-41.
37. Cardone, M.H., et al., *Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation*. Science, 1998. **282**(5392): p. 1318-21.
38. Hildt, E. and S. Oess, *Identification of Grb2 as a novel binding partner of tumor necrosis factor (TNF) receptor I*. J Exp Med, 1999. **189**(11): p. 1707-14.
39. Yamada, Y., et al., *Initiation of liver growth by tumor necrosis factor: deficient liver regeneration in mice lacking type I tumor necrosis factor receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(4): p. 1441-6.
40. Bradham, C.A., et al., *Mechanisms of hepatic toxicity. I. TNF-induced liver injury*. Am J Physiol, 1998. **275**(3 Pt 1): p. G387-92.
41. Qi, J.H., et al., *Phosphoinositide 3 kinase is critical for survival, mitogenesis and migration but not for differentiation of endothelial cells*. Angiogenesis, 1999. **3**(4): p. 371-80.
42. Morello, F., A. Perino, and E. Hirsch, *Phosphoinositide 3-kinase signalling in the vascular system*. Cardiovasc Res, 2009. **82**(2): p. 261-71.
43. Katso, R., et al., *Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2001. **17**: p. 615-75.
44. Song, G., G. Ouyang, and S. Bao, *The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival*. J Cell Mol Med, 2005. **9**(1): p. 59-71.
45. Ackah, E., et al., *Akt1/protein kinase Balpha is critical for ischemic and VEGF-mediated angiogenesis*. J Clin Invest, 2005. **115**(8): p. 2119-27.

46. Stephens, L., et al., *Protein kinase B kinases that mediate phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate-dependent activation of protein kinase B*. Science, 1998. **279**(5351): p. 710-4.
47. Vanhaesebroeck, B. and D.R. Alessi, *The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB*. Biochem J, 2000. **346 Pt 3**: p. 561-76.
48. Dong, L.Q. and F. Liu, *PDK2: the missing piece in the receptor tyrosine kinase signaling pathway puzzle*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005. **289**(2): p. E187-96.
49. Hresko, R.C. and M. Mueckler, *mTOR.RICTOR is the Ser473 kinase for Akt/protein kinase B in 3T3-L1 adipocytes*. J Biol Chem, 2005. **280**(49): p. 40406-16.
50. Andjelkovic, M., et al., *Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(12): p. 5699-704.
51. Brunet, A., et al., *Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor*. Cell, 1999. **96**(6): p. 857-68.
52. Ozes, O.N., et al., *NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase*. Nature, 1999. **401**(6748): p. 82-5.
53. Dimmeler, S., et al., *Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation*. Nature, 1999. **399**(6736): p. 601-5.
54. Fulton, D., et al., *Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt*. Nature, 1999. **399**(6736): p. 597-601.
55. Alavi, A., et al., *Role of Raf in vascular protection from distinct apoptotic stimuli*. Science, 2003. **301**(5629): p. 94-6.
56. Chang, F., et al., *Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention*. Leukemia, 2003. **17**(7): p. 1263-93.
57. Vojtek, A.B., S.M. Hollenberg, and J.A. Cooper, *Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf*. Cell, 1993. **74**(1): p. 205-14.
58. Weber, C.K., et al., *Active Ras induces heterodimerization of cRaf and BRaf*. Cancer Res, 2001. **61**(9): p. 3595-8.
59. Chong, H., J. Lee, and K.L. Guan, *Positive and negative regulation of Raf kinase activity and function by phosphorylation*. EMBO J, 2001. **20**(14): p. 3716-27.
60. Zang, M., C. Hayne, and Z. Luo, *Interaction between active Pak1 and Raf-1 is necessary for phosphorylation and activation of Raf-1*. J Biol Chem, 2002. **277**(6): p. 4395-405.
61. Takahashi, T., H. Ueno, and M. Shibuya, *VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells*. Oncogene, 1999. **18**(13): p. 2221-30.
62. Reusch, H.P., et al., *Regulation of Raf by Akt controls growth and differentiation in vascular smooth muscle cells*. J Biol Chem, 2001. **276**(36): p. 33630-7.
63. Katz, M., I. Amit, and Y. Yarden, *Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1773**(8): p. 1161-76.
64. Lees-Miller, S.P., Y.R. Chen, and C.W. Anderson, *Human cells contain a DNA-activated protein kinase that phosphorylates simian virus 40 T antigen, mouse p53, and the human Ku autoantigen*. Mol Cell Biol, 1990. **10**(12): p. 6472-81.
65. Smith, G.C. and S.P. Jackson, *The DNA-dependent protein kinase*. Genes Dev, 1999. **13**(8): p. 916-34.
66. Lee, S.E., et al., *Evidence for DNA-PK-dependent and -independent DNA double-strand break repair pathways in mammalian cells as a function of the cell cycle*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(3): p. 1425-33.

67. Lucero, H., D. Gae, and G.E. Taccioli, *Novel localization of the DNA-PK complex in lipid rafts: a putative role in the signal transduction pathway of the ionizing radiation response*. J Biol Chem, 2003. **278**(24): p. 22136-43.
68. Nilsson, A., et al., *Cell cycle-dependent regulation of the DNA-dependent protein kinase*. Cell Prolif, 1999. **32**(4): p. 239-48.
69. Cai, Q.Q., et al., *Chromosomal location and expression of the genes coding for Ku p70 and p80 in human cell lines and normal tissues*. Cytogenet Cell Genet, 1994. **65**(4): p. 221-7.
70. Muller, C., et al., *Regulation of the DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) activity in eukaryotic cells*. Biochimie, 1999. **81**(1-2): p. 117-25.
71. Collis, S.J., et al., *The life and death of DNA-PK*. Oncogene, 2005. **24**(6): p. 949-61.
72. Hartley, K.O., et al., *DNA-dependent protein kinase catalytic subunit: a relative of phosphatidylinositol 3-kinase and the ataxia telangiectasia gene product*. Cell, 1995. **82**(5): p. 849-56.
73. Poltoratsky, V.P., et al., *Human DNA-activated protein kinase (DNA-PK) is homologous to phosphatidylinositol kinases*. J Immunol, 1995. **155**(10): p. 4529-33.
74. Hill, M.M., J. Feng, and B.A. Hemmings, *Identification of a plasma membrane Raft-associated PKB Ser473 kinase activity that is distinct from ILK and PDK1*. Curr Biol, 2002. **12**(14): p. 1251-5.
75. Feng, J., et al., *Identification of a PKB/Akt hydrophobic motif Ser-473 kinase as DNA-dependent protein kinase*. J Biol Chem, 2004. **279**(39): p. 41189-96.
76. Dragoi, A.M., et al., *DNA-PKcs, but not TLR9, is required for activation of Akt by CpG-DNA*. EMBO J, 2005. **24**(4): p. 779-89.
77. Ruscetti, T., et al., *Stimulation of the DNA-dependent protein kinase by poly(ADP-ribose) polymerase*. J Biol Chem, 1998. **273**(23): p. 14461-7.
78. Chan, D.W. and S.P. Lees-Miller, *The DNA-dependent protein kinase is inactivated by autophosphorylation of the catalytic subunit*. J Biol Chem, 1996. **271**(15): p. 8936-41.
79. Douglas, P., et al., *Protein phosphatases regulate DNA-dependent protein kinase activity*. J Biol Chem, 2001. **276**(22): p. 18992-8.
80. Mi, J., et al., *Activation of DNA-PK by ionizing radiation is mediated by protein phosphatase 6*. PLoS One, 2009. **4**(2): p. e4395.
81. Wechsler, T., et al., *DNA-PKcs function regulated specifically by protein phosphatase 5*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(5): p. 1247-52.
82. Bozulis, L. and B.A. Hemmings, *PIKKing on PKB: regulation of PKB activity by phosphorylation*. Curr Opin Cell Biol, 2009. **21**(2): p. 256-61.
83. Dip, R. and H. Naegeli, *More than just strand breaks: the recognition of structural DNA discontinuities by DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*. FASEB J, 2005. **19**(7): p. 704-15.
84. Cobb, L.J., et al., *Phosphorylation by DNA-dependent protein kinase is critical for apoptosis induction by insulin-like growth factor binding protein-3*. Cancer Res, 2006. **66**(22): p. 10878-84.
85. Lu, D., J. Huang, and A. Basu, *Protein kinase Cepsilon activates protein kinase B/Akt via DNA-PK to protect against tumor necrosis factor-alpha-induced cell death*. J Biol Chem, 2006. **281**(32): p. 22799-807.
86. Lees-Miller, S.P., et al., *Absence of p350 subunit of DNA-activated protein kinase from a radiosensitive human cell line*. Science, 1995. **267**(5201): p. 1183-5.
87. Ader, I., et al., *The radioprotective effect of the 24 kDa FGF-2 isoform in HeLa cells is related to an increased expression and activity of the DNA dependent protein kinase (DNA-PK) catalytic subunit*. Oncogene, 2002. **21**(42): p. 6471-9.

88. Gloe, T., et al., *The 67-kDa laminin-binding protein is involved in shear stress-dependent endothelial nitric-oxide synthase expression*. J Biol Chem, 1999. **274**(23): p. 15996-6002.
89. Ades, E.W., et al., *HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line*. J Invest Dermatol, 1992. **99**(6): p. 683-90.
90. Krotz, F., et al., *Magnetofection--a highly efficient tool for antisense oligonucleotide delivery in vitro and in vivo*. Mol Ther, 2003. **7**(5 Pt 1): p. 700-10.
91. Krotz, F., et al., *Magnetofection potentiates gene delivery to cultured endothelial cells*. J Vasc Res, 2003. **40**(5): p. 425-34.
92. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays*. J Immunol Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
93. Veuger, S.J., et al., *Radiosensitization and DNA repair inhibition by the combined use of novel inhibitors of DNA-dependent protein kinase and poly(ADP-ribose) polymerase-1*. Cancer Res, 2003. **63**(18): p. 6008-15.
94. Zubilewicz, A., et al., *Two distinct signalling pathways are involved in FGF2-stimulated proliferation of choriocapillary endothelial cells: a comparative study with VEGF*. Oncogene, 2001. **20**(12): p. 1403-13.
95. Anderson, C.W., et al., *Frameshift mutation in PRKDC, the gene for DNA-PKcs, in the DNA repair-defective, human, glioma-derived cell line M059J*. Radiat Res, 2001. **156**(1): p. 2-9.
96. Kirchgessner, C.U., et al., *DNA-dependent kinase (p350) as a candidate gene for the murine SCID defect*. Science, 1995. **267**(5201): p. 1178-83.
97. Anderson, C.W. and M.J. Allalunis-Turner, *Human TP53 from the malignant glioma-derived cell lines M059J and M059K has a cancer-associated mutation in exon 8*. Radiat Res, 2000. **154**(4): p. 473-6.
98. Buckley, R.H., *Pulmonary complications of primary immunodeficiencies*. Paediatr Respir Rev, 2004. **5 Suppl A**: p. S225-33.
99. Tsuchida, R., et al., *Detection of ATM gene mutation in human glioma cell line M059J by a rapid frameshift/stop codon assay in yeast*. Radiat Res, 2002. **158**(2): p. 195-201.
100. Nutley, B.P., et al., *Preclinical pharmacokinetics and metabolism of a novel prototype DNA-PK inhibitor NU7026*. Br J Cancer, 2005. **93**(9): p. 1011-8.
101. Staton, C.A., M.W. Reed, and N.J. Brown, *A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays*. Int J Exp Pathol, 2009. **90**(3): p. 195-221.
102. Jha, K.K., et al., *SV40-Mediated immortalization*. Exp Cell Res, 1998. **245**(1): p. 1-7.
103. Levine, A.J., *The common mechanisms of transformation by the small DNA tumor viruses: The inactivation of tumor suppressor gene products: p53*. Virology, 2009. **384**(2): p. 285-93.
104. DiTullio, R.A., Jr., et al., *53BP1 functions in an ATM-dependent checkpoint pathway that is constitutively activated in human cancer*. Nat Cell Biol, 2002. **4**(12): p. 998-1002.
105. Sedelnikova, O.A., et al., *Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unrepairable double-strand breaks*. Nat Cell Biol, 2004. **6**(2): p. 168-70.
106. van Beijnum, J.R., E. van der Linden, and A.W. Griffioen, *Angiogenic profiling and comparison of immortalized endothelial cells for functional genomics*. Exp Cell Res, 2008. **314**(2): p. 264-72.
107. Wyman, C. and R. Kanaar, *DNA double-strand break repair: all's well that ends well*. Annu Rev Genet, 2006. **40**: p. 363-83.
108. Huston, E., et al., *EPAC and PKA allow cAMP dual control over DNA-PK nuclear translocation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(35): p. 12791-6.
109. Watanabe, F., et al., *Involvement of DNA-dependent protein kinase in down-regulation of cell cycle progression*. Int J Biochem Cell Biol, 2003. **35**(4): p. 432-40.

110. An, J., et al., *Downregulation of c-myc protein by siRNA-mediated silencing of DNA-PKcs in HeLa cells*. Int J Cancer, 2005. **117**(4): p. 531-7.
111. Charron, T., N. Nili, and B.H. Strauss, *The cell cycle: a critical therapeutic target to prevent vascular proliferative disease*. Can J Cardiol, 2006. **22 Suppl B**: p. 41B-55B.
112. Friesen, C., et al., *DNA-ligase IV and DNA-protein kinase play a critical role in deficient caspases activation in apoptosis-resistant cancer cells by using doxorubicin*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(8): p. 3283-9.
113. Itoh, T. and T. Horio, *DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is cleaved during UV-induced apoptosis*. J Dermatol Sci, 2001. **25**(1): p. 72-7.
114. Bharti, A., et al., *Inactivation of DNA-dependent protein kinase by protein kinase Cdelta: implications for apoptosis*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(11): p. 6719-28.
115. Park, J., et al., *DNA-dependent protein kinase-mediated phosphorylation of protein kinase B requires a specific recognition sequence in the C-terminal hydrophobic motif*. J Biol Chem, 2009. **284**(10): p. 6169-74.
116. Meier, R., et al., *Mitogenic activation, phosphorylation, and nuclear translocation of protein kinase Bbeta*. J Biol Chem, 1997. **272**(48): p. 30491-7.
117. Panta, G.R., et al., *ATM and the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase activate NF-kappaB through a common MEK/extracellular signal-regulated kinase/p90(rsk) signaling pathway in response to distinct forms of DNA damage*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(5): p. 1823-35.
118. Ruis, B.L., K.R. Fattah, and E.A. Hendrickson, *The catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase regulates proliferation, telomere length, and genomic stability in human somatic cells*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(20): p. 6182-95.
119. Yang, Z.Z., et al., *Physiological functions of protein kinase B/Akt*. Biochem Soc Trans, 2004. **32**(Pt 2): p. 350-4.
120. Surucu, B., et al., *In vivo analysis of protein kinase B (PKB)/Akt regulation in DNA-PKcs-null mice reveals a role for PKB/Akt in DNA damage response and tumorigenesis*. J Biol Chem, 2008. **283**(44): p. 30025-33.
121. Toulany, M., et al., *Targeting of AKT1 enhances radiation toxicity of human tumor cells by inhibiting DNA-PKcs-dependent DNA double-strand break repair*. Mol Cancer Ther, 2008. **7**(7): p. 1772-81.
122. Brown, C.K., et al., *Glioblastoma cells block radiation-induced programmed cell death of endothelial cells*. FEBS Lett, 2004. **565**(1-3): p. 167-70.
123. Xu, W., et al., *Nitric oxide upregulates expression of DNA-PKcs to protect cells from DNA-damaging anti-tumour agents*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(6): p. 339-45.
124. Fuks, Z., et al., *Basic fibroblast growth factor protects endothelial cells against radiation-induced programmed cell death in vitro and in vivo*. Cancer Res, 1994. **54**(10): p. 2582-90.
125. Connelly, M.A., et al., *The promoters for human DNA-PKcs (PRKDC) and MCM4: divergently transcribed genes located at chromosome 8 band q11*. Genomics, 1998. **47**(1): p. 71-83.
126. Hosoi, Y., et al., *Up-regulation of DNA-dependent protein kinase activity and Sp1 in colorectal cancer*. Int J Oncol, 2004. **25**(2): p. 461-8.
127. Medunjanin, S., et al., *Transcriptional activation of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit gene expression by oestrogen receptor-alpha*. EMBO Rep, 2010. **11**(3): p. 208-13.
128. Chen, C.H., et al., *Fibroblast growth factor 2: from laboratory evidence to clinical application*. Curr Vasc Pharmacol, 2004. **2**(1): p. 33-43.
129. Galloway, A.M., et al., *Differential stability of the DNA-activated protein kinase catalytic subunit mRNA in human glioma cells*. Oncogene, 1999. **18**(6): p. 1361-8.

Literaturverzeichnis

130. Madhusudan, S. and I.D. Hickson, *DNA repair inhibition: a selective tumour targeting strategy*. Trends Mol Med, 2005. **11**(11): p. 503-11.
131. Willmore, E., et al., *A novel DNA-dependent protein kinase inhibitor, NU7026, potentiates the cytotoxicity of topoisomerase II poisons used in the treatment of leukemia*. Blood, 2004. **103**(12): p. 4659-65.

8 Danksagung

Dank gilt zuerst Prof. Dr. med. U. Pohl, dem Vorstand des Walter-Brendel Zentrums, Institut für experimentelle Medizin, für die Möglichkeit dieses Projekt in einem ausgezeichneten Rahmen durchführen zu dürfen.

Besonderer Dank gilt PD Dr. med. F. Krötz, meinem Arbeitsgruppenleiter und Doktorvater für die großzügige Bereitstellung der wissenschaftlichen Umgebung in der AG Krötz, in materieller und intellektueller Hinsicht.

Zu größter Dankbarkeit fühle ich mich meiner Betreuerin Dr. rer. nat. H. Mannell verpflichtet, die mich über die Jahre hinweg exzellent durch alle Höhen und Tiefen einer experimentellen Doktorarbeit begleitet hat. Eine bessere Betreuung kann man sich nicht wünschen.

Großen Dank auch an die Kleinen, die ihre Mama so oft mit mir geteilt haben.

Bedanken möchte ich mich außerdem explizit bei Frau R. Mettler, unserer MTA, die stets bereitwillig ausgeholfen und nie die Geduld verloren hat.

Den Mit-Doktoranden der AG Krötz, der AG Walzog und aus dem Walter-Brendel Zentrum danke ich für Unterstützung, Rat und angenehme Stunden.

Auch bei allen übrigen Mitarbeitern des Instituts möchte ich mich herzlich für Unterstützung und angenehmes Arbeitsklima bedanken.