

**Aus dem Zentrum der Inneren Medizin des Klinikums
der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main**

**Medizinische Klinik III
(Direktor: Prof. Dr. med. A.M. Zeiher)**

Regulation von Thioredoxin-1 durch reaktive Sauerstoffspezies:
Geringe Dosen reaktiver Sauerstoffspezies schützen Endothelzellen
vor Apoptose durch Erhöhung der
Thioredoxin-1-Expression

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

vorgelegt von Verena Tischler
aus Hanau

Frankfurt am Main 2007

Dekan: Herr Prof. Dr. J. Pfeilschifter
Referentin: Frau PD Dr. J. Haendeler
Koreferent: Herr Professor Dr. R. Brandes
Tag der mündlichen Prüfung: 07.12.2007

Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Bildung intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies.....	1
1.1.1	NAD(P)H-Oxidase	1
1.1.2	Xanthinoxidase.....	2
1.1.3	Mitochondrien.....	2
1.1.4	Zyklooxygenase	3
1.1.5	Lipoxygenase	3
1.2	Antioxidative Systeme der Zelle	4
1.2.1	Superoxiddismutase.....	4
1.2.2	Katalase	5
1.2.3	Peroxiredoxine	6
1.2.4	Das Glutathion-System	6
1.2.5	Das Thioredoxin-System	6
1.3	Apoptose.....	10
1.3.1	Allgemeines zur Apoptose.....	10
1.3.2	Apoptose in Endothelzellen.....	11
1.3.3	Proapoptotische Stimuli in Endothelzellen	12
1.3.4	Stickstoffmonoxid – wichtigster antiapoptotischer Stimulus	13
1.4	Reaktive Sauerstoffspezies und Signaltransduktion	16
1.5	ROS in der Pathogenese der Atherosklerose	18
	Ziele der Doktorarbeit.....	22
2	Material und Methoden	23
2.1	Zellkultur.....	23
2.1.1	Kultivierung der HUVEC.....	23
2.1.2	Transfektion	24
2.1.3	Applikation von laminarer Schubspannung	24
2.2	Methoden zur Proteinanalyse.....	25
2.2.1	Proteinisolation aus HUVEC	25
2.2.2	Proteinisolation aus Tierorganen.....	25
2.2.3	Gesamtproteinbestimmung	25

2.2.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	26
2.2.5	Transfer von Proteinen (Western Blot)	26
2.2.6	Immundetektion von membrangebundenen Proteinen.....	27
2.2.7	Konzentrieren von Proteinen.....	28
2.3	Methoden zur Analyse der Genexpression	28
2.3.1	Isolierung der Gesamt-RNA aus HUVEC	28
2.3.2	Bestimmung der RNA-Menge	28
2.3.3	Quantitative realtime RT-PCR.....	29
2.3.4	Analyse des PCR-Produkts im Agarosegel.....	30
2.4	Nachweis der Apoptose mittels FACS.....	31
2.5	Nachweis intrazellulärer ROS mittels FACS.....	31
2.6	ELISA.....	32
2.7	Statistik.....	32
3	Ergebnisse	33
3.1	H ₂ O ₂ und TNF α führen zur Bildung intrazellulärer ROS.....	33
3.2	Charakterisierung der Wirkung von ROS auf die Expression von Trx-1 in HUVEC.....	34
3.2.1	Geringe Dosen H ₂ O ₂ induzieren Trx-1 mRNA in HUVEC	34
3.2.2	ROS in geringer Dosis erhöhen den Trx-1 Proteingehalt in Endothelzellen.....	36
3.2.3	Trx-1 wird unter oxidativem Stress nicht sezerniert.....	38
3.2.4	TNF α beeinflusst die Stabilität von Trx-1	40
3.3	H ₂ O ₂ in geringer Dosis verhindert Apoptose in HUVEC	42
3.4	Die Reduktion der Trx-1-Expression wirkt proapoptotisch.....	44
3.5	Einfluss des Antioxidans N-Acetylcystein auf den Trx-1-Level in HUVEC.....	45
3.6	Einfluss von Schubspannung auf den Trx-1-Level in HUVEC.....	47
3.7	Exogenes Stickstoffmonoxid stabilisiert Trx-1	49
3.8	Trx-1 in eNOS-defizienten Zellen	51
3.9	Mechanismus der Trx-1-Reduktion unter oxidativem Stress.....	52

4 Diskussion	55
4.1 H ₂ O ₂ und TNF α führen zur Bildung intrazellulärer ROS.....	55
4.2 Regulation der Oxidoreduktase Trx-1 durch ROS.....	56
4.3 Geringe Dosen H ₂ O ₂ wirken antiapoptotisch über Trx-1	58
4.4 N-Acetylcystein und exogenes NO stabilisieren Trx-1 unter oxidativem Stress.....	61
4.5 Schubspannung induziert Trx-1-Protein unter basalen Bedingungen	62
4.6 Abbau von Trx-1 unter oxidativem Stress durch Cathepsin D.....	63
4.7 Mögliche Bedeutung der Ergebnisse für die Atherosklerose.....	65
Ausblick	68
5 Zusammenfassung	70
6 Summary	72
7 Literatur	73
8 Abkürzungen	91
9 Lebenslauf	94
10 Teilpublikationen	95
11 Danksagung	96
12 Ehrenwörtliche Erklärung	97

1 Einleitung

1.1 Bildung intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS, engl. *reactive oxygen species*) sind Moleküle, die molekularen Sauerstoff oder Sauerstoffradikale enthalten und von aeroben Organismen gebildet und abgebaut werden. Wichtige intrazelluläre ROS sind Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Superoxid (O_2^-) und das Hydroxylradikal (OH^\cdot). Die wichtigsten intrazellulären oxidativen Systeme sind die NAD(P)H-Oxidase, Xanthinoxidase, Glukoseoxidase, Zyklooxygenase und Lipoxygenase.

1.1.1 NAD(P)H-Oxidase

Die membranständige NAD(P)H-Oxidase produziert Superoxid und wurde zuerst in Leukozyten beschrieben (Sbarra und Karnovsky 1959). Die klassische NAD(P)H-Oxidase der Neutrophilen besteht aus verschiedenen Komponenten wie den membranständigen Flavocytochromuntereinheiten $p22^{phox}$ und $gp91^{phox}/NOX2$, den zytosolischen Faktoren $p67^{phox}$, $p47^{phox}$ und $p40^{phox}$ sowie der GTPase Rac (zur Übersicht (Hordijk PL 2006, Lambeth JD 2004)). Das gebildete Superoxid wird in den Phagosomen zu H_2O_2 reduziert und durch die Myeloperoxidase zur Hypochlorsäure modifiziert, aus der spontan das toxische, antibakterielle Hydroxylradikal entsteht (Babior BM 1999). In neueren Studien konnte gezeigt werden, dass Komponenten der NAD(P)H-Oxidase auch in Zellen der Blutgefäße vorkommen und dort an der Bildung von ROS beteiligt sind (Jones et al. 1996, Bayraktutan et al. 1997, Guzik et al. 2000, Görlach et al. 2000). Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Fibroblasten exprimieren auch NOX2 Homologe wie NOX1 und NOX4 (Sorescu et al. 2002).

Vor einiger Zeit konnte die komplexe biphasische Aktivierung von NAD(P)H-Oxidase in glatten Muskelzellen durch den neurohumoralen Faktor Angiotensin II aufgeklärt werden: Proteinkinase C aktiviert die NAD(P)H-Oxidase zur Produktion von ROS, welche über die Kinase c-Src und eine Transaktivierung

des Epidermal Growth Factor (EGF)-Rezeptors Rac-GTPase und so wiederum NAD(P)H-Oxidase aktivieren (Seshiah et al. 2002). Auch eine transkriptionelle Regulation der Enzymkomponenten wurde beschrieben wie zum Beispiel für p22^{phox} in glatten Muskelzellen (De Keulenaer et al. 1998a). Ein Anstieg der Aktivität bzw. der Expression von NAD(P)H-Oxidase in glatten Muskelzellen und Fibroblasten wird in der Pathogenese der Hypertonie, der Atherosklerose und des Diabetes mellitus beschrieben (Griendling et al. 2000, Madamanchi et al. 2005, Münzel und Harrison 1999, Warnholtz et al. 1999).

1.1.2 Xanthinoxidase

Aus Xanthindehydrogenase, einem Enzym des Purinstoffwechsels, entsteht Xanthinoxidase durch proteolytische Spaltung oder oxidative Modifikation. Beide sind an der Oxidation von Xanthin und Hypoxanthin beteiligt. Schon vor einiger Zeit wurde die Xanthinoxidase darüber hinaus als eine Quelle der Endothel abhängigen Superoxidproduktion identifiziert (Zweier et al. 1988, Phan et al. 1989). Allerdings zeigte sich bald, dass die NAD(P)H-Oxidase quantitativ eine größere Bedeutung für die ROS-Entstehung hat. Pathophysiologische Relevanz hat das Enzym Xanthinoxidase durch seine Aktivierung vor allem bei postischämischer Reperfusion (Zimmermann und Granger 1994). Es gibt Hinweise, dass die Aktivität der Xanthinoxidase bei Personen mit koronarer Herzkrankheit (KHK) erhöht ist im Vergleich zu Personen ohne KHK (Spiekermann et al. 2003).

1.1.3 Mitochondrien

Mitochondrien sind durch ihre wichtigen zellulären Funktionen wie z. B. ihre Beteiligung an der Atmungskette und der oxidativen Phosphorylierung für die Energieversorgung jeder Zelle unverzichtbar. Molekularer Sauerstoff wird in den Mitochondrien durch Übertragung von Elektronen durch die Cytochrom-c-Oxidase zu Wasser reduziert. Ein kleiner Teil des molekularen Sauerstoffs wird jedoch unvollständig metabolisiert. Es entstehen Superoxidanionen (Boveris

und Chance 1973, Nohl und Hegner 1978). Zwar verfügen Mitochondrien über eine eigene Isoform der Superoxiddismutase (siehe 1.2.1), doch das entstehende Wasserstoffperoxid kann in das Zytosol diffundieren. Beschrieben wurde, dass Wasserstoffperoxid auch eine Rolle in der Kommunikation zwischen Zytosol und Mitochondrium spielt: So führt zum Beispiel ein erhöhtes Angebot an Pyruvat H_2O_2 -abhängig zur Regulation des Glukosestoffwechsels (Nemoto et al. 2000).

1.1.4 Zyklooxygenase

Die beiden Isoformen der Zyklooxygenase (COX), die konstitutiv exprimierte COX-1 sowie die induzierbare COX-2, konvertieren Arachidonsäure zu Prostaglandinendoperoxiden unter Einbau von zwei Sauerstoffmolekülen. Das entstandene Prostaglandin G_2 wird durch die Peroxidasefunktion der Zyklooxygenase zum instabilen Prostaglandin H_2 modifiziert. Aus diesem werden über verschiedene Wege Gewebshormone wie die Thromboxane sowie die Prostaglandine E_2 , I_2 , $F_2\alpha$ und D_2 gebildet. Hervorzuheben für die Gefäßbiologie sind hier vor allem das Thromboxan A_2 , welches Vasokonstriktion und Thrombozytenaggregation fördert, und das Prostaglandin I_2 , dessen Funktionen Vasodilatation und Hemmung der Plättchenaggregation sind. Mediert werden diese Effekte über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR).

1.1.5 Lipoxygenase

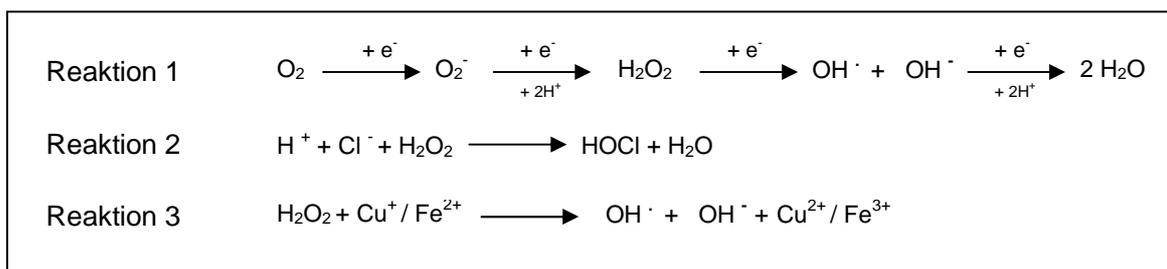
Eine weitere Gruppe von Enzymen zur Modifikation der Arachidonsäure sind die Lipoxygenasen. Der Multienzymkomplex Lipoxygenase-5 führt zur Bildung eines Hydroperoxids aus Arachidonsäure. Daraus entstehen die Leukotriene A_4 , C_4 , D_4 und E_4 . Leukotriene sind sehr starke Bronchokonstriktoren. Mit den Prostaglandinen und Thromboxanen bilden sie die Gruppe der Eikosanoide, die an Inflammation und Überempfindlichkeitsreaktionen beteiligt sind.

1.2 Antioxidative Systeme der Zelle

Zu den intrazellulären antioxidativen Systemen zählen die Enzyme Superoxiddismutase, Katalase, die Gruppe der Peroxiredoxine, das Glutathion-System und das Thioredoxin-System, welches an dieser Stelle ausführlicher besprochen werden soll. Antioxidative Wirkung haben auch niedermolekulare Substanzen wie die Vitamine C und E, Ubiquinon und Liponsäure, auf die hier nicht näher eingegangen wird.

1.2.1 Superoxiddismutase

Durch Übertragung eines Elektrons auf molekularen Sauerstoff entsteht Superoxid (Erster Schritt von Reaktion 1). Das relativ wenig reaktive freie Radikal kann Lipidmembranen nicht passieren. Das Enzym Superoxiddismutase (SOD) katalysiert die Reaktion von O_2^- zu H_2O_2 und molekularem Sauerstoff (siehe Abbildung 1.1A) (McCord und Fridovich 1969). Wasserstoffperoxid ist membranpermeabel und somit nicht an Kompartimente gebunden. Es ist selbst kein freies Radikal, trägt aber zur Bildung von ROS wie Hypochlorsäure (HOCl) oder Hydroxylradikalen bei (Reaktionen 2 und 3). Letztere entstehen durch Oxidation von Übergangsmetallen wie Cu^+ und Fe^{2+} durch H_2O_2 (zur Übersicht (Nordberg und Arnér 2001).



modifiziert nach Nordberg und Arnér 2001

Eukaryotische Zellen enthalten die mitochondriale tetramerische Mn^{2+} -SOD und die zytosolische dimerische Cu^+/Zn^{2+} -SOD. Mn^{2+} -SOD-Knockout-Mäuse sterben kurz nach der Geburt oder leiden unter schweren neurodegenerativen Erkrankungen (Melov et al. 1998). Die mitochondriale Mn^{2+} -SOD ist induzierbar

durch oxidativen Stress und die Oxidoreduktase Thioredoxin (Das et al. 1997). Interessanterweise kann eine Mutation im $\text{Cu}^+/\text{Zn}^{2+}$ -SOD-Gen beim Menschen zur Familiären Amyotrophen Lateralsklerose führen (Rosen et al. 1993).

1.2.2 Katalase

Das Enzym Katalase beschleunigt die Reaktion von Wasserstoffperoxid zu Wasser und molekularem Sauerstoff (siehe Abbildung 1.1B). Damit verhindert Katalase effektiv die durch Metallionen katalysierte Fenton-Reaktion von Wasserstoffperoxid zum Hydroxylradikal (Reaktion 3). Katalase ist vor allem in Zellorganellen lokalisiert, in denen viel Wasserstoffperoxid gebildet wird wie zum Beispiel den Peroxisomen (Kirkman und Gaetani 1984, zur Übersicht (Nordberg und Arnér 2001)).

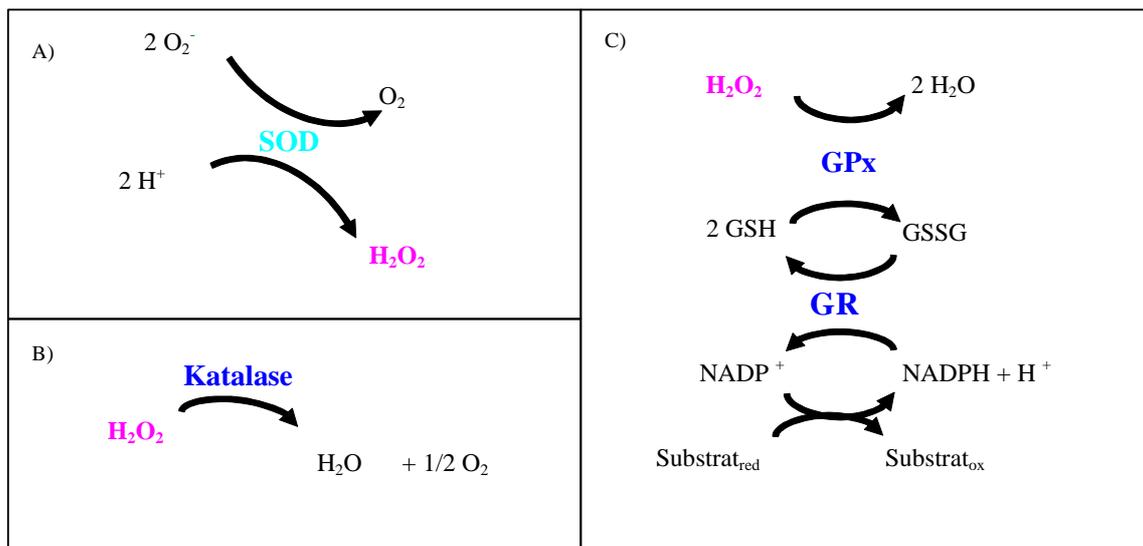


Abbildung 1.1: Schema einiger antioxidativer Systeme der Zelle (modifiziert nach Nordberg und Arnér 2001)

A) zeigt schematisch die Funktion der Superoxiddismutase (SOD). B) Katalase katalysiert den Abbau von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff. C) Glutathion-Peroxidase (GPx) reduziert H_2O_2 und oxidiert Glutathion (GSSG), das von Glutathion-Reduktase (GR) wieder reduziert wird (GSH).

1.2.3 Peroxiredoxine

Die vor einigen Jahren beschriebene Gruppe der Peroxiredoxine reduziert Peroxide direkt. Die Oxidoreduktase Thioredoxin und weitere Reduktasen regenerieren oxidierte Peroxiredoxine (Chae et al. 1999). Peroxiredoxine können durch p53 sowie H₂O₂ induzierte Apoptose verhindern. Sie greifen oberhalb des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 in die Apoptosemodulation ein (Zhang et al. 1997).

1.2.4 Das Glutathion-System

Das Glutathion-System beinhaltet die Enzyme Glutathion-Peroxidase und Glutathion-Reduktase sowie das Tripeptid Glutathion. Als Reduktionsäquivalente dienen NADPH/NADP⁺ (siehe Abbildung 1.1C). Allen Glutathion-Peroxidasen ist die Reduktion von H₂O₂ zu H₂O unter Verwendung von Glutathion als Substrat gemeinsam. Glutathion wird dann wiederum durch die Glutathion-Reduktase restituiert. Neben H₂O₂ können auch andere Peroxide reduziert werden, z. B. Lipidperoxide der Zellmembran zu Alkoholen. Glutathion (GSH) ist in millimolarer Konzentration in allen aeroben Zellen enthalten (zur Übersicht (Nordberg und Arnér 2001)).

1.2.5 Das Thioredoxin-System

Das ubiquitär exprimierte Thioredoxin-1 (Trx-1) hat zentrale Bedeutung als Protein-Disulfid-Reduktase und Redoxregulator. Zusammen mit dem Selenoprotein Thioredoxin-Reduktase (TrxR) und NADPH/NADP⁺ bildet Trx-1 das Thioredoxin-1-System (Holmgren A 1989, zur Übersicht (Nordberg und Arnér 2001), siehe Abbildung 1.2A). Auf die Thioredoxin-Reduktase soll nicht weiter eingegangen werden. Die Thioredoxin-Familie besteht aus dem zytosolischen Trx-1, dem mitochondrialen Trx-2 und SpTrx, welches ausschließlich in humanen Spermatozyten exprimiert wird (Spyrou et al. 1997, Damdimopoulos et al. 2002, Miranda-Vizuete et al. 2001). Ihnen gemeinsam ist ein aktives Zentrum mit der Aminosäuresequenz Cys-Gly-Pro-Cys, also einem

Disulfid, das zu einem Dithiol reduziert werden und so an Redoxreaktionen teilnehmen kann (siehe Abbildung 1.2 B). Trx-1 wurde zum ersten Mal 1964 von Laurent et al. als Wasserstoff-Donor für die Ribonukleotid-Reduktase in der Desoxyribonukleotidsynthese von *E. coli* beschrieben (Laurent et al. 1964). Viele Proteine im Zellinneren enthalten freie Thiolgruppen, deren Oxidation zu einer veränderten biologischen Funktion führen kann (Butterfield et al. 1998). Das Trx-System überführt Proteine wieder in den reduzierten Zustand. Solche Redoxreaktionen sind schnell, reversibel und ein wichtiger Mechanismus in der Regulation der Signaltransduktion (zur Übersicht (Fujino et al. 2006)).

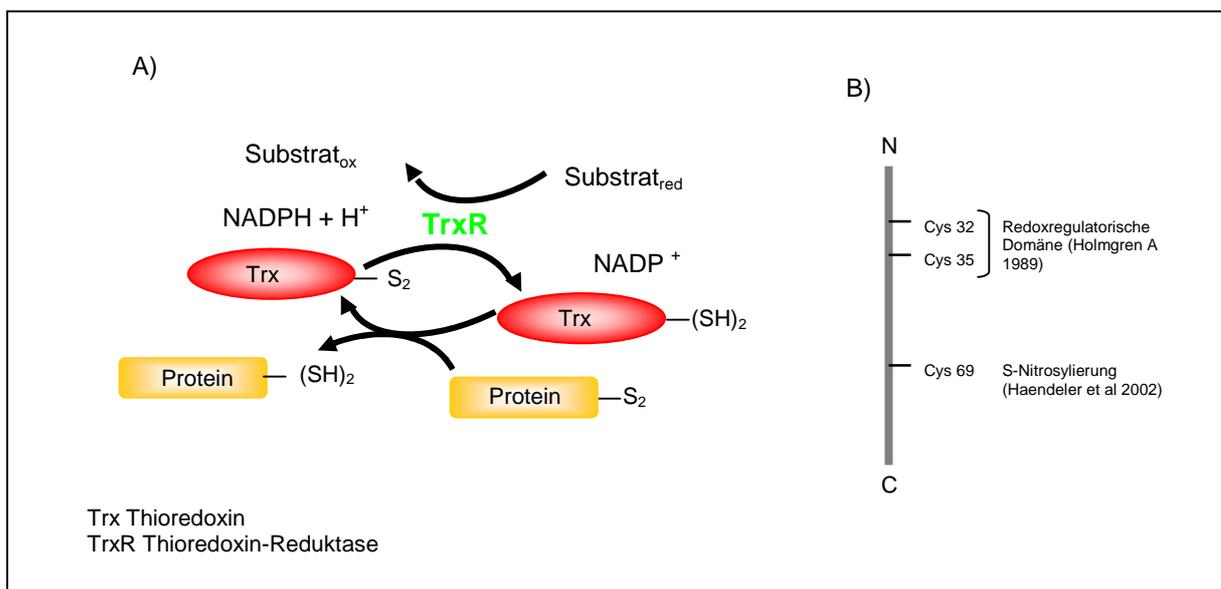


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des Thioredoxin-Systems (modifiziert nach Holmgren A 1989)

Trx hat vielfältige Funktionen (siehe Abbildung 1.3). Es gehört zum „early pregnancy factor“ Komplex (Clarke et al. 1991). Ein Ausschalten der Trx-Genfunktion im Mausmodell führt zum Absterben der Embryonen direkt nach der Implantation (Matsui et al. 1996).

In atherosklerotischen Plaques wurde vermehrt Trx-1 sowohl in Endothelzellen als auch in Makrophagen nachgewiesen (Takagi et al. 1998). Welche Bedeutung es für die in der Plaque ablaufenden Prozesse und die Atheroskleroseprogression hat, ist bislang nicht befriedigend geklärt (Takagi et al. 1998). Eine Überexpression von Thioredoxin in transgenen Mäusen mindert

Schäden durch fokale zerebrale Ischämien (Takagi et al. 1999). Thioredoxin schützt aber auch Neuroblastomzellen vor Apoptose durch oxidativen Stress (Andoh et al. 2002). Die Zytotoxizität von $\text{TNF}\alpha$ auf U937 Zellen wird durch Trx-1 gemindert (Matsuda et al. 1991). Darüber hinaus ist Thioredoxin ein physiologischer Inhibitor der Apoptosis signal-regulating kinase-1 (ASK-1) (Saitoh et al. 1998), die an der Vermittlung der stressaktivierten Apoptose beteiligt ist (Ichijo et al. 1997). Reduziertes Trx-1 bildet mit ASK-1 einen Komplex (Saitoh et al. 1998). Proapoptotische Stimuli wie $\text{TNF}\alpha$ und ROS lösen Trx-1 aus diesem Komplex, und es kommt zur Apoptose (Saitoh et al. 1998). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Trx-1 in Endothelzellen die Ubiquitylierung und Degradierung von ASK-1 fördert (Liu et al. 2002).

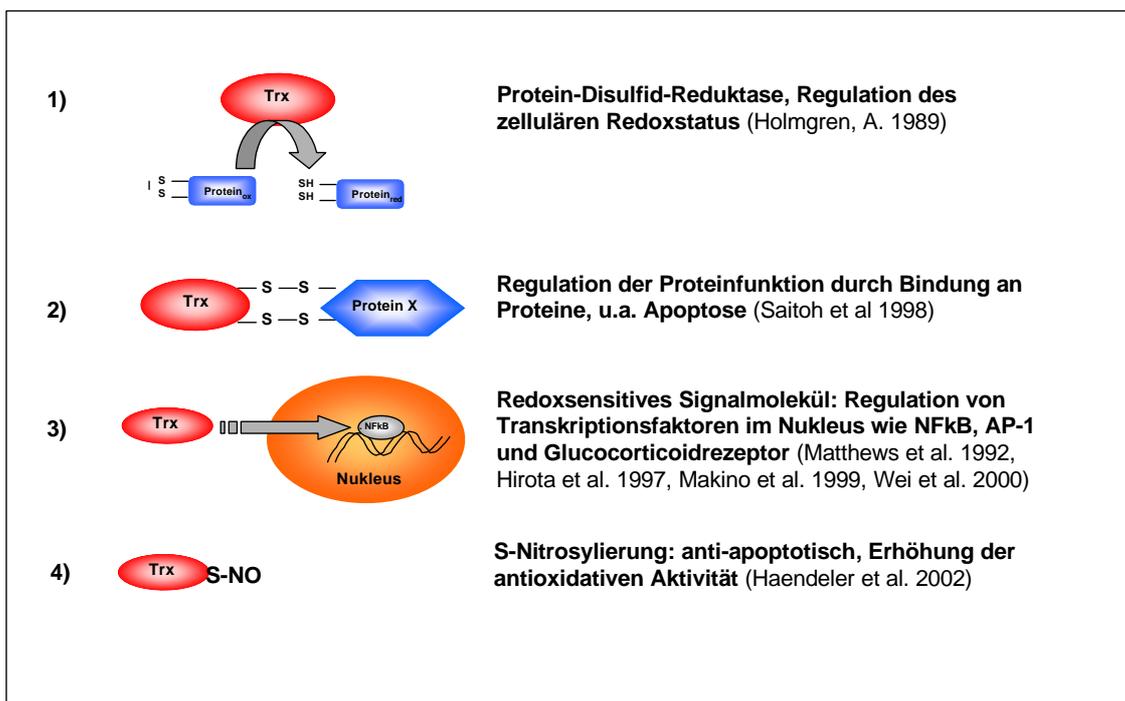


Abbildung 1.3: Funktionen von Trx-1

Auch NFκB, ein Transkriptionsfaktor, der die Expression zahlreicher inflammatorischer und proliferativer Gene moduliert, wird redoxreguliert (Toledano und Leonard 1991). Im Zytosol wird die Aktivierung von NFκB durch

Trx-1 inhibiert (Schenk et al. 1994). Im Nukleus ermöglicht Trx-1 die Bindung von NF κ B an DNA durch Reduktion eines Cysteinylrests (Matthews et al. 1992). Offensichtlich übermittelt Trx-1 auch als redoxsensitives Signalmolekül Informationen aus dem Zytosol in den Nukleus: Oxidativer Stress durch ionisierende Strahlung führt zur Translokation von Trx-1 in den Nukleus (Wei et al. 2000). Trx-1 aktiviert durch Bindung mit seinem redoxaktiven Zentrum an den Redoxfaktor-1 (ref-1) den Transkriptionsfaktor AP-1 (Hirota et al. 1997). Der Glukokortikoidrezeptor, ein weiterer Transkriptionsfaktor, wird ebenfalls durch redoxabhängige Translokation von Trx-1 in den Nukleus reguliert (Makino et al. 1999).

Der Wachstumsfaktor "adult T cell leukemia-derived factor" (ADF) wurde als humanes Trx-1 identifiziert (Tagaya et al. 1989). Weitere Studien ergaben, dass Trx-1 von verschiedenen Zellen des Immunsystems und Tumorzellen sezerniert werden kann (Rubartelli et al. 1992). Extrazelluläres Trx-1 hat immunomodulierende Eigenschaften. Es wirkt als Wachstumsfaktor und Kozytokin auf Lymphozyten und Tumorzellen (Wakasugi et al. 1990) sowie als chemotaktischer Faktor für Neutrophile, Monozyten und T-Zellen (Bertini et al. 1999). Trx 80, eine verkürzte Spleißvariante ohne Redoxfunktion, wird von Monozyten und Makrophagen sezerniert und hat immunostimulierende Wirkung (Pekkari et al. 2000).

In einer Reihe von Studien wurde die Rolle von Trx-1 in der Pathogenese von verschiedenen Erkrankungen untersucht, z B. von Krebs, rheumatoider Arthritis, Herzinsuffizienz, instabiler Angina pectoris und HIV (Welsh et al. 2002, Matsutani et al. 2001, Yoshida et al. 1999, Kishimoto et al. 2001, Hokamaki et al. 2005, Newman et al. 1994). Rekombinantes Trx-1 vermindert beispielsweise die Expression von HIV in humanen Makrophagen zu einem höheren Grad als andere Antioxidantien (Newman et al. 1994). Trotzdem haben AIDS-Kranke mit chronisch erhöhten Trx-1-Plasmaspiegeln eine verkürzte Lebenserwartung, die auf eine schlechtere Abwehr opportunistischer Infektionen zurückgeführt wird (Nakamura et al. 2001).

1.3 Apoptose

Ist das Gleichgewicht zwischen den intrazellulären ROS-bildenden und ROS-abbauenden Systemen gestört, so kommt es zur Änderung des Redoxstatus der Zelle und damit zum oxidativen Stress (Parman et al. 1999). Die exzessive Erhöhung der Konzentration reaktiver Sauerstoffspezies verursacht direkte oxidative Schäden von DNA, Lipiden und Proteinen (Beckman und Ames 1997, Marnett LJ 2000, Butterfield et al. 1998, Cai und Harrison 2000). Durch Verschlechterung der zellulären Funktion und Aktivierung verschiedener Mechanismen kann es zur Induktion von Apoptose kommen (Buttke und Sandstrom 1994).

1.3.1 Allgemeines zur Apoptose

Apoptose oder programmierter Zelltod ist ein wichtiger biologischer Mechanismus, um beschädigte oder nicht mehr benötigte Zellen zu eliminieren. Dies ist von großer Bedeutung unter physiologischen Bedingungen wie zum Beispiel der Embryonalentwicklung und der Gewebserneuerung (Jacobson et al. 1997). Eine Fehlregulation der Apoptose scheint in der Pathogenese einer Vielzahl von Erkrankungen wie Krebs, HIV, Autoimmunerkrankungen, M. Alzheimer und Atherosklerose eine Rolle zu spielen (Thompson CB 1995, Duke et al. 1997, Rössig et al. 2001). Die Zelle verliert zunächst ihre Zellverbindungen, wird kleiner und löst sich aus dem Zellverband. Es kommt zu Veränderungen der Zellmembran mit Ausbildung kleiner Blasen, Verlust der Mikrovilli und zur Exposition von Phosphatidylserin an der Außenseite der Zellmembran. Außerdem erfolgt eine Kondensation des Chromatins, welches sich in den Randbereichen des Zellkerns sammelt. Die DNA wird durch Endonukleasen in spezifische Fragmente gespalten (180 Basenpaare und Vielfache davon) und der Nukleus wird fragmentiert. Die Zelle zerfällt in viele apoptotische Partikel. Im Gegensatz zur Nekrose, der zweiten bekannten Form des Zelltods, ist der programmierte Zelltod ein nichtinflammatorischer Prozess (Kerr et al. 1972). Die Apoptoseinduktion erfolgt durch unterschiedliche Signale, die in der Zelle zur Aktivierung der Caspase-Kaskade führen.

Caspasen, abgeleitet von engl. *cysteiny* *aspartate-specific proteinases*, sind Cystein-Proteasen, die hinter der Aminosäure Aspartat schneiden können. Horvitz et al. entdeckten zuerst, dass in der Entwicklung des Fadenwurms *C. elegans* bestimmte cell death genes (Ceds) beteiligt sind, die zur Apoptose führen (Horvitz et al. 1982). Homologe dieser in der Evolution konservierten Apoptose kontrollierenden ceds wurden auch in allen bekannten Zellen von Vertebraten gefunden (zur Übersicht (Hengartner MO 2000)).

1.3.2 Apoptose in Endothelzellen

Endothelzellen kleiden alle Blutgefäße von innen aus. Wie in anderen Zellen auch kann in Endothelzellen die Caspase-Kaskade durch Todesrezeptoren wie den Fas/CD95- und den TNF α -Rezeptor sowie auf mitochondrialem Weg aktiviert werden. Nach Bindung des Rezeptoragonisten kommt es zur Rekrutierung von intrazellulären Proteinen zum „death inducing signalling complex“ (DISC), der Caspase-8 aktiviert. Unter Einbeziehung weiterer Caspasen wird die finale Caspase-3 aktiviert (siehe Abbildung 1.5). Substrate dieser Protease sind z.B. das DNA-Reparaturenzym Poly-ADP-Ribosylpolymerase (PARP), welches über eine Spaltung durch Caspase-3 inaktiviert wird, und der DNA Fragmentierungsfaktor (DFF), der nach Abspaltung seines Inhibitors (ICAD) durch Caspase-3 aktiviert wird (Liu et al. 1997, Enari et al. 1998). Der mitochondriale Weg kann durch Caspase-8 oder durch Stimuli wie ROS, das Antionkoprotein p53, Ca²⁺ oder das Signalmolekül Ceramid eingeschlagen werden und führt über Freisetzung von Cytochrom c zur Zusammenlagerung von Caspase-9 mit Apaf-1 (apoptosis activating factor-1) und somit zur Aktivierung der finalen Caspase-3 (Green und Reed 1998).

Eine Beteiligung der Endothelzellapoptose an der Entstehung der Atherosklerose ist wahrscheinlich: In Femoralarterien und Aorten alter Affen wurde eine vermehrte Endothelzellapoptose gefunden, die vermutlich sehr frühe Stadien der Atherosklerose darstellt (Asai et al. 2000). Apoptotische Endothelzellen wirken proadhesiv auf Thrombozyten (Bombeli et al. 1997). Zudem konnte gezeigt werden, dass viele Risikofaktoren für die Atherosklerose in vitro proapoptotisch auf Endothelzellen wirken (siehe unten).

1.3.3 Proapoptotische Stimuli in Endothelzellen

Reaktive Sauerstoffspezies wie Superoxidanionen, H_2O_2 und Hypochlorsäure induzieren Apoptose in Endothelzellen (Dimmeler et al. 1999b, Hermann et al. 1997, Vissers et al. 1999, Dimmeler und Zeiher 2000). ROS sind in der Lage, direkt die Freisetzung von Cytochrom c in das Zytosol zu triggern und so Caspase-3 zu aktivieren (Green and Reed 1998, zur Übersicht (Hampton et al. 1998)) oder indirekt z.B. über die Herunterregulation von bcl-2 (Aoki et al. 2001).

Das Zytokin Tumornekrosefaktor ($TNF\alpha$) ist beteiligt an Entzündungsreaktionen, Sepsis und Apoptose sowie der Regulation der Genexpression (Robaye et al. 1991, Baker und Reddy 1996, Baker und Reddy 1998). Es wird vor allem von Makrophagen, T-Zellen, glatten Muskelzellen und Fibroblasten produziert. $TNF\alpha$ aktiviert über den $TNF\alpha$ -Rezeptor und assoziierte Proteine die Caspase-Kaskade und führt zu intrazellulärem Stress (van der Poll und Lowry 1995, Matsubara und Ziff 1986, Larrick und Wright 1990, Murphy et al. 1992). In vielen Zelltypen konnten Mitochondrien als Quelle $TNF\alpha$ induzierter Produktion reaktiver Sauerstoffspezies ausfindig gemacht werden (Schulze-Osthoff et al. 1993, Cai und Jones 1998). Wie Corda et al. zeigen konnten, wird in Endothelzellen die mitochondriale ROS-Produktion nach Stimulation mit $TNF\alpha$ durch Ceramid vermittelt (Corda et al. 2001). Es führen jedoch nicht alle durch $TNF\alpha$ gebildeten ROS zum programmierten Zelltod: Durch Rac1 regulierte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies aktiviert transient in Endothelzellen den redoxsensitiven Transkriptionsfaktor $NF\kappa B$, der unter anderem antiapoptotische Proteine wie c-IAP reguliert und proliferativ wirkt (Deshpande et al. 2000). ROS können als Antwort auf einen einzigen Stimulus also sowohl pro- als auch antiapoptotisch wirken.

Weitere Stimuli, die Endothelzellapoptose induzieren können, sind Angiotensin II und Epinephrin (Dimmeler et al. 1997c, Li et al. 1999b, Romeo et al. 2000).

In die Intima eingelagertes LDL wird oxidativ modifiziert und stellt einen proatherogenen Risikofaktor dar. Das entstandene so genannte oxLDL ist ein komplexes Gemisch verschiedener biologisch aktiver Fettderivate und enthält

unter anderem Lipidhydroperoxide und Lysophospholipide. Diese modifizierten Lipide können die Expression von Adhäsionsmolekülen, Chemokinen und Zytokinen induzieren (zur Übersicht (Steinberg D 1997)).

Von verschiedenen Gruppen wurde die proapoptotische Wirkung von oxLDL auf Endothelzellen demonstriert (Dimmeler et al. 1997a, Harada-Shiba et al. 1998, Li et al. 1999a). OxLDL wird von Endothelzellen über den LOX-1 Rezeptor aufgenommen und bedingt eine Sensibilisierung der Endothelzellen gegenüber proapoptotischen Stimuli (Sata und Walsh 1998a, Sata und Walsh 1998b).

Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass auch Alterung Endothelzellen gegenüber proapoptotischen Stimuli wie $TNF\alpha$ und oxidiertem LDL sensibilisiert (Hoffmann und Haendeler 2001a).

Ein hoher Glucosespiegel begünstigt die Endothelzellapoptose (Baumgartner-Parzer et al. 1995). Ho et al. konnten zeigen, dass die durch hohe Glukosespiegel bedingte Endothelzellapoptose durch eine Aktivierung der Proteinkinase JNK und Caspase-3 zu erklären ist (Ho et al. 2000). Der Entzug von Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel FGF führt ebenfalls zur Endothelzellapoptose (Araki et al. 1990). Angiogeneseinhibitoren wie Thrombospondin-1, Angiostatin und Endostatin können Apoptose in Endothelzellen induzieren (Guo et al. 1997, Dhanabel et al. 1999, Claesson-Welsh et al. 1998). Auch der Faktor TGF β , der endotheliales Wachstum inhibiert, induziert Apoptose in Endothelzellen (Tsukada et al. 1995).

1.3.4 Stickstoffmonoxid – wichtigster antiapoptotischer Stimulus

Furchgott und Zawadski veröffentlichten im Jahr 1980 eine Arbeit, in der gezeigt wurde, dass eine intakte Endothelzellschicht Bedingung für die durch Acetylcholin vermittelte Relaxation glatter Gefäßmuskelzellen ist (Furchgott und Zawadski 1980). Der „Endothelium-derived relaxing factor“ (EDRF) wurde 1987 als das Signalmolekül Stickstoffmonoxid (NO) identifiziert (Palmer et al. 1987, Ignarro et al. 1987). Das Flavoenzym NO-Synthase katalysiert die Bildung von NO aus L-Arginin (Moncada und Higgs 1993). Es sind drei Isoformen der NO-Synthase bekannt: die neuronale NOS I (nNOS), die induzierbare NOS II

(iNOS) und die endotheliale NOS III (eNOS). Die eNOS wird konstitutiv in Endothelzellen exprimiert und setzt Ca^{2+} -abhängig NO im Picomolbereich frei. Zusätzlich kann die eNOS aber auch Ca^{2+} -unabhängig über Phosphorylierung durch die Proteinkinase Akt aktiviert werden (Dimmeler et al. 1999a).

NO wirkt über verschiedene Mechanismen: Die reversible S-Nitrosylierung, also die Bindung von NO an die schwefelhaltige Aminosäure Cystein, führt zur Modulation der Aktivität und Funktion z. B. von Transkriptionsfaktoren wie c-Jun und AP-1 und Proteinkinasen wie JNK, c-Src und EGF-Rezeptor (Stamler et al. 2001). Der antiapoptotische Effekt von NO in Endothelzellen wird unter anderem durch S-Nitrosylierung und damit Regulation von Caspase-3 und der antiapoptotischen Oxidoreduktase Thioredoxin-1 vermittelt (Dimmeler et al. 1997b, Rössig et al. 1999, Haendeler et al. 2002).

Ein weiterer wichtiger Mechanismus ist die Bindung von NO an eisenhaltige Proteine. Von großer Bedeutung für die Gefäßphysiologie ist hier die Relaxation von glatten Muskelzellen durch Stimulierung der löslichen Guanylylzyklase durch endotheliales NO (Moncada und Higgs 1993). eNOS-defiziente Mäuse weisen im Vergleich zu Wildtypmäusen eine Hypertonie und eine beschleunigte Entstehung atherosklerotischer Läsionen auf (Huang et al. 1995, Moroi et al. 1998). Isolierte Zellen aus eNOS-defizienten Mäusen zeigen eine erhöhte Sensitivität gegenüber Apoptose (Hoffmann und Haendeler 2001a). Gealterte Endothelzellen zeigen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber proapoptotischen Stimuli und eine verminderte eNOS Expression (Hoffmann und Haendeler 2001a).

Durch Endothelzellen produziertes NO hat weitere wichtige Effekte: Es vermindert die Thrombozytenaggregation und inhibiert die Proliferation glatter Muskelzellen (Moncada et al. 1991). Verschiedene Gruppen konnten zeigen, dass NO in Endothelzellen die Genexpression proinflammatorischer Faktoren wie VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1) und MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) reguliert und den Transkriptionsfaktor $\text{NF}\kappa\text{B}$ moduliert (Khan et al. 1996, De Caterina et al. 1995, Zeiher et al. 1995, Peng et al. 1995).

An dieser Stelle soll noch erwähnt werden, dass hohe Konzentrationen von NO zur Bildung von zytotoxischem Peroxynitrit führen können. Peroxynitrit verursacht über verschiedene Zwischenreaktionen die Inaktivierung von vielen Enzymen, z.B. von Proteinkinasen. NO wird daher auch als zweischneidiges Schwert für das Überleben von Endothelzellen bezeichnet (Dimmeler und Zeiher 1997).

Ein potenter Stimulus für die endotheliale Produktion von NO ist die Schubspannung. Die Kreislaufparameter Blutdruck, Herzfrequenz und Herzaktion resultieren in zeitlich veränderlichen Kräften auf das Gefäßsystem. Es treten intramurale Kräfte durch radiale und longitudinale Dehnung während der Systole sowie Schubspannung durch das strömende Blut auf. Radiale und longitudinale Dehnung betreffen die gesamte Gefäßwand. Die Endothelzellschicht ist zusätzlich aufgrund ihrer Lokalisation direkt dem luminalen Blutfluss und somit der Schubspannung ausgesetzt. Die Schubspannung ist abhängig von Gefäßradius, Blutviskosität und Menge des Blutflusses. Je nach Gefäßabschnitt handelt es sich um laminare oder turbulente Schubspannung. Laminare Schubspannung ist ein wichtiger atheroprotektiver Faktor (Traub et al. 1998). In Gefäßbiegungen und Gefäßgabelungen überwiegt turbulenter oder niedriger Blutfluss (Caro et al. 1969). Diese Regionen sind besonders häufig von Atherosklerose unabhängig von Risikofaktoren betroffen (Ku et al. 1985, Asakura et al. 1990). Verschiedene atheroprotektive Mechanismen wurden bereits charakterisiert: So wirkt Schubspannung durch die verminderte Expression von Leukozytenadhäsionsfaktoren wie VCAM-1 antiinflammatorisch (Korenaga et al. 1997). Die Freisetzung von Prostazyklin und NO hemmt die Thrombozytenaggregation (Frangos et al. 1985, Rubanyi et al. 1986). Schubspannung schützt das Endothel vor Apoptose durch proatherosklerotische Faktoren wie $\text{TNF}\alpha$ und oxLDL (Dimmeler et al. 1996, Dimmeler et al. 1999b). Der antiapoptotische Effekt der Schubspannung wird durch antioxidative und NO-abhängige Mechanismen vermittelt wie die Aktivierung der Superoxiddismutase und antioxidativer Gene sowie die

Aktivierung der eNOS über die Proteinkinase Akt (Dimmeler et al. 1999a, Dimmeler et al. 1999b, Chen et al. 2003).

1.4 Reaktive Sauerstoffspezies und Signaltransduktion

Lange Zeit nahm man an, der Effekt reaktiver Sauerstoffspezies beruhe hauptsächlich auf der zufälligen Zerstörung von DNA, Lipiden und Proteinen. Es gibt mittlerweile jedoch zahlreiche Hinweise darauf, dass ROS Mediatoren intrazellulärer Signalkaskaden (engl. second messenger) und Regulatoren der Genexpression sind. Die spezifische Antwort auf ROS ist abhängig vom Zelltyp, Redoxstatus, von der Art und Menge der ROS und ihrer subzellulären Lokalisation (Rao und Berk 1992, Sundaresan et al. 1995, Yeh et al. 1999, Guyton et al. 1996, zur Übersicht (Dalton et al. 1999), Finkel T 1998, Suzuki et al. 1996).

Die Stimulation zellulärer Oberflächenrezeptoren führt zur Aktivierung verschiedener Mechanismen der Signaltransduktion wie z. B. der Aktivierung von Tyrosinkinasen, Serin/Threonin-Kinasen, Phospholipasen sowie kalziumabhängiger Wege. Für eine Reihe von Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Hormonen und Neurotransmittern konnten reaktive Sauerstoffspezies als second messenger nachgewiesen werden (Suzuki et al. 1996, Adler et al. 1999).

Zu den Tyrosinkinasen zählen Zellmembranrezeptoren wie der Epidermal Growth Factor (EGF)-Rezeptor und der Platelet Derived Growth Factor (PDGF)-Rezeptor. Die Transaktivierung dieser Rezeptoren verläuft redoxsensitiv (Heeneman et al. 2000, Ushio-Fukai et al. 2001). In glatten Muskelzellen induziert H_2O_2 die Phosphorylierung des EGF-Rezeptors (Rao GN 1996). Wie gezeigt werden konnte, ist die Proteinkinase c-Src für diese ROS-medierte Phosphorylierung des EGF-Rezeptors verantwortlich (Ushio-Fukai et al. 2001).

Die Familie der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) beinhaltet regulatorische Schlüsselproteine, welche Proliferation, Apoptose und die Antwort auf Stress kontrollieren. Vier Gruppen von MAPK sind bekannt: p38 Kinase, ERK1/2 (p42/44 MAPK), JNK und BMK. In Endothelzellen kann die Aktivierung

von ERK1/2 redox-abhängig induziert und durch Antioxidantien gehemmt werden (Yeh et al. 1999). Auch eine Redoxregulation von p38 Kinase wurde beschrieben (Huot et al. 1997). JNK, welches den Transkriptionsfaktor c-Jun phosphoryliert und an der Apoptosevermittlung vieler Zellen beteiligt ist, wird durch H_2O_2 aktiviert (Hojo et al. 2002).

Weitere Beispiele für die Beteiligung von ROS an der Signaltransduktion:

- § VEGF (vascular endothelial growth factor) führt in Endothelzellen zur Bildung von O_2^- über die NAD(P)H-Oxidase (Ushio-Fukai et al. 2002). Dies ist essentiell für die Migration und Proliferation und in vivo für die Angiogenese (Ushio-Fukai et al. 2002).
- § In Endothelzellen aktivieren H_2O_2 und Lipidperoxide Phospholipase D und tragen so zur Bildung von Mediatoren bei (Natarajan et al. 1993).
- § Die Redoxregulation von thiolhaltigen Proteinen ist ein grundlegender Mechanismus in der Signaltransduktion und der Genexpression. ROS verändern die Konformation und damit die Aktivität von Proteinen mit Sulfhydrylgruppen durch Oxidation. Auf diese Weise werden z.B. Proteinkinase C, Ca^{2+} -ATPase, Kollagenasen, Ras und Tyrosinkinasen reguliert (zur Übersicht (Dalton et al. 1999), Lander et al. 1995).
- § Durch ROS reguliert werden auch Transkriptionsfaktoren wie z.B. $\text{NF}\kappa\text{B}$ und AP-1 (Schenk et al. 1994). Als Mechanismen werden neben Modifikationen des Transkriptionsfaktors z. B. ein verändertes DNA-Bindungsvermögen durch Oxidation oder eine redoxregulierte Aktivierung der Transkriptionsfaktoren vermutet. Beobachtet wurde jedoch auch eine Zerstörung der Promotorregion der DNA durch ROS, wodurch der Transkriptionsfaktor nicht mehr binden kann (Ghosh et al. 1999).
- § Zu den in Endothelzellen durch H_2O_2 regulierten Genen gehören $\text{Cu}^+/\text{Zn}^{2+}$ -SOD, Katalase, Glutathion-Peroxidase, Hämoxygenase-1, Heat-Shock-Protein (HSP)-70, MCSF (macrophage colony stimulating factor), HB-EGF (heparin binding epidermal growth factor), VEGF und eNOS (Lu et al. 1993, Hong et al. 1997, Wang et al. 1998, Kayanoki et al. 1999, Chua et al. 1998, Drummond et al. 2000).

Nicht alle genannten Signalproteine, die vom Redoxstatus der Zelle abhängen, sind selbst direkte Ziele von ROS. Möglicherweise sind Mediatoren, wie z.B. redoxsensitive Tyrosinphosphatasen, beteiligt (Irani K 2000).

1.5 ROS in der Pathogenese der Atherosklerose

Eine uneingeschränkte Blutversorgung ist für die Organfunktionen von zentraler Bedeutung. Atherosklerotische Veränderungen führen nach jahrelanger asymptomatischer Progression häufig zu Infarkten, besonders zum Herz- und Hirninfarkt. In Deutschland sind Herz-Kreislauf-Erkrankungen mit über 30% die häufigste Todesursache im mittleren Lebensalter (35-65 Jahre). Mit zunehmendem Alter steigt dieser Anteil auf über 50%. Von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) wird Atherosklerose als „eine variable Kombination von Veränderungen der Intima, bestehend aus einer herdförmigen Ansammlung von Fettsubstanzen, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen, verbunden mit Veränderungen der Arterienmedia“ bezeichnet (Böcker et al. 2000).

Bereits Virchow vermutete eine Beteiligung des Endothels oder der „inneren Haut“ des Gefäßes in der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen (Virchow R 1856). Nach der „*response to injury*“ Hypothese ist eine Schädigung des Endothels mit der Ausbildung einer veränderten endothelialen Funktion das kritische Ereignis in der Pathogenese der Atherosklerose (Dimmeler et al. 1997a, siehe Abbildung 1.4). Der Begriff endotheliale Dysfunktion beschreibt das klinische Phänomen einer verminderten NO-Aktivität oder NO-Verfügbarkeit, die sich in einer gestörten endothelabhängigen Vasodilatation erfassen lässt (Harrison DG 1998).

Bereits 1986, also vor der Charakterisierung von EDRF als NO, zeigten Rubanyi und Vanhoutte, dass EDRF durch Superoxid inaktiviert wird (Rubanyi und Vanhoutte 1986).

In tierexperimentellen sowie klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass die üblichen Risikofaktoren für die Atherosklerose wie Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus, Rauchen, Hypertonie und erhöhtes Lebensalter nicht nur zur

endothelialen Dysfunktion sondern auch zur vermehrten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies führen (Azumi et al. 1999, Cai und Harrison 2000, Hink et al. 2001).

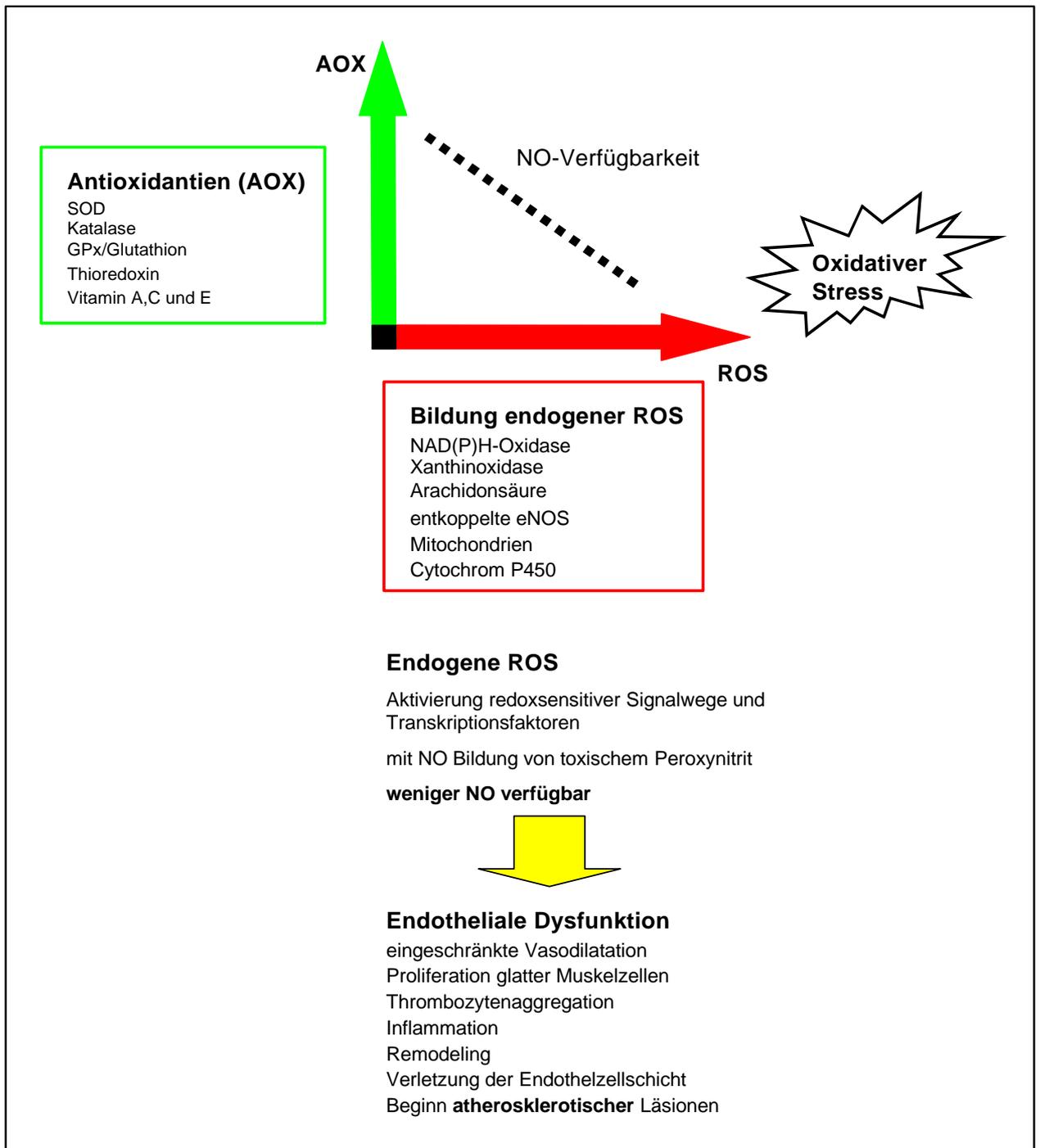


Abbildung 1.4: Ein Ungleichgewicht zwischen Antioxidantien und ROS führt zu oxidativem Stress und zur verminderten NO-Verfügbarkeit mit der möglichen Folge endothelialer Dysfunktion

Reaktive Sauerstoffspezies sind beteiligt an proatherogenen Prozessen wie der vermehrten Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle, Proliferation glatter Muskelzellen, Endothelzellapoptose, Lipidoxidation, Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen und veränderter Vasomotorik (siehe Abbildung 1.4). So führt beispielsweise die vermehrte Superoxidproduktion unter Hypercholesterinämie zur vermehrten Leukozytenadhäsion an Endothelzellen (Stokes et al. 2001).

Am Beispiel von Angiotensin II soll ein Mechanismus verdeutlicht werden: Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System ist wesentlich beteiligt an der Regulation von Blutdruck, Natriumhaushalt und extrazellulärem Wasserbestand. Angiotensin II reguliert Komponenten der endothelialen NADPH-Oxidase wie gp91^{phox} hoch und verursacht so eine vermehrte Produktion von Superoxidanionen (Mollnau et al. 2002). Angiotensin II führt auch zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in glatten Muskelzellen und damit zu deren Proliferation (Griendling et al. 2000). Die vermehrte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies senkt die Verfügbarkeit von NO und führt zur endothelialen Dysfunktion.

Auch die Atherosklerose wird durch eine durch Angiotensin II mediierte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies gefördert: Wie von Warnholtz et al. gezeigt wurde, ist die Aktivität der NADH-Oxidase und Superoxidproduktion in frühen atherosklerotischen Läsionen erhöht und kann durch Antagonisten am Angiotensinrezeptor reduziert werden (Warnholtz et al. 1999). Untersuchungen an humanen atherosklerotischen Läsionen zeigten auch eine vermehrte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies und eine erhöhte Expression von Untereinheiten der NAD(P)H Oxidase (Azumi et al. 1999). An der Plaqueschulter, wo es am häufigsten zur Ruptur atherosklerotischer Läsionen und zur Ausschwemmung thrombembolischen Materials kommt, wurden zudem die höchsten Konzentrationen von Superoxidanionen und inflammatorischen Zellen detektiert (Sorescu et al. 2002). Die biologische Aktivität der Plaque scheint mit vermehrtem oxidativem Stress zuzunehmen (Sorescu et al. 2002).

Die Hypothese der Atheroskleroseentstehung durch oxidativen Stress macht vor allem oxLDL für die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies in Endothelzellen

und die Progression der Atherosklerose verantwortlich (Steinberg et al. 1989, Ohara et al. 1994). Abbildung 1.5 fasst die verschiedenen proatherogenen und proapoptotischen Faktoren zusammen:

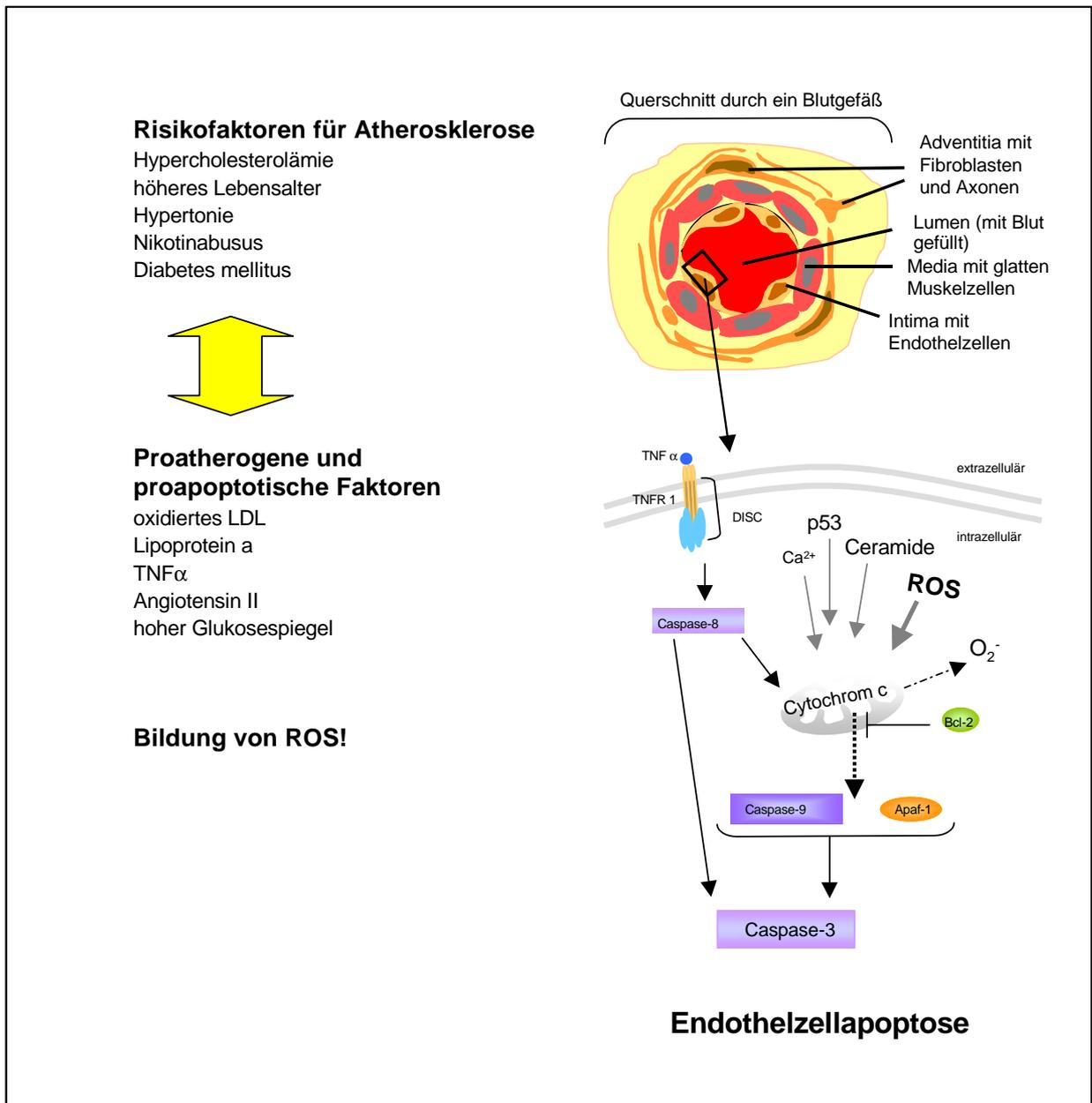


Abbildung 1.5: Risikofaktoren für die Atherosklerose wirken proapoptotisch (modifiziert nach Rössig et al. 2001). TNFR1 TNF α Rezeptor 1, DISC death inducing signalling complex.

Ziele der Doktorarbeit

Reaktiven Sauerstoffspezies kommt eine essentielle Bedeutung in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen wie der Atherosklerose zu. Eine vermehrte ROS-Entstehung führt zu einem verminderten Angebot an NO, zur Aktivierung redoxsensitiver proatherogener Signalwege und wahrscheinlich über apoptotische Prozesse zur Destabilisierung der atherosklerotischen Plaque. Entscheidend ist nicht nur, wie viel ROS gebildet werden, sondern auch wie effektiv sie durch antioxidative Systeme wie dem Thioredoxin-System entfernt werden können. Das Verständnis der Regulation der Oxidoreduktase Thioredoxin-1 in Endothelzellen durch ROS würde zur besseren Einordnung ihrer Funktion und somit ihrer Wirkung bei der Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie der Atherosklerose beitragen. Daher sollte in dieser Doktorarbeit untersucht werden:

- § Welchen Einfluss hat exogener bzw. endogener oxidativer Stress auf die Genexpression von Trx-1 in humanen venösen Nabelschnurendothelzellen (HUVEC)?
- § Welche Auswirkungen haben reaktive Sauerstoffspezies auf den Proteinlevel von Trx-1 in HUVEC?
- § Können Stickstoffmonoxid, N-Acetylcystein oder Schubspannung den Trx-1-Level unter oxidativem Stress modifizieren?
- § Welchen Effekt hat eine veränderte Trx-1 Proteinexpression auf die Apoptose in Endothelzellen?

2 Material und Methoden

Alle Feinchemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, in p.a. Qualität bei der Fa. Sigma-Aldrich (Schnelldorf) oder der Fa. Carl Roth (Karlsruhe) bezogen.

2.1 Zellkultur

2.1.1 Kultivierung der HUVEC

Humane venöse Nabelschnurendothelzellen (HUVEC) wurden in Endothelzell Basalmedium (EBM; Clonetics, Cell Systems, St. Katharinen) mit 10% fötalem Kälberserum (FCS; Fa. GibcoBRL, Karlsruhe) und mit folgenden Zusätzen der Fa. Clonetics kultiviert: epidermaler Wachstumsfaktor (10 ng/ml), Hydrocortison (1 µg/ml), Gentamicin (50 µg/ml), Amphotericin B (50 ng/ml), und Rinderhirnextrakt (12 µg/ml).

Für die Versuche wurden Zellen mittels Trypsinverdau passagiert, für 18 h kultiviert und anschließend je nach Versuch inkubiert bzw. transfiziert.

H₂O₂ (Fa. Merck KGaA, Darmstadt), TNF α (Fa. Sigma-Aldrich), Papanonoate (Fa. Alexis, Grünberg), N-Acetylcystein (Fa. Sigma-Aldrich) in den jeweils angegebenen Konzentrationen wurden zur Stimulation bzw. Präinkubation der Zellen verwendet.

Für die Inhibitorenstudie wurden Pepstatin A (Isovalenyl-L-val-L-val-statinyl-L-ala-statin, Fa. Sigma-Aldrich), EDTA (Ethylendiamintetraacetat, Fa. Sigma-Aldrich), PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid, Fa. Sigma-Aldrich), E64c ((2S,3S)-*trans*-Epoxy succinyl-L-leucylamido-3-methylbutane, Fa. BIOMOL GmbH, Hamburg), MG 132 (Z-Leu-Leu-Leu-CHO, BIOMOL GmbH) und ZVADfmk (N-benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethyl-Keton, Fa. Bachem, Bubendorf) verwendet.

2.1.2 Transfektion

Zur Transfektion von HUVEC mit Oligonukleotiden wurden phosphothiolierte Sense- und Antisenseoligonukleotide (entsprechend der Trx-Sequenz: sense 5'- ATG GTG AAG CAG ATC GAG AGC AAG ACT und antisense 5'-AGT CTT GCT CTC GAT CTG CTT CAC CAT) verwendet. Je 5 µg Oligonukleotid wurde mit 5 µl Lipofektamine (Fa. Invitrogen, Niederlande) und 200 µl RPMI-Medium (Fa. Invitrogen) pro Ansatz ($2,5 \times 10^5$ Zellen je 60 mm Zellkulturschale, Fa. Greiner, Frickenhausen) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden dann mit 2 ml RPMI-Medium (serumfrei) mit dem Transfektionsansatz für 5 h inkubiert. Anschließend wurden 3 ml EBM-Medium mit 10% FCS und allen Zusätzen (siehe oben) zugegeben und für weitere 18 h inkubiert, bevor die Zellen für die folgenden Versuche behandelt wurden.

2.1.3 Applikation von laminarer Schubspannung

HUVEC (3×10^5 Zellen/60 mm Kulturschale) wurden in einem konischen Kegelplattenviskosimeter einer laminaren Schubspannung von 15 dynes/cm^2 ausgesetzt. Durch die gleichmäßige Rotation des Konus im Kulturmedium entsteht eine definierte laminare Schubspannung τ , die in etwa den Strömungsverhältnissen in mittelgroßen Gefäßen entspricht (siehe Abbildung 2.1).

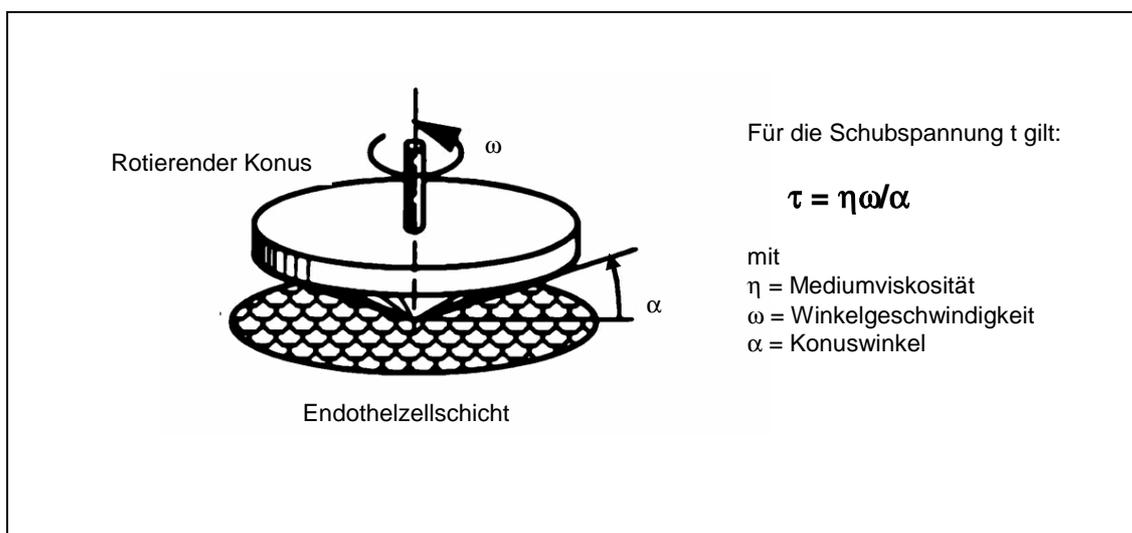


Abbildung 2.1: Konisches Kegelplattenviskosimeter (modifiziert nach Noris et al. 1995)

Die verwendeten Apparaturen wurden freundlicherweise von Dr. R. Popp und Prof. R. Busse (Institut für Kardiovaskuläre Physiologie, Universität Frankfurt) zur Verfügung gestellt.

2.2 Methoden zur Proteinanalyse

2.2.1 Proteinisolation aus HUVEC

Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit RIPA-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0; 1% Nonidet p40; 150 mM NaCl; 0,1% SDS; 0,5% Desoxycholsäure) auf Eis 30 min lysiert. Das Lysat wurde zentrifugiert (20000 g, 4°C, 15 min). Anschließend wurde im Überstand der Proteingehalt nach der Methode von Bradford bestimmt (siehe 2.2.3).

2.2.2 Proteinisolation aus Tierorganen

In einen Mörser wurde flüssiger Stickstoff vorgelegt. Die Organe von eNOS-defizienten (^{-/-}) Mäusen bzw. Wildtyp-Mäusen (beide Fa. Jackson Laboratories, Bar Harbor, USA) wurden im Mörser mit dem Pistill zu einem feinen Pulver zerrieben. Je nach Organmasse wurden 200 bis 1000 µl RIPA-Puffer zum Lysieren hinzu gegeben. Ab dem Auftauen wurde für 30 min lysiert. Nach dem Zentrifugieren (20000 g, 4°C, 15 min) wurde der Überstand wie unter 2.2.3 beschrieben auf seinen Proteingehalt bestimmt.

2.2.3 Gesamtproteinbestimmung

Es wurde die 1976 von Bradford vorgeschlagene Methode verwendet (Bradford MM 1976). 200 µl Bio-Rad-Reagenz (Fa. Bio-Rad, München) wurde mit 800 µl dH₂O und 1 µl Probe bzw. RIPA-Puffer (Referenz) versetzt und für 5 min inkubieren lassen. Anschließend wurde im Spektralphotometer die Absorption bei $\lambda=595$ nm gemessen. Die Umrechnung erfolgte anhand einer Eichkurve, die mit BSA (Rinderserumalbumin) erstellt wurde.

2.2.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) können komplexe Proteingemische nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Dabei entscheidet der Anteil an Acrylamid/Bisacrylamid, welche Vernetzung innerhalb des Gels erreicht wird. Je höher der Acrylamid/Bisacrylamid-Anteil ist, umso kleinere Proteine kann man darstellen. Die Auftrennung wurde nach der von Laemmli vorgeschlagenen Methode durchgeführt (Laemmli UK 1970).

Die beiden Glasplatten der Mini Gel-Apparatur (Mini Protean II cell, Fa. Bio-Rad) wurden mit 1,5 mm Platzhaltern in den Gelhalter eingebaut. Die Trenngellösung (1,5 M Tris/HCl pH 8,8 und 0,4% SDS, zusätzlich gewünschter Anteil Acrylamid/Bisacrylamid) wurde nach Zusetzen von TEMED eingefüllt und mit 100% Ethanol überschichtet. Nach dem Polymerisieren wurde das Ethanol abgezogen und die Sammelgellösung (0,5 M Tris/HCl pH 6,8; 0,4% SDS sowie Acrylamid/Bisacrylamid und TEMED) eingefüllt. Anschließend wurde der Probenkamm eingesteckt. Die Proteinproben wurden mit 1/5 Vol. 5x Probenpuffer (0,3125 M Tris/HCl pH 6,8; 10% SDS; 50% Glycerol; 250 mmol DTT; Bromphenolblau 10%) für 2 min bei 95°C erhitzt, anschließend 1 min bei 13000g zentrifugiert und auf das Gel aufgetragen. Als Molekulargewichtsmarker wurde ein rainbow marker RPN 755 der Firma Amersham, Freiburg, benutzt. Als Laufpuffer wurde 0,25 M Tris, 0,96 M Glycin und 1% SDS verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 80 V für das Sammelgel bzw. 120 V für das Trenngel durchgeführt für insgesamt 1,5 bis 2 Stunden.

2.2.5 Transfer von Proteinen (Western Blot)

Um die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine detektieren zu können, wurden diese auf eine PVDF-(Polyvinylidendifluorid)-Membran (Immobilon-P, Millipore, Eschborn) transferiert und fixiert. Die PVDF-Membran wurde dazu zunächst 5 s in 100% Methanol, 2 Minuten in dH₂O und anschließend in Transferpuffer (25 mM Tris; 0,19 mM Glycin und 20% Methanol) äquilibriert. Das Gel, die PVDF-Membran und 6 Whatman 3MM Papiere wurden ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert, luftblasenfrei zwischen „Scotch pads“ eingeklemmt

und in eine mit eiskaltem Transferpuffer gefüllte Transferapparatur „Mini Blot“ der Fa. Bio-Rad eingehängt. Der Transfer erfolgte für 1-2 h bei 100 V.

2.2.6 Immundetektion von membrangebundenen Proteinen

Alle Schritte wurden auf einem HS 250 basic Schüttler der Fa. IKA, Staufen, durchgeführt. Zunächst wurden die Membranen (2.2.5) 1 h bei Raumtemperatur in 5% Magermilch (Fa. Töpfer GmbH, Dietmannsried) in TBS (50 mM Tris/HCl pH 8,0; 150 mM NaCl und 2,5 mM KCl) mit 0,1% Tween (T) 20 (Fa. AppliChem, Darmstadt) geschüttelt, um unspezifische Bindungen abzusättigen. Anschließend wurde mit dem primären Antikörper gegen das zu detektierende Protein zu den in Tabelle 1 angegebenen Bedingungen inkubiert. Es folgten 3 x 10 min Waschen mit TBS Tween 0,1% auf dem Schüttler. Danach wurde 2 h mit einem Peroxidase-gekoppelten Sekundär-Antikörper (siehe Tabelle 1) inkubiert. Um überschüssigen Peroxidase-gekoppelten Antikörper zu entfernen, wurde 3 x 15 min mit TBS Tween 0,1% gewaschen.

Zur Visualisierung wurde das kommerzielle ECL-System (Fa. Amersham) verwendet und das Ergebnis auf ECL-Hyperfilm festgehalten. Die Filmentwicklung erfolgte in einem Agfa Curix 60. Die Filme wurden nach dem Einscannen mit dem Programm Scion Image (entwickelt durch das U.S. National Institutes of Health und über Internet öffentlich zugänglich unter <http://rsb.info.nih.gov/nih-image/>) densitometrisch ausgewertet.

Tabelle 1: Verwendete Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Inkubationszeit
Trx-1 (BD Pharmingen), primär	1:500 in 5% Milchpulver/TBST 0,1%	über Nacht, 4°C
Tubulin-β (Clone DM1B, Fa. Neomarkers), primär	1:1000 in 5% Milchpulver/TBST 0,1%	über Nacht, 4°C
Anti-Maus-IgG/HRP (Fa. Amersham), sekundär	1:5000 in 5% Milchpulver/TBST 0,1%	1h, RT

2.2.7 Konzentrieren von Proteinen

Zur Analyse von Proteinen aus dem Überstand wurde durch Zentrifugation im Zentrifugalfilter (Ultrafree-4, nominelles Molekulargewichtslimit 5000 Dalton, Fa. Millipore, Eschborn) das Volumen verringert und so die Konzentration der Proteine erhöht. 500 µl des Proteingemischs wurde auf den Filter aufgetragen. Bei 4000 g wurde für 10 bis 15 min bei 4°C zentrifugiert. Das konzentrierte Proteingemisch wurde im ELISA (siehe 2.6) eingesetzt.

2.3 Methoden zur Analyse der Genexpression

2.3.1 Isolierung der Gesamt-RNA aus HUVEC

Von HUVEC in 60 mm Zellkulturschalen wurde das Medium abgesaugt. Pro Kulturschale wurde 1 ml Trizol (Fa. GibcoBRL) zugegeben und für 5 min unter Schwenken bei Raumtemperatur inkubieren lassen. Es wurden ab jetzt ausschließlich RNase freie Materialien (Fa. Greiner) und Lösungen verwendet. Nach dem Überführen in frische Reaktionsgefäße (Fa. Eppendorf, Hamburg) wurde 0,2 ml Chloroform zugegeben und heftig geschüttelt. Bei 12000 g wurde für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in frische Reaktionsgefäße überführt und die RNA durch Zugabe von 0,5 ml 2-Propanol gefällt. Nach 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde bei 12000 g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde 1 x mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen, 30 min bei Raumtemperatur getrocknet und in 30 µl RNase freiem Wasser aufgenommen. Zum Lösen des RNA-Pellets wurde vorsichtig resuspendiert und für 10 min bei 55°C erhitzt. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C.

2.3.2 Bestimmung der RNA-Menge

2 µl Gesamt-RNA-Gemisch auf 500 µl dH₂O wurde in einer Quarzglasküvette bei 260 und 280 nm im Photometer vermessen. Eine optische Dichte (OD) von

OD₂₆₀=1 entspricht 40 µg/ml RNA. Der Quotient OD₂₆₀ / OD₂₈₀ lag bei den reinen RNA-Präparationen zwischen 1,4 und 1,6.

2.3.3 Quantitative realtime RT-PCR

Mit der quantitativen real-time RT-PCR wird zunächst wie bei der herkömmlichen RT-PCR RNA mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Durch Zugabe von spezifischen Primern kann man nun bestimmte DNA-Produkte amplifizieren lassen. Das verwendete LightCycler-System (Fa. Roche, Mannheim) stellt die Amplifikation während der Reaktion visuell dar. Dafür wurde einmal pro Zyklus die Zunahme der Fluoreszenz des Farbstoffs SYBR Green, welcher sich in die DNA einlagert, gemessen. Aus der Reaktionskinetik wurde nach Vergleich mit einer Standardkurve die Ausgangskonzentration an RNA ermittelt.

Als Primer wurden eingesetzt:

Thioredoxin-1

5'-CATGGTGAAGCAGATCGAGA (sense)

5'-CTTAGACTAATTCATTAATGGTGGC (antisense)

GAPDH

5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC (sense)

5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC (antisense)

Alle Primer wurden bei der Fa. TIB MOLBIOL, Berlin, gekauft.

Es wurde das QuantiTect SYBR Green RT-PCR-Kit (Fa. Qiagen, Hilden) verwendet.

Pro LightCycler-Kapillare (20 µl) wurden pipettiert:

Template	500 ng
2 x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix	10 µl
Primer A (finale Konzentration 0,3 µM)	1,2 µl
Primer B (finale Konzentration 0,3 µM)	1,2 µl
QuantiTect RT Mix	0,2 µl
RNAse freies Wasser	variabel

Das Zytokin-Kontrollkit (Fa. Roche) wurde nach folgendem Schema pipettiert:

Standardtemplate (3,15 pg/μl)	1 μl
2 x QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix	10 μl
Primer-Mix, Endkonzentration je 0,3 μM	1,2 μl
QuantiTect RT Mix	0,2 μl
RNAse freies Wasser	7,6 μl

Die reverse Transkription und die Amplifikation der cDNA wurden nach folgendem Program durchgeführt:

<i>Programmtyp</i>	<i>Dauer</i>	<i>Temperatur</i>	
Reverse Transkription	20 min	50°C	
Initiale Aktivierung	15 min	95°C	
Denaturierung	15 s	94°C	} 45 Zyklen
Annealing	20 s	55°C	
Extension	10 s	72°C	
Schmelzkurve	variabel	60°C	

Anhand der Schmelzkurvenanalyse wurden unspezifische Produkte wie Primer-Dimere ausgeschlossen.

2.3.4 Analyse des PCR-Produkts im Agarosegel

Mit einer horizontalen Agarosegelelektrophorese wurden die Produkte nach der Länge aufgetrennt. Für ein 2% Gel wurden 1 g Agarose in 50 ml 0,5-fach TBE-Puffer (89 mmol/l Tris; 89 mmol/l H₃BO₃; 2,5 mmol EDTA, pH=8,0) gekocht und mit 2,5 μg/ml Ethidiumbromid gefärbt. Die Proben wurden mit 1/6 Vol. 6 x DNA loading dye (0,1% Bromphenolblau; 0,1% Xylencyanol; 10 mmol/l EDTA; 40% Glycerin) versetzt und auf das Gel geladen. Als Größenmarker wurden 5 μl einer kommerziellen DNA-Leiter (Fa. GibcoBRL, verdünnt nach Herstellerangaben), die DNA-Fragmente bekannter Länge enthält, verwendet.

Die Elektrophorese wurde bei 200 V mit 0,5-fachem TBE als Laufpuffer bis zum gewünschten Auftrennungsgrad durchgeführt. Die DNA-Banden wurden unter einer UV-Lampe sichtbar gemacht und mit einer Sofortbild-Kamera (Fa. Polaroid) fotografiert.

2.4 Nachweis der Apoptose mittels FACS

Für die Apoptose-Messung mittels FACS (Fluorescence-activated Cell Sorter) wurde das Annexin V-PE Apoptosis Kit I (Fa. BD Pharmingen, San Jose, USA) verwendet. Annexin V-Phycoerythrin (PE) bindet mit hoher Affinität Phosphatidylserin, das in der vitalen Zelle auf der Membranoberfläche lokalisiert ist. Apoptotische Zellen weisen auf ihrer Oberfläche Phosphatidylserin auf. Nekrotische Zellen nehmen wegen ihrer defekten Zellmembran den Farbstoff 7-Amino-Actinomycin-Fluorescein-Isothiocyanat (7-AAD-FITC) auf und können so detektiert werden. Apoptotische Zellen wurden als Annexin V positiv und 7-AAD negativ definiert. Für die FACS-Analyse der Apoptose wurden HUVEC 1 x mit PBS gespült und mit 500 µl Trypsin 2 min bei 37°C abgelöst. Durch Zugabe von 2 ml PBS mit 10% FCS wurde die Trypsinwirkung gestoppt. Anschließend wurden die Zellen 2 x mit Annexinbindungspuffer (10 mM HEPES; 140 mM NaCl; 2,5 mM CaCl₂) gewaschen und 5 Minuten bei 800 g (4°C) zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in 50 µl Annexin Bindungspuffer aufgenommen und 20 min im Dunkeln mit 2,5 ng/ml Annexin V-PE und 2,5 ng/ml 7-AAD-FITC inkubiert. Anschließend wurden die Zellen im FACS (FACSCalibur, BD Bioscience, CellQuest Software) gemessen und analysiert.

2.5 Nachweis intrazellulärer ROS mittels FACS

HUVEC wurden mit 20 µM 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat (H₂DCF-DA, Molecular Probes) 20 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden nach einmaligem Spülen mit PBS 2 min bei 37°C mit 500 µl Trypsin abgelöst. Die Reaktion wurde mit 2 ml PBS mit 10% FCS terminiert und die Zellen bei 800 g und 4°C für 5 min pelletiert. Danach erfolgte die Analyse im FACS (siehe oben).

2.6 ELISA

Eine Mikrotiterplatte (96 Loch, Fa. Nunc, Wiesbaden) wurde mit 50 µl Antikörperlösung je Vertiefung (Trx-1 (BD Pharmingen): 1:50 in PBS, Trx 80 (BD Pharmingen) 1:250 in PBS) über Nacht bei 4°C beschichtet. Mit jeweils 200 µl Blockierungslösung (0,5% BSA; 0,05% Tween 20; 0,02% NaN₃ in PBS) pro Vertiefung wurde 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen für Proteine zu blockieren. Danach wurde die Platte 4 x mit Waschpuffer (0,05 % Tween 20 in 0,9 % NaCl) gewaschen, je 200 µl der aufkonzentrierten Überstände (siehe 2.2.7) aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubieren lassen. Nach weiteren 4 Waschgängen wurde wie beim Beschichten Antikörperlösung aufgetragen und 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur Detektion der gebundenen Antikörper wurde ein System mit alkalischer Phosphatase eingesetzt. Pro Proteinprobe wurde dazu 50 µl Alkaline-Phosphatase-konjugierter AffiniPure Goat Anti-mouse IgG(H+L) Antikörper (Fa. Dianova, Hamburg) 1:1000 in PBS für 2 Stunden bei Raumtemperatur aufgetragen. Nach 6 x Waschen wurden je 50 µl p-Nitrophenyl-Lösung (1 mg/ml in 50 mM Tris/HCl pH 6,8; 20 mM MgCl₂; 1 mM DTT) zugegeben. Die Reaktion wurde nach 20 min bei 30°C gestoppt mit je 50 µl 1 M NaOH und die Farbintensität mit einem ELISA-Lesegerät (Fa. Tecan, Magellan-Software) bei 580 nm bestimmt. Die Umrechnung erfolgte anhand einer mit humanem rekombinantem Trx-1 (Fa. Dianova) erstellten Eichkurve.

2.7 Statistik

Die angegebenen Werte sind Mittelwerte mit Standardabweichung (SEM). Mit n wird die Anzahl unabhängiger Experimente bezeichnet. Signifikanzen wurden mittels t-Test bestimmt. Ein Wert wurde als signifikant bezeichnet, wenn $p < 0,05$ betrug. Die Berechnungen für Mittelwerte, SEM und Signifikanzen wurden mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel von der Fa. Microsoft, München, ausgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 H₂O₂ und TNF α führen zur Bildung intrazellulärer ROS

Reaktive Sauerstoffspezies können redoxsensitive Signalwege aktivieren und so zu Veränderungen der Proteinexpression führen. Die antiapoptotische Oxidoreduktase Trx-1 ist von Bedeutung für den zellulären Redoxstatus. Da von Interesse war, ob Trx-1 in Endothelzellen durch reaktive Sauerstoffspezies reguliert wird, wurde zunächst untersucht, welchen Effekt H₂O₂ hinsichtlich des zellulären Gehalts an reaktiven Sauerstoffspezies hat. Dazu wurden HUVEC mit 50 μ M H₂O₂ für 6 Stunden inkubiert und mit dem Fluoreszenzfarbstoff 2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat (H₂DCF-DA) angefärbt. Wasserstoffperoxid und TNF α induzieren beide Apoptose in Endothelzellen (Hermann et al. 1997, Robaye et al. 1991). Außerdem ist für TNF α bekannt, dass es über den TNF-Rezeptor Signalkaskaden aktiviert, die zur Freisetzung von Cytochrom c und zur Bildung von ROS in der Zelle beitragen (Green und Reed 1998, Matsubara und Ziff 1986). HUVEC wurden mit 50 ng/ml und 100 ng/ml TNF α für 6 Stunden inkubiert und anschließend mit H₂DCF-DA gefärbt. Abbildung 3.1 zeigt das Ergebnis.

Sowohl 50 μ M H₂O₂ als auch 50 und 100 ng/ml TNF α erhöhen signifikant den Anteil reaktiver Sauerstoffspezies in HUVEC. Interessanterweise ist der Anteil an ROS durch H₂O₂ und TNF α bei den verwendeten Konzentrationen vergleichbar. Dies lässt darauf schließen, dass TNF α und H₂O₂, obwohl das eine ein Zytokin und das andere ein Radikal ist, zumindest bezüglich der Bildung intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies einen ähnlichen Effekt in Endothelzellen haben.

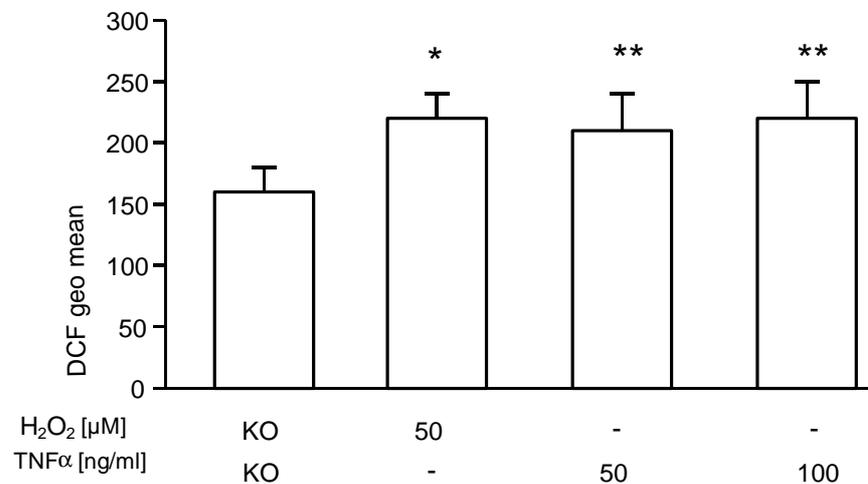


Abbildung 3.1: H₂O₂ führt zur Bildung endogener reaktiver Sauerstoffspezies

HUVEC wurden für 6 Stunden mit 50 μM H₂O₂ bzw. 50 und 100 ng/ml TNFα bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wie unter 2.5 beschrieben für 20 min mit 20 μM H₂DCF-DA angefärbt, gewaschen und sedimentiert. Die Analyse erfolgte mittels FACS. Die Mittelwerte wurden bestimmt ± SEM. *p<0,005 vs. Kontrolle, n=6, KO Kontrolle, **p<0,05 vs Kontrolle, n=4.

3.2 Charakterisierung der Wirkung von ROS auf die Expression von Trx-1 in HUVEC

3.2.1 Geringe Dosen H₂O₂ induzieren Trx-1 mRNA in HUVEC

Nachdem gezeigt wurde, dass H₂O₂ zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in Endothelzellen führt, wurde untersucht, ob oxidativer Stress eine Änderung der Expression von Trx-1 auf mRNA Ebene hervorruft. Dazu wurden HUVEC für 3 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen H₂O₂ (10, 50, 100 und 200 μM sowie Kontrolle) inkubiert und nach Präparation der Gesamt-RNA eine quantitative RT-PCR mittels LightCycler durchgeführt.

An dieser Stelle soll noch kurz auf den LightCycler eingegangen werden. Die Quantifizierung des PCR-Produkts wird über die zunehmende Anlagerung eines

Fluoreszenzfarbstoffs namens SYBR Green I an die DNA gemessen. Wichtig für die Quantifizierung ist jedoch, dass keine Primer-Dimere oder unspezifischen Produkte entstehen, an die sich der Farbstoff ebenfalls anlagern könnte. Unterscheiden kann man die Primer-Dimere und unspezifischen Produkte von den Produkten anhand ihrer Schmelztemperatur. Sind verschiedene Produkte innerhalb eines Reaktionsgefäßes entstanden, zeigen sich in der ersten Ableitung der Schmelzkurve bei unterschiedlichen Temperaturen Spitzenwerte (engl. peaks), welche den Umkehrpunkten der Schmelzkurve entsprechen. Ist nur ein Produkt entstanden, erhält man in der ersten Ableitung für die Negativkontrolle (Wasser statt Template-RNA) eine niedrige breite Primer-Dimer-Spitze und für die Proben mit Template-RNA eine schmale hohe Produkt-Spitze (siehe Abbildung 3.2).

Die Standardkurve wurde für jeden LightCycler-Versuch durch Kontrollproben mit definierter Menge einer Zytokin RNA ermittelt. Anhand der Standardkurve wurde dann die RNA-Konzentration der Proben bestimmt. Durch Vergleich der Konzentrationen von Trx-1 mit GAPDH wurden die Proben normalisiert.

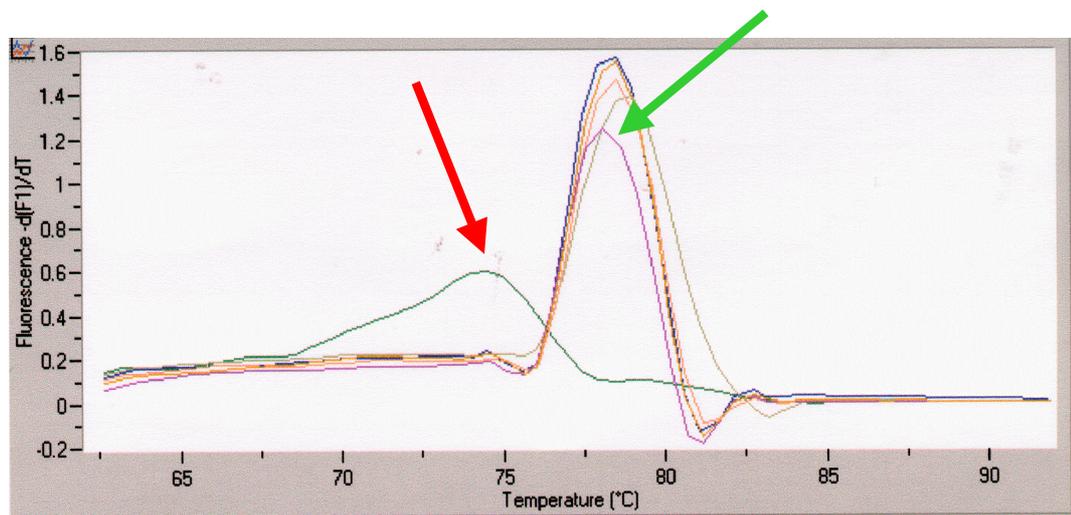


Abbildung 3.2: Schmelzkurvenanalyse

Zur Bestimmung der Spezifität des amplifizierten PCR-Produkts wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt und die erste Ableitung dargestellt. Der grüne Pfeil zeigt auf die „Schmelzspitzen“ (engl. melting peaks) der amplifizierten Zytokin-DNA. Das spezifische Zytokin-PCR-Produkt schmilzt bei einer höheren Temperatur als die Primer-Dimere in der Negativkontrolle (roter Pfeil).

Eine geringe Konzentration von H_2O_2 wie 10 und 50 μM induziert Trx-1 mRNA (signifikant für 10 μM H_2O_2 vs. Kontrolle nach 3 Stunden, siehe Abbildung 3.3) auf $506 \pm 45\%$ bzw. $333 \pm 142\%$. Höhere Konzentrationen H_2O_2 wie 100 und 200 μM haben hingegen keinen Effekt ($95 \pm 7,6\%$ und $94 \pm 22,5\%$ respektive) auf die Trx-1 mRNA-Spiegel in HUVEC.

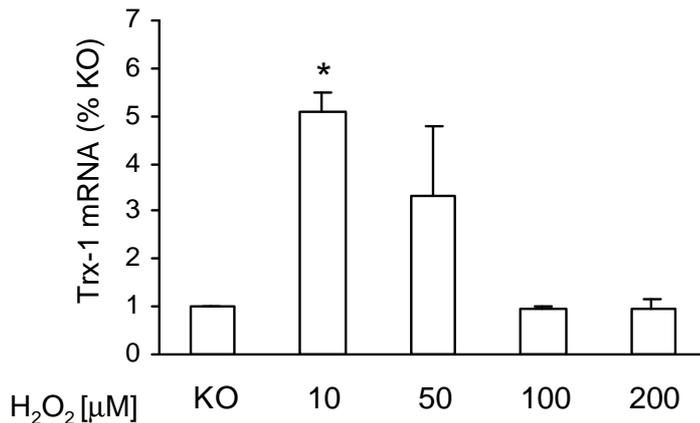


Abbildung 3.3: Reaktive Sauerstoffspezies regulieren Trx-1 auf transkriptioneller Ebene

Geringe Dosen H_2O_2 (10 und 50 μM) induzieren die Trx-1 mRNA-Expression. Endothelzellen wurden für 3 Stunden mit 10, 50, 100 oder 200 μM H_2O_2 inkubiert. Die quantitative RT-PCR wurde durchgeführt wie unter 2.3.3 beschrieben. Die Spezifität der PCR-Produkte wurde mittels Schmelzkurvenanalyse gesichert. Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$ 10 μM H_2O_2 vs. Kontrolle, $n=3$. KO Kontrolle.

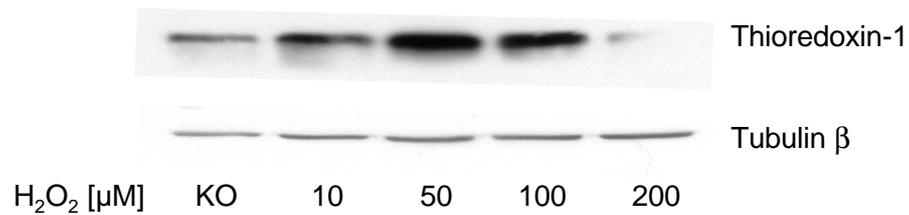
3.2.2 ROS in geringer Dosis erhöhen den Trx-1 Proteingehalt in Endothelzellen

Um zu untersuchen, wie Trx-1 auf Proteinebene durch reaktive Sauerstoffspezies reguliert wird, wurden HUVEC mit verschiedenen Konzentrationen H_2O_2 für 3 und 6 Stunden stimuliert und die Proteinexpression von Trx-1 untersucht.

Interessanterweise fand sich nach 6 Stunden eine signifikante Veränderung. Abbildung 3.4 zeigt den biphasischen Effekt: Geringe Konzentrationen H_2O_2 erhöhen die Proteinexpression von Trx-1 signifikant ($234 \pm 23\%$ für 50 μM H_2O_2 , $p < 0,01$ versus Kontrolle), wohingegen die höchste Konzentration (200 H_2O_2)

Trx-1 sogar unterhalb den Kontrollwert senkt ($46 \pm 26\%$ für $200 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$, $p < 0,05$ versus $50 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$). Dieses Ergebnis zeigt zusammen mit den Resultaten der RT-PCR, dass geringe Konzentrationen H_2O_2 Trx-1 transkriptionell regulieren

A)



B)

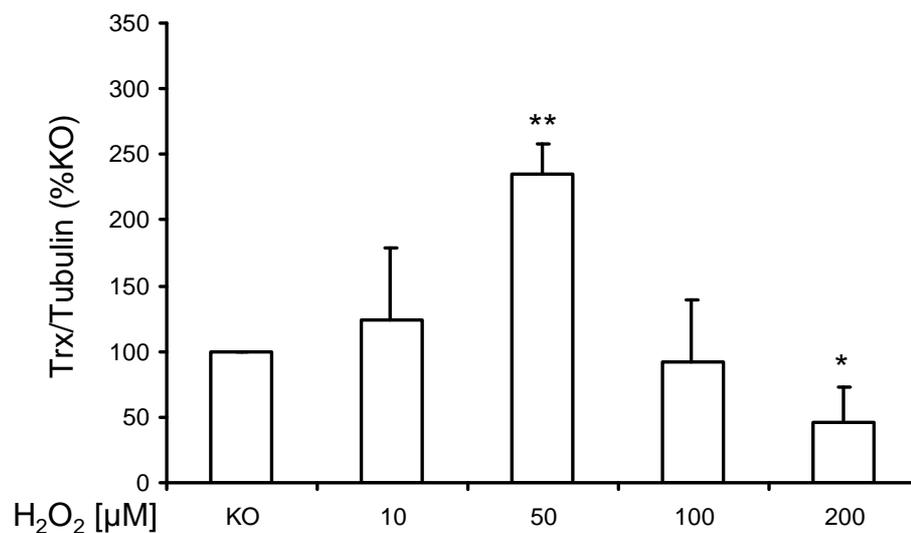


Abbildung 3.4: Reaktive Sauerstoffspezies verändern konzentrationsabhängig den Trx-1-Gehalt in HUVEC

HUVEC wurden für 6 Stunden mit 10, 50, 100 und 200 $\mu\text{M H}_2\text{O}_2$ bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert (2.2.1) und der Proteingehalt bestimmt. 80 μg Protein wurden mittels SDS-PAGE (2.2.4) aufgetrennt und der Western Blot (2.2.5) durchgeführt. Die Proteine wurden wie unter 2.2.6 beschrieben detektiert. A) Gezeigt ist ein repräsentativer Western Blot. KO Kontrolle. B) Die Filme wurden gescannt, densitometrisch ausgewertet und die Trx-1/Tubulin-Ratio bestimmt. Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM, $n=3$. KO Kontrolle. ** $p < 0,01$ vs. Kontrolle, * $p < 0,05$ vs. $50 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$.

Allerdings lässt sich der Abfall des Trx-1-Proteinlevels unter hohen H_2O_2 Konzentrationen nicht mit einer transkriptionellen Regulation erklären, sondern deutet eher auf einen Verlust von Trx-1 durch Sekretion oder Abbau hin.

Die Abbildung 3.5 zeigt die Ergebnisse für 3 Stunden sowie repräsentative Western Blots. Es ergaben sich keine signifikanten Änderungen hinsichtlich des zellulären Gehalts an Trx-1. Zusammen mit den Ergebnissen unter 3.2.1 spricht dies dafür, dass geringe Konzentrationen H_2O_2 nach 3 Stunden Trx-1 mRNA und nach 6 Stunden Trx-1 Protein hochreguliert haben.

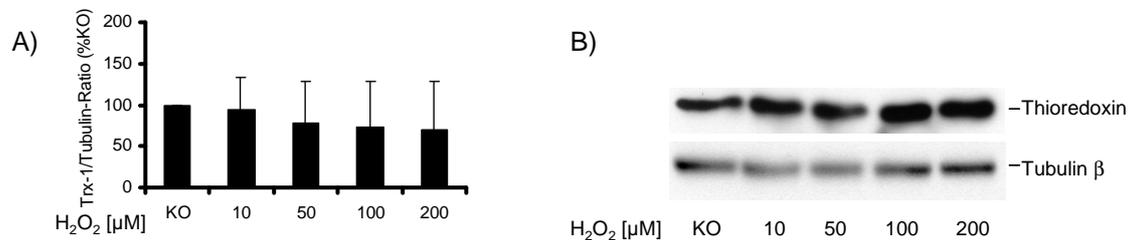


Abbildung 3.5: Kein Effekt reaktiver Sauerstoffspezies auf Trx-1-Proteinexpression nach 3 Stunden
 HUVEC wurden für 3 Stunden mit 10, 50, 100 und 200 µM H_2O_2 inkubiert. Nach Lysieren mit RIPA-Puffer wurde der Proteingehalt mittels Bradford-Assay (2.2.3) bestimmt und 80 µg Protein mittels SDS-PAGE (2.2.4) aufgetrennt. Nach Durchführung des Western Blot (2.2.5) wurden Trx-1 und Tubulin wie unter 2.2.6 beschrieben detektiert. A) zeigt als Diagramm die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung. Angegebene Werte sind Mittelwerte \pm SEM der Trx-1/Tubulin-Ratio in % KO, n=6. KO Kontrolle. B) zeigt einen repräsentativen Western Blot.

3.2.3 Trx-1 wird unter oxidativem Stress nicht sezerniert

Trx-1 und seine verkürzte Splicingvariante Trx 80 spielen eine wichtige Rolle in der Immunmodulation. Da Trx-1 ebenso wie die Spleißvariante Trx 80 von verschiedenen Zelltypen wie Immunzellen und Tumorzellen als Kozytokin bzw. als Wachstumsfaktor sezerniert werden kann, stellte sich die Frage, ob dieser Mechanismus auch unter oxidativem Stress eine Rolle spielen könnte und dadurch möglicherweise der Verlust an intrazellulärem Trx-1-Protein bei hohen Dosen H_2O_2 zu erklären ist. Um die Freisetzung von Trx-1 und Trx 80 zu untersuchen, wurde ein ELISA wie unter 2.6 beschrieben durchgeführt.

Verwendet wurden Überstände von HUVEC, die 6 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen H_2O_2 behandelt worden waren. Die Überstände wurden wie unter 2.2.7 beschrieben aufkonzentriert. Mit rekombinantem Trx-1 wurde eine Eichkurve (siehe Abbildung 3.6) erstellt.

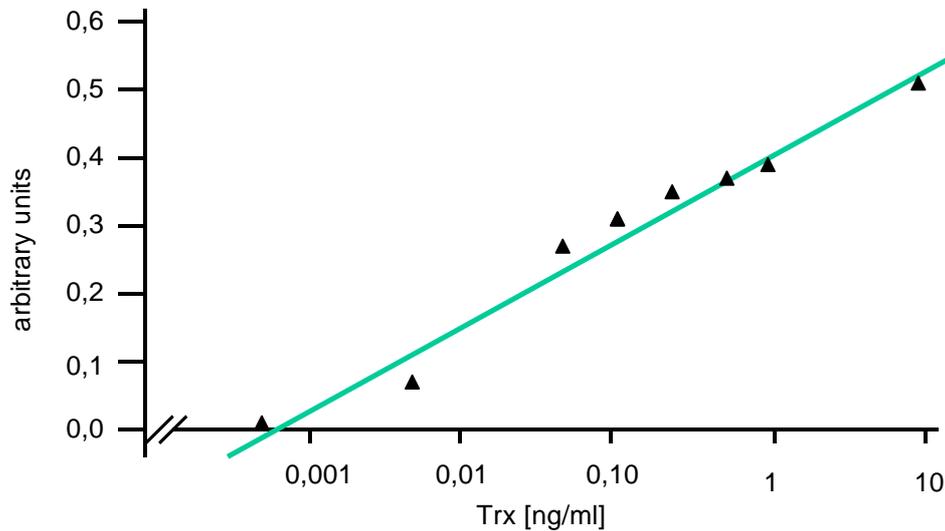


Abbildung 3.6: Eichkurve für die Interaktion von rekombinantem Trx-1 und Trx-1-Antikörper

Verschiedene Konzentrationen von rekombinantem Trx-1 wurden im ELISA getestet: 0,00005; 0,0005; 0,005; 0,05; 0,10; 0,25; 0,50; 1,00 und 10,00 ng/ml. Die Farbintensität in willkürlich gewählter Einheit (arbitrary units) ist in Abhängigkeit von Trx-1-Konzentration (ng/ml) als Eichkurve dargestellt, n=3.

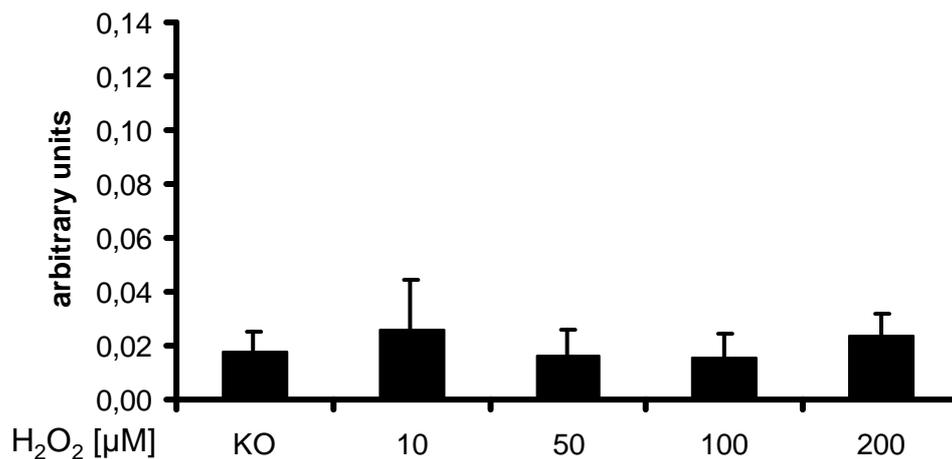


Abbildung 3.7: Es ist kein Anstieg von Trx-1 im Überstand nachweisbar

Die Überstände wurden nach Inkubation der HUVEC für 6 h mit den angegebenen Konzentrationen H_2O_2 wie unter 2.2.7 beschrieben konzentriert. Der ELISA wurde wie unter 2.6 durchgeführt. Als Antikörper wurde Trx-1-Antikörper 1:50 in PBS verwendet, n=3.

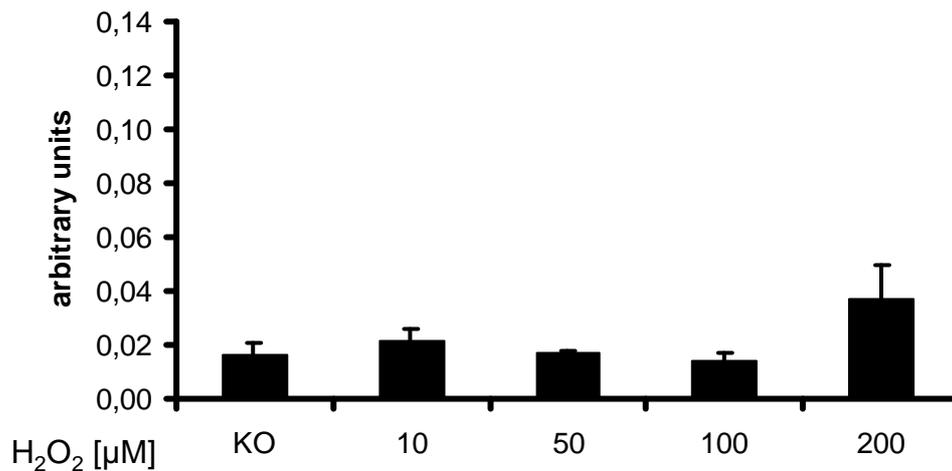


Abbildung 3.8: Trx 80 steigt im Überstand unter oxidativem Stress nicht an

Überstände aus den Versuchen mit den angegebenen Konzentrationen H₂O₂ wurden konzentriert (2.2.7) und nun für den Elisa (2.6) Trx 80-Antikörper 1:250 in PBS eingesetzt, n=3.

Weder Trx-1 noch Trx 80 wird unter oxidativem Stress vermehrt sezerniert (siehe Abbildungen 3.7 und 3.8). Somit ist die beobachtete signifikante Verminderung von Trx-1-Protein nach 6-stündiger Inkubation mit 100 und 200 µM H₂O₂ nicht durch eine vermehrte Freisetzung von Trx-1 in das Zellmedium zu erklären.

3.2.4 TNF α beeinflusst die Stabilität von Trx-1

Wie verschiedene Studien zeigten, regulieren Zytokine bzw. Interleukine wie TNF α und IL-1 auch antioxidative Systeme (Visner et al. 1992). Außerdem wurde unter 3.1 gezeigt, dass TNF α nach 6 Stunden den Anteil an intrazellulären ROS erhöht vergleichbar mit Wasserstoffperoxid. Daher war von Interesse, ob auch TNF α analog zu H₂O₂ eine Veränderung des Trx-1 Gehalts in Endothelzellen bewirkt. HUVEC wurden für 6 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen TNF α inkubiert, in RIPA-Puffer lysiert und eine SDS-PAGE durchgeführt. Western Blot und Proteindetektion erfolgten wie im Methodenteil beschrieben.

Wie man auf dem repräsentativen Western Blot (siehe 3.9A) und in der Auswertung (siehe 3.9B) sieht, wird der Trx-1 Gehalt von HUVEC nach 6

Stunden durch 50 ng/ml TNF α auf $662 \pm 237\%$ und 100 ng/ml TNF α auf $577 \pm 281\%$ signifikant erhöht.

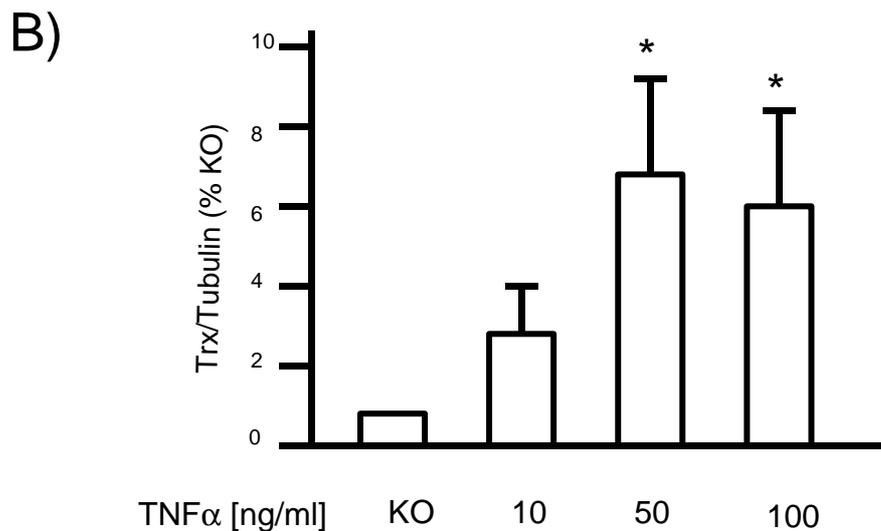
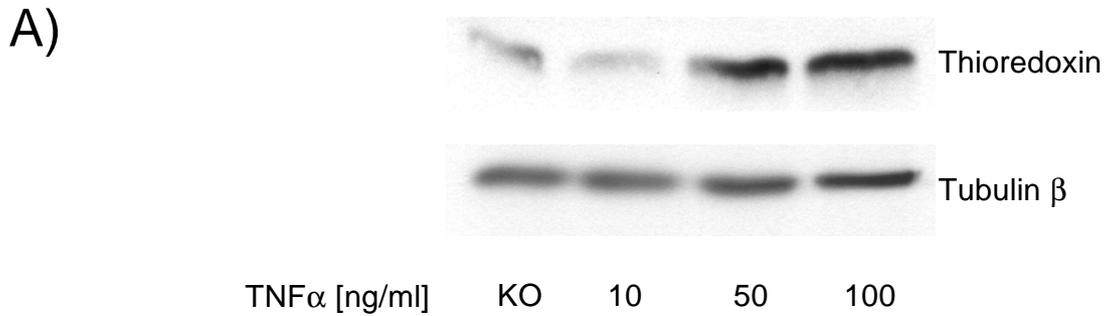


Abbildung 3.9: TNF α erhöht den Trx-1-Level in HUVEC

HUVEC wurden für 6 Stunden mit 10, 50 und 100 ng/ml TNF α stimuliert. Die Zellen wurden dann lysiert (2.2.1), der Proteingehalt bestimmt und 80 μ g Protein auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen (2.2.4). Der Western Blot wurde wie unter 2.2.5 beschrieben durchgeführt und die Proteine detektiert (2.2.6). A) Gezeigt ist ein repräsentativer Blot. B) Die Filme wurden densitometrisch ausgewertet und die Ratio von Trx-1/Tubulin bestimmt. Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM, n=4, *p<0,05 für TNF 50 ng/ml vs. KO und TNF 100 ng/ml vs. KO. KO Kontrolle.

Um zu ermitteln, ob eine Regulation von Trx-1 wie zuvor für H₂O₂ gezeigt auf transkriptioneller Ebene stattfindet, wurden HUVEC für 3 Stunden mit TNF α

stimuliert, danach die Gesamt-RNA extrahiert (2.3.1), die RNA-Konzentration bestimmt (2.3.2) und die Proben mittels quantitativer realtime RT-PCR untersucht. Abbildung 3.10 zeigt das Ergebnis.

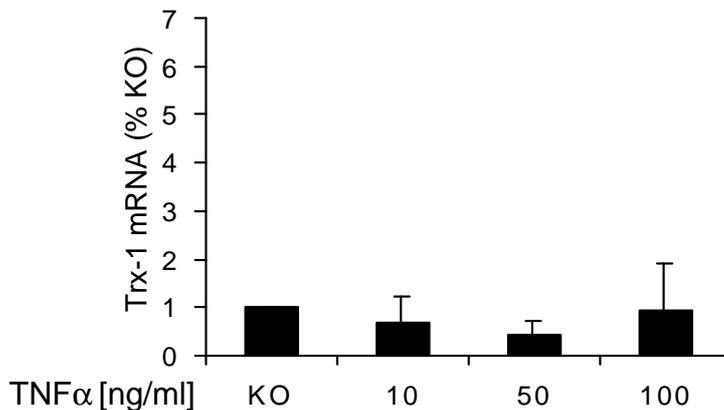


Abbildung 3.10: Trx-1 mRNA wird durch TNF α nicht reguliert

Nach 3-stündigem Inkubieren mit 10, 50 oder 100 ng/ml TNF α wurde die Gesamt-RNA aus HUVEC extrahiert, vermessen und eine quantitative RT-PCR durchgeführt. Angegeben sind Mittelwerte \pm SEM, n=3. KO Kontrolle.

Wie auf Abbildung 3.10 zu sehen ist, wird Trx-1 mRNA nicht durch TNF α reguliert. Es handelt sich also anders als bei H₂O₂ nicht um einen transkriptionellen Mechanismus sondern vermutlich um einen stabilisierenden Effekt.

3.3 H₂O₂ in geringer Dosis verhindert Apoptose in HUVEC

Verschiedene Studien konnten die Beteiligung von oxidativem Stress an der Apoptoseinduktion in unterschiedlichen Zellsystemen dokumentieren. Wie Hermann et al. 1997 zeigten, haben hohe Konzentrationen von H₂O₂ (200 μ M) in HUVEC einen proapoptotischen Effekt (Hermann et al. 1997). Im Gegensatz dazu können reaktive Sauerstoffspezies in niedrigen Konzentrationen proliferativ auf verschiedene Zelltypen wirken (Rao und Berk 1992, Preston et al. 2001). Um zu untersuchen, welche ROS-Levels pro- oder antiapoptotisch wirken, wurden HUVEC mit 10, 50 und 100 μ M H₂O₂ für 12 Stunden inkubiert

und wie unter 2.4 beschrieben für die FACS-Analyse vorbereitet und die Apoptoserate bestimmt.

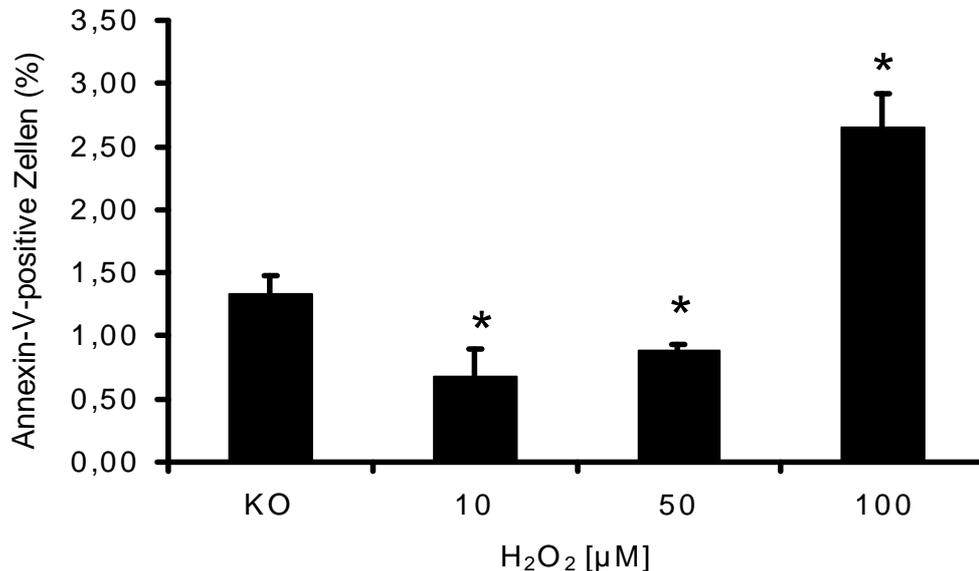


Abbildung 3.11: H₂O₂ in geringer Konzentration schützt Endothelzellen vor Apoptose

HUVEC wurden für 12 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen H₂O₂ inkubiert und der Anteil Annexin-V-positiver Zellen wie unter 2.4 beschrieben mittels FACS gemessen. Die Mittelwerte wurden bestimmt ± SEM. *p<0,05 versus KO (Kontrolle), n=4.

Wie auf Abbildung 3.11 zu erkennen ist, haben geringe Konzentrationen H₂O₂ wie 10 und 50 µM einen signifikant protektiven Effekt auf Endothelzellen (KO: 1,34 ± 0,14%; 10 µM: 0,68 ± 0,22%; 50 µM: 0,88 ± 0,04%) ohne den Anteil nekrotischer Zellen zu erhöhen (KO: 0,74 ± 0,25% 7-AAD positive Zellen, 10 µM: 0,75 ± 0,25% 7-AAD positive Zellen, 50 µM: 0,85 ± 0,27% 7-AAD positive Zellen). 100 µM H₂O₂ hingegen verdoppelt den Anteil apoptotischer Endothelzellen signifikant auf 2,66 ± 0,26%.

Offensichtlich sind ROS in Abhängigkeit von ihrer Konzentration entweder antiapoptotisch wirksam oder steigern den Anteil apoptotischer HUVEC unter basalen Bedingungen. Es scheint sich bei ROS ähnlich wie bei NO in Abhängigkeit von der Konzentration um ein zweiseitiges Schwert für das Überleben von Endothelzellen zu handeln.

3.4 Die Reduktion der Trx-1-Expression wirkt proapoptotisch

Die Beobachtung einer vermehrten Trx-1-Proteinexpression nach 6-stündiger Inkubation mit 10 und 50 μM H_2O_2 gemeinsam mit einer verringerten Basalapoptose nach 12-stündiger Inkubation deutet auf eine mögliche Beteiligung von Trx-1 hin. Um die Hypothese zu testen, dass eine vermehrte Trx-1-Expression an der antiapoptotischen Wirkung geringer Dosen H_2O_2 beteiligt ist, wurde der endogene Trx-1-Level in HUVEC durch Transfektion mit Antisense-Oligonukleotiden reduziert (2.1.2) und die Zellen anschließend für 12 Stunden mit 10 μM H_2O_2 stimuliert. Der Anteil apoptotischer Zellen wurde mit dem FACS gemessen.

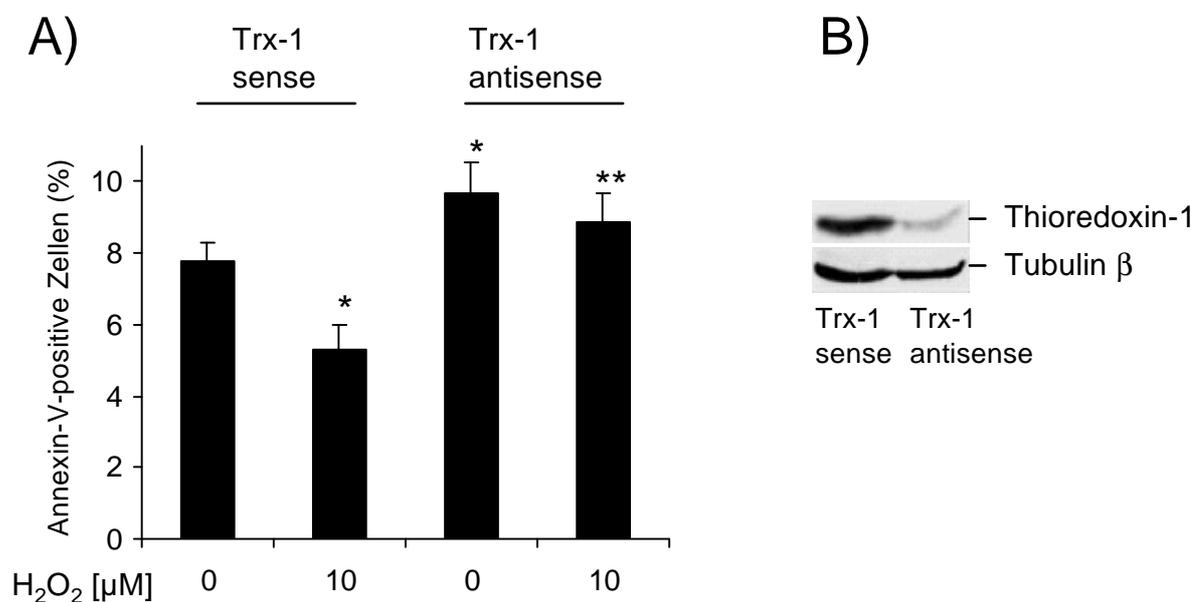


Abbildung 3.12: Trx-1 ist für den antiapoptotischen Effekt von H_2O_2 essentiell

A) HUVEC wurden mit Oligonukleotiden gegen Trx-1 transfiziert und für 12 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen H_2O_2 inkubiert. Der Anteil Annexin-V-positiver Zellen wurde wie unter 2.4 beschrieben mittels FACS gemessen. Die Mittelwerte wurden bestimmt \pm SEM. * $p < 0,05$ versus Trx-1-sense transfizierte Zellen, ** $p < 0,05$ versus Trx-1-sense transfizierte Zellen und 10 μM H_2O_2 , $n=4$. B) zeigt die verminderte Expression von Trx-1 in den mit Trx-1-Antisense-Oligonukleotiden transfizierten HUVEC.

Die Transfektion mit Antisense-Oligonukleotiden reduzierte den intrazellulären Trx-1-Gehalt deutlich (Abbildung 3.12B). Tatsächlich war der antiapoptotische Effekt niedriger H_2O_2 -Konzentrationen in den mit Trx-1-Antisense-

Oligonukleotiden transfizierten Endothelzellen fast vollständig aufgehoben (Abbildung 3.12A). In den mit Trx-1-Sense-Oligonukleotiden transfizierten Zellen hatten geringe H_2O_2 -Konzentrationen nach wie vor eine protektive Wirkung gegenüber basaler Apoptose. Damit wurde gezeigt, dass H_2O_2 in niedriger Konzentration antiapoptotisch in HUVEC wirkt und dieser Effekt abhängig von Trx-1 ist.

3.5 Einfluss des Antioxidans N-Acetylcystein auf den Trx-1-Level in HUVEC

Charakteristisch für redoxsensitive Mechanismen ist, dass man sie durch Antioxidantien beeinflussen kann (Sundaresan et al. 1995, Yeh et al. 1999).

N-Acetylcystein (NAC) ist ein membrangängiger Glutathion-Vorläufer, der das intrazelluläre antioxidative Potential erhöht.

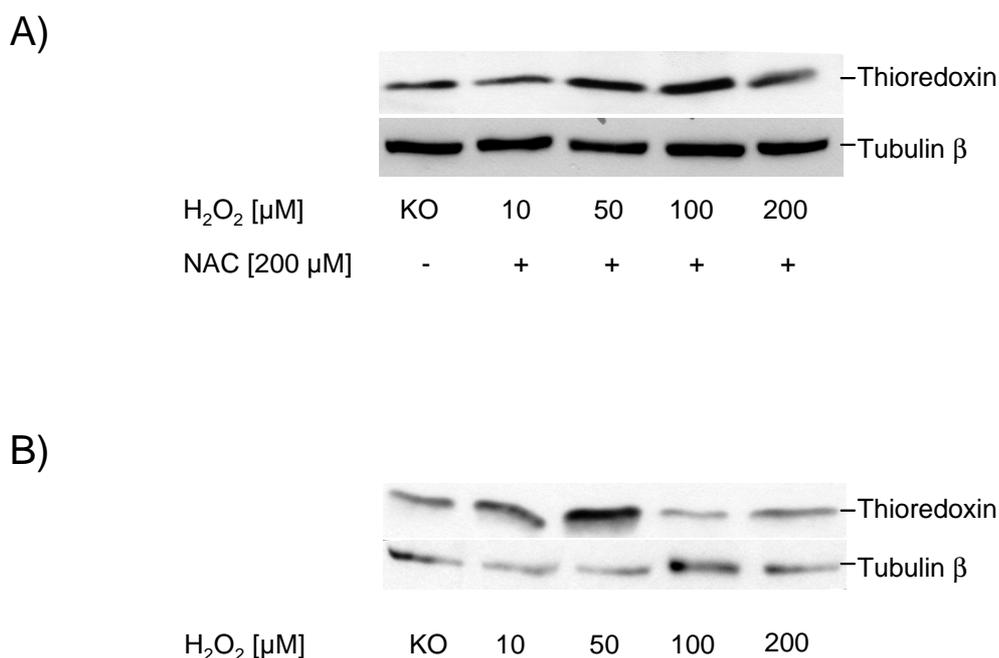


Abbildung 3.13: NAC stabilisiert Trx-1 unter oxidativem Stress

HUVEC wurden für 1 Stunde mit 200 μM NAC vorinkubiert und für 6 Stunden H_2O_2 ausgesetzt. Die Zellen wurden lysiert (2.2.1) und 80 μg Protein mittels 14% SDS-PAGE aufgetrennt (2.2.4). Der Western Blot wurde wie unter 2.2.5 beschrieben durchgeführt und die Proteine detektiert (2.2.6). A) zeigt einen repräsentativen Blot zu einem Versuch mit NAC. B) zeigt einen Blot zu einem Kontrollversuch ohne NAC.

Um die Regulation von Trx-1 unter oxidativem Stress weiter zu charakterisieren, wurden HUVEC mit 200 μM NAC für 1 Stunde inkubiert und anschließend mit unterschiedlichen Dosen H_2O_2 behandelt.

Wie auf den Abbildungen 3.13 und 3.14 zu sehen, wird der Trx-1-Proteinlevel unter niedrigen Konzentrationen H_2O_2 nur wenig erhöht, wenn die Zellen mit dem antioxidativ wirksamen NAC vorbehandelt werden. Hohe Konzentrationen H_2O_2 ohne NAC senken die Trx-1-Proteinexpression unter Kontrollniveau (siehe Abbildung 3.13B). Dies wird durch Vorbehandlung mit 200 μM NAC verhindert. Dieser Effekt ist signifikant für 200 μM H_2O_2 versus 200 μM H_2O_2 + NAC ($41,30 \pm 24,47\%$ vs. $198,58 \pm 57,27\%$; $p < 0,05$, siehe Abbildung 3.14).

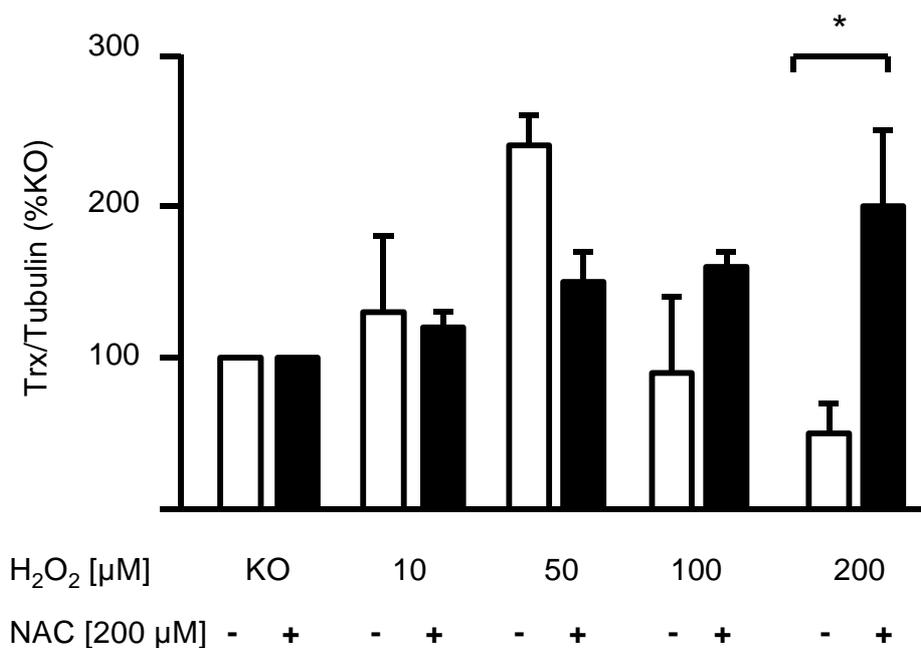


Abbildung 3.14: Effekt von NAC auf den Trx-1 Gehalt unter oxidativem Stress

Die Blots wurden eingescannt und die Trx-1/Tubulin-Ratio berechnet. Werte sind Mittelwerte \pm SEM, $n=3$, * $p < 0,05$ 200 μM H_2O_2 + 200 μM NAC vs. 200 μM H_2O_2 . KO Kontrolle.

3.6 Einfluss von Schubspannung auf den Trx-1-Level in HUVEC

Laurindo et al. entdeckten 1994, dass ein Anstieg im Blutfluss die Freisetzung von ROS in vivo und in isolierten Kaninchenaorten hervorruft (Laurindo et al. 1994). Bereits wenige Minuten nach Applikation von laminarer Schubspannung beginnt in HUVEC die Produktion intrazellulärer Superoxidanionen, die bei fortbestehender Schubspannung für mindestens 6 Stunden anhält (De Keulenaer et al. 1998b, Chiu et al. 1997). Zudem ist Schubspannung der wichtigste physiologische Stimulus zur Bildung von NO durch die eNOS (Busse und Fleming 1998). In HUVEC wird nach einer Applikation von Schubspannung über einen Zeitraum von 24 Stunden die eNOS mRNA Expression 2 bis 3-fach erhöht (Uematsu et al. 1995). Außerdem wird unter Schubspannung die eNOS über den Phosphatidylinositol-3-OH Kinase/Akt Signaltransduktionsweg verstärkt phosphoryliert und vermehrt NO gebildet (Dimmeler et al. 1999a). Wie Haendeler et al. 2004 zeigten, wird Trx-1 mRNA durch Schubspannung induziert (Haendeler et al. 2004b). Dieser Effekt war durch NAC inhibierbar und unabhängig von der eNOS (Haendeler et al. 2004b).

Um den Effekt von Schubspannung auf den Trx-1 Gehalt von HUVEC zu untersuchen, wurden 3×10^5 HUVEC in einer 60 mm Zellkulturschale für 6 Stunden Schubspannung von 15 dynes/cm^2 und $50 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ ausgesetzt, und die Zellen auf ihren Trx-1 Protein Gehalt untersucht. Wie auf den Abbildungen 3.15A und B zu erkennen ist, erhöht Schubspannung nach 6 Stunden signifikant den Gehalt an Trx-1 unter Basalbedingungen ($238 \pm 63\%$ mit Schubspannung, $p < 0,05$ versus Kontrolle). Unter $50 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ kommt es durch Schubspannung zu keiner weiteren Steigerung des Trx-1-Proteingehalts (ohne Schubspannung $410 \pm 192\%$ und mit Schubspannung $438 \pm 198\%$).

Somit haben exogene und endogene ROS den gleichen Effekt auf die Trx-1-Expression in HUVEC.

Zusammen mit der Beobachtung der Trx-1 mRNA Induktion unter Schubspannung und den gemessenen intrazellulären ROS (Haendeler et al. 2004b) sowie den in dieser Arbeit vorgestellten Resultaten spricht dies für die

Beteiligung reaktiver Sauerstoffspezies an der Regulation der Oxidoreduktase Thioredoxin-1.

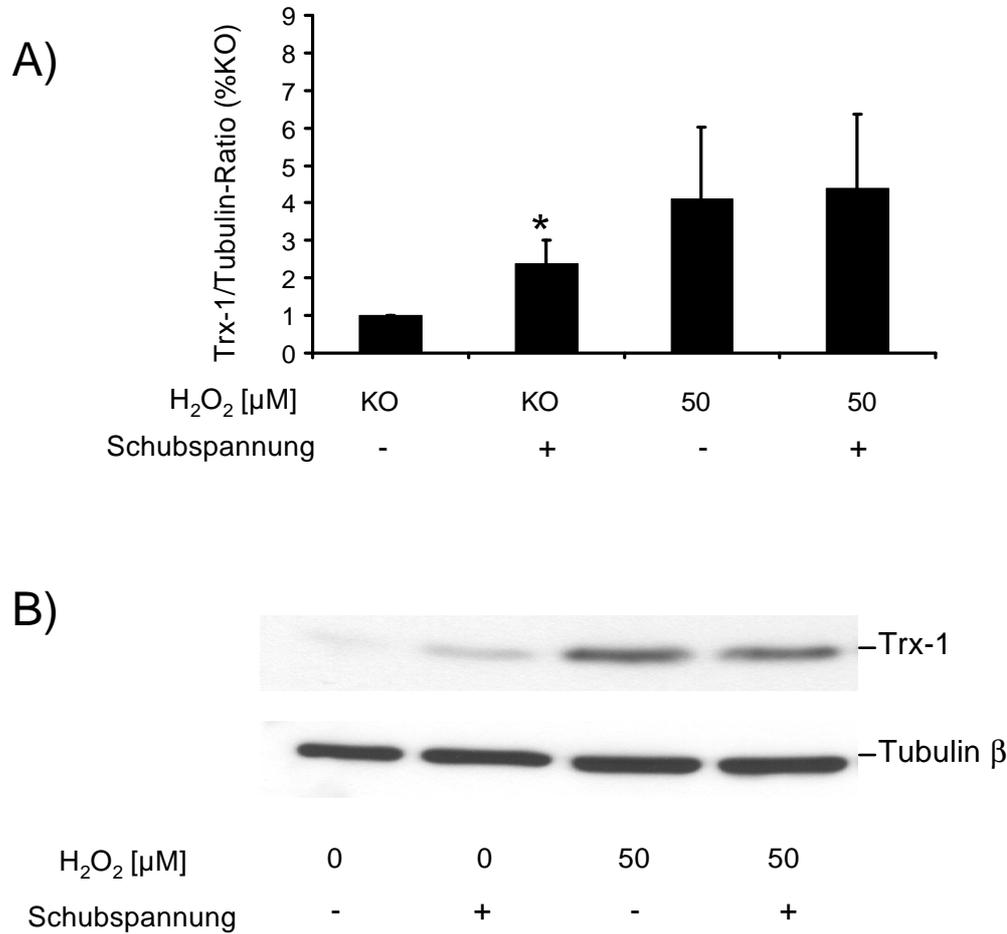


Abbildung 3.15: Schubspannung induziert Trx-1 Protein unter Basalbedingungen

HUVEC wurden für 6 Stunden einer Schubspannung von 15 dynes/cm² ausgesetzt unter Kontrollbedingungen und unter 50 µM H₂O₂. Dann wurden die Zellen lysiert (2.2.1) und 80 µg Protein auf einem 14% Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Der Western Blot wurde wie unter 2.2.5 beschrieben durchgeführt. Die Blots wurden gescannt, densitometrisch ausgewertet und die Trx-1/Tubulin-Ratio berechnet. Wie auf 3.15A zu sehen ist, erhöht Schubspannung signifikant den zellulären Gehalt an Trx-1-Protein. Sowohl 50 µM H₂O₂ als auch 50 µM H₂O₂ kombiniert mit Schubspannung induzieren Trx-1-Protein auf das 4-fache des Kontrollwerts. Gezeigt sind Mittelwerte ± SEM, n=3. *p<0,05 Schubspannung versus keine Schubspannung. Abbildung 3.15B zeigt einen repräsentativen Blot.

3.7 Exogenes Stickstoffmonoxid stabilisiert Trx-1

Stickstoffmonoxid (NO) hat abhängig von seiner Konzentration zytoprotektive oder zytotoxische Wirkung auf Endothelzellen. Es kann durch Bindung an Cysteinylreste oder Fe-haltige Proteine die Proteinfunktion modulieren oder durch Reaktion mit Superoxidanionen das toxische Peroxynitrit bilden. In der Gefäßbiologie ist NO wegen seiner antiatherogenen und antiapoptotischen Funktion von großer Bedeutung. Wie zuvor gezeigt, wird Trx-1 durch reaktive Sauerstoffspezies biphasisch reguliert. Es stellte sich daher die Frage, ob ein bekannt gefäßprotektiver Faktor wie NO die Herabregulation von Trx-1 unter hohen Konzentrationen von Wasserstoffperoxid modifizieren kann, zumal bereits gezeigt wurde, dass Thioredoxin-1 an Cystein 69 S-nitrosyliert wird und dies von Bedeutung für die antiapoptotische Funktion von Trx-1 ist (Haendeler et al. 2002). HUVEC wurden mit dem NO-Donor Papanonoate in einer Konzentration von 100 μM für 1 Stunde präinkubiert und anschließend mit 10, 50, 100 und 200 μM H_2O_2 für 6 Stunden weiter inkubiert.

Um zu sehen, ob es sich um einen generellen Effekt von NO handelt, wurde überprüft, ob unter Kontrollbedingungen der Trx-1-Gehalt ebenfalls vermehrt ist. Wie sich zeigte, hat NO alleine keinen Effekt auf den intrazellulären Trx-1-Gehalt (siehe Abbildungen 3.16A und 3.16B).

Wie man auf Abbildung 3.16C erkennt, ist exogenes NO in der Lage, Trx-1 unter 100 und 200 μM H_2O_2 zu stabilisieren. Dabei wird der Anstieg von Trx-1 unter 10 und 50 μM H_2O_2 nicht verändert, was darauf hindeutet, dass die reaktiven Sauerstoffspezies als Signalmoleküle erhalten bleiben und zumindest unter diesen Konzentrationen H_2O_2 kein toxisches Peroxynitrit mit NO gebildet wird.

Es wurde spekuliert, ob Trx-1 ein Speicher für zelluläres NO sein könnte. In diesem Fall würde eine Erhöhung der Trx-1 mRNA-Menge unter vermehrtem NO-Angebot sinnvoll erscheinen. Eine Induktion von Trx-1 mRNA ließ sich jedoch durch Analyse von Gesamt-RNA mittels LightCycler nicht verifizieren (Daten nicht gezeigt). Umgekehrt wird allerdings Trx-1 mRNA auch nicht verringert durch Inhibierung der eNOS durch L-NMMA (Haendeler et al. 2004b).

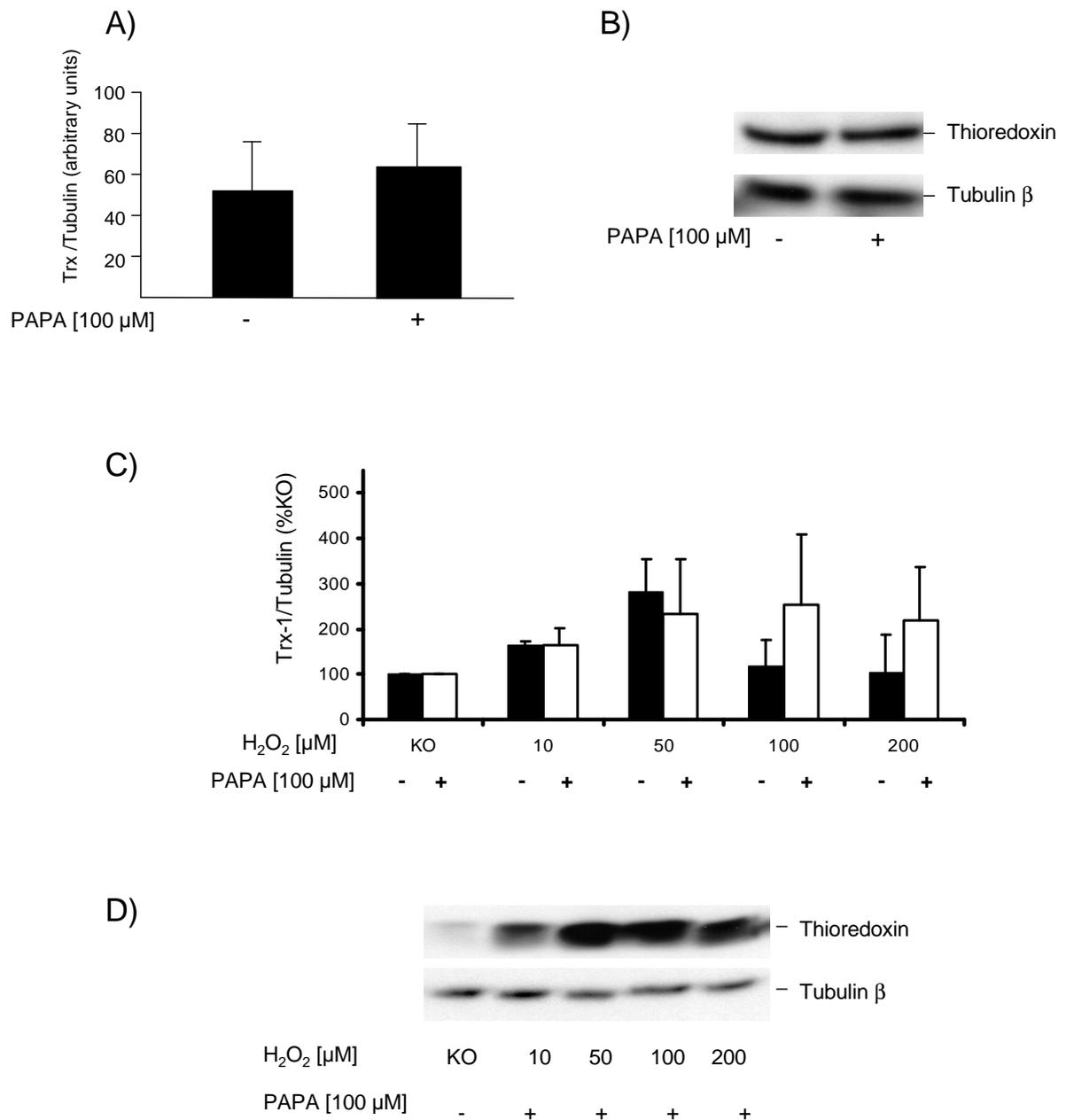


Abbildung 3.16: Exogenes NO stabilisiert Trx-1 unter oxidativem Stress

HUVEC wurden eine Stunde mit dem NO-Donor Papanonoate (100 μM) präinkubiert und anschließend über 6 Stunden H₂O₂ in den angegebenen Konzentrationen ausgesetzt. Dann wurden die Zellen lysiert (2.2.1) und 80 μg Protein im 14% Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Western Blot wurde wie unter 2.2.5 durchgeführt und die Proteine detektiert (2.2.6). A) Die Western Blots wurden densitometrisch ausgewertet. Gezeigt sind die Trx-1-Level mit bzw. ohne Papanonoate. Angegeben sind Mittelwerte ± SEM, n=7. B) zeigt einen repräsentativen Western Blot. C) Die densitometrische Auswertung zeigt, dass Trx-1 Protein nach Präinkubation mit dem NO-Donor Papanonoate (100 μM) unter hohen Konzentrationen H₂O₂ nicht verringert vorliegt. Angegeben sind Mittelwerte ± SEM, n=6. D) zeigt einen repräsentativen Western Blot. KO: Kontrolle, PAPA: Papanonoate.

Vermutlich handelt es sich eher um eine posttranslationelle Regulation im Sinne einer Stabilisierung von Trx-1 durch S-Nitrosylierung oder eine Regulation der Protease, die für den Abbau von Trx-1 unter oxidativem Stress verantwortlich ist.

Hier kämen verschiedene Proteasen in Frage, wie zum Beispiel der Ubiquitin-Proteasomenkomplex, oder Cysteinylnproteasen, wie zum Beispiel Caspasen. Um herauszufinden, ob eine und wenn ja welche Protease beteiligt ist, kann man mittels Inhibitoren die Funktion bestimmter Proteasen bzw. Proteaseklassen ausschalten (siehe 3.9).

3.8 Trx-1 in eNOS-defizienten Zellen

Nach der Beobachtung, dass exogenes NO Trx-1 unter oxidativem Stress stabilisieren kann, stellte sich die Frage, welche Rolle endogenes NO für den zellulären Trx-1-Gehalt spielt. Dazu wurde untersucht, ob der Trx-1-Gehalt unter Basalbedingungen in Organen eNOS-defizienter Mäusen verändert ist im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Die Nieren der Tiere wurden wie unter 2.2.2 lysiert, der Proteingehalt bestimmt (2.2.3) und die Gelelektrophorese (2.2.4) sowie der Western Blot (2.2.5) durchgeführt.

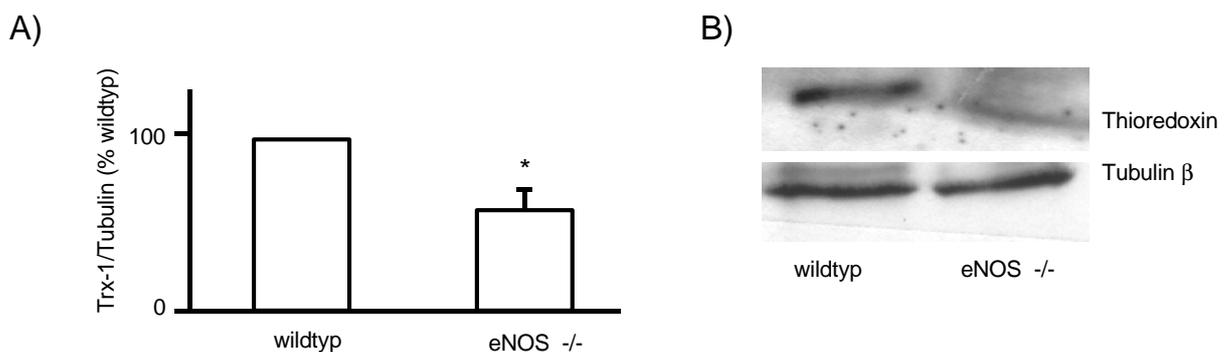


Abbildung 3.17: Verminderter Gehalt von Trx-1 in Nieren von eNOS^{-/-} versus Wildtyp-Mäusen

Nieren von eNOS^{-/-} Mäusen wurden wie unter 2.2.2 beschrieben lysiert und der Proteingehalt bestimmt. 100 µg Protein wurden auf einem 14% Gel aufgetrennt und der Western Blot (2.2.5) durchgeführt. A) Die Western Blots wurden eingescannt, densitometrisch ausgewertet und die Trx-1/Tubulin-Ratio berechnet. Angegeben sind Mittelwerte ± SEM in % Wildtyp, n=3, *p<0,05 versus Wildtyp. B) Gezeigt ist ein repräsentativer Western Blot.

Wie auf den Abbildungen 3.17A und B zu sehen ist, ist der Gehalt von Trx-1-Protein in den Nieren eNOS-defizienter Tieren signifikant vermindert gegenüber Wildtyp-Kontrolltieren (auf $58,35 \pm 14,1\%$ des Wildtypkontrollwerts). Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass Trx-1 möglicherweise in Zellen, die kein endogenes NO über die eNOS produzieren können, weniger stabil ist.

3.9 Mechanismus der Trx-1-Reduktion unter oxidativem Stress

Wie zuvor schon gezeigt, senkt H_2O_2 in Konzentrationen von 100 und 200 μM den Trx-1-Gehalt in HUVEC unter Basalniveau (siehe Abbildung 3.4). Eine transkriptionelle Regulation konnte durch quantitative Trx-1-mRNA-Bestimmung ausgeschlossen werden (siehe Abbildung 3.3). Die Stabilisierung von Trx-1 durch NO (siehe 3.7) lässt zudem einen posttranskriptionellen Mechanismus des Trx-1 Abbaus unter oxidativem Stress vermuten wie z. B. einen Abbau durch eine Protease. Proteasen sind von essentieller Bedeutung für die zelluläre Homöostase. Bislang wurde eine Vielzahl von Proteasen mit unterschiedlicher Funktion beschrieben, die sich durch Angriffsorte im Protein (Endopeptidasen, Exopeptidasen) sowie intrazellulären (Proteasomenkomplex, Caspasen, Cathepsine) und extrazellulären Wirkort (Trypsin, Proteine der Blutgerinnung und Fibrinolyse, Matrixmetalloproteinasen) unterscheiden.

Lysosomen sind Zellorganellen, die eine Vielzahl von Enzymen zum Abbau von Proteinen, Nukleinsäuren, Polysacchariden und Lipiden enthalten. Zur Enzymausstattung der Lysosomen gehören auch die Cathepsine, die ubiquitär in normalen Geweben verbreitet sind. Cathepsine sind an Signalwegen beteiligt, die zum Zelltod führen (Leist et al. 2001). Insbesondere dem Cathepsin D, einer Aspartatprotease, wurde eine Rolle als Mediatorprotein am programmierten Zelltod zugesprochen (Deiss und Galinka 1996, Jäätelä et al. 2004, Roberg et al. 1998). Fibroblasten von Cathepsin D-defizienten Mäusen waren zudem resistenter gegenüber Etoposid und Adriamycin induzierter Apoptose als Fibroblasten von Wildtyp-Mäusen (Wu et al. 1998). Auf Caspasen wurde schon unter 1.3.1 eingegangen. Der Ubiquitin-Proteasomen-Komplex enthält als Hauptkomponente die multikatalytische Protease und baut mit

Ubiquitin markierte Proteine, die z.B. fehlgefaltet oder oxidativ beschädigt sind, ab. Metalloproteinasen und Serin-Proteasen werden hauptsächlich sezerniert und wirken auf die extrazelluläre Matrix.

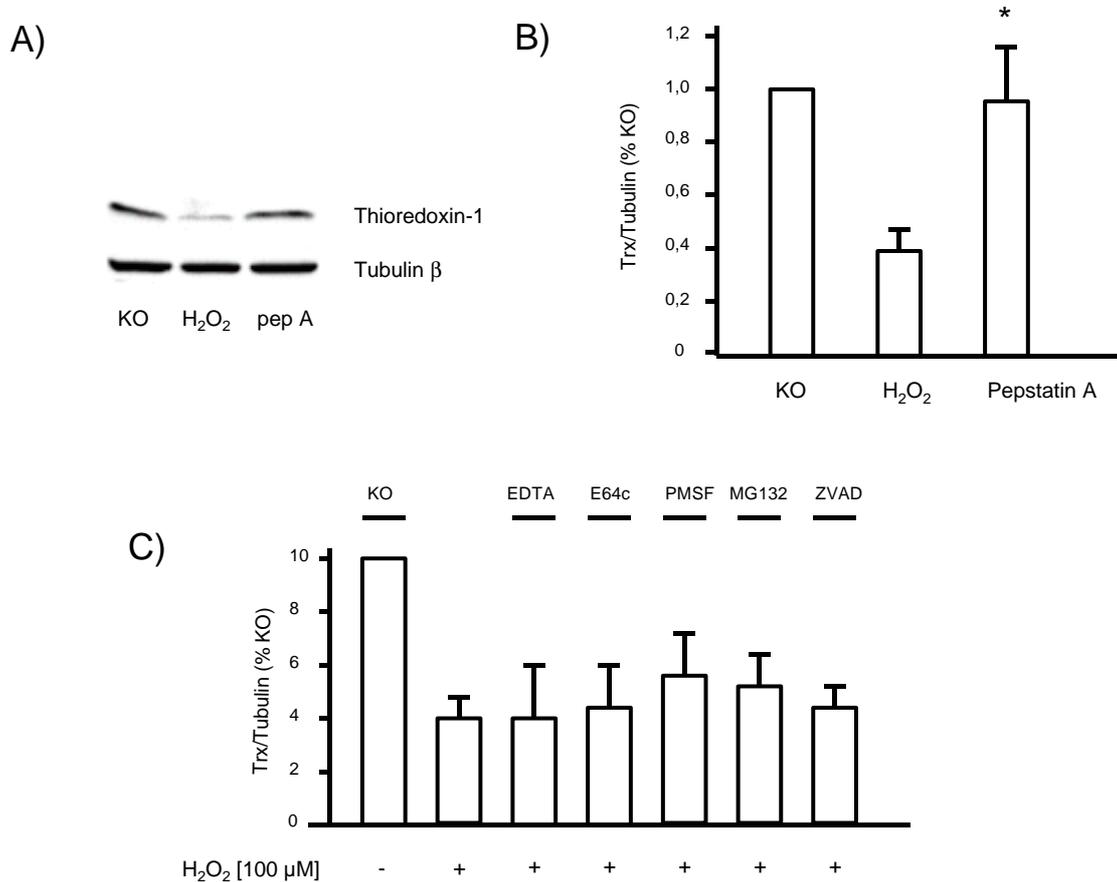


Abbildung 3.18: Der Trx-1-Abbau unter oxidativem Stress erfolgt durch Cathepsin D

HUVEC wurden mit den angegebenen membrangängigen Proteaseinhibitoren präinkubiert und dann für 6 Stunden oxidativem Stress durch H₂O₂ in einer Konzentration von 100 μM ausgesetzt. Anschließend wurden die Zellen wie unter 2.2.1 beschrieben lysiert und der Proteingehalt bestimmt (2.2.3). Nach dem Auftrennen des Proteingemischs mittels SDS-PAGE (2.2.4) und Durchführung des Western Blots (2.2.5) wurden die Proteine detektiert (2.2.6). A) zeigt einen repräsentativen Western Blot. B) Die Filme wurden gescannt und densitometrisch ausgewertet. Die Trx-1/Tubulin-Ratio wurde berechnet. Angegebene Werte sind Mittelwerte ± SEM, n=5, *p<0,05 vs H₂O₂). Der Proteaseinhibitor Pepstatin A (10 μg/ml) kann den Abbau von Trx-1 unter 100 μM H₂O₂ vollkommen blockieren. C) Die Filme wurden wie unter B) beschrieben ausgewertet. Angegebene Werte sind Mittelwerte ± SEM, n=3-8) Keiner der anderen Proteaseinhibitoren verhindert den Abbau von Trx-1 unter oxidativem Stress in HUVEC. Pep A Pepstatin A.

Für die Versuche kamen zum Einsatz der Cathepsin-D-Inhibitor Pepstatin A, der Breitspektrum-Metalloproteinase-Inhibitor EDTA, der membrangängige Cysteinprotease-Inhibitor E64c, der Breitspektrum-Caspase-Inhibitor ZVAD-fmk, der Ubiquitin-Proteasomenkomplex-Inhibitor MG 132 und der Serin-Protease-Inhibitor PMSF (siehe Tabelle 2). Die HUVEC wurden mit den jeweiligen Proteaseinhibitoren vorinkubiert und mit 100 μM H_2O_2 für 6 Stunden behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und wie zuvor beschrieben für den Western Blot vorbereitet. Abbildung 3.18 zeigt die Ergebnisse.

Die Inhibierung von Cathepsin D durch Pepstatin A verhindert den Abbau von Trx-1 unter 100 μM H_2O_2 vollständig. Trx-1 wird also unter oxidativem Stress durch Cathepsin D degradiert. Keine der anderen hier untersuchten Proteasen ist am Abbau von Trx-1 beteiligt (siehe Abbildung 3.18A-C).

Tabelle 2: Verwendete Inhibitoren und Konzentrationen

Protease	Inhibitor	verwendete Konzentration
Cathepsin D	Pepstatin A	10 $\mu\text{g/ml}$
Metalloproteinasen	EDTA	5 mM
Cysteinproteasen	E64c	10 $\mu\text{g/ml}$
Caspasen	ZVAD-fmk	100 μM
Ubiquitin-Proteasomenkomplex	MG 132	40 μM
Serin-Proteasen	PMSF	2 mM

4 Diskussion

4.1 H₂O₂ und TNF α führen zur Bildung intrazellulärer ROS

Wie gezeigt werden konnte, ist der Effekt von Wasserstoffperoxid hinsichtlich der Generierung intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies vergleichbar mit TNF α (siehe Abbildung 3.1). Dies ist einerseits überraschend, da H₂O₂ zu den reaktiven Sauerstoffspezies und TNF α zu den Zytokinen gerechnet wird. Andererseits ist bekannt, dass TNF α über eine Aktivierung der NADPH-Oxidase den Gehalt an intrazellulärem Superoxid erhöht und außerdem über den Mediator Ceramid ROS aus Mitochondrien freizusetzen vermag (Li et al. 2002, Corda et al. 2001). Die intrazelluläre Konzentration an ROS im steady state wird auf 1 nMol/l geschätzt (Brawn und Fridovich 1980). Die vorgelegten Daten zeigen nach Gabe von H₂O₂ bzw. TNF α eine Zunahme intrazellulärer ROS um 45% bzw. 38% gegenüber Basalniveau. Der für die FACS-Analyse verwendete Farbstoff H₂DCF-DA wird in die Zellen aufgenommen und dort von Esterasen zu H₂DCF gespalten, welches die Zelle nicht verlassen kann. In Anwesenheit von H₂O₂ wird H₂DCF zu DCF oxidiert. Die Lokalisation der NAD(P)H-Oxidasen an der zytosolgewandten Seite der Zellmembran führt jedoch sehr wahrscheinlich zu einem völlig anderen intrazellulären Ausbreitungsmuster der reaktiven Sauerstoffspezies nach TNF α -Gabe als nach Exposition von Endothelzellen gegenüber H₂O₂-haltigem Medium. Obwohl Superoxid durch die SOD zu H₂O₂ umgebaut wird, lässt sich vermuten, dass nach TNF α -Gabe intrazellulär andere Mengenverhältnisse der unterschiedlichen ROS vorliegen als nach H₂O₂-Gabe. Dies könnte auch erklären, warum durch Wasserstoffperoxid Trx-1 transkriptionell reguliert wird, während durch TNF α lediglich eine Stabilisierung auf Proteinebene stattfindet. Es ist möglich, dass TNF α Trx-1 unabhängig von ROS reguliert, zum Beispiel über eine vermehrte Präsenz von Trx-1 durch Herauslösen aus der Bindung mit ASK-1.

Die Färbung nach 6 Stunden zeigt, dass Wasserstoffperoxid in HUVEC zum vermehrten Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies geführt hat. Keine Aussage

kann an dieser Stelle darüber gemacht werden, wie sich der Gehalt an reaktiven Sauerstoffspezies in HUVEC zeitlich verhält. Eine Überexpression von Wildtyp-Trx-1 in HUVEC senkt den endogenen ROS-Gehalt (Haendeler et al. 2002). Es ist daher wahrscheinlich, dass der ROS-Gehalt in HUVEC nach 6 Stunden Inkubation mit 50 μM H_2O_2 höher wäre, wenn es nicht zur Induktion der endogenen Trx-1-Expression käme.

4.2 Regulation der Oxidoreduktase Trx-1 durch ROS

Die vorgelegten Daten zeigen, dass Trx-1 durch unterschiedliche Konzentrationen an H_2O_2 biphasisch reguliert wird (siehe Abbildung 3.4). Die Signalwege, über welche reaktive Sauerstoffspezies in physiologischen Konzentrationen als second messenger wirken, sind nur unzureichend bekannt. Vorangehende Studien lassen vermuten, dass reaktive Sauerstoffspezies Caspasen regulieren (zur Übersicht (Hampton et al. 1998), Deshpande et al. 2000) und die Serin/Threonin-Kinase Akt (Wang et al. 2000) sowie die MAPK (Wang et al. 1998) aktivieren. Hier wird gezeigt, dass geringe Konzentrationen Wasserstoffperoxid den Redoxregulator Trx-1 hochregulieren. Es ist bekannt, dass Trx-1 direkt mit Wasserstoffperoxid reagieren und es so „entgiften“ kann (Dalton et al. 1999, Nakamura et al. 1997). Denkbar wäre eine Regulation von Trx-1 durch Wasserstoffperoxid im Sinne einer Feedbackregulation, wie es zuvor bereits für das antioxidative Enzym Katalase und in Endothelzellen für einige weitere antioxidative Enzyme gezeigt worden ist (Xu et al. 2001, Lu et al. 1993).

Die Induktion der Expression von Trx-1 könnte am wahrscheinlichsten über ARE (engl. antioxidative responsive element) oder ORE (engl. oxidative stress element) im Trx-1-Promotor vermittelt sein. Beide Elemente sind in Untersuchungen an einer erhöhten Trx-1-Expression in T-Zellen und Neutrophilen unter oxidativem Stress durch Strahlung oder Menadion beteiligt gewesen (Taniguchi et al. 1996, Kim et al. 2003). Auch eine Interaktion von ARE und ORE miteinander und mit weiteren regulatorischen Elementen im Trx-1-Promotor nach Induktion von oxidativem Stress wurde in einem

Mammakarzinommodell beschrieben (Osborne et al. 2006). Abbildung 4.1 zeigt einen möglichen Mechanismus der Trx-1-Regulation durch ROS:

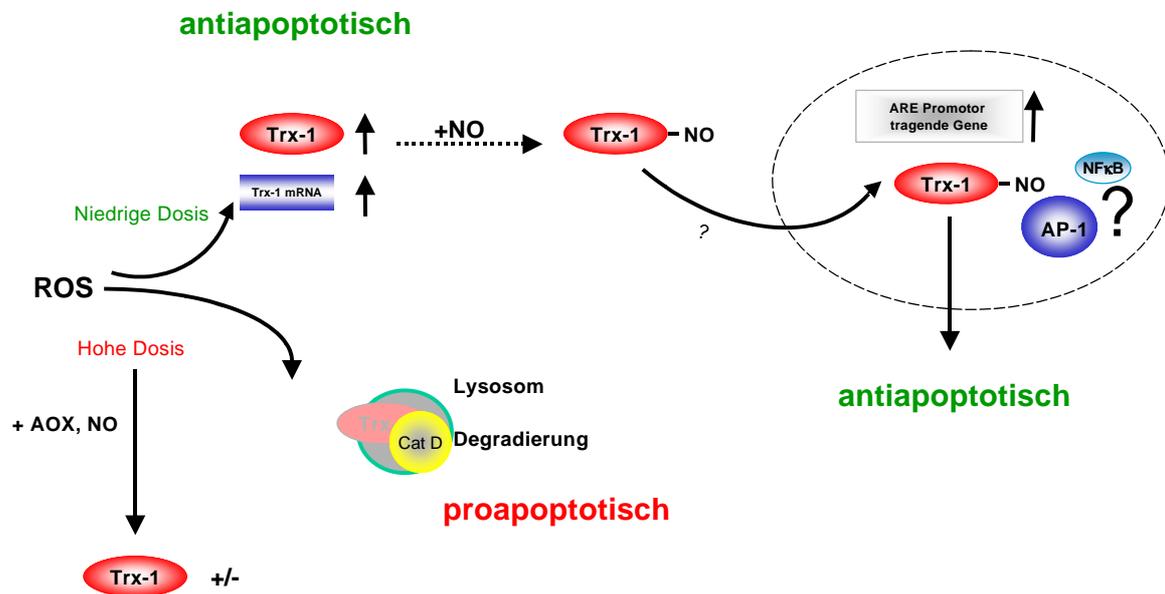


Abbildung 4.1: Möglicher Mechanismus der Trx-1-Regulation unter oxidativem Stress

Geringe ROS-Mengen, zum Beispiel exogen oder durch Schubspannung, induzieren Trx-1 mRNA und Trx-1 Protein. Trx-1 kann in den Nucleus wandern und in Abhängigkeit vom Redoxstatus NFκB reversibel (Überleben) oder irreversibel (Apoptose) aktivieren. Eine Translokation von Trx-1 in den Nucleus könnte ebenso zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 und zum Überleben führen. Des Weiteren könnte es zur vermehrten Inhibierung von ASK-1 durch Trx-1 kommen. Hohe intrazelluläre ROS-Mengen führen zur Verminderung von Trx-1 Protein durch Degradierung durch Cathepsin D im Lysosom.

Interessanterweise konnte auch das Zytokin TNFα die Expression von Trx-1-Protein abhängig von seiner Konzentration im Medium erhöhen (siehe Abbildung 3.9). Allerdings wurde bei den verwendeten Konzentrationen bis 200 ng/ml kein Abfall der intrazellulären Trx-1-Menge beobachtet. Die unter 3.1 gezeigte Induktion intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies durch TNFα legt nahe, dass diese auch für die vermehrte Expression von Trx-1 in diesem Fall verantwortlich sein könnten. Ein wichtiger Unterschied zwischen TNFα- und Wasserstoffperoxid-induzierter Trx-1-Expression ist jedoch, dass TNFα Trx-1 nicht transkriptionell reguliert. Mögliche Erklärungen für eine nicht transkriptionelle Regulation sind:

- dass Trx-1 nach Zugabe von TNFα vermehrt nachweisbar ist, da Trx-1 durch TNFα aus seinem Komplex mit ASK-1 herausgelöst wird (Saitoh et al. 1998).

- b) dass $\text{TNF}\alpha$ eine Protease, die Trx-1 abbaut, hemmt oder auf anderem Wege der Abbau eines antioxidativen Proteins durch $\text{TNF}\alpha$ begünstigt wird und Trx-1 kompensatorisch eine längere Halbwertszeit hat. Von Hoffmann und Haendeler wurde 2001 eine Verminderung des S-NO-Gehalts in HUVEC nach Zugabe von 100 ng/ml $\text{TNF}\alpha$ beschrieben (Hoffmann und Haendeler 2001b), so dass auch hier eine kompensatorische Erhöhung des Trx-1-Gehalts vorstellbar ist.
- c) dass $\text{TNF}\alpha$ und Wasserstoffperoxid induzierte ROS von unterschiedlicher Kinetik sind und so der Unterschied bei der Induktion von Trx-1-mRNA zustande kommt.

Weitere Versuche sind notwendig, um den Mechanismus zu klären.

4.3 Geringe Dosen H_2O_2 wirken antiapoptotisch über Trx-1

Die Ergebnisse zeigen, dass geringe Konzentrationen reaktiver Sauerstoffspezies in einer Größenordnung von 10 bis 50 μM H_2O_2 Endothelzellen vor Apoptose schützen. Höhere Konzentrationen an H_2O_2 hingegen induzieren Apoptose (siehe Abbildung 3.11). Wie Stickstoffmonoxid sind offenbar auch reaktive Sauerstoffspezies konzentrationsabhängig als zweischneidiges Schwert zu bewerten.

Eine vermehrte Expression von Trx-1 in Endothelzellen wirkt sich protektiv gegenüber ROS-vermittelter Apoptose aus (siehe Abbildung 4.2A). Umgekehrt trifft im Endothelzellmodell zu, dass eine Verminderung der Trx-1-Expression auf Proteinebene zur gesteigerten Empfänglichkeit gegenüber ROS induzierter Apoptose führt (siehe Abbildung 4.2B). Sicherlich ist der Trx-1-Level nicht das einzige Kriterium für die Empfindlichkeit einer Zelle gegenüber oxidativem Stress. In verschiedenen Studien wurde bereits gezeigt, dass überexprimiertes oder rekombinantes Trx-1 Zellen vor dem Zelltod bewahren kann (Didier et al. 2001, Haendeler et al. 2002, Nakamura et al. 1994). Allerdings muss man auch berücksichtigen, dass verschiedene Zelltypen unterschiedlich empfindlich gegenüber proapoptotischen Stimuli sind. In einer von Andoh et al. 2002 vorgestellten Untersuchung wurden unter anderem für unterschiedliche

Tumorzelltypen die endogenen Trx-1-Level bestimmt. Es zeigten sich große Unterschiede hinsichtlich der Induktion von Apoptose durch Entzug von Wachstumsfaktoren – Zellen mit niedrigem Trx-1-Gehalt waren empfindlicher und konnten durch exogene Trx-1-Gabe geschützt werden (Andoh et al. 2002).

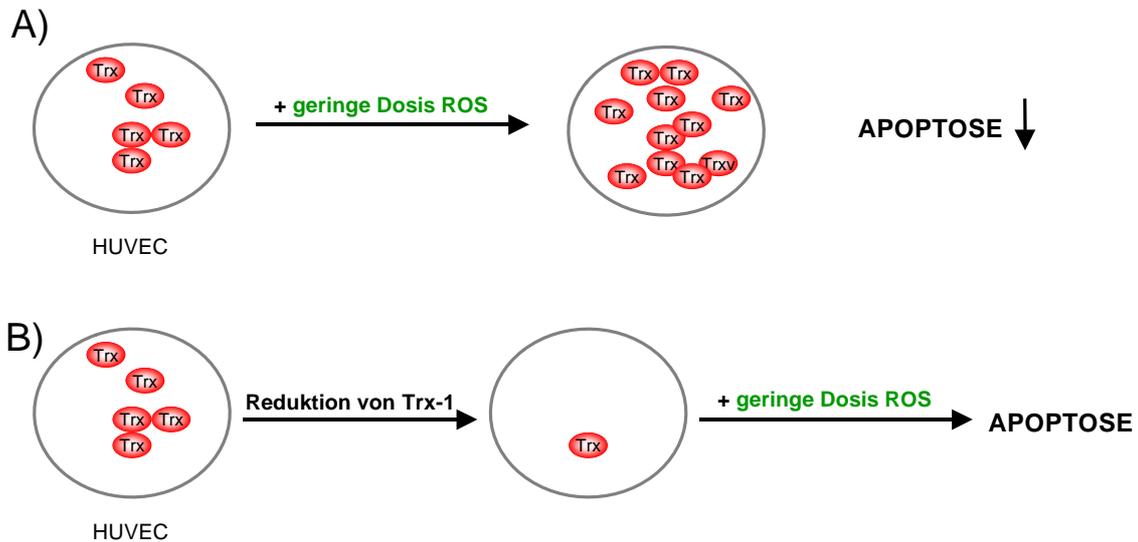


Abbildung 4.2: A) ROS in geringer Dosis führen zur Erhöhung des intrazellulären Trx-1-Gehalts und zu verminderter Apoptose in HUVEC. B) Eine Reduktion von intrazellulärem Trx-1 durch Trx-1-Antisense-Oligonukleotide hebt den antiapoptotischen Effekt geringer Mengen ROS auf.

Es wurde beschrieben, dass oxidativer Stress Trx-1 in vivo und in vitro inhibiert und dies zum Auftreten von Hypertonie und Gefäßkrankheiten führt (Tanito et al. 2004, Schulze et al. 2004). Daher ist es eine interessante Überlegung, dass eine gesteigerte Trx-1-Expression an einer verminderten Endothelzellapoptose und möglicherweise einer verminderten endothelialen Dysfunktion beteiligt sein könnte.

Darüber hinaus aktiviert Trx-1 Transkriptionsfaktoren wie NFκB und AP-1 mittels Bindung von Ref-1 (Schenk et al. 1994, Wei et al. 2000). Diese Arbeit liefert nun Hinweise, dass niedrige Konzentrationen von Wasserstoffperoxid Endothelzellen abhängig von Trx-1 vor Apoptose schützen. Dieser protektive Effekt trat bereits nach 6 Stunden Inkubation der Zellen mit niedrigen Dosen an H₂O₂ auf. Daher ist als möglicher Mechanismus eine Hochregulation von „immediate early“ Genen wie dem Transkriptionsfaktor AP-1 denkbar. Die

Induktion nukleärer Faktoren durch Trx-1 wäre möglich über eine Translokation von Trx-1 aus dem Zytosol in den Nukleus wie es z.B. nach Induktion von oxidativem Stress durch Ferronitilotriacetat beschrieben wurde (Wei et al. 2000). Nach Translokation in den Nukleus erhöht Trx-1 die DNA-Bindung von AP-1 und/oder NF κ B, wodurch letztlich unterschiedliche Zielproteine transkriptionell aktiviert werden. Trx-1 bindet direkt an NF κ B, wo es Disulfidbindungen reduziert und so die Bindungskapazität von NF κ B an die DNA verbessert (Matthews et al. 1992). Dieser Prozess ist reversibel. Somit wird durch diese Arbeit zur Diskussion hinsichtlich der kontroversen Beteiligung von NF κ B in der Induktion oder Inhibition der Apoptose durch oxidativen Stress beigetragen. Niedrige Konzentrationen H₂O₂ könnten dann reversibel eine kurzzeitige Aktivierung von NF κ B in Endothelzellen über die vermehrte Trx-1-Expression induzieren. Höhere Konzentrationen von H₂O₂ führen möglicherweise zur direkten Zerstörung der Disulfidbindung um Cystein 62 in NF κ B und so zur irreversiblen Aktivierung von NF κ B, die schließlich in den Tod der Endothelzellen mündet (siehe Abbildung 4.1).

Auch die Komplexbildung mit ASK-1 spielt hier vermutlich eine Rolle, denn über Anlagerung an ASK-1 verhindert Trx-1 deren Aktivierung durch ROS und TNF α (Saitoh et al. 1998). Liu et al. zeigten zudem, dass Überexpression von Wildtyp-Trx-1 zur Degradierung von ASK-1 führt (Liu et al. 2002). Die transkriptionelle Regulation von Trx-1 könnte daher auch über einen begünstigten Abbau der proapoptotischen ASK-1 antiapoptotisch wirken. Das heißt, wenn mehr Trx-1 zur Verfügung steht, ist die Zelle besser gegen proapoptotische Einflüsse geschützt. Zusammengefasst scheint die vermehrte Expression von Trx-1 induziert durch niedrige Konzentrationen H₂O₂ der Schlüssel zu deren antiapoptotischem Effekt zu sein.

4.4 N-Acetylcystein und exogenes NO stabilisieren Trx-1 unter oxidativem Stress

Präinkubation der HUVEC mit 200 μM NAC vermindert das zelluläre Trx-1 unter 50 μM H_2O_2 auf das 1,5-fache der Kontrolle (ohne NAC: 2,4-fache der Kontrolle), zeigt aber für 200 μM H_2O_2 eine Steigerung auf das ca. 2-fache (ohne NAC: 0,4-fache der Kontrolle, siehe Abbildung 3.14). Dies zeigt sehr klar die Abhängigkeit der Trx-1-Expression und des Trx-1-Abbaus vom Redoxstatus der Zelle sowie die Reversibilität des Effekts durch ein Antioxidans und spricht für eine Beteiligung von ROS an der Signaltransduktion (siehe Abbildung 4.3A). Der NO-Donor Papanonoate ist Membran permeabel und setzt intrazellulär NO frei. Präinkubation mit 100 μM Papanonoate vermindert den Abbau von Trx-1 unter oxidativem Stress (siehe Abbildung 4.3A). Ursächlich für die erhöhte Stabilität von Trx-1 könnte eine vermehrte S-Nitrosylierung sein, denn Trx-1 kann an Cystein 69 S-nitrosyliert werden (Haendeler et al. 2002). Auch Signalmoleküle wie Ras und JNK sowie Caspasen können durch S-Nitrosylierung reguliert werden (Stamler et al. 2001, Rössig et al. 1999). Es wurde bereits vermutet, dass Trx-1 intrazellulär als NO-Speicher dient.

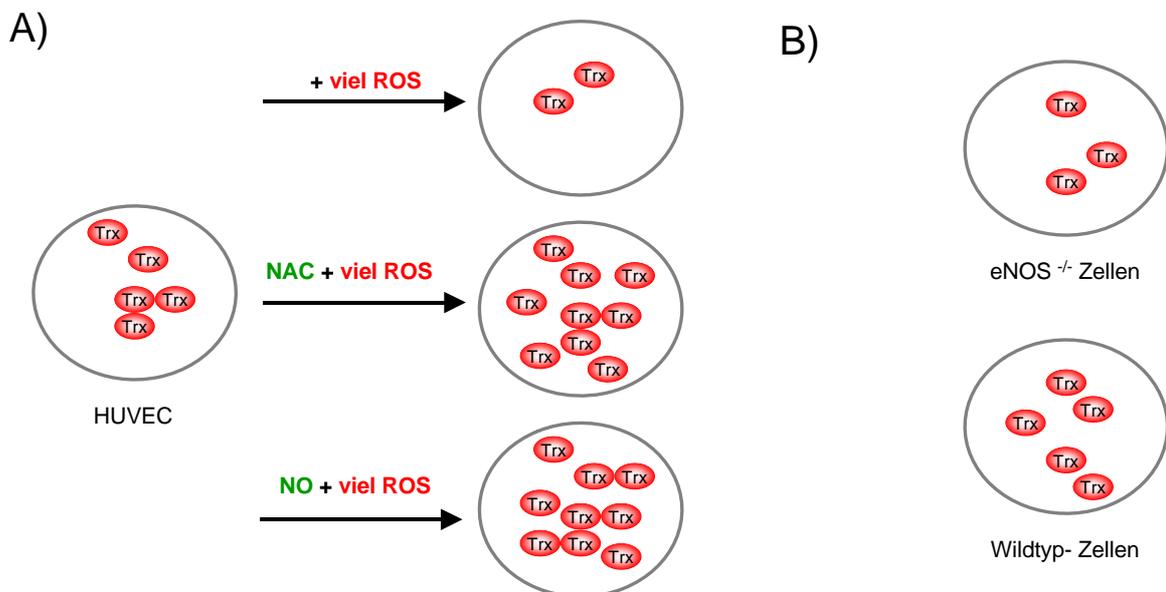


Abbildung 4.3: A) Hohe Konzentrationen an H_2O_2 verringern den Trx-1-Gehalt in HUVEC. Präinkubation mit dem Antioxidans NAC oder einem NO-Donor verhindert dies. B) eNOS-defiziente Zellen enthalten signifikant weniger Trx-1 als vergleichbare Wildtyp-Zellen.

Als weitere Ursache für die Stabilisierung von Trx-1 kommt eine Hemmung der Protease in Frage, die für den Abbau von Trx-1 unter oxidativem Stress verantwortlich ist.

Die Nieren eNOS-defizienter Mäuse enthalten niedrigere Trx-1-Levels (siehe Abbildung 4.3B) verglichen mit den Nieren von Wildtyp-Mäusen. eNOS-defiziente Mäuse neigen zu frühzeitiger Atherosklerose. Isolierte Endothelzellen von eNOS-defizienten Mäusen zeigen eine erhöhte Empfindlichkeit gegenüber Apoptose (Hoffmann und Haendeler 2001a). Es ist vorstellbar, dass die Zellen durch den NO-Mangel und den Trx-1-Mangel empfindlicher gegenüber ROS sein könnten. Die Ursache könnte ein vermindertes Vorliegen S-nitrosylierter Moleküle und damit auch eine geringere Stabilität und antiapoptotische Wirkung von Trx-1 sein.

4.5 Schubspannung induziert Trx-1-Protein unter basalen Bedingungen

In dieser Arbeit wurde nachgewiesen, dass die Applikation von Schubspannung den Gehalt an Trx-1 in Endothelzellen unter basalen Bedingungen erhöht (siehe Abbildung 4.4). Wie von Haendeler et al. gezeigt, führt Schubspannung unter diesen Bedingungen zu einer vermehrten Bildung intrazellulärer reaktiver Sauerstoffspezies (Haendeler et al. 2004b). Wie in dieser Arbeit demonstriert wurde, induzieren geringe Konzentrationen reaktiver Sauerstoffspezies Trx-1 sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene. Hiermit wurde ein weiterer Hinweis auf eine Signalfunktion reaktiver Sauerstoffspezies geliefert. Atherosklerotische Läsionen werden in Gefäßabschnitten mit turbulentem Blutfluss vermehrt beobachtet (Caro et al. 1969). Tricot et al. veröffentlichten, dass in humanen atherosklerotischen Plaques Apoptose vermehrt in Arealen mit geringer Schubspannung auftritt (Tricot et al. 2000). Trx-1 könnte also auch unter laminarer Schubspannung zur Intakthaltung des Endothels durch verminderte Apoptose beitragen. Eine weitere Möglichkeit wäre eine Stabilisierung von Trx-1 durch Schubspannung über die vermehrte Bildung von

NO. Die NO-Produktion setzt nach Applikation von Schubspannung praktisch unmittelbar ein, sodass eine Beteiligung der eNOS möglich ist. Yamakawi et al. berichteten 2005 über einen antiinflammatorischen Effekt von Schubspannung in Gefäßen, welcher über eine Verminderung von Trx interacting protein (TNIP) und damit eine erhöhte Trx-1-Aktivität sowie verminderte JNK und p38-Aktivität vermittelt wurde (Yamakawi et al. 2005). Der beobachtete Effekt der vermehrten Trx-1-Verfügbarkeit nach 6 Stunden könnte somit Bestandteil einer ganzen Kette von Abwehrmechanismen sein, die kardiovaskuläre Zellen oxidativem Stress entgegensetzen.

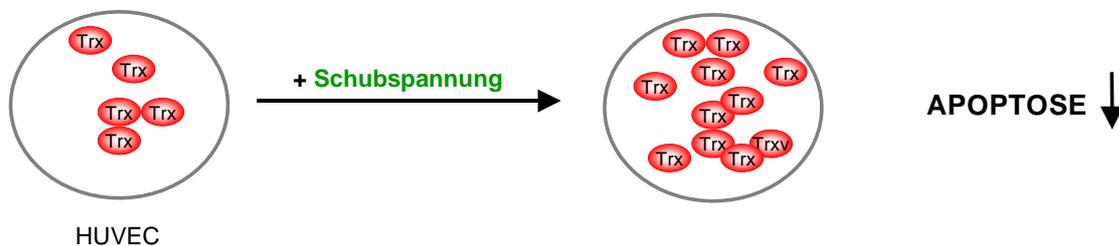


Abbildung 4.4: Die Applikation laminarer Schubspannung erhöht den Gehalt an intrazellulärem Trx-1. Schubspannung ist ein bekannter antiapoptotischer Stimulus für HUVEC.

4.6 Abbau von Trx-1 unter oxidativem Stress durch Cathepsin D

Für viele Jahre wurde angenommen, dass Cathepsine lediglich unspezifische Funktionen beim Zelltod haben, wie der Abbau nekrotischer Zellen oder apoptotischer Partikel. Mittlerweile gibt es verschiedene Berichte über die Beteiligung von Cathepsinen als Mediatoren in der Regulation der Apoptose (Deiss und Galinka 1996, Foghsgaard et al. 2001). In dieser Arbeit wurde nun gezeigt, dass die lysosomale Protease Cathepsin D Trx-1 unter oxidativem Stress abbaut (siehe Abbildung 4.5). Von Haendeler et al. wurde zudem nachgewiesen, dass H_2O_2 Cathepsin D in HUVEC aktiviert (Haendeler et al. 2005). Die Überexpression von Cathepsin D induziert Apoptose in HUVEC, wohingegen ein Ausschalten von Cathepsin D durch Transfektion von Antisense-Oligonukleotiden Apoptose durch hohe H_2O_2 -Mengen inhibiert (Haendeler et al. 2005). Trx-1 transloziert nach H_2O_2 -Gabe in die Lysosomen

und wird dort durch Cathepsin D degradiert, noch bevor es zur Apoptose kommt (Haendeler et al. 2005). Welche Mechanismen diese Translokation triggern können, ist bislang nicht aufgeklärt. Möglicherweise wird Trx-1 zuvor monoubiquitiniert (Haendeler et al. 2005).

Von welchen Faktoren es abhängt, ob Apoptose durch lysosomale Enzyme, Caspasen oder durch einen Crosstalk dieser beiden Proteasefamilien initiiert und ausgeführt wird, ist bislang nicht klar. Seit Ellis und Horvitz 1986 über Caspase-unabhängige Zelltodprogramme berichteten, gab es weitere Gruppen, die Zelltod mit morphologischen Aspekten der Apoptose aber ohne Aktivierung der Caspase-Kaskade zeigten (Ellis und Horvitz 1986, Foghsgaard et al 2001). In manchen Studien wurde diese Variante der Induktion des programmierten Zelltods nur offensichtlich, wenn die Caspasen funktionell ausgeschaltet waren (Khwaja und Tatton 1999). Auch eine Aktivierung von Lysosomen im Sinne einer Verstärkung der Caspase-Kaskade durch entstandene reaktive Sauerstoffspezies nach Zerstörung von Mitochondrien wurde postuliert (Zhao et al. 2003, Cirman et al. 2004). Die kurzzeitige Blockade der intralysosomalen Verdauung durch lysosomotropische alkalinisierende Substanzen verminderte die intralysosomale Proteolyse und intrazelluläre ROS-Produktion (Yu et al. 2003). Welche Wege ein proapoptotischer Stimulus nimmt und welche Wirkung er damit hat, hängt letztlich von den intrazellulären Verhältnissen aktiver Regulatorproteine im Augenblick der Exposition und dem extrazellulären Kontext ab.

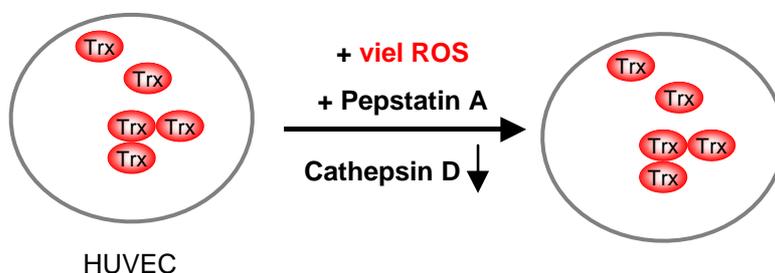


Abbildung 4.5: Hohe ROS-Mengen führen zur Verminderung von Trx-1 Protein. Diese Degradierung wird durch den Cathepsin D Inhibitor Pepstatin A verhindert.

4.7 Mögliche Bedeutung der Ergebnisse für die Atherosklerose

Endothelzellen kleiden die Gefäße von innen aus und sind von grundlegender Bedeutung für die Gefäßhomöostase. Wegen seiner exponierten Lage ist der Endothelzellmonolayer kontinuierlich zirkulierenden Faktoren ausgesetzt und über den Blutweg gut erreichbar. Wie von der Gruppe um Asai gezeigt wurde, korreliert die Endothelzellapoptose mit einer verschlechterten endothelialen Vasodilatatorfunktion im Affenmodell (Asai et al. 2000). Des Weiteren induzieren Mikropartikel, also Residuen apoptotischer Endothelzellen, die endotheliale Dysfunktion (Boulanger et al. 2001). Apoptotische Endothelzellen stimulieren auch die Bindung von Thrombozyten an das Endothel und wirken so prothrombotisch (Bombeli et al. 1997). Faktoren wie Thioredoxin-1 oder NO, welche die Endothelzellapoptose vermindern, kommt daher in der Prävention der Atherosklerose eine wichtige Funktion zu.

Bisherige Therapieversuche mit Antioxidantien bei Patienten mit bekannten atherosklerotischen Läsionen zeigten enttäuschende Ergebnisse. Dafür kommen verschiedene Gründe in Frage. So wurden zum Beispiel Patienten mit bekannten kardiovaskulären Erkrankungen erst spät mit Antioxidantien versorgt und so der Zeitpunkt der Entstehung atherosklerotischer Läsionen verpasst (Taniyama und Griendling 2003). Außerdem könnten die verschiedenen ROS unterschiedlich stark zu kardiovaskulären Erkrankungen beitragen und damit auch spezifische Antioxidantien zur Therapie erfordern (Taniyama und Griendling 2003). So könnte es sein, dass H_2O_2 wichtiger für die Atheromentstehung ist als Superoxid (Taniyama und Griendling 2003). ApolipoproteinE (ApoE)-defiziente Mäuse werden häufig als Modell für die Atherosklerose verwendet. Sie entwickeln spontan eine Hypercholesterolämie, atherosklerotische Läsionen und zeigen eine schlechtere Endothelfunktion als Wildtypmäuse (d'Uscio et al. 2001). Für eine wichtigere Funktion von H_2O_2 als O_2^- bei Atheromentstehung spräche beispielsweise, dass eine Überexpression von Katalase ApoE-defiziente Mäuse vor Atherosklerose schützt, nicht aber eine Überexpression von SOD (Yang et al. 2004). Dies würde auch die relativ schlechte Wirksamkeit von antioxidativen Vitaminen wie Vitamin C in der Atherosklerose erklären (Taniyama und Griendling 2003). Verglichen mit den

endogenen antioxidativen Systemen sind antioxidative Vitamine nämlich häufig nur schwach wirksam und wurden gegen Superoxidanionen nicht aber gegen H_2O_2 getestet (Taniyama und Griendling 2003). Hinzu kommt noch, dass Superoxid sehr schnell mit NO das toxische Peroxynitrit bildet und somit zusätzlich NO als ein protektiver Faktor verloren geht (Warnholtz und Münzel 2000). Um diese Reaktion zu unterbinden, wären sehr hohe Konzentrationen antioxidativer Substanzen notwendig (Warnholtz und Münzel 2000). Dann können Antioxidantien allerdings selbst auch oxidativ wirken. Beispielsweise Vitamin E zeigte in sehr hohen Konzentrationen sogar eine Verschlechterung der Endothelfunktion bei Tieren, die cholesterinreich ernährt wurden (Keaney et al. 1994). Eine große klinische Studie verglich sonographisch die Karotiden und die Elastizität großer Gefäße von Personen, die über einen mittleren Zeitraum von 7,2 Jahren Antioxidantien in niedriger Dosierung oder Placebo eingenommen hatten (Zureik et al. 2004). Auch hier konnte kein Nutzen der antioxidativen Nahrungsergänzung verzeichnet werden (Zureik et al. 2004). Besser wirksame und spezifischere Antioxidantien gegen H_2O_2 wie zum Beispiel Trx-1 könnten dazu beitragen, eine suffiziente antioxidative Therapie von Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen zu unterstützen. Eine Substanz, die bereits eingesetzt wird, ist der β HMG-CoA-Reduktase-Hemmer Atorvastatin. Hemmstoffe der β HMG-CoA-Reduktase, auch Statine genannt, unterbinden in der Cholesterinsynthese die geschwindigkeitsbestimmende Überführung der aktivierten 3-Hydroxy-3-methyl-Glutarsäure in die Mevalonsäure. Atorvastatin erhöht aber auch die enzymatische Aktivität von Trx-1 durch S-Nitrosylierung und vermindert auf diesem Weg oxidativen Stress in Endothelzellen (Haendeler et al. 2004a). Darüber hinaus vermindert Atorvastatin auch die Expression von NADPH-Oxidase-Untereinheiten und erhöht die Expression von Katalase in glatten Gefäßmuskelzellen (Wassmann et al. 2002). Ein weiteres Medikament, welches im weiteren Sinne zu den „Antioxidantien“ gezählt wird, ist die Gruppe der ACE-Hemmer, welche über die Inhibierung der Bildung von Angiotensin II auch zur verminderten Aktivierung der NAD(P)H-Oxidasen führen (Warnholtz und Münzel 2000). In verschiedenen Studien wurde bereits gezeigt, dass ACE-Hemmer die Progression der

Atherosklerose verzögern und die Endothelfunktion verbessern (Warnholtz und Münzel 2000). Grundsätzlich scheint es strategisch günstiger, die Entstehung von oxidativem Stress zu verhindern als mit klassischen nutritiven Antioxidantien wie Vitaminen bereits entstandene ROS „abzufangen“.

Um Trx-1 als Gentherapeutikum einsetzen zu können, muss gewährleistet sein, dass es selektiv auf Endothelzellen wirkt und keine unerwünschten, z. B. tumorigenen, Wirkungen im Körper hat. Auch sollte durch ein Antioxidans nicht die Signaltransduktion durch ROS gestört werden. Eine weitere Möglichkeit, Trx-1 in größerer Menge unter oxidativem Stress intrazellulär verfügbar zu machen, wäre eine pharmakologische Inhibierung der abbauenden Protease Cathepsin D. Da Cathepsin D derzeit als prognostischer Marker für verschiedene Tumoren charakterisiert wird, bleibt abzuwarten welchen Nutzen und welche Risiken sich für eine pharmakologische Modifikation von Cathepsin D ableiten lassen (Likaki-Karatza et al. 2006, Merseburger et al. 2005, Speleman et al. 2007). Für Endothelzellen ist noch die Aktivierung der eNOS durch laminare Schubspannung von Bedeutung, um durch NO-Bereitstellung Trx-1 aktiv zu halten und zusätzlich durch die geringen ROS-Mengen die Trx-1-Level aufrecht zu erhalten.

In einer sehr interessanten Studie wurde der Effekt der endothelspezifischen Expression von mitochondrialem Trx-2 in vivo getestet (Zhang H, Luo Y, Zhang W und He Y et al. 2007). Dabei wurde gefunden, dass Trx-2 transgene Mäuse einen besseren antioxidativen Status, weniger oxidativen Stress, einen erhöhten endogenen NO-Level und einen niedrigeren Blutdruck als Wildtyp Mäuse aufweisen (Zhang H, Luo Y, Zhang W und He Y et al. 2007). Trx-2 transgene/ApoE-defiziente Mäuse zeigten zudem eine verbesserte Endothelfunktion und eine geringere Atheroskleroseprogredienz als ApoE-defiziente Mäuse (Zhang H, Luo Y, Zhang W und He Y et al. 2007).

Atherosklerose ist ein entzündliches Geschehen (Libby et al. 2002, Ross R 1999). Erst kürzlich wurde berichtet, dass oxLDL in Makrophagen gesunder Probanden unter anderem das Trx-1-System hochreguliert (Hägg et al. 2006). In der gleichen Studie wurde gezeigt, dass die Genexpression des antioxidativen Enzyms Katalase in Makrophagen von Probanden mit

Atherosklerose deutlich vermindert ist im Vergleich zu gesunden Probanden (Hägg et al. 2006). Es ist bekannt, dass Makrophagen in atherosklerotischen Plaques über NAD(P)H-Oxidasen Superoxid produzieren. Zusammen mit den Ergebnissen von Hägg et al. könnte dies bedeuten, dass in der atherosklerotischen Plaque H_2O_2 akkumuliert. H_2O_2 ist im Gegensatz zu O_2^- nicht an zelluläre Kompartimente gebunden. Gemeinsam mit den in dieser Doktorarbeit vorgestellten Resultaten wäre unter dieser Bedingung eine Diffusion in das Endothel und eine Zunahme der Endothelzellapoptose im Bereich atherosklerotischer Plaques und damit möglicherweise eine geringere Plaquestabilität denkbar. Des Weiteren könnte, wie bereits unter 4.3 diskutiert, Trx-1 in Abhängigkeit vom Redoxstatus der Zelle reversibel oder irreversibel mit dem proinflammatorischen Transkriptionsfaktor $NF\kappa B$ interagieren und so auch in die Inflammation und die Progression der Atherosklerose involviert sein.

Ausblick

Die eingangs gestellten Fragen konnten mit dieser Doktorarbeit beantwortet werden. Aus den Resultaten ergeben sich Ideen für weitere Untersuchungen: Interessant wäre, die Aktivität von $NF\kappa B$ nach Zugabe niedriger und hoher Konzentrationen H_2O_2 und auch unter Ausschaltung von Trx-1 zu untersuchen. Des Weiteren könnte die Aktivität von ASK-1 nach Zugabe geringer und hoher Konzentrationen H_2O_2 und bei Abwesenheit von Trx-1 bestimmt werden. Es könnte getestet werden, welche Elemente, z.B. das ORE, in die transkriptionelle Regulation von Trx-1 durch reaktive Sauerstoffspezies involviert sind. Außerdem wäre interessant, unterschiedliche Zelltypen, wie z.B. glatte Muskelzellen, Fibroblasten und Kardiomyozyten, hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber oxidativem Stress und ihrem Trx-1-Gehalt zu charakterisieren. Auch eine Aufklärung des posttranskriptionellen Effekts von $TNF\alpha$ auf den intrazellulären Trx-1 Gehalt wäre von Interesse.

Im Hinblick auf eine mögliche Anwendung von Trx-1 als „antioxidatives Medikament“ wäre ein endothelzellspezifisches Konstrukt zu fordern, welches wie das durch geringe ROS-Mengen in Endothelzellen induzierte Trx-1

antiapoptotisch wirken und somit zur Stabilisierung der Endothelzellschicht führen könnte. Insgesamt scheint eine Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen mittels zellspezifischer Antioxidantien oder deren Modulatoren vielversprechend. Um zu untersuchen, inwieweit die Überlegungen zur Atherosklerose und zur Plaquemorphologie zutreffen, wäre ein Tiermodell wie z.B. ApoE^{-/-}-Mäuse mit Überexpression von Trx-1 ähnlich dem kürzlich vorgestellten Modell für Trx-2 hilfreich (Zhang H, Luo Y, Zhang W und He Y et al. 2007). Womöglich könnte man auch die Atheroskleroseprogression verzögern, indem man Makrophagen Trx-1 entzieht und sie somit schädigt. Abbildung 4.6 zeigt schematisch die möglichen Effekte der Trx-1-Regulation durch oxidativen Stress auf die Endothelzellen im Blutgefäß. Viele weitere Studien sind notwendig, um die Rolle von Trx-1 in der Atherosklerose zu klären.

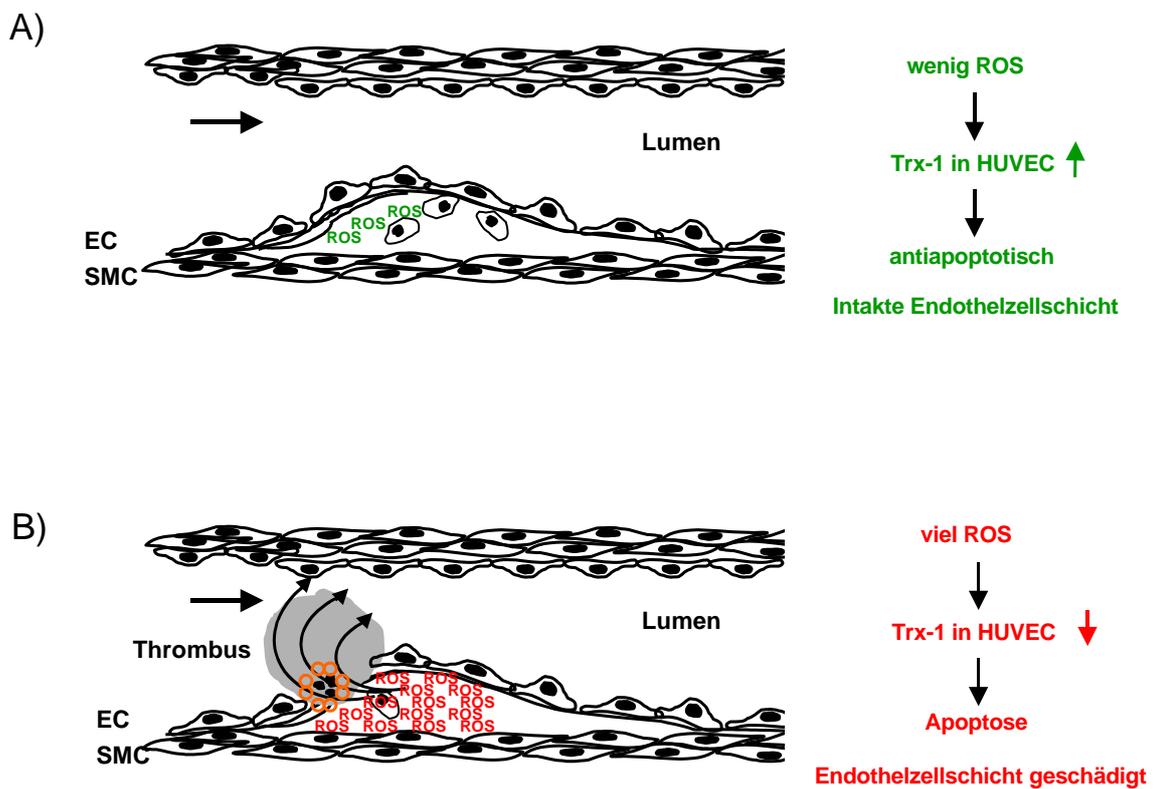


Abbildung 4.6 Schema des möglichen Effekts von Trx-1 auf die Endothelzellen im Blutgefäß

A) Geringe ROS-Mengen führen zu erhöhten Trx-1-Levels, geringer Apoptose und vermehrter Stabilität der endovaskulären Endothelzellschicht. B) Hohe ROS-Mengen vermindern intrazelluläres Trx-1. Dies begünstigt Apoptose und schädigt das Endothel mit möglichen weiteren Folgen wie Plaqueruptur und Thrombenbildung. EC Endothelzellschicht, SMC Schicht glatter Muskelzellen.

5 Zusammenfassung

Der ubiquitäre Redoxregulator Thioredoxin-1 (Trx-1) hat wichtige Funktionen für den zellulären Redoxstatus, Zellwachstum und Apoptose. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind beteiligt an der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen wie der Atherosklerose und werden zunehmend in ihrer Rolle als intra- und extrazelluläre Signalmoleküle charakterisiert. Ein Ungleichgewicht zwischen der Entstehung von ROS und ihrem Abbau durch antioxidative Systeme führt zu oxidativem Stress, zur Oxidation von Proteinen und letztlich zum Zelltod. Daher wurde in dieser Doktorarbeit untersucht, wie reaktive Sauerstoffspezies Trx-1 in Endothelzellen regulieren, welchen Einfluss dies für die Endothelzellapoptose hat und welche Bedeutung Antioxidantien, Stickstoffmonoxid (NO) und Schubspannung haben.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass H_2O_2 konzentrationsabhängig die Expression von Trx-1 beeinflusst. Geringe Konzentrationen H_2O_2 wie 10 und 50 μM induzierten Trx-1-mRNA nach 3 Stunden. Auf Proteinebene fand sich dann nach 6 Stunden eine transiente Hochregulation von Trx-1. Diese geringen Konzentrationen von H_2O_2 wirkten antiapoptotisch. Dieser antiapoptotische Effekt war von der Trx-1 Proteinexpression abhängig. Im Gegensatz dazu kam es bei hohen Konzentrationen H_2O_2 zu einer Degradierung von Trx-1. Durch das Antioxidans NAC und NO konnte der Abbau von Trx-1 unter höheren H_2O_2 -Konzentrationen verhindert werden. Untersuchungen zum Mechanismus des Degradierungsprozesses ergaben, dass Trx-1 durch die Aspartatprotease Cathepsin D abgebaut wird. Der protektive Effekt von NO auf die Trx-1 Expression konnte auch im Gewebe eNOS-defizienter Mäuse gezeigt werden, da bereits eNOS-defiziente Mäuse in den Nieren weniger Trx-1 Protein aufwiesen im Vergleich zu Wildtyp-Kontrollmäusen.

Bei der Entstehung endothelialer Läsionen und der Stabilität atheromatöser Plaques spielt die Endothelzellapoptose vermutlich eine wichtige Rolle. Trx-1 schützt Endothelzellen vor Apoptose, wird jedoch unter oxidativem Stress abgebaut. Faktoren, die Trx-1 unter oxidativem Stress stabilisieren wie NAC

und NO, kommt daher eine besondere Bedeutung für die Endothelzellhomöostase zu.

6 Summary

The ubiquitous redoxregulator thioredoxin-1 (trx-1) is essential for cellular redox status, cell growth and apoptosis. Reactive oxygen species (ROS) are involved in the pathogenesis of cardiovascular diseases like atherosclerosis. In addition, ROS have recently been characterised as intra- and extracellular signalling molecules. Severe imbalance in cellular redox state leads to oxidative protein damage and cell death. Therefore, this thesis was focused on how trx-1 is regulated by ROS in endothelial cells, whether endothelial cell apoptosis is effected and whether antioxidants, nitric oxide and shear stress modulate trx-1 regulation.

In this thesis it was shown that H₂O₂ modulates expression of trx-1 in a concentration dependent manner. Low doses of H₂O₂ like 10 and 50 µM induced trx-1 mRNA after 3 hours. On the protein level, a transient upregulation of trx-1 became evident after 6 hours incubation with low doses of ROS. These low doses of H₂O₂ protected endothelial cells from apoptosis. The anti-apoptotic effect was dependent on trx-1 protein expression. In contrast, high doses of H₂O₂ lead to degradation of trx-1. The antioxidant NAC and nitric oxide prevented degradation of trx-1 under conditions of high doses of H₂O₂. Investigations of the degradation mechanism revealed that trx-1 is degraded by the aspartatic protease Cathepsin D. Additionally, the protective effect of nitric oxide on trx-1 protein expression was shown in the tissue of eNOS-deficient mice as these had a lower trx-1 protein level in the kidney compared with wildtype control mice.

In the progression of atherosclerosis and the stability of atherosclerotic plaques, endothelial cell apoptosis may play a key role. Trx-1 protects endothelial cells from apoptosis but is degraded under conditions of oxidative stress. Factors that stabilise trx-1 under conditions of oxidative stress like NAC and NO are of great importance for endothelial cell homeostasis.

7 Literatur

Abe J, Berk BC (1998) Reactive oxygen species as mediators of signal transduction in cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med.* 8:59-64

Adler V, Yin Z, Tew KD, Ronai Z (1999) Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling. *Oncogene.* 18:6104-6111

Andoh T, Chock PB, Chiueh CC (2002) The roles of thioredoxin in protection against oxidative stress-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *J Biol Chem.* 277:9655-9660

Aoki M, Nata T, Morishita R, Matsushita H, Nakagami H, Yamamoto K, Yamazaki K, Nakabayashi M, Ogihara T, Kaneda Y (2001) Endothelial cell apoptosis induced by oxidative stress through activation of NF- κ B. Antiapoptotic effect of antioxidant agents on endothelial cells. *Hypertension.* 38:48-55

Araki S, Simada Y, Kaji K, Hayashi H (1990) Role of protein kinase C in the inhibition by fibroblast growth factor of apoptosis in serum-depleted endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 172:1081-1085

Asai K, Kudej RK, Shen YT, Yang GP, Takagi G, Kudej AB, Geng YJ, Sato N, Nazareno JB, Vatner DE, Natividad F, Bishop SP, Vatner SF (2000) Peripheral vascular endothelial dysfunction and apoptosis in old monkeys. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20:1493-1499

Asakura T, Karino T (1990) Flow patterns and spatial distribution of atherosclerotic lesions in human coronary arteries. *Circ Res.* 66:1045-1066

Azumi H, Inoue N, Takeshita S, Rikitake Y, Kawashima S, Hayashi Y, Itoh H, Yokoyama M. (1999) Expression of NADH/NADPH Oxidase p22phox in human coronary arteries. *Circulation.* 100:1494-1498

Babior BM (1999) NADPH oxidase: An update. *Blood.* 93:1464-1476

Ballinger SW, Patterson C, Yan CN, Doan R, Burow DL, Young CG, Yakes FM, Van Houten B, Ballinger CA, Freeman BA, Runge MS (2000) Hydrogen peroxide- and peroxynitrite-induced mitochondrial DNA damage and dysfunction in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Circ Res.* 86:960-966

Baker SJ, Reddy EP (1996) Transducers of life and death: TNF receptor superfamily and associated proteins. *Oncogene.* 12:1-9

Baker SJ, Reddy EP (1998) Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene.* 17:3261-3270

Baumgartner-Parzer SM, Wagner L, Pettermann M, Grillari J, Gessl A, Waldhausl W (1995) High glucose-triggered apoptosis in cultured endothelial cells. *Diabetes.* 44:1323-1327

Bayraktutan U, Draper N, Lang D, Shah AM (1997) Expression of a functional neutrophil-type NADPH oxidase in cultured rat coronary microvascular endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 38:256-262

Beckman KB, Ames BN (1997) Oxidative decay of DNA. *J Biol Chem.* 272:19633-19636

Bertini R, Howard OM, Dong HF, Oppenheim JJ, Bizzarri C, Sergi R, Caselli G, Pagliei S, Romines B, Wilshire JA, Mengozzi M, Nakamura H, Yodoi J, Pekkari K, Gurunath R, Holmgren A, Herzenberg LA, Herzenberg LA, Ghezzi P (1999) Thioredoxin, a redox enzyme released in infection and inflammation, is a unique chemoattractant for neutrophils, monocytes, and T-cells. *J Exp Med.* 189:1783-1789

Böcker W, Denk H, Heitz PU (2000) *Pathologie.* Urban & Fischer Verlag München, Jena. 2. Auflage:465-469

Bombeli T, Karsan A, Tait JF, Harlan JM (1997) Endothelial cells undergoing apoptosis become procoagulant. *Blood.* 89:2429-2442

Boulanger CM, Scoazec A, Ebrahimian T, Henry P, Mathieu E, Tedgui A, Mallat Z (2001) Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction. *Circulation.* 104:2649-2652

Boveris A, Chance B (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J.* 134:707-716

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254

Brawn K, Fridovich I (1980) Superoxide radical and superoxide dismutases: threat and defense. *Acta Physiol Scand Suppl.* 492:9-18

Busse R, Fleming I (1998) Pulsatile stretch and shear stress: physical stimuli determining the production of endothelium-derived relaxing factors. *J Vasc Res.* 35:73-84

Butterfield DA, Koppal T, Howard B, Subramaniam R, Hall N, Hensley K, Yatin S, Allen K, Aksenov M, Aksenova M, Carney J (1998) Structural and functional changes in proteins induced by free radical-mediated oxidative stress and protective action of the antioxidants N-tert-butyl-alpha-phenylnitron and vitamin E. *Ann N Y Acad Sci.* 854:448-462

Buttke TM, and Sandstrom PA (1994) Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today.* 15:7-10

Cai H, Harrison DG (2000) Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 87:840-844

Cai J, Jones DP (1998) Superoxide in apoptosis. Mitochondrial generation triggered by cytochrome c loss. *J Biol Chem.* 273:11401-11404

Caro CG, Fitz-Gerald JM, Schroter RC (1969) Arterial wall shear and distribution of early atheroma in man. *Nature*. 223:1159-1160

Chae HZ, Kang SW, Rhee SG (1999) Isoforms of mammalian peroxiredoxins that reduce peroxides in presence of thioredoxin. *Methods Enzymol*. 300:219-226

Chen XL, Varner SC, Rao AS, Grey JY, Thomas S, Cook CK, Wasserman MA, Medford RM, Jaiswal AK, Kunsch C (2003) Laminar Flow induction of antioxidant response element-mediated genes in endothelial cells. *J Biol Chem*. 278:703-711

Chiu JJ, Wung BS, Shyy JY, Hsieh HJ, Wang DL (1997) Reactive oxygen species are involved in shear stress- induced intercellular adhesion molecule-1 expression in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 17:3570-3577

Chua CC, Hamdy RC, Chua BH (1998) Upregulation of vascular endothelial growth factor by H₂O₂ in rat heart endothelial cells. *Free Radic Biol Med*. 25:891-897

Cirman T, Oresik K, Mazovec GD, Turk V, Reed JC, Myers RM, Salvesen GS, Turk B (2004) Selective disruption of lysosomes in HeLa cells triggers apoptosis mediated by cleavage of bid by multiple papain-like lysosomal cathepsins. *J Biol Chem*. 279:3578-3587

Claesson-Welsh L, Welsh M, Ito N, Anand-Apte B, Soker S, Zetter B, O'Reilly M, Folkman J (1998) Angiostatin induces endothelial cell apoptosis and activation of focal adhesion kinase independently of the integrin-binding motif RGD. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95:5579-5583

Clarke FM, Orozco C, Perkins AV, Cock I, Tonissen KF, Robins AJ, Wells JRE (1991) Identification of molecules involved in the "early pregnancy factor" phenomenon. *J Reprod Fert*. 93:525-539

Corda S, Laplace C, Vicaut E, Duranteau J (2001) Rapid reactive oxygen species production by mitochondria in endothelial cells exposed to tumor necrosis factor- α is mediated by ceramide. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 24:762-768

Dalton TP, Shertzer HG, Puga A (1999) Regulation of gene expression by reactive oxygen. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 39:67-101

Damdimopoulos AE, Miranda-Vizueté A, Pelto-Huikko M, Gustafsson J-A, Spyrou G (2002) Human mitochondrial thioredoxin: Involvement in mitochondrial membrane potential and cell death. *J Biol Chem*. 277:33249-33257

Das KC, Lewis-Molock Y, White CW (1997) Elevation of manganese superoxide dismutase gene expression by thioredoxin. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 17:713-726

De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA, Shin WS, Liao JK (1995) Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation: nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest*. 96:60-68

Deiss LP, Galinka H, Berissi H, Cohen O, Kimchi A (1996) Cathepsin D protease mediates programmed cell death induced by interferon- γ , Fas/APO-1 and TNF α . *EMBO J*. 15:3861-3870

De Keulenaer GW, Alexander RW, Ushio-Fukai M, Ishizaka N, Griendling KK (1998a) Tumor necrosis factor- α activates a p22phox-based NADH oxidase in vascular smooth muscle. *Biochem J.* 329:653-657

De Keulenaer GW, Chappell DC, Ishizaka N, Nerem RM, Alexander RW, Griendling, KK (1998b) Oscillatory and steady laminar shear stress differentially affect human endothelial redox state. Role of a superoxide-producing NADH-oxidase. *Circ Res.* 82:1094-1101

Deshpande SS, Angkeow P, Huang J, Ozaki M, Irani K (2000) Rac1 inhibits TNF- α -induced endothelial cell apoptosis: dual regulation by reactive oxygen species. *FASEB J.* 14:1705-1714

Dhanabal M, Ramchandran R, Waterman MJF, Lu H, Knebelmann B, Segal M, Sukhatme VP (1999) Endostatin induces endothelial cell apoptosis. *J Biol Chem.* 274:11721-11726

Didier C, Kerblat I, Drouet C, Favier A, Beani JC, Richard MJ (2001) Induction of thioredoxin by ultraviolet-A radiation prevents oxidative-mediated cell death in human skin fibroblasts. *Free Radic Biol Med.* 31:585-598.

Dimmeler S, Haendeler J, Rippmann V, Nehls M, Zeiher AM (1996) Shear stress inhibits apoptosis of human endothelial cells. *FEBS letters.* 399:71-74

Dimmeler S, Haendeler J, Galle J, Zeiher AM (1997a) Oxidized low-density lipoprotein induces apoptosis of human endothelial cells by activation of CPP32-like proteases: a mechanistic clue to the "response to injury" hypothesis. *Circulation.* 95:1760-1763

Dimmeler S, Haendeler J, Nehls M, Zeiher AM (1997b) Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1 β -converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. *J Exp Med.* 185:601-607

Dimmeler S, Rippmann V, Weiland U, Haendeler J, Zeiher AM (1997c) Angiotensin II induces apoptosis of human endothelial cells. Protective effect of nitric oxide. *Circ Res.* 81:970-976

Dimmeler S, Zeiher AM (1997) Nitric oxide and apoptosis: Another paradigm for the double-edged role of nitric oxide. *Nitric Oxide.* 1:275-281

Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R, Zeiher AM (1999a) Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature.* 399:601-605

Dimmeler S, Hermann C, Galle J, Zeiher AM (1999b) Upregulation of superoxide dismutase and nitric oxide synthase mediates the apoptosis-suppressive effects of shear stress on endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19:656-664

Dimmeler S, Zeiher AM (2000) Reactive oxygen species and vascular cell apoptosis in response to angiotensin II and pro-atherosclerotic factors. *Regul Pept.* 90:19-25

Drummond GR, Cai H, Davis ME, Ramasamy S, Harrison DG (2000) Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by hydrogen peroxide. *Circ Res.* 86:347-354

Duke RC, Ojcius DM, Young JD (1997) Die Apoptose-Regeln und Fehler beim Zellselbstmord. *Spektrum der Wissenschaft.* 2:26-35

d'Uscio LV, Baker TA, Mantilla CV, Smith L, Weiler D, Sieck GC, Katusic ZS (2001) Mechanisms of endothelial dysfunction in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 21:1017-1022

Ellis HM and Horvitz HR (1986) Genetic control of programmed cell death in nematode *C. Elegans*. *Cell.* 44:817-829

Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S (1998) A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature.* 391:43-50

Finkel T (1998) Oxygen radicals and signaling. *Curr Opin Cell Biol.* 10:248-253

Foghsgaard L, Wissing D, Mauch D, Lademann U, Bastholm L, Boes M, Elling F, Leist M, Jäättelä M (2001) Cathepsin B acts as a dominant execution protease in tumor cell apoptosis induced by tumor necrosis factor. *J Cell Biol.* 153:999-1009

Frangos JA, Eskin SG, McIntire LV, Ives CL (1985) Flow effects on prostacyclin production by cultured human endothelial cells. *Science.* 227:1477-1478

Fridovich I (1978) The biology of oxygen radicals. *Science* 201:875-880.

Fujino G, Noguchi T, Takeda K, Ichijo H (2006). Thioredoxin and protein kinases in redox signaling. *Semin Cancer Biol.* 16:427-435

Furchgott RF, Zawadski JV (1980) The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373-376

Ghosh R, Mitchell DL (1999) Effect of oxidative DNA damage in promoter elements on transcription factor binding. *Nucleic Acids Res.* 27:3213-3218

Görlach A, Brandes RP, Nguyen K, Amidi M, Dehghani F, Busse R (2000) A gp91phox containing NADPH oxidase selectively expressed in endothelial cells is a major source of oxygen radical generation in the arterial wall. *Circ Res.* 87:26-32

Green DR, Reed JC (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science.* 281:1309-1312

Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M (2000) NAD(P)H-oxidase: Role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* 86:494-501

Guo N, Krutzsch HC, Inman JK, Roberts DD (1997) Thrombospondin 1 and type I repeat peptides of thrombospondin 1 specifically induce apoptosis of endothelial cells. *Cancer Res* 57:1735-1742

Guyton KZ, Liu Y, Gorospe M, Xu Q, Holbrook NJ (1996) Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem.* 271:4138-4142

Guzik TJ, West NEJ, Black E, McDonald D, Ratnatunga C, Pillai R, Channon KM (2000) Vascular superoxide production by NAD(P)H oxidase: Association with endothelial dysfunction and clinical risk factors. *Circ Res.* 86:e85-e90

Haendeler J, Hoffmann J, Tischler V, Berk BC, Zeiher AM, Dimmeler S (2002) Redox regulatory and anti-apoptotic functions of thioredoxin depend on S-nitrosylation at cysteine 69. *Nat Cell Biol.* 4:743-749

Haendeler J, Hoffmann J, Zeiher AM, Dimmeler S (2004a) Antioxidant effects of statins via S-nitrosylation and activation of thioredoxin in endothelial cells. A novel vasculoprotective function of statins. *Circulation.* 110:856-861

Haendeler J, Tischler V, Hoffmann J, Zeiher AM, Dimmeler S (2004b) Low doses of reactive oxygen species protect endothelial cells from apoptosis by increasing thioredoxin-1 expression. *FEBS letters* 577:427-433

Haendeler J, Popp, Goy C, Tischler V, Zeiher AM, Dimmeler S (2005) Cathepsin D and H₂O₂ induce endothelial cell apoptosis via protein degradation of thioredoxin-1. Implication for endothelial cell apoptosis. *J Biol Chem.* 280:42945-42951

Hägg D, Englund MCO, Jernas M, Schmidt C, Wiklund O, Hultén LM, Ohlsson BG, Carlsson LMS, Carlsson B, Svensson PA (2006) Oxidized LDL induces a coordinated up-regulation of the glutathione and thioredoxin systems in human macrophages. *Atherosclerosis.* 185:282-289

Hampton MB, Fadeel B, Orrenius S (1998) Redox regulation of the caspases during apoptosis. *Ann N Y Acad Sci.* 854:328-335

Harada-Shiba M, Kinoshita M, Kamido H, Shimokado K (1998) Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis in cultured human umbilical vein endothelial cells by common and unique mechanisms. *J Biol Chem.* 273:9681-9687

Harrison DG (1998) Cellular and molecular mechanisms of endothelial dysfunction. *J Clin Invest.* 100:2153-2157

Heeneman S, Haendeler J, Saito Y, Ishida M, Berk BC (2000) Angiotensin II induces transactivation of two different populations of the platelet-derived growth factor beta receptor. Key role for the p66 adaptor protein Shc. *J Biol Chem.* 275:15926-32

Hengartner MO (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407:770-776

Hermann C, Zeiher AM, Dimmeler S (1997) Shear stress inhibits H₂O₂-induced apoptosis of human endothelial cells by modulation of the glutathione redox cycle and nitric oxide synthase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17:3588-3592

Hink U, Li H, Mollnau H, Oelze M, Matheis E, Hartmann M, Skatchkov M, Thaiss F, Stahl RAK, Warnholtz A, Meinertz T, Griendling K, Harrison DG, Förstermann U, Münzel T (2001) Mechanisms underlying endothelial dysfunction in diabetes mellitus. *Circ Res.* 88:e14-e22

Hirota K, Matsui M, Iwata S, Nishiyama A, Mori K, Yodoi J (1997) AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94:3633-3683

Ho FM, Liu SH, Liao SC, Huang PJ, Lin-Shiau SY (2000) High glucose-induced apoptosis in human endothelial cells is mediated by sequential activations of c-Jun NH₂-terminal kinase and caspase-3. *Circulation*. 101:2618-2624

Hoffmann J, Haendeler J, Aicher A, Rössig L, Vasa M, Zeiher AM, Dimmeler S (2001a) Aging enhances the sensitivity of endothelial cells toward apoptotic stimuli: important role of nitric oxide. *Circ Res*. 89:709-715

Hoffmann J, Haendeler J, Zeiher AM, Dimmeler S (2001b) TNF α and oxLDL reduce protein s-nitrosylation in endothelial cells. *J Biol Chem*. 276:41383-41387

Hojo Y, Saito Y, Tanimoto T, Hoefen RJ, Baines CP, Yamamoto K, Haendeler J, Asmis R, Berk BC (2002) Fluid shear stress attenuates hydrogen peroxide-induced c-Jun NH₂-terminal kinase activation via a glutathione reductase-mediated mechanism. *Circ Res*. 91:712-718

Hokamaki J, Kawano H, Soejima H, Miyamoto S, Kajiura I, Kojima S, Sakamoto T, Sugiyama S, Yoshimura M, Nakamura H, Yodoi J, Ogawa H (2005) Plasma thioredoxin levels in patients with unstable angina. *Int J Cardiol*. 99:225-231

Holmgren A (1989) Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem*. 264:13963-13966

Hong YH, Peng H-B, La Fata V, Liao JK (1997) Hydrogen peroxide-mediated transcriptional induction of macrophage colony-stimulating factor by TGF- β 1. *J Immunol*. 159:2418-2423

Hordijk PL (2006) Regulation of NADPH oxidases. The role of Rac proteins. *Circ Res*. 98:453-462

Horvitz HR, Ellis HM, Sternberg P (1982) Programmed cell death in nematode development. *Neurosci Comment*. 1:56-65

Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC (1995) Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 377:239-342

Huot J, Houle F, Marceau F, Landry J (1997) Oxidative stress-induced actin reorganization mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase/heat shock protein 27 pathway in vascular endothelial cells. *Circ Res*. 80:383-392

Hussain SP, Hofseth LJ, Harris CC (2003) Radical causes of cancer. *Nat Rev Cancer*. 3:276-285

Ichijo H, Nishida E, Irie K, ten Dijke P, Saitoh M, Moriguchi T, Takagi M, Matsumoto K, Miyazono K, Gotoh Y (1997) Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science*. 275:90-94

Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G (1987) Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 84:9265-9269

Irani K (2000) Oxidant signaling in vascular cell growth, death and survival. A review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ Res*. 87:179-183

Jacobson MD, Weil M, Raff MC (1997) Programmed cell death in animal development. *Cell*. 88:347-354

Jäättelä M, Candé C, Kroemer G (2004) Lysosomes and mitochondria in the commitment to apoptosis: a potential role for cathepsin D and AIF. *Cell Death Differ*. 11:135-136

Jones SA, O'Donnell VB, Wood JD, Broughton JP, Hughes EJ, Jones OTG (1996) Expression of phagocyte NADPH oxidase components in human endothelial cells. *Am J Physiol*. 271:H1626-H1634

Kayanoki Y, Higashiyama S, Suzuki K, Asahi M, Kawata S, Matsuzawa Y, Taniguchi N (1999) The requirement of both intracellular reactive oxygen species and intracellular calcium elevation for the induction of heparin-binding EGF-like growth factor in vascular endothelial cells and smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 259:50-55

Keaney JF jr, Gaziano JM, Xu A, Frei B, Curran-Celentano J, Shwaery GT, Loscalzo J, Vita JA (1994) Low-dose alpha-tocopherol improves and high-dose alpha-tocopherol worsens endothelial vasodilator function in cholesterol-fed rabbits. *J Clin Invest*. 93:844-851

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 26:239-257

Khan BV, Harrison DG, Olbrych MT, Alexander RW, Medford RM (1996) Nitric oxide regulates VCAM-1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 93:9114-9119

Khwaja A, and Tatton L (1999) Resistance to the cytotoxic effects of tumor necrosis factor α can be overcome by inhibition of a FADD/caspase-dependent signaling pathway. *J Biol Chem*. 274:36817-36823

Kim YC, Yamaguchi Y, Kondo N, Masutani H, Yodoi J (2003) Thioredoxin-dependent redox regulation of the antioxidant responsive element (ARE) in electrophile response. *Oncogene*. 22:1860-1865

Kirkman HN, Gaetani GF (1984) Catalase: a tetrameric enzyme with four tightly bound molecules of NADPH. *Proc Natl Acad Sci USA*. 81:4343-4347

Kishimoto C, Shioji K, Nakamura H, Nakayama Y, Yodoi J, Sasayama S (2001) Serum thioredoxin (TRX) levels in patients with heart failure. *Jpn Circ J*. 65:491-494

Korenaga R, Ando J, Kosaki K, Isshiki M, Takada Y, Kamiya A (1997) Negative transcriptional regulation of the VCAM-1 gene by fluid shear stress in murine endothelial cells. *Am J Physiol*. 273:1506-15

Ku DN, Giddens DP, Zarins CK, Glagov S (1985) Pulsatile flow and atherosclerosis in the human carotid bifurcation. Positive correlation between plaque location and low oscillating shear stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 5:293-302

Kunsch C, Medford RM (1999) Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. *Circ Res.* 85:753-766

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685

Lambeth JD (2004) NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat Rev Immunol.* 4:181-189

Lander HM, Ogiste JS, Teng KK, Novogrodsky A (1995) p21ras as a common signaling target of reactive free radicals and cellular redox stress. *J Biol Chem.* 270:21195-21198

Larrick JW, Wright SC (1990) Cytotoxic mechanism of tumor necrosis factor- α . *FASEB J.* 4:3215-3223

Laurent TV, Moore EC, Reichard P (1964) Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides. IV. Isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from *Escherichia coli* B. *J Biol Chem.* 239:3436-3444

Laurindo FR, Pedro Mde A, Barbeiro HV, Pileggi F, Carvalho MH, Augusto O, da Luz PL (1994) Vascular free radical release. Ex vivo and in vivo evidence for a flow-dependent endothelial mechanism. *Circ Res.* 74:700-709

Leist M, Jäättelä M (2001) Triggering of apoptosis by cathepsins. *Cell Death Differ.* 8:324-326

Li D, Yang B, Mehta JL (1999a) Ox-LDL induces apoptosis in human coronary artery endothelial cells: role of PKC, PTK, bcl-2, and Fas. *Am J Physiol.* 275:H568-H575

Li D, Yang B, Philips MI, Mehta JL (1999b) Proapoptotic effects of Ang II in human coronary artery endothelial cells: role of AT1 receptor and PKC activation. *Am J Physiol.* 276:H786-792

Li PF, Dietz R, von Harsdorf R (1997) Differential effect of hydrogen peroxide and superoxide anion on apoptosis and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circulation.* 96:3602-3609

Li JM, Mullen AM, Yun S, Wientjes F, Brouns GY, Thrasher AJ, Shah AM (2002) Essential role of the NADPH oxidase subunit p47^{phox} in endothelial cell superoxide production in response to phorbol ester and tumor necrosis factor- α . *Circ Res.* 90:143-150

Libby P, Ridker PM, Maseri A (2002) Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation.* 105:1135-1143

Likaki-Karatza E, Ravazoula P, Androutsopoulos G, Michail G, Batistatou A, Tzorakoleftherakis E, Kalofonos H, Kourounis G (2006) Correlation of mammographic appearance and molecular prognostic factors in high-grade breast carcinomas. *Eur J Gynaecol Oncol.* 27:39-41

Liu X, Zou H, Slaughter C, Wang X (1997) DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell*. 89:175-184

Liu Y, Min W (2002) Thioredoxin promotes ASK1 ubiquitination and degradation to inhibit ASK1-mediated apoptosis in a redox activity-independent manner. *Circ Res*. 90:1259-1266

Lu D, Maulik N, Moraru II, Kreutzer DL, Das DK (1993) Molecular adaptation of vascular endothelial cells to oxidative stress. *Am J Physiol*. 264:C715-C722

Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS (2005) Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 25:29-38

Makino Y, Noritada Y, Okamoto K, Hirota K, Yodoi J, Makino I, Tanaka H (1999) Direct association with thioredoxin allows redox regulation of glucocorticoid receptor function. *J Biol Chem*. 274:3182-3188

Marnett LJ (2000) Oxyradicals and DNA–damage. *Carcinogenesis*. 21:361-370

Matsubara T, Ziff M (1986) Increased superoxide anion release from human endothelial cells in response to cytokines. *J Immunol*. 137:3295-3298

Matsuda M, Masutani H, Nakamura H, Miyajima S, Yamauchi A, Yonehara S, Uchida A, Irimajiri K, Horiuchi A, Yodoi J (1991) Protective activity of adult T cell leukemia-derived factor (ADF) against tumor necrosis factor-dependent cytotoxicity on U937 cells. *J Immunol*. 147:3837-3841

Matsui M, Oshima M, Oshima H, Takaku K, Maruyama T, Yodoi J, Taketo MM (1996) Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse thioredoxin gene. *Dev Biol*. 178:179-185

Matsutani Y, Yamauchi A, Takahashi R, Ueno M, Yoshikawa K, Honda K, Nakamura H, Kato H, Kodama H, Inamoto T, Yodoi J, Yamaoka Y (2001) Inverse correlation of thioredoxin expression with estrogen receptor- and p53-dependent tumor growth in breast cancer tissues. *Clin Cancer Res*. 7:3430-3436

Matthews JR, Wakasugi N, Virelizier JL, Yodoi J, Hay RT (1992) Thioredoxin regulates the DNA binding activity of NF- κ B by reduction of a disulphide bond involving cysteine 62. *Nucleic Acids Res*. 20:3821-3830

McCord JM, Fridovich I (1969) Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem*. 244:6049-6055

Melov S, Schneider JA, Day BJ, Hinerfeld D, Coskun P, Mirra SS, Crapo JD, Wallace DC (1998) A novel neurological phenotype in mice lacking mitochondrial manganese superoxide dismutase. *Nat Genet*. 18:159-163

Merseburger AS, Hennenlotter J, Simon P, Ohneseit PA, Kuehs U, Kruck S, Koch E, Vogel U, Stenzl A, Kuczyk MA (2005) Cathepsin D expression in renal cell cancer-clinical implications. *Eur Urol*. 48:519-26

Miranda-Vizueté A, Ljung J, Damdimopoulos AE, Gustafsson J-A, Oko R, Pelto-Huikko M, Spyrou G (2001) Characterization of sptrx, a novel member of the thioredoxin family specifically expressed in human spermatozoa. *J Biol Chem.* 276:31567-31574

Mollnau H, Wendt M, Szöcs K, Lassègue B, Schulz E, Oelze M, Huige L, Bodenschatz M, August M, Kleschyov AL, Tsilimingas N, Walter U, Förstermann U, Meinertz T, Griendling K, Münzel T (2002) Effects of angiotensin II infusion on the expression and function of NAD(P)H oxidase and components of nitric oxide/cGMP signaling. *Circ Res.* 90:e58-e65

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 43:109-142

Moncada S, Higgs A (1993) The L-arginine-nitric-oxide pathway. *N Engl J Med.* 329:2002-2012

Murphy HS, Shayman JA, Till GO, Mahrougui M, Owens CB, Ryan US, Ward PA (1992) Superoxide responses of endothelial cells to C5a and TNF- α : divergent signal transduction pathways. *Am J Physiol.* 263:L51-L59

Moroi M, Zhang L, Yasuda T, Virmani R, Gold HK, Fishman MC, Huang PL (1998) Interaction of genetic deficiency of endothelial nitric oxide, gender, and pregnancy in vascular responses to injury in mice. *J Clin Invest.* 101:1225-1232

Münzel T, Harrison DG (1999) Increased superoxide in heart failure: A biochemical baroreflex gone awry. *Circulation.* 100:216-218

Nakamura H, Matsuda M, Furuke K, Kitaoka Y, Iwata S, Toda K, Inamoto T, Yamaoka Y, Ozawa K, Yodoi J (1994) Adult T cell leukemia-derived factor/human thioredoxin protects endothelial F-2 cell injury caused by activated neutrophils or hydrogen peroxide. *Immunol Lett.* 42:75-80

Nakamura H, Nakamura K, Yodoi J (1997) Redox regulation of cellular activation. *Annu Rev Immunol.* 15:351-369

Nakamura H, De Rosa SC, Yodoi J, Holmgren A, Ghezzi P, Herzenberg LA, Herzenberg LA (2001) Chronic elevation of plasma thioredoxin: Inhibition of chemotaxis and curtailment of life expectancy in AIDS. *Proc Natl Acad Sci USA.* 98:2688-2693

Natarajan V, Taher MM, Roehm B, Parinandi NL, Schmid HHO, Kiss Z, Garcia JGN (1993) Activation of endothelial cell phospholipase D by hydrogen peroxide and fatty acid hydroperoxide. *J Biol Chem.* 268:930-937

Nemoto S, Takeda K, Yu Z-X, Ferrans VJ, Finkel T (2000) Role for mitochondrial oxidants as regulators of cellular metabolism. *Mol Cell Biol.* 20:7311-7318

Newman GW, Balcewicz-Sablinska MK, Guarnaccia JR, Remold HG, Silberstein DS (1994) Opposing regulatory effects of thioredoxin and eosinophil cytotoxicity-enhancing factor on the development of human immunodeficiency virus 1. *J Exp Med.* 180:359-363

Nohl H, Hegner D (1978) Do mitochondria produce oxygen radicals in vivo? *Eur J Biochem.* 82:563-567

Nordberg J, Arnér ESJ (2001) Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med.* 31:1287-1312

Noris M, Morigi M, Donadelli R, Aiello S, Foppolo M, Todeschini M, Orisio S, Remuzzi G, Remuzzi A (1995) Nitric oxide synthesis by cultured endothelial cells is modulated by flow conditions. *Circulation.* 76:536-543

Ohara Y, Peterson TE, Zheng B, Kuo JF, Harrison DG (1994) Lysophosphatidylcholine increases vascular superoxide anion production via protein kinase C activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 14:1007-1013

Okuda M, Inoue N, Azumi H, Seno T, Sumi Y, Hirata Ki, Kawashima S, Hayashi Y, Itoh, H, Yodoi J, Yokoyama M (2001) Expression of glutaredoxin in human coronary arteries: its potential role in antioxidant protection against atherosclerosis. *Arterioscl Thromb Vasc Biol.* 21:1483-1487

Osborne SA, Hawkes HK, Baldwin BL, Alexander KA, Svingen T, Clarke FM, Tonissen KF (2006) The tert-butylhydroquinone-mediated activation of the human thioredoxin gene reveals a novel promoter structure. *Biochem J.* 398:269-277

Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S (1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327:524-526

Parman T, Wiley MJ, Wells PG (1999) Free radical-mediated oxidative DNA-damage in the mechanism of thalidomide teratogenicity. *Nat Med.* 5:582-585

Pekkari K, Gurunath R, Arnér ESJ, Holmgren A (2000) Truncated thioredoxin is a mitogenic cytokine for resting human peripheral blood mononuclear cells and is present in human plasma. *J Biol Chem.* 275:37474-37480

Peng HB, Libby P, Liao JK (1995) Induction and stabilization of I κ B α by nitric oxide mediates inhibition of NF- κ B. *J Biol Chem.* 270:14214-14219

Phan SH, Gannon DE, Varani J, Ryan US, Ward PA (1989) Xanthine oxidase activity in rat pulmonary artery endothelial cells and its alteration by activated neutrophils. *Am J Pathol.* 134:1201-1211

Preston TJ, Muller WJ, Singh G (2001) Scavenging of extracellular H₂O₂ by catalase inhibits the proliferation of HER-2/Neu-transformed rat-1 fibroblasts through the induction of a stress response. *J Biol Chem.* 276:9558-9564

Rao GN, and Berk BC (1992) Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. *Circ Res.* 70:593-599

Rao GN (1996) Hydrogen peroxide induces complex formation of SHC-Grb2-SOS with receptor tyrosine kinase and activates ras and extracellular signal-regulated protein kinases group of mitogen activated protein kinases. *Oncogene.* 13:713-719

Robaye B, Mosselmans R, Fiers W, Dumont JE, Galand P (1991) Tumor necrosis factor induces apoptosis (programmed cell death) in normal endothelial cells in vitro. *Am J Pathol.* 138:447-453

Roberg K, Kagedal K, Öllinger K (2002) Microinjection of cathepsin D induces caspase-dependent apoptosis in fibroblasts. *Am J Pathol.* 161:89-96

Romeo F, Li D, Shi M, Mehta JL (2000) Carvedilol prevents epinephrine-induced apoptosis in human coronary artery endothelial cells: modulation of Fas/Fas ligand and caspase-3 pathway. *Cardiovasc Res.* 45:788-794

Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng H-X, Rahmani Z, Krizus A, McKenna-Yasek D, Cayabyab A, Gaston SM, Berger R, Tanzi RE, Halperin JJ, Herzfeldt B, Van den Bergh R, Hung W-Y, Bird T, Deng G, Mulder DW, Smyth C, Laing NG, Soriano E, Pericak-Vance MA, Haines J, Rouleau GA, Gusella JS, Horvitz HR, Brown Jr RH (1993) Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature.* 362:59-62

Ross R (1999) Atherosclerosis – an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 340:115-126
Rössig L, Fichtlscherer B, Breitschopf K, Haendeler J, Zeiher AM, Mülsch A, Dimmeler S (1999) Nitric oxide inhibits caspase-3 by S-nitrosation in vivo. *J Biol Chem.* 274:6823-6826

Rössig L, Dimmeler S, Zeiher AM (2001) Apoptosis in the vascular wall and atherosclerosis. *Basic Res Cardiol.* 96:11-22

Rubanyi GM, Romero JC, Vanhoutte PM (1986) Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol.* 250:H1145-H1149

Rubanyi GM, Vanhoutte PM (1986) Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelial-derived relaxing factor. *Am J Physiol.* 250:H822-827

Rubartelli A, Bajetto A, Allavena G, Wollman E, Sitia R (1992) Secretion of thioredoxin by normal and neoplastic cells through a leaderless pathway. *J Biol Chem.* 267:24161-24164

Saitoh M, Nishitoh H, Fujii M, Takeda K, Tobiume K, Sawada Y, Kawataba M, Miyazono K, Ichijo H (1998) Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J.* 17:2596-2606

Sata M, Walsh K (1998a) Endothelial cell apoptosis induced by oxidized LDL is associated with the down-regulation of the cellular caspase inhibitor FLIP. *J Biol Chem.* 273:33103-33106

Sata M, Walsh K (1998b) Oxidized LDL activates Fas-mediated endothelial cell apoptosis. *J Clin Invest.* 102:1682-1689

Sbarra AJ, Karnovsky ML (1959) The biochemical basis of phagocytosis: I. Metabolic changes during the ingestion of particles by polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem.* 234:1355-1362

Schenk H, Klein M, Erdbrügger W, Dröge W, Schulze-Osthoff K (1994) Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF- κ B and AP-1. *Proc Natl Acad Sci USA*. 91:1672-1676

Schulze PC, Yoshioka J, Takahashi T, He Z, King GL and Lee RT (2004) Hyperglycemia promotes oxidative stress through inhibition of thioredoxin function by thioredoxin-interacting protein. *J Biol Chem*. 277:30369-30374

Schulze-Osthoff K, Beyaert R, Vandevoorde V, Haegeman G, Fiers W (1993) Depletion of the mitochondrial electron transport abrogates the cytotoxic and gene-inductive effects of TNF. *EMBO J*. 12:3095-3104

Seshiah PN, Weber DS, Rocic P, Valppu L, Taniyama Y, Griendling KK (2002) Angiotensin II stimulation of NAD(P)H oxidase activity: upstream mediators. *Circ Res*. 91:406-413

Sorescu D, Weiss D, Lassègue B, Clempus RE, Szöcs K, Sorescu GP, Valppu L, Quinn MT, Lambeth JD, Vega JD, Taylor WR, Griendling KK (2002) Superoxide production and expression of nox family proteins in human atherosclerosis. *Circulation*. 105:1429-1435

Speleman L, Kerrebijn JD, Look MP, Meeuwis CA, Foekens JA, Berns EM (2007) Prognostic value of plasminogen activator inhibitor-1 in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 29:341-50

Spiekermann S, Landmesser U, Dikalov S, Brecht M, Gamez F, Tatge H, Reepschläger N, Hornig B, Drexler H, Harrison DG (2003) Electron spin resonance characterization of vascular xanthine and NAD(P)H oxidase activity in patients with coronary artery disease. Relation to endothelium-dependent vasodilation. *Circulation*. 107:1383-1389

Spyrou G, Enmark E, Miranda-Vizuete A, Gustafsson JA (1997) Cloning and expression of a novel mammalian thioredoxin. *J Biol Chem*. 272:2936-2941

Stamler JS, Lamas S, Fang FC (2001) Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* 106, 675-683

Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL (1989) Beyond cholesterol: modification of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med*. 320:915-924

Steinberg D (1997) Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem*. 272:20963-20966

Stokes KY, Clanton EC, Russell JM, Ross CR, Granger DN (2001) NAD(P)H oxidase-derived superoxide mediates hypercholesterolemia-induced leukocyte-endothelial cell adhesion. *Circ Res*. 88:499-505

Sundaresan M, Yu Z-X, Ferrans VJ, Irani K, Finkel T (1995) Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science*. 270:296-299

Suzuki YJ, Forman HF, Sevanian A (1996) Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic Biol Med*. 22:269-285

Tagaya Y, Maeda Y, Mitsui A, Kondo N, Matsui H, Hamuro J, Brown N, Arai K, Yokota T, Wakasugi H, Yodoi J (1989) ATL-derived factor (ADF), an IL-2 receptor/Tac inducer homologous to thioredoxin: possible involvement of dithiol-reduction in the IL-2 receptor induction. *EMBO J.* 8:757-764. Siehe erratum 13:2244

Takagi Y, Gon Y, Todaka T, Nozaki K, Nishiyama A, Sono H, Hashimoto N, Kikuchi H, Yodoi J (1998) Expression of thioredoxin is enhanced in atherosclerotic plaques and during neointima formation in rat arteries. *Lab Invest.* 78:957-966

Takagi Y, Mitsui A, Nishiyama A, Nozaki K, Sono H, Gon Y, Hashimoto N, Yodoi J (1999) Overexpression of thioredoxin in transgenic mice attenuates focal ischemic brain damage. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96:4131-4136

Taniguchi Y, Taniguchi-Ueda Y, Mori K, Yodoi J (1996) A novel promoter sequence is involved in the oxidative stress-induced expression of the adult T-cell leukemia-derived factor (ADF)/human thioredoxin (Trx) gene. *Nucleic Acids Res.* 24:2746-2752

Tanito M, Nakamura H, Kwon YW, Teratani A, Masutani H, Shioji K, Kishimoto C, Ohira A, Horie R, Yodoi J (2004) Enhanced oxidative stress and impaired thioredoxin expression in spontaneously hypertensive rats. *Antioxid Redox Signal.* 6:89-97

Taniyama Y, Griendling KK (2003) Reactive oxygen species in the vasculature. Molecular and cellular mechanisms. *Hypertension.* 42:1075-1081

Thompson CB (1995) Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 267:1465-1462

Toledano MB, Leonard WJ (1991) Modulation of transcription factor NF- κ B binding activity by oxidation-reduction in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88:4328-4332

Traub O, Berk BC (1998) Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 18:677-685

Tricot O, Mallat Z, Heymes C, Belmin J, Lesèche G, Tedgui A (2000) Relation between endothelial cell apoptosis and blood flow direction in human atherosclerotic plaques. *Circulation.* 101:2450-2453

Tsukada T, Eguchi K, Migita K, Kawabe Y, Kawakami A, Matsuoka N, Takashima H, Mizokami A, Nagataki S (1995) Transforming growth factor beta 1 induces apoptotic cell death in cultured human umbilical vein endothelial cells with down-regulated expression of bcl-2. *Biochem Biophys Res Comm* 210:1076-1082

Uematsu M, Ohara Y, Navas JP, Nishida K, Murphy TJ, Alexander RW, Nerem RM, Harrison DG (1995) Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *Am J Physiol.* 269:C1371-C1378

Ushio-Fukai M, Griendling KK, Becker PL, Hilenski L, Halleran S, Alexander RW (2001) Epidermal growth factor receptor transactivation by angiotensin II requires reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 21:489-495

Ushio-Fukai M, Tang Y, Fukai T, Dikalov SI, Ma Y, Fujimoto M, Quinn MT, Pagano PJ, Johnson C, Alexander RW (2002) Novel role of gp91^{phox}-containing NAD(P)H oxidase

in vascular endothelial growth factor-induced signaling and angiogenesis. *Circ Res.* 91:1160-1167

van der Poll T, Lowry SF (1995) Tumor necrosis factor in sepsis: mediator of multiple organ failure or essential part of host defense? *Shock.* 3:1-12

Virchow R (1856) Der atheromatöse Prozess der Arterien. *Wien Med Wochenschr.* 6:825-827

Visner GA, Chesrown SE, Monnier J, Ryan US, Nick HS (1992) Regulation of manganese superoxide dismutase: IL-1 and TNF induction in pulmonary artery and microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 188:453-462

Vissers MCM, Pullar JM, Hampton MB (1999) Hypochlorous acid causes caspase activation and apoptosis or growth arrest in human endothelial cells. *Biochem J.* 344:443-449

Wakasugi N, Tagaya Y, Wakasugi H, Mitsui A, Maeda M, Yodoi J, Tursz T (1990) Adult T-cell leukemia-derived factor/thioredoxin, produced by both human T-lymphotrophic virus type 1- and Epstein-Barr virus-transformed lymphocytes, acts as an autocrine growth factor and synergizes with interleukin 1 and interleukin 2. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87:8282-8286

Wang JF, Zhang X, Groopman JE (2004) Activation of vascular endothelial growth factor receptor-3 and its downstream signaling promote cell survival under oxidative stress. *J Biol Chem.* 279:27088-27097

Wang LJ, Lee TS, Lee FY, Pai RC, Chau LY (1998) Expression of heme oxygenase-1 in atherosclerotic lesions. *Am J Pathol.* 152:711-720

Wang X, Martindale JL, Liu Y, Holbrook NJ (1998) The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival. *Biochem J.* 333:291-300

Wang X, McCullough KD, Franke TF, Holbrook NJ (2000) Epidermal growth factor receptor-dependent Akt activation by oxidative stress enhances cell survival. *J Biol Chem.* 275:14624-14631

Warnholtz A, Nickenig G, Schulz E, Macharzina R, Bräsen JH, Skatchkov M, Heitzer T, Stasch JP, Griendling KK, Harrison DG, Böhm M, Meinertz T, Münzel T (1999) Increased NADH-oxidase-mediated superoxide production in the early stages of atherosclerosis: evidence for involvement of the renin-angiotensin system. *Circulation* 99:2027-2033

Warnholtz A, Münzel T (2000) Why do antioxidants fail to provide clinical benefit? *Curr Control Trials Cardiovasc Med.* 1:38-40

Wassmann S, Laufs U, Müller K, Konkol C, Ahlbory K, Bäumer AT, Linz W, Böhm M, Nickenig G (2002) Cellular antioxidant effects of atorvastatin in vitro and vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 22:300-305

Wei JS, Botero A, Hirota K, Bradbury CM, Markovina S, Laszlo A, Spitz DR, Goswami PC, Yodoi J, Gius D (2000) Thioredoxin nuclear translocation and interaction with

redox-factor-1 activates the activator protein-1 transcription factor in response to ionizing radiation. *Cancer Res.* 60:6688-6695

Welsh SJ, Bellamy WT, Briehl MM, Powis G (2002) The redox protein thioredoxin-1 (Trx-1) increases hypoxia-inducible factor 1 α protein expression: Trx-1 overexpression results in increased vascular endothelial growth factor production and enhanced tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 62:5089-5095

Wu GS, Saftig P, Peters C, El-Deiry WS (1998) Potential role for cathepsin D in p53-dependent tumor suppression and chemosensitivity. *Oncogene.* 16: 2177-2183

Xu XQ, Li LP, Pan SQ (2001) Feedback regulation of an *Agrobacterium* catalase gene *kataA* involved in *Agrobacterium*-plant interaction. *Mol Microbiol.* 42:645-657

Yamakawi H, Pan S, Tee RT, Berk BC (2005) Fluid shear stress inhibits vascular inflammation by decreasing thioredoxin-interacting protein in endothelial cells. *J Clin Invest.* 115:733-738

Yang H, Roberts LJ, Shi MJ, Zhou LC, Ballard BR, Richardson A, Guo ZM (2004) Retardation of atherosclerosis by overexpression of catalase or both Cu/Zn-superoxide dismutase and catalase in mice lacking apolipoprotein E. *Circ Res.* 95:1075-1081

Yeh LH, Park YJ, Hansalia RJ, Ahmed IS, Deshpande SS, Goldschmidt-Clermont PJ, Irani K, Alevriadou BR (1999) Shear-induced tyrosine phosphorylation in endothelial cells requires Rac1-dependent production of ROS. *Am J Physiol.* 276:C838-C847

Yoshida S, Katoh T, Tetsuka T, Uno K, Matsui N, Okamoto T (1999) Involvement of thioredoxin in rheumatoid arthritis: Its costimulatory roles in the TNF- α -induced production of IL-6 and IL-8 from cultured synovial fibroblasts. *J Immunol.* 163:351-358

Yu Z, Persson HL, Eaton JW, Brunk UT (2003) Intralysosomal iron: a major determinant of oxidant-induced cell death. *Free Radic Biol Med.* 34:1243-1252

Zeiger AM, Fisslthaler B, Schray-Utz B, Busse R (1995) Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells. *Circ Res.* 76:980-986

Zhang H, Luo Y, Zhang W, He Y, Dai S, Zhang R, Huang Y, Bernatchez P, Giordano FJ, Shadel G, Sessa WC, Min W (2007) Endothelial-specific expression of mitochondrial thioredoxin improves endothelial cell function and reduces atherosclerotic lesions. *Am J Pathol.* 170(3):1108-1120

Zhang P, Liu B, Kang SW, Seo MS, Rhee SG, Obeid LM (1997) Thioredoxin peroxidase is a novel inhibitor of apoptosis with a mechanism distinct from that of Bcl-2. *J Biol Chem.* 272:30615-30618

Zhao M, Antunes F, Eaton JW, Brunk UT (2003) Lysosomal enzymes promote mitochondrial oxidant production, cytochrome c release and apoptosis. *Eur J Biochem.* 270:3778-3786

Zimmermann BJ, Granger DN (1994) Mechanisms of reperfusion injury. *Am J Med Sci.* 307:284-292

Zureik M, Galan P, Bertrais S, Mennen L, Czernichow S, Blacher J, Ducimetière P, Hercberg S (2004) Effects of long-term daily low-dose supplementation with antioxidant vitamins and minerals on structure and function of large arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24:1485-1491

Zweier JL, Kuppusamy P, Luty GA (1988) Measurement of endothelial cell free radical generation: evidence for a central mechanism of free radical injury in postischemic tissues. *Proc Natl Acad Sci USA.* 85:4046-4050

8 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
AIDS	Acquired immunodeficiency syndrome
Apaf-1	Apoptosis activating factor-1
ARE	antioxidative response element
ASK-1	Apoptosis signal-regulating kinase-1
BMK	große MAPK (engl. big MAPK)
BSA	Bovine Serum Albumine (Rinderserumalbumin)
Ca ²⁺	Kalzium
cDNA	Complementary DNA
c-IAP	cellular inhibitor of apoptosis proteins
COX-1/2	Zyklooxygenase-1/2
DCF	Dichlorofluorescein
DFF	DNA-Fragmentierungsfaktor
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DISC	death inducing signalling complex
DTT	Dithiothreitol
EC	Endothelzelle(n)
ECL	Enhanced Chemoluminiscent Reagens
E. coli	Escherichia coli
EDRF	endothelium-derived relaxing factor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
engl.	englisch
eNOS	endothelial nitric oxide synthase
ERK1/2	extracellular signal-regulated kinase 1/2
Fa.	Firma
FACS	Fluorescence activated Cell Sorter
Fas	CD95/APO-1
FCS	Fetal calf serum (Fötales Kälberserum)
Fe	Eisen

FGF	Fibroblast growth factor
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GPCRs	G-protein-coupled receptors
GPx	Glutathion-Peroxidase
GR	Glutathion-Reduktase
GSH	Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
h	Stunde/n
HB-EGF	heparin binding epidermal growth factor
H ₂ DCF	reduziertes Dichlorofluorescein
H ₂ DCF-DA	2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiazetat
Hepes	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazino]-Ethansulfonsäure
HIV	Human immunodeficiency virus
HMG-CoA	aktivierte 3-Hydroxy-3-methyl-Glutarsäure
HRP	horseradish peroxidase
HSP	heat shock protein
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell/s
ICAD	inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease
iNOS	inducible nitric oxide synthase
JNK	c-Jun Amino-terminal Kinase (=SAPK stress-activated protein kinase)
kDa	Kilo-Dalton
KHK	Koronare Herzkrankheit
LC	LightCycler
LDL	low density lipoprotein
L-NMMA	N ^G -Monomethyl-L-arginin
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
MCSF	macrophage colony stimulating factor
min	Minute/n
mRNA	messenger RNA
NAC	N-Acetylcystein
NFκB	nuclear factor κB
nNOS	neural nitric oxide synthase
NO	Stickstoffmonoxid (engl. nitric oxide)
oxLDL	oxidiertes Low Density Lipoprotein

ORE	oxidative stress responsive element
PARP	Poly-ADP-Ribosylpolymerase
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	platelet derived growth factor
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RIPA	Radioimmunoassay precipitation buffer
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (engl. reactive oxygen species)
RT PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Chain Reaction
s	Sekunde/n
SAPK	stress-activated protein kinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SMC	glatte Muskelzelle (engl. smooth muscle cell)
SOD	Superoxiddismutase
SpTrx	Spermatozyten-spezifisches Trx (engl. sperm-specific trx)
TBE	Tris Borsäure EDTA
TBST	Tris buffered saline und Tween 20
TEMED	Tetramethyldiamin
TGF β	transforming growth factor β
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TNIP	Trx interacting protein
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
Trx	Thioredoxin
Trx-1	zytosolisches Trx
Trx-2	mitochondriales Trx
TrxR	Thioredoxin-Reduktase
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	vascular endothelial growth factor
Vol.	Volumen
vs.	versus

9 Lebenslauf

von Verena Maria Hildegard Ulrike Tischler, geboren am 04.06.1978 in Hanau

Schulbildung

1984-1988 Friedrich-Ebert-Grundschule, Hanau Klein-Auheim
1988-1993 Private Mädchen-Realschule St. Josef, Großauheim
1993-1997 Hohe Landesschule, Hanau, Abitur

Studium und Promotion

1997-1998 Bauingenieurwesen, Zivilrecht und Architekturgeschichte, TU Darmstadt
10/1998-12/2005 Humanmedizin, Johann-Wolfgang-Goethe Universität Frankfurt/Main
09/2000 Ärztliche Vorprüfung
09/2001 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/2001 Beginn der Dissertation in der Gruppe von Frau PD Dr. Judith Haendeler, Molekulare Kardiologie an der Universitätsklinik Frankfurt, Leiterin Frau Professor Stefanie Dimmeler
03/2002-02/2004 Wissenschaftliche Hilfskraft im Kursus für Histopathologie
04/2004 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
05/2004-10/2004 Stipendiatin der Bayer AG und des Dänischen Forschungsrates, Durchführung eines Projekts am Institut für Molekularpathologie der Universität Kopenhagen, Leitung Frau Professor Ulla Wewer
11/2004-10/2005 Beginn Praktisches Jahr

1. Tertial Anästhesie und Intensivmedizin, Universitätsklinik Frankfurt
2. Tertial Innere Medizin, Universitätsspital Zürich, Schweiz
3. Tertial Chirurgie, Universitätsklinik Frankfurt und General Health Science Center, Memorial University of Newfoundland, Kanada
12/2005 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Approbation als Ärztin

Weiterbildung

02/2006-07/2006 Assistenzärztin Chirurgie, St. Vinzenz-Krankenhaus, Hanau
08/2006-07/2007 Assistenzärztin, Institut für Pathologie, Kantonsspital St. Gallen, Schweiz
ab 08/2007 Assistenzärztin, Institut für Klinische Pathologie, Universitätsspital Zürich, Schweiz

St. Gallen, den 20.01.2007

10 Teilpublikationen

Haendeler J, Popp R, Goy C, Tischler V, Zeiher AM, Dimmeler S (2005) Cathepsin D and H₂O₂ stimulate degradation of thioredoxin-1: implication for endothelial cell apoptosis (J Biol Chem. 280:42945-51)

Haendeler J, Tischler V, Hoffmann J, Zeiher AM, Dimmeler S (2004) Low doses of reactive oxygen species protect endothelial cells from apoptosis by increasing thioredoxin-1 expression (FEBS letters 577:427-433)

Haendeler J, Hoffmann J, Tischler V, Berk BC, Zeiher AM, Dimmeler S (2002) Redox regulatory and anti-apoptotic functions of thioredoxin depend on S-nitrosylation at cysteine 69 (Nature Cell Biology 4:743-749)

11 Danksagung

Ich bedanke mich zunächst sehr herzlich bei Frau Professor Stefanie Dimmeler und Herrn Professor Zeiher für die Aufnahme in das Team der Molekularen Kardiologie innerhalb der Medizinischen Klinik III am Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main, die sehr guten Arbeitsbedingungen und die zahlreichen internen Fortbildungen.

Meiner Doktormutter Frau PD Dr. Jojo Haendeler danke ich sehr für die Überlassung des Themas, die Einarbeitung in die Labormethoden und die hervorragende Betreuung der Doktorarbeit. Ihr Enthusiasmus für wissenschaftliche Fragestellungen, ihre ständige Diskussionsbereitschaft und ihr Engagement haben mich wesentlich bei der Erstellung der Doktorarbeit unterstützt und mir wertvolle Impulse über die Arbeit hinaus gegeben.

Frau Christine Goy und Herrn Dr. Jörg Hoffmann danke ich für die Einführung in die verschiedene Methoden und die gute Zusammenarbeit innerhalb unserer Arbeitsgruppe. Frau Susanne Ficus danke ich für die grundlegende Einführung in die PCR-Technik.

Des Weiteren danke ich den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Molekularen Kardiologie für Diskussionen, Anregungen und insbesondere ihre Hilfsbereitschaft.

Meiner Mitstreiterin Frau Dr. Ulrike Kämper danke ich für den ständigen Austausch und die vielen produktiven Diskussionen.

Zuletzt möchte ich Herrn Dr. Hubert Müller herzlich danken, denn durch seinen spannenden und mitreissenden (Bio-)Chemieunterricht hat er mein Interesse an beiden Fächern maßgeblich gefördert.

St. Gallen, Februar 2007

Verena Tischler

12 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Regulation von Thioredoxin-1 durch reaktive Sauerstoffspezies:
Geringe Dosen reaktiver Sauerstoffspezies schützen Endothelzellen vor
Apoptose durch Erhöhung der Thioredoxin-1-Expression“

im Zentrum für Innere Medizin, Medizinische Klinik III, Molekulare Kardiologie, unter Betreuung und Anleitung von PD Dr. J. Haendeler ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

St. Gallen, den 22.02.2007

Verena Tischler

