

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Biologin Anke Hildebrandt
aus: Blankenburg
Tag der mündlichen Prüfung: 08.12.2009

**Tyrosinnitrierung von CD40 als
anti-arteriosklerotischer Schutzmechanismus
humaner Endothelzellen**

Gutachter: Prof. Dr. Günther Hämmerling
Prof. Dr. Markus Hecker

Meinen Eltern

Abstract

Atherosclerosis is a focal disease affecting medium to large size arteries in the human body. In these vessels, fibrous plaques are preferentially located at branches and bifurcations. The localization of atherosclerotic plaques seems to correlate with areas of reduced laminar shear stress with cyclic stretch being enhanced. CD40-CD40 ligand (CD154) interactions are strongly involved in inflammatory processes in the vessel wall leading to development of atherosclerotic disease. In this work we investigated the cyclic stretch (Flexercell Strain Unit FX-3000) induced nitration of CD40 followed by its subsequent rapid degradation in human umbilical cord venous endothelial cells (HUVEC). The stretch induced decrease in CD40 protein was prevented by inhibition of the 20S proteasome and by different scavengers of peroxynitrite. CD40 nitration also occurred under static conditions upon addition of exogenous peroxynitrite or the peroxynitrite generator SIN-1. Further investigations revealed that CD154-induced interleukin-12 p40 and E-Selectin expression significantly decreased on mRNA and protein level after brief exposure to exogenous peroxynitrite or cyclic stretch. This effect was reversed by preincubation of the cells with the peroxynitrite scavenger urate. Co-immunoprecipitation experiments revealed a decreased binding of Traf 2 and Traf 6 to CD40 after peroxynitrite treatment. Urate as well as depletion of membrane cholesterol with Methyl- β -Cyclodextrin restored CD154-mediated association of both Traf proteins with CD40. Additional Western Blot analyses showed a significant reduction in the localization of CD40 in the plasma membrane in cultured HUVEC and THP-1 monocytes following exposure to exogenous peroxynitrite. Immunofluorescence studies with THP-1 monocytes demonstrated at least a peroxynitrite-dependent redistribution of cytokine-stimulated CD40 protein from the cell membrane to the cytoplasm which was prevented by methyl- β -cyclodextrin.

Through this posttranslational oxidative modification of CD40 endothelial cells may endogenously limit their capacity to interact with pro-inflammatory CD154-positive T cells or platelets, thus lowering the risk of atherosclerosis initiation and/or progression.

Kurzzusammenfassung

Die Arteriosklerose tritt im menschlichen Körper am häufigsten in mittleren und großen Arterien auf. Dabei entstehen fibröse Plaques vorzugsweise an Biegungen und Verzweigungen dieser Gefäße. Die Lokalisation der arteriosklerotischen Plaques scheint mit Bereichen verminderter laminarer Schubspannung bei gleichzeitiger zyklischer Dehnung zu korrelieren. Interaktionen von CD40 mit CD40 Ligand werden als ein wesentlicher pathogenetischer Mechanismus bei Entzündungen einschließlich der Entwicklung der Arteriosklerose angenommen. In dieser Arbeit wurde die durch zyklische Dehnung (Flexercell FX-3000) induzierte Tyrosinnitrierung von CD40, gefolgt von dessen schnellem Abbau in kultivierten humanen Endothelzellen untersucht. Die Hemmung der 20S-Untereinheit des Proteasoms und die Peroxynitritscavenger Urat und FeTPPs verhinderten die dehnungsinduzierte Abnahme von CD40-Protein. Darüber hinaus war eine Tyrosinnitrierung von CD40 auch unter statischen Kulturbedingungen nach Inkubation mit exogenem Peroxynitrit oder dem Peroxynitritdonor SIN-1 nachweisbar. Weitere Untersuchungen ergaben einen signifikanten Rückgang der CD154-induziertem IL-12p40 und E-Selektin Expression auf mRNA- und Protein-Ebene nach zyklischer Dehnung oder der Exposition mit exogenem ONOO⁻. Dieser Effekt wurde durch eine Vorinkubation der Zellen mit Urat verhindert. Western Blot-Analysen mit immunpräzipitiertem CD40 konnten eine signifikante Abnahme der CD154-abhängigen Rekrutierung von Traf 2 und Traf 6 an CD40 nach kurzer Exposition gegenüber exogenen ONOO⁻ nachweisen. Eine Vorinkubation der Zellen mit Urat oder die Depletierung von Cholesterin aus der Plasmamembran mit Methyl-β-Cyclodextrin stellten die CD154-vermittelte Assoziation von Traf 2 und Traf 6 mit CD40 wieder her. Zusätzliche Western Blot-Analysen ergaben eine signifikante Abnahme des CD40 Protein in der mikrosomalen Membranfraktion von HUVECs und THP-1-Monozyten nach Zugabe von exogenem ONOO⁻. Immunfluoreszenzfärbungen von Monozyten zeigten letztlich eine ONOO⁻-abhängige Internalisierung von CD40 von der Plasmamembran ins Zytoplasma der Zellen, die durch Methyl-β-Cyclodextrin verhindert wurde.

Dieser posttranskriptionelle Mechanismus könnte Endothelzellen u. a. vor einer Initiation und Progression der Arteriosklerose durch Kontakt mit pro-inflammatorischen CD154-positiven T-Zellen oder Thrombozyten in Regionen mit verstärktem hämodynamischen Stress schützen.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Markus Hecker für die Überlassung dieses interessanten Themas, die vielen Ratschläge und kritischen Gedanken zu dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Hämmerling danke ich für seine Funktion als Erstgutachter.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Angel und Frau Prof. Dr. Melchior für die Übernahme des Koreferats.

Ein herzliches Dankeschön geht an Herrn Dr. Andreas Wagner für seine Betreuung. Seine Unterstützung, die mit sehr viel Fachkompetenz und Geduld erfolgte und seine offene und lustige Art haben mich stets motiviert und mir zusätzlich großen Spaß bereitet.

Neben allen Mitarbeitern der Abteilung Herz-Kreislauf-Physiologie möchte ich ganz besonders Anna (Änna-Banäna) Reifegerst, Ender Serbest, Danijela Heide und Evelyn Ernst für ihre Unterstützung, Hilfsbereitschaft und den Spaß bei der Arbeit danken!

Ein ganz besonderer Dank geht an meine Familie, die mich in jeglicher Situation bedingungslos unterstützt und somit zu meinem Werdegang beigetragen hat.

Herzlichen Dank sage ich vielen guten Freunden, ganz besonders Nicole Putzer, Susanne Rau, Dr. Johannes Friesen, Dr. Swen Wagner, Nina Ulbricht und Matthias Kleiser.

Schließlich möchte ich mich bei allen hier nicht genannten Menschen bedanken, die zum Gelingen der Arbeit Hilfestellungen geben konnten.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Einleitung	1
1.1 Arteriosklerose	1
1.2 Das Endothel und oxidativer Stress	2
1.3 Das CD40-CD154-System	4
1.4 Bedeutung des CD40/CD154-Systems in der Endothelzellen-Leukozyten- Wechselwirkung	5
1.5 Endozytose und Proteinabbau	6
1.6 Zielsetzung der Arbeit	8
2. Material und Methoden	9
2.1 Material	9
2.1.1 Zellkultur	9
2.1.2 Enzyme	9
2.1.3 Kits und Reagenzien für die Nukleinsäuresolierung und PCR	9
2.1.4 Molekulargewichtsstandards	9
2.1.5 Primer	10
2.1.6 Antikörper	10
2.2 Methoden	11
2.2.1 Zellkultur	11
2.2.2 Isolierung und Kultivierung von humanen Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVEC)	11
2.2.3 Isolierung und Kultivierung von humanen Nabelschnurarterien-Endothelzellen (HUAEC)	12
2.2.4 Kultivierung von Maus-Myelomzellen	12
2.2.5 Kultivierung der humanen THP-1-Monozytenzelllinie	12
2.2.6 Kokultivierungsexperimente mit HUVECs und CD154-positiven Myelomzellen.	12
2.2.7 Zyklische Dehnung von HUVEC	13
2.2.8 Zytokin-Stimulation der Zellen	13
2.2.9 Nachweis einer CD40-Tyrosin-Nitrierung in der Zellkultur	13

2.2.10 Inkubation der Endothelzellen mit Inhibitoren gegen verschiedene Proteinabbauwege	13
2.2.11 mRNA-Isolierung	14
2.2.12 Reverse Transkription	15
2.2.13 Polymerasekettenreaktion (PCR)	15
2.2.14 Quantitative PCR (Light Cycler).....	16
2.2.15 Herstellung von Gesamtproteinlysaten	17
2.2.16 Proteinbestimmung nach Micro Lowry.....	18
2.2.17 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	18
2.2.18 Western Blot und Immunfärbung.....	19
2.2.19 Differentielle Zentrifugation und subzelluläre Fraktionierung	21
2.2.20 Herstellung von Kernextrakten	21
2.2.21 Immunpräzipitation (IP)	22
2.2.22 Dynalbead-Immunpräzipitation.....	23
2.2.23 Isolierung von nativem CD40 mittels Blau-Nativ-PAGE (BN-PAGE, nach Schägger und von Jagow, 1991, modifiziert).....	24
2.2.24 Nitrierungsassay CD40	25
2.2.25 Proteasom-Assay	25
2.2.26 Biotin-Trypsin-Endozytose-Assay	26
2.2.27 Ubiquitin-Konjugations-Assay CD40	26
2.2.28 Nachweis der CD40-Ubiquitinierung.....	27
2.2.29 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) – IL-12p40	27
2.2.30 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) – IL-12p70	28
2.2.31 Anfertigung von Paraffinschnitten	28
2.2.32 Immunhistologie.....	29
2.2.33 Doppelimmunfluoreszenzfärbung	30
2.2.34 Fluorescence-Activated-Cell-Sorting (FACS)	32
3. Ergebnisse	33
3.1 Charakterisierung der CD40- und VCAM-1-Expressionsmuster in venösen und arteriellen Endothelzellen.....	33
3.1.1 Gewebeverband (Nabelschnur)	33
3.1.2 HUVECs und HUAECs (Zellkultur).....	34
3.2 Tyrosinnitrierung von CD40 und proteasomaler Abbau	36
3.2.1 CD40 wird während zyklischer Dehnung nicht ubiquitiniert	36

3.2.2 Zyklische Dehnung führt zu einem Abbau von CD40-Protein über die 20S-Untereinheit des Proteasoms	36
3.2.3 Exogenes Peroxynitrit (ONOO ⁻) führt zum Abbau von CD40-Protein über das proteasomale System.....	38
3.2.4 Nachweis einer Tyrosinnitrierung von CD40-Protein im zellfreien System	40
3.2.5 Tyrosin-nitriertes CD40-Protein wird über das 20S-Proteasom degradiert	41
3.2.6 Zyklische Dehnung führt nicht zu einer Freisetzung des 20S-Proteasoms aus kultivierten humanen Endothelzellen.....	43
3.3 Subzelluläre Lokalisierung von CD40	44
3.3.1 Tyrosin-nitriertes CD40-Protein wird internalisiert.....	44
3.3.2 ONOO ⁻ vermindert die Zytokin-induzierte CD40-Proteinmenge in den Mikrosomen von HUVECs und THP-1-Monozyten.....	45
3.3.3 Die Depletierung des Cholesterins in der Zellmembran verhindert die Peroxynitrit-abhängige Reduktion von mikrosomalem CD40 in HUVECs und THP-1-Monozyten ..	48
3.3.4 Einfluss von zyklischer Dehnung auf die subzelluläre Verteilung von CD40 in HUVECs.....	49
3.3.5 HSP-70 spielt bei der Peroxynitrit-abhängigen Internalisierung von CD40 keine Rolle	49
3.3.6 Überprüfung der CD40-Lokalisation in humanen Endothelzellen nach Zytokin-Stimulation mittels Immunfluoreszenz	50
3.3.7 Effekt von ONOO ⁻ auf die subzelluläre Verteilung von CD40 in Endothelzellen .	51
3.3.8 Einfluss zyklischer Dehnung auf die CD40-Protein-Verteilung in HUVECs	52
3.3.9 CD40 ist in Kernextrakten kultivierter HUVECs nachweisbar	53
3.3.10 Methyl-β-Cyclodextrin verhindert die durch ONOO ⁻ induzierte Umverteilung von CD40 in humanen THP-1-Monozyten	55
3.4 Tyrosinnitrierung von CD40 und deren Auswirkung auf die CD40-Funktion	55
3.4.1 Effekt von ONOO ⁻ und Urat auf die CD154-abhängige IL-12p40- und E-Selektin-Expression in statisch kultivierten HUVECs	55
3.4.2 Methyl-β-Cyclodextrin verhindert die ONOO ⁻ -abhängige Abnahme der CD154-induzierten IL-12p40- und E-Selektin-Expression in HUVECs	57
3.4.3 Der ONOO ⁻ -bedingte Funktionsverlust von CD40 ist offenbar nicht durch dessen Abbau über das 20S-Proteasom bedingt	58
3.4.4 Zyklische Dehnung reduziert die CD154-induzierte Expression von IL-12p40- und E-Selektin in Endothelzellen	61
3.4.5 ONOO ⁻ beeinträchtigt die CD40-Funktion in THP-1-Monozyten.....	62
3.4.6 Die Rekrutierung von Traf 2 und Traf 6 wird durch ONOO ⁻ beeinträchtigt	64
3.4.7 Methyl-β-Cyclodextrin stellt die durch Peroxynitrit verminderte Traf-Rekrutierung wieder her	65
3.4.8 Effekt zyklischer Dehnung auf die Rekrutierung von Traf 2 und Traf 6.....	66

4. Diskussion	68
4.1 Charakterisierung der Expressionsmuster von CD40 und VCAM-1 in venösen und arteriellen Endothelzellen.....	68
4.2 Tyrosinnitrierung von CD40 und proteasomaler Abbau	69
4.3 Subzelluläre Lokalisierung von CD40	73
4.4 Tyrosinnitrierung von CD40 und deren Auswirkung auf die CD40-Funktion	77
4.5 Zusammenfassung und Ausblick	80
5. Zusammenfassung	82
6. Literaturverzeichnis.....	85

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Das Endothel und oxidativer Stress.....	3
Abbildung 2:	Aktivierung von humanen Endothelzellen.....	6
Abbildung 3:	Vergleich der IFN- γ - und TNF- α -induzierten CD40- und VCAM-1-Proteinexpression in Endothelzellen humaner Nabelschnurvenen und -arterien.....	34
Abbildung 4:	Unterschiede in der CD40- und VCAM-1 -Expression in HUVECs und HUAECs.....	35
Abbildung 5:	Effekt von Proteasom-Inhibitoren auf die dehnungsinduzierte Abnahme von CD40.....	37
Abbildung 6:	Effekt einer Inhibierung des Proteasoms auf die ONOO ⁻ -induzierte Reduktion von CD40-Protein.....	39
Abbildung 7:	Nachweis der in vitro Tyrosinnitrierung von CD40.....	41
Abbildung 8:	Proteasomaler Abbau von nativem Nitrotyrosin-haltigem CD40 im zellfreien System.....	42
Abbildung 9:	Kinetik des Abbaus von CD40 über das 20S-Proteasom.....	43
Abbildung 10:	Das 20S-Proteasom wird während zyklischer Dehnung nicht von HUVECs freigesetzt.....	44
Abbildung 11:	ONOO ⁻ -abhängige Internalisierung von CD40 Protein in HUVECs.....	45
Abbildung 12:	ONOO ⁻ reduziert die TNF- α - und IFN- γ -induzierte mikrosomale CD40-Proteinmenge.....	46
Abbildung 13:	Effekt von Methyl- β -Cyclodextrin auf die Peroxynitrit-abhängige Verminderung von mikrosomalem CD40 in HUVECs und THP-1-Monozyten.....	47
Abbildung 14:	Veränderung der subzellulären Verteilung von CD40 nach zyklischer Dehnung.....	48
Abbildung 15:	Auswirkung von ONOO ⁻ und Epoxomicin auf die mögliche Interaktion von CD40 und HSP-70.....	50
Abbildung 16:	IFN- γ - und TNF- α -Exposition verstärkt die CD40-Expression in HUVECs.....	51
Abbildung 17:	Einfluss von ONOO ⁻ auf die Lokalisation von CD40 in kultivierten humanen Endothelzellen.....	52
Abbildung 18:	Einfluss der zyklischen Dehnung auf die CD40-Expression in kultivierten humanen Endothelzellen.....	53
Abbildung 19:	CD40 ist in Kernextrakten von humanen Endothelzellen nachweisbar....	53

Abbildung 20:	Effekt von Methyl- β -Cyclodextrin auf die ONOO ⁻ -induzierte Umverteilung von CD40 nach Zytokin-Stimulation in humanen Monozyten.....	54
Abbildung 21:	Effekt von ONOO ⁻ und Urat auf die CD154-induzierte Expression von IL-12p40 und E-Selektin-mRNA in HUVECs.....	56
Abbildung 22:	Effekt von ONOO ⁻ und Urat auf die CD154-induzierte IL-12p40-Protein-Expression in HUVECs.....	57
Abbildung 23:	Effekt von ONOO ⁻ und Methyl- β -Cyclodextrin (MCD) auf die CD154-abhängige IL-12p40- und E-Selektin-mRNA-Expression in HUVECs....	58
Abbildung 24:	Vergleich der Wirkung von Urat, Lactacystin und MCD auf die CD154-abhängige (A) IL-12p40- und (B) E-Selektin-mRNA-Expression in HUVECs.....	59
Abbildung 25:	Effekt von zyklischer Dehnung auf die CD154-abhängige Expression von (A) IL-12p40-, (B) E-Selektin- und (C) CD40-mRNA in kultivierten HUVECs.....	60
Abbildung 26:	Effekt von zyklischer Dehnung und Urat auf die CD154-induzierte Freisetzung von IL-12p40-Protein aus kultivierten HUVECs.....	61
Abbildung 27:	Effekt von ONOO ⁻ und Methyl- β -Cyclodextrin (MCD) auf die CD154-abhängige Expression von (A) IL-12p40-, (B) E-Selektin- und (C) CD40-mRNA in THP Monozyten.....	62
Abbildung 28:	Effekt von ONOO ⁻ und Urat auf die CD154-induzierte Freisetzung von IL-12p40-Protein aus THP-1-Monozyten.....	63
Abbildung 29:	Auswirkung von ONOO ⁻ und Urat auf die Assoziation von CD40 mit Traf 2 bzw. Traf 6 in Endothelzellen.....	65
Abbildung 30:	Wirkung von MCD und ONOO ⁻ auf die Assoziation von CD40 mit Traf 2 bzw. Traf 6 in Endothelzellen.....	66
Abbildung 31:	Zyklische Dehnung vermittelt die Assoziation von Traf 2 bzw. Traf 6 an CD40 und TNFR-1 in humanen kultivierten Endothelzellen.....	67
Abbildung 32:	CD40-Aminosäuresequenz.....	72
Abbildung 33:	ONOO ⁻ -abhängige Internalisierung des CD40-Rezeptors.....	74

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APC	Antigenpräsentierende Zelle
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin)
cDNA	komplementäre DNA
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
CO ₂	Kohlendioxid
CP	Crossing Point
Cy 3	Indiodicarbocyanin
DMEM	Dulbecco's modifiendeagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECGS	Endothelial Cell Growth Factor
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fötale Kälberserum (Fetal Calf Serum)
G	Erdbeschleunigung
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethan-sulfonsäure
HUVEC	Human Umbilical Cord Vein Endothelial Cells
HSP-70	Heat Shock Protein 70 (Hitzeschockprotein 70)
ICAM-1	Intracellular Adhesion Molecule-1
IFN- γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

kDa	Kilodalton
LDL	Low-Density-Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharid
Lsg.	Lösung
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
mM	Millimolar
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NO	Stickstoffmonoxid (Nitric Oxide)
O ₂ ⁻	Superoxidanion
ONOO ⁻	Peroxynitritanion
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	Reactive Oxygen Species (Reaktive Sauerstoffspezies)
rpl32	ribosomales Protein L32
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	Reverse-Transkription-Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (standard error of mean)
SOD	Superoxid-Dismutase
STAT	signal transducer and activator of transcription
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Th1	T-Helfer1-Lymphozyt
THP-1	Name der Zelllinie
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor alpha
Traf	Tumor Nekrose Faktor assoziierter Faktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-Aminomethan

U	Einheit
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule-1

1. Einleitung

1.1 Arteriosklerose

Noch vor 20-30 Jahren wurde die Arteriosklerose als reine Lipidablagerung in Arterien angesehen. Heute ist allgemein akzeptiert, dass es sich hierbei um eine chronisch Entzündungserkrankung handelt, die zusammen mit ihren Folgeerkrankungen Myokardinfarkt, Schlaganfall und Herzinsuffizienz für mehr als 50 % aller Todesfälle in der westlichen Welt verantwortlich ist. Es ist zu befürchten, dass die Prävalenz der Arteriosklerose zukünftig durch veränderte Lebensgewohnheiten noch zunimmt und sich auch auf andere Kulturkreise ausbreitet.

Nach heutigem Kenntnisstand spielen von Anfang an entzündliche Prozesse eine Schlüsselrolle. Diese tragen wesentlich zu allen Phasen der Krankheit bei: von der Initiation arteriosklerotischer Plaques bis hin zur Ruptur mit den entsprechenden thromboembolischen Komplikationen. Unter normalen Bedingungen kommt es zu keiner Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen, die die innere Oberfläche von Gefäßen bilden. Unter pathophysiologischen Bedingungen kann jedoch die Funktion des Endothels gestört sein und es kommt zu einer Veränderung der Gefäßwand in Form einer Erniedrigung der vaskulären Elastizität und strukturellen Wandverdickungen (Libby, 2006). Die so genannte „endotheliale Dysfunktion“ zusammen mit den klassischen Risikofaktoren (z.B. Dyslipidämie, Rauchen, Bluthochdruck, Diabetes und neuerdings der rheumatoiden Arthritis) kann z.B. die Expression von Adhäsionsmolekülen (E-Selektin und VCAM-1) in den Endothelzellen anregen. Die Expression von VCAM-1 wird durch die Bindung von oxidiertem Low Density Lipoprotein (oxLDL) an den LOX-1-Rezeptor auf den Endothelzellen initiiert (Cybulsky et al., 2001; Li et al., 2002). Darüber hinaus führt die Stimulation der Endothelzellen mit oxLDL zur Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine wie Interleukin-1 β (IL-1 β) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) (Sever et al., 2003).

Die gesteigerte Expression der Adhäsionsmoleküle ermöglicht die Interaktion von Endothelzellen und Leukozyten. Dies führt zur Aktivierung der Endothelzellen und zur Freisetzung von Chemokinen wie z.B. MCP-1 (Monocyte chemoattractant protein-1) (Lukacs et al., 1995). Anhand eines MCP-1-Gradienten werden zirkulierende Monozyten rekrutiert. Es kommt zum so genannten „Monozytenrolling“, dem die Bindung an die Endothelzellen und schließlich die Extravasation in die Gefäßwand folgt (Kukreti et al., 1997, Reinhardt und Kubes, 1998). Im subendothelialen Raum differenzieren die Monozyten zunächst zu

Makrophagen und durch Aufnahme oxidiertes Lipide zu Schaumzellen. Durch die gleichzeitige Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen (IL-8) und Wachstumsfaktoren (M-CSF) kommt es zur Rekrutierung von glatten Muskelzellen aus der Media, welche in die Intima einwandern und dort beginnen zu proliferieren (Clinton et al., 1992, Rosenfeld et al., 1992). Die glatten Muskelzellen in der Intima setzen extrazelluläre Matrixproteine frei und befördern dadurch die Bildung einer fibrösen Kappe (Amento et al., 1991). Dieser Prozess trägt grundsätzlich zur Stabilisierung arteriosklerotischer Plaques bei. In den Plaques akkumulierende aktivierte T-Zellen, Makrophagen und Mastzellen produzieren Matrixmetalloproteinasen, welche diese fibröse Kappe angreifen. Dadurch kann diese mechanisch aufreißen, wodurch die subendotheliale Matrix exponiert wird, was letztendlich zu einer lokalen Thrombose und damit zu einem möglichen Kompletverschluss des betroffenen Gefäßes führt (Mach et al., 1997).

Somit wird deutlich, dass Entzündungsreaktionen nicht nur bei der Initiation arteriosklerotischer Plaques, sondern darüber hinaus auch bei der Entwicklung komplizierter vulnerabler Läsionen beteiligt sind (Ross 1999, Glass und Witztum 2001).

1.2 Das Endothel und oxidativer Stress

Arteriosklerotische Läsionen bilden sich bevorzugt an Verzweigungen und Biegungen der großen Arterien, was den veränderten Strömungsprofilen des Blutes an diesen so genannten Prädilektionsstellen zugeschrieben wird. Die durch laminaren Blutfluss verursachte erhöhte Wandschubspannung stimuliert in den Endothelzellen die Expression von Superoxid-Dismutasen (SOD) und steigert die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) durch Aktivierung der endothelialen NO-Synthase (eNOS) (Gimbrone et al., 2000; Abb. 1). In geringen Mengen hat NO eine vasodilatatorische und vasoprotektive Wirkung und hemmt die Expression pro-inflammatorischer Genprodukte wie VCAM-1 über eine Inhibierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (De Caterina et al., 1995). Weiterhin hemmt NO die Adhäsion und Aktivierung von Thrombozyten sowie zirkulierender Leukozyten und suppremiert die Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen (Vane et al., 1990).

Die Gruppe der so genannten reaktiven Sauerstoffspezies, kurz ROS genannt, beinhaltet verschiedene reduzierte Formen von molekularem Sauerstoff, wie das Superoxidanion (O_2^-), Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und das Hydroxylradikal ($\text{OH}\cdot$). O_2^- wird vornehmlich durch Mitglieder der NOX-Familie der Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH)-Oxidasen gebildet. Die membranständige NOX2 wird dabei in Endothelzellen durch erhöhte zyklische Deformation aktiviert (Bedard und Krause, 2007, Abb. 1). Durch das an den Bifurkationen zugunsten von O_2^- und seinen Folgeprodukten verschobene Gleichgewicht

zwischen NO und $\cdot\text{O}_2^-$ kommt es letztendlich zur Enthemmung der Expression pro-arteriosklerotischer Genprodukte wie z.B. von CD40 (Abb. 1).

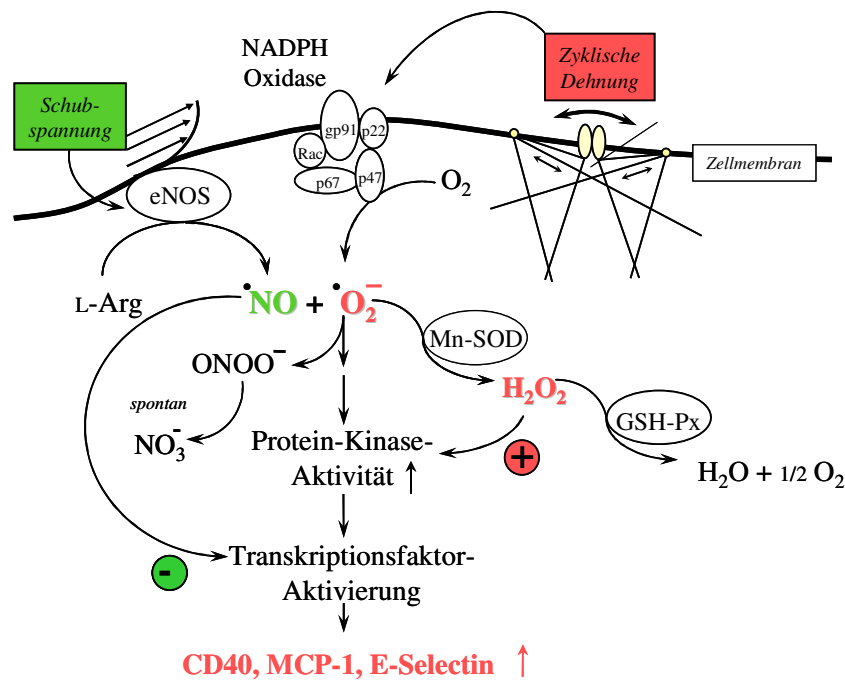


Abbildung 1: Das Endothel und oxidativer Stress.

Durch Aufdehnung der Gefäßwand kommt es zur gesteigerten O_2^- -Bildung, die zu einer vermehrten Expression pro-arteriosklerotischer Genprodukte führt. Das Ungleichgewicht von Stickstoffmonoxid (NO) und Superoxidanion (O_2^-) führt darüber hinaus zur Bildung erhöhter Mengen von Peroxynitrit (ONOO^-) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2), welche ihrerseits die Exposition pro-arteriosklerotischer Genprodukte steigern können (mit freundlicher Genehmigung von Prof. Hecker).

Darüber hinaus reagiert NO mit $\cdot\text{O}_2^-$ zu Peroxynitrit (ONOO^-) (Bedard und Krause, 2007, Beckmann et al., 1994, Abb. 1). Die Folge ist ein Absinken der ROS-Menge in den Zellen insbesondere aber des arterioprotektiven NO. ONOO^- ist eine reaktive Stickstoffverbindung (RNS), die in der Lage ist verschiedene Proteine durch Nitrierung von Tyrosinresten oxidativ zu modifizieren und gegebenenfalls zu inaktivieren (Beckmann et al., 1994). Akuter bzw. chronischer oxidativer und ggf. nitrosativer Stress im vaskulären Endothel wird als endotheliale Dysfunktion bezeichnet und scheint maßgeblich an der Entstehung bzw. Entwicklung nicht nur der Arteriosklerose sondern auch des Diabetes und neurodegenerativen Erkrankungen beteiligt zu sein.

1.3 Das CD40-CD154-System

Der CD40-Rezeptor ist ein 48 kDa großes Transmembranprotein und gehört gemeinsam mit den Rezeptoren für TNF- α und dem Apoptoserezeptor Fas/CD95 zur so genannten TNF-Rezeptor-Superfamilie. Es wird konstitutiv von Antigenpräsentierenden Zellen wie B-Zellen, Monozyten/Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert (Foy et al., 1996). Darüber hinaus konnte der Rezeptor auf Zellen des Gefäßsystems (Endothelzellen, Fibroblasten und glatten Muskelzellen), Epithelzellen und Thrombozyten nachgewiesen werden (Hollenbaugh et al., 1995, Foy et al., 1996).

Der CD40-Ligand CD154 (CD40L) wurde erstmalig als Membranprotein auf aktivierten T-Zellen beschrieben (Armitage et al., 1992, Hollenbaugh et al., 1992), wird außerdem aber v.a. von Thrombozyten, vaskulären glatten Muskelzellen, Endothelzellen und Monozyten exprimiert. CD154 ist ein Typ-II-Transmembranprotein und gehört zur TNF-Superfamilie. Aus der 39 kDa großen Transmembranform kann durch Proteolyse eine kleinere lösliche Form, das so genannte sCD154 (soluble CD154) entstehen (Graf et al., 1995). Aktivierte Plättchen stellen die Hauptquelle für sCD154 dar (Foy et al., 1996).

Neben seiner besonderen Bedeutung als kostimulatorisches Rezeptor/Liganden-Paar, z.B. beim Immunglobulinklassenwechsel von B-Lymphozyten ist die pathophysiologische Rolle des CD40-CD154-Systems bei chronisch entzündlichen und Autoimmunkrankheiten in den letzten Jahren immer deutlicher geworden. So konnte bei Knockoutmäusen gezeigt werden, dass die Defizienz von CD40 oder CD154 sich positiv auf den Verlauf von Gelenkentzündungen, wie der Arthritis (Durie et al., 1993), der allergischen Enzephalomyelitis (Grewal et al., 1993) und der Arteriosklerose auswirkt (Lutgens et al., 1999, Mach et al., 1998, Schönbeck et al., 2000).

Da CD40 eine intrinsische Signalaktivität fehlt, werden Adaptormoleküle, die so genannten TNF-Rezeptor-assoziierten Faktoren (Traf) zur Signalweiterleitung nach einer CD40-CD154-Interaktion benötigt (Schönbeck und Libby, 2001). Die Traf-Familie besteht aus sechs Mitgliedern, von denen fünf (Traf 1, 2, 3, 5, 6) abhängig von Zelltyp und -funktion an CD40 binden (Zapata et al., 2003). In Endothelzellen bewirkt die Assoziation von Traf 2 und CD40 die Aktivierung pro-inflammatorischer Signalwege (Munkundan et al., 2004).

Die Spezifität der CD40-Signalweiterleitung wird aber nicht nur durch das Zusammenspiel mit den verschiedenen Trafs beeinflusst. Vielmehr spielt hierbei auch die Lokalisation des Rezeptors eine wesentliche Rolle. CD40 ist in und an speziellen Membranmikrodomänen, den so genannten „Lipid Rafts“ lokalisiert. Nach einer CD40-CD154-Interaktion transloziert der

Großteil von CD40 in die Lipid Rafts, wo der Rezeptor dann mit den verschiedenen Traf s assoziiert (Arron et al., 2002). Die Lipid Raft-abhängige Assoziation von Traf 2 an CD40 führt zur Bildung pro-inflammatorischer Zytokine (z.B. MCP-1), welche die Arteriosklerose (Aaron et al., 2002; Chen et al., 2006) begünstigen.

1.4 Bedeutung des CD40/CD154-Systems in der Endothelzellen-Leukozyten-Wechselwirkung

In der Endothelzellen-Leukozyten-Wechselwirkung wird dem CD40/CD154-System eine besondere Bedeutung zugesprochen, seitdem bekannt ist, dass durch die Ligand-Rezeptor-Interaktion eine ausgesprochen starke pro-entzündliche Reaktion ausgelöst werden kann. Ähnlich wie durch die Stimulation mit pro-inflammatorischen Zytokinen (IL-1 β , IFN- γ und TNF- α) wird in den Endothelzellen eine gesteigerte Expression von Chemokinen (MCP-1 und IL-8) sowie Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, VCAM-1, E-Selektin) induziert (Mach et al., 1998, Thienel et al., 1999, Lienenlücke et al., 2000). Dies bewirkt die vermehrte Rekrutierung und Aktivierung von Monozyten, was wiederum die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine, wie TNF- α und IFN- γ , zur Folge hat. Diese stellen einen weiteren Stimulus für die Endothelzellen dar und führen unter anderem zu einer deutlichen Verstärkung der CD40-Expression (Wagner et al., 2002).

Ebenfalls rekrutierte CD154-positive T-Zellen können jetzt verstärkt mit CD40 auf Endothelzellen und Monozyten/Makrophagen reagieren. So wird unter anderem die Bildung von IL-18 und IL-12 in Monozyten/Makrophagen stimuliert (Robertson und Hansson, 2006).

In humanen Endothelzellen scheint die Produktion von IL-12p70 exklusiv über eine CD40-CD154-Interaktion ausgelöst zu werden (Lienenlücke et al., 2000, Abb. 2). Dabei exprimieren die Zellen konstitutiv die IL-12p35-Untereinheit während die IL-12p40-Untereinheit *de novo* synthetisiert werden muss. IL-12 hat die Differenzierung von Th0-Zellen zu Th1-Zellen zur Folge (Robertson und Hansson, 2006). Die verstärkte Bildung von Th1-Zellen fördert die Entzündungsreaktion insbesondere durch die heraufregulierte Synthese von IFN- γ , welches Makrophagen zur Sekretion von Zytokinen (TNF- α , IL-1 β und IL-6) anregt. Eine Th2-Antwort, die durch die Freisetzung von IL-10 ausgelöst wird, hat im Gegensatz dazu in diesem Kontext anti-inflammatorische Effekte. So stellt IL-10 einen potenten Inhibitor der Monozyten/Makrophagen-Funktion dar und verhindert somit unter anderem die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine (Robertson und Hansson, 2006). Insofern kann der CD40-CD154-gesteuerten Endothel-Leukozyten-Wechselwirkung in der Initiationsphase der Entzündung eine besondere Bedeutung zugesprochen werden.

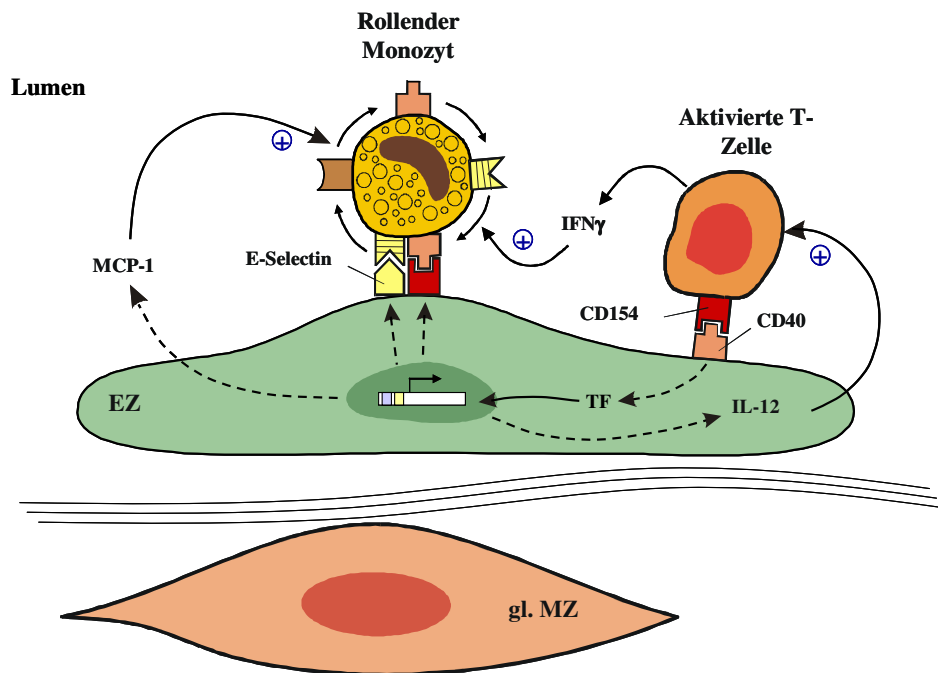


Abbildung 2: Aktivierung von humanen Endothelzellen.

Darstellung der CD40/CD154-vermittelten Interaktion von T-Lymphozyten, Endothelzellen und Monozyten.

Hervorgehoben ist die positive Rückkopplung des CD154-induzierten endothelialen IL-12.

(EZ: Endothelzelle; gl. MZ: glatte Muskelzelle; mit freundlicher Genehmigung von Prof. Hecker)

1.5 Endozytose und Proteinabbau

Transmembranrezeptoren und die zugehörigen Signal- und Adaptorproteine sind hauptsächlich in den Lipid Rafts, die mit Caveolinen assoziiert sein können, lokalisiert. Die Bindung der entsprechenden Liganden vermittelt hier eine Rezeptorinternalisierung, die entweder Clathrin-abhängig oder -unabhängig ist (Le Roy et al., 2005). Die Clathrin-abhängige Endozytose findet dabei außerhalb der Lipid Rafts statt (Wiley et al., 2001). Bei diesem Prozess formieren sich lösliche Clathrin-Moleküle an der Plasmamembran um den Rezeptor. Diese bilden Clathrin-bedeckte Invaginationen der Plasmamembran und nach ihrer Ablösung Clathrin-Vesikel. Der Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor (EGFR) wird zum Beispiel auf diesem Weg ubiquitiniert und dem proteasomalen System zum Abbau zugeführt (Wiley et al., 2001).

Die Clathrin-unabhängige Endozytose ist dagegen direkt mit den Lipid Rafts assoziiert und Caveolin-abhängig (Minshall et al., 2003). In vaskulären Endothelzellen bilden Caveolae Einstülpungen der Plasmamembran, binden dort Cholesterin und sammeln dieses in Clustern an (Pelkmans et al., 2004, Bauer et al., 2005). Nach der Rezeptoraktivierung kommt es abhängig von GTPasen zur Bildung intrazellulärer geschlossener Vesikel, den so genannten

„Cavikeln“ (Navarro et al., 2004). Die Cavikel transportieren die aufgenommenen Rezeptoren entlang von Mikrotubuli zu den Caveosomen (Tagawa et al., 2005, Pelkmans et al., 2005), von wo aus die internalisierten Proteine weiter zum Golgi-Apparat oder dem Endoplasmatischen Retikulum transportiert werden (Pelkmans et al., 2005).

In eukaryotischen Zellen wird der Proteinabbau hauptsächlich über den ATP- und Ubiquitin-abhängigen Proteasom-Abbauweg bewerkstelligt. Hierbei werden die Proteine zunächst durch kovalente Bindung mehrerer Ubiquitin-Moleküle markiert (siehe Übersichtsartikel von Hochstrasser, 1996) Der Konjugation mit den Ubiquitinmolekülen folgt eine schnelle Degradation durch das 26S-Proteasom, einer multikatalytischen Protease, die die Proteine in kurze Peptidketten zerlegt (Hilt und Wolf, 1996). Das 26S-Proteasom besteht aus dem zentralen 20S-Proteasom, in dem die Proteine degradiert werden und aus zwei flankierenden 19S-Komplexen, die die Substratspezifität und deren Regulierung sicherstellen. Obwohl es eine zentrale Rolle beim intrazellulären Proteinumsatz spielt, kommt dem 26S-Proteasom auch eminente Bedeutung bei verschiedenen Prozessen wie der Antigenpräsentation über MHC-Klasse I, Apoptose und Zellteilung zu (Ciechanover, 2006).

Neben der Proteolyse durch das 26S-Proteasom ist auch der ATP- und Ubiquitin-unabhängige Abbau über das 20S-Proteasoms bekannt. Dabei wird der Abbau je nach Substrat durch die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität, die große hydrophobe Reste erkennt, die Trypsin-ähnliche Aktivität, deren Substrat basische Aminosäuren darstellen oder die Peptidyl-Glutamyl-Peptid-hydrolysierende Aktivität (PGPH), die saure Reste erkennt, katalysiert (Heinemeyer et al., 1993, Boes et al., 1994, Bogyo et al. 1998). Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass Modifikationen von Proteinen, die durch oxidativen Stress entstehen, z.B. die Nitrierung von Tyrosinresten durch Peroxynitrit, ein Signal für deren Abbau über die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität des 20S-Proteasoms darstellen (Szousa et al., 2000, Shringapure et al., 2001, Kretz-Remy et al., 2003).

Zum besseren Verständnis bzw. zur Aufklärung proteolytischer Prozesse werden verschiedene Inhibitoren des proteasomalen Systems eingesetzt. Dabei sind die Peptidaldehyde MG-132 und Lactacystin sowie das zu den Epoxoketonen gehörende Epoxomicin (Meng et al., 1999) die am häufigsten und auch in der klinischen Therapie eingesetzten Substanzen. Peptidaldehyde inhibieren die Funktionen aller proteasomalen Untereinheiten und darüber hinaus andere intrazelluläre Proteasen sowie Teile des lysosomalen Systems (z.B. Cathepsin B) (Mellgren, 1997, Bogyo et al., 1997, Bromme et al., 1999). Im Gegensatz dazu werden die Aktivitäten von nicht-proteasomalen Proteasen (Trypsin, Chymotrypsin, Papain, Calpain oder Cathepsin B) durch den Inhibitor Epoxomicin

nicht beeinflusst (Hanada et al., 1992). Dieser Inhibitor hemmt spezifisch die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität des 20S-Proteasoms (Meng et al, 1999).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

In den letzten Jahren wurde dem CD40-Rezeptor aufgrund seiner Bedeutung in der Pathogenese chronischer Entzündungserkrankungen wachsende Aufmerksamkeit geschenkt. In der Arbeitsgruppe von Prof. Hecker konnte bereits gezeigt werden, dass zyklische Dehnung humaner Endothelzellen zu einer Degradation von CD40 führt, die durch den generellen proteasomalen Inhibitor MG-132 gehemmt werden kann. Weiterhin konnten erste Hinweise auf eine dehnungsinduzierte Tyrosinnitrierung von CD40 gewonnen werden (Dissertation Baumgarten, 2004).

In dieser Arbeit sollte daher im Detail untersucht werden, welche proteolytischen Kompartimente in den dehnungsabhängigen Abbau von CD40 involviert sind. Weiterhin sollte der Zusammenhang zwischen der Peroxynitrit-medierte Tyrosinnitrierung und dem Abbau von CD40 nach dessen Internalisierung in humanen Nabelschnurvenen-Endothelzellen auf molekularer Ebene untersucht werden. Zudem sollte die funktionelle Bedeutung der Tyrosinnitrierung des CD40-Rezeptors für den CD40-CD154-Signalweg geklärt werden. Die Identifizierung möglicher Regulationsmechanismen, die die Präsenz des CD40-Rezeptors auf Endothelzellen limitiert, sollte ferner einen Beitrag zum besseren Verständnis der Initiation der Arteriosklerose und ggf. deren therapeutischer Kontrolle liefern.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Soweit nicht anders erwähnt, stammten die verwendeten Chemikalien und Reagenzien von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Roche (Mannheim) oder Sigma (Steinheim).

Plastikmaterialien für die Zellkultur wurden von TPP (Trassdingen, Schweiz), BD Falcon (Heidelberg), Sarstedt (Hannover) und Eppendorf (Hamburg) bezogen.

2.1.1 Zellkultur

Die folgenden Medien, Zusätze und Puffer wurden von Gibco (Invitrogen, Wiesbaden) bezogen:

Zur Kultivierung von primären humanen Nabelschnurvenen-Endothelzellen

M199-Medium (Gibco; Invitrogen; Karlsruhe) mit 20 % fötalem Kälberserum (FKS), 1% Penicillin-Streptomycin-Mix und 1 µg/ml ECGS (endothelial cell growth supplement)

Zur Kultivierung der CD40-Liganden transfizierten Maus-Myelomzelllinie P3xTB.A7

„Roswell Park Memorial Institute“ (RPMI) 1640-Medium mit 10% FKS, 1% Pen-Strep

2.1.2 Enzyme

Taq Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Bioron)

2.1.3 Kits und Reagenzien für die Nukleinsäuresolierung und PCR

RNA-Isolierung:	RNeasy Total RNA Kit (Qiagen, Hilden)
Reverse Transkription:	Omniscript reverse transcription Kit (Qiagen, Hilden) Sensiscript reverse transcription Kit (Qiagen, Hilden)
RNase Inhibitor:	RNase Inhibitor 100 U/µl (Promega, Madison, USA)
Light Cycler PCR:	QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit (Qiagen, Hilden)

2.1.4 Molekulargewichtsstandards

DNA-Standards

Ultra-low-range-marker:

10, 15, 20, 25, 35, 50, 75, 100, 150, 200, 300 bp (Fermentas, St. Leon-Roth)

Proteinstandards

Prestained protein marker: 15, 20, 37, 50, 75, 100, 150, 200 kDa (Biorad, München)

2.1.5 Primer

In dieser Arbeit wurden folgende Primer verwendet:

Tabelle 1: Primerbedingungen (Sequenzen, Zyklenzahlen, Annealingtemperaturen)

Primer	Zyklen	Annealing-Temperatur	Sequenz 5'-3'	Genbanknr.
CD40 forward CD40 reverse	35	60 °C	TGGTCTCTGTAATCCCTTGTGCCT GGAAGGCATTCCGTTTCA	NM_001250
RPL-32 forward RPL-32 reverse	30	58 °C	AGGCATTGACAACAGGGGTTTC GCACA CAGCAGCACTTGTT	NM_001007074
E-Selektin forward E-Selektin reverse	35	56 °C	AGCAAGGCATGATGTTAACC GCATTCTCTCTTCCAGAGC	M17851
VCAM-1 forward VACM-1 reverse	30	56 °C	CATGACCTGTTCCAGCGAGG CATTACGAGGCCACCACTC	X53051
IL12P40 reverse IL12p40 forward	35	53 °C	CTGGTT TTTCTGGCATCTCC GTGAGGACCACCATTTCTCC	NM_002187

2.1.6 Antikörper

Primärantikörper

Kaninchen-anti-CD40-C-terminal (C-20; Santa Cruz; Heidelberg)

Kaninchen-anti-CD40-N-terminal (N-16; Santa Cruz; Heidelberg)

Maus-anti-CD40 (MC-159; AbD Serotec; Düsseldorf)

Maus-anti-CD40 (Ab-2, Klon BE-1; Dianova, Hamburg)

Phycoerythrin-konjugiertes Maus-anti-CD40 (BD Pharmingen)

Phycoerythrin-konjugiertes IgG κ Isotyp Kontrolle (BD Pharmingen)

Kaninchen-anti-Nitrotyrosin (Upstate; Lake Placid; USA)

Maus-anti-Nitrotyrosin (Upstate; Lake Placid; USA)

Maus-anti- β -Aktin (Abcam; Cambridge; UK)

Ziege-anti-CD31 (Santa Cruz; Heidelberg)

Maus-anti-CD31 (#09096, Dianova, Hamburg)

Maus-anti-HSP70 (C92F3A-5; Stressgen)

Kaninchen-anti-TRAF6 (H-274; Santa Cruz; Heidelberg)

Maus-anti-TRAF2 (ab12122; Abcam; Cambridge; UK)

Kaninchen-anti-Proteasome 20S alpha+beta (ab22673; Abcam; Cambridge; UK)

Maus-anti-Ubiquitin (P4D1; Cell Signaling)

Kaninchen-anti-VCAM-1 (H-276; Santa Cruz; Heidelberg)

NA/LE Maus-anti-CD154 (BD Pharmingen)

Sekundärantikörper

Peroxydase-konjugiertes Ziege F(ab')₂ anti-Kaninchen-IgG (Sigma; München)

Peroxydase-konjugiertes Ziege F(ab')₂ anti-Maus-IgG (Sigma; München)

Cy3-konjugiertes Esel F(ab')₂ anti-Kaninchen-IgG (Jackson Immunity)

Cy3-konjugiertes Esel F(ab')₂ anti-Maus-IgG (Jackson Immunity)

Cy3-konjugiertes Esel F(ab')₂ anti-Ziege-IgG (Jackson Immunity)

Cy2-konjugiertes Esel F(ab')₂ anti-Ziege-IgG (Jackson Immunity)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Alle Arbeiten der Zellkultur erfolgten unter sterilen Bedingungen. Die Zellen wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit in einem Brutschrank (Thermo Scientific Heraeus) inkubiert.

2.2.2 Isolierung und Kultivierung von humanen Nabelschnurvenen-Endothelzellen

(HUVEC)

Zur Präparation von HUVECs (human umbilical cord venous endothelial cells) wurden Nabelschnüre verwendet, bei denen die Geburt nicht länger als 24 Stunden zurücklag. Die Präparation erfolgte unter weitgehend sterilen Bedingungen. Nach der äußeren Reinigung der Nabelschnur, wurde die Vena umbilicalis von beiden Enden mit Knopfkanülen sondiert und durch diese mit sterilem, auf 37 °C vorgewärmten HANKS (PAA Laboratories) mit Penicillin (50 U/ml), Streptomycin (50 µg/ml) und Nystatin (10 U/ml) gespült, um Blutreste und Thromben zu entfernen. Nach der Reinigung des Venenlumens wurde Dispase-II-Lösung (neutrale Protease, 75 U/ml; Roche Diagnostics GmbH) eingefüllt und die Nabelschnur für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Nabelschnur vorsichtig massiert und mehrfach mit sterilem HANKS gespült, um die HUVECs aus dem Gewebeverband zu lösen. Nach darauf folgender Zentrifugation der Zellsuspension bei 110 x g für 5 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Zellen in M199-Medium (Invitrogen, Karlsruhe) mit 20% FKS, 1% Pen-Strep und 1 µg/ml ECGS aufgenommen. Die Kultivierung der Zellen erfolgte auf 6-Loch-Platten oder 6-Loch-FlexerCell Platten (FlexCell International Corp., Hillsborough, USA), die mit 2% Gelatine (Sigma, gelöst in 0,1 N HCl) beschichtet waren. Am ersten Tag

nach der Präparation wurden die Zellen in serumfreiem Medium gewaschen, um noch vorhandene Erythrozyten und abgestorbene Zellen zu entfernen. Die weitere Kultivierung erfolgte in Medium (M199) mit Zusätzen, welches alle 48 Stunden gewechselt wurde. Eine für die Versuche notwendige Konfluenz der primären Zellen von 100% war in 4-6 Tagen erreicht.

2.2.3 Isolierung und Kultivierung von humanen Nabelschnurarterien-Endothelzellen (HUAEC)

Die Präparation und Kultivierung von HUAEC erfolgte im Wesentlichen wie für HUVEC in Kapitel 2.2.2 beschrieben. Um einen Spasmus der Arterien zu vermeiden, wurde die Präparation auf einer 37 °C warmen Heizplatte durchgeführt. Nach Erreichen einer 100%-igen Konfluenz der primären Zellen wurden diese für 8 Minuten mit 0,5% Trypsin in 0,2 mg/l EDTA von den Kulturplatten abgelöst. Nach einem Waschschrift in serumfreiem Medium, wurden sie in M199-Medium mit 20% FKS, 1% Pen-Strep und 1 µg/ml ECGS aufgenommen und in 6-Loch-Platten ausgesät. Danach wurden die HUAECs bis zu 100%-iger Konfluenz 4-6 Tage wachsen gelassen.

2.2.4 Kultivierung von Maus-Myelomzellen

Die stabil CD154-transfizierte Maus-Myelomzelllinie P3xTB.A7 wurde von Prof. Dr. R. Kroczeck (Robert-Koch-Institut, Berlin) zur Verfügung gestellt. Eine Beschreibung ist durch eine Publikation von Graf et al. (1992) gegeben. Als Kultivierungsmedium diente RPMI 1640 (10% FKS, 50 U/ml Penicillin, 50 µg/µl Streptomycin, 10 U/ml Nystatin). Die Zellen wurden regelmäßig mittels Western Blot-Analyse auf die Expression von CD154 untersucht.

2.2.5 Kultivierung der humanen THP-1-Monozytenzelllinie

Die humane Monozytenzelllinie THP-1 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) wurde in RPMI 1640 Medium plus 10% FKS, Penicillin (50 U/ml), Streptomycin (50 µg/µl) und Nystatin (10 U/ml) kultiviert.

2.2.6 Kokultivierungsexperimente mit HUVECs und CD154-positiven Myelomzellen

Zur Aktivierung des membranständigen CD40-Rezeptors wurden Endothelzellen mit CD154-exprimierenden P3xTB.A7-Myelomzellen kokultiviert. Dafür wurden jeweils 1×10^6 P3xTB.A7-Zellen in 1ml M199 mit Zusätzen aufgenommen und für 20 Minuten bis 24 Stunden den Endothelzellen bei 37 °C und 5% CO₂ hinzugefügt. Um zu zeigen, dass es sich um eine spezifische CD154-induzierte CD40-Aktivierung handelte, wurde ein neutralisierender Antikörper gegen CD154 eingesetzt (Trap-1, 40 µg/ml; Henn et al. 1998).

Nach der Stimulation wurden die Myelomzellen mit Hilfe einer Pipette und 37 °C warmen HEPES-Tyrode unter mikroskopischer Kontrolle nahezu vollständig von den Endothelzellen heruntergespült.

2.2.7 Zyklische Dehnung von HUVEC

Das FlexCell-System (FlexCell International Corp., Hillsborough, USA) wurde eingesetzt, um *in vitro* die lokale Aufdehnung der Gefäßwand zu simulieren und die Endothelzellen unter den dabei entstehenden Stressbedingungen zu untersuchen.

HUVECs wurden dazu auf speziellen FlexCell-Platten (FlexCell International Corp., Hillsborough, USA), auf einer Kautschukmembran kultiviert. Für die Versuche wurden die Platten in die FlexCell-Dehnungsapparatur eingesetzt und mit Hilfe einer Vakuumpumpe für die vorgesehenen Zeitspannen (3-16 Stunden) bei 16% Elongation und einer Frequenz von 0,5 Hz gedehnt. Das Einsetzen von Hartplastikscheiben in den unteren Teil der Wells vermied die Dehnung der Zellen, die als ungedehnte Kontrollen dienten.

2.2.8 Zytokin-Stimulation der Zellen

Soweit nicht anders erwähnt, wurden die HUVECs und THP-1-Monozyten standardisiert durch Zugabe von IFN- γ (1000 U/ml Medium) in Kombination mit TNF- α (100 U/ml Medium) (beide R&D Systems, Wiesbaden) zum Kultivierungsmedium stimuliert.

2.2.9 Nachweis einer CD40-Tyrosin-Nitrierung in der Zellkultur

Um membranständiges CD40 von HUVECs bzw. THP-1 Monozyten an seinen Tyrosinresten zu nitrieren, wurden die Zellen entweder für 3 bzw. 6 Stunden mit 5 mM des Peroxynitritdonors SIN-1, oder für eine Stunde mit exogenem Peroxynitrit (ONOO⁻, 160-200 μ M final) behandelt. Durch die Vorinkubation der Zellen mit den Peroxynitritscavengern Urat (10 μ M, 30 Minuten) und FeTPPs (100 μ M, 1 Stunde) wurde die Selektivität der Tyrosinnitrierung durch ONOO⁻ überprüft.

2.2.10 Inkubation der Endothelzellen mit Inhibitoren gegen verschiedene Proteinabbauwege

HUVECs wurden nach unten aufgeführter Tabelle mit den einzelnen Inhibitoren vorbehandelt, bevor sie anschließend zyklisch gedehnt wurden (siehe Kapitel 2.2.7) oder eine Behandlung mit ONOO⁻ (siehe Kapitel 2.2.9) stattfand.

Tabelle 2: Inhibitoren

Inhibitor	Eingesetzte Konzentration	Inkubationszeit	Zielkompartiment
Ca-074-Me	50 μ M	30 Minuten	Cathepsin B
Chymostatin	100 μ M	30 Minuten	Serin und Cystein-Proteasen A, B, D, G; Chymotrypsin, Papain, Cathepsin A, B, C
Epoxomicin	10 μ M	30 Minuten	Chymotrypsin-ähnliche Aktivität des 20S-Proteasoms
Iodoacetamid	10 mM	30 Minuten	Cathepsin B, C, Cystein-Proteasen
Lactacystin	50 μ M	30 Minuten	Chymotrypsin-ähnliche, Trypsin-ähnliche, Caspase-ähnliche Aktivität des Proteasoms, katalytische Untereinheiten des 26S-Proteasoms
Leu-Ala	2 mM	30 Minuten	Ubiquitin-Ligase
MG-132	10 μ M	30 Minuten	Chymotrypsin-ähnliche, Trypsin-ähnliche, Caspase-ähnliche Aktivität des Proteasoms, Cathepsin A, B, C, Cystein-Proteasen, Calpaine,

2.2.11 mRNA-Isolierung

Gesamt-RNA wurde mittels des RNeasy Total RNA Isolation Kit (Qiagen, Hilden) entsprechend den Angaben des Herstellers isoliert. Dabei wurden die Zellen direkt in den 6-Lochplatten in 350 μ l Lysepuffer mit 0,1% β -Mercaptoethanol lysiert und mikroskopisch kontrolliert. Die Proben wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und für 1 Minute kräftig gevortext. Anschließend wurden die homogenisierten Proben mit dem äquivalenten Volumen 70% Ethanol gemischt und auf die im Kit enthaltenen RNA-bindenden Säulen gegeben, an

deren Silica-Gel-Matrix die RNA-Moleküle gebunden wurden. Die anderen Bestandteile der Lysate wurden durch Zentrifugation bei 8000 x g für 15 s und durch Waschen mit im Kit enthaltenen Waschpuffern entfernt. Die Elution der RNA erfolgte in 30 µl RNase-freiem Wasser mit einer abschließenden Zentrifugation bei 8000 x g für 1 Minute. Mittels dieser Methode können RNA-Moleküle, die mindestens 200 bp groß sind, isoliert werden. Die kleineren tRNAs und rRNAs werden mit den anderen Bestandteilen von der Matrix gewaschen.

Zuletzt wurde die Konzentration der isolierten RNA photometrisch mit dem NanoDrop (Peqlab, Erlangen) bestimmt. Die in den Proben enthaltene RNA-Konzentration wurde vom Photometer in µg/µl angegeben. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -80 °C gelagert.

2.2.12 Reverse Transkription

Mit Hilfe der reversen Transkriptasen Omniscript bzw. Sensiscript (Qiagen) wurde die isolierte RNA in einzelsträngige, komplementäre cDNA umgeschrieben. Während der reversen Transkription wurden Oligo-dT-Primer eingesetzt, die sich an den Poly-A-Schwanz der mRNA anlagern. Die RT-Ansätze wurden auf Eis entsprechend dem folgenden Pipettierschema gemischt, anschließend für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert und konnten anschließend bei -20 °C gelagert werden.

	<u>Menge</u>	<u>Endkonzentration</u>
10 x RT-Puffer	2 µl	1 x
dNTPs, 5 mM pro dNTP	2 µl	0,5 mM pro dNTP
Oligo-dT-Primer, 10 µM	0,2 µl	0,2 µM
RNase-Inhibitor, 10 U/ml	1 µl	0,5 U/µl
Omniscript Reverse Transcriptase, 4 U/ml	1 µl	0,2 U/µl
H ₂ O _{bidest}	ad 20 µl	

2.2.13 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion wurde zur Amplifizierung spezifischer cDNA-Sequenzen mit Hilfe spezifischer Primerpaare benutzt.

Das Prinzip der Polymerasekettenreaktion beruht auf der zyklischen Wiederholung dreier Reaktionsschritte: Zunächst wird die eingesetzte cDNA durch Erhitzen denaturiert. Darauf folgt das Anlagern der spezifischen Primer an die einzelsträngige DNA und zuletzt, durch die

Anwesenheit des Enzyms Taq-Polymerase, die Rekrutierung von dNTPs und die Bildung von komplementären DNA-Strängen.

Um auszuschließen, dass das Ergebnis der Analyse durch unterschiedliche cDNA-Mengen in den Proben verfälscht wird, wurde für die Verrechnung und statistische Auswertung das nicht regulierte Housekeeping-Gen RPL-32 gemessen.

Bei jeder PCR wurde parallel eine Negativkontrolle angesetzt, in der statt cDNA H_2O_{bidest} enthalten war. Die Reaktionsgemische waren in einem Gesamtvolumen von 50 μ l nach folgenden Pipettierschema angesetzt.

	<u>Menge</u>	<u>Endkonzentration</u>
10 x PCR-Puffer	5 μ l	1 x
dNTPs	1 μ l	0,2 μ M
Primer forward (10 μ M)	2 μ l	0,4 μ M
Primer reverse (10 μ M)	2 μ l	0,4 μ M
Taq Polymerase	0,2 μ l	
cDNA	2 μ l	40 ng/ μ l
H_2O_{bidest}	ad 50 μ l	

2.2.14 Quantitative PCR (Light Cycler)

Die Polymerasekettenreaktion mit dem Light Cycler® (Roche, Mannheim) wurde für eine relative Quantifizierung der Amplifizierung spezifischer cDNA-Sequenzen benutzt.

Bei der Light Cycler© PCR wird der DNA-Gehalt am Ende jedes Amplifikationszyklus durch einen an doppelsträngige DNA bindenden Fluoreszenzfarbstoff gemessen. Die ursprüngliche Menge an cDNA in den Proben wird anhand der Zyklen bis zum Erreichen des Schwellenwerts, der für eine Detektion des PCR-Produktes über den Fluoreszenzhintergrund hinaus notwendig ist, quantifiziert. Die Anzahl der Zyklen beim Erreichen des Schwellenwerts wird als „Crossing Point“ (CP) bezeichnet. Je niedriger der CP ist, desto höher war die Ausgangskonzentration der in cDNA umgeschriebenen Ziel-mRNA der einzelnen Proben. Um Unterschiede bei der Menge der eingesetzten cDNA auszugleichen, wurde das Verhältnis der eigentlichen Proben zu einer internen Kontrolle ins Verhältnis mit den Werten des Housekeeping-Gens RPL derselben Proben gesetzt.

$$\text{Verhältnis} = (E_{\text{Probe}})^{\Delta CP_{\text{Probe}}(\text{Kontrolle-Probe})} / (E_{\text{RPL}})^{\Delta CP_{\text{RPL}}(\text{Kontrolle-Probe})}$$

(Pfaffl, 2001). E ist hierbei die Effizienz der PCR und wurde 2 gesetzt.

Für die PCR-Reaktionen wurden Primer, H₂O, Quantitect SYBR Green Fast Start-Reaktionsmix (Qiagen; Hilden) wie unten angegeben angesetzt. Die Primer wurden standardisiert in einer Endkonzentration von 0,2 µM eingesetzt. Der Mastermix für jede Reaktion wurde zusammen mit dem Template in eine Glaskapillare (Roche) gegeben. Diese wurde für 30 Sekunden bei 1000 x g zentrifugiert und in das LC-Karussell gestellt. Im Anschluss an die PCR wurden die Reaktionsansätze aus den Glaskapillaren durch Zentrifugation isoliert und die Größe und Menge der PCR-Produkte auf einem Agarosegel kontrolliert.

Reaktionsansatz

1 µl cDNA

1 µl Primer forward

1 µl Primer reverse

7 µl H₂O

10 µl Quantitect-Reaktionsmix

Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Dafür wurden jeweils 10 µl der Proben mit 10 x Ladebuffer (siehe unten) vermischt und in einem 2%-igen Agarosegel in TBE-Puffer mit 1 µg/ml Ethidiumbromid analysiert. Zur Größenbestimmung der PCR-Produkte wurde zusätzlich ein Größenstandard mit aufgetrennt. Die Banden wurden mit Hilfe des Videodokumentationssystems (Gel-Doc 2000, Biorad, München) und der Biorad Quanti One-Software (Biorad) quantifiziert.

2.2.15 Herstellung von Gesamtproteinlysaten

In den Versuchen behandelte HUVECs wurden zweimal mit HANKS gewaschen bevor sie abgeschabt und in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt wurden. Die THP-1-Zellen wurden bei 4 °C und 2000 x g für 5 Minuten abzentrifugiert und zweimal in HANKS gewaschen. Nach einem anschließenden Zentrifugationsschritt für 5 Minuten bei 2000 x g und 4 °C wurden die Zellpellets in flüssigem Stickstoff eingefroren und entweder bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert, oder direkt aufgearbeitet.

Nach Zugabe von 10 µl sterilem H₂O zu jedem gefrorenen Pellet fand der Zellaufschluss durch wiederholtes Auftauen bei 37 °C, gefolgt von kräftigem Vortexen und erneutem Einfrieren in flüssigem Stickstoff statt. Insgesamt wurde die Prozedur 5 x wiederholt. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Probenvolumina, und die Zugabe der äquivalenten

Menge an 2 x Homogenisierungspuffer I. Der nach einer darauf folgenden Zentrifugation (2000 x g, 5 Minuten, 4 °C) gewonnene Überstand stellte das Gesamtzelllysat dar. Von den Doppeltansätzen wurde jeweils einer als Gesamtlysat bei -80 °C gelagert, während der andere für die Generierung von zytosolischen und mikrosomalen Fraktionen verwendet wurde.

Die Bestimmung der Proteinmengen in den einzelnen Proben erfolgte photometrisch nach der Micro-Lowry-Methode (siehe Kapitel 2.2.16). Die Proben wurden mit 1x SDS-Probenpuffer (Roth), dem Bromphenolblau zugesetzt war, vermischt und weiter nach der Western Blot Methode analysiert.

1 x Homogenisierungspuffer I

50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1,15% (w/v) KCl, 1 mM EDTA, 5 mM Glucose, 0,1 mM DTT, 2 mg/l Leupeptin, 2 mg/l Pepstatin A, 10 mg/l Trypsin-Inhibitor, 0,04 µg/l Pefabloc

2.2.16 Proteinbestimmung nach Micro Lowry

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen in Proteinlysaten erfolgte mit Hilfe eines Kits (Total Protein Kit, Micro Lowry, Peterson's Modification, Sigma), dem alle benötigten Substanzen beigelegt waren. Zunächst wurde der BSA-Standard in 1% Glycin-PBS gelöst und auf folgende Konzentrationen eingestellt: 12,5, 25, 50, 100 µg/µl. In eine 96-Loch-Platte wurden anschließend je 100 µl der Standards und Proben (1:100 in 1% Glycin-PBS vorverdünnt) als Doppeltansatz vorgelegt. Als Blankwert diente 1% Glycin-PBS. Zu den Proben wurden 100 µl Lowry-Reagenz gegeben und die Platte für 20 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach der Zugabe von 50 µl Folin-Reagenz pro Vertiefung und einer Inkubation bei RT für 30 Minuten erfolgte die photometrische Bestimmung des Farbumschlags bei 500 nm mit einer λ -Korrektur bei 800 nm.

2.2.17 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde in einer Vertikalelektrophoresekammer (Mini-Protean III; Biorad, München) durchgeführt. Für das Gel wurde zunächst ein 10%-iges Trenngel in eine Gießapparatur gegossen und zur vollständigen Polymerisation mit Butanol überschichtet. Danach wurde das Butanol abgegossen und die Trenngeloberfläche gründlich mit H₂O_{bidest} gespült. Letztlich erfolgte die Überschichtung mit einem 5%-igen Sammelgel, in das ein Probenkamm gesteckt wurde.

Das fertige Gel wurde in die Gelkammer eingebaut, die mit 1 x SDS-Laufpuffer gefüllt wurde. Nach dem Entfernen des Probenkamms wurden die Taschen mit Hilfe einer Eppendorf-

Pipette gespült. Parallel zu den Proteinproben (siehe Kapitel 2.2.9) wurde ein vorgefärbter Protein Marker (Biorad) im Gel aufgetrennt.

Die SDS-PAGE wurde konstant mit einer Stromstärke von 25 mA durchgeführt, bis die Bromphenolblaufront gerade aus dem Gelende gelaufen war.

Trenngel (10% Acrylamid)

0,375 M Tris-HCl, pH 8.8, 0,2% SDS, 10% Acrylamid/ 0,3% Bisacrylamid, 0,04% Ammoniumpersulfat (APS), 0,02% Tetramethylethyldiamin (TEMED)

Sammelgel (5% Acrylamid)

0,125 M Tris-HCl, pH 6.8, 0,2% SDS, 5% Acrylamid/ 0,13% Bisacrylamid, 0,04% Ammoniumpersulfat, 0,04% Tetramethylethyldiamin

1 x SDS-Laufpuffer

25 mM Tris-HCl, pH 8.3, 192 mM Glycin, 0,1% SDS

2 x SDS-Probenpuffer

125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 20% Glycerin, 65 mM Dithiothreitol (DTT), 0,002% Bromphenolblau (BPB)

2.2.18 Western Blot und Immunfärbung

Der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran (Imobilon-P, Millipore, USA) wurde nach der Tankblot-Methode durchgeführt. Zunächst wurde die hydrophobe Membran für 10 Minuten in Methanol und zweimal 10 Minuten in Reinstwasser geschwenkt. Der Transfer fand in einer mit gekühltem Transferpuffer gefüllten Transblot-Kammer (Mini-Protean[®] 3-Cell, Bio-Rad, München) für 60 Minuten bei 350 mA statt. Nachfolgend wurde die Membran zur Kontrolle des Transfers mit Ponceau-S-Lösung (Sigma-Aldrich, Hamburg) angefärbt. Nachdem dieses durch 10 Minuten waschen in TBS-Puffer entfernt worden war, erfolgte die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen durch eine 1-stündige Inkubation bei RT mit 5% (w/v) Magermilchpulver oder 5% BSA in TBST-Puffer. Die Inkubation mit den verschiedenen Primärantikörpern, die in den entsprechenden Blockierlösungen verdünnt waren, wurde für 2 Stunden bei RT durchgeführt. Anschließend folgten zwei Waschschrte bei RT in TBST-Puffer und ein Waschschrte in TBS (jeweils 10 Minuten), bevor die Membran für 1 Stunde bei RT mit dem jeweiligen Peroxidase-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert wurde. Drei weitere Waschschrte mit TBST/TBS-Puffer folgten (wie oben beschrieben), bevor die Membran für 5 Minuten mit Amersham[™]-ECL Plus Western Blotting Detection System-Substrat (GE-Healthcare, UK) benetzt wurde. Die

Aufnahme der Chemilumineszenz erfolgte mit Hilfe der ChemiDoc XRS-Geldokumentationsstation (BioRad) und der Quantity One-Software (BioRad).

Für Mehrfachfärbungen der Membranen wurde der vorherige Antikörper mit 0,2 M NaOH (10 Minuten, RT) von dem Blot abgelöst und der Färbeprozess wie oben beschrieben mit den neuen Antikörpern durchgeführt. Als interner Standard zur Kontrolle der eingesetzten Proteinmengen diente der Nachweis von β -Aktin. Die Banden der entwickelten Western-Blots wurden mit der Quantity One-Software (BioRad, München) densitometrisch analysiert. Die verwendeten Antikörper mit den entsprechenden Verdünnungen und den zugehörigen Sekundärantikörpern sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3: Primäre und sekundäre Antikörper für Western Blot und Verdünnungen

Primär-Antikörper	Verdünnung	Sekundär-Antikörper	Verdünnung
Kaninchen-anti-CD40 (C-20)	1:1000	Ziege-anti-Kaninchen-IgG	1:5000
Kaninchen-anti-CD40 (N-16)	1:1000	Ziege-anti-Kaninchen-IgG	1:5000
Maus-anti- β -Aktin	1:5000	Ziege-anti-Maus-IgG	1:5000
Maus-anti-Nitrotyrosin	1:500	Ziege-anti-Maus-IgG	1:5000
Kaninchen-anti-Nitrotyrosin	1:500	Ziege-anti-Kaninchen-IgG	1:5000
Maus-anti-TRAF2	1:1000	Ziege-anti-Maus-IgG	1:5000
Kaninchen-anti-Proteasome 20S alpha + beta	1:1000	Ziege-anti-Kaninchen-IgG	1:5000
Maus-anti-Ubiquitin	1:500	Ziege-anti-Maus-IgG	1:5000
Maus-anti-HSP-70	1:500	Ziege-anti-Maus-IgG	1:5000
Kaninchen-anti-TRAF6	1:1000	Ziege-anti-Kaninchen-IgG	1:5000

Transferpuffer für PVDF 5x:

30 g Tris, 144 g Glycin, ad 2 l H₂O_{bidest}, pH 8,3 (einstellen mit 5 M HCl)

TBS:

50 mM Tris-HCl, pH 7,6, 0,15 M NaCl, ad 2 l H₂O_{bidest}

TBST:

50 mM Tris-HCl, pH 7,6, 0,15 M NaCl, 0,05% Tween-20, ad 2 l H₂O_{bidest}

2.2.19 Differentielle Zentrifugation und subzelluläre Fraktionierung

Für die Herstellung subzellulärer Fraktionen mittels differentieller Zentrifugation wurden HUVECs in 96 mm-Zellkulturschalen kultiviert und wie in Kapitel 2.2.8 beschrieben mit Zytokinen stimuliert, mit ONOO⁻ (siehe Kapitel 2.2.9) behandelt und geerntet. Die Gesamtzelllysate wurden wie in Kapitel 2.2.15 beschrieben, hergestellt. Vom Überstand wurde ein Aliquot von 30 µl entnommen und bei -80 °C gelagert. Die verbleibenden Lysate wurden bei 10000 x g, 4 °C für 20 Minuten zentrifugiert. Der so erhaltene Überstand enthielt die zytoplasmatischen Proteine. Das Pellet wurde in 50 µl 1 x Homogenisierungspuffer I aufgenommen und stellte die mikrosomale Fraktion dar. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Homogenisierungspuffer I

50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 1,15% (w/v) KCl, 1 mM EDTA, 5 mM Glucose, 0,1 mM DTT, 2 mg/l Leupeptin, 2 mg/l Pepstatin A, 10 mg/l Trypsin-Inhibitor, 44 mg/l Pefabloc

2.2.20 Herstellung von Kernextrakten

Um ein Vorhandensein von CD40 im Nukleus von HUVEC nachzuweisen, wurden Kernextrakte von Endothelzellen hergestellt und im Western Blot analysiert. Dazu wurden HUVECs mit Zytokinen (siehe Kapitel 2.2.8) stimuliert, oder mit CD154-exprimierenden Myelomzellen (siehe Kapitel 2.2.6) kokultiviert. Nach gründlichen Waschen (2 x 5 Minuten HEPES-Tyrode, 37 °C, pH 7,5) wurden die Zellen abgeschabt und für 5 Minuten bei 1000 x g und 4 °C zentrifugiert. Das so gewonnene Zellpellet wurde mit Hilfe einer Pipette vorsichtig in Puffer A resuspendiert, wobei Luftblasen vermieden wurden, und 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellmembran wurde durch von 10%-igem IGEPAL gefolgt von kräftigen vortexen für 10 Sekunden aufgelöst. Nach einer erneuten Zentrifugation für 5 Minuten bei 1000 x g und 4 °C wurde der Überstand (= Zytosol) in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert. Das Kernpellet wurde in Puffer B resuspendiert, für 15 Minuten auf Eis inkubiert wurde und alle 1-2 Minuten gevortext. Nach einer abschließenden Zentrifugation bei 10000 x g und 4 °C für 5 Minuten wurde der Überstand (=Kernextrakt) in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

Stammlösung Puffer A

10 mM HEPES pH 7,9, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 0,1 mM EGTA, ad H₂O_{bidest}

Puffer A

Stammlösung A, 1mM DTT 1 mg/ml Pefabloc, 0,1 mg/ml Pepstatin A, 0,1 mg/ml Leupeptin

Stammlösung Puffer B

10 mM HEPES pH 7,9, 0,4 M NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, ad H₂O_{bidest}

Puffer B

Stammlösung B, 1mM DTT 1 mg/ml Pefabloc, 0,1 mg/ml Pepstatin A, 0,1 mg/ml Leupeptin

2.2.21 Immunpräzipitation (IP)

Zur Isolierung von CD40 und assoziierten Proteinen aus Gesamtzelllysaten wurden zunächst primäre HUVEC in 6-Loch-Platten bis zur Konfluenz kultiviert. Zum Nachweis einer Traf-Rekrutierung an den CD40-Rezeptor wurden die Zellen für 10 Minuten mit 160-200 μ M ONOO⁻ vorbehandelt, bevor sie für 20 bzw. 40 Minuten mit CD154-positiven Myelomzellen kokultiviert wurden. Die Myelomzellen wurden vorsichtig mit vorgewärmten HANKs abgespült und 300 μ l RIPA-Lysepuffer (Sigma, mit Proteaseinhibitoren) direkt auf die HUVECs gegeben. Die Zellyse erfolgte für 10 Minuten im Kühlschrank. Nachdem die Zellysate mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der Kulturschalen abgekratzt und in ein Reaktionsgefäß überführt worden waren, wurden sie zum endgültigen Aufschluss 10 x mit einer Spritze auf- und abgezogen. Darauf folgte ein 5-minütiger Zentrifugationsschritt bei 10000 x g und einer Temperatur von 4 °C. Von den Überständen wurde, wie in 2.2.8 beschrieben, die Proteinkonzentration mittels Micro Lowry bestimmt. Da nach einer Immunpräzipitation eine Normalisierung mittels eines Housekeeping-Proteins nicht möglich ist, müssen die zur IP eingesetzten Proteinmengen gleich sein. Zu den eingestellten Proben wurden zur Vorreinigung 5 μ l Preclearing-Matrix-E (Exacta Cruz, Santa Cruz) pro 100 μ l Probenvolumen gegeben und für 1 Stunde bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Zeitgleich erfolgte die Kopplung des gegen CD40 gerichteten monoklonalen Antikörpers (MC1590) an die IP-Matrix-E (Exacta Cruz, Santa Cruz). Dazu wurden 5 μ l Antikörperlösung (0,2 mg in 100 μ l) mit 50 μ l IP-Matrix-E für 1 Stunde bei 4 °C auf dem Drehrad inkubiert. Auf die Kopplung folgten zwei Waschschrte in PBS, zwischen denen die IP-Matrix-E jeweils für 30 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert wurde. Die Proteinproben wurden nach der Vorreinigung ebenfalls für 30 Sekunden bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und der Probenüberstand mit der Antikörper-gekoppelten IP-Matrix-E vereinigt. Um die Bindung des Antikörpers an CD40 zu ermöglichen, inkubierten die Proben über Nacht bei 4 °C auf dem Drehrad. Bevor die Antigen-Antikörper-IP-Matrix-Komplexe in 1 x

SDS-Probenpuffer (Roth) aufgenommen und denaturiert wurden, fanden zwei Waschschriffe mit PBS statt. Zuletzt wurden 20 µl der denaturierten Proben auf eine 10%ige-SDS-PAGE aufgetragen und mittels Western Blot-Analyse untersucht.

2.2.22 Dynalbead-Immunpräzipitation

Um die Tyrosinnitrierung von CD40 nachzuweisen, wurde natives Protein mittels Dynalbead-Immunpräzipitation (IP) aus HUVEC-Gesamtzelllysaten (vgl. Kapitel 2.2.15) isoliert. Um größere Mengen von CD40-Protein isolieren zu können, wurden die Gesamtlysate von insgesamt 10 100 mm-Zellkulturschalen primärer HUVECs vereinigt.

Für die Kopplung des gegen CD40 gerichteten monoklonalen Antikörpers (MC159) an die Protein-G-markierten Dynalbeads wurden zunächst 50 µl Dynalbead-Lösung pro 300 µg Gesamtprotein in Citrat-Phosphat-Puffer (pH 5.0) zweimal gewaschen, wobei die Beads zwischen den Waschschriffen mittels eines Magneten im Reaktionsgefäß behalten wurden. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100 µl Antikörperlösung (2 µg pro 300 µg Protein) zu den Dynalbeads und ein Inkubationsschritt für 45 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Drehrad. Nach zwei Waschschriffen in Citrat-Phosphat-Puffer (pH 5.0) erfolgte die Quervernetzung der Dynalbead-Protein-G-Antikörper-Komplexe. Dazu wurden die Komplexe erst zweimal in 0,2 M Triethanolamin (pH 8.2.) gewaschen, bevor sie für 30 Minuten bei RT in 1 ml 20 mM DMP in Triethanolamin (pH 8.2) geschüttelt wurden. Die Reaktion wurde durch Inkubation der Bead-Antikörperkomplexe in 50 mM Tris (pH 7.5) für 15 Minuten bei Raumtemperatur abgestoppt. Nach drei Waschschriffen in 1ml PBS/ 0,1% Tween-20 erfolgte die Zugabe der Gesamtproteinlysate und eine Inkubation für 60 Minuten bei 4 °C auf dem Drehrad. Nach erneutem dreimaligem Waschen der Protein-Antikörper-Dynalbeadkomplexe mit PBS fand zuletzt die Elution des nativen CD40-Proteins aus den Komplexen statt. Dazu wurden die gewaschenen Komplexe für 5 Minuten auf Eis in 100 µl Elutionspuffer (pH 2.0-3.0) inkubiert. Nach Überführen der Überstände in ein neues Reaktionsgefäß wurde der pH-Wert der Lösung durch 50 µl Homopuffer (pH 11.0) neutralisiert. Die Proteinkonzentration des Eluats wurde nach der Micro-Lowry-Methode (siehe Kapitel 2.2.16) bestimmt. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert, bevor sie für Nitrierungsversuche eingesetzt wurden.

Waschpuffer: Citrat-Phosphat-Puffer (pH 5.0)

4,7 g Zitronensäure, 9,2 g Zweibasisches Natriumphosphat (Na₂HPO₄) Dehydrat, ad 1 l

H₂O_{bidest}

Elutionspuffer

0,1 M Citrat (pH 2-3)

Cross-linking-Puffer und Reagenzien

0,2 M Triethanolamin (pH8.2)

20 mM DMP in 0,2 M Triethanolamin (pH 8.2), Frisch ansetzen!

50 mM Tris (pH 7.5)

0,1% Tween-20 in PBS

Immunpräzipitationspuffer

PBS

2.2.23 Isolierung von nativem CD40 mittels Blau-Nativ-PAGE (BN-PAGE, nach Schägger und von Jagow, 1991, modifiziert)

Im Gegensatz zur SDS-PAGE werden die Proteine über die Blau-Nativ-PAGE (BN-PAGE) nach Schägger und von Jagow (1991) in ihrem nativen Zustand aufgetrennt, d.h., neben ihrem Molekulargewicht spielt auch ihre Konformation eine Rolle. Als Detergenzersatz wird der anionische Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau G-250 verwendet. Die BN-PAGE wurde zur Isolierung von nativem CD40 Protein aus Gesamtzelllysaten kultivierter Endothelzellen und dem nachfolgenden Nachweis einer Tyrosinnitrierung verwendet. HUVECs wurden in 100 mm-Schalen bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert und Gesamtzelllysate, wie in Kapitel 2.2.15 beschrieben, hergestellt. Die Proteinkonzentrationsbestimmung erfolgte nach der Micro Lowry Methode. Jeweils 15 µg Gesamtprotein wurden mit 5 µl Auftragspuffer vermischt und auf die PAGE aufgetragen. Der Einlauf ins Sammelgel erfolgte bei 100 V und bei Erreichen der Trenngelgrenze wurde die Spannung auf 200 V erhöht. Die Elektrophorese fand unter Kühlung statt. Nach Ende der Elektrophorese wurden die Banden um 50 kDa, deren Größe anhand eines nativen Proteinstandards (Invitrogen) bestimmt werden konnte, aus dem Gel ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt. Zu den Gelstreifen wurden 200 µl H₂O pipettiert. Es folgte eine Inkubation bei 4 °C über Nacht. Während dieses Schrittes diffundierten die Proteine aus dem Gel in das Wasser. Nachdem die Gelreste kurz abzentrifugiert worden waren, wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Der Nachweis der Tyrosinnitrierung erfolgte wie in Kapitel 2.2.24 beschrieben.

3x-Gelpuffer Sammelgel

150 mM Bis-Tris, 600 mM ε-Aminocaprinsäure, pH 7.0 mit HCl einstellen, steril filtrieren

3x-Gelpuffer Trenngel

150 mM Bis-Tris, 600 mM ϵ -Aminocapronsäure, 60% (w/v) Glycerin, pH 7.0 mit HCl einstellen, steril filtrieren

Anodenpuffer

50 mM Bis-Tris, pH 7.0 mit HCl einstellen

BN-Kathodenpuffer

50 mM Tricin, 15 mM Bis-Tris, 0,002% (w/v) CBB G-250, pH 7.0 stellt sich ein

Auftragspuffer

5% (w/v) CBB G-250, 500 mM ϵ -Aminocapronsäure, 50 mM Bis-Tris, pH 7.0 stellt sich ein

2.2.24 Nitrierungsassay CD40

Das über die BN-PAGE oder durch Dynalbead-Immunpräzipitation isolierte native CD40 Protein wurde für eine *in vitro*-Nitrierung verwendet. Dazu wurden jeweils 5 μ g CD40 in 19 μ l Puffer A aufgenommen. Für die Tyrosinnitrierung, wurden je 1 μ l verschieden konzentrierter Stammlösungen des Peroxynitritdonors SIN-1 (2 mM, 10 mM, 20 mM, 40 mM) bzw. einer 160-200 mM ONOO⁻-Stammlösung zu der Probe pipettiert und der Reaktionsansatz für 1 Stunde bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 5 μ l 4 x SDS-Probenpuffer vermischt und bei 94 °C für 5 Minuten denaturiert, bevor sie auf eine 10% SDS-PAGE (siehe Kapitel 2.2.17) aufgetragen wurden. Die Tyrosinnitrierung wurde anschließend im Western Blot mit spezifischen Nitrotyrosin-Antikörpern (Upstate) untersucht. Als Kontrolle wurden 5 μ g unbehandeltes CD40, wie oben beschrieben, in Puffer A aufgenommen und für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Um die Spezifität des Antikörpers zu überprüfen, wurden die geblotteten PVDF-Membranen für 5 Minuten in 100 mM Natrium-Dithionit in TBS inkubiert, was zu einer Reduktion Nitrogruppe führte und die Färbung komplett unterband.

Analog zu den Versuchen mit nativen CD40 wurden Nitrierungs-Experimente durchgeführt, bei denen eine rekombinante CD40-Fc-Chimäre eingesetzt wurde.

Puffer A

100 mM KH₂PO₄, 0,1 mM DTPA (Diethylenetriaminepentaacetic acid), 25 mM NaHCO₃

2.2.25 Proteasom-Assay

Um den Abbau von CD40 über das proteasomale System zu untersuchen, wurde natives CD40 wie in Kapitel 2.2.24 beschrieben mit ONOO⁻ inkubiert und anschließend für 2 Stunden mit 0,1 mg/ml rekombinanten 26S-Proteasom oder für 10, 20, 30 Minuten und 2 Stunden mit

0,1 mg/ml rekombinanten 20S-Proteasom bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert und anschließend mit Hilfe der Western Blot-Methode analysiert.

2.2.26 Biotin-Trypsin-Endozytose-Assay

Zum Nachweis einer möglichen Internalisierung von Tyrosin-nitriertem CD40 wurden HUVECs in 6-Loch-Schalen bis zur Konfluenz kultiviert. Um die Oberflächenmoleküle der Zellen zu biotinylieren, wurden die Zellen nach dreimaligem Waschen in sterilem HEPES-Tyrode mit 0,5 mg/ml Biotin-N-Hydroxysuccinimide (Biotin-NHS, Fluka) für 45 Minuten bei 37 °C inkubiert. Darauf folgten drei Waschschrte in HEPES-Tyrode, bevor die Zellen mit 160-200µl ONOO⁻ für 60 Minuten behandelt wurden. Die Oberflächenproteine wurden im Anschluss an zwei Waschschrte mit HEPES-Tyrode durch die Zugabe von 1ml pro Vertiefung 0,25% Trypsin, 1 M EDTA in HEPES-Tyrode für 30 Minuten auf Eis verdaut. Nach erneuten Waschen (3 x in HEPES-Tyrode) wurden wie in Kapitel 2.2.15 beschrieben Gesamzelllysate hergestellt, aus denen, wie in Kapitel 2.2.21 erläutert, CD40 mittels Immunpräzipitation isoliert wurde.

2.2.27 Ubiquitin-Konjugations-Assay CD40

Um eine mögliche Ubiquitinierung von CD40 nachzuweisen, wurden HUVECs in 60 mm-Kulturschalen bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert und wie in Kapitel 2.2.8 beschrieben mit Zytokinen stimuliert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit vorgewärmter HANKS-Lösung wurden 500 µl RIPA-Lysepuffer (Sigma) direkt auf die Zellen gegeben. Die Zelllyse erfolgte für 10 Minuten bei 4 °C. Um eine vorzeitige Degradierung von ubiquitinyliertem CD40 zu verhindern, enthielt der RIPA-Lysepuffer neben Proteaseinhibitoren (2 mg/l Pepstain A, 2 mg/l Leupeptin, 44 mg/l Pefabloc) auch 10 mM Iodoacteamid, 2 mM Methylmaleimid und 5 µM Ubiquitin-Aldehyd.

Die Zelllysate wurden in ein Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration mittels der Micro Lowry Methode bestimmt. Die Proben wurden auf vier Ansätze mit gleichen Proteinmengen verteilt. Da die Ubiquitinierung von Proteinen ein ATP-abhängiger Prozess ist, wurden zu zwei Proben 5 mM ATP hinzugegeben. Zu jeweils einer Probe mit und ohne ATP wurden 10 µg Ubiquitin pipettiert und die Ansätze anschließend für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Weiterhin erfolgte die Immunpräzipitation von CD40 aus den Ansätzen nach Kapitel 2.2.21.

2.2.28 Nachweis der CD40-Ubiquitinierung

Das UbiQuaptureQ-Kits (Biomol) ermöglicht die Isolierung von ubiquitinierten Proteinen. Die im Kit enthaltene UbiQuaptureQ-Matrix bindet dabei die Ubiquitinreste ubiquitinerter Proteine, unabhängig davon, ob es sich um eine Mono- oder Polyubiquitinierung handelt. Alle benötigten Substanzen, sowie der für die Western Blot-Analyse verwendete Antikörper und eine Positiv-Kontrolle waren im Kit enthalten. Der Versuch wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Proteinlysate von gedehnten und ungedehnten HUVECs wurden wie in Kapitel 2.2.27 hergestellt und die Proteinkonzentration mittels Micro Lowry bestimmt. Pro Probe wie auch von der Positivkontrolle wurden jeweils 2 x 25 µg Gesamtprotein mit PBS, 10 mM Iodoacetamid, 10 mM Methylmaleimid auf ein Volumen von 100 µl eingestellt. Ein Ansatz wurde sofort mit 25 µl 4 x SDS-Probenpuffer vermischt, bei 94 °C für 5 Minuten denaturiert und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Dieses „Startmaterial“ diente zum Vergleich der Ausgangslysate mit den isolierten ubiquitinierten Proteinen.

Zu den anderen Proben wurden 40 µl UbiQuaptureQ-Matrix gegeben und die Ansätze über Nacht auf dem Drehrad bei 4 °C inkubiert und die Matrix anschließend durch Zentrifugation für 30 Sekunden bei 5000 x g pelletiert. Der gewonnene Überstand mit 25 µl 4 x SDS-Probenpuffer vermischt und bei 94 °C für 5 Minuten denaturiert. Die als „unbound fraction“ bezeichneten Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Die Matrix wurde zweimal in 200 µl Waschpuffer (180 µl PBS, 20 µl RIPA-Lysepuffer) gewaschen und zwischen den Waschschritten wie oben beschrieben durch Zentrifugation pelletiert. Der erste Waschpufferüberstand wurde als „Waschfraktion“ weiter verarbeitet. Die Elution der Ubiquitin-Protein-Komplexe erfolgte durch eine 15-minütige Inkubation bei 4 °C auf dem Drehrad in 80 µl PBS und 25 µl 4 x SDS-Probenpuffer und einer abschließenden Inkubation von 5 Minuten bei 94 °C. Diese letzte Fraktion, die „Eluted Fraction“, wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.29 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) – IL-12p40

Zum Nachweis der CD154-induzierten IL-12p40-Expression und -Freisetzung wurde das BD OptEIA Human IL-12(p40) Kit (Becton Dickinson, Heidelberg) eingesetzt. Alle verwendeten Substanzen waren im Kit enthalten und wurden vor Beginn des Versuchs auf Raumtemperatur erwärmt.

Zunächst wurden die lyophilisierten Standards in Standard/Sample-Verdünnungspuffer in einer Konzentration von 2000 pg/ml aufgelöst; diese Stammlösung diente als höchster Standard. Ausgehend davon wurden die Standards zu folgenden Konzentrationen verdünnt:

1000 pg/ml, 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml und 31,3 pg/ml. Anschließend wurde die benötigte Anzahl von Reaktionsvertiefungen, die bereits mit gegen IL-12p40 gerichtetem Antikörper beschichtet waren, in die Reaktionsplatte eingesetzt und in diese jeweils 50 µl ELISA-Verdünnungspuffer vorgelegt. Es folgte die Zugabe von je 100 µl Standards bzw. Probe als Doppeltansätze. Als Vergleichswert diente der Standard/Sample-Verdünnungspuffer. Nach einer Inkubation von 2 Stunden bei RT, während der die Bindung von IL-12p40 an die Antikörper stattfand, wurden die Wells geleert und 5 x mit 300 µl Waschpuffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift musste der Waschpuffer komplett entfernt werden, bevor die Zugabe von 100 µl Working Detektor (bestehend aus 125 µl Detektions-Antikörper und 0,5 µl Enzymkonzentrat) erfolgte. Die Platte wurde für 1 Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Reaktionsflüssigkeit vollständig entfernt und die Platte 7 x für 30 Sekunden mit 300 µl Waschpuffer pro Well gewaschen. Nachfolgend wurden die Vertiefungen mit je 100 µl TMB One-Step Substrat für 30 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert. Während dieser Zeit fand der enzymatische Farbumschlag in den Proben statt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl Stop-Lösung beendet und die Absorption bei einer Lichtwellenlänge von $\lambda = 450$ nm mit einer λ -Korrektur von 570 nm photometrisch bestimmt.

2.2.30 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) – IL-12p70

Zum Nachweis von IL-12p70 wurde das BD OptEIA Human IL-12(p70) Kit (Becton Dickinson, Heidelberg) verwendet. Die Durchführung erfolgte wie in Kapitel 2.2.29 beschrieben. Allerdings wurden die Proben bzw. Standards unverdünnt gemessen. Die Standards wurden ausgehend von einer 500 pg/ml-Stammlösung auf 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,3 pg/ml, 15,6 pg/ml und 7,8 pg/ml verdünnt.

2.2.31 Anfertigung von Paraffinschnitten

Zum Vergleich von CD40- und VCAM-1-Expression in venösen und arteriellen Endothelzellen *in situ* wurden zunächst die Nabelschnüre mit einem scharfen Skalpell in 1 mm dicke Scheiben geschnitten und in vorgewärmtem HEPES Tyrode gespült. Dabei wurden Blutreste entfernt und die Gefäßlumen möglichst weit geöffnet. Anschließend wurde je eine Scheibe in eine Vertiefung einer 12-Loch-Kulturplatte, die mit 3 ml M199-Medium mit 20% FKS, 1% Pen-Strep und 1 µg/ml ECGS gefüllt war, überführt. Ein Schnitt diente jeweils als unbehandelte Kontrolle, während die anderen durch Zugabe von 1000 U/ml IFN- γ bzw. 100 U/ml TNF- α oder mit einer Kombination aus beiden Zytokinen für 16 Stunden

stimuliert wurden. Zur Fixierung der Gewebeschnitte wurden diese anschließend jeweils einzeln in 10 ml Zink-Fixans überführt und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Zur Entwässerung der Proben wurden die einzelnen Schnitte in eine Einbettungskassette überführt und nacheinander jeweils 2 Stunden bei RT in 70% Ethanol, 85% Ethanol, 96% Ethanol und Isopropanol gelagert. Nach Abschluss der Alkoholreihe folgte ein Inkubationsschritt über Nacht in Low Melting Paraffin bei 65 °C. Die so entwässerten Proben wurden in Paraffin eingegossen. Nachdem die Paraffinblöcke abgekühlt und ausgehärtet waren, wurden am Mikrotom 5 µm dünne Schnitte angefertigt, die auf Objektträgern aufgenommen wurden und dort trockneten.

2.2.32 Immunhistologie

Die für die Immunhistologie angefertigten Präparate (siehe Kapitel 2.2.31) mussten vor Beginn der Färbung zunächst entparaffiniert werden. Dazu wurden sie in der absteigenden Alkoholreihe nacheinander je 5 Minuten in Xylol I, Xylol II, Isopropanol, 99% Ethanol, 85% Ethanol, 70% Ethanol und letztendlich für 5 Minuten in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ inkubiert. Unspezifische endogene Peroxydase-Aktivität wurde zunächst durch die Behandlung der Schnitte mit 3% H_2O_2 in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ blockiert. Hiernach wurden die Schnitte dreimal für je 5 Minuten in H_2O gespült, bevor die Gewebeschnitte auf den Objektträgern mit einem Fettstift eingekreist wurden. Auf die Gewebepräparate wurden jeweils 50 µl Blockierlösung pipettiert und für 30 Minuten in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Objektträger wurden vorsichtig abgetupft, wobei darauf geachtet wurde, dass die Schnitte nicht austrockneten. Anschließend folgte die Zugabe von 20 µl des Primärantikörpers in Blockierlösung (Antikörper mit Verdünnungen siehe Tabelle 4) und eine Inkubation (2 Stunden, RT) in einer feuchten Kammer. Nach dreimaligem Waschen in TBST für je 5 Minuten wurden abhängig vom Primärantikörper entweder 50 µl DAKO-Envision anti-Maus oder DAKO-Envision anti-Kaninchen (Dako, Dänemark) auf die Gewebeschnitte gegeben und wirkten für 30 Minuten bei RT ein. Nach drei weiteren Waschschritten für 5 Minuten in TBST wurde jeweils ein Tropfen DAB-Lösung (DAKO) auf die Schnitte getropft. Nachdem sich eine Braunfärbung nach 1 bis 5 Minuten entwickelt hatte, wurden die Präparate in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gespült, bevor sie zum Anfärben des Gewebes für 30 Minuten in Meyer's Häkalaun (1:5 in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$) inkubiert wurden. Die Präparate wurden abschließend für 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut und mit Kaiser's Glyceringelatine eingedeckelt.

Tabelle 4: In der Histologie eingesetzte Primärantikörper mit Verdünnungen

Primärantikörper	Verdünnung
Maus-anti-CD31 (Dianova #09096)	1:25
Maus-anti-CD40 (Dianova #6310)	1:20
Kaninchen-anti-CD40 (C-20)	1:100
Kaninchen-anti-VCAM-1	1:100

Zink-Fixans

0,1 M Tris, pH 7,4 (pH vor Zink-Zugabe einstellen), 0,5 g Calcium-Acetat, 5 g Zink-Acetat, 5 g Zink-Chlorid

Blockierlösung

0,25% Casein, 15 mM NaN₃, 0,1% BSA, in 50 mM Tris-HCl, pH 7,6

TBST

50 mM Tris-HCl, pH7,6, 0,15 M NaCl, 0,05% Tween-20, in H₂O_{bidest}

2.2.33 Doppelimmunfluoreszenzfärbung

Um die subzelluläre Verteilung von CD40 bzw. eine mögliche Internalisierung des Proteins nachzuweisen, wurde die indirekte Immunfluoreszenzfärbung angewendet.

Dazu wurden Endothelzellen in 6-Lochplatten bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert. Die Stimulation der Zellen erfolgte mit Zytokinen (siehe Kapitel 2.2.7) oder CD154-exprimierenden Myelomzellen. Des Weiteren wurden der Einfluss von ONOO⁻ (160-200 µM, 1 Stunde), bzw. zyklischer Dehnung auf die CD40-Distribution untersucht. Nach ausgiebigem Waschen der Zellen mit Ca-Mg-PBS (0,9mM CaCl₂, 0,5mM MgCl₂) wurden die Zellen für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 3% Paraformaldehyd in PBS fixiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal in Ca-Mg-PBS gewaschen. Wenn die Präparate nicht innerhalb eines Tages gefärbt wurden, wurden sie in PBS mit 0,02% NaN₃ bei 4 °C gelagert. In diesem Fall mussten sie vor der Immunfluoreszenzfärbung erneut zweimal in Ca-Mg-PBS gewaschen werden.

Um die Hintergrundfärbung aufgrund der Paraformaldehydfixierung zu reduzieren, wurden die Zellen für 10 Minuten in 50 mM NH₄Cl in PBS inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift in Ca-Mg-PBS wurden durch Inkubation mit PBS, 0,1 mg/ml Saponin, 1% BSA für 1 Stunde bei RT gleichzeitig unspezifische Proteinbindestellen blockiert und die

Zellmembran permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen in 0,1 mg/ml Saponin in PBS für 10 Minuten gewaschen und danach für 6 Stunden bei RT mit den Primärantikörpern (siehe Tabelle 5) inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen für 10 Minuten bei RT in 0,1 mg/ml Saponin in PBS folgte die Inkubation mit den Fluochrom-markierten Sekundärantikörpern für eine Stunde (Verdünnungen siehe Tabelle 6). Aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Fluochrome wurde die Lichtexposition möglichst gering gehalten. Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurden die Zellen drei Mal für 10 Minuten in 0,1 mg/ml Saponin in PBS und einmal in PBS gewaschen. Die Zellkerne wurden unspezifisch durch eine Inkubation für 10 Minuten in Dapi (1:5000 in PBS) angefärbt. Abschließend erfolgten drei weitere Waschschrte (2 x 5 Minuten in PBS, 1 x kurz in H₂O_{bidest}) an die sich die Fixierung von Deckgläschen in den Vertiefungen mit 20 µl Mowiol (Calbiochem, Bad Soden) und die Trocknung über Nacht bei 4 °C anschloss. Nach der Polymerisation des Mowioms wurden die Böden der 6-Loch-Platten ausgeschnitten und die Präparate mit Hilfe eines konfokalen Spinning Disc-Fluoreszenzmikroskops (Olympus) ausgewertet.

Tabelle 5: Primär- und Sekundärantikörper mit Verdünnungen

Primär-Antikörper	Verdünnung	Sekundär-Antikörper	Verdünnung
Kaninchen-anti-CD40 (C-20)	1:50	Cy3-konjugiertes Esel F(ab') ₂ anti-Kaninchen-IgG	1:50
Kaninchen-anti-CD40 (N-16)	1:50	Cy3-konjugiertes Esel F(ab') ₂ anti-Kaninchen-IgG	1:50
Maus-anti-CD40 (Dianova)	1:50	Cy3-konjugiertes Esel F(ab') ₂ anti-Maus-IgG	1:50
Ziege-anti-CD31	1:100	Cy3-konjugiertes Esel F(ab') ₂ anti-Ziege-IgG	1:50

Die THP-1-Zellen wurden ausgezählt und jeweils 1×10^6 Zellen/Vertiefung in 6-Lochplatten ausgesät. Es folgte die Stimulierung mit Zytokinen, an die sich eine Behandlung mit ONOO-anschluss. Anschließend wurden die Zellen bei 1000 x g für 5 Minuten abzentrifugiert und das Pellet in HANKs-Lösung resuspendiert. Der Waschschrte wurde zweimal wiederholt, bevor die Zellen in 3% Paraformaldehyd für 30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert wurden.

Auf die Fixierung folgten zwei Waschschriffe in HANKs-Lösung und eine Inkubation für 5 Minuten in NH_4Cl -PBS. Zwischen den Waschschriffen wurden die Zellen jeweils für 5 Minuten bei $1000 \times g$ abzentrifugiert. Zuletzt wurden die Zellen in HANKs-Lösung aufgenommen und je 5×10^4 Zellen pro Ansatz und Antikörper auf Glasobjektträger aufpipettiert und über Nacht trocken gelassen. Die weitere Färbung wurde nach dem oben beschriebenen Protokoll durchgeführt.

2.2.34 Fluorescence-Activated-Cell-Sorting (FACS)

Der Nachweis von CD40-Protein auf der Zelloberfläche der Endothelzellen erfolgte mittels FACS-Analyse. Für die Versuche wurden HUVECs in Gelatine beschichteten Dehnungsplatten kultiviert (siehe Kapitel 2.2.6). Nach Erreichen der 100%-igen Konfluenz erfolgte die zyklische Dehnung (16 Stunden, 16% Elongation, 0,5 Hz). Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellkulturspatel abgeschabt (Sarstedt, Hannover) und für 3 Minuten bei $1000 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ zentrifugiert. Das Pellet wurde in $300 \mu\text{l}$ FACS-Puffer (2% FCS in PBS) aufgenommen und $10 \mu\text{l}$ eines monoklonalen CD40-Primärantikörpers (R&D Systems) zugegeben und für 2 Stunden bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Darauf folgte ein Waschschriff mit 2 ml kaltem FACS-Puffer und ein Zentrifugationsschriff bei $1600 \times g$ und $4 \text{ }^\circ\text{C}$ für 10 Minuten. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Zellpellet in $100 \mu\text{l}$ Sekundärantikörperlösung (Phycoerythrin (PE)-Antikörper (BD Pharmingen); 1:100 in FACS-Puffer) resuspendiert und für weitere 30 Minuten bei $4 \text{ }^\circ\text{C}$ und Dunkelheit inkubiert. Als Negativkontrolle wurde ein äquivalenter Ansatz angefertigt, bei dem statt des spezifischen Antikörpers eine PE-konjugierte IgG κ Isotyp Kontrolle (BD Pharmingen) eingesetzt wurde. Es folgte ein weiterer Waschschriff und Zentrifugation (s.o.). Das so gewonnene Pellet wurde in 1 ml Zell-Fixans (1% Formaldehyd in PBS) mit Hilfe einer Pipette resuspendiert und bis zur Messung im Dunkeln auf Eis aufbewahrt. Sämtliche FACS-Analysen wurden mit einem EPICS[®]XL-MCL-Gerät der Firma Coulter (Krefeld) durchgeführt.

FACS-Puffer

2% FCS, 0,01% Na-Azid, in PBS

3. Ergebnisse

Die Grundlage für den ersten Teil der vorliegenden Arbeit lieferten Beobachtungen von Korff et al. (Blood, 2007) aus unserer Arbeitsgruppe. In der Publikation wird beschrieben, dass CD40 bei Mäusen ubiquitär in venösen Endothelzellen ex vivo detektierbar ist. Im Gegensatz dazu ist eine Expression von CD40 in arteriellen Endothelzellen nur an Gefäßverzweigungen nachzuweisen. Im ersten Teil dieser Arbeit sollten daher Unterschiede in der Expression von CD40 und VCAM-1 in humanen venösen und arteriellen Endothelzellen untersucht werden.

Eine weitere Grundlage für die hier beschriebenen Untersuchungen stellten frühere Experimente dar, in denen humane kultivierte Endothelzellen zyklisch gedehnt und anschließend die CD40-Protein-Expression analysiert wurde. Dabei wurde ein dehnungsabhängiger Abfall der CD40-Proteinmenge unter das Ausgangsniveau sowie eine Tyrosinnitrierung des Proteins entdeckt. Diese nahm in Abhängigkeit von der Dehnungsdauer zu. Basierend auf diesen Beobachtungen sollte der Mechanismus des CD40-Proteinabbaus aufgeklärt werden.

3.1 Charakterisierung der CD40- und VCAM-1-Expressionsmuster in venösen und arteriellen Endothelzellen

3.1.1 Gewebeverband (Nabelschnur)

Um die Proteinexpression von CD40 und VCAM-1 in humanen Endothelzellen von Venen und Arterien im Gewebeverband untersuchen zu können, wurden ca. 1 mm breite Querschnitte von Nabelschnüren mit IFN- γ oder TNF- α bzw. einer Kombination von beiden Zytokinen stimuliert oder unstimuliert belassen. Die Gewebeschnitte wurden mit Hilfe spezifischer Antikörper gegen CD40 bzw. VCAM-1 angefärbt und mikroskopisch ausgewertet (Abb. 3). Die Endothelspezifität der CD40- und VCAM-1-Verteilung wurde durch eine Koimmunfärbung mit dem Endothelzellmarker CD31 nachgewiesen.

In venösen, nicht jedoch in arteriellen nativen Endothelzellen, konnte eine basale CD40-Expression nachgewiesen werden. Darüber hinaus führte die Stimulation mit IFN- γ zu einer leichten Verstärkung bzw. Induktion der CD40-Expression in den Venen- und Arteriensegmenten. Die Stimulation mit TNF- α allein hatte dagegen keinen Effekt. Die Kombination der beiden Zytokine hatte denselben Effekt wie IFN- γ alleine (Abb. 3).

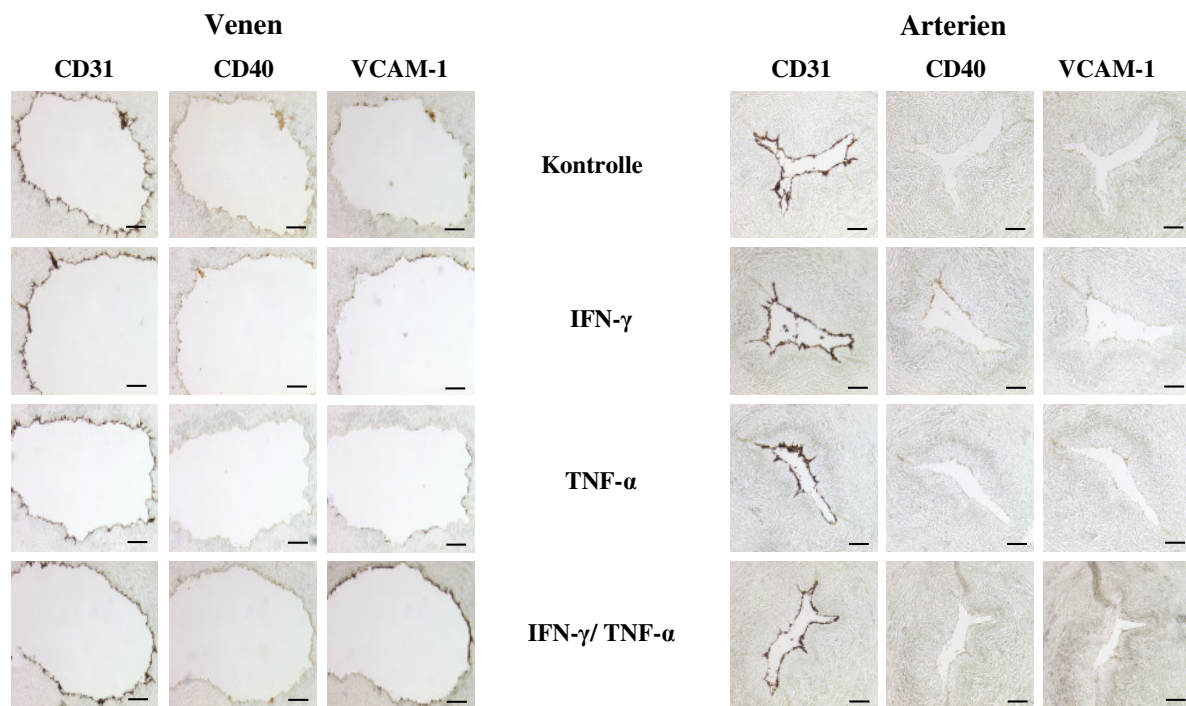


Abbildung 3: Vergleich der IFN- γ - und TNF- α -induzierten CD40- und VCAM-1-Proteinexpression in Endothelzellen humaner Nabelschnurvenen und -arterien.

Effekt von TNF- α (100 U/ml) und IFN- γ (1000 U/ml, beide 16 Stunden) auf die CD40- und VCAM-1-Expression in Endothelzellen *in situ*. Dargestellt sind exemplarische immunhistologische Färbungen von CD40, VCAM-1 und CD31 in Gewebeschnitten von humanen Nabelschnurvenen und -arterien. Die Venen wurden in 50-facher Vergrößerung aufgenommen; der Balken stellt 400 μ m dar. Arterien sind in 100-facher Vergrößerung gezeigt; der Balken stellt 200 μ m dar. Die Resultate wurden in fünf unabhängigen Experimenten bestätigt.

VCAM-1 konnte weder in den unstimulierten Arteriensegmenten, noch nach Zytokin-Stimulation detektiert werden (Abb. 3). Im Gegensatz dazu war im Endothel der Venensegmente eine basale Expression des Proteins nachweisbar, welche durch IFN- γ bzw. TNF- α leicht verstärkt wurde. Einen deutlich größeren Effekt hatte die Kombination beider Zytokine (Abb. 3).

3.1.2 HUVECs und HUAECs (Zellkultur)

Sowohl in HUVECs als auch in HUAECs löste die Stimulation mit der Kombination von IFN- γ und TNF- α eine signifikante Steigerung der CD40- und VCAM-1-Proteinmengen aus (Abb. 4B), die in den HUAECs allerdings deutlich schwächer ausgeprägt war als in den HUVECs. Darüber hinaus war der basale Proteingehalt an VCAM-1 in den HUVECs deutlich geringer als in den HUAECs (Abb. 4B). Die Analyse der mRNA-Expression von CD40 und VCAM-1 ergab ein vergleichbares Resultat.

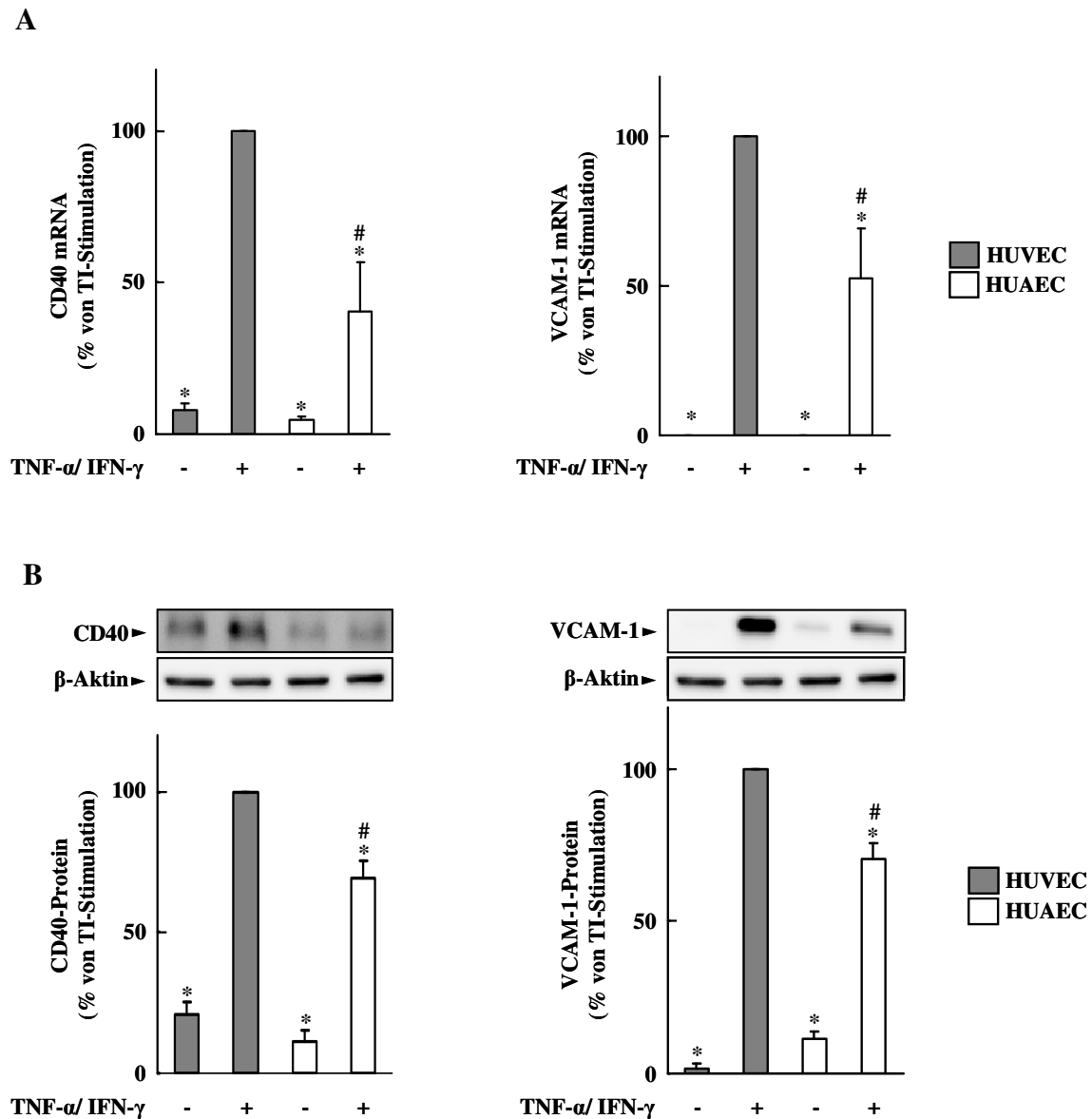


Abbildung 4: Unterschiede in der CD40- und VCAM-1 -Expression in HUVECs und HUAECs.

Effekt der Kombination von TNF- α (100 U/ml) und IFN- γ (1000 U/ml, 16 Stunden) auf die (A) mRNA- und (B) Protein-Expression von CD40 und VCAM-1 in HUVECs und HUAECs. Zur Normalisierung wurde in der quantitativen PCR (A) das Housekeeping-Gen RPL-32 gemessen und in der Western Blot-Analyse (B) das Housekeeping-Protein β -Aktin gefärbt. Gezeigt werden Mittelwerte \pm SEM von 3 individuellen Versuchen sowie exemplarische Western Blot-Analysen (B) (* P < 0,01 vs. HUVEC stimuliert; # P < 0,05 vs. HUVEC unstimuliert).

Wie auf Proteinebene beobachtet, stieg die Menge an CD40- wie auch VCAM-1-mRNA nach Zytokin-Stimulation in beiden Zelltypen sehr stark an (Abb. 4A). Deutlich erkennbar ist allerdings auch hier die geringere Stimulierbarkeit der HUAECs im Vergleich zu den HUVECs (Abb. 4A). Damit ist das Expressionsverhalten von kultivierten arteriellen und venösen Endothelzellen vergleichbar mit dem von nativen Endothelzellen im Gewebeverband.

3.2 Tyrosinnitrierung von CD40 und proteasomaler Abbau

3.2.1 CD40 wird während zyklischer Dehnung nicht ubiquitiniert

In früheren Experimenten, in denen die Kinetik der CD40-Protein- und mRNA-Spiegel in HUVECs während zyklischer Dehnung untersucht worden war, konnte nach kurzen Dehnungszeiten (3 Stunden) ein transienter Anstieg des mRNA- und auch des Proteingehalts beobachtet werden. Längere Dehnungszeiten von 16 Stunden oder mehr führten zu einem Rückgang des mRNA-Gehalts von CD40 auf das Basalniveau. Dagegen fiel die CD40-Proteinmenge nach Dehnungszeiten über 6 Stunden unter das Basalniveau ungedehnter Kontrollzellen. Diese starke Abnahme der CD40-Proteinmenge lässt einen aktiven Abbau vermuten, der in der eukaryotischen Zelle hauptsächlich in Ubiquitin-abhängiger Weise über das 26S-Proteasom katalysiert wird.

Da die Ubiquitinierung von Proteinen ein ATP-abhängiger Prozess ist, wurden Lysate von gedehnten HUVECs in An- oder Abwesenheit von ATP mit Ubiquitin und Ubiquitin-Aldehyd inkubiert. CD40 wurde mittels Immunpräzipitation aus den Gesamtproteinlysaten isoliert. Die Western Blot-Analyse zeigte die erfolgreiche Isolierung von CD40. Eine Ubiquitinierung des Proteins konnte unter den gewählten Bedingungen jedoch nicht nachgewiesen werden (nicht gezeigte Ergebnisse). Weiterhin konnte auch kein CD40 in mit dem Anti-Ubiquitin-Antikörper hergestelltem Proteinpräzipitat detektiert werden. Somit erscheint eine Ubiquitinierung des Proteins nach Tyrosinnitrierung nicht stattzufinden.

3.2.2 Zyklische Dehnung führt zu einem Abbau von CD40-Protein über die 20S-Untereinheit des Proteasoms

In Vorarbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass die beobachtete Abnahme der CD40-Proteinmenge durch den Einsatz des proteasomalen Breitbandinhibitors MG-132 verhindert wird. Um daher den genauen Abbauort von CD40 während zyklischer Dehnung zu identifizieren, wurden Inhibitoren gegen verschiedene proteasomale Kompartimente auf ihre Fähigkeit hin untersucht, die dehnungsinduzierte Abnahme der CD40-Proteinmenge verhindern zu können. Lactacystin weist eine höhere Spezifität auf als MG-132, hemmt aber wie dieses die drei wichtigsten katalytischen Funktionen des Proteasoms. Epoxomicin dagegen inhibiert die Chymotrypsin-ähnliche Funktion des 20S-Proteasoms. Um auszuschließen, dass die beobachtete Degradierung von CD40 über das lysosomale System oder andere proteolytische Kompartimente vermittelt ist, wurden zusätzlich Inhibitoren von Serinproteasen, Cathepsinen und Cysteinproteasen (Ca-074-Me, Chymostatin, Iodoacetamid) eingesetzt.

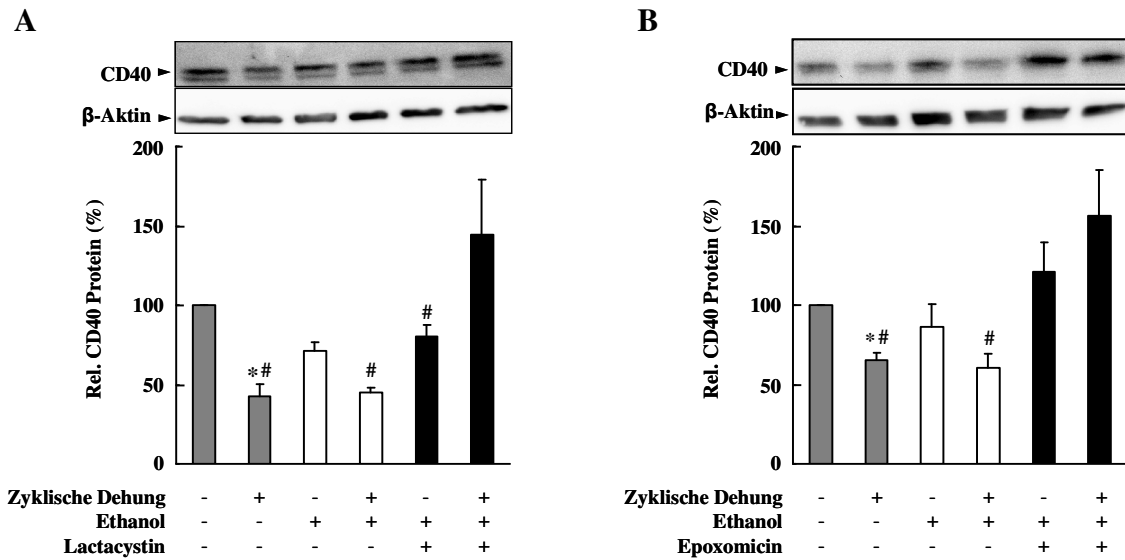


Abbildung 5: Effekt von Proteasom-Inhibitoren auf die dehnungsinduzierte Abnahme von CD40.

Statistische Zusammenfassung und exemplarische Western Blot-Analysen. Wirkung von (A) Lactacystin (50 μM) und (B) Epoxomicin (10 μM) auf die dehnungsinduzierte (16 Stunden, 16% Elongation, 0,5 Hz) Abnahme von CD40-Protein in HUVECs. Dargestellt ist der prozentuale CD40-Proteinsgehalt (Mittelwerte \pm SEM, n=5) bezogen auf ungedehnte Kontrollzellen. (* P < 0.01 vs. ungedehnt; # P < 0.01 vs. Dehnung + Inhibitor)

Nach 16 Stunden zyklischer Dehnung war die basale Menge an CD40-Protein deutlich reduziert (Abb. 5). Weder Ca-074-Me (50 μM) noch Chymostatin (100 μM) oder Iodoacetamid (10 mM) konnten die dehnungsinduzierte Abnahme von CD40 verhindern (nicht gezeigte Ergebnisse). Eine Vorbehandlung der Endothelzellen mit Lactacystin verhinderte nicht nur den dehnungsinduzierten Abbau von CD40, sondern stabilisierte den CD40-Proteingehalt auf einem Niveau deutlich über dem Basalwert (Abb. 5A).

Ebenso konnte in den Experimenten, bei denen die HUVECs mit Epoxomicin vorbehandelt waren, ein Anstieg der CD40-Proteinmenge unter statischen Bedingungen und nach 16 Stunden zyklischer Dehnung beobachtet (Abb. 5B). Da die beiden Inhibitoren in Ethanol gelöst waren, wurden zusätzlich Lösungsmittelkontrollen angefertigt. Ethanol beeinflusste die CD40-Proteinmengen weder in gedehnten noch in ungedehnten Zellen (Abb. 5).

Um eine dehnungsabhängige Freisetzung des Proteins ins Medium (Shedding) und eine daraus resultierende geringere nachweisbare CD40-Menge auszuschließen, wurden die Mediumüberstände gedehnter Zellen mittels ELISA untersucht. CD40 war hierbei weder im Überstand ungedehnter Kontrollzellen noch nach 16-stündiger Dehnung nachweisbar (nicht gezeigte Ergebnisse). Somit kann eine Reduzierung des CD40-Spiegels durch Freisetzung des

Proteins ausgeschlossen werden. Weiterhin lieferten die hier gezeigten Experimente einen Beleg dafür, dass CD40 während zyklischer Dehnung über das proteasomale System degradiert wird. Hierfür scheint die 20S-Untereinheit des Proteasoms verantwortlich zu sein.

3.2.3 Exogenes Peroxynitrit (ONOO⁻) führt zum Abbau von CD40-Protein über das proteasomale System

Wie vorstehend beschrieben, nimmt die CD40-Proteinmenge in HUVECs während zyklischer Dehnung deutlich ab. Darüber hinaus lieferte die Arbeit von Baumgarten (2004) den Hinweis, dass es während der Dehnung dieser Zellen zu einer vermehrten Bildung von Peroxynitrit (ONOO⁻) kommt. Aus diesem Grund sollte als nächstes untersucht werden, ob die Inkubation kultivierter Zellen mit exogenem ONOO⁻ unter statischen Bedingungen ebenfalls zu einer Abnahme der CD40-Proteinmenge führt.

Zunächst wurden die Bedingungen für eine ONOO⁻-Behandlung der Endothelzellen etabliert. Dazu wurden HUVECs für 1 Stunde in M199-Medium mit verschiedenen Konzentrationen von fetalem Kälberserum (FKS) und in HEPES-Tyrode kultiviert, bevor sie mit ONOO⁻ behandelt wurden. Anschließend wurden die Gesamtproteinlysate im Western Blot auf CD40-Proteinmengen untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die ONOO⁻-Behandlung von HUVECs, welche in 20%- bzw. 5%-FKS-haltigem Medium kultiviert wurden, keinen Effekt auf den CD40-Spiegel der Zellen hatte (nicht gezeigte Ergebnisse). Vermutlich reagierte das hinzugefügte ONOO⁻ sehr schnell mit den Serumproteinen des Mediums. Daher wurden die Zellen vor der ONOO⁻-Zugabe für 24 Stunden in serumfreien Medium und anschließend für 1 Stunde in HEPES-Tyrode kultiviert.

Wie in Abb. 6A zu sehen, hatte die Kultivierung unter serumfreien Bedingungen keine Auswirkung auf die CD40-Proteinmenge per se. Die zusätzliche Behandlung mit ONOO⁻ löste jedoch eine Abnahme der CD40-Proteinmenge um etwa 50% aus (Abb. 6A). Des Weiteren konnte die durch ONOO⁻ hervorgerufene Tyrosinnitrierung von CD40 und weiteren Proteinen mittels Western Blot-Analyse bestätigt werden. Die Spezifität des verwendeten Nitrotyrosin-Antikörpers wurde dabei mit einer Dithionit-vermittelten Reduktion der Nitrogruppe überprüft, welche die Immunfärbung komplett unterband (nicht gezeigte Ergebnisse).

Infolge der so verifizierten ONOO⁻-abhängigen Abnahme der CD40-Proteinmenge in den Endothelzellen, sollte nun ermittelt werden, worauf diese Abnahme beruht. Wie bereits in den Dehnungsexperimenten wurden Inhibitoren gegen die verschiedenen proteolytischen Kompartimente getestet. Ca-074-Me, Chymostatin und Iodoacetamid hatten hierbei keinen Effekt auf die ONOO⁻-abhängige Abnahme der CD40-Proteinmenge (nicht gezeigte

Ergebnisse). Es wurden daher weitere Nitrierungsexperimente durchgeführt, bei denen die Endothelzellen vor dem Einsatz von ONOO^- mit dem proteasomalen Inhibitor Lactacystin vorinkubiert wurden. Lactacystin verhinderte deutlich die ONOO^- -vermittelte Abnahme der CD40-Proteinmenge (Abb. 6B). Diese Experimente zeigen, dass die ONOO^- -abhängige Tyrosinnitrierung von CD40 zu einem Abbau des Proteins über das proteasomale System führt.

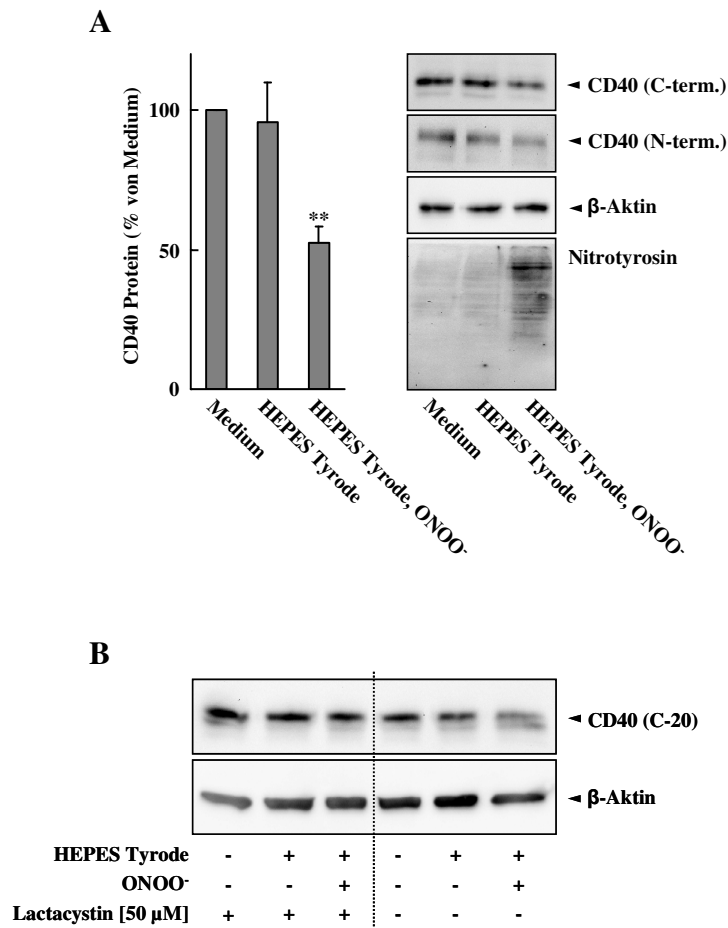


Abbildung 6: Effekt einer Inhibierung des Proteasoms auf die ONOO^- -induzierte Reduktion von CD40-Protein.

Dargestellt ist die Auswirkung der Inkubation statisch kultivierter HUVECs mit (A) ONOO^- (160-200 μM , 60 Minuten) sowie (B) der Effekt des proteasomalen Inhibitors Lactacystin auf die ONOO^- -abhängige Abnahme von CD40. Zum Nachweis des Proteins im Immunblot wurden polyklonale Antikörper gegen den C-Terminus (C-20) und den N-Terminus (N-16) verwendet. Nitrotyrosin wurde mittels eines monoklonalen Antikörpers detektiert. Zur Normalisierung der eingesetzten Proteinmengen wurde zusätzlich β -Aktin gefärbt. Dargestellt sind die gemittelten Werte \pm SEM aus je 5 unabhängigen Experimenten sowie repräsentative Western Blot-Analysen (** $P < 0.01$ vs. Mediumkontrolle).

3.2.4 Nachweis einer Tyrosinnitrierung von CD40-Protein im zellfreien System

Im nächsten Schritt sollte der Nachweis erbracht werden, dass die ONOO⁻-vermittelte Nitrierung an den Tyrosinresten von CD40 im N-terminalen extrazellulären Bereich des Proteins stattfindet. Zu diesem Zweck wurden Nitrierungsexperimente mit isoliertem nativem CD40-Protein und zusätzlich mit einer rekombinanten CD40/Fc-Chimäre, welche nur den N-terminalen Teil des Proteins enthält, durchgeführt.

Zunächst wurde versucht, natives CD40 aus Gesamtzelllysaten von kultivierten Endothelzellen aufzureinigen. Dazu wurden die Gesamtproteinlysate unter Kühlung und unter nicht denaturierenden Bedingungen über eine Blau-Native-PAGE (Schägger und von Jagow, 1991) aufgetrennt, die Banden mit einer Größe von etwa 50 kDa ausgeschnitten und CD40 durch Diffusion in Wasser eluiert. Nach einer Inkubation mit 0,5 mM ONOO⁻ wurde das Protein über eine SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit Antikörpern gegen CD40 und Nitrotyrosin gefärbt. Die Analyse ergab eine deutliche Tyrosinnitrierung nach ONOO⁻-Behandlung, welche in unbehandelten Proben nicht nachweisbar war (nicht gezeigte Ergebnisse). Der Nachteil dieser Methode ist allerdings, dass neben CD40 prinzipiell auch andere Proteine mit der gleichen Größe isoliert werden können, so dass eine Tyrosinnitrierung von CD40 nicht einwandfrei bestätigbar war. Daher wurde das CD40-Protein anschließend über eine Dynalbead-Immunpräzipitation unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers nativ aufgereinigt.

Das isolierte Protein und die rekombinante CD40/Fc-Chimäre wurden nachfolgend mit verschiedenen Konzentrationen des Peroxynitritdonors SIN-1 bzw. mit authentischem Peroxynitrit inkubiert und im Western Blot gegen CD40 und Nitrotyrosin gefärbt. Natives CD40 war mit einem gegen den N-Terminus gerichteten CD40-Antikörper (N-16) nach der SIN-1-Behandlung als Bande mit einer Größe von 48 kDa, das rekombinante Protein bei 60 kDa nachweisbar. Nach Peroxynitritexposition war weder das isolierte Protein noch die Chimäre mit dem verwendeten Antikörper zu detektieren (Abb. 7A und 7B), vermutlich da der verwendete Antikörper das Epitop nach der Modifikation nicht mehr erkannte. Die Tyrosinnitrierung der beiden Proteine stieg mit zunehmender Konzentration von SIN-1 an und war nach ONOO⁻-Behandlung am stärksten ausgeprägt (Abb. 7A und 7B). Die Banden für das nitrierte Protein lagen übereinstimmend bei 48 kDa bzw. 60 kDa.

Darüber hinaus wurden nach der Behandlung der Proteine mit ONOO⁻ Nitrotyrosin-haltige Banden bei circa 100 kDa (natives Protein) bzw. 120 kDa (rekombinantes Protein) detektiert, die aber nicht CD40-immunreaktiv waren (Abb. 7A und 7B).

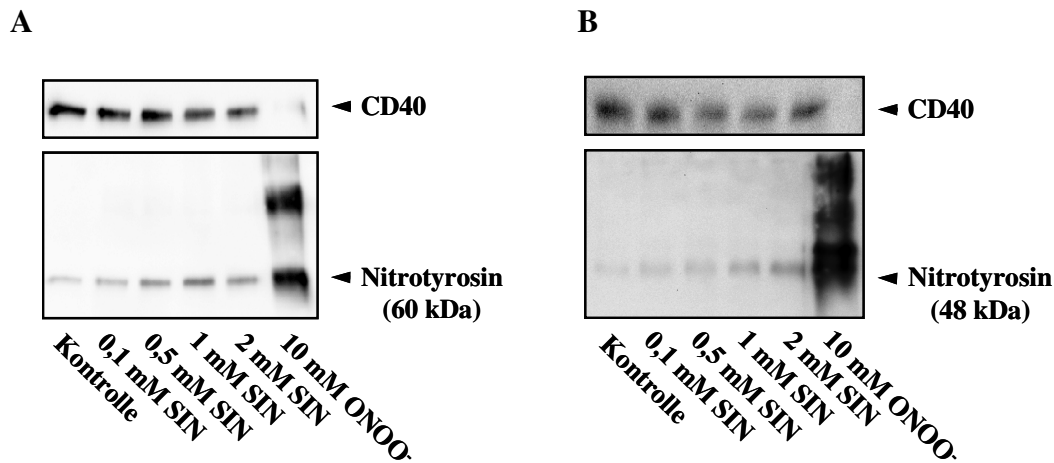


Abbildung 7: Nachweis der *in vitro* Tyrosinnitrierung von CD40.

Zum Nachweis einer Tyrosinnitrierung von CD40 wurden (A) eine rekombinante CD40/Fc-Chimäre und (B) natives CD40-Protein, welches mittels Dynalbead-Immunpräzipitation aus primären HUVECs gewonnen worden war, mit verschiedenen Konzentrationen des Peroxynitritdonors SIN-1 und mit authentischem ONOO⁻ für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Tyrosinnitrierung wurde anschließend im Western Blot mit einem polyklonalen Nitrotyrosin-Antikörper nachgewiesen. Abgebildet sind exemplarische Western Blots, deren Ergebnisse in je fünf unabhängigen Versuchen bestätigt werden konnten.

3.2.5 Tyrosin-nitriertes CD40-Protein wird über das 20S-Proteasom degradiert

Im zellfreien System sollte ferner der Nachweis geführt werden, dass die bereits in Kapitel 3.2.3 beschriebene Tyrosinnitrierung von CD40 als Signal für den Abbau des Proteins fungiert. Weiterhin sollte die 20S-Untereinheit des Proteasoms als die dafür verantwortliche Untereinheit bestätigt werden. Zu diesem Zweck wurde aus primären Endothelzellen isoliertes natives CD40-Protein zunächst mit authentischem Peroxynitrit an seinen Tyrosinresten nitriert und anschließend mit humanem rekombinanten 26S- bzw. 20S-Proteasom inkubiert. Analog erfolgte die Inkubation von Protein und Proteasom in Gegenwart von Lactacystin. Wie in Abbildung 8 deutlich zu sehen, war die CD40-Proteinmenge in Gegenwart des 26S-Proteasoms im Vergleich zum Kontrollprotein, welches nicht mit einem der beiden Proteasom-Untereinheiten inkubiert worden war, unverändert. Die vorherige Nitrierung des Proteins führte ebenfalls nicht zu einer Degradierung von CD40 durch das 26S-Proteasom. Demzufolge hatte auch der Zusatz von Lactacystin keinen Effekt auf die detektierbare CD40-Proteinmenge (Abb. 8).

Im Gegensatz zum 26S-Proteasom hatte die Inkubation von CD40 mit dem 20S-Proteasom eine deutliche Verminderung der Proteinmenge im Vergleich zum Kontrollansatz zur Folge (Abb. 8). Allerdings schien das 20S-Proteasom CD40 ungeachtet der Tyrosinnitrierung gleich

gut abzubauen. In Gegenwart von Lactacystin war die beobachtete Abnahme der CD40-Proteinmenge deutlich geringer (Abb. 8).

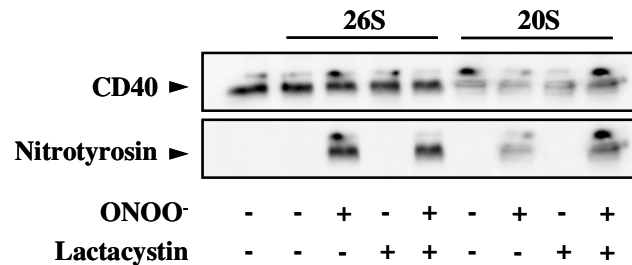


Abbildung 8: Proteasomaler Abbau von nativem Nitrotyrosin-haltigem CD40 im zellfreien System.

Natives CD40-Protein wurde mit rekombinantem 20S- bzw. 26-Proteasom (beide 0,1 mg/ml) in Abwesenheit oder Gegenwart von Lactacystin (50 μ M) für 2 Stunden inkubiert. In der Western Blot-Analyse wurden CD40 (N-16-Antikörper) und Nitrotyrosin nachgewiesen. Der gezeigte Western Blot ist repräsentativ für zwei weitere unabhängige Experimente mit demselben Resultat.

Der fehlende Unterschied im Abbau von nitriertem und nicht-nitriertem CD40 war vermutlich auf die lange Inkubationszeit von 1 Stunde zurückzuführen. Darüber hinaus konnte eine Tyrosinnitrierung für natives ebenso für das rekombinante nur den N-Terminus enthaltendes Protein beobachtet werden (siehe Kapitel 3.2.4). Daher wurden Experimente durchgeführt, bei welchen das rekombinante CD40-Protein mittels ONOO⁻ an seinen Tyrosinresten nitriert bzw. unnitriert belassen und anschließend für verschiedene Zeitpunkte mit dem rekombinanten 20S-Proteasom inkubiert wurde.

Wie in Abbildung 9 erkennbar, führte die Nitrierung von CD40 allein zu keinem Unterschied in der nachweisbaren Proteinmenge. Auch nach 20 Minuten Inkubation mit dem 20S-Proteasom bestand kein Unterschied der verbleibenden Proteinmenge zwischen nitriertem und nicht-nitriertem CD40. Des Weiteren waren die Proteinmengen nach 20 Minuten mit der nicht inkubierten Kontrolle vergleichbar. Im Gegensatz dazu war nach 30 Minuten die Menge an Tyrosin-nitriertem CD40 im Vergleich zu unnitriertem CD40 deutlich auf etwa 60% des Referenzwertes vermindert (Abb. 9). Insofern scheint die Tyrosinnitrierung von CD40 den Abbau durch das 20S-Proteasom tatsächlich zu beschleunigen.

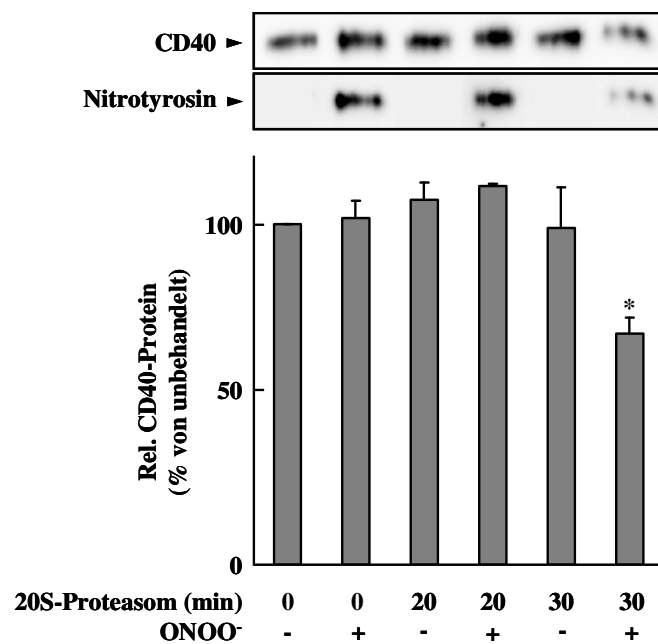


Abbildung 9: Kinetik des Abbaus von CD40 über das 20S-Proteasom.

Tyrosin-nitriertes rekombinantes CD40-Protein wird durch rekombinantes 20S-Proteasom (0,1 mg/ml) schneller degradiert als unmodifiziertes Protein. Die Tyrosinnitrierung wurde vorher durch 15-minütige Inkubation mit 10 mM ONOO⁻ erzeugt. Der gezeigte Western Blot ist repräsentativ für 3 unabhängige Experimente. Dargestellt sind außerdem die Mittelwerte \pm SEM in % des unbehandelten rekombinanten Proteins (* P < 0.01 vs. unbehandeltes CD40).

3.2.6 Zyklische Dehnung führt nicht zu einer Freisetzung des 20S-Proteasoms aus kultivierten humanen Endothelzellen

Die bisher vorliegenden Daten zeigen, dass das an einem oder beiden Tyrosinresten nitrierte CD40-Protein während zyklischer Dehnung durch das 20S-Proteasom abgebaut werden kann. Beide Tyrosinreste von CD40 liegen in der extrazellulären Domäne, so dass sich die Frage stellte wie das Protein dem Proteasom zugeführt wird. In diesem Zusammenhang haben verschiedene Arbeitsgruppen über eine zirkulierende extrazelluläre Form des 20S-Proteasoms berichtet (Egerer et al., 2002; Sixt et al., 2007). Insofern sollte überprüft werden ob kultivierte HUVECs bei zyklischer Dehnung das 20S-Proteasom in den Zellüberstand freizusetzen.

Wie in Abbildung 10 dargestellt, konnte die 20S-Untereinheit erfolgreich aus Gesamtproteinlysaten der Endothelzellen isoliert werden. Die detektierten Banden waren in der IgG-Negativkontrolle nicht vorhanden, was die Spezifität der Immunpräzipitation zeigt. Dagegen konnte das 20S-Proteasom weder in den Zellüberständen ungedehnter Zellen noch nach 3 bzw. 16 Stunden zyklischer Dehnung nachgewiesen werden (Abb. 10). Damit kann ein

extrazellulärer Abbau von CD40 unter den vorliegenden Versuchsbedingungen ausgeschlossen werden.

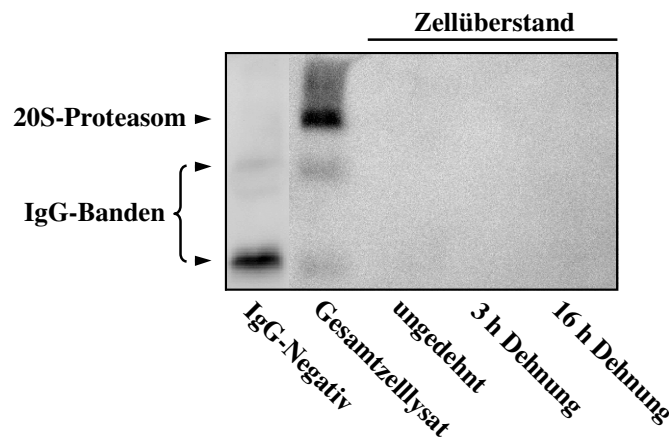


Abbildung 10: Das 20S-Proteasom wird während zyklischer Dehnung nicht von HUVECs freigesetzt.

20S-Proteasom-Immunpräzipitation der Zellüberstände ungedehnter und gedehnter HUVECs (Dehnung: 16 Stunden, 16% Elongation, 0,5 Hz). Parallel wurden eine IgG-Negativkontrolle sowie eine Immunpräzipitation (IP) mit Gesamtzelllysaten von ungedehnten Zellen durchgeführt. Zum Nachweis des 20S-Proteasoms im Western Blot wurde derselbe Antikörper wie für die IP eingesetzt, welcher mit einem speziellen IP-Sekundärantikörper (Exacta Cruz-Anti-Kaninchen-HRP) detektiert wurde. Gezeigt ist ein repräsentativer Western Blot, der stellvertretend für 3 unabhängige Experimente steht.

3.3 Subzelluläre Lokalisierung von CD40

Die bisher vorgestellten Daten zeigen, dass eine Tyrosinnitrierung von CD40-Protein nach längerer zyklischer Dehnung bzw. in Gegenwart von exogenem ONOO^- erfolgt und mit dem nachfolgenden Abbau des Proteins über das 20S-Proteasom assoziiert ist. Die zwei nitrierbaren Tyrosinreste von CD40 sind in der extrazellulären Domäne des Proteins lokalisiert. Da Endothelzellen kein 20S-Proteasom während zyklischer Dehnung freisetzen, ist zu vermuten, dass der Abbau des Proteins intrazellulär erfolgt. Insofern wurde nachfolgend die Internalisierung des nitrierten Proteins in kultivierten Endothelzellen und zum Vergleich in THP-1-Monozyten untersucht.

3.3.1 Tyrosin-nitriertes CD40-Protein wird internalisiert

Zum Nachweis der mutmaßlichen Internalisierung von CD40 wurden zunächst die Oberflächenproteine der Endothelzellen biotinyliert. Danach folgte die Inkubation mit exogenem ONOO^- , der Verdau aller Oberflächenproteine mit Trypsin und schließlich eine CD40-Immunpräzipitation.

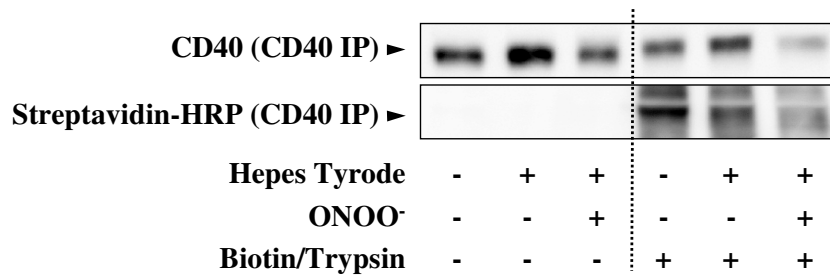


Abbildung 11: ONOO⁻-abhängige Internalisierung von CD40 Protein in HUVECs.

Dargestellt ist eine exemplarische Western-Blot-Analyse von immunpräzipitiertem CD40 (CD40 IP), dass aus ONOO⁻-behandelten (160-200 μ M, 60 min) HUVECs mit biotinylierten Oberflächenproteinen isoliert wurde. Biotinyliertes Protein wurde mit HRP-gekoppeltem Streptavidin nachgewiesen. Der gezeigte Western Blot steht stellvertretend für 4 unabhängige Experimente mit vergleichbarem Resultat.

In Abb. 11 ist deutlich zu erkennen, dass die Menge an CD40-Protein in den Zellen nach Peroxynitritexposition signifikant reduziert war. Darüber hinaus war keine Biotinylierung in Zellen detektierbar, die nicht mit Biotin behandelt worden waren. Die Menge an CD40, die aus biotinylierten Zellen isoliert wurde, war nach Peroxynitritexposition ähnlich deutlich reduziert wie die Menge an nachweisbarem Biotin (Abb. 11). Da vor der Herstellung der Gesamtzelllysate sämtliche Oberflächenproteine mit Trypsin verdaut und abgewaschen worden waren, konnte ein Nachweis von membranständigen Proteinen ausgeschlossen werden. Das mittels Streptavidin-HRP detektierte Biotinylierung musste daher ausschließlich von internalisiertem Protein stammen. Demnach scheint Zellmembranständiges CD40 nach ONOO⁻-vermittelter Tyrosinnitrierung tatsächlich ins Innere der Endothelzellen transloziert zu werden.

3.3.2 ONOO⁻ vermindert die Zytokin-induzierte CD40-Proteinmenge in den Mikrosomen von HUVECs und THP-1-Monozyten

Um die Ergebnisse der Biotinylierung der Endothelzelloberflächenproteine zu bestätigen, wurde aus Zytokin-stimulierten und anschließend mit Peroxynitrit behandelten HUVECs die mikrosomale Membranfraktion isoliert. Analoge Experimente wurden mit THP-1-Monozyten durchgeführt. Der Nachweis der CD40-Verteilung erfolgte durch Western Blot-Analyse.

Unter basalen Bedingungen war in den Gesamtzelllysaten der Endothelzellen CD40 sowohl mit dem C-terminalen als auch mit dem N-terminalen Antikörper nur schwach gefärbt. Die Stimulation mit Zytokinen verstärkte den CD40-Gehalt deutlich (Abb. 12A). Eine zusätzliche Behandlung mit ONOO⁻ führte zu einer deutlichen Abnahme der Zytokin-induzierten CD40-Menge. In den zytosolischen Fraktionen war CD40 unter keinen Bedingungen nachweisbar.

Dagegen zeigte sich eine deutliche Anreicherung des Proteins in den mikrosomalen Fraktionen unstimulierter Zellen im Vergleich zum Gesamtprotein. Der Gehalt an CD40 in der mikrosomalen Fraktion war nach Zytokin-Stimulation signifikant erhöht (Abb. 12A). Der Zusatz von Peroxynitrit verursachte eine deutliche Abnahme der Zytokin-induzierbaren CD40-Menge. Hierbei ist zu beachten, dass sich die durch die beiden CD40-Antikörper nachgewiesenen Proteinmengen nicht unterschieden, so dass ein extrazellulärer Protease-Verdau bzw. ein Verlust des N-Terminus nach Tyrosinnitrierung unwahrscheinlich ist (Abb. 12A).

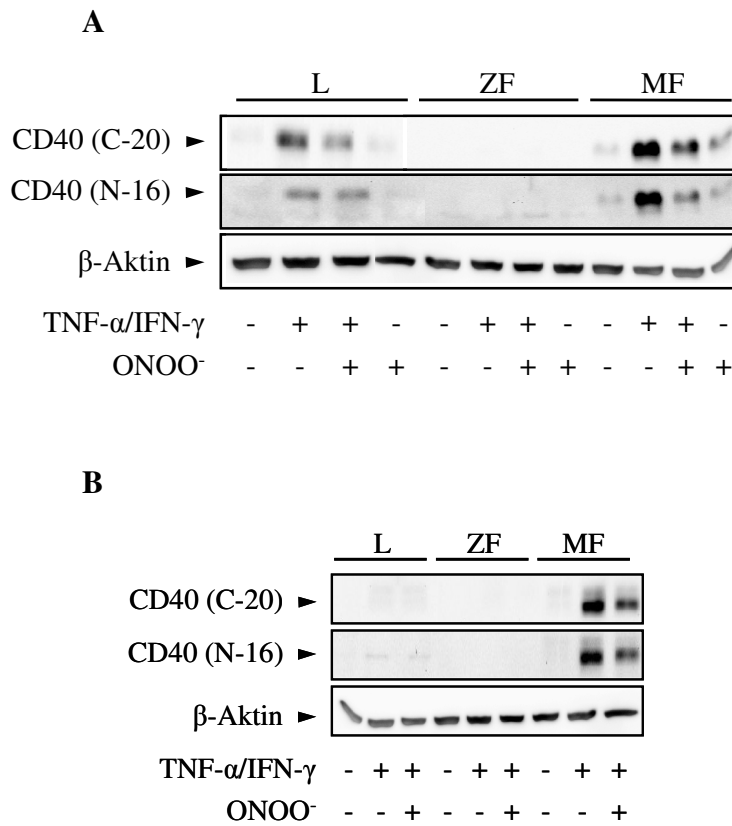


Abbildung 12: ONOO⁻ reduziert die TNF-α- und IFN-γ-induzierte mikrosomale CD40-Proteinmenge.

Dargestellt sind subzelluläre Fraktionen von (A) humanen Endothelzellen und (B) humanen Monozyten. HUVECs und THP-1-Zellen wurden für 16 Stunden mit 1000 U/ml IFN-γ und 100 U/ml TNF-α stimuliert und für 1 Stunde exogenem ONOO⁻ (160-200 μM) ausgesetzt. Gesamtproteinlysate (L) wurden generiert und in zytosolische (ZF) und mikrosomale (MF) Fraktion aufgetrennt. CD40 wurde mit einem C-terminalen Antikörper (C-20) und einem N-terminalen Antikörper (N-16) gefärbt. Zur Kontrolle der eingesetzten Proteinmengen wurde zusätzlich β-Aktin gefärbt. Die dargestellten Western Blots sind repräsentativ für jeweils 5 unabhängige Versuche.

In den Gesamtlysaten der Monozyten war CD40 unter basalen Bedingungen nicht nachweisbar (Abb. 12B), jedoch nach Zytokin-Stimulation deutlich gesteigert. Die Menge an CD40 war nach ONOO⁻-Behandlung reduziert. Wie auch in den HUVECs war CD40 in den zytosolischen Fraktionen der THP-1-Zellen unter keinen Bedingungen nachweisbar (Abb. 12B). Die Menge an mikrosomalem CD40 war nach Zytokin-Stimulation im Vergleich zu unstimulierten Proben signifikant erhöht. Die zusätzliche Behandlung der Zellen mit ONOO⁻ führte zu einer Verminderung des mikrosomalen CD40-Proteingehalts (Abb. 12B).

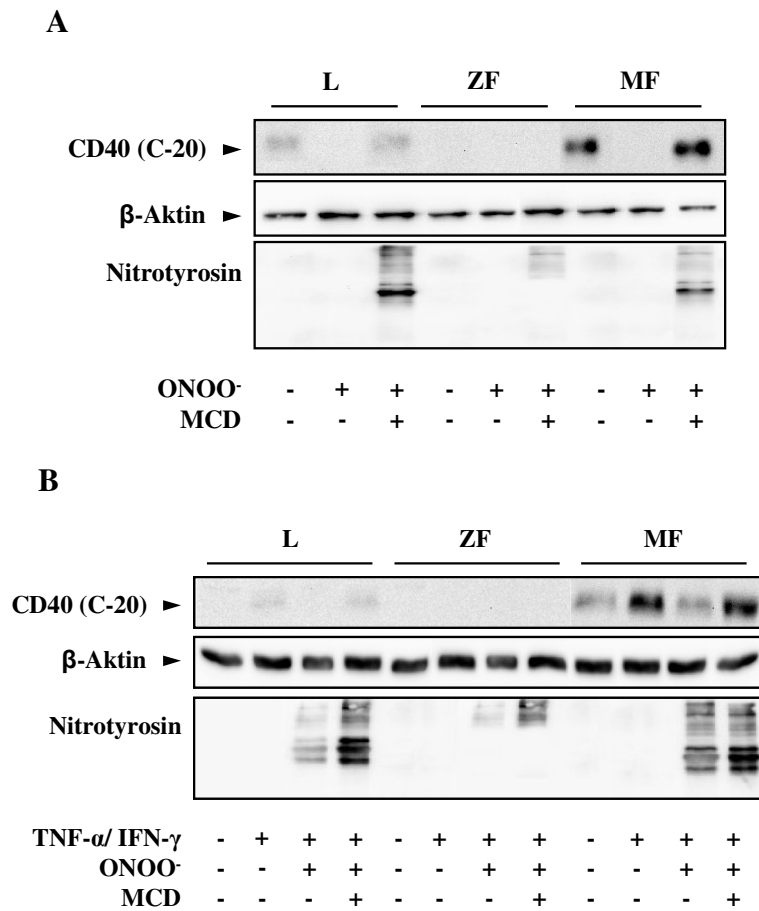


Abbildung 13: Effekt von Methyl-β-Cyclodextrin auf die Peroxynitrit-abhängige Verminderung von mikrosomalem CD40 in HUVECs und THP-1-Monozyten.

Dargestellt ist die Western Blot-Analyse von zytosolischen und mikrosomalen Fraktionen kultivierter humaner Endothelzellen (A) und Monozyten (B) nach Behandlung mit Methyl-β-Cyclodextrin (MCD; 5 μM, 30 Minuten) und Inkubation mit ONOO⁻ (160-200 μM, 60 Minuten). Die THP-1-Monozyten, nicht aber die Endothelzellen, wurden zuvor für 16 Stunden mit IFN-γ (1000 U/ml) und TNF-α (100 U/ml) stimuliert. Die Gesamtproteinlysate (L) wurden durch Zentrifugation in zytosolische (ZF) und mikrosomale (MF) Fraktionen getrennt und CD40 anschließend mittels Western Blot-Analyse detektiert. Gezeigt sind für je 4 unabhängige Experimente repräsentative Western Blots.

3.3.3 Die Depletierung des Cholesterins in der Zellmembran verhindert die Peroxynitrit-abhängige Reduktion von mikrosomalem CD40 in HUVECs und THP-1-Monozyten

Um nachzuweisen, dass ONOO^- für eine Cholesterin-abhängige Internalisierung von CD40 verantwortlich ist, wurden HUVECs mit Methyl- β -Cyclodextrin (MCD) inkubiert. MCD depletiert das in der Zellmembran befindliche Cholesterin und verhindert somit die Relokalisation von in der Membran lokalisierten Proteinen. Nachfolgend wurden die Zellen mit ONOO^- inkubiert, Gesamtzelllysate hergestellt und diese in zytosolische und mikrosomale Fraktionen getrennt. Analoge Experimente wurden mit THP-1-Monozyten durchgeführt. Hierbei fand allerdings vor der MCD-Behandlung zusätzlich eine Stimulation mit $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IFN-}\gamma$ statt.

Die Behandlung der Endothelzellen mit ONOO^- führte zur bereits beschriebenen Abnahme von mikrosomalem CD40 im Vergleich mit unbehandelten Proben (Abb. 13A). War das Cholesterin der Zellen depletiert, so trat dieser Effekt nicht auf. In der zytosolischen Fraktion war grundsätzlich kein CD40 detektierbar. Ebenso führte die Peroxynitritbehandlung in der mikrosomalen Fraktion der THP-1-Zellen zu einer deutlichen Reduktion des CD40-Proteingehalts verglichen mit unbehandelten Zellen. Cholesterindepletierung verhinderte diesen Effekt genauso wie in den HUVECs (Abb. 13B). Auch in der zytosolischen Fraktion der Monozyten war kein CD40 detektierbar.

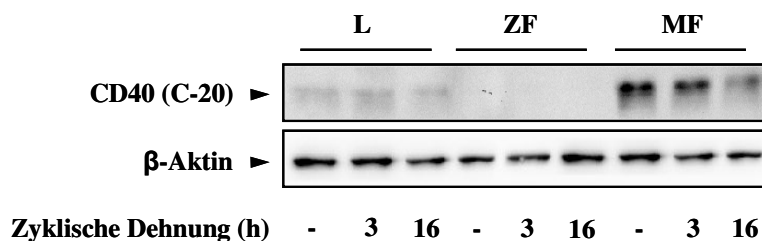


Abbildung 14: Veränderung der subzellulären Verteilung von CD40 nach zyklischer Dehnung.

Exemplarischer Western Blot der verschiedenen Fraktionen kultivierter HUVECs. Die Endothelzellen wurden für 3 bzw. 16 Stunden mit 16% Elongation und 0,5 Hz zyklisch gedehnt. Die Gesamtproteinlysate (L) wurden in zytosolische (ZF) und mikrosomale (MF) Fraktionen separiert und die CD40-Proteinmenge anschließend mittels Western Blot-Analyse bestimmt. Der gezeigte Western Blot ist repräsentativ für die aus 4 unabhängigen Versuchen gewonnenen Ergebnisse.

3.3.4 Einfluss von zyklischer Dehnung auf die subzelluläre Verteilung von CD40 in HUVECs

Unter statischen Kulturbedingungen war CD40 in humanen Endothelzellen nur in der mikrosomalen, nicht jedoch in der zytosolischen Fraktion detektierbar. Auch nach zyklischer Dehnung für 3 bzw. 16 Stunden änderte sich die subzelluläre Verteilung des Proteins nicht (Abb. 14). Allerdings schien CD40 deutlich in der mikrosomalen Fraktion angereichert zu sein. Die Gesamtproteinmenge nach drei Stunden Dehnung war im Vergleich zu den ungedehnten Kontrollen nicht verändert. Nach 16 Stunden Dehnung war der CD40-Gehalt im Gesamtlysat ebenfalls wie in der Mikrosomenfraktion deutlich reduziert (Abb. 14).

3.3.5 HSP-70 spielt bei der Peroxynitrit-abhängigen Internalisierung von CD40 keine Rolle

Die bisherigen Versuche deuten auf eine Internalisierung des nitrierten CD40-Proteins in Endothelzellen und THP-1-Monozyten hin. Des Weiteren stabilisiert eine Cholesterindepletierung den mikrosomalen CD40-Gehalt in Gegenwart von exogenem ONOO⁻. Infolge von Berichten, dass CD40 in antigenpräsentierenden Zellen HSP-70 bindet und in dieser assoziierten Form internalisiert wird (Becker et al., 2002), sollte die Beteiligung von HSP-70 an der Internalisierung von CD40 in den kultivierten Endothelzellen experimentell überprüft werden. Der CD40-Gehalt der Zellen war nach einstündiger Peroxynitritexposition deutlich reduziert (Abb. 15A). Zur Gewährleistung einer effizienten ONOO⁻-vermittelten Tyrosinnitrierung wurden die Zellen in HEPES-Tyrode kultiviert. In den in Medium kultivierten Kontrollzellen war kein HSP-70 im Gesamtzelllysate nachweisbar. Allerdings löste schon die Inkubation der Zellen in HEPES-Tyrode eine Induktion von HSP-70 aus (Abb. 15A). ONOO⁻-Exposition hatte keine Änderung der HSP-70-Menge zur Folge. Allerdings war der Gehalt an HSP-70 deutlich höher, wenn die Endothelzellen zuvor mit Epoxomicin inkubiert worden waren. Die Menge an immunpräzipitiertem CD40 war nach ONOO⁻-Behandlung im Vergleich mit unbehandelten Kontrollproben ebenfalls signifikant reduziert. Dieser Effekt wurde durch Vorinkubation mit Epoxomicin aufgehoben (Abb. 15B). HSP-70 konnte nach CD40-Immunpräzipitation weder in den Medium- bzw. HEPES-Tyrode-Kontrollen noch in ONOO⁻-behandelten Proben nachgewiesen werden (Abb. 15B). Damit ist eine Peroxynitrit-abhängige Interaktion von CD40 und HSP-70 zumindest unter den gewählten Versuchsbedingungen unwahrscheinlich.

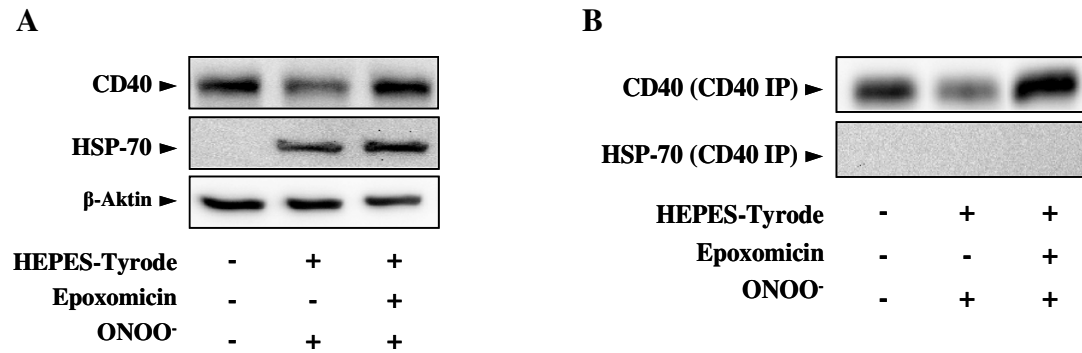


Abbildung 15: Auswirkung von ONOO⁻ und Epoxomicin auf die mögliche Interaktion von CD40 und HSP-70.

Die Abbildung zeigt den Effekt ONOO⁻ (160-200 µM, 60 Minuten) alleine bzw. in Kombination mit von Epoxomicin (10 µM, 30 Minuten) auf CD40 und seinen möglichen Interaktionspartner HSP-70 in Gesamtzelllysaten (A) und nach CD40-Immunpräzipitation (B). Exemplarische Western Blot-Analysen, die für je 3 unabhängige Experimente stellvertretend sind.

3.3.6 Überprüfung der CD40-Lokalisation in humanen Endothelzellen nach Zytokin-Stimulation mittels Immunfluoreszenz

Mit Hilfe der FACS-Analyse konnte unter Basalbedingungen kein immunreaktives CD40 auf der Oberfläche von humanen Endothelzellen nachgewiesen werden (nicht gezeigte Ergebnisse). Daher wurden Immunfluoreszenzanalysen durchgeführt, bei denen zunächst der Einfluss von IFN- γ und TNF- α auf die zelluläre Verteilung von CD40 untersucht wurde. Zum Nachweis von CD40 wurden dabei die gegen den C-Terminus (C-20) und den N-Terminus (N-16) gerichteten polyklonalen Antikörper eingesetzt. Unter basalen Bedingungen war mit dem C-20-Antikörper eine diffus über die gesamte Zelle verteilte zytoplasmatische Fluoreszenz detektierbar. Eine eindeutige Lokalisation des Proteins in der Zellmembran war nicht erkennbar (Abb. 16). Mit Hilfe des N-16-Antikörpers angefärbte Zellen zeigten eine deutlich akzentuierte Lokalisation von CD40 teilweise im Zellkern und vor allem in der perinukleären Region (Abb.16). Die Stimulation mit IFN- γ und TNF- α für 16 Stunden verstärkten das CD40-Immunfluoreszenzsignal deutlich, allerdings war auch unter diesen Bedingungen kein Nachweis einer CD40-Lokalisation in der Zellmembran möglich (Abb. 16). Die Spezifität der beiden verwendeten Antikörper konnte mithilfe spezifischer blockierender Peptide verifiziert werden.

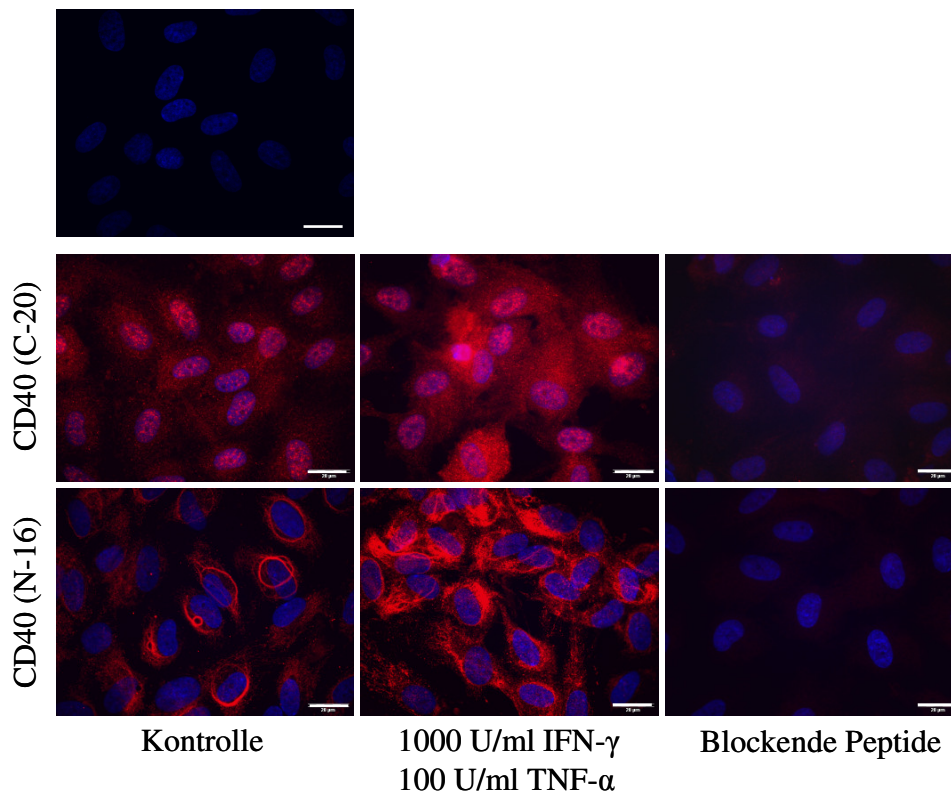


Abbildung 16: IFN- γ - und TNF- α -Exposition verstärkt die CD40-Expression in HUVECs.

Effekt einer 16-stündigen Stimulation mit TNF- α (100 U/ml) und IFN- γ (1000 U/ml) auf die CD40-Expression in HUVECs. Gezeigt sind repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen mit spezifischen Antikörpern gegen den C-Terminus (C-20) bzw. N-Terminus (N-16) des Proteins. Zum Vergleich sind die unstimulierte Kontrolle und die Negativkontrolle (ohne primären Antikörper, NK) gezeigt. Die Spezifität der Antikörper wurde mittels spezifischer blockierender Peptide, die in zehnfacher Menge der Antikörperkonzentration eingesetzt wurden, überprüft. Die Zellen wurden mit 400-facher Vergrößerung aufgenommen. Der Balken stellt 20 μm dar.

3.3.7 Effekt von ONOO $^-$ auf die subzelluläre Verteilung von CD40 in Endothelzellen

Neben der Auswirkung einer Zytokin-Stimulation auf die intrazelluläre Lokalisierung von CD40 wurde zusätzlich der Effekt von ONOO $^-$ mit Hilfe von Immunfluoreszenzfärbungen untersucht. Im Gegensatz zu unbehandelten Kontrollzellen war die mit Hilfe des C-20-Antikörpers detektierte Immunfluoreszenz nach Peroxynitritexposition deutlich abgeschwächt, wobei die Immunfärbung keine eindeutige Zuordnung zu zellulären Strukturen zuließ (Abb.17, obere Reihe).

Die unter Kontrollbedingungen mit Hilfe des N-16-Antikörpers beobachtete klar begrenzte perinukleäre Rotfluoreszenz von CD40 war nach ONOO $^-$ -Inkubation eindeutig vermindert und deutlich diffuser (Abb. 17, untere Reihe).

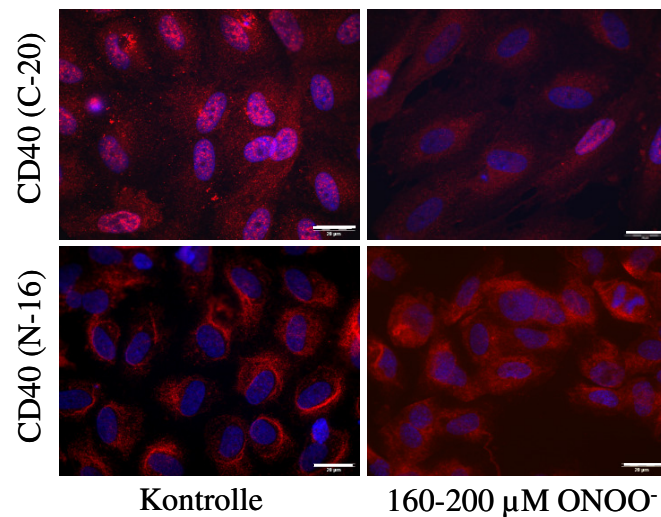


Abbildung 17: Einfluss von ONOO⁻ auf die Lokalisation von CD40 in kultivierten humanen Endothelzellen.

Die Abbildung zeigt repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen mit dem polyklonalen Antikörper gegen den C-Terminus (C-20) bzw. den N-Terminus (N-16) des Proteins. Vorbehandlung mit 160-200 µM ONOO⁻ (60 Minuten) schwächte das Immunfluoreszenzsignal in den kultivierten HUVECs deutlich ab. Die Zellen wurden mit Hilfe eines konfokalen Fluoreszenzmikroskops in 400-facher Vergrößerung aufgenommen. Der Balken stellt 20 µm dar.

3.3.8 Einfluss zyklischer Dehnung auf die CD40-Protein-Verteilung in HUVECs

Neben der Behandlung von statisch kultivierten HUVECs mit exogenem ONOO⁻ sollte der Einfluss der zyklischen Dehnung auf die Lokalisation von CD40 untersucht werden. Zyklische Dehnung für 3 Stunden führte zu einer transienten Zunahme des durch beide Antikörper detektierten Immunfluoreszenzsignals, allerdings nicht zu einer Umverteilung von CD40 (Abb. 18). Nach 16 Stunden Dehnung entsprachen die Fluoreszenzintensität und die Verteilung der mit beiden Antikörpern detektierten Signale in etwa den Ausgangswerten (Abb. 18).

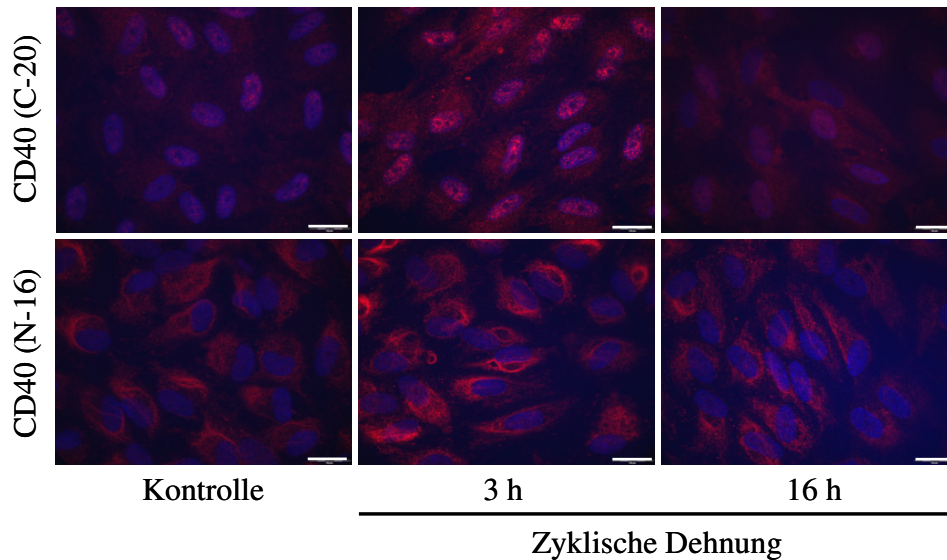


Abbildung 18: Einfluss der zyklischen Dehnung auf die CD40-Expression in kultivierten humanen Endothelzellen.

Gezeigt sind repräsentative konfokale Aufnahmen von CD40-Immunfluoreszenzfärbungen mit spezifischen Antikörpern gegen den C-Terminus (C-20) bzw. N-Terminus (N-16) des Proteins. Primäre HUVECs wurden für 3 bzw. 16 Stunden mit 16% Elongation und 0,5 Hz zyklisch gedehnt. Die Aufnahme erfolgte mit 400-facher Vergrößerung. Der Balken stellt 20 µm dar.

3.3.9 CD40 ist in Kernextrakten kultivierter HUVECs nachweisbar

Der Befund aus den Immunfluoreszenzanalysen, dass CD40 teilweise im Zellkern der Endothelzellen lokalisiert ist, sollte in anschließenden Versuchen mit Hilfe von Kernextrakten verifiziert werden. Darüber hinaus wurde eine mögliche Abhängigkeit dieser Kernlokalisation von einer Zytokin- bzw. CD154-Stimulation untersucht.

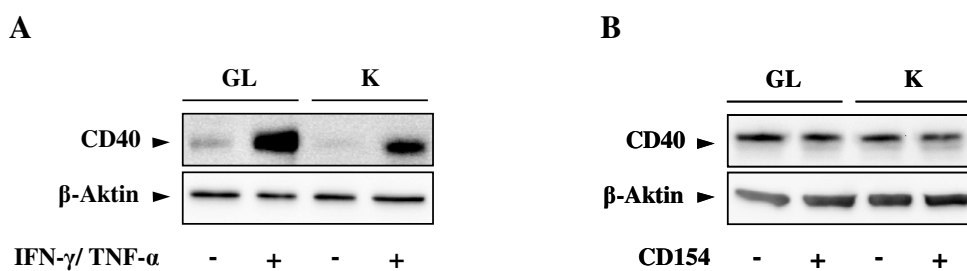


Abbildung 19: CD40 ist in Kernextrakten von humanen Endothelzellen nachweisbar.

Dargestellt sind repräsentative Western Blots von Kernextrakten (K) aus primären HUVECs, die zuvor mit (A) IFN- γ (1000 U/ml) und TNF- α (100 U/ml) für 16 Stunden stimuliert oder (B) für 12 Stunden mit CD154-positiven Myelomzellen kokultiviert wurden. Zum Vergleich der Proteinmengen wurden ebenfalls Gesamtproteinlysate (GL) analysiert. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für jeweils 3 unabhängige Experimente.

Wie in Abb. 19A dargestellt, nahm die Menge an nukleärem CD40 nach Zytokin-Stimulation im Vergleich mit unbehandelten Endothelzellen deutlich zu. Auch die zytosolische CD40-Menge war nach Stimulation mit IFN- γ und TNF- α erhöht. Anders verhielt es sich nach Koinkubation der Endothelzellen mit CD154-positiven Myelomzellen (Abb. 19B). Hier war weder die Menge an nukleärem noch zytosolischem Protein verändert.

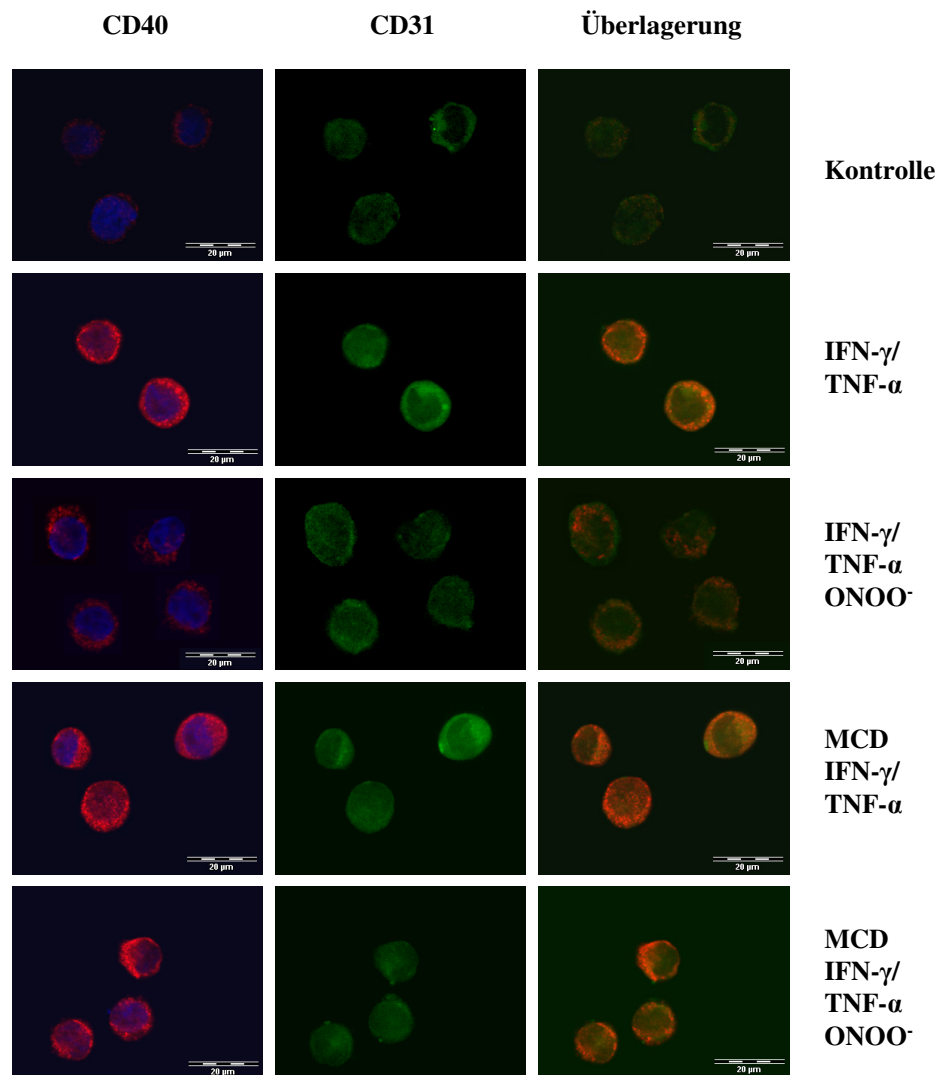


Abbildung 20: Effekt von Methyl- β -Cyclodextrin auf die ONOO $^-$ -induzierte Umverteilung von CD40 nach Zytokin-Stimulation in humanen Monozyten.

THP-1-Zellen wurden für 16 Stunden mit IFN- γ (1000 U/ml) und TNF- α (100 U/ml) stimuliert und anschließend für 30 Minuten mit Methyl- β -Cyclodextrin (MCD, 5 μ M) inkubiert bevor die Zellen mit ONOO $^-$ (160-200 μ M, 60 Minuten) behandelt wurden. Gezeigt wird eine für 3 unabhängige Versuche repräsentative Färbung mit spezifischen Antikörpern gegen CD40 (rot) und CD31 (grün) und deren Überlagerung. Die Zellkerne wurden zur besseren Orientierung mit Dapi (blau) gefärbt. Die Zellen wurden mit 400-facher Vergrößerung aufgenommen. Der Balken stellt 20 μ m dar.

3.3.10 Methyl- β -Cyclodextrin verhindert die durch ONOO⁻ induzierte Umverteilung von CD40 in humanen THP-1-Monozyten

Da im Western Blot eine deutliche ONOO⁻-abhängige Abnahme des CD40-Proteingehalts in THP-1-Zellen nachweisbar war, wurden zusätzliche Immunfluoreszenz-Analysen der Zellen durchgeführt, die eine mögliche Internalisierung des Proteins zeigen sollten.

In den unbehandelten Kontrollzellen war nur wenig CD40-Protein in vesikulären Strukturen im Zytoplasma nachweisbar. Die Stimulation mit IFN- γ und TNF- α führte zu einem deutlichen Anstieg der CD40-Proteinmenge und auch zu einer deutlichen Lokalisation des Proteins in der Zellmembran (Abb. 20). Wurden die Zellen darüber hinaus mit ONOO⁻ behandelt, nahm die membranäre CD40-Färbung deutlich ab, wogegen der CD40-Nachweis in vesikulären Strukturen deutlich zunahm (Abb. 20). Die Depletierung des Cholesterins in der Plasmamembran mit Methyl- β -Cyclodextrin verhinderte diese Peroxynitrit-induzierte Umverteilung von CD40. Die Lokalisation von CD40 in der Plasmamembran wurde durch Überlagerung von roter (CD40) und grüner (Oberflächenprotein CD31) Fluoreszenz (Gelbfärbung) nachgewiesen (Abb. 20).

3.4 Tyrosinnitrierung von CD40 und deren Auswirkung auf die CD40-Funktion

Bislang konnte nur in den humanen Monozyten nicht aber in den Endothelzellen eine ONOO⁻-medierte Internalisierung von immunreaktivem CD40 nachgewiesen werden. Aus diesem Grund sollten im Folgenden die funktionellen Konsequenzen dieser mutmaßlichen Endozytose von Tyrosin-nitriertem CD40 analysiert werden. Die CD154-abhängige Expression der Interleukin-12 (IL-12) Untereinheit IL-12p40 und von E-Selektin dienten hierbei als Readout-Parameter für CD40-abhängige Änderungen der Genexpression.

3.4.1 Effekt von ONOO⁻ und Urat auf die CD154-abhängige IL-12p40- und E-Selektin-Expression in statisch kultivierten HUVECs

Zunächst sollte untersucht werden, inwieweit eine Tyrosinnitrierung von CD40 sich auf die Expression CD154-abhängiger Genprodukte wie IL-12p40 und E-Selektin auswirkt. HUVECs wurden für 1 Stunde mit ONOO⁻ inkubiert, gefolgt von einer 6-stündigen Kokultur mit CD154-positiven Myelomzellen. Die Stimulation mit CD154-positiven Myelomzellen hatte einen signifikanten Anstieg sowohl der IL-12p40- als auch der E-Selektin-Expression auf mRNA-Ebene zur Folge (Abb. 21). Die Spezifität der Reaktion wurde mit Hilfe eines spezifischen blockierenden Anti-CD154-Antikörpers überprüft, welcher die Myelomzellen-induzierte Expression beider Genprodukte verhinderte.

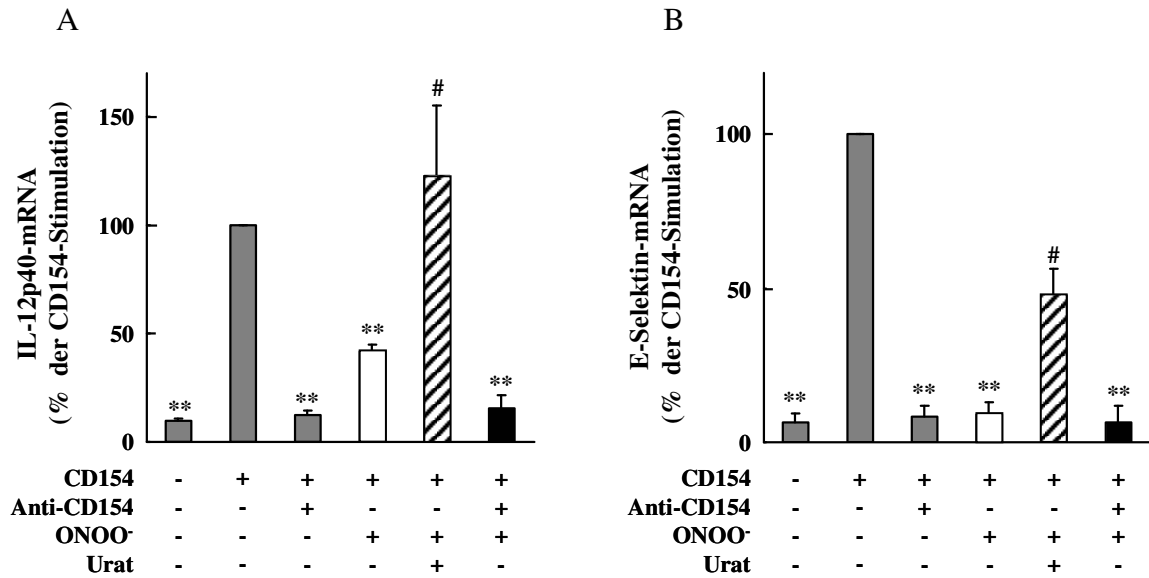


Abbildung 21: Effekt von ONOO⁻ und Urat auf die CD154-induzierte Expression von IL-12p40 und E-Selektin-mRNA in HUVECs.

Gezeigt ist die Auswirkung von ONOO⁻ (160-200 μ M, 60 Minuten) und seinem Scavenger Urat (10 μ M, 30 Minuten Vorinkubation) auf die CD154-abhängige mRNA-Expression von (A) IL-12p40 und (B) E-Selektin, relativ zum internen Standard RPL-32. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus jeweils 5 unabhängigen Experimenten (** P < 0.01 vs. CD154; # P < 0.01 vs. CD154 + ONOO⁻).

Die Inkubation der HUVECs mit exogenem ONOO⁻ verminderte die CD154-induzierte IL-12p40-mRNA-Expression um etwa 60% verglichen mit den stimulierten Kontrollzellen. Die CD154-induzierte E-Selektin-mRNA-Expression wurde sogar komplett inhibiert. Eine zusätzliche Inkubation der Zellen mit dem ONOO⁻-Scavenger Urat konnte die Peroxynitrit-vermittelte Hemmung der IL-12p40-Expression vollständig, die für E-Selektin nur partiell aber signifikant aufheben (ca. 50% verglichen mit den CD154-stimulierten Kontrollzellen).

Als nächstes wurden die auf mRNA-Ebene erzielten Ergebnisse für IL-12p40 auf Proteinebene überprüft. Hierfür wurde die Dauer der Kokultur mit den CD154-positiven Myelomzellen von 6 auf 24 Stunden verlängert und das konditionierte Medium im ELISA analysiert. Abb. 22 zeigt, dass sich das Ergebnis der PCR-Analyse auch auf der Proteinebene einwandfrei reproduzieren ließ. Dabei zeigte der alleinige Zusatz von Urat keinen Effekt auf die CD154-induzierte Freisetzung von IL-12p40 in den Mediumüberstand der Endothelzellen.

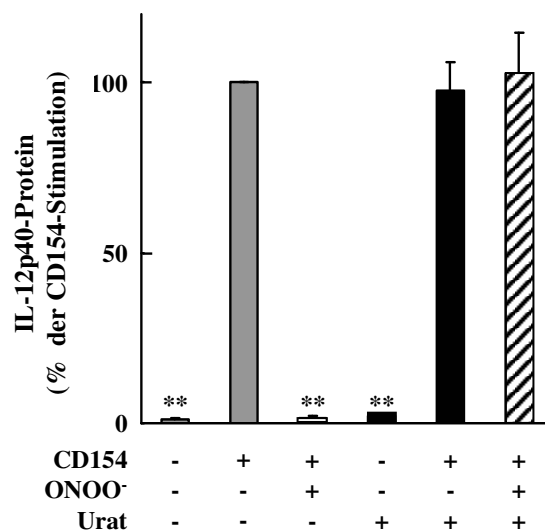


Abbildung 22: Effekt von ONOO⁻ und Urat auf die CD154-induzierte IL-12p40-Protein-Expression in HUVECs.

Gezeigt sind die Effekte von ONOO⁻ (160-200 μ M, 60 Minuten) mit und ohne Vorbehandlung mit Urat (10 μ M, 30 Minuten Vorinkubation) auf die CD154-induzierte IL-12p40-Protein-Expression in Mediumüberständen von HUVECs. Nachfolgend fand eine 24-stündige Kokultur mit CD154-positiven Myelomzellen gefolgt von einem ELISA mit dem Kulturüberstand statt. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM von 3 unabhängigen Experimenten (** P < 0.01 vs. CD154-Stimulation).

3.4.2 Methyl- β -Cyclodextrin verhindert die ONOO⁻-abhängige Abnahme der CD154-induzierten IL-12p40- und E-Selektin-Expression in HUVECs

Im nächsten Schritt sollte überprüft werden, ob die durch ONOO⁻ ausgelöste Verminderung der CD154-induzierten IL-12p40- und E-Selektin-mRNA-Expression einer Entfernung durch Internalisierung des CD40-Rezeptors von der Zelloberfläche bzw. einem durch die Tyrosinnitrierung ausgelöstem Funktionsverlust des Proteins zuzuschreiben ist. Dazu wurden die kultivierten Endothelzellen vor der Behandlung mit ONOO⁻ und der nachfolgenden Kokultur mit CD154-positiven Myelomzellen mit Methyl- β -Cyclodextrin (MCD) inkubiert, um das Cholesterin in den Zellmembranen zu depletieren und somit eine Internalisierung von CD40 zu verhindern.

Wie bereits in vorhergehenden Versuchen beobachtet, war die CD154-stimulierte IL-12p40- und E-Selektin-mRNA-Expression nach kurzer Exposition gegenüber ONOO⁻ signifikant gehemmt (Abb. 23). Die Vorinkubation mit MCD hatte keinen Effekt auf den basalen IL-12p40- bzw. E-Selektin-mRNA-Spiegel. Bei Stimulation mit CD154 bewirkte die

Vorinkubation mit MCD dahingegen nahezu eine Verdopplung der CD154-induzierten IL-12p40- und E-Selektin-mRNA-Mengen (Abb. 23A und B).

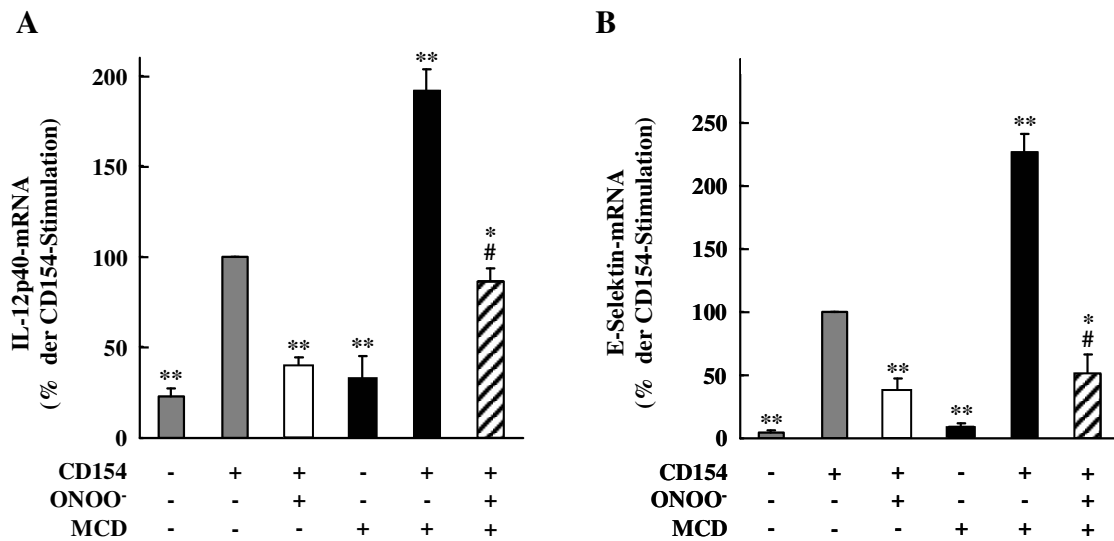


Abbildung 23: Effekt von ONOO⁻ und Methyl- β -Cyclodextrin (MCD) auf die CD154-abhängige IL-12p40- und E-Selektin-mRNA-Expression in HUVECs.

Statistische Zusammenfassung der (A) IL-12p40- und (B) E-Selektin-mRNA-Mengen in % bezogen auf die CD154-Stimulation. HUVECs wurden mit MCD (5 μ M, 30 Minuten Vorinkubation) und ONOO⁻ (160-200 μ M, 60 Minuten) behandelt und nachfolgend 6 Stunden mit CD154-positiven Myelomzellen kokultiviert. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von 4 unabhängigen Experimenten (** P < 0.01 vs. CD154; * P < 0.01 vs. ONOO⁻ + CD154; # P < 0.01 vs. MCD + CD154).

Nach Applikation von ONOO⁻ war dieser Effekt von MCD auf die IL-12p40-Expression nahezu halbiert aber noch doppelt so groß wie nach alleiniger Peroxynitritexposition (Abb. 23A). Die CD154-stimulierte Expression von E-Selektin wurde durch ONOO⁻ nach MCD-Vorbehandlung sogar auf einen vergleichbaren Wert wie mit ONOO⁻ alleine gesenkt (Abb. 23B). Insofern scheint die durch ONOO⁻ ausgelöste Tyrosinnitrierung von CD40 zumindest einen teilweisen Funktionsverlust des Rezeptors zur Folge zu haben. Andererseits schließen diese Experimente eine Internalisierung und nachfolgende proteasomale Degradation des Proteins nicht aus.

3.4.3 Der ONOO⁻-bedingte Funktionsverlust von CD40 ist offenbar nicht durch dessen Abbau über das 20S-Proteasom bedingt

Im Folgenden sollte deshalb geklärt werden, ob der Funktionsverlust von CD40 mit dessen Depletierung von der Zelloberfläche und dem nachfolgenden Abbau über das 20S-Proteasom assoziiert ist. Sowohl Urat wie auch MCD konnten in diesen Versuchen die nach ONOO⁻-

Exposition verminderte CD154-stimulierte Expression von IL-12p40 und E-Selektin wieder herstellen. Damit konnten die Ergebnisse der vorangegangenen Experimente bestätigt werden. Im Gegensatz dazu verringerte Lactacystin alleine die CD154-stimulierte Expression beider Genprodukte signifikant. Darüber hinaus war die Inhibierung des 20S-Proteasoms nicht in der

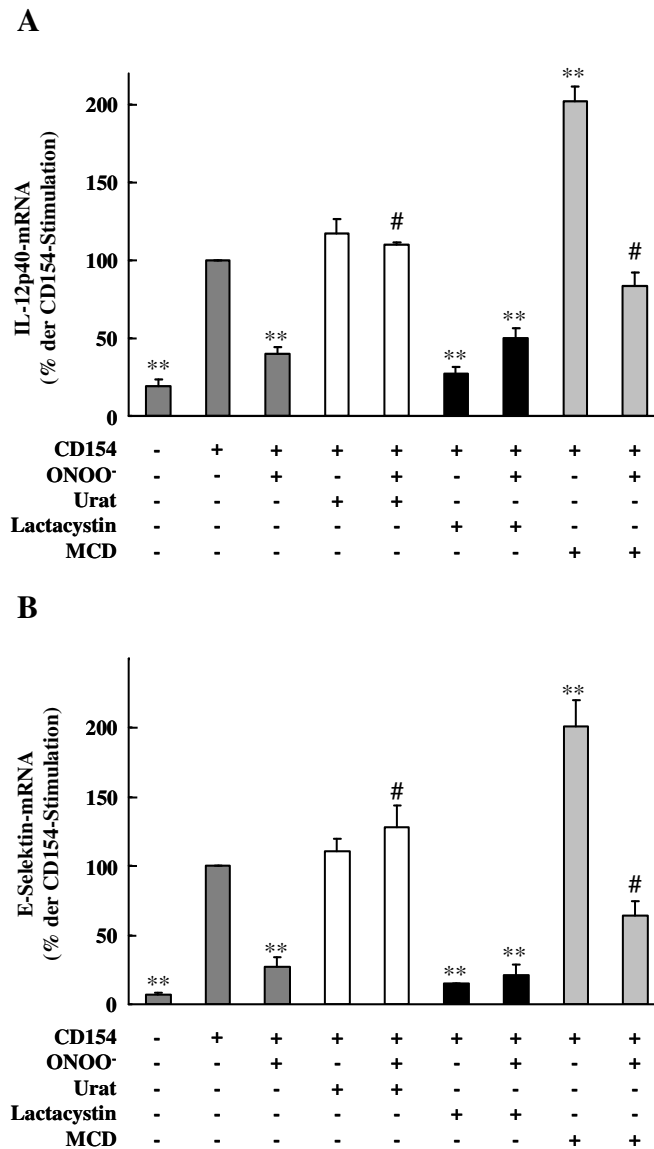


Abbildung 24: Vergleich der Wirkung von Urat, Lactacystin und MCD auf die CD154-abhängige (A) IL-12p40- und (B) E-Selektin-mRNA-Expression in HUVECs.

Die kultivierten Zellen wurden für 30 Minuten mit Lactacystin (50 μ M), Urat (10 μ M) oder Methyl- β -Cyclodextrin (MCD; 5 μ M) und nachfolgend für 60 Minuten mit ONOO⁻ (160-200 μ M) behandelt. Anschließend erfolgte eine Kokultur mit CD154-exprimierenden Myelomzellen für 6 Stunden. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus 3 unabhängigen Experimenten (** P < 0,01 vs. CD154; # P < 0,01 vs. CD154 + ONOO⁻).

Lage, den Peroxynitriteffekt aufzuheben (Abb. 24). Trotz der überraschenden Eigenwirkung von Lactacystin kann man aus diesen Befunden dennoch vorsichtig schlussfolgern, dass die durch hohe exogene Konzentration von ONOO^- induzierte Tyrosinnitrierung von CD40 eher zu einem Funktionalitätsverlust des Proteins führt.

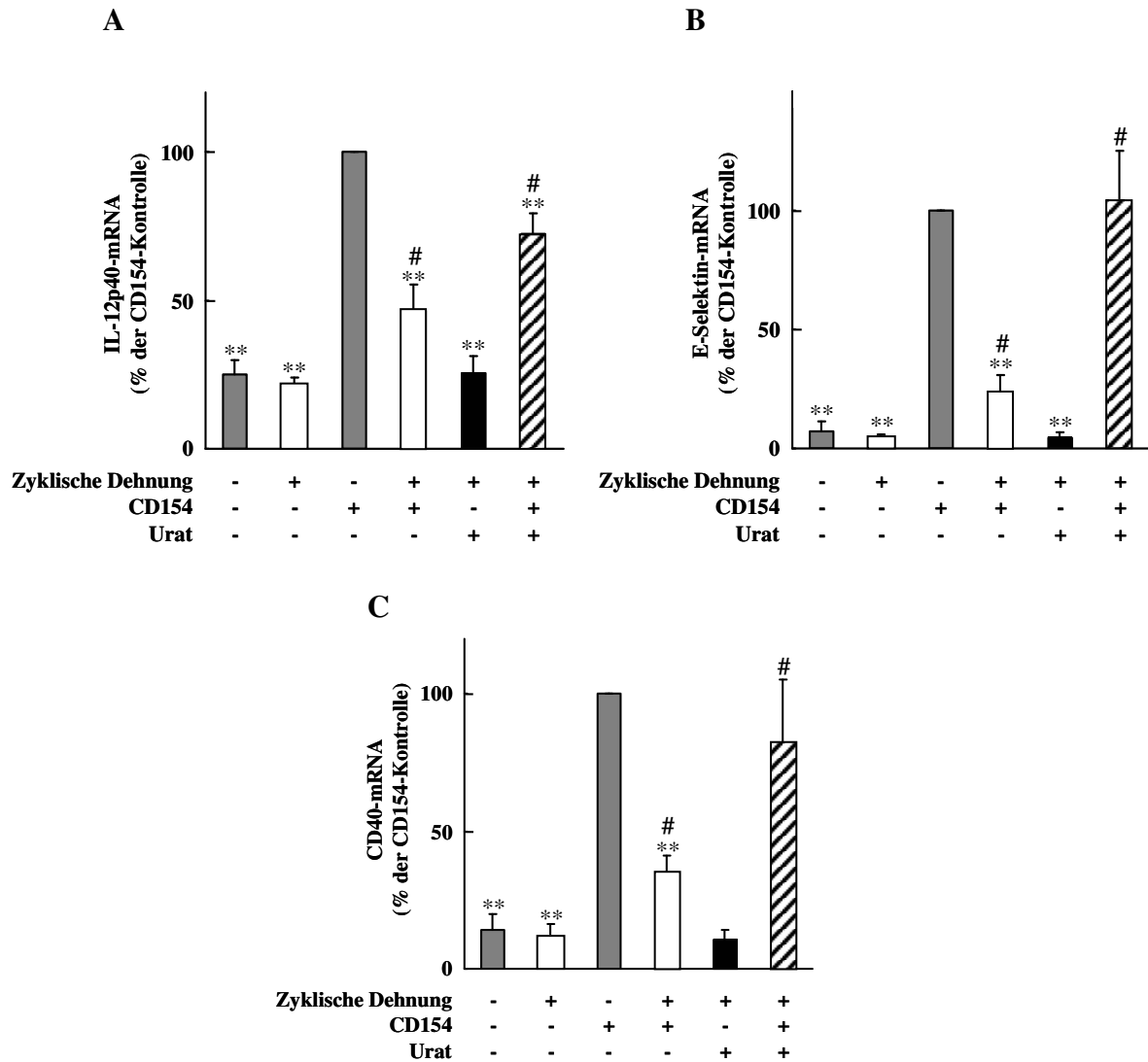


Abbildung 25: Effekt von zyklischer Dehnung auf die CD154-abhängige Expression von (A) IL-12p40-, (B) E-Selektin- und (C) CD40-mRNA in kultivierten HUVECs.

Die kultivierten Zellen wurden für 30 Minuten mit Urat ($10 \mu\text{M}$) vorbehandelt und anschließend zyklisch gedehnt (16 Stunden, 16% Elongation, 0,5 Hz). Danach folgte die Stimulation mit CD154-positiven Myelomzellen für 6 Stunden. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM aus jeweils 4 unabhängigen Experimenten (** $P < 0.01$ vs. Ungedehnt, # $P < 0.01$ vs. Dehnung + CD154).

3.4.4 Zyklische Dehnung reduziert die CD154-induzierte Expression von IL-12p40- und E-Selektin in Endothelzellen

Zyklische Dehnung per se hatte auf mRNA-Ebene keinen Effekt auf die Basalexpression von IL-12p40 und E-Selektin. In Endothelzellen, die vor der CD154-Stimulation für 16 Stunden zyklisch gedehnt worden waren, war der mRNA-Spiegel von IL-12p40 um 50% und der von E-Selektin sogar um 75% reduziert (Abb. 25). Die Vorbehandlung mit Urat führte zu einem Wiederanstieg der IL-12p40-Expression auf ca. 80 % des Kontrollwertes (Abb. 25A). Die E-Selektin-Expression war unter diesen Bedingungen sogar genau so hoch wie in den CD154-stimulierten Kontrollzellen (Abb. 25B). Die basale Expression beider Genprodukte war dagegen durch Urat nicht beeinflusst (Abb. 25). Interessanterweise verhielt sich die Expression von CD40 in den Endothelzellen genauso wie die von IL-12p40 und E-Selektin (Abb. 25C).

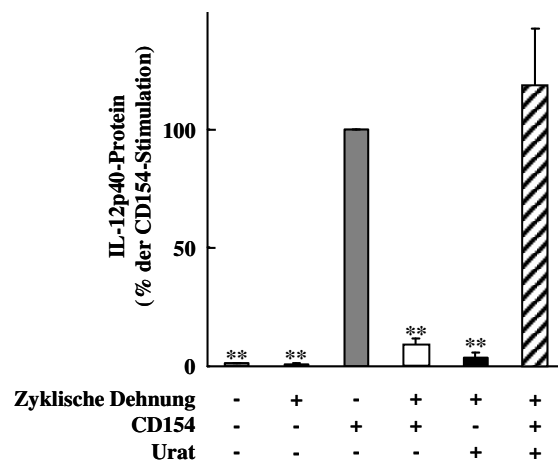


Abbildung 26: Effekt von zyklischer Dehnung und Urat auf die CD154-induzierte Freisetzung von IL-12p40-Protein aus kultivierten HUVECs.

Die Zellen wurden in Gegenwart von Urat (10 μ M, 30 Minuten Vorinkubation) zyklisch gedehnt (16 Stunden, 16 % Elongation, 0,5 Hz) und nachfolgend für 24 Stunden mit CD154-positiven Myelomzellen stimuliert. Dargestellt sind die IL-12p40-Proteinmengen in % der stimulierten Kontrolle in den Kulturüberständen als Mittelwerte \pm SEM von 3 unabhängigen Experimenten. (** P < 0.01 vs. stimulierte Kontrolle).

Die Analyse der IL-12p40-Proteinmengen im konditionierten Medium der gedehnten Endothelzellen erbrachte ein mit der PCR-Analyse vergleichbares Resultat. Dabei war die Konzentration des Proteins in den Überständen ungedehnter und gedehnter Kontrollzellen gleichermaßen gering (Abb. 26). Die Exposition gegenüber den CD154-positiven

Myelomzellen führte in den ungedehnten Endothelzellen zu einer deutlichen Induktion der IL-12p40-Synthese während vorhergehende zyklische Dehnung der Zellen diese um 90% inhibierte (Abb. 26). Der Zusatz von Urat restaurierte die CD154-stimulierte Freisetzung von IL-12p40 vollständig (Abb. 26).

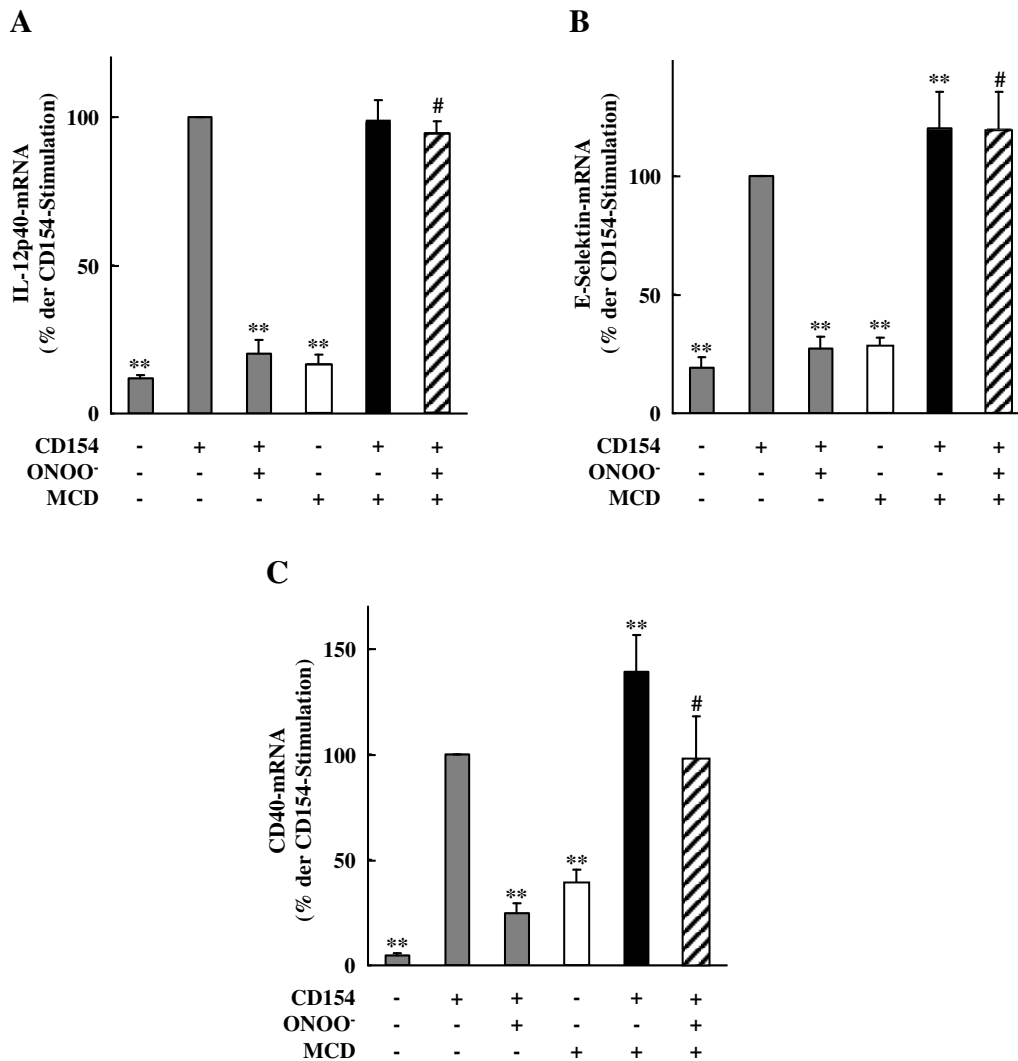


Abbildung 27: Effekt von ONOO⁻ und Methyl- β -Cyclodextrin (MCD) auf die CD154-abhängige Expression von (A) IL-12p40-, (B) E-Selektin- und (C) CD40-mRNA in THP-1-Monozyten.

Die Monozyten wurden für 30 Minuten mit MCD (5 μ M) und anschließend für 60 Minuten mit 160-200 μ M ONOO⁻ behandelt, bevor sie für 6 Stunden mit CD154-positiven Myelomzellen kokultiviert wurden. Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM aus 5 unabhängigen Experimenten. (** P < 0.01 vs. CD154; # P < 0.01 vs. CD154 + ONOO⁻)

3.4.5 ONOO⁻ beeinträchtigt die CD40-Funktion in THP-1-Monozyten

Wie erwähnt, zeigte die Immunfluoreszenzanalyse von THP-1-Zellen eine zumindest partielle ONOO⁻-abhängige Internalisierung des CD40-Rezeptors (siehe Kapitel 3.3.11).

Analog zu den Endothelzellen wurde daher in diesen Zellen untersucht, ob die Tyrosinnitrierung von CD40 die CD154-induzierte IL-12p40- bzw. E-Selektin-Genexpression beeinflusst.

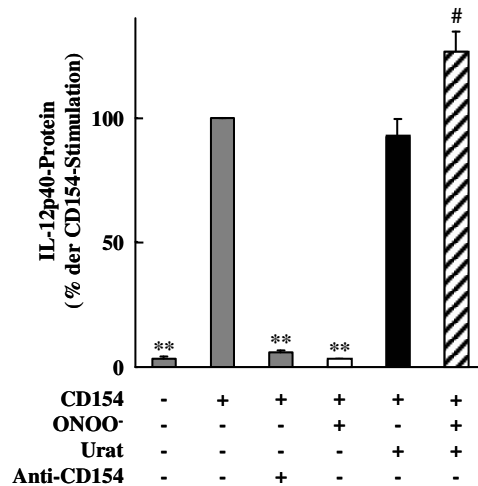


Abbildung 28: Effekt von ONOO⁻ und Urat auf die CD154-induzierte Freisetzung von IL-12p40-Protein aus THP-1-Monozyten.

Dargestellt sind die im Überstand der Zellen detektierten Proteinkonzentrationen in % der CD154-stimulierten Kontrolle. Vor der Stimulation mit den CD154-positiven Myelomzellen (24 Stunden) wurden die humanen Monozyten mit Urat (10 μ M, 30 Minuten) und ONOO⁻ (160-200 μ M, 60 Minuten) behandelt. Die Spezifität der CD40-CD40 Ligand-Interaktion wurde mit einem blockierenden Anti-CD154-Antikörper (40 μ g/ml) verifiziert. Die gezeigten Mittelwerte \pm SEM stammen aus 3 unabhängigen Experimenten (** P < 0.01 vs. CD154; # P < 0.01 vs. CD154 + ONOO⁻).

Die Stimulation des CD40-Rezeptors in diesen Zellen führte zu einer deutlichen Heraufregulierung der mRNA-Spiegel für IL-12p40 und E-Selektin (Abb. 27A und B). Diese war durch Zugabe von ONOO⁻ nahezu auf das Ausgangsniveau gesenkt. Die Vorbehandlung mit Methyl- β -Cyclodextrin (MCD) hob diesen Effekt von ONOO⁻ vollständig auf, hatte aber *per se* keinen Effekt auf die basale bzw. CD154-induzierte Expression beider Genprodukte (Abb. 27A und B). Im Gegensatz zu den kultivierten Endothelzellen verstärkte MCD die CD154-stimulierte Expression von IL-12p40 und E-Selektin nicht. Daher wurde zusätzlich die CD40-mRNA-Expression in den THP-1-Zellen untersucht, um diesbezüglich einen Unterschied zwischen beiden Zelltypen auszuschließen. Die Kokultur der THP-1-Zellen mit den CD154-positiven Myelomzellen führte wie bei den Endothelzellen zu einer signifikanten Steigung der CD40-mRNA-Menge (Abb. 27C). Diese war nach Exposition gegenüber ONOO⁻ signifikant reduziert. MCD-Vorbehandlung verstärkte die CD154-induzierte CD40-

Expression moderat, erhöhte aber auch die basale CD40-Expression in diesen Zellen um einen vergleichbaren Betrag. Darüber hinaus hatte MCD auch in unstimulierten Monozyten einen 6-fachen Anstieg der CD40-mRNA-Menge zur Folge (Abb. 27C). Weiterhin verhinderte MCD wie in den Endothelzellen die ONOO⁻-vermittelte Hemmung der CD154-induzierten CD40-Expression (Abb. 27C).

Wie in den HUVECs wurde auch in den THP-1-Zellen die IL-12p40-Protein-Expression analysiert. Um einen weiteren Einblick in den Verlust der CD40-Funktion zu erhalten, wurde untersucht, inwieweit die inhibitorische Wirkung von ONOO⁻ durch Urat aufgehoben werden kann. Wie bereits auf mRNA-Ebene beobachtet, führte die Stimulation des CD40-Rezeptors zu einer deutlichen Heraufregulierung (25-fach) der IL-12p40-Protein-Expression, die nach ONOO⁻-Exposition nahezu komplett gehemmt war und durch Urat vollständig rekonstituiert werden konnte (Abb. 28).

3.4.6 Die Rekrutierung von Traf 2 und Traf 6 wird durch ONOO⁻ beeinträchtigt

Die bislang beschriebenen Analysen der CD154-induzierten Genexpressionsänderungen in den kultivierten Endothelzellen und Monozyten lassen keine Differenzierung dahingehend zu, ob exogenes bzw. endogenes Peroxynitrit durch Tyrosinnitrierung des CD40-Rezeptors diesen für den Abbau durch das 20S-Proteasom markiert oder zu einer Entkopplung von der nachgestellten Signaltransduktion nach Ligandbindung führt. Insofern wurde in einer abschließenden Serie von Versuchen die Rekrutierung der CD40-Rezeptor-assoziierten Proteine Traf 2 und Traf 6 analysiert.

Hierfür wurden Endothelzellen zunächst mit Urat behandelt, bevor sie kurz mit ONOO⁻ und anschließend mit CD154-exprimierenden Myelomzellen inkubiert wurden. Um eine Aussage über die spezifische Interaktion von CD40 mit Traf 2 bzw. Traf 6 treffen zu können, erfolgte zusätzlich eine CD40-Immunpräzipitation.

In Abbildung 29 ist zunächst die basale Assoziation von Traf 2 und Traf 6 mit dem CD40-Rezeptor ersichtlich. Nach CD154-Stimulation nahm die Menge an Traf 2 deutlich zu, während der Traf 6-Gehalt im Immunpräzipitat weitgehend unverändert blieb. ONOO⁻-Zusatz bewirkte in unstimulierten und CD154-stimulierten Zellen eine deutliche Dissoziation von Traf 2 und Traf 6 vom CD40-Rezeptor. Die Vorbehandlung der Zellen mit Urat hob diesen ONOO⁻-Effekt nicht nur auf, sondern verstärkte sogar die Interaktion beider Traf-Moleküle mit CD40 (Abb. 29).

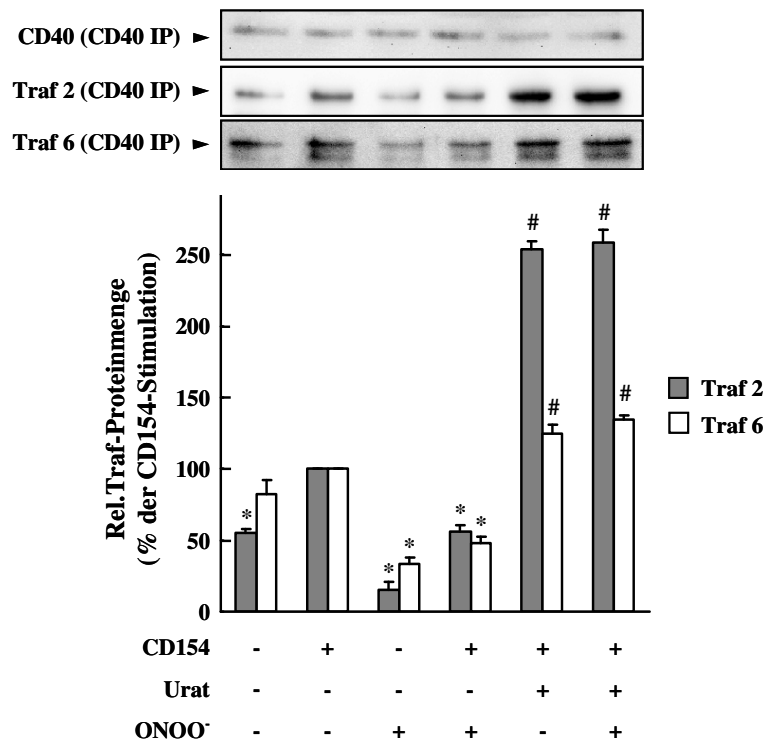


Abbildung 29: Auswirkung von ONOO⁻ und Urat auf die Assoziation von CD40 mit Traf 2 bzw. Traf 6 in Endothelzellen.

Dargestellt sind oben repräsentative Western Blot-Analysen nach CD40-Immunpräzipitation aus kultivierten primären HUVECs. Zuvor erfolgte die Behandlung mit Urat (10 μ M, 30 Minuten Vorinkubation) und ONOO⁻ (160-200 μ M, 15 Minuten), an die sich eine CD154-Stimulation (20 Minuten) anschloss. Unten sind die Mittelwerte \pm SEM von 3 unabhängigen Experimenten gezeigt. (* P < 0.01 vs. CD154; # P < 0,01 vs. CD154 + ONOO⁻).

3.4.7 Methyl- β -Cyclodextrin stellt die durch Peroxynitrit verminderte Traf-Rekrutierung wieder her

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, inwieweit die Rekrutierung von Traf 2 und Traf 6 an den CD40-Rezeptor durch MCD, d.h. eine Depletierung des Cholesterins in der Zellmembran, beeinflusst wird. Wie in Abb. 29 bereits gezeigt, wurde die Assoziation von Traf 2 und Traf 6 mit dem CD40-Rezeptor nach CD154-Stimulation der Endothelzellen deutlich verstärkt. Die Vorbehandlung mit MCD stellte die durch ONOO⁻-Exposition verursachte Dissoziation beider Traf-Moleküle mit dem CD40-Protein wieder her (Abb. 30). Dabei war die rekrutierte Menge von Traf 2 sogar um 50% größer als in stimulierten Kontrollzellen (Abb. 30). Im Gegensatz zu Urat hatte MCD selbst keinen Effekt auf die CD154-stimulierte Rekrutierung der beiden Traf-Moleküle.

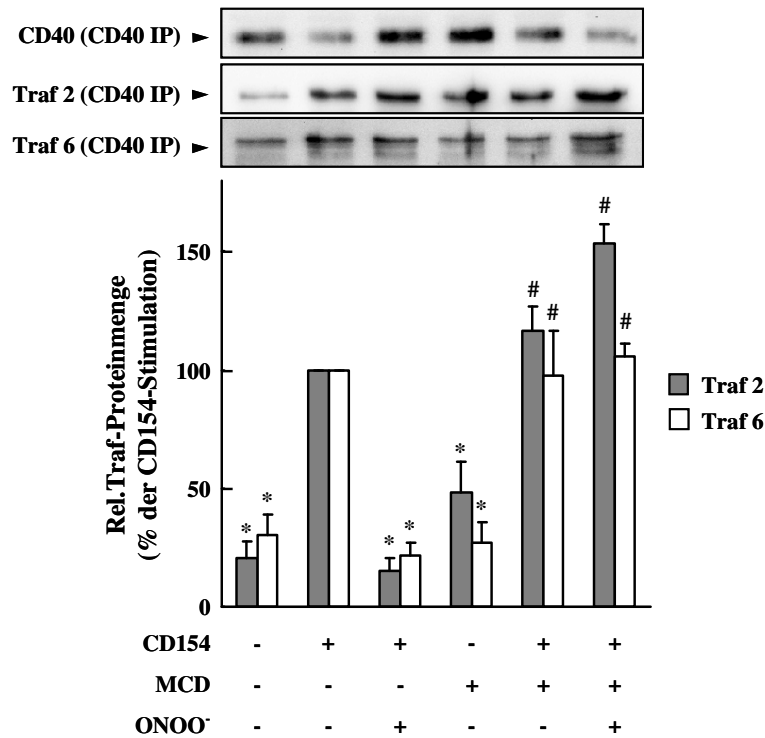


Abbildung 30: Wirkung von MCD und ONOO⁻ auf die Assoziation von CD40 mit Traf 2 bzw. Traf 6 in Endothelzellen.

Dargestellt sind oben repräsentative Western Blot-Analysen nach CD40-Immunpräzipitation aus kultivierten HUVECs. Zuvor erfolgte die Behandlung mit Methyl- β -Cyclodextrin (MCD, 5 μ M, 30 Minuten Vorinkubation) und ONOO⁻ (160-200 μ M, 15 Minuten), an die sich eine CD154-Stimulation (20 Minuten) anschloss. Unten sind die Mittelwerte \pm SEM von 3 unabhängigen Experimenten gezeigt. (* P < 0.01 vs. CD154; # P < 0,01 vs. CD154 + ONOO⁻).

3.4.8 Effekt zyklischer Dehnung auf die Rekrutierung von Traf 2 und Traf 6

Schließlich wurden noch Dehnungsexperimente durchgeführt, um den Effekt von endogen generiertem ONOO⁻ auf die CD154-vermittelte Assoziation von Traf 2 bzw. Traf 6 mit CD40 zu analysieren.

In Proben von ungedehnten HUVECs war nach CD40-Immunpräzipitation sowohl Traf 2 als auch Traf 6 nachweisbar. Eine 3-stündige (Abb. 31A) ebenso wie 16-stündige Dehnung (Abb. 31B) ohne CD154-Stimulation führte zu einer deutlichen Rekrutierung von Traf 2 wie auch Traf 6 an den CD40-Rezeptor. Die Menge rekrutierter Traf-Moleküle war mit der nach CD154-Stimulation ungedehnter Zellen vergleichbar. Im Gegensatz dazu war die CD154-induzierte Assoziation von Traf 2 und Traf 6 mit dem CD40-Rezeptor durch zyklische Dehnung und Urat (10 μ M) nicht verändert (nicht gezeigte Ergebnisse).

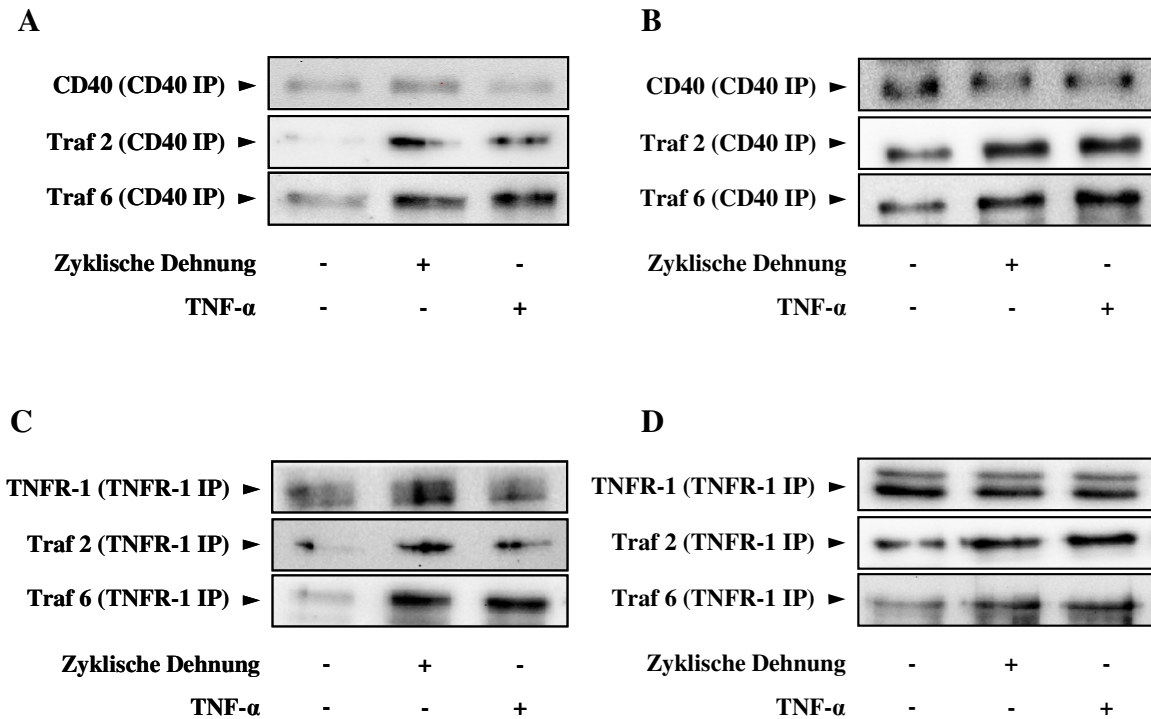


Abbildung 31: Zyklische Dehnung vermittelt die Assoziation von Traf 2 bzw. Traf 6 an CD40 und TNFR-1 in humanen kultivierten Endothelzellen.

Dargestellt sind repräsentative Western Blots nach CD40-Immunpräzipitation (A und B) bzw. TNFR-1-Immunpräzipitation (C und D). Vor der IP wurden die HUVECs für 3 Stunden (A und C) bzw. 16 Stunden (B und D) zyklisch gedehnt (16% Elongation, 0,5 Hz). Als Positivkontrollen wurden ungedehnte Zellen entweder für 20 Minuten mit CD154 (A und B) oder für 60 Minuten mit TNF- α (100 U/ml) (C und D) stimuliert. Die gezeigten Ergebnisse stehen stellvertretend für je 3 unabhängige Experimente.

Um zu überprüfen, ob es sich bei diesen Ergebnissen um einen generell durch zyklische Dehnung verursachten Effekt handelt, wurden zusätzliche Versuche durchgeführt, bei denen der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor (TNFR)-1 immunpräzipitiert wurde. Auch hier waren sowohl Traf 2 als auch Traf 6 in ungedehnten Zellen schwach mit dem TNFR-1 assoziiert (Abb. 31C und D). Nach drei Stunden Dehnung war dieser Effekt deutlich ausgeprägter und weitgehend identisch mit dem einer 60-minütigen Stimulation mit TNF- α (Abb. 31C). Auch nach 16 Stunden Dehnung schien die Assoziation von Traf 2 bzw. Traf 6 mit dem CD40-Rezeptor vergleichbar mit der nach 3 Stunden zu sein (Abb. 31D).

4. Diskussion

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass CD40 in humanen Endothelzellen während zyklischer Dehnung vermutlich durch das dabei entstehende Peroxynitrit (ONOO⁻) an seinen Tyrosinresten nitriert wird. Nitrotyrosin-haltiges CD40 wird anschließend schnell über die 20S-Untereinheit des Proteasoms abgebaut. Weiterhin war die CD154-abhängige Expression von IL-12p40 und E-Selektin ebenso wie die Rekrutierung von Traf-Proteinen mit CD40 durch diese posttranskriptionelle Modifikation stark beeinträchtigt.

4.1 Charakterisierung der Expressionsmuster von CD40 und VCAM-1 in venösen und arteriellen Endothelzellen

CD40 wird eine zentrale Rolle bei der Kontrolle inflammatorischer Prozesse wie z.B. der Transplantatabstoßung oder der Arteriosklerose zugeschrieben. Eine weitere Schlüsselrolle in der Arterioskleroseentstehung nimmt das Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1) ein, welches auf aktivierten Endothelzellen verstärkt exprimiert wird und so zur initialen Rekrutierung zirkulierender Monozyten führt (Libby 2006). In Experimenten mit LDL-Rezeptor-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Neutralisierung des CD40-Liganden CD154 zu einer deutlichen Reduktion des Gehalts von Makrophagen, T-Zellen, Lipiden und VCAM-1 in arteriosklerotischen Läsionen führt (Mach et al., 1998, Lutgens et al., 1999, Schönbeck et al., 2000). Darüber hinaus beschrieben Lienenlücke et al. (2000) eine verstärkte Expression von ICAM-1, VCAM-1 und E-Selektin in humanen Endothelzellen nach CD40-Stimulation. Die Expression von VCAM-1 und CD40 in Endothelzellen kann auch durch pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 β , TNF- α und IFN- γ ausgelöst werden, die in arteriosklerotischen Plaques hochreguliert sind (Schönbeck und Libby, 2001). Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zur Zytokin-induzierten CD40- und VCAM-1-Expression in humanen nativen Endothelzellen bestätigen die bisher veröffentlichten Daten zu den kultivierten Zellen. So waren sowohl CD40 als auch VCAM-1 durch TNF- α und IFN- γ in venösen, nicht jedoch in arteriellen Endothelzellen induzierbar. Weiterhin ergaben die histologischen Untersuchungen eine geringe Basalexpression von CD40 und VCAM-1 in venösen nicht aber in arteriellen Endothelzellen. Dies bestätigt Beobachtungen in NMRI-Mäusen, die eine Expression von CD40 nur in Endothelzellen von Venen und Kapillaren nicht aber Arterien zeigen (Korff et al., 2007).

Weiterhin berichten Korff et al. (2007) von einer Zunahme der CD40-Proteinmenge in humanen Endothelzellen, wenn diese aus dem Gewebeverband isoliert worden waren. In den

hier durchgeführten Experimenten konnte eine Basalexpression von CD40 sowohl in isolierten venösen als auch in kultivierten arteriellen Endothelzellen detektiert werden. Interessanterweise war auch eine Basalexpression von VCAM-1 in kultivierten, nicht aber in nativen arteriellen Endothelzellen detektierbar. Venöse Endothelzellen der postkapillären Venolen stellen die Hauptinteraktionspartner für Leukozyten unter Entzündungsbedingungen dar. In arteriellen Endothelzellen z.B. an Gefäßverzweigungen würde die Expression von CD40 und VCAM-1 allerdings das Risiko der Arterioskleroseentstehung erheblich verstärken. Somit ist die Basalexpression von CD40 und VCAM-1 in kultivierten arteriellen Endothelzellen zum einen mit der fehlenden Wandschubspannung unter statischen Zellkulturbedingungen zu begründen, welche im Gefäß durch den laminaren Blutfluss ausgelöst wird. Diese mechanische Kraft hat eine Steigerung der Expression und Aktivität der endothelialen NO-Synthase zur Folge (Fisslthaler et al., 2000). Das schubspannungsabhängig gebildete NO verhindert die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die zur Expression pro-arteriosklerotischer Genprodukte wie CD40 führen. Korff et al. (2007) vermuten zum anderen, dass die unterschiedlichen Expressionsmuster nativer bzw. kultivierter Endothelzellen auf ein fehlendes TGF- β 1-Signal aus glatten Gefäßmuskelzellen zurückzuführen ist. TGF- β 1 gilt als ein Schlüsselregulator in der Kommunikation zwischen Endothel- und glatten Muskelzellen *in situ* (Bobik, 2006).

Demnach liefern die vorgenannten Befunde einen klaren Hinweis darauf, dass Endothelzellen unterschiedlicher Ursprungsgefäße in der Kultur ein ähnliches Verhalten zeigen. Somit erübrigt sich die Frage, inwieweit sich grundlegende Erkenntnisse aus *in vitro*-Versuchen ohne weiteres auf die Situation des Gefäßendothels *in vivo* übertragen lassen.

4.2 Tyrosinnitrierung von CD40 und proteasomaler Abbau

Bereits seit Mitte des 19. Jahrhunderts ist bekannt, dass arteriosklerotische Veränderungen bevorzugt an Verzweigungen bzw. Biegungen der großen Arterien entstehen. Dies ist zweifelsohne den besonderen hämodynamischen Bedingungen an diesen Orten zuzuschreiben. Unter normalen Flussbedingungen führt laminare Schubspannung zu einer erhöhten Expression von Superoxid-Dismutase (SOD) und endothelialer NO-Synthase (eNOS) und auch zu einer erhöhten eNOS-Aktivität (Gimbrone et al., 2000). Letztendlich resultiert dies in der Bildung vasoprotektiver Mengen von NO. An Gefäßverzweigungen ist der laminare Fluss vermindert und es kommt gleichzeitig zu einer pulsatilen Dehnung der Gefäßwand. Durch diese hämodynamische Besonderheit wird die mechanosensitive NADPH-Oxidase NOX2 aktiviert (Silacci et al., 2001, Dworakowski et al., 2003). Die dadurch erhöhte O_2^- -Bildung

hat unter anderem einen Abfall des biologisch aktiven NO durch die Bildung von ONOO⁻ zur Folge (Cai und Harrison, 2000). Das so entstehende Ungleichgewicht von NO und 'O₂⁻ führt in Endothelzellen zu einer verstärkten Expression pro-arteriosklerotischer Genprodukte wie Adhäsionsmolekülen (VCAM-1) und auch von CD40.

Im Wesentlichen bauen die hier durchgeführten Untersuchungen auf den Ergebnissen einer medizinischen Doktorarbeit auf (Baumgarten, 2004). Dabei wurde beobachtet, dass es in humanen kultivierten Nabelschnurvenen-Endothelzellen bei zyklischer Dehnung zu einer kurzfristigen Zunahme des CD40-Proteingehalts kommt (3 Stunden), nach 6 Stunden das Ausgangsniveau erreicht und nach 18 Stunden um 75% unter diesen Wert abgefallen ist. Der Zusatz des unspezifischen Proteasominhibitors MG-132 verhinderte diesen Abfall der CD40-Proteinmenge, der mit einer Tyrosinnitrierung des Proteins assoziiert zu sein schien.

Der Abbau geschädigter oder modifizierter Proteine findet hauptsächlich in ATP-abhängiger Weise über das Ubiquitin-Proteasom-System statt (Ciechanover, 2006). Dabei wird das Ubiquitin zunächst durch ein E1-Ubiquitin-aktivierendes Enzym aktiviert und anschließend von so genannten E2-Ubiquitin-Transport-Enzymen zu den substratspezifischen E3-Ubiquitin-Ligasen transferiert (Ciechanover, 1998). Die E3-Ligasen wiederum markieren ihre Substrat-Proteine mit einem oder mehreren Ubiquitinmolekülen und machen sie so dem Abbau über das 26S-Proteasom zugänglich (Ciechanover, 2000). Die Ausgangshypothese dieser Arbeit, nach der es wie mehrfach beschrieben zu einer Polyubiquitinierung des durch Nitrierung an seinen Tyrosinresten modifizierten CD40 und nachfolgend zu einem Abbau über das 26S-Proteasom kommt (Grune et al., 1998, Young et al., 1998, Buchczyk et al., 2003), konnte überraschenderweise nicht bestätigt werden. Zwar war der dehnungsabhängige Abbau von CD40 durch Hemmung der E3-Ubiquitin-Ligasen mit dem Dipeptid Leu-Ala vermindert (Baumgarten, 2004), der Nachweis einer Mono- oder Polyubiquitinierung des Proteins konnte jedoch trotz diverser experimenteller Ansätze nicht geführt werden. Andererseits belegten die im zellfreien System durchgeführten Experimente, dass die 20S-Untereinheit des 26S-Proteasoms grundsätzlich in der Lage ist CD40 abzubauen und dass dieser Abbau durch die Tyrosinnitrierung des Proteins beschleunigt wird.

Weiterhin bestand die Möglichkeit, dass CD40 über das lysosomale System degradiert wird. Vor allem bei membranständigen Proteinen wie Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, Hormone und Zytokine kommt es nach deren Aktivierung zu einer Polyubiquitinierung und infolgedessen zu einem Transfer zu den Lysosomen, wo letztendlich der Abbau der markierten Proteine erfolgt (Raiborg und Stenmark, 2009). So wird beispielsweise der Rezeptor für EGF nach Bindung seines Liganden noch in der Membran polyubiquitiniert,

anschließend in frühen Endosomen internalisiert und im lysosomalen Kompartiment abgebaut (Katzmann und Odorizzi, 2002). Für den Abbau des Nitrotyrosin-haltigen CD40 konnte diese Alternative durch die fehlende Wirkung der entsprechenden Inhibitoren weitgehend ausgeschlossen werden.

Eine weitere Möglichkeit der oxidativen Proteinmodifikation mit anschließendem Abbau wurde unter anderem von Souza et al. (2000) beschrieben. So wird die $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ -Superoxiddismutase (SOD-1) an ihren Tyrosinresten nitriert und dadurch dem Abbau über die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität des 20S-Proteasoms zugeführt. Dieser Prozess ist komplett unabhängig von Ubiquitin und ATP und wurde auch für andere Proteine wie z.B. die Glutamin-Synthase beschrieben (Görg et al., 2007). Die Ergebnisse der vorliegenden Studie aus Dehnungsexperimenten mit spezifischen Inhibitoren gegen das proteasomale System weisen im Fall von CD40 eindeutig auf den zuletzt erwähnten Mechanismus hin. So konnten sowohl der spezifische 26S-Inhibitor Lactacystin wie auch das die 20S-Untereinheit des Proteasoms hemmende Epoxomicin die Abnahme der CD40-Proteinmenge nach zyklischer Dehnung verhindern. Im zellfreien System wurde, wie bereits erwähnt, das Tyrosin-nitrierte CD40 über das 20S- nicht aber über das 26S-Proteasom degradiert. Bei diesem Ansatz ließ sich zunächst kein Unterschied zwischen dem Nitrotyrosin-haltigen und dem unmodifizierten Protein feststellen, offenbar weil die Aktivität des rekombinanten Proteasoms für die gewählte Inkubationsdauer zu hoch war. Durch Verkürzung der Expositionszeit gelang es schließlich einen schnelleren Abbau der Nitrotyrosin-haltigen Form durch das 20S-Proteasom zu verifizieren.

Neben der normalen Lokalisation gibt es seit einigen Jahren Hinweise auf eine extrazelluläre, zirkulierende Form des 20S-Proteasoms. Dieses weist alle drei substratspezifischen Aktivitäten (Chymotrypsin-, Trypsin- und Caspase-ähnliche Aktivität) der intrazellulären Variante auf (Sixt und Dahmann, 2008). Allerdings ließ sich im Rahmen dieser Arbeit kein 20S-Proteasom im konditionierten Medium humaner gedehnter Endothelzellen nachweisen. Insofern scheint unter Zellkulturbedingungen kein extrazellulärer Abbau des Tyrosin-nitrierten CD40 stattzufinden. Das schließt aber nicht aus, dass diese Komponente im nativen Kontext *in situ*, d.h. im arteriosklerotischen Plaque, nicht zumindest anteilig realisiert ist.

Die Nitrierung von Tyrosinresten in Proteinen wird hauptsächlich über eine spontane Reaktion von ONOO^- mit dem aromatischen Ring der Aminosäure Tyrosin katalysiert (Ischiropoulos, 1998). Am Beispiel der Cyclooxygenasen 1 und 2 wird deutlich, dass bereits sehr geringe Peroxynitritkonzentrationen (0,1-3 μM) ausreichen, um die Proteine zu nitrieren und dadurch eine schnelle funktionelle Beeinträchtigung hervorzurufen (Ndengele et al.,

2008). Das so entstehende 3-Nitrotyrosin ist nicht nur ein Hinweis auf die Bildung von ONOO^- , sondern wird auch als Marker für Entzündungsreaktionen gewertet. So kann beispielsweise mithilfe immunhistochemischer Färbungen 3-Nitrotyrosin in arteriosklerotischen Plaques nachgewiesen werden. Darüber hinaus wird diese oxidative Modifikation von Proteinen als Marker für das Risiko eines Herzversagens betrachtet (Anzalone et al., 2009) und spielt scheinbar eine Rolle für die Integrität der Blut-Hirn-Schranke (Ischiropoulos und Beckmann, 2003).

1	mvrplqcvl wgclltavhp eppta	crekq ylnsqccsl	cqpgqklvsd cteftetecl
61	pcgesefldt wnreth	chqh kycdpnlglr	vqqkgtsetd tictceegwh ctseacescv
121	lhrscspgfg vkqiatgvsd ticepcpvgf	fsnvssafek chpwtscek	dlvqqagtn
181	ktdvvcgppd rralvipi ifgilfaill	vlvf	kkvak kptnkaphpk qepqeinfpd
241	dlpgsntaap vqetlhgcqp	vtqedgkesr	isvqerq

Abbildung 32: CD40-Aminosäuresequenz.

Die Aminosäuresequenz von CD40 Typ I enthält 2 Tyrosinreste (y, blau markiert: ± 5 Aminosäuren). Neben dem Tyrosin an Position 82 ist ein Prolin (p) wie auch ein negativ geladenes Aspartat (d) zu finden. Diese begünstigen die Nitrierung des Tyrosins durch ONOO^- (s. u.). Weiterhin ist die nukleäre Translokationssequenz (NLS) rot hervorgehoben.

Auch wenn ONOO^- spontan aus der Reaktion von O_2^- mit NO entsteht (Cai und Harrison, 2000), so sind nicht alle Tyrosinreste eines Proteins gleichermaßen für diese oxidative Modifikation empfindlich. Die Bedingungen, die für eine Tyrosinnitrierung erfüllt sein müssen, konnten von Souza et al. (1999) umfassend geklärt werden. Danach scheint die Anwesenheit von Loop-bildenden Aminosäuren (z.B. Prolin oder Glycin) ebenso wie von negativ geladenen Aminosäuren (z.B. Glutamat oder Aspartat) in direkter Nähe zum Tyrosin die Bildung von 3-Nitrotyrosin eindeutig zu begünstigen. CD40 besitzt in seinem extrazellulären N-terminalen Teil zwei Tyrosine. Betrachtet man die zugehörigen Aminosäuresequenzen (Abb. 32), so erfüllt das Tyrosin an Position 31 keine der erwähnten Bedingungen. Im Gegensatz dazu hat das Tyrosin an Position 82 in unmittelbarer Nachbarschaft sowohl ein Aspartat (D_{84}) wie auch ein Prolin (P_{85}). Zurzeit werden diese hypothetischen Überlegungen mithilfe einer massenspektrometrischen Analyse des nitrierten Proteins verifiziert. Interessanterweise scheint bereits die Nitrierung eines Tyrosinrestes einen deutlichen Funktionsverlust des Proteins auszulösen, wie in Mesangialzellen aus Ratten am Beispiel der Prostacyclin-Synthese belegt werden konnte (Zou et al., 1998).

4.3 Subzelluläre Lokalisierung von CD40

Die Endozytose von Rezeptoren auf der Zelloberfläche ist für die Einleitung der Signaltransduktion nach Interaktion mit dem Liganden ebenso von entscheidender Bedeutung wie für deren Regulation. Mittlerweile weiß man, dass bestimmte flache Strukturen in der Membran, die so genannten Lipid Rafts, für die Assoziation von Rezeptoren mit ihren entsprechenden zytoplasmatischen Effektormolekülen essentiell sind (Allen, Halverson-Tamboli und Rasenick, 2007). Lipid Rafts „schwimmen“ frei in der Lipiddoppelschicht der Zellmembran und sind durch eine Anreicherung von Cholesterin, Sphingomyelin und Glycosylphosphatidylinositol- (GPI)-verankerten Proteinen ebenso wie durch eine direkte Assoziation mit dem Zytoskelett charakterisiert (Allen et al., 2007). In Endothelzellen wie auch in anderen Zellen konnte darüber hinaus die Existenz von speziellen invaginierten Lipid Rafts nachgewiesen werden, die sich durch einen hohen Gehalt an Caveolinen, insbesondere Caveolin-1 (Cav-1) auszeichnen. Lipid Rafts und Caveolae stellen sowohl einen räumlichen wie auch zeitlichen Treffpunkt für Oberflächenrezeptoren und Signalmoleküle in der Zelle dar. Ein Beispiel dafür ist der Rezeptor für den Endothelial growth factor (EGF). Dieser ist in den Lipid Rafts lokalisiert und wird in einem ERK 1/2, p38 MAP-Kinase-regulierten, Ligand-vermittelten Prozess internalisiert (Winograd-Katz und Levitzki, 2006). Der CD40-Rezeptor ist in Endothelzellen unter basalen Bedingungen nicht in den Lipid Rafts lokalisiert. Sobald es aber zu einer Interaktion mit CD154 kommt, transloziert CD40 in die Lipid Rafts (Xia et al., 2007) wo er weiterhin mit den Tumornekrosefaktor assoziierten Proteinen (Traf)s assoziiert (Chen et al., 2006).

Wie zuvor beschrieben, befinden sich die beiden Tyrosinreste von CD40 in der extrazellulären Domäne des Proteins. Die Degradierung des Rezeptors über das 20S-Proteasom in den kultivierten Zellen ist dagegen mit aller Wahrscheinlichkeit ein intrazellulärer Prozess. Hierfür ist eine Internalisierung des Nitrotyrosin-haltigen Proteins zwingend erforderlich (Abb. 33). Erste Hinweise für eine derartige Internalisierung lieferten Versuche bei denen Oberflächen-CD40 biotinyliert wurde. Hierbei kann aufgrund der diversen Waschschriffe eine Kontamination mit nicht vollständig verdauten Oberflächen-CD40 weitgehend ausgeschlossen werden. Einen weiteren Hinweis auf eine Lokalisation von CD40 in der Zellmembran der Endothelzellen und Monozyten konnte mithilfe von Western Blot-Analysen erzielt werden, nach denen CD40 stark in der mikrosomalen Fraktion angereichert ist. Allerdings setzt sich diese mikrosomale Fraktion aus allen membranären Strukturen der Zellen zusammen. Ferner konnte eine Peroxynitrit-abhängige Translokation von CD40 von der Plasmamembran ins Zytoplasma der Monozyten mittels

Immunfluoreszenzanalysen gezeigt werden. Aufgrund der hemmenden Wirkung von Methyl- β -Cyclodextrin (MCD) scheint dieser Internalisierungsprozess Cholesterin-abhängig zu sein.

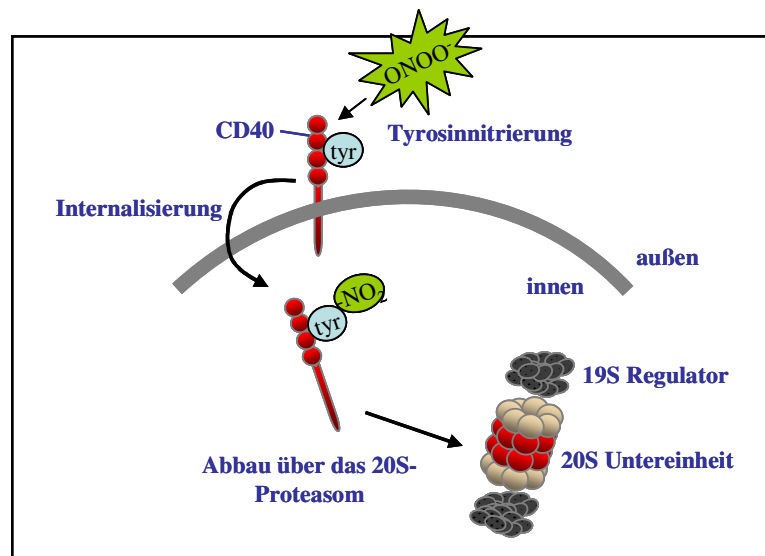


Abbildung 33: ONOO⁻-abhängige Internalisierung des CD40-Rezeptors.

Die Nitrierung eines oder beider Tyrosinreste im extrazellulären Teil von CD40 durch ONOO⁻ hat den intrazellulären Abbau des Proteins über das 20S-Proteasom zur Folge. Dabei scheint die durch die Modifikation ausgelöste Konformationsänderung die Endozytose des Rezeptors einzuleiten. Weiterhin fungiert die Tyrosinnitrierung als Signal für den Abbau durch das 20S-Proteasom und könnte eine Entkopplung zwischen Rezeptor und nachfolgender Signaltransduktion herbeiführen.

In den Endothelzellen konnte dagegen trotz mehrerer Anläufe mit dieser Methode keine eindeutige Lokalisation von CD40 in der Plasmamembran dargestellt werden, obwohl diese für Endothelzellen mehrfach beschrieben worden ist (Chen et al., 2006, Chen et al., 2007). Ein möglicher Grund dafür mag die Lokalisation von CD40 in den Caveolae sein (Chen et al., 2007). Wie bereits erwähnt stellen diese Strukturen Invaginationen der Zellmembran dar, so dass darin lokalisiertes CD40 für einen Antikörper möglicherweise nicht zugänglich ist. Darüber hinaus gibt es Hinweise (Karmann et al., 1995), dass CD40 auf humanen kultivierten Endothelzellen konstitutiv nur in sehr geringer Menge ($5-10 \times 10^3$ Moleküle/ Zelle) exprimiert wird, was dessen Nachweis zusätzlich erschweren dürfte. Darüber hinaus fällt auf, dass die in den meisten Publikationen beschriebene Lokalisierung von CD40 in der Zellmembran, z.B. in B-Zellen oder in Endothelzellen (Tone et al., 2001, Chen et al., 2006, Lin-Lee et al., 2006, Chen et al., 2007), erst nach Überexpression des Proteins sichtbar ist, nicht aber wie hier versucht unter Basalbedingungen. Um eine eindeutige Lokalisation des Proteins in der Zellmembran der humanen Endothelzellen nachweisen zu können, müsste dieses idealerweise

mit grün fluoreszierendem EGFP o.ä. gekoppelt, in einem adeno- oder lentiviralen Ansatz überexprimiert werden. Derartige Untersuchungen sind zwischenzeitlich angelaufen.

Prinzipiell gibt es verschiedene Mechanismen, die für eine Endozytose von CD40 nach Tyrosinnitrierung in Frage kommen. Die meisten Oberflächenrezeptoren werden über den klassischen Clathrin- und Dynamin-abhängigen Internalisierungsprozess endozytiert (Wolfe und Trejo, 2007). Ein Beispiel dafür liefern Untersuchungen von Gavard und Gutkind (2006), die über eine Clathrin-abhängige Endozytose von VE-Cadherin nach VEGF (Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor)-Stimulation berichten. Untersuchungen von kultivierten Endothelzellen, die mit einer dominant-negativen Dynamin-1 Mutante (freundlicherweise von Prof. Dr. H.-J. Schnittler, Münster zur Verfügung gestellt) transfiziert worden waren, lieferten aber für das Nitrotyrosin-haltige CD40 keine eindeutig interpretierbaren Ergebnisse. Hierbei sollte geklärt werden, ob die Internalisierung von biotinyliertem CD40 nach Peroxynitritexposition durch die Dynamin-1-Depletierung aufgehoben ist.

Wie bereits oben erwähnt, scheint CD40 in Endothelzellen vorzugsweise in Caveolae lokalisiert zu sein (Chen et al., 2007). Für diese Strukturen sind andere Clathrin-unabhängige Endozytose-Mechanismen beschrieben. So berichten Damm et al. (2005) über eine Cholesterin-abhängige aber Clathrin- und Dynamin-unabhängige Aufnahme von Simianvirenpartikeln in Maus-Fibroblasten. Weiterhin ist bekannt, dass in Lipid Rafts lokalisierte Histamin-H1-Rezeptoren eine Clathrin-unabhängige Internalisierung durchlaufen, bei der ein Mitwirken von Caveolinen grundsätzlich ausgeschlossen werden kann (Self et al., 2005). In Bezug auf CD40 konnte in Endothelzellen aus der Schweineaorta ein Cholesterin- und Caveolin- vermittelter aber Clathrin-unabhängiger Endozytoseprozess nach Ligandbindung beobachtet werden (Chen et al., 2007). Inwieweit sich dieser Mechanismus auf einen Ligand-unabhängigen durch oxidative Modifikation vermittelten Prozess übertragen lässt, bleibt fraglich. Erste Ergebnisse von Versuchen mit einem Caveolin-1 Antisense-Ansatz, deuten aber auf eine Caveolin-1-unabhängige Internalisierung von Tyrosin-nitriertem CD40 hin. Diese Versuche sind noch nicht ganz abgeschlossen, so dass die Daten hier nicht präsentiert werden konnten.

Eine weitere Möglichkeit für die Nitrotyrosin-vermittelte Translokation von CD40 bietet die Arbeit von Becker et al. (2002), die eine durch die Assoziation mit HSP-70 hervorgerufene Internalisierung von CD40 in murinen Makrophagen beschreibt. Versuche im Rahmen dieser Studie, bei denen CD40 immunpräzipitiert wurde, um eine Assoziation des Rezeptors mit HSP-70 in den humanen kultivierten Endothelzellen nachzuweisen, verliefen jedoch ergebnislos. Außerdem konnten Becker et al. (2002) eine HSP-70-CD40-Interaktion nur dann

detektieren, wenn HSP-70 mit einem bestimmten Peptid-Antigen beladen war. Es ist daher fraglich, ob der Nitrotyrosin-modifizierte N-Terminus von CD40 als Peptidsubstrat für HSP-70 dienen und gleichzeitig seine eigene Internalisierung vermitteln kann.

In diesem Zusammenhang stellt sich allerdings die Frage, wie die Nitrierung von einem oder beiden extrazellulären Tyrosinresten von CD40 durch das intrazellulär gebildete ONOO⁻ während der zyklischen Dehnung zustande kommt. Die NO-Synthase ist in Endothelzellen v.a. in den Caveolae lokalisiert (Fulton et al., 2002). Auch die NADPH-Oxidase NOX2 als vermutliche dehnungsabhängige Hauptquelle von O₂⁻ scheint in Endothelzellen primär mit der Plasmamembran assoziiert zu sein (van Buul et al., 2005). Somit könnte es zu einer quasi extrazellulären Bildung von ONOO⁻ in den Caveolae kommen. Allerdings ist auch bekannt, dass ONOO⁻ passiv und schnell durch biologische Membranen diffundieren kann (Ferrer-Sueta und Radi, 2009), so dass hiermit eine weitere Möglichkeit für die Tyrosinnitrierung eines extrazellulären Proteins besteht. Allerdings verfügt das hochreaktive Peroxynitrit wahrscheinlich nur über eine relativ geringe freie Diffusionsstrecke.

Interessanterweise wurde CD40 bei dem Versuch, den Rezeptor mittels Immunfluoreszenzanalyse in der Plasmamembran der Endothelzellen zu detektieren, u.a. im Zellkern entdeckt. Dieser Befund deckt sich mit einem Bericht von Lin-Lee et al. (2006), der erstmalig nukleäres CD40 in aggressiven Lymphom B-Zellen bzw. in aktivierten B-Zellen beschrieben hat. Das Protein hat eine nukleäre Translokationssequenz in der C-terminalen Domäne (Görlich und Mattaj, 1996, s. Abb. 32), die die Translokation des Rezeptors in den Zellkern prinzipiell ermöglicht. Die funktionelle Bedeutung von Rezeptorproteinen im Zellkern wird bislang kontrovers diskutiert. Allerdings existieren Berichte über den EGF-Rezeptor, der im Zellkern einer Brustkrebszelllinie (MDA-MB-468 Zellen) entdeckt wurde und dort als Transkriptionsfaktor fungiert (Lin et al., 2001). Auch für CD40 konnte eine die Transkription regulierende Funktion beschrieben werden. So bindet der Rezeptor nach einer Stimulation mit CD154 in normalen aktivierten B-Zellen wie auch in Lymphom B-Zellen zusammen mit der NF-κB-Untereinheit cRel an NF-κB-Bindungsstellen in der Promotorregion von Genen, welche die B-Zell-Proliferation beeinflussen, interessanterweise aber auch im Promotor des CD154-Gens (Zhou et al., 2007). Im Rahmen dieser Arbeit wurde CD40 hauptsächlich im Kern ruhender Endothelzellen detektiert. Diese Kernfärbung nahm nach Zytokin-Stimulation zu; ein Zusammenhang mit der Bindung von CD154 an den Rezeptor ließ sich aber nicht nachweisen. So bleibt die funktionelle Bedeutung von CD40 im Kern der Endothelzellen zunächst weiter unklar.

Neben der Lokalisierung von CD40 im Zellkern berichten Lin-Lee et al. (2006) auch von einer Lokalisation des Rezeptors im Endoplasmatischen Retikulum (ER) von B-Zellen. Dies deckt sich mit den hier durchgeführten Immunfluoreszenzanalysen kultivierter Endothelzellen bei denen CD40 in perinukleären Strukturen detektiert werden konnte. Das ER ist für die Synthese von Transmembranproteinen verantwortlich (Nickel und Rabouille, 2009), was eine Erklärung für das Vorkommen von CD40 in diesem Kompartiment wäre.

Trotz der zahlreichen experimentellen Hinweise die subzelluläre Lokalisation von CD40 bzw. seine ONOO⁻-abhängige Internalisierung betreffend, sind für die vollständige Aufklärung des mutmaßlichen Internalisierungsprozesses zweifellos weitere Arbeiten notwendig.

4.4 Tyrosinnitrierung von CD40 und deren Auswirkung auf die CD40-Funktion

Wie bereits im vorhergehenden Teil ausführlich diskutiert, stellt die Internalisierung von Rezeptoren einen wichtigen regulatorischen Prozess dar, der direkt in die nachgeschaltete Signaltransduktionskaskade eingreift. Funktionelle Analysen z.B. zu den Auswirkungen auf die nachgeschaltete Veränderung der Genexpression sind eine weitere Möglichkeit die Konsequenzen der oxidativen Modifikation von CD40 auf der Oberfläche der Endothelzellen aufzuklären.

So ist allgemein akzeptiert, dass die als posttranskriptionelle Modifikation geltende Tyrosinnitrierung von Proteinen einen Funktionsverlust nach sich zieht. Als „Modellprotein“ hierfür kann die Mn²⁺-SOD oder SOD-2 herangezogen werden (Ischiropoulos, 2009). Unter anderem wurde gezeigt, dass eine Nitrierung des Tyrosins an Position 34 der Polypeptidkette zu einem dramatischen Verlust der Dismutaseaktivität führt (Neumann et al., 2008). Andere Enzyme, die durch eine ONOO⁻-vermittelte Tyrosinnitrierung inaktiviert werden, sind die Prostacyclin-Synthase (Bachschmidt et al., 2003; Nie et al., 2006, Davis et al., 2005) oder die Cyclooxygenasen vom Typ I und II (Ndengele et al., 2008). Darüber hinaus kann die Tyrosinnitrierung membranständiger Proteine zu deren Dimerisierung führen (Bartesaghi et al., 2008). Auch im Rahmen dieser Arbeit konnten Dimere von Nitrotyrosin-haltigem CD40 im Western Blot detektiert werden. Im Falle des EGF-Rezeptors führt dies zu einem Funktionsverlust des Tyrosin-nitrierten dimerisierten Proteins, dass auch nachfolgend nicht mehr durch Phosphorylierung aktiviert werden kann (van der Vliet et al., 1998).

Neben der Einleitung pro-inflammatorischer Signalwege führt die Interaktion von CD154 mit CD40 in Endothelzellen selbst auch zu einer intrazellulären Bildung von ONOO⁻ (Urbich et al., 2002, Davis et al., 2005). Die so gebildete ONOO⁻-Menge scheint ausreichend zu sein, um die katalytische Aktivität der Prostacyclin-Synthase dramatisch zu reduzieren (Davis et al.,

2005). Für die Experimente dieser Arbeit sind diese Beobachtungen allerdings zu vernachlässigen, da CD40 bereits vor der Stimulation mit CD154 durch Dehnung bzw. exogenes ONOO⁻ an seinen Tyrosinresten nitriert ist. Im Zellverband allerdings könnte die hier beschriebene Tyrosinnitrierung auch als regulatorischer Mechanismus nach einer Ligandbindung fungieren, bei dem *de novo* synthetisiertes Protein an seinen Tyrosinresten nitriert und somit eine Interaktion von Rezeptor und Ligand begrenzt wird.

Für die Interaktion von CD40 mit seinem Liganden scheint eine bestimmte Sequenz im N-terminalen extrazellulären Teil der Polypeptidkette von entscheidender Bedeutung zu sein (Bajorath et al. (1995a und b). In dieser Domäne befindet sich auch der Tyrosinrest an Position 82, der besonders anfällig für eine Nitrierung zu sein scheint. Insofern ist neben der Internalisierung des Rezeptors auch eine Entkopplung von der nachfolgenden Signaltransduktion als Mechanismus für den Funktionalitätsverlust des Proteins nach Tyrosinnitrierung denkbar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst die CD154-abhängige Expression von IL-12p40 als spezifisches und von E-Selektin als allgemeiner Readout-Parameter für den Funktionsverlust Nitrotyrosin-modifiziertem CD40 untersucht. Tatsächlich war die CD154-stimulierte IL-12p40-Synthese nach zyklischer Dehnung ebenso wie nach Zusatz von exogenem ONOO⁻ in den Endothelzellen bzw. Monozyten signifikant reduziert. Dieser Effekt war in allen Fällen durch den ONOO⁻-Scavenger Urat aufhebbar. Auch die Depletierung von Cholesterin in der Zellmembran, um die Internalisierung des Tyrosin-nitrierten Proteins zu verhindern, führte nicht nur zu einer Restaurierung der CD154-stimulierten IL-12p40-Expression in den Endothelzellen bzw. Monozyten, sondern steigerte diese sogar deutlich. Dies könnte auf eine Anreicherung von *de novo* synthetisierten CD40 in der Zellmembran hinweisen, dessen Funktion durch die ONOO⁻-bedingte Tyrosinnitrierung des Proteins erheblich eingeschränkt ist. Im Gegensatz dazu konnte der proteasomale Inhibitor Lactacystin die CD154-abhängige Expression von IL-12p40 und E-Selektin nicht wiederherstellen. Darüber hinaus verhinderte Lactacystin allein die Expression beider Genprodukte. Dieser Effekt ist möglicherweise auf die Ubiquitin- und Proteasom-abhängige Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zurückzuführen. So beinhaltet die CD154-abhängige Expression von E-Selektin u. a. eine Aktivierung von NF-κB (Karmann et al., 1996) über den kanonischen Signalweg eine Ubiquitinierung und den proteasomalen Abbau der inhibitorischen Untereinheit IκB (Karin et al., 2004).

Interessanterweise führte die CD40-CD154-Interaktion auch zu einem markanten Anstieg der CD40-Expression. Dies steht im Widerspruch zu früheren Untersuchungen von Lienenlücke et

al. (2000), bei denen eine Ligand-abhängige Induktion des CD40-Rezeptors in HUVECs nicht nachgewiesen werden konnte. Allerdings bestätigen die hier erzielten Resultate Arbeiten von Chai et al. (2006), die eine CD154-abhängige Steigerung der CD40-Expression in Endothelzellen aus humanen Koronararterien gezeigt haben.

Die zusätzliche Analyse der CD40-assoziierten Traf-Proteine sollte einen Einblick in die frühe Aktivierungsphase der CD154-induzierten Signaltransduktionskaskade vermitteln. CD40 weist in seinem zytoplasmatischen Teil Bindungsstellen für diese Adaptorproteine auf (Schönbeck und Libby, 2001). Die Familie der Trafs hat sechs Mitglieder, wobei bis auf Traf 4 alle übrigen Familienmitglieder mit CD40 assoziieren können (Zirlik et al., 2007b). Welche weiterführenden Signalwege anschließend eingeleitet werden, ist dabei von den verschiedenen Traf-Molekülen aber auch vom Zelltyp abhängig (Zirlik et al., 2007b). In Endothelzellen fungiert Traf 2 als Aktivator der CD154-abhängigen IL-6 und IL-8-Expression (Zirlik et al., 2007b). Ebenso wie Traf 2 konnte Traf 6 eine essentielle Rolle bei der Aktivierung NF- κ B-abhängiger Gene in Endothelzellen zugeschrieben werden (Ahonen, 2002).

In dieser Arbeit konnte übereinstimmend eine deutliche Zunahme der Assoziation von Traf 2 und Traf 6 mit CD40 nach CD154-Stimulation beobachtet werden. Exogen zugesetztes ONOO⁻ verhinderte diesen Effekt signifikant und lässt insofern auf einen Funktionsverlust des Rezeptors nach Tyrosinnitrierung schließen. Diese Annahme wurde durch die Aufhebung des Peroxynitrit-Effekts durch Urat und Cholesterindepletierung untermauert. Im Gegensatz zu den Arbeiten von Xia et al. (2007) und Rub et al. (2009), die eine verminderte Traf-Rekrutierung in Endothelzellen und Makrophagen nach Cholesterindepletierung beschreiben, behinderte diese die Assoziation von CD40 und Traf 2 und 6 in den hier gezeigten Experimenten nicht. Allerdings stimmen diese Befunde mit Berichten von Chen et al. (2007) überein, die ebenfalls eine Cholesterin-unabhängige Rekrutierung der Traf-Moleküle an CD40 nach Stimulation mit membranständigem Liganden beschreiben. Ein möglicher Grund für die unterschiedliche Auswirkung der Cholesterindepletierung könnte die circa 10-fach niedrigere Konzentration von Methyl- β -Cyclodextrin sein, die in dieser Arbeit verwendet wurde.

Im Gegensatz zu den vorgenannten Ergebnissen unter statischen Versuchsbedingungen lieferte die Analyse der Assoziation der Traf-Moleküle mit CD40 in zyklisch gedehnten Endothelzellen überraschende Resultate. Hier war die Menge an Traf 2 wie auch Traf 6 nach 3 bzw. 16 Stunden Dehnung ohne CD154-Exposition erhöht und mit der nach CD154-Stimulation vergleichbar. Mechanische Deformation führt in glatten Muskelzellen ebenfalls

zu einer Traf 2-Rekrutierung an den TNF-Rezeptor 1 und weiterhin auch ohne TNF- α -Stimulation zu einer Aktivierung des p38/MAP Kinase und Janus-Kinase-Signalwegs (Sotoudeh et al., 2002). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen konnte in dieser Arbeit eine initial durch zyklische Dehnung signifikant erhöhte Assoziation von Traf 2 und Traf 6 mit dem TNF-Rezeptor 1 in den Endothelzellen detektiert werden. Dies bedeutet, dass die unter statischen Bedingungen mit exogenem ONOO⁻ erzielten Resultate nicht wie bisher auf die in Dehnungsexperimenten generierten Daten übertragen werden können, da mechanische Stimuli scheinbar eine Traf-Rekrutierung bewirken. Dafür sprechen auch Beobachtungen von Urbich et al. (2001), dass in Endothelzellen unter laminaren Flussbedingungen Traf 3 an CD40 assoziiert. Da Traf 2 und Traf 3 an dieselbe Stelle im zytoplasmatischen Teil von CD40 binden, wird so die Aktivierung pro-inflammatorischer Signalwege durch Traf 2 verhindert (Urbich et al., 2001). Inwieweit allerdings die Bildung von NO bzw. reaktiven Sauerstoffspezies hierfür von Bedeutung sind, bleibt aufzuklären.

Weiterhin stellt sich die Frage, ob die CD154-abhängige IL-12p40-Synthese, welche durch zyklische Dehnung in Endothelzellen nicht verändert war, mit der Rekrutierung von Traf 2 und 6 zusammenhängt. Bislang ist jedoch die Signalkaskade, die zur Initiierung der IL-12p40-Expression in Endothelzellen führte, trotz intensiver Bemühungen nicht aufgeklärt.

4.5 Zusammenfassung und Ausblick

Unter *in vivo*-Bedingungen sind Endothelzellen kontinuierlich biomechanischen Kräften wie Schubspannung und zyklischer Dehnung ausgesetzt. Arteriosklerotische Plaques entstehen bevorzugt an Gefäßverzweigungen, an denen es zu einer Reduktion der Schubspannung bei gleichzeitig verstärkter zyklischer Dehnung kommt. In dieser Arbeit wurde auf molekularer Ebene untersucht wie Endothelzellen in der Lage sind, an Orten mit hämodynamischen Stress den Verlauf einer Entzündungsreaktion durch Regulation der CD40-Expression und Proteinstabilität zu steuern. Die posttranskriptionelle Nitrierung der extrazellulären Tyrosinreste von CD40 und den dadurch entstehenden Funktionsverlust bzw. das Verschwinden des Rezeptors von der Oberfläche der Endothelzellen stellt somit einen Schlüsselschritt dar, um die Intensivierung der Interaktion dieser Zellen mit CD154-positiven aktivierten T-Zellen bzw. Thrombozyten zu begrenzen. Dadurch kann die nachfolgende Expression pro-inflammatorischer Genprodukte reduziert und somit die Initiation bzw. Progression der Arteriosklerose verlangsamt werden.

Es sind jedoch noch weitere Forschungsaktivitäten nötig, um eindeutig zu differenzieren, ob die Unterbrechung der CD40-Signaltransduktionskaskade durch den Funktionalitätsverlust des Proteins oder dessen Internalisierung zustande kommt. In dieser Arbeit wurde

ausschließlich der Effekt der Tyrosinnitrierung auf CD40 untersucht. Inwieweit neben CD40 auch andere kostimulatorische oder Adhäsionsmoleküle über einen derartigen Mechanismus reguliert werden, stellt eine interessante Frage für weiterführende Experimente dar. Weiterhin könnte untersucht werden, ob sich aus den vorliegenden Befunden therapeutische Ansatzmöglichkeiten ableiten lassen. Im klinischen Alltag werden Stickstoffmonoxidendonatoren wie Molsidomin u.a. zur Therapie der koronaren Herzkrankheit eingesetzt. Auf molekularer Ebene wirkt Molsidomin durch direkte Freisetzung von Stickstoffmonoxid aus seinem aktiven hepatischen Metaboliten SIN-1, der in dieser Studie als Peroxynitritdonor eingesetzt wurde. Der beschleunigte Abbau von pro-entzündlichen Proteinen nach Tyrosinnitrierung durch Molsidomin könnte neben seinen bekannten Wirkmustern (Vorlastsenkung, Dilatation der Koronararterien) einen schützenden Effekt auf die arteriellen Bifurkationen als Prädilektionsstellen für Arteriosklerose haben. Dieser Aspekt wäre ebenfalls ein interessanter Ansatzpunkt für weiterführende Forschungsarbeiten.

5. Zusammenfassung

Das CD40-CD154-Rezeptor-Ligand-System ist maßgeblich an zentralen Funktionen des Immunsystems, wie z.B. der humoralen und zellulären Immunantwort beteiligt; Mechanismen die auch in der Pathogenese der Arteriosklerose eine wichtige Rolle spielen. Besondere Bedeutung kommt dem CD40-Signalweg daher an den Prädilektionsstellen für diese Erkrankung im Gefäßsystem zu. Dies sind im Wesentlichen arterielle Bifurkationen und Biegungen, Bereiche in denen eine turbulente Blutströmung mit lokaler Wandaufdehnung vorherrscht. Diese hämodynamischen Bedingungen führen zu einer Störung der Balance zwischen Stickstoffmonoxid (NO) und Superoxidanionen (O_2^-) in den Endothelzellen. Das abhängig von laminarer Schubspannung gebildete NO wird dabei durch das während zyklischer Dehnung verstärkt gebildete O_2^- neutralisiert und resultiert in einer Enthemmung pro-arteriosklerotischer Genprodukte. Bei dieser Reaktion von NO und O_2^- entsteht Peroxynitrit ($ONOO^-$), dem durch die 3-Nitrotyrosin-Modifikation von Proteinen und der daraus resultierenden Einschränkung ihrer Funktionalität Second Messenger-Eigenschaften zukommen könnten. Eine andere Folge dieser Tyrosinnitrierung kann der Abbau der so modifizierten Proteine über das proteasomale System sein. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss zyklischer Dehnung auf die CD40-Protein-Expression sowie die mutmaßliche Internalisierung und den Abbau des Rezeptors in humanen kultivierten Nabelschnurvenen-Endothelzellen (HUVEC) im Detail untersucht. Darüber hinaus sollten die funktionellen Konsequenzen der diesem Abbau zugrunde liegenden 3-Nitrotyrosin-Modifikation des Proteins für die CD40-abhängige Expression pro-arteriosklerotischer Genprodukte charakterisiert werden.

Im Vergleich zu statisch kultivierten Kontrollzellen war die CD40-Proteinmenge nach 16-stündiger Dehnung in den kultivierten HUVECs signifikant reduziert. Eine Hemmung des 26S-Proteasoms (Lactacystin) oder der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität des 20S-Proteasoms (Epoxomicin), welches den Kernkomplex des 26S-Proteasoms bildet, verhinderte die Degradation von CD40 vollständig. Diese war eng mit der dehnungsabhängigen Tyrosinnitrierung des Proteins assoziiert und konnte durch die Peroxynitrit-Scavenger Urat und FeTPPs verhindert werden. Ebenso war eine 3-Nitrotyrosin-Modifikation von CD40 unter statischen Bedingungen nach Exposition gegenüber authentischem Peroxynitrit oder dem Peroxynitritdonor SIN-1 detektierbar. Die dadurch verursachte Degradation des Proteins konnte durch Hemmung des 20S-Proteasoms komplett blockiert werden. Diese Peroxynitrit-

medierte 3-Nitrotyrosin-Modifikation war auch im zellfreien System mit nativem immunpräzipitierten CD40 sowie einem rekombinanten aminoterminalen CD40-Fragment des Proteins nachweisbar. Dabei beschleunigte die Tyrosinnitrierung deren Abbau durch die rekombinante 20S-Untereinheit des Proteasoms. Die chemische Reduktion der Nitrogruppe an Position 3 des Tyrosinrings mithilfe von Dithionit bestätigte Katalyse dieser Reaktion durch das endogen gebildete bzw. exogen zugesetzte Peroxynitrit.

Einen Hinweis auf die wahrscheinliche Internalisierung des so modifizierten Proteins lieferten die Biotinylierung der Proteine der Zellmembran mit anschließendem Trypsinverdau. Da die Zahl von CD40-Molekülen in der Endothelzellmembran zu gering für eine Immunfluoreszenzdarstellung ist, wurde die Rezeptormenge mittels Western Blot-Analyse in der Mikrosomenfraktion der Endothelzellen bzw. der humanen monozytären Zelllinie THP-1 quantifiziert. Dabei zeigte sich, dass der mikrosomale CD40-Gehalt in den Endothelzellen nach zyklischer Dehnung bzw. Exposition beider Zelltypen gegenüber exogenem Peroxynitrit deutlich reduziert war. Neutralisierung von Peroxynitrit bzw. Cholesterindepletierung mit Methyl- β -Cyclodextrin hoben diesen Effekt auf. Immunfluoreszenzfärbungen der Monozyten zeigten darüber hinaus eine deutliche Peroxynitrit-abhängige Translokation von CD40 von der Plasmamembran ins Zytoplasma der Zellen, die in Gegenwart von Methyl- β -Cyclodextrin gehemmt war.

Ferner war die CD154-stimuliertbare Expression von IL-12p40 und E-Selektin in den kultivierten Endothelzellen nach 16 Stunden zyklischer Dehnung deutlich reduziert. Vorinkubation mit Urat verhinderte dies. Auch die Exposition gegenüber authentischem Peroxynitrit hemmte die CD154-stimulierte IL-12p40- und E-Selektin-Expression in beiden Zelltypen deutlich und dieser Effekt war durch vorherige Cholesterindepletierung aufhebbar. In den Endothelzellen verhinderte Zugabe von Peroxynitrit auch die Rekrutierung der Adaptorproteine Traf 2 und Traf 6 an den zytoplasmatischen Teil des CD40-Rezeptors. Vorbehandlung mit Urat bzw. Methyl- β -Cyclodextrin führten zu einer Restaurierung der CD154-induzierten Assoziation von Traf 2 und Traf 6 mit dem Rezeptor.

Zusammenfassend weisen die vorliegenden Daten eine Tyrosinnitrierung von CD40 in den Endothelzellen nach, die durch das während der zyklischen Dehnung endogen gebildete Peroxynitrit katalysiert wird. Die wahrscheinliche Nitrierung des Tyrosins an Position 82 in der extrazellulären Domäne des Proteins, die für die CD154-induzierte Trimerisierung und Aktivierung des CD40-Rezeptors maßgeblich ist, könnte zunächst zu einer Entkopplung von der nachfolgenden Signaltransduktionskaskade führen, indem die Assoziation der Traf-Moleküle mit dem Rezeptor verhindert wird. Das nitrierte Protein wird anschließend durch

einen Cholesterin-abhängigen Endozytoseprozess in die Endothelzelle aufgenommen und durch die Chymotrypsin-ähnliche Aktivität des 20S-Proteasoms abgebaut. Dieser posttranskriptionelle Mechanismus könnte Endothelzellen vor der Initiation und möglicherweise auch Progression der Arteriosklerose durch Verringerung der CD40/CD154-vermittelten Kostimulation zwischen Endothelzellen und aktivierten T-Zellen bzw. Thrombozyten in Regionen mit verstärktem hämodynamischen Stress schützen.

6. Literaturverzeichnis

Adorini L (1999): Interleukin-12, a key cytokine in Th1-mediated autoimmune diseases. *Cell Mol Life Sci* 55, 1610-1625

Ahonen C, Manning E, Erickson LD, O'Connor BP, Lind EF, Pullen SS, Kehry MR, Noelle RJ (2002): The CD40-Traf 6 axis controls affinity maturation and the generation of long-lived plasma cells. *Nat Immunol* 3, 451-456

Allen JA, Halverson-Tamboli RA, Rasenick MM (2007): Lipid raft microdomains and neurotransmitter signalling. *Nat Rev Neuro Sci* 8, 128-140

Amento EP, Ehsani N, Palmer H, Libby P (1991): Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb* 11, 1223-1230

Anzalone R, La Rocca G, Di Stefano A, Magno F, Corrao S, Carbone M, Loria T, Lo Iacono M, Eleuteri E, Colombo M, Cappello F, Farina F, Zummo G, Giannuzzi P (2009): Role of endothelial cell stress in the pathogenesis of chronic heart failure. *Front Biosci* 1, 2238-2247

Armitage RJ, Fanslow WC, Strockbine L, Sato TA, Clifford KN, Macduff BM, Anderson DM, Gimpel SD, Davis-Smith T, Maliszewski CR et al. (1992): Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. *Nature* 357, 80-82

Arron JR, Pewzner-Jung Y, Walsh MC, Kobayashi T, Choi Y (2002): Regulation of the subcellular localization of tumor necrosis factor receptor associated factor (TRAF) 2 by TRAF 1 reveals mechanisms of TRAF 2 signalling. *J Exp Med* 196, 923-934

Baumgarten S (2004): Zyklische Deformation und reaktive Sauerstoffspezies - Kontrolle der CD40-Expression in humanen Endothelzellen. Dissertation

Bachs Schmidt M, Thureau S, Zou MH, Ullrich V (2003): Endothelial cell activation by endotoxin involves superoxide/NO-mediated nitration of prostacyclin synthase and thromboxane receptor stimulation. *FASEB J* 17, 914-916

Bajorath J, Chalupny NJ, Marken JS, Siadak AW, Skonier J, Gordon M, Hollenbaugh D, Noelle RJ, Ochs HD, Aruffo A (1995a): Identification of residues on CD40 and its ligand which are critical for the receptor-ligand interaction. *Biochemistry* 34, 1833-1844

Bajorath J, Marken JS, Chalupny NJ, Spoon TL, Siadak AW, Gordon M, Noelle RJ, Hollenbaugh D, Aruffo A (1995 b): Analysis of gp39/CD40 interactions using molecular models and site directed mutagenesis. *Biochemistry* 34, 9884-9892

Baker SJ, Rane SG, Reddy EP (2007): Hematopoietic cytokine receptor signaling. *Oncogene* 26, 6724-6737

Bartesaghi S, Peluffo G, Zhang H, Joseph J, Kalyanaraman B, Radi R (2008): Tyrosine nitration, dimerization, and hydroxylation by peroxynitrite in membranes as studied by the hydrophobic probe N-t-BOC-L-tyrosine tert-butyl ester. *Methods Enzymol* 441, 217-236

Bauer PM, Yu J, Chen Y, Hickey R, Bernatchez PN, Looft-Wilson R, Huang Y, Giordano F, Stan RV, Sessa WC (2005): Endothelial-specific expression of caveolin-1 impairs microvascular permeability and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 204 –209

Becker T, Hartl FU, Wieland F (2002): CD40, an extracellular receptor for binding and uptake of HSP-70-peptide complexes. *JCB* 158 (7), 1277-1285

Beckmann JS, Ye YZ, Anderson PG, Chen J, Accavitti MA, Tarpey MM, White CR (1994): Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. *Biol Chem Hoppe Seyler* 375, 81-88

Bedard K, Krause KH (2007): The NOX-family of ROS-generating NADPH-oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 87, 245-313

Bharadwaj AS, Agrawal DK (2007): Transcription factors in the control of dendritic cell life cycle. *Immunol Res* 37, 79-96

Bobik A (2006): Transforming growth factor-betas and vascular disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 1712-1720

Boes B, Hengel, H, Ruppert, T, Multhaup, G, Koszinowski UH, Kloetzel PM (1994): Interferon gamma stimulation modulates the proteolytic activity and cleavage site preference of 20S mouse proteasomes. *J Exp Med* 179, 901–909

Bogyo M, McMaster JS, Gaczynska M, Tortorella D, Goldberg AL, Ploegh H (1997): Covalent modification of the active site threonine of proteasomal beta subunits and the *Escherichia coli* homolog HslV by a new class of inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 6629–6634

Bogyo M, Shin, S, McMaster, JS, Ploegh, JL (1998): Substrate binding and sequence preference of the proteasome revealed by active-site-directed affinity probes. *Chem Biol* 5, 307-320

Bromme D, Klaus JL, Okamoto K, Rasnick D, Palmer JT (1996): Peptidyl vinyl sulphones: a new class of potent and selective cysteine protease inhibitors: S2P2 specificity of human cathepsin O2 in comparison with cathepsins S and L. *Biochem J* 315, 85–89

Buchczyk DP, Grune T, Sies H, Klotz LO (2003): Modifications of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase induced by increasing concentrations of peroxynitrite: early recognition by 20S proteasome. *Biol Chem* 348, 237-241

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

Cattaruzza M, Slodowski W, Stojakovic M, Krzesz R, Hecker M (2003): Interleukin-10 induction of nitric-oxide synthase expression attenuates CD40-mediated IL-12 synthesis in human endothelial cells. *JBC* 278, 37874-37880

Chai H, Yan S, Wang Hao, Zhang R, Lin PH, Yao Q, Chen C (2006): CD40 ligand increases expression of its receptor CD40 in human coronary artery endothelial cells. *Surgery* 140, 236-242

Chen Y, Chen J, Xiong Y, Da Q, Xu Y, Jiang X, Tang H (2006): Internalization of CD40 regulates its signal transduction in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 345, 106-117

Chen J, Chen L, Wang G, Tang H (2007): Cholesterol-dependent and -independent CD40 internalization and signaling activation in cardiovascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 2005-2013

Ciechanover A, Schwartz AL (1998): The ubiquitin-proteasome pathway: The complexity and myriad functions of proteins death. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 2727-2730

Ciechanover A (2006): Intracellular protein degradation: From a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 1-12, 505-506

Clinton SK, Underwood R, Hayes L, Sherman ML, Kufe DW, Libby P (1992): Macrophage colony-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis. *Am J Pathol* 140, 301-316

Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, Davis V, Gutierrez-Ramos JC, Connelly PW, Milstone DS (2001): A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest* 107, 1255-1262

Damm EM, Pelkmans L, Kartenbeck J, Mezzacasa A, Kurzchalia T, Helenius A (2005): Clathrin- and caveolin-1-independent endocytosis: entry of simian virus 40 into cells devoid of caveolae. *JBC* 168, 477-488

Davis B, Zou MH (2005): CD40 ligand-dependent tyrosine nitration of prostacyclin synthase in vivo. *Circulation* 112, 2184-2192

De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA Jr., 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

Di Guglielmo GM, Le Roy C, Goodfellow AF, Wrana JL (2003): Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. *Nat Cell Biol* 5, 410 – 421

Durie FH, Fava RA, Foy TM, Aruffo A, Ledbetter JA, Noelle RJ (1993) : Prevention of collagen-induced arthritis with an antibody to gp39, the ligand for CD40. *Science* 261, 1328-1330

Dworakowski R, Alom-Ruiz SP, Shah AM (2003): NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in the regulation of the endothelial phenotype. *Pharmacol Rep* 60, 21-28

Egerer K, Kuckelkorn U, Rudolph PE, Ruckert JC, Dorner T, Burmester GR, Kloetzel PM, Feist E (2002): Circulating proteasomes are markers of cell damage and immunologic activity in autoimmune diseases. *J Rheumatol* 29, 2045-2052

Ferrer-Sueta G, Radi R (2009): Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals. *ACS Chem Biol* 4, 161-177

Fisslthaler B, Dimmeler S, Hermann C, Busse R, Fleming I (2000): Phosphorylation and activation of the endothelial nitric oxide synthase by fluid shear stress. *Acta Physiol Scand* 168, 81-88

Fotin-Mleczek M, Henklers F, Hausser A, Glauner H, Samel D, Graness A, Scheurich P, Mauri D, Wajant H (2004): Tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) 1 regulates CD40-induced TRAF 2-mediated NFκB activation. *JBC* 279, 677-685

Foy TM, Aruffo A, Bajorath J, Buhlmann JE, Noelle RJ (1996) : Immune regulation by CD40 and its ligand GP39. *Ann Rev Immunol* 14, 591-617

Fulton D, Fontana J, Sowa G, Gratton JP, Lin M, Li KX, Michell B, Kemp BE, Rodman D, Sessa WC (2002): Localization of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylated on serine 1179 and nitric oxide in Golgi and plasma membrane defines the existence of two pools of active enzyme. *JBC* 277, 4277-4284

Gavard J, Gutkind JS (2006): VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-Cadherin. *Nat Cell Biol* 8, 1223-1234

Gerszten RE, Garcia-Zepeda EA, Lim YC, Yoshida M, Ding HA, Gimbrone MA Jr., Luster AD, Luscinskas FW, Rosenzweig A (1999): MCP-1 and IL-8 trigger firm adhesion of monocytes to vascular endothelium under flow conditions. *Nature* 398, 718-723

Gimbrone MA Jr, Topper JN, Nagel T, Anderson KR, Garcia-Cardena G (2000): Endothelial dysfunction, hemodynamic forces and atherogenesis. *Ann NY acad Sci* 902, 230-239

Glass CK, Witztum JL (2001): Atherosclerosis: the road ahead. *Cell* 104, 503-516

Görg B, Qvartrkhava N, Voss P, Häussinger D, Schliess F (2007): Reversible inhibition of mammalian glutamate synthetase by tyrosine nitration. *FEBS Lett* 581, 84-90

Görlich D, Mattaj IW (1996): Nucleocytoplasmic transport. *Science* 271, 1513-1518

Graf D, Korthäuser U, Mages HW, Senger G, Kroczeck RA (1992): Cloning of TRAP, a ligand for CD40 on human T cells. *Eur J Immunol* 22, 3191-3194

Graf D, Müller S, Korthäuser U, van Kooten C, Weise C, Kroczeck RA (1995): A soluble form of TRAP (CD40 ligand) is rapidly released after T cell activation. *Eur J Immunol* 25, 1749-1754

Grewal IS, Foellmer HG, Grewal KD, Xu J, Hardardottir F, Baron JL, Janeway CA Jr., Flavell RA (1996): Requirement for CD40 ligand in costimulation induction, T cell activation, and experimental allergic encephalomyelitis. *Science* 273, 1864-1867

Grune T, Blasig IE, Sitte N, Roloff B, Haseloff R, Davies KJA (1998): Peroxynitrite increases the degradation of aconitase and other cellular Proteins by proteasome. *JBC*, 10875-10862

Hanada M, Sugawara K, Kaneta K, Toda S, Nishiyama Y, Tomita K, Yamamoto H, Konishi M, Oki T (1992): Epoxomicin, a new antitumor agent of microbial origin. *J Antibiotics* 45, 1746–1752

Hassan GS, Merhi Y, Mourad WM (2009): CD154 and its receptor in inflammatory vascular pathologies. *Trends Immunol* 30, 165-172

Heinemeyer W, Gruhler A, Mohrle V, Mahe Y, Wolf DH (1993): PRE2, highly homologous to the human major histocompatibility complex-linked RING10 gene, codes for a yeast proteasome subunit necessary for chymotryptic activity and degradation of ubiquitinated proteins. *JBC* 268, 5115–5120

Hilt W, Wolf DH (1996): Proteasomes: destruction as a program. *Trends Biochem Sci* 21, 96–102

Hochrein H, O'Keeffe M, Luft T, Vandenabeele S, Grumont RJ, Maraskovsky E, Shortman K (2000): Interleukin (IL)-4 is a major regulatory cytokine governing bioactive IL-12 production by mouse and human dendritic cells. *J Exp Med* 192, 823-833

Hochstrasser M (1996): Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet* 30, 405-439

Hollenbaugh D, Grosmaire LS, Kullas CD, Chalupny NJ, Braesch-Andersen S, Noelle RJ, Stamenkovic I, Ledbetter JA, Aruffo A (1992): The human T cell antigen gp39, a member of the TNF gene family, is a ligand for the CD40 receptor: expression of soluble form of gp39 with B cell co-stimulatory activity. *EMBO J* 11, 4313-4321

Hollenbaugh D, Mischel-Petty N, Edwards CP, Simon JC, Denfeld RW, Kiener PA, Aruffo A (1995): Expression of functional CD40 by vascular endothelial cells. *J Exp Med* 182, 33-40

Ischiropoulos H (1998): Biological tyrosine nitration: A pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys* 356, 1-11

Ischiropoulos H, Beckmann JS (2003): Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: Cause, effect or association? *J Clin Invest* 111, 163-169

Ischiropoulos H (2009): Protein tyrosine nitration- an update. *Arch Biochem Biophys* 484, 117-121

Jayakumar A, Donovan MJ, Tripathi V, Ramalho-Ortigao M, McDowell MA (2008): Leishmania major infection activates NF-kappaB and interferon regulatory factors 1 and 8 in human dendritic cells. *Infect Immun* 76, 2138-2148

Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK (1986): Regional accumulation of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Atherosclerosis* 6, 131-138

Karin M, Yamamoto Y, Wang QM (2004): The IKK NF-kappaB system: a treasure trove for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 3, 17-26

Karmann K, Hughes CCW, Schechner J, Fanslow WC, Pober JS (1995): CD40 on human endothelial cells: Inducibility by cytokines and functional regulation of adhesion molecule expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 4342-4346

Karmann K, Min W, Fanslow WC, Pober JS (1996): Activation and homologous desensitisation of human endothelial cells by CD40 ligand, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-1. *J Exp Med* 184, 173-182

Katzmann DJ, Odorizzi G., Emr SD (2002): Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nature Rev* 3, 893-905

Kodja G, Harrison D (1999): Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance an atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res* 43, 562-571

Kretz-Remy C, Arrigo AP (2003): Modulation of the Chymotrypsin-Like Activity of the 20S Proteasome by Intracellular Redox Status: Effects of Glutathione Peroxidase-1 Overexpression and Antioxidant Drugs. *Biol Chem* 384, 589–595

Kukreti S, Konstantopoulos L, Smith CW, McIntire LV (1997): Molecular mechanisms of monocyte adhesion to interleukin-1 β -stimulated endothelial cells under physiologic flow conditions. *Blood* 89, 4104-4111

Larsson L, Johansson P, Jansson A, Donati M, Rymo L, Berglundh T (2009): The Sp1 transcription factor binds to the G-allele of the -1087 IL-10 gene polymorphism and enhances transcriptional activation. *Genes Immun* 10, 280-284

Le Roy C, Wrana JL (2005): Clathrin- and non-clathrin-mediated endocytic regulation of cell signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 112–126

Levi BZ, Hashmueli S, Gleit-Kielmanowicz M, Azriel A, Meraro D (2002): ICSBP/IRF-8 transactivation: a tale of protein-protein interaction. *J Interferon Cytokine Res* 22, 153-160

Li D, Chen H, Romeo F, Sawamura T, Saldeen T, Metha JL (2002): Statins modulate low-density lipoprotein-mediated adhesion molecule expression in human coronary artery endothelial cells: role of LOX-1. *J Pharmacol Exp Ther* 302, 601-605

Libby P (2006): Inflammation and cardiovascular disease mechanisms. *Am J Clin Nutr* 83 (suppl), 456S-460S

Libby P (2008): Role of inflammation in Atherosclerosis associated with Rheumatoid Arthritis. *J Am Med* 121, S21-S31

Lienenlücke B, German T, Kroczeck RA, Hecker M (2000): CD154 stimulation of interleukin-12 synthesis in human endothelial cells. *Eur J Immunol* 30, 2864-2870

Lin SY, Makino K, Xia W, Matin A, Weng Y, Kwong KY, Bourguignon L, Hung MC (2001): Nuclear localization of the EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol* 3, 802-808

Lin-Lee YC, Pham LV, Tamayo AT, Fu L, Zhou HJ, Yoshimura LC, Decker GL, Ford RJ (2006): Nuclear localization in the biology of the CD40 receptor in normal and neoplastic human B lymphocytes. *JBC* 281, 18878-18887

Liu J, Guan X, Tamura T, Ozato K, Ma X (2004): Synergistic activation of interleukin-12 p35 gene transcription by interferon regulatory factor-1 and interferon consensus sequence-binding protein. *JBC* 279, 55609-55617

Luft T, Luetjens P, Hochrein H, Toy T, Masterman KA, Rizkalla M, Maliszewski C, Shortman K, Cebon J, Maraskovsky E (2002): IFN- α enhances CD40 ligand-mediated activation of immature monocyte-derived dendritic cells. *Int Immunol* 14, 367-380

Lukacs NW, Strieter RM, Elner V, Evanoff HL, Burdick MD, Kunle SL (1995): Production of chemokines, interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1, during monocyte: endothelial cell interactions. *Blood* 86, 2767-2773

Lutgens E, Gorelik L, Daemen MJ, de Muinck ED, Grewal IS, Kotliansky VE, Flavell RA (1999): Requirement for CD154 in the progression of atherosclerosis. *Nat Med* 5, 1313-1316

Mach F, Schönbeck U, Bonnefoy, Prober JS, Libby P (1997): Activation of monocyte/macrophage functions related to acute atheroma complication by ligation of CD40: induction of collagenase, stromelysin and tissue factor. *Circulation* 96, 396-399

Mach F, Schönbeck U, Sukhova GK, Atkinson E, Libby P (1998): Reduction of atherosclerosis in mice by inhibition of CD40 signalling. *Nature* 394, 200-203

Mellgren RL (1997): Specificities of cell permeant peptidyl inhibitors for the proteinase activities of μ -calpain and the 20 S proteasome. *JBC* 272, 29899-29903

Meng L, Mohan R, Kwok BH, Elofsson M, Crews CM (1999): Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo inflammatory activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 10403-10408

Minshall R.D., Sessa, W.C., Stan, R.V., Anderson, R.G., Malik, A.B. (2003): Caveolin regulation of endothelial function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285, L1179 –L1183

Mohazzab KM, Kaminski PM, Wolin MS (1994): NADH oxidoreductase is a major source of superoxide anion in bovine coronary artery endothelium. *Am J Physiol* 266, H2568-H2572

Moncada S, Martin JF (1993): Evolution of nitric oxide. *Lancet* 341, 1511

Mukundan L, Milhorn Matta Suttles J (2004): CD40-mediated activation of vascular smooth muscle cell chemokine production through Src-initiated, MAPK-dependent pathway. *Cell Signal* 16, 375-384

Mukundan L, Bishop GA, Head KZ, Zhang L, Wahl LM, Suttles J (2005): TNF receptor associated factor 6 is an essential mediator of CD40-activated proinflammatory pathways in monocytes and macrophages. *J Immunol* 174, 1081-1090

Murata T, Noguchi PD, Puri RK (1995): Receptors for interleukin (IL)-4 do not associate with the common gamma chain, and IL-4 induces the phosphorylation of JAK2 tyrosine kinase in human colon carcinoma cells. *JBC* 270, 30829-30836

Navarro A, Anand-Apte B, Parat MO (2004): A role for caveolae in cell migration. *Faseb J* 18, 1801–1811

Ndengele MM, Cuzzocrea S, Esposito E, Mazzon E, di Paola R, Matuschak GM, Salvemini D (2008): Cyclooxygenases 1 and 2 contribute to peroxynitrite-mediated inflammatory pain hypersensitivity. *FASEB J* 22, 3154-3164

Nelms K, Huang H, Ryan J, Keegan A, Paul WE (1998): Interleukin-4 receptor signalling mechanisms and their biological significance. *Adv Exp Med Biol* 452, 37-43

Neumann H, Hazen JL, Weinstein J, Chin JW (2008): Genetically encoding protein oxidative damage. *J Am Chem Soc* 130, 4028-4033

Nickel W, Rabouille C (2009): Mechanisms of regulated unconventional protein secretion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10 (2), 148-155

Nie H, Wu JI, Zhang M, Xu J, Zou MH (2006): Endothelial nitric oxide synthase-dependent tyrosine nitration of prostacyclin synthase in diabetes in vivo. *Diabetes* 55, 3133-3141

Pelkmans L, Burli T, Zerial M, Helenius A (2004): Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic. *Cell* 118, 767-780

Pelkmans L, Zerial M (2005): Kinase-regulated quantal assemblies and kiss and run recycling of caveolae. *Nature* 436, 128-133

Raiborg C, Stenmark H (2009): The ESCRT machinery in endosomal sorting of ubiquitinated membrane proteins. *Nature* 458, 445-452

Reinhardt PH, Kubes P (1998): Differential leukocyte recruitment from whole blood via endothelial adhesion molecules under shear conditions. *Blood* 92, 4691-4699

Reyes-Moreno C, Sharif-Askari E, Girouard J, Leveille C, Jundi M, Akoum A, Lapointe R, Darveau A, Mourad W (2007): Requirement of oxidation-dependent CD40 homodimers for CD154/CD40 bidirectional signaling. *JBC* 282, 19473-19480

Robertson AK, Hansson GK (2006): T cells in atherogenesis: for better or for worse? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 2421-2432

Rosenfeld ME, Yla-Herttuala S, Lipton BA, Ord VA, Witztum JL, Steinberg D (1992): Macrophage colony-stimulating factor mRNA and protein in atherosclerotic lesions of rabbits and humans. *Am J Pathol* 140, 291-300

Ross R (1999): Atherosclerosis: an inflammatory disease. *N Engl Med* 340, 115-126

Rub A, Dey R, Jadhav M, Kamat R, Chakkaramakkil S, Mujamdar S, Mukhopadhyaya R, Saha B (2009): Cholesterol depletion associated with *Leishmania major* infection alters Macrophage CD40 signalosome composition and effector function. *Nat Immunol* 10, 273-280

Schönbeck U, Sukhova GK, Shimizu K, Mach F, Libby P (2000): Inhibition of CD40 signalling limits evolution of established atherosclerosis in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 7458-7463

Schönbeck U, Libby P (2001): The CD40/CD154 receptor/ligand dyad. *Cell Mol Life Sci* 58, 4-43

Schönbeck U, Libby P (2001): CD40 signalling and plaque instability. *Circ Res* 89, 1092-1103

Self TJ, Oakley SM, Hill SJ (2005): Clathrin-independent internalization of the human histamin-H1-receptor in CHO-K1 cells. *Br J Pharmacol* 146, 612-624

Sever PS, Dahlöf B, Poulter NR, Wedel H, Beevers G, Caulfield M, Collins R, Kjeldsen SE, Kristinsson A, McInnes GT, Mehlsen J, Nieminen M, O'Brien E, Ostergren J, ASCOT investigators (2003): Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian cardiac outcomes Trial-lipid lowering arm (ASCOT-LLA): a multicentre randomised control trial. *Lancet* 361, 1149-1158

Shringapure R, Grunea T, Davies KJA (2001): Protein oxidation and 20S proteasome-dependent proteolysis in mammalian cells. *Cell Mol Life Sci* 58, 201-211

Silacci P, Desgeorges A, Mazzolai L, Chambaz C, Hayoz D (2001): Flow pulsatility is a critical determinant of oxidative stress in endothelial cells. *Hypertension* 38, 1162-1166

Sixt SU, Dahlmann B (2008): Extracellular, circulating proteasomes and ubiquitin - Incidence and relevance. *Biochem Biophys Act* 1782, 817-823

Sotoudeh M, Li YS, Yajima N, Chang CC, Tsou TC, Wang Y, Usami S, Ratcliffe A, Chien S, Shyy JYJ (2002): Induction of apoptosis in vascular smooth muscle cells by mechanical stretch. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282, H1709-H1716

Souza JM, Daikhin E, Yudkoff M, Ramann CS, Ischiropoulos H (1999): Factors determining the selectivity of protein tyrosine nitration. *Arch Biochem Biophys* 15, 169-178

Souza JM, Choi, I, Chen Q, Weisse M, Daikhin E, Yudkoff M, Obin M, Ara J, Horwitz J, Ischiropoulos H (2000): Proteolytic degradation of tyrosine nitrated proteins. *Arch Biochem Biophys* 2, 360-366

Tagawa A, Mezzacasa A, Hayer A, Longatti A, Helenius A (2005): Assembly and trafficking of caveolar domains in the cell: caveolae as stable, cargo-triggered, vesicular transporters. *J Cell Biol* 170, 769-779

Thienel U, Loike J, Yellin MJ (1999): CD154 (CD40L) induced human endothelial cell chemokine production and migration of leukocyte subsets. *Cell Immunol* 198, 87-95

Tone M, Tone Y, Fairchild PJ, Wykes M, Waldmann H (2001): Regulation of CD40 function by its isoforms generated through alternative splicing. *PNAS* 98, 1751-1756

Tucker TA, Schwiebert LM (2008): CD40 ligation decreases its half life at the cell surface. *Eur J Immunol* 38, 864-869

Urbich C, Mallat Z, Tedgui A, Claus M, Zeiher AM, Dimmeler S (2001): Upregulation of TRAF3 by shear stress blocks CD40-mediated endothelial activation. *J Clin Invest* 108, 1451-1458

Urbich C, Dernbach E, Aicher A, Zeiher AM, Dimmeler S (2002): CD40 ligand inhibits endothelial cell migration by increasing production of endothelial reactive oxygen species. *Circulation* 106, 981-986

Van Buul JD, Fernandez-Borja M, Anthony EC, Hordijk PL (2005): Expression and localization of NOX2 and NOX4 in primary human endothelial cells. *Antioxid Redox Signal* 7, 308-317

Vane JR, Anggard EE, Botting, RM (1990): Regulatory functions of the vascular endothelium. *New Engl J Med* 323, 27-36

Wada M, Kosaka M, Saito S, Sano T, Tanaka K, Ichihara A (1993): Serum concentration and localization in tumor cells of proteasomes in patients with hematologic malignancy and their pathophysiological significance. *J Lab Clin Med* 121, 215-223

Wagner AH, Gebauer M, Pollok-Kopp B, Hecker M (2002): Cytokine-inducible CD40 expression in human endothelial cells is mediated by interferon regulatory factor-1. *Blood* 99, 520-525

Wagner AH, Gülden-zoph B, Lienenlücke B, Hecker M (2004): CD154/ CD40-mediated expression of CD154 in endothelial cells - consequences for endothelial cell-monocyte interaction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 715-720

Welham MJ, Learmonth L, Bone H, Schrader JW (1995): Interleukin-13 signal transduction in lymphohemopoietic cells. Similarities and differences in signal transduction with interleukin-4 and insulin. *JBC* 270, 12286-12296

Wiley HS, Burke PM (2001): Regulation of receptor tyrosine kinase signalling by endocytic trafficking. *Traffic* 2, 12-18

Winograd-Katz SE, Levitzki A (2006): Cisplatin induces PKB/Akt activation and p38MAPK phosphorylation of the EGF receptor. *Oncogene* 25, 7381-7390

Witthuhn BA, Silvennoinen O, Miura O, Lai KS, Cwik C, Liu ET, Ihle JN (1994): Involvement of the Jak-3 Janus kinase in signalling by interleukins 2 and 4 in lymphoid and myeloid cells. *Nature* 370, 153-157

Xia M, Wang Q, Zhu H, Ma J, Hu M, Tang Z, Li J, Ling W (2007): Lipid rafts regulate cellular CD40 receptor localization in vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Com* 361, 768-774

Young P, Deveraux Q, Beal RE, Pickart CM, Rechsteiner M (1998): Characterization of two polyubiquitin binding sites in the 26S protease subunit 5a. *JBC* 273, 5461-5467

Zapata JM (2003): TNF-receptor associated factors as targets for drug development. *Expert Opin Ther Targets* 7, 411-425

Zhang GX, Yu S, Gran B, Li J, Siglienti I, Chen X, Calida D, Ventura E, Kamoun M, Rostami A (2003): Role of IL-12 receptor beta 1 in regulation of T cell response to APC in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 171, 4485-4492

Zhou HJ, Pham LV, Tamayo AT, Lin-Lee YC, Fu L, Yoshimura LC, Ford RJ (2007): Nuclear CD40 interacts with c-Rel and enhances proliferation in aggressive B-cell lymphoma. *Blood* 110, 2121-2127

Zirlik A, Maier C, Gerdes N, MacFarlane L, Soosairajah J, Bavendiek U, Ahrens I, Ernst S, Bassler N, Missiou A, Patko Z, Aikawa M, Schönbeck U, Bode C, Libby P, Peter K (2007a): CD40 ligand mediates inflammation independently of CD40 by interaction with Mac-1. *Circulation* 115, 1571-1580

Zirlik A, Bavendiek U, Libby P, MacFarlane L, Gerdes N, Jagielska J, Ernst S, Aikawa M, Nakano H, Tsitsikov E, Schönbeck U (2007b): Traf-1, -2, -3, -5 and -6 are induced in atherosclerotic plaques and differentially mediate proinflammatory functions of CD40L in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27, 1101-1107

Zou MH, Klein T, Pasquet JP, Ullrich V (1998): Interleukin-1-beta decreases prostacyclin synthase activity mesangial cells via endogenous peroxynitrite formation. *Biochem J* 336, 507-512