Wirkungen reaktiver Sauerstoffspezies:

Charakterisierung zweier ROS-sensitiver Gene und ihre Rolle bei der Kontrolle des zellulären Wachstums

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Stephanie Baudler
aus Koblenz

2001

Berichterstatter: Prof. Dr. S. Korsching
Prof. Dr. M. Böhm

Tag der mündlichen Prüfung: 21.05.2001

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1997 bis Oktober 2000 in der Klinik III für Innere Medizin der Medizinischen Einrichtungen der Universität zu Köln unter der Betreuung von Frau Prof. Dr. S. Korsching und der Anleitung von Herrn Prof. Dr. M. Böhm durchgeführt.

1 EINLEITUNG 1

1.1 Eigenschaften reaktiver Sauerstoffspezies 2
1.1.1 Das Hydroxylradikal 2
1.1.2 Das Superoxidradikal 3

1.2 ROS-produzierende Enzyme 4
1.2.1 Die NADH/NADPH-Oxidase 4
1.2.2 Die Xanthinoxidase 5
1.2.3 Die Stickstoffmonoxid-Synthase 5

1.3 *Scavenger*-Enzyme 6
1.3.1 Die Superoxiddismutase 7
1.3.2 Die Katalase 7
1.3.3 Die Glutathionperoxidase 8

1.4 Wirkungen reaktiver Sauerstoffspezies 8

1.5 ROS im vaskulären System: Endotheliale Dysfunktion und Arteriosklerose 10
1.5.1 Endotheliale Dysfunktion 10
1.5.2 Arteriosklerose 11

1.6 Fragestellung und Ziel der Arbeit 13
1.6.1 Experimentelle Aufgaben 13

2 MATERIALIEN UND METHODEN 15

2.1 Materialien 15
2.1.1 Chemikalien 15
2.1.2 Häufig verwendete Puffer 16
2.1.3 Filter und Membranen 18
2.1.4 Radiochemikalien 18
2.1.5 Molekularbiologische Kits 18
2.1.6 Restriktionsendonucleasen, Polymerasen und DNA-modifizierende Enzyme 18
2.1.7 DNA-Längenstandards und Protein-Molekulargewichts-Standards 18
2.1.8 Oligonukleotide 18
2.1.9 Vektoren 20
2.1.10 Bakterienstämme 20
2.1.11 Antikörper 20
2.1.12 Kulturmedien 20
2.1.13 Geräte und Zubehör 21
2.1.14 Software 22

2.2 Methoden 22
2.2.1 Zellkultur 22
2.2.2 Isolation von Gesamt-RNA 23
2.2.3 Differential Display von mRNA 23
2.2.4 Bandenelution und Reamplifikation 26

2.2.5 Northern Blot und Herstellung radioaktiv markierter cDNA-Sonden 27
2.2.6 Semiquantitative RT-PCR 27
2.2.7 Western Blot 28
2.2.8 Klonierungen 28
2.2.9 Transformation von *E.coli* 29
2.2.10 Plasmidisolation aus *E.coli* 29
2.2.11 Transiente Transfektion von VSMC durch Elektroporation 30
2.2.12 Bestimmung der Proliferationsrate und Zellzählung 30
2.2.13 Bestimmung der Apoptoserate 31
2.2.14 Sequenzierungen 31

3 ERGEBNISSE 32

3.1 Differential Display von mRNA 32

3.2 Wirkung von $O_2^{\bullet -}$ auf die Expression der charakterisierten Gene 36

3.3 Untersuchungen zur Proliferation und Apoptose von VSMC 38

3.4 Untersuchung der Aufgaben von Id3 und GKLF in der Zelle 42

3.5 Wirkung von ROS auf die Regulation Zellzyklus-assoziierter Proteine 44

3.6 Einfluß von Id3 und GKLF auf die Regulation Zellzyklus-assoziierter Proteine 45

4 DISKUSSION 47

4.1 Differential Display 47
4.1.1 Inhibitor of DNA-Binding (Id3) 48
4.1.2 Gut-enriched Krüppel-like Factor (GKLF) 50

4.2 Der Effekt von ROS auf die Proliferation von VSMC 51

4.3 Der Effekt von ROS auf p53, $p21^{WAF1/Cip1,}$ $p27^{Kip1}$ und Rb 52

4.4 Die Rolle von Id3 und GKLF im $OH^{\bullet}$-induzierten Wachstumsarrest 56
4.4.1 GKLF 56
4.4.2 Id3 59

4.5 Die Rolle von Id3 und GKLF im $O_2^{\bullet -}$-induzierten Zellwachstum 61

5 ZUSAMMENFASSUNG 64

6 LITERATUR 65

ANHANG 78

Übersicht über die Differential Display-Klone 78

Weitere Oligonukleotide **80**

Plasmidkarten der Konstrukte für die transiente Transfektion **81**

Sequenz des humanen Id3-Promotors **85**

Sequenz des murinen p53-Promotors **87**

Accession-Nummern in BLAST **88**

Erklärung **89**

Teilpublikationen **89**

Zusammenfassung **90**

Abstract **91**

Lebenslauf **92**

Abkürzungen

Maße und Gewichte

°C	Grad Celsius	**l**	Liter
Ci	Curie	**M**	Molar, mol pro Liter
g	Gramm	**m**	Meter
h	*hour*, Stunde	**S**	Sedimentationskoeffizient
kDa	Kilodalton	**U**	*unit*

Sonstige Abkürzungen

A	Adenin
ATP	Adenosin-5'-diphosphat
APS	Ammoniumpersulfat
bp	*base pairs,* Basenpaar(e)
BH_4	Tetrahydrobiopterin
BTE	*basic transcription element*
C	Cytosin
cAMP	*cyclic AMP,* zyklisches Adenosin-3', 5'-Monophosphat
CDK	*cyclin dependent kinase*
cDNA	*complementary DNA,* komplementäre DNA, hergestellt durch reverse Transkription einer mRNA
Cip1	*Cdk-interacting protein-1*
Cys	Cystein
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
DEPC	Diethypyrocarbonat
DNA	*desoxyribonucleic acid,* Desoxyribonucleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dYT	*double Yeast-Tryptone* Bakterienmedium
E.coli	*Escherichia coli* Bakterien
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
G	Guanin
Gpx	Glutathionperoxidase
IgG	Immunglobulin G

GAPDH	Glycerinaldehyd-3'-Phosphat-Dehydrogenase
His	Histidin
LDL	*low densitiy lipoprotein*
KIP1	*Kinase inhibitory protein-1*
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MOPS	*4-Morpholinopropane sulfonic acid*, 4-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	*messenger RNA*
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
$NO^{\bullet}$	Stickstoffmonoxyd
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCNA	*proliferating cell nuclear antigen*
PCR	*polymerase chain reaction,* Polymerase-Kettenreaktion
RNA	*ribonucleic acid,* Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	*reactive oxygen species*, reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Drehzahl in *rounds per minute*
rRNA	ribosomale RNA
RT	reverse Transkription
SSC	*standard saline citrate*-Puffer
SDS	*sodiumdodecylsulfate,* Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
TAE	Tris/Acetat/EDTA-Puffer
Taq	*Thermophilus aquaticus*
TBE	Tris/Borsäure/EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
tRNA	*transfer RNA*
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
U	Uracil
WAF1	*wild-type p53-activated fragment-1*
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-ß-D-galactosid

1 Einleitung

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind eine Gruppe von Molekülen, die molekularen Sauerstoff und seine Derivate in allen aeroben Zellen umfaßt. Eine übermäßige Produktion von ROS, die das Maß der endogenen antioxidativen Mechanismen übersteigt, wird mit Prozessen in Zusammenhang gebracht, im Verlauf derer biologische Makromoleküle wie DNA, Proteine, Kohlenhydrate und Lipide oxidiert werden. Dieser Zustand wird als oxidativer Streß bezeichnet.

ROS sind an einer Vielzahl physiologischer, aber auch pathophysiologischer Prozesse beteiligt (Babior 2000, Barnes 1990, Berk 1999, de Groot 1994, Hensley, Robinson, et al. 2000). Es häufen sich Hinweise darauf, daß oxidativer Streß eine wichtige Rolle in der Pathogenese vieler kardiovaskulärer Erkrankungen spielt, dazu gehören Hypercholesterinämie, Arteriosklerose, Bluthochdruck, Diabetes und Herzinsuffizienz (Cai & Harrison 2000).

Als Quellen von ROS im Organismus kommen verschiedene Ereignisse in Frage, beispielsweise die mitochondriale oxidative Phosphorylierung (Chance, Sies, et al. 1979), ionisierende Strahlung (Skov 1984), Verstoffwechselung exogener Komponenten und pathologische metabolische Prozesse (Shackelford, Kaufmann, et al. 2000).

Die Bildung von ROS wird beispielsweise in Blutgefäßen und dem Myokard in Reaktion auf Verletzungen erhöht (Berk 1999, Bolli 1988, Dart & Sanders 1988, Das, Engelman, et al. 1999, de Groot 1994, Ferrari, Agnoletti, et al. 1998, Goldhaber & Weiss 1992, Hensley, Robinson, et al. 2000, Rao & Berk 1992). Eine wichtige Rolle spielen ROS in der Frühform der Arteriosklerose und der endothelialen Dysfunktion (Cai & Harrison 2000). Außerdem besteht ein Zusammenhang zwischen der Bildung von ROS und Entzündungsreaktionen und viralen Infektionen (Barnes 1990, Israel & Gougerot-Pocidalo 1997, Speir, Shibutani, et al. 1996).

ROS können direkte zelluläre Schädigungen verursachen (Halliwell & Aruoma 1991, Masutani 2000, Mello Filho & Meneghini 1985), die Mitose stimulieren (Berk 1999, Greene, Velarde, et al. 2000, Li, Dietz, et al. 1997, Rao & Berk 1992), als intrazelluläre Signalmoleküle fungieren (Dreher & Junod 1995, Finkel 1998, Finkel 1999, Finkel 2000, Kojda & Harrison 1999) oder aber auch vasoprotektives Stickstoffmonoxid ($NO^{\bullet}$) abfangen (Cai & Harrison 2000, Ferrari, Agnoletti, et al.

1998, Gutteridge & Halliwell 1990, Harrison 1997, Jaeschke 1995, Kojda & Harrison 1999, Patel, Moellering, et al. 2000). Sie werden in der Zelle durch enzymatische Prozesse gebildet oder entstehen aus weiteren Reaktionen von ROS mit anderen Molekülen in der Zelle.

1.1 Eigenschaften reaktiver Sauerstoffspezies

Viele ROS besitzen ungepaarte Elektronen und sind daher freie Radikale. Dazu gehören Moleküle wie das Superoxid-Anion ($O_2^{\bullet -}$), das Hydroxyl-Radikal ($OH^{\bullet}$), Stickstoffmonoxid ($NO^{\bullet}$) und Lipid-Radikale.

Andere ROS wie H_2O_2, Peroxynitrit ($ONOO^-$) und hypochlorische Säure (HOCl) sind selbst keine freien Radikale, haben aber oxidierende Effekte, die zum oxidativen Stress beitragen. Die zelluläre Produktion eines Typs von ROS kann durch verschiedene Radikal-Kettenreaktionen zur Produktion anderer ROS führen (Cai & Harrison 2000).

1.1.1 Das Hydroxylradikal

Wie bereits erwähnt besitzen freie Radikale ein oder mehrere ungepaarte Elektronen. Viele freie Radikale sind hochreaktiv und ziehen Wasserstoffatome von anderen Molekülen ab oder brechen Doppelbindungen auf. Das reaktivste dieser Radikale ist das Hydroxylradikal ($OH^{\bullet}$), welches in biologischen Systemen durch sog. Fenton-Reaktionen von H_2O_2 mit Eisen-oder Kupferionen entsteht (Duell, Lengfelder, et al. 1995, Stadtman 1990):

$$H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow OH^{\bullet} + OH^- + Fe^{3+}$$

Das Metallion kann dann durch eine der in biologischen Systemen vorhandenen reduzierenden Substanzen wie z.B. Ascorbinsäure (Higson, Kohen, et al. 1988) reduziert werden und dann mit einem weiteren H_2O_2-Molekül reagieren und so ein weiteres $OH^{\bullet}$-Molekül produzieren.

H_2O_2 diffundiert als apolares Molekül leicht in die Zelle (Dreher & Junod 1995) und kann dort mit zellulären Molekülen reagieren.

Das hochreaktive $OH^{\bullet}$-Radikal dagegen kann die Cytoplasmamembran wahrscheinlich nicht passieren, daher können viele seiner Effekte entweder durch intrazelluläre $OH^{\bullet}$-Produktion oder Oxidation von Membrankomponenten bedingt sein (Dreher & Junod 1995).

1.1.2 Das Superoxidradikal

Das Superoxidradikal $O_2^{\bullet -}$ kann, obwohl es ein polares Molekül ist, wahrscheinlich Membanen passieren, dies wurde an synthetischen Membranen gezeigt (Gomes, Cuccovia, et al. 1993). So könnte es von außen in die Zelle gelangen, es wird jedoch durch verschiedene Prozesse auch innerhalb der Zelle produziert. Es ist selbst nur wenig reaktiv und agiert hauptsächlich als Reduktionsmittel (Dreher & Junod 1995). Daher wird oxidativer Streß, der von $O_2^{\bullet -}$-generierenden Systemen herrührt, vermutlich durch andere ROS verursacht, deren Entstehung das Vorhandensein von $O_2^{\bullet -}$ erfordert. Dazu gehören wie oben beschrieben H_2O_2, mittelbar also auch $OH^{\bullet}$, sowie reaktive Stickstoffspezies.

Reaktive Stickstoffspezies entstehen beispielsweise durch die Reaktion von $NO^{\bullet}$ mit $O_2^{\bullet -}$, eine davon ist Peroxynitrit (Pryor & Squadrito 1995):

$$NO^{\bullet} + O_2^{\bullet -} \rightarrow ONOO^{-}$$

So wird nicht nur vasoprotektives $NO^{\bullet}$ abgefangen, sondern Peroxynitrit reagiert auch weiter zu einem Agens, welches nitrosierende Eigenschaften besitzt und beispielsweise Tyrosinreste nitrosieren kann.

1.2 ROS-produzierende Enzyme

Einige Enzyme in der Zelle sind verantwortlich für die Bildung von ROS, dazu gehören neben einigen anderen die NADH/NADPH-Oxidase, die Xanthin-Oxidase und die Stickstoffmonoxid-Synthase.

1.2.1 Die NADH/NADPH-Oxidase

Die NADH/NADPH-Oxidase ist ein membrangebundenes Enzym, welches die Bildung von $O_2^{\bullet -}$ aus molekularem Sauerstoff (O_2) und NADPH katalysiert:

$$2\ O_2 + NADPH \rightarrow 2\ O_2^{\bullet -} + NADPH^+ + H^+$$

In glatten Gefäßmuskelzellen wird die NADPH-Oxidase beispielsweise durch Thrombin (Holland, Meyer, et al. 1998), *platelet-derived growth factor* (PDGF) (Marumo, Schini-Kerth, et al. 1997), Tumornekrosefaktor-a (De Keulenaer, Alexander, et al. 1998) und den Vasokonstriktor Angiotensin II aktiviert (Baas & Berk 1995, Griendling, Minieri, et al. 1994, Zafari, Ushio-Fukai, et al. 1998) und so vaskuläre Hypertrophie induziert.

Die spezifische biologische Rolle des durch die NADPH-Oxidase gebildeten $O_2^{\bullet -}$ ist noch unklar, aber es wird vermutet, daß es intrazelluläre Signalwege auf verschiedene Arten beeinflussen kann. Es wurde z.B. gezeigt, daß die p42/p44 Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) durch $O_2^{\bullet -}$ aktiviert werden kann (Baas & Berk 1995). Das Hormon Bradykinin beispielsweise vermag dies über die Produktion intrazellulärer ROS und erhöht so auch die Expression von c-fos mRNA in VSMC, ein Prozeß, der durch Hemmung der NADPH-Oxidase verhindert werden kann (Greene, Velarde, et al. 2000).

1.2.2 Die Xanthinoxidase

Die Xanthinoxidase ist ein molybdän- und eisenhaltiges Flavoprotein, welches in der Zelle für den oxidativen Abbau von Hypoxanthin (Franceschi, Graham, et al. 1990, Jornot & Junod 1989, Jornot, Petersen, et al. 1991, Masumoto, Tasaka, et al. 1990) zu Xanthin, und von Xanthin (Geeraerts, Ronveaux-Dupal, et al. 1991, Hirosumi, Ouchi, et al. 1988, Maki, Berezesky, et al. 1992) zu Urat verantwortlich ist. Als Oxidationsmittel für diese beiden Reaktionen dient molekularer Sauerstoff, er wird zu H_2O_2 reduziert. Diese Reaktion verläuft primär über die Entstehung von $O_2^{\bullet -}$, welches dann spontan oder enzymatisch katalysiert zu H_2O_2 dismutiert.

Studien haben gezeigt, daß frühe Stadien der experimentellen, durch ernährungsbedingte Hypercholesterinämie hervorgerufenen Arteriosklerose mit einem erhöhten $O_2^{\bullet -}$-Spiegel einhergehen. Dieses $O_2^{\bullet -}$ wurde vermutlich von der Xanthinoxidase produziert, da unter diesen experimentellen Bedingungen die $O_2^{\bullet -}$-Produktion durch Oxypurinol, einen Inhibitor der Xanthinoxidase-vermittelten $O_2^{\bullet -}$-Produktion, normalisiert werden konnte (Ohara, Peterson, et al. 1993). In hypercholesterinämischen Patienten konnte durch die Gabe von Oxypurinol die verminderte Vasodilatation verbessert werden (Cardillo, Kilcoyne, et al. 1997).

1.2.3 Die Stickstoffmonoxid-Synthase

Die Stickstoffmonoxid-Synthase (NO-Synthase, NOS) (Marletta 1994) katalysiert die Produktion von Stickstoffmonoxid ($NO^{\bullet}$) aus L-Arginin, Sauerstoff (O_2) und NADPH:

$$\text{L-Arginin} + O_2 + \text{NADPH} \rightarrow NO^{\bullet} + \text{Citrullin} + NADP^{+}$$

Allgemein gibt es zwei Typen der NOS, konstitutive und induzierbare. Die konstitutiven Formen sind Enzyme mit schwacher Aktivität, die geringe Mengen $NO^{\bullet}$ als Signalmoleküle produzieren (Murad 1994), sie finden sich hauptsächlich im vaskulären Endothel (eNOS) und dem zentralnervösen System. Die induzierba-

re Form ist ein Enzym mit hoher Aktivität, welches beispielsweise von entsprechend stimulierten Phagozyten produziert wird (Hevel, White, et al. 1991).

Die NO-Synthase ist ein komplexes System, welches FAD, FMN, Häm und Tetrahydrobiopterin (BH_4) enthält.

Das Enzym benötigt BH_4, um Elektronen auf ein Stickstoffatom von L-Arginin zu übertragen, wodurch $NO^{\bullet}$ entsteht. In Abwesenheit von L-Arginin oder BH_4 kann beispielsweise die eNOS $O_2^{\bullet -}$ und H_2O_2 produzieren. Dieses Phänomen wird als NOS-Entkopplung bezeichnet (Heinzel, John, et al. 1992, Pou, Pou, et al. 1992, Vasquez-Vivar, Kalyanaraman, et al. 1998).

Die Mechanismen, durch die die eNOS *in vivo* entkoppelt werden kann, sind bisher unklar. Neuere Studien lassen vermuten, daß Peroxynitrit ($ONOO^-$), das Produkt der Reaktion von $NO^{\bullet}$ und $O_2^{\bullet -}$, BH_4 oxidieren und so als Substrat für die eNOS unbrauchbar machen kann, wodurch eine Entkopplung herbeigeführt werden könnte (Cai & Harrison 2000, Bech-Laursen, Somers, et al. 2000).

Diese Entkopplung kann durch mindestens drei Mechanismen zu oxidativem Stress und endothelialer Dysfunktion führen: Zum Einen kann die enzymatische $NO^{\bullet}$-Produktion generell vermindert sein, so daß die Radikale, die normalerweise mit $NO^{\bullet}$ reagieren würden, andere zelluläre Ziele angreifen könnten. Zum Zweiten kann das Enzym mit der Produktion von $O_2^{\bullet -}$ beginnen und so zum oxidativen Streß beitragen. Zuletzt ist es wahrscheinlich, daß die eNOS teilweise entkoppelt wird, so daß sowohl O_2^- als auch $NO^{\bullet}$ gleichzeitig produziert werden. Unter diesen Umständen würde die eNOS ein Peroxynitrit-generierendes System darstellen und so den oxidativen Streß verstärken (Cai & Harrison 2000).

1.3 *Scavenger*-Enzyme

Die Zelle besitzt auch Systeme, die die Schädigung zellulärer Komponenten durch ROS verhindern sollen, indem sie sie abfangen, d.h. als *Scavenger* dienen. Dazu gehören die Superoxiddismutase, die Katalase und die Glutathionperoxidase.

1.3.1 Die Superoxiddismutase

Die Superoxiddismutase (SOD) ist ein Enzym, dessen Aufgabe es ist, intrazelluläres $O_2^{\bullet -}$ zu H_2O_2 und O_2 umzusetzen:

$$2\ O_2^{\bullet -} + 2\ H^+ \rightarrow O_2 + H_2O_2$$

Diese Reaktion nennt sich Dismutation, da das Substrat $O_2^{\bullet -}$ mit sich selbst reagiert und so ein oxidiertes Produkt (hier O_2) und ein reduziertes Produkt (hier H_2O_2) entstehen.

Die Aufgabe der SOD ist es, die intrazelluläre Konzentration von $O_2^{\bullet -}$ niedrig zu halten, ohne die SOD wurde die Dismutationsreaktion zwar ebenfalls spontan ablaufen, jedoch müßte dafür die Konzentration an freien $O_2^{\bullet -}$-Molekülen deutlich höher sein. Im Endeffekt ist also die intrazelluläre $O_2^{\bullet -}$-Konzentration durch die enzymkatalysierte Dismutation geringer als nur durch die Spontanreaktion (Babior 2000).

1.3.2 Die Katalase

Die Katalase ist vornehmlich in den Peroxisomen lokalisiert und katalysiert dort die Oxidation verschiedener Substrate mit Hilfe des von anderen Enzymen gebildeten H_2O_2. Sammelt sich zuviel H_2O_2 in der Zelle an katalysiert das Enzym wie die SOD eine Dismutationsreaktion, im deren Verlauf das reaktionsfreudige H_2O_2 zu Wasser und molekularen Sauerstoff umgesetzt wird (Alberts, Bray, et al. 1995):

$$2\ H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2$$

1.3.3 Die Glutathionperoxidase

Die Glutathionperoxidase (Gpx) spielt eine wichtige Rolle beim Schutz der Zelle gegen Oxidantien und bei der Entgiftung. Sie ist ein selenhaltiges Enzym, welches Peroxide reduziert und dazu Glutathion (GSH) als Reduktionsmittel benutzt (Stryer 1991). Dieses wird dabei in eine oxidierte Form überführt, in der zwei Tripeptide über eine Disulfidbrücke verbunden sind:

$$\text{GSH R-O-OH} \rightarrow \text{GSGG} + H_2O + \text{ROH}$$

1.4 Wirkungen reaktiver Sauerstoffspezies

Eine Besonderheit der Reaktionen von freien Radikalen mit anderen Molekülen ist, daß das Reaktionsprodukt wieder ein freies Radikal ist, beispielsweise:

$$\equiv C - H + OH^{\bullet} \rightarrow \equiv C^{\bullet} + H_2O$$

So kann eine Vielzahl neuer reaktiver Reaktionsprodukte mit einem ungepaarten Elektron an Kohlenstoff, Sauerstoff, Stickstoff oder Schwefel entstehen, von denen viele wiederum sehr reaktionsfreudig sind. So entsteht eine Kettenreaktion von Ereignissen, und sowohl $OH^{\bullet}$ selbst als auch reaktive sekundäre Radikale können Schäden an wichtigen biologischen Molekülen verursachen. Eine solche Kettenreaktion kommt erst zum Erliegen, wenn ein freies Radikal auf ein weiteres Molekül mit einem ungepaarten Elektron trifft und mit diesem reagiert (Babior 2000), wie z.B.:

$$\equiv C^{\bullet} + {}^{\bullet}C \equiv \rightarrow \equiv C - C \equiv$$

So wurden für $OH^{\bullet}$ beispielsweise DNA-schädigende Wirkungen wie Strangbrüche gezeigt (Duell, Lengfelder, et al. 1995, Halliwell & Aruoma 1991, Mello Filho & Meneghini 1985, Min, Nishida, et al. 1999).

Reaktionen von Radikalen mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren in Zellmembranen können in Fettsäure-Peroxyl-Radikalen resultieren, die wiederum benachbarte Fettsäureketten angreifen können. Endprodukte solcher Lipidperoxidationsprozesse können beispielsweise zytotoxische und mutagene Eigenschaften besitzen (Herbst, Toborek, et al. 1999). Außerdem können andere zelluläre Komponenten wie Proteine oder Nukleinsäuren geschädigt werden, was eine generelle Dysfunktion oder sogar das Absterben der Zelle bedeuten könnte (Bolli 1988, Dart & Sanders 1988, Duell, Lengfelder, et al. 1995, Ferrari, Agnoletti, et al. 1998, Goldhaber & Weiss 1992, Gutteridge & Halliwell 1990, Halliwell & Aruoma 1991, Kloner, Przyklenk, et al. 1989, Min, Nishida, et al. 1999, Richard, Murry, et al. 1990).

In verschiedenen Zelltypen haben ROS bestimmt Aufgaben, in Neutrophilen und Phagozyten dienen sie beispielsweise dazu, eindringende Mikroorganismen abzuwehren (Babior, Kipnes, et al. 1973, Babior 2000, Klebanoff & Pincus 1971). Dabei wird zunächst $O_2^{\bullet -}$ durch die NADH/NADPH-Oxidase produziert, welches hauptsächlich in einer Dismutationsreaktion H_2O_2 bildet. Dieses wird in der Folge entweder zu hypochlorischer Säure (HOCl), $OH^{\bullet}$ oder $ONOO^-$ umgesetzt. Diese reaktiven Oxidantien können jedoch auch eine Schädigung benachbarter Gewebe verursachen (Babior, Kipnes, et al. 1973, Barnes 1990) und so eine Rolle in der Pathogenese vieler Erkrankungen spielen.

Neben diesen Wirkungen von ROS häufen sich die Hinweise darauf, daß sie in geringen Konzentrationen auch als Signalmoleküle wichtige Aufgaben erfüllen (Finkel 1998, Gamaley & Klyubin 1999, Lander 1997). So wird die Produktion von $O_2^{\bullet -}$ beispielsweise durch Mitogene wie PDGF oder Angiotensin II über eine Aktivierung der NADH/NADPH-Oxidase erhöht (Griendling, Minieri, et al. 1994, Griendling, Sorescu, et al. 2000, Marumo, Schini-Kerth, et al. 1997, Zafari, Ushio-Fukai, et al. 1998), was $O_2^{\bullet -}$ eine Rolle bei der Induktion der zellulären Proliferation zuweisen könnte.

$O_2^{\bullet -}$ selbst produziert verschiedene *second messenger*, die typisch für Mitogene sind (Baas & Berk 1995, Berk 1999, Cheng, Shih, et al. 1999, Conrad, Millhorn, et al. 2000, Rao & Berk 1992, Robinson, Stewart, et al. 1999, Zafari, Ushio-Fukai, et al. 1998). Dabei scheinen z.B. Kalzium und cAMP eine Rolle zu spielen, so wurde z.B. gezeigt, daß ROS Einfluß auf den intrazellulären Kalziumspiegel

nehmen (Dreher & Junod 1995, Franceschi, Graham, et al. 1990, Maki, Berezesky, et al. 1992, Masumoto, Tasaka, et al. 1990, Orie, Zidek, et al. 1999, Suzuki, Forman, et al. 1997, Zafari, Ushio-Fukai, et al. 1998).

Im Gegensatz dazu sind die Daten zur Rolle von $OH^{\bullet}$ im Zusammenhang mit zellulärer Proliferation widersprüchlich. So wurden $OH^{\bullet}$ sowohl hypertrophe als auch apoptotische Effekte z.B. in VSMC zugeschrieben (Griendling & Harrison 1999, Li, Dietz, et al. 1997, Li, Dietz, et al. 1997, Li, Maasch, et al. 1999).

1.5 ROS im vaskulären System: Endotheliale Dysfunktion und Arteriosklerose

1.5.1 Endotheliale Dysfunktion

Die Bezeichnung „endotheliale Dysfunktion“ bezog sich bisher auf mehrere pathologische Zustände, die veränderte antikoagulative und anti-entzündliche Eigenschaften des Endothels, eine gestörte Kontrolle vaskulären Wachstums und eine Dysregulation des vaskulären *Remodeling* mit einschloß (Gimbrone 1995). Oft bezieht sich die Bezeichnung jedoch auf eine Störung der Endothel-abhängigen Vasorelaxation, die durch einen Verlust der Bioaktivität von $NO^{\bullet}$ in der Gefäßwand verursacht wird. Mehrere Studien am Menschen haben gezeigt, daß traditionelle Risikofaktoren für die Arteriosklerose wie Bluthochdruck, Hypercholesterinämie, Diabetes und Rauchen ebenfalls zur endothelialen Dysfunktion prädisponieren (Cai & Harrison 2000).

Eine Verringerung der Bioverfügbarkeit von $NO^{\bullet}$ kann beispielsweise durch einen beschleunigten $NO^{\bullet}$-Abbau durch ROS zustande kommen (Harrison 1997). Unter physiologischen Bedingungen minimieren endogene antioxidative Mechanismen diese Interaktionen und erhalten so ein Gleichgewicht zwischen $O_2^{\bullet -}$ und $NO^{\bullet}$ aufrecht, in verschiedenen Erkrankungen ist dieses Gleichgewicht jedoch gestört.

In hypercholesterinämischen Kaninchen wurde beispielsweise eine gestörte Vasorelaxation bei erhöhter $NO^{\bullet}$-Produktion gemessen. Durch Applikation von SOD konnte gezeigt werden, daß die verringerte Bioverfügbarkeit von $NO^{\bullet}$ durch eine erhöhte Produktion von $O_2^{\bullet-}$ hervorgerufen wurde (Minor, Myers, et al. 1990, Mugge, Elwell, et al. 1991).

Eine veränderte Endothel-abhängige Vasorelaxation konnte in Tiermodellen verschiedener Erkrankungen mit einer erhöhten $NO^{\bullet}$-Zersetzung durch ROS in Ver-bindung gebracht werden, dazu gehören Bluthochdruck, Diabetes, Zigarettenrauch und Herzinsuffizienz (Durante, Sen, et al. 1988, Lockette, Otsuka, et al. 1986, Oyama, Kawasaki, et al. 1986, Winquist, Bunting, et al. 1984). Durch Gabe antioxidativer Vitamine konnte außerdem eine Verbesserung der Vasorelaxation erreicht werden (Levine, Frei, et al. 1996, Solzbach, Hornig, et al. 1997, Ting, Timimi, et al. 1996).

Neben $O_2^{\bullet-}$ können auch Lipidradikale mit $NO^{\bullet}$ reagieren (O'Donnell, Chumley, et al. 1997), beispielsweise kann oxidiertes *low densitiy lipoprotein* (oxLDL) im Gegensatz zu nativem LDL in isolierten Gefäßen die Endothel-abhängige Vasorelaxation verhindern (Tanner, Noll, et al. 1991). Kürzlich wurde gezeigt, daß auch $OH^{\bullet}$ mit $NO^{\bullet}$ reagieren und so dessen Bioverfügbarkeit einschränken kann (Pieper, Langenstroer, et al. 1997).

Die endotheliale Dysfunktion kann letztendlich zu Verletzungen der Gefäßwand führen und so die Arteriosklerose begünstigen.

1.5.2 Arteriosklerose

Die Arteriosklerose ist ein Sammelbegriff für die Verdickung und Verhärtung der Arterienwand und wird durch eine Ansammlung von Lipiden und fibrotischen Komponenten in diesen Gefäßen charakterisiert (Isselbacher, Braunwald, et al. 1995, Lusis 2000).

Eine Theorie zur Entstehung der Arteriosklerose ist die „Reaktion auf eine Schädigung“, die mit vielen experimentellen Beweisen übereinstimmt. Danach sind die die innere Gefäßwand auskleidenden Endothelzellen wiederholten oder kontinuierlichen Angriffen auf ihre Integrität ausgesetzt, die letztendlich zu Verlet-

zungen und einem Funktionsverlust der Zellen führen, so daß sie nicht mehr als Permeabilitätsbarriere dienen können. Zu diesen Verletzungen des Endothels gehören z.B. metabolische Schädigungen wie durch eine Hypercholesterinämie, oder mechanische Belastungen wie sie bei Bluthochdruck auftreten.

Durch die geschädigte Endothelzellschicht können dann Plasmabestandteile in das darunterliegende Gewebe eindringen, welches aus glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) besteht. Außerdem lagern sich an diesen Läsionen Mono- und Thrombozyten an, die Monozyten können sich zu Makrophagen entwickeln und Entzündungsreaktionen auslösen, und Thrombozyten und Makrophagen setzen eine Vielzahl von sekretorischen Produkten frei, einschließlich Wachstumsfaktoren und Zytokinen.

Dies kann die Proliferation der VSMC an der Verletzungsstelle stimulieren, die proliferierenden VSMC können überdies eine Matrix aus Bindegewebe bilden und Lipide einlagern. Die aus Monozyten entwickelten Makrophagen nehmen ebenfalls Lipide auf und werden zu sog „Schaumzellen“ die mit der Zeit absterben und ihren lipidreichen Inhalt ins Innere der Läsion abgeben. So entsteht ein arteriosklerotischer Plaque mit einer sog. *„fibrous cap“* mit einem lipidreichen nekrotischen Inneren (*„necrotic core“*). Dabei hat sich gezeigt, daß natives LDL nicht schnell genug von Makrophagen aufgenommen werden kann, daß sie sich zu Schaumzellen entwickeln können, sondern daß das LDL modifiziert wird. Die wichtigste Modifikation für die frühe Entstehung von Läsionen ist dabei die Oxidation von LDL durch oxidative Abfallprodukte vaskulärer Zellen (Lusis 2000).

Mehrere Risikofaktoren wie auch Bluthochdruck oder verschiedene Hormone können zu einer Ausbildung solcher fibrotischen Läsionen führen, dazu gehört auch Angiotensin II, welches direkt das Wachstum von VSMC und die Produktion extrazellulärer Matrix stimulieren kann (Griendling, Minieri, et al. 1994, Lusis 2000).

Die arteriosklerotischen Plaques werden immer komplexer und können schließlich zur Ausbildung eines Thrombus führen, die im allgemeinen mit einer Plaqueruptur einhergeht (Lusis 2000).

Für die Pathogenese der Arteriosklerose ist das Wachstum von VSMC und die Plaqueinstabilität von entscheidender Bedeutung, daher stehen die Proliferation und der Arrest zellulären Wachstums in den verschiedenen Stadien der Arteriosklerose im Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses.

1.6 Fragestellung und Ziel der Arbeit

Wie bereits erwähnt üben ROS ihre Wirkungen nicht nur über das Abfangen von $NO^{\bullet}$ und oxidative Prozesse an Biomolekülen aus, sondern sie haben auch einen Einfluß auf die Mobilisierung verschiedener *second messenger* und können außerdem selbst als Signalmoleküle in der Zelle wirken.

ROS beeinflussen Wachstum und Apoptose in verschiedenen Zelltypen, beispielsweise auch glatten Gefäßmukelzellen (VSMC) (Irani 2000, Kunsch & Medford 1999, Suzuki & Ford 1999). $O_2^{\bullet -}$ kann in glatten Gefäßmuskelzellen Wachstum erzeugen, die zellulären Wirkungen von $OH^{\bullet}$ sind noch weitgehend ungeklärt. Das durch ROS induzierte Wachstum von VSMC spielt eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der Arteriosklerose und Restenose.

Darüber hinaus können ROS auch Einfluß auf die zelluläre Genexpression nehmen, eine solche Wirkung auf die Genexpression durch ROS wurde bereits mehrfach beschrieben (Allen & Tresini 2000). Ein Zusammenhang zur Proliferation von VSMC oder zur Arteriosklerose konnte jedoch bisher nicht gezeigt werden.

Um Gene zu identifizieren, deren Expression in VSMC durch ROS verändert wird, wurde eine Methode des *gene hunting* angewandt, um möglicherweise ROS-sensitive Gene identifizieren zu können, deren veränderte Expression Hinweise auf physiologische oder pathophysiologische zelluläre Prozesse im Zusammenhang mit ROS bedeuten könnten. Eine Methode, die geeignet ist, solche Veränderungen in der Genexpression von Zellen oder Geweben als Reaktion auf veränderte Bedingungen oder äußere Stimulantien umfassend zu untersuchen, ist das Differential Display von mRNA (Kap. 2.2.3).

1.6.1 Experimentelle Aufgaben

- Differential Display von mRNA aus mit ROS behandelten kultivierten VSMC. Zunächst wurde nur die Wirkung von $OH^{\bullet}$ auf VSMC untersucht. Als $OH^{\bullet}$-erzeugendes System wurde eine Kombination von H_2O_2 und Fe^{3+}NTA

gewählt, die als potenter Erzeuger von $OH^{\bullet}$ gilt (Dreher & Junod 1995, Inoue & Kawanishi 1987, Min, Nishida, et al. 1999).

- Untersuchungen zur Proliferation von VSMC unter dem Einfluß von $OH^{\bullet}$ oder $O_2^{\bullet -}$, sowie Untersuchungen zum Einfluß der im Differential Display identifizierten Gene auf die Proliferation von VSMC.

- Untersuchungen zur Wirkung von ROS auf die Expression wichtiger Zellzykluskomponenten und zur Aufgabe der im Differential Display identifizierten Gene bei der Vermittlung dieser Wirkung.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Acrylamide > 99,9%, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland

Agarose ultrapure Electrophoresis Grade, Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland

Ampicillin (D [-]- a- Aminobenzylpenicillin), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

Ammonium Persulfate (APS), SERVA Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg, Deutschland

Bacto® Tryptone, DIFCO Laboratories, Augsburg, Deutschland

Bacto® Yeast Extract, DIFCO Laboratories, Augsburg

Borsäure, E. Merck, Darmstadt, Deutschland

Bromphenolblau, E. Merck, Darmstadt

Chloroform, E. Merck, Darmstadt

Denhard's Solution, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Diethylpyrocarbonat, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Dithiothreitol (DTT), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Dodecylsulfate – Na-Salt, 2x cryst., SERVA Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg

Eisessig, E. Merck, Darmstadt

Ethanol, E. Merck, Darmstadt

Ethidiumbromid, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Ethylenediaminetetraacetic Acid (EDTA), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

$FeCl_3$, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Fetal Calf Serum, Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe

Formaldehyd 37%, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Formamid, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Ficoll® 400, Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg, Deutschland

Glukose, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Glycerol, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Glycin, SERVA Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg

H_2O_2 30%, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Morpholinopropane sulfonic acid (MOPS), SERVA Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg

Natriumhydroxyd-Plätzchen, E. Merck, Darmstadt

Nitrilotriacetic Acid (NTA), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

N,N'-Methylene Bisacrylamid, SERVA Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg

N, N, N', N' – Tetramethylethylendiamin (TEMED), SERVA Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg

NuSieve® GTG® Agarose (Low Melting Point), FMC BioProducts, Rockland, USA

peqGOLD dNTP-Mix, 10 mM, PeqLab, Erlangen, Deutschland

peqGOLD RNAPure, PeqLab, Erlangen

Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol 25:24:1, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Purin (7H-imidazo[4,5-d]pyrimidine), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

SDS (Sodiumdodecylsulfate), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Salmon Testes DNA (10,4mg/ml), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Sodium Acetate, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Trispuffer (Tris (hydroxymethyl)-amino-methan), 99%+, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Urea Electrophoresis Reagent, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Xanthinoxidase, 0,5U/ml, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

X-Gal (5-Brom-4-chlor-3-indolyl-ß-D-galactopyranosid), PeqLab, Erlangen

Xylene-Cyanol FF, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

2-Propanol (Isopropanol), Carl Roth GmbH + Ko, Karlsruhe, Deutschland

2.1.2 Häufig verwendete Puffer

Wenn nicht anders angegeben, beziehen sich die Mengenangaben der Puffer-bestandteile auf ein Endvolumen von 1000 ml.

20x MOPS-Puffer (pH 7,0):	83,6 g MOPS 33,2 ml 3M Na-Acetat 40 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
RNA-Gel-Ladepuffer:	50% Glyzerin 1 mM EDTA 0,25% Bromphenolblau 0,25 % Xylene Cyanol FF
50X TAE-Puffer:	242 g Trispuffer 57,1 ml Eisesseig 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
DNA-Gel-Ladepuffer Typ II:	0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylene Cyanole FF 15% Ficoll
Acrylamid-Stammlösung für Differential Display :	238 g Acrylamid 12,5 g N,N'-Methylene Bisacrylamid ad 1000 ml 8,3 M Urea
10x TBE-Puffer:	1,34 M Tris/HCL pH 8,8 0,44 M Borsäure 25 mM EDTA
Differential Display Gel-Ladepuffer:	0,2% Bromphenolblau 0,2% Xylene Cyanol FF 10 mM EDTA 20% Glyzerin
6% denaturierendes Polyacrylamid-Sequenziergel für (Differential Display):	10 ml 10x TBE 24 ml Acrylamid-Stammlösung ad 100 ml 8,3 M Urea 30 µl TEMED 1000 µl APS
Prähybridisierungslösung:	50% Formamid 6x SSC 0,5% SDS 5x Denhard's Solution

Hybridisierungslösung:	50% Formamid 6x SSC 0,5% SDS
STE-Puffer:	0,1 M NaCl 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 1 mM EDTA
20x SSC (standard saline citrate):	3 M NaCl 0,3 M Na_3-Citrat
Protein-Lysepuffer:	100mM TRIS pH6,8 4% SDS 20% Glycerol 0,1mM PMSF 1µg/ml leupeptin 1µg/ml aprotinin
PBS (phosphate buffered saline)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,1 mM Na_2HPO_4 1,5 mM KH_2PO_4
SDS-PAGE Elektrophoresepuffer (pH 8,3)	25 mM Tris-Acetat 250 mM Glycin 0,1% w/v SDS
SDS-PAGE 2x Probenpuffer	100 mM Tris (pH 6,8) 200 mM DTT 4% w/v SDS 0,2% w/v Bromphenolblau 20% v/v Glyzerin
Semi-Dry-Blot Anodenlösung 1	300 mM Tris 0,01% Na-Azid 20% Methanol
Semi-Dry-Blot Anodenlösung 2	25 mM Tris 0,01% Na-Azid 20% Methanol
Semi-Dry-Blot Kathodenlösung	40 mM 6-Aminohexansäure 0,01% SDS 0,01% Azid 20% Methanol

2.1.3 Filter und Membranen

Hybond™-N Nylon Membrane, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
Whatman 3MM, Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
Hybond™ Nitrocellulosemembran, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland

2.1.4 Radiochemikalien

a -[^{32}P]-dCTP, 10µCi/µl
a -[^{33}P]-dATP, 10µCi/µl
ICN Biomedicals, Eschwege, Deutschland

2.1.5 Molekularbiologische Kits

Cell Death Detection ELISA^{PLUS} – Systems, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland
Cell Proliferation ELISA, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland
Enhanced Chemiluminscence (ECL) Kit, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland
E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit, PeqLab, Erlangen, Deutschland
One Shot™ Kit incl. INFaF' Competent Cells, Invitrogen BV, Groningen, Niederlande
Prime-It II Random-Primer Kit, Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland
RNAimage mRNA Differential Display Systems, GenHunter Corporation, Nashville, USA
TA-Cloning Kit, Invitrogen BV, Groningen, Niederlande

2.1.6 Restriktionsendonucleasen, Polymerasen und DNA-modifizierende Enzyme

***AmpliTaq* DNA Polymerase 5U/µl,** Perkin Elmer Applied Biosystems GmbH, Langen, Deutschland
DNase I, RNase-free, 10U/µl, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland
EcoRI, Eco RV, Hind III, Not I, Sac I, Xho I, 10 U/µl, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland
MMLV Reverse Transcriptase, 200U/µl, Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor, Promega GmbH, Heidelberg, Deutschland
RedTaq DNA Polymerase, 1U/µl, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
T4 DNA Ligase 1000U/ml, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland

2.1.7 DNA-Längenstandards und Protein-Molekulargewichts-Standards

DNA Molecular Weight Marker X, 250 µg/ml, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland
DNA Molecular Weight Marker XIV (100bp ladder) 250 µg/ml, Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland
peqGOLD 100 bp DNA-Leiter Plus, 0.5 mg DNA/ml, PeqLab, Erlangen, Deutschland
Prestained SDS-PAGE Standard High Range und Low Range, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland

2.1.8 Oligonukleotide

Primer für spezifische PCRs wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) bezogen. Die Differential Display-Primer waren in den RNAimage-Kits (GenHunter Corp.) enthalten. Im Anhang sind solche Primer aufgeführt, mit denen die differentielle Expression später verworfener Klone überprüft wurde.

Primer für die reverse Transkription:

p(dN_6)-Oligonucleotid-Primer (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland)

Differential Display-Primer:

HT_{11}-G:	5’-AAGCTTTTTTTTTTTG-3’
HT_{11}-A:	5’-AAGCTTTTTTTTTTTA-3’
HT_{11}-C:	5’-AAGCTTTTTTTTTTTC-3’
H-AP57:	5’-AAGCTTGTTGGTA-3’
H-AP58:	5’-AAGCTTAACTGAG-3’
H-AP59:	5’-AAGCTTCTAGCAT-3’
H-AP60:	5’-AAGCTTTCGAATC-3’
H-AP61:	5’-AAGCTTAGTTGCT-3’
H-AP62:	5’-AAGCTTGCAAGTT-3’
H-AP63:	5’-AAGCTTTTATCCG-3’
H-AP64:	5’-AAGCTTCATATGC-3’
H-AP65:	5’-AAGCTTCAAGACC-3’
H-AP66:	5’-AAGCTTGCCTTTA-3’
H-AP67:	5’-AAGCTTTATTTAT-3’
H-AP68:	5’-AAGCTTCTTTGGT-3’
H-AP69:	5’-AAGCTTAATAACG-3’
H-AP70:	5’-AAGCTTTCATATG-3’
H-AP71:	5’-AAGCTTGTAGTAA-3’
H-AP72:	5’-AAGCTTTCAAAGA-3’

Weitere PCR-Primer

Id3-Sense:	5'-CGACATGAACCACTGCTACTC-3'
Id3-Antisense:	5'-GGTCAGTGGCAAAAACTCCTC-3'
Id3 full length Sense:	5’-CTCCAACCTCCAACATGAAGG-3’
Id3 full length Antisense:	5’-GTTCAAAAATGGTTTATTATGCAAAATGTT-3’
GKLF Sense:	5'-CAACGACCTCCTGGACCTAGA-3'
GKLF Antisense:	5'-TTCCTCGGGACTCAGTGTAGG-3'
GKLF full length Sense:	5’-ATGAGGCAGCCACCTGGCGA-3’

GKLF full length Antisense:	5’-TTAAAAGTGCCTCTTCATGTGTAAGG-3’
GAPDH Sense:	5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'
GAPDH Antisense:	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

2.1.9 Vektoren

pCR™II	Amp^r, $Kana^r$, lacZ’, f1 ori, ColE1 ori, P_{Sp6}, P_{T7} (Invitrogen BV, Groningen, Niederlande)
pcDNA 3	Amp^r, Neo^r, SV40 ori, P_{SV40}, P_{CMV}, P_{Sp6}, P_{T7}, BGH pA, SV40 pA (Invitrogen BV, Groningen, Niederlande)

2.1.10 Bakterienstämme

Für alle Transformationen zur Vermehrung von Plasmid-DNA wurden Colibakterien des Stammes INFαF’ (Invitrogen BV, Groningen, Niederlande) verwendet.

2.1.11 Antikörper

Folgende mono- und polyklonale Antiseren wurden in dieser Arbeit verwendet:

GKLF (M-19 goat polyclonal IgG, sc-1905)
Id3 (C-20 rabbit polyclonal IgG, sc-490)
p53 (Pab 240 mouse monoclonal IgG, sc-99)
p27 (F-8 mouse monoclonal IgG, sc-1641)
Rb (M-153 rabbit polyclonal IgG, sc-7905) Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA
p21 (mouse mixed monoclonal IgG, #05-345), Upstate Biotechnology, Biomol Hamburg, Deutschland
Peroxidase-gekoppelte anti-Kaninchen, anti-Maus und anti-Ziege IgG, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

2.1.12 Kulturmedien

Zellkultur:

Optimem I, Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe
Fetal Calf Serum (FCS), Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe

Bakterienkultur:

2x YT Medium (1l):	16 g Bacto Tryptone 10 g Bacto Yest Extract 5 g NaCl
SOC Medium (1l):	20 g Bacto Tryptone 5 g Bacto Yeast Extract 0,5 g NaCl 20 ml sterile 1 M Glukoselösung (Zugabe nach dem Autoklavieren)

2.1.13 Geräte und Zubehör

Beckmann DU® 640 Spectrophotometer, Beckmann Instruments GmbH, München, Deutschland
Hybaid Mini Oven, MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland
Inkubatoren:

- **Innova Incubator Shaker,** New Brunswick Scientific Co., Inc., Edison, New Jersey, USA
- **Heraeus kelvitron® T,** Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
- **Heraeus Hera Cell,** Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland

IKA® Combimac RCH Magnetrührer, Jahnke und Kunkel über Carl Roth GmbH + Ko, Karlsruhe, Deutschland
Küvetten für die Elektroporation, Promega, Heidelberg, Deutschland
Power Pac 3000, Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Perkin Elmer DNA Thermal Cycler 480, Perkin Elmer Applied Biosystems GmbH, Langen, Deutschland
Sony Video Graphic Printer UP-860 CE, Sony, Deutschland
UVP ImageStore 7500, UVP White/UV Transilluminator, Ultra Violet Products, CA, USA
UV-Stratalinker 1800, Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland
Zentrifugen:

- **Eppendorf Centrifuge 5415 C,** Gerätebau Eppendorf GmbH, Engelsdorf, Deutschland
- **Sigma 1 K15,** Sigma Laborzentrifugen, Osterode am Harz, Deutschland

Autoradiographie-Expositionskassetten und Verstärkerfolien, Appligene Oncor, Heidelberg, Deutschland
Reaktionsgefäße:

- **GeneAmp Reaction Tubes,** Perkin Elmer Applied Biosystems GmbH, Langen, Deutschland
- **0,5ml Reaktionsgefäße dünnwandig, 0,5, 1,5 und 2 ml Reaktionsgefäße,** Eppendorf, Deutschland

Hyperfilm™-MP High Performance autoradiography film, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
NucTrap® Probe Purification Columns, Stratagene GmbH, Heidelberg, Deutschland
Pipettenspitzen:

- **10, 100, 1000µl,** Sarstedt Nümbrecht, Deutschland
- **Filtertips FX 0010 E, FX 0100,** SLG, Gauting, Deutschland

Gelelektrophorese- und Blotsysteme:

- **Mini SubCell, Wide Mini SubCell, SubCell Elektrophoresesysteme,** Bio-Rad Laboratories, München
- **Modell S2 Sequenzierungs-Gelelektrophorese-System,** Gibco BRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe
- **Hoefer SE 600 Eletrophorese-System,** Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg
- **Hoefer TE 70 SemiPhor Semi Dry Blotsystem,** Amersham-Pharmacia Biotech, Freiburg

2.1.14 Software

Über das Internet wurde auf folgende Programme zugegriffen:

BlastX und BlastN: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Glatte Gefäßmuskelzellen wurden aus der thorakalen Aorta der Ratte (Sprague-Dawley, 6-10 Wochen alte männliche Tiere, Charles River Wega GmbH, Sulzfeld, Deutschland) durch enzymatische Dispersion isoliert und über mehrere Passagen kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in einer 5% CO_2 Atmosphäre bei 37°C in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), versetzt mit 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin, 1% nicht-essentiellen Aminosäuren (100x) und 10% fetalem Kälberserum. Alle folgenden Experimente wurden mit Zellen der Passagen 5-15 durchgeführt. Zur Untersuchung der ROS-Effekte wurden die einschichtig konfluenten Zellen zunächst für 12-24h durch Serumentzug wachstumsarretiert. Die Stimulation erfolgte entweder mit einer Kombination von 10^{-4}M H_2O_2 und 10^{-5}M Fe^{3+}NTA (10mM $FeCl_3$, 20mM nitrilotriacetic acid) zur $OH^{\bullet}$-Erzeugung oder mit 10^{-4}M Purin (7H-imidazo[4,5-d]pyrimidine, X) und 1.6 x 10^{-3}U Xanthinoxidase (XO) zur $O_2^{\bullet -}$ -Erzeugung.

H_2O_2, Fe^{3+}NTA und das durch X/XO produzierte $O_2^{\bullet -}$ können ungehindert in die Zelle diffundieren und so intrazellulär ihre Wirkungen entfalten (Djeha & Brock 1992, Dreher & Junod 1995, Gomes, Cuccovia, et al. 1993, Olakanmi, Stokes, et al. 1994, Richardson & Baker 1991).

2.2.2 Isolation von Gesamt-RNA

Zur Isolation der RNA aus kultivierten VSMC wurde peqGOLD RNAPure verwendet. Nach dem Absaugen des Kulturmediums wurde 1ml RNAPure auf jede Kulturschale (6 bzw. 10 cm Durchmesser) gegeben, der Zellrasen abgeschabt und das Gemisch in einem 1,5ml Eppendorf-Gefäß aufgenommen. Die Trennung der Nukleinsäure- und der Proteinfraktion wurde durch Zugabe von je 300µl Chloroform und Mischen durch Vortexen, gefolgt einem Zentrifugationsschritt für 20min bei 15,000rpm und 4°C in einer Eppendorf Tischzentrifuge erreicht. Die obere wäßrige Phase wurde in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt, die RNA durch Zugabe eines Volumens 2-Propanol präzipitiert und durch Zentrifugation pelletiert. Nach einem Waschschritt mit 70% vol/vol Ethanol wurde das Pellet luftgetrocknet und in RNase-freiem ddH_2O aufgenommen. Für das Differential Display wurden Aliquots der Gesamt-RNA für 1h bei 37°C mit DNase I behandelt, um Kontaminationen mit genomischer DNA auszuschließen. Anschließend wurde eine Phenol:Chloroform-Extraktion durchgeführt. Die RNA-Menge wurde photometrisch durch UV-Absorption bestimmt und die Qualität durch Elektrophorese von je 1µg RNA aus jeder Probe auf einem 1,2% Agarose / 0,67% Formaldehydgel in 1X MOPS-Puffer (Kap. 2.1.2) durch Färbung mit Ethidiumbromid überprüft

2.2.3 Differential Display von mRNA

Höhere Organismen verfügen in ihrem Erbgut über ca. 100.000 Gene, von denen jedoch nur ein geringer Prozentsatz exprimiert wird. So wird in jeder Zelle neben solchen Genen, deren Expression für die grundlegenden Stoffwechselprozesse notwendig ist, auch ein Satz von Genen exprimiert, der die Besonderheiten des betreffenden Zelltyps bzw. Gewebes ausmacht. Im Verlauf der Differenzierung werden so immer wieder Gene aktiviert und reprimiert, bis in der vollständig differenzierten Zelle ein bestimmter Anteil ruhender und aktiver Gene vorhanden ist. Werden nun Gene durch veränderte äußere Bedingungen aktiviert oder reprimiert, so wird die Zelle einen – unter Umständen pathophysiologisch bedeutenden - veränderten Phänotyp zeigen.

Die Methode des Differential Display von mRNA (Liang & Pardee 1992) wurde entwickelt, um Veränderungen in der Genexpression von Zellen oder Geweben als Reaktion auf äußere Reize oder im Verlauf pathologischer Prozesse aufspüren zu können. Dazu wird die Gesamt-RNA aus den zu vergleichenden Zellen oder Geweben isoliert und mit Hilfe spezieller Oligo-(dT)-Primer (hier: H-T_{11}-M Primer, M entspr. A, C oder G) in cDNA umgeschrieben. In einer anschließenden PCR mit niedriger Stringenz werden diese cDNA-Moleküle unter Verwendung desselben Oligo-(dT)-Primers und verschiedener kurzer *arbitrary* Primer amplifiziert und dabei radioaktiv markiert. Die so erhaltenen Pools an PCR-Produkten werden auf einem Polyacrylamid-Sequenziergel elektrophoretisch separiert, und nach Autoradiographie können die entstandenen Bandenmuster direkt verglichen werden. Jede Bande entspricht einem Teil aus dem 3'-Ende einer mRNA und so deutet beispielsweise eine fehlende Bande auf eine fehlende mRNA in der betreffenden Probe hin. Die in der Vergleichsprobe vorhandene Bande kann dann aus dem Gel ausgeschnitten und die darin enthaltene cDNA eluiert, kloniert und weiter charakterisiert werden. Nach Identifizierung der zugehörigen mRNAs und Proteine oder Enzyme lassen sich dann Rückschlüsse auf die Vorgänge in den untersuchten Zellen oder Geweben ziehen (Abb. 2.1).

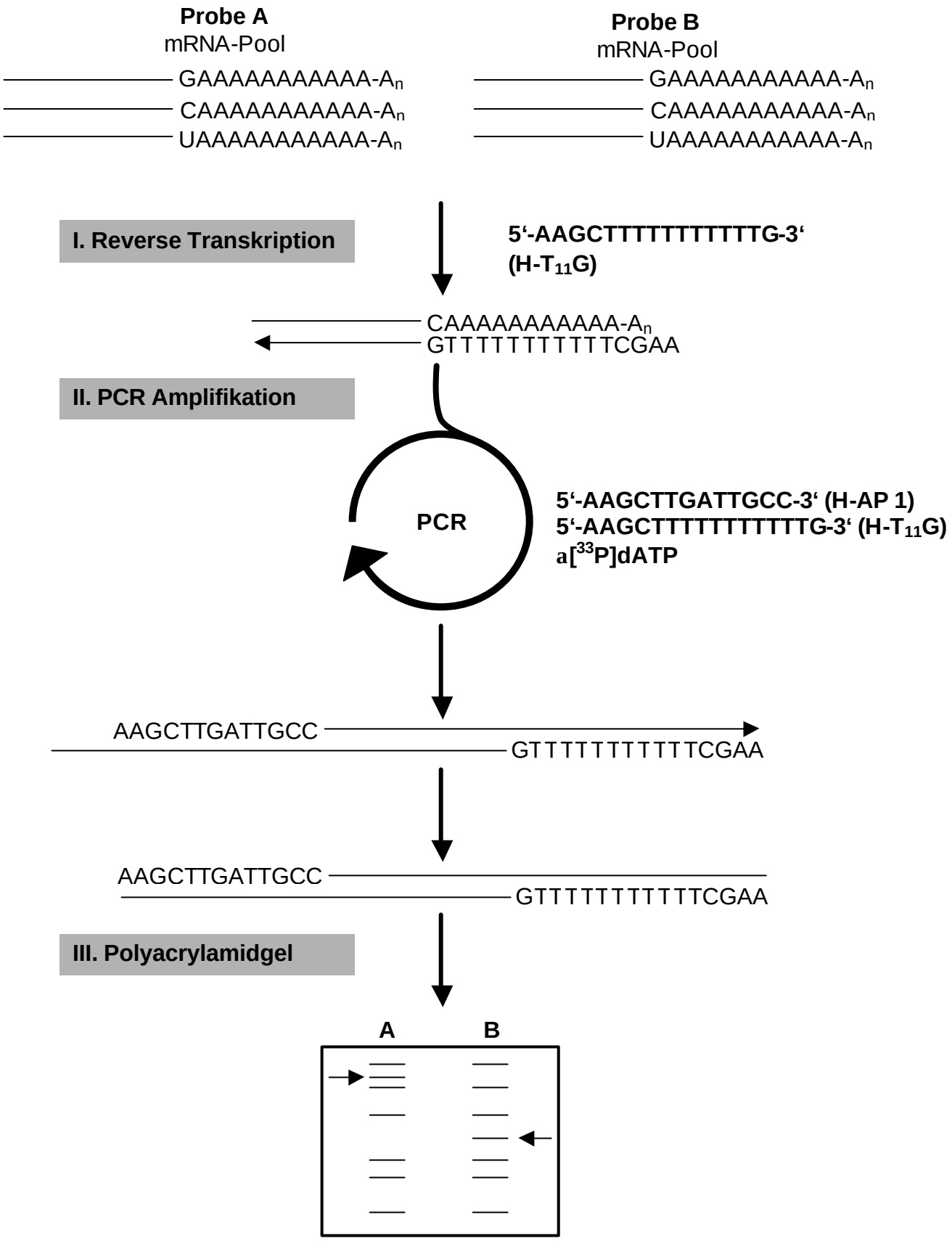


Abb. 2.1: Schema des Differential Display am Beispiel der Primerkombination H-T_{11}G und H-AP 1.

Das Differential Display wurde unter Verwendung des RNAimage mRNA Differential Display Systems nach der Anleitung des Herstellers durchgeführt. 2 µg gereinigte und mit DNase I behandelte Gesamt-RNA aus ROS-behandelten und unbehandelten Kontrollzellen wurden mit Hilfe eines der drei im Kit enthaltenen H-T_{11}-M-Primer (Kap. 2.1.8) revers transkribiert und cDNA entsprechend 200ng eingesetzter RNA in der Differential Display PCR amplifiziert. Als PCR-Primer dienten neben dem in der reversen Transkription verwendeten H-T_{11}-M-Primer einer der elf im Kit enthaltenen *arbitrary* Primer. Die radioaktive Markierung der PCR-Produkte wurde durch Zugabe von 2µCi a-[^{33}P]dATP pro PCR-Reaktion erreicht, die Amplifikation erfolgte durch 1U AmpliTaq DNA Polymerase in 40 Zyklen von 30s bei 94°C, 2min bei 40°C und 30s bei 72°C, gefolgt von 5min bei 72°C. Die PCR-Produkte wurde auf einem denaturierenden 6% Polyacrylamidgel in 1X TBE-Puffer (Kap. 2.1.2) elektrophoretisch aufgetrennt und durch Autoradiographie auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht.

2.2.4 Bandenelution und Reamplifikation

Im Differential Display reproduzierbar differentiell exprimierte Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten, in einem Eppendorf-Gefäß mit 100µl ddH_2O versetzt und die cDNA durch Inkubation für 15min bei 95°C aus dem Gel eluiert. Gelreste wurden durch Zentrifugation pelletiert und der Überstand in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt. Die cDNA wurde durch Zugabe von absolutem Ethanol und Inkubation auf Trockeneis für 30min präzipitiert und anschließend durch Zentrifugation für 30min bei 15.000rpm und 4°C in einer Eppendorf Tischzentrifuge pelletiert. Das Pellet wurde mit 85% vol/vol Ethanol gewaschen, getrocknet und in ddH_2O aufgenommen.

Die Reamplifikation der gereinigten cDNA erfolgte unter Verwendung derselben Primerkombination und PCR-Bedingungen wie in der Differential Display PCR. Die reamplifizierten cDNA-Fragmente wurden anschließend entweder direkt mit Hilfe des entsprechenden Arbitrary Primers sequenziert oder nach Klonierung in den pCR™II-Vektor via TA-Klonierung .

2.2.5 Northern Blot und Herstellung radioaktiv markierter cDNA-Sonden

15µg Gesamt-RNA aus ROS-behandelten und unbehandelten Kontrollzellen wurden auf einem 1.2% Agarose / 0.67% Formaldehydgel in 1X MOPS-Puffer (Kap. 2.1.2) elektrophoretisch aufgetrennt, durch Kapillarblot auf eine Hybond N Nylon Membran überführt und durch UV-Bestrahlung mit der Membran kreuzvernetzt. PCR-Fragmente von 897nt (Id3) und 1456nt (GKLF) Länge wurden in einer *random-prime labeling* Reaktion durch Einbau von a-[^{32}P]-dCTP unter Verwendung des Prime-It® II Random Primer Labeling Kits radioaktiv markiert.

Die Membranen wurden in Prähybridisierungslösung (Kap. 2.1.2) und 100µg/ml Lachsperma DNA für mindestens 30min bei 42°C prähybridisiert. Die Hybridisierung mit den radioaktiv markierten Sonden erfolgte für mindestens 6 Stunden in Hybridisierungslösung und 100µg/ml Lachsperma DNA bei 42°C. Anschließend wurden die Membranen zweimal mit 2X SSC bei Raumtemperatur und zwei- bis viermal mit 2X SSC / 0,1% SDS bei 50-65°C gewaschen, in Folie eingeschweißt und die radioaktiv markierten Banden durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

2.2.6 Semiquantitative RT-PCR

2µg Gesamt-RNA wurden unter Verwendung von 100pmol p(dN_6)-Oligonucleotid-Primer und 200 U MMLV Reverse Transcriptase revers transkribiert. Die Reaktion erfolgte im bereitgestellten 5X First Strand Buffer, komplettiert mit 200nmol DTT, 10nmol dATP, dCTP, dGTP und dTTP und 10U RNasin in einem Gesamtvolumen von 20µl. 1µl jeder Reaktion wurde für den Nachweis von Id3 und GKLF in der PCR mit 50pmol der entsprechenden Primer für die Amplifikation eines 352nt-Fragmentes von Id3 (Primer: Id3 Sense und Antisense) bzw. eines 691nt Fragmentes von GKLF (Primer: GKLF Sense und Antisense) verwendet. Die Reaktion erfolgte in RedTaq PCR Puffer (10mM Tris-HCl, pH8,3, 50mM KCl, 1,1mM $MgCl_2$, 0,01% Gelatine), versetzt mit 10nmol der vier dNTPs und 1.25U of Red Taq DNA Polymerase in einem Gesamtvolumen von 50µl. Dieselben cDNA-Proben wurden zur Amplifikation eines 452nt-Fragmentes der Glyzerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (Primer: GAPDH Sense und Antisense) verwen-

det, um zu überprüfen, ob gleiche Mengen RNA revers transkribiert wurden. Die PCR erfolgte nach einem Denaturierungsschritt von 5min bei 95°C in 25 Zyklen (GAPDH: 23 Zyklen) von 30s bei 95°C, 45s bei 57°C (Id3) bzw. 60°C (GKLF und GAPDH) und 45s bei 72°C, gefolgt von 10min bei 72°C.

2.2.7 Western Blot

ROS-behandelte und unbehandelte Kontrollzellen wurden nach Absaugen des Kulturmediums zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, in 1ml eiskaltem Lysepuffer (Kap. 2.1.2) aufgenommen, für 5min auf 95°C erhitzt und bis zur weiteren Verwendung bei –20°C gelagert. 40µg-Aliquots des Lysats wurden auf einem 0,1% SDS / 10% Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine in einer Semi-Dry Blotkammer auf eine Nitrocellulosemembran überführt. Die Blotmembranen wurden anschließend mit Ponceau-Rot angefärbt, um den gleichmäßigen Transfer der Proteine zu überprüfen. Die Inkubation mit den entsprechenden Primärantikörpern erfolgte jeweils über Nacht bei 4°C. Verwendet wurden folgende Antikörper: p53 (Pab 240 mouse monoclonal IgG) 1:300 verdünnt, p27 (F-8 mouse monoclonal IgG) 1:300 verdünnt, p21 (mouse mixed monoclonal IgG) 1:600 verdünnt, Rb (M-153 rabbit polyclonal) 1:100 verdünnt, Id3 (C-20 rabbit polyclonal) 1:100 verdünnt, GKLF (M-19 goat polyclonal IgG) 1:300 verdünnt. Der Nachweis der Antikörperbindung erfolgte durch Inkubation mit dem jeweils geeigneten Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (1:20.000 - 80.000 verdünnt) für 1h bei Raumtemperatur und dem Enhanced Chemiluminscence (ECL) Kit und anschließender Autoradiographie.

2.2.8 Klonierungen

TA-Klonierung

Alle PCR-Produkte wurden zunächst über TA-Klonierung in den Vektor pCR™II nach den Angaben des Herstellers kloniert (Kap. 2.1.5).

Herstellung von Expressionsvektor-Konstrukten

cDNAs von Id3 und GKLF in voller Länge wurden durch PCR-Amplifikation revers transkribierter RNA aus VSMC unter Verwendung der Primer GKLF full length Sense und Antisense, Id3 full length Sense und Antisense hergestellt (Kap.2.1.8). Die PCR-Produkte wurden durch Elektrophorese auf einem 1% Agarose-Ethidiumbromidgel in 1XTAE-Puffer überprüft und durch TA-Klonierung in den pCR™II-Vektor (Kap. 2.1.9) eingebracht. Die Orientierung des Inserts wurde durch Sequenzierung ermittelt.

Mit geeigneten Restriktionsendonukleasen wurden die vollständigen Inserts in Sense- und Antisense-Orientierung aus dem Vektor pCR™II herausgeschnitten und in die entsprechenden Stellen der *multiple cloning site* des Vektors pcDNA3 inseriert, um Id3- bzw. GKLF-Sense und -Antisense-Konstrukte zu erhalten:

Id3 Sense: Bam HI und Eco RV

Id3 Antisense: Bam HI und Eco R V

GKLF Sense: Not I und Xho I

GKLF Antisense: Hind III und Not I

2.2.9 Transformation von *E.coli*

Für die Transformation von DNA in kompetente E.coli-Bakterien wurde der One Shot™ Kit der Firma Invitrogen BV nach Angaben des Herstellers verwendet.

2.2.10 Plasmidisolation aus *E.coli*

Für die Isolierung von Plasmiden aus *E. coli* wurde die Methode der Alkalischen Lyse (Birnboim & Doly 1979) genutzt. Für Isolierung reiner Plasmid-DNA wurde der E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit der Firma PeqLab nach Angaben der Hersteller verwendet.

2.2.11 Transiente Transfektion von VSMC durch Elektroporation

Für die Elektroporation wurden einschichtig konfluente VSMC durch Zugabe von Trypsin von der Kulturschale gelöst und durch Zentrifugation für 5min bei 1000g pelletiert. Das Pellet wurde in 200µl Elektroporatonsmedium aufgenommen und die Zellen mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. 10^6 Zellen pro Ansatz wurden mit 20µg des entsprechenden Plasmids in vorgekühlten Elektroporationsküvetten für 30min auf Eis inkubiert und anschließend für 30s im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Die Elektroporation der Zellen erfolgte für 16ms bei 0,3keV und 500µF. Nach einer weiteren Inkubation für 30min bei Raumtemperatur wurden die Zellen auf Kulturschalen oder Mikrotiterplatten ausgesät.

2.2.12 Bestimmung der Proliferationsrate und Zellzählung

Die Proliferation von VSMC wurde mit Hilfe des Cell Proliferation ELISA (Roche Molecular Biochemicals) durch den Nachweis von BrdU-Inkorporation in neusynthetisierte DNA bestimmt. Dazu wurden VSMC in einer Zahl von 10^4 Zellen pro Well auf einer Mikrotiterplatte ausgesät. Nach 12h wurden die Zellen 48h durch Serumentzug wachstumsarretiert. Bei Stimulation mit ROS erfolgte diese für 12h. BrdU wurde in einer Endkonzentration von 10µM hinzugegeben und die Zellen wiederum für 12h inkubiert. Die Zellen wurden anschließend für 30min bei Raumtemperatur mit Fixationslösung fixiert und mit 100µl Peroxidase-gekoppeltem Anti-BrdU pro Well für 90min inkubiert. Nach drei Waschschritten mit der bereitgestellten Waschlösung wurde die Substratlösung für die colorimetrische Quantifizierung in einer Endkonzentration von 100µl/ml hinzugegeben, die Farbreaktion erfolgte innerhalb 5-30min. Die Auswertung wurde mittels eines ELISA-Readers vorgenommen.

Für die Zellzählung wurden VSMC für 24h durch Serumentzug wachstumsarretiert, für 12h mit ROS behandelt und durch Zugabe von Trypsin von der Kulturschale abgelöst. Nach Pelletierung durch Zentrifugation wurden die Zellen in Kulturmedium aufgenommen und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

2.2.13 Bestimmung der Apoptoserate

Die Apoptoserate von VSMC wurde mit Hilfe des Cell Death Detection E-LISA^{PLUS} – Systems (Roche Molecular Biochemicals) ermittelt. Das Testprinzip beruht auf dem Nachweis von durch die apoptotische Fragmentierung der zellulären DNA entstandenen Nucleosomen. Die kultivierten Zellen wurden durch Serumentzug wachstumsarretiert und dann für 24h mit ROS behandelt. Anschließend wurden sie durch Abschaben von der Kulturschale geerntet, durch Zentrifugation pelletiert und in 1ml DMEM gewaschen. Das Pellet wurde dann in 0,5ml des bereitgestellten Inkubationspuffers aufgenommen und für 30min bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation für 10min bei 15.000rpm und 4°C in einer Eppendorf Tischzentrifuge wurden 200µl des Überstandes mit 1,8ml Inkubationspuffer verdünnt und 100µl Probe pro Well in Anti-Histon-beschichteten Mikrotiterplatten gegeben. Nach 90min wurden die Wells dreimal mit Inkubationspuffer gewaschen und 100µl/Well Peroxidase-gekoppelter Anti-DNA Antikörper hinzugegeben und für weitere 90min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Inkubationspuffer erfolgte die Zugabe der ABTS–Substratlösung für die Peroxidase, und nach 10-20min wurde der Gehalt an Nucleosomen durch photometrische Messung bei 492nm bestimmt.

2.2.14 Sequenzierungen

Alle Sequenzierungen wurden im Servicelabor des Zentrums für Molekulare Medizin Köln (ZMMK) automatisiert durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Differential Display von mRNA

Mit Hilfe des Differential Display von mRNA sollte die Wirkung des Hydroxylradikals auf die Genexpression in VSMC untersucht werden. Die Zellen wurden dazu mit H_2O_2 und Fe^{3+}NTA für 0-4 Stunden stimuliert, die RNA isoliert und das Differential Display durchgeführt (Abb. 3.1). Bevor differentiell exprimierte Banden weiter charakterisiert wurden, wurde die Reproduzierbarkeit der differentiellen Expression durch zweimalige Wiederholung der Differential Display PCR mit der betreffenden Primerkombination überprüft. Durch Verwendung von 48 unterschiedlichen Kombinationen aus den im Kit enthaltenen drei H-T_{11}M (Kap.2.1.8) und 16 der *arbitrary* Primer (AP) konnten die cDNAs aus 25 reproduzierbar differentiell exprimierten Banden isoliert und weiter charakterisiert werden. Die betreffenden cDNAs wurden zunächst aus dem Differential Display Gel ausgeschnitten, eluiert und mit der entsprechenden Primerkombination in ein bis zwei PCRs reamplifiziert, um mehr Material für weitere Analysen zu gewinnen. Anschließend erfolgte die Sequenzierung, entweder direkt unter Verwendung des entsprechenden *arbitrary* Primers oder nach TA-Klonierung der PCR-Produkte aus der Reamplifikation über überhängende Adenin-Reste in den pCR™II-Vektor. Anhand der Sequenz wurde die Identität der Klone durch einen Datenbankabgleich mit Hilfe des NCBI-Programmes BLAST geklärt. Außerdem konnten so spezifische PCR-Primer hergestellt werden, um semiquantitative RT-PCR-Experimente durchführen und cDNA-Sonden für Northern Blot-Experimente herstellen zu können. Anhand dieser Referenzmethoden wurden die differentiellen Expressionsmuster der isolierten Klone nochmals überprüft.

Tab. 1 (Anhang) zeigt eine Übersicht über die gesamten 25 isolierten cDNAs, von denen zwei auch in den nachfolgenden Kontrollexperimenten tatsächlich einer Regulation durch $OH^{\bullet}$ unterlagen. Die Vorgehensweise zur Verifizierung der differentiellen Expression und weiteren Charakterisierung der Klone wird im Folgenden an diesen beiden exemplarisch dargestellt.

Mit der Primerkombination H-T_{11}G und AP63 wurde ein 258bp großes cDNA-Fragment im Differential Display amplifiziert, das durch $OH^{\bullet}$ nach 4h herab-

reguliert (Abb. 3.1B, links). Ein weiteres differentiell exprimiertes cDNA-Fragment wurde mit den Primern H-T_{11}G und AP59 amplifiziert. Diese 205bp große cDNA unterlag einer Heraufregulation durch das $OH^{\bullet}$ -Radikal nach 4h (Abb. 3.1B, rechts).

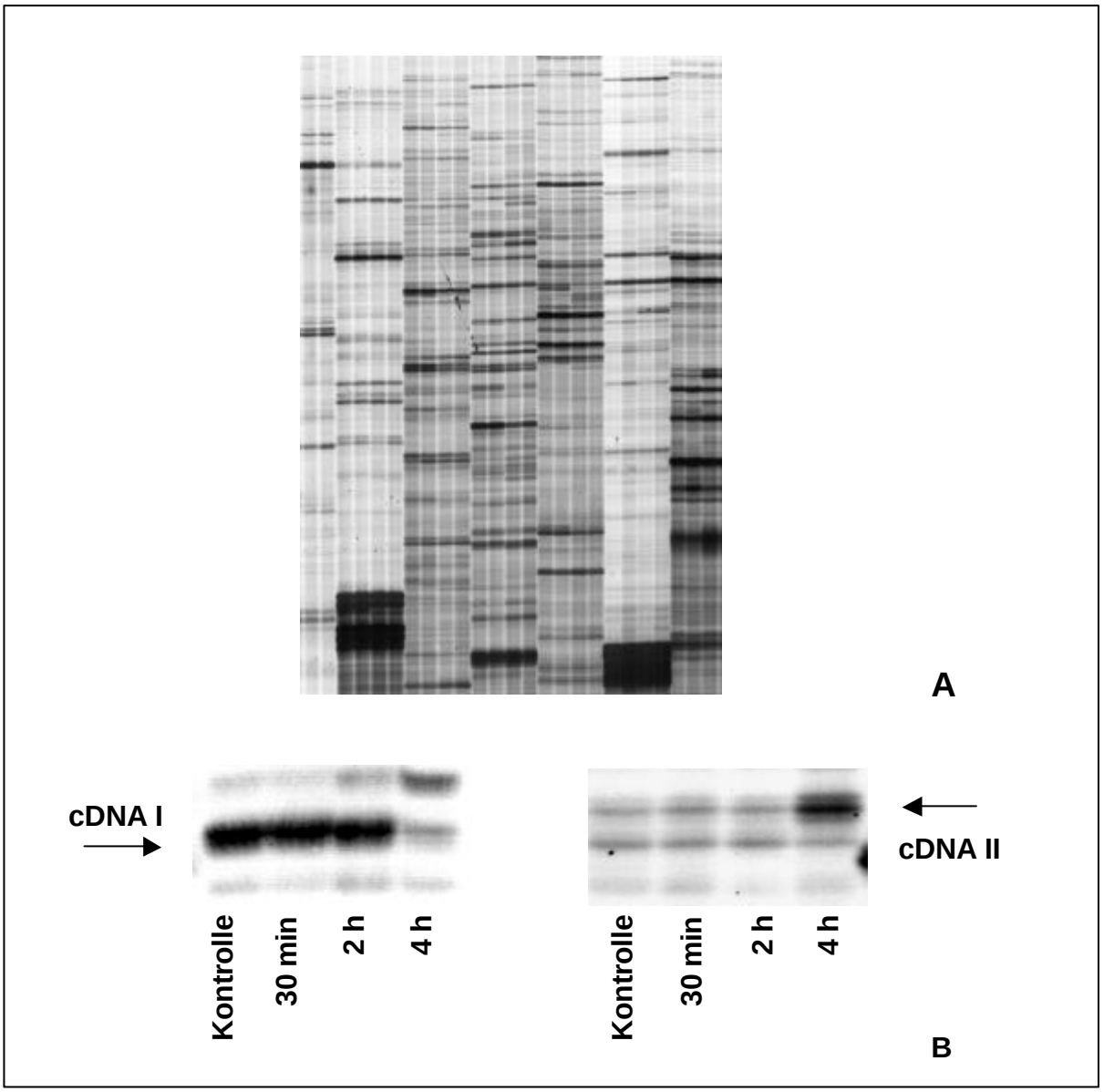


Abb. 3.1: A Ausschnitt aus dem Autoradiogramm eines Differential Display Gels, RNA aus VSMC stimuliert mit 10^{-4} M H_2O_2 und 10^{-5} M Fe^{3+}NTA. **B** Vergrößerte Ausschnitte mit differentiell exprimierten cDNAs I und II.

Um die differentielle Expression dieser beiden cDNAs zu verifizieren, wurden beide zunächst aus dem Differential Display Gel eluiert, reamplifiziert und die entstandenen PCR-Produkte sequenziert.

Durch einen Datenbankabgleich der erhaltenen Sequenzen mit Hilfe des NCBI-Programms BLAST (Kap. 2.1.14) konnten die isolierten cDNAs entsprechenden bekannten Sequenzen zugeordnet werden. cDNA I besaß große Homologien zur „Mouse helix-loop-helix protein (Id related) mRNA“, das Genprodukt des HLH462-Gens. Das Homolog in der Ratte ist das Inhibitor of DNA-binding Protein (Id3).

cDNA II zeigte eine Homologie von 94% zur „Rattus norvegicus FSH-regulated protein mRNA“, dabei handelt es sich um ein Fragment aus der cDNA für den *Gut-enriched Krüppel-like Factor* (GKLF). Zu beiden Genen wurden spezifische Primer hergestellt, die eine Überprüfung des differentiellen Expressionsmusters anhand von semiquantitativen RT-PCR-Experimenten ermöglichen sollten (Kap. 2.1.8). Die Herabregulation der mRNA von Id3 und die Heraufregulation der mRNA von GKLF konnte anhand dieser Versuche bestätigt werden (Abb. 3.2 A). Die Darstellung ist repräsentativ für mindestens drei unabhängige Versuche.

Mit PCR-Primern, die eine Amplifizierung der cDNAs für Id3 und GKLF in voller Länge ermöglichten, wurden außerdem Sonden für Northern Blots hergestellt. Auch hier konnte die Regulation der beiden Gene durch $OH^{\bullet}$ nachgewiesen werden (Abb. 3.2 B). Die Id3-mRNA wurde sowohl im Northern-Blot als auch in den RT-PCR-Experimenten nach 2h stark herabreguliert, die GKLF-mRNA dagegen wurde nach 2h stark heraufreguliert.

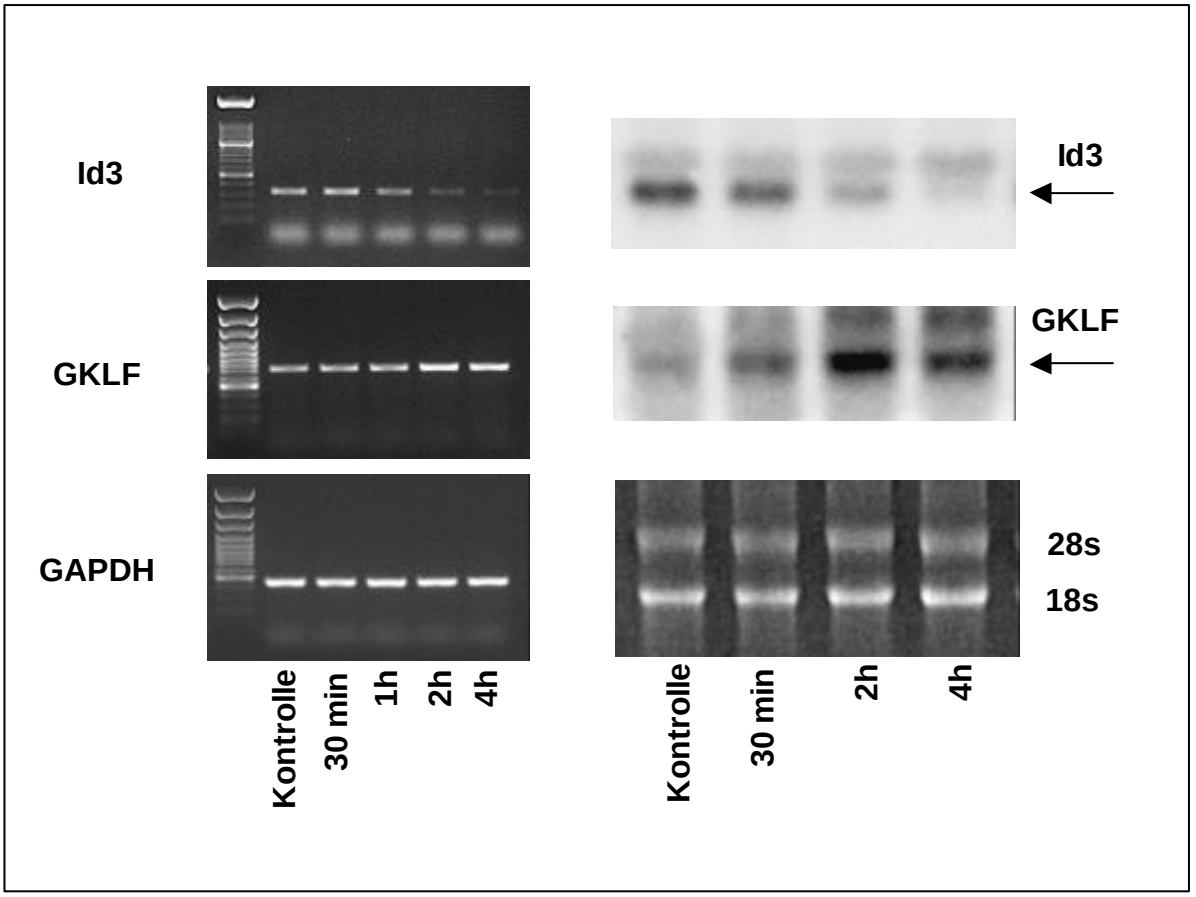


Abb. 3.2: Kontrollversuche zu Verifizierung der differentiellen Expression von Id3 und GKLF. **Links:** Semiquantitative RT-PCR, Ethidiumbromidfärbung. Kontrolle: GAPDH. **Rechts:** Northern Blot, Autoradiogramme. Kontrolle: Ethidiumbromidfärbung der 28 und 18S RNA.

Weitere differentiell exprimierte Klone konnten mit diesen Methoden nicht identifiziert werden. Die übrigen aus Differential Display Gelen ausgeschnittene Banden wurden ebenfalls – gegebenenfalls nach vorheriger Subklonierung – sequenziert. Die differentielle Expression wurde auch hier mittels RT-PCR mehrfach überprüft. Die verwendeten Primer können ebenso wie die Ergebnisse für diese Klone dem Anhang entnommen werden.

Um zu zeigen, daß sich die Herauf- bzw. Herabregulation der mRNA in einer entsprechenden Regulation auf Proteinebene widerspiegelt, wurden Western Blot Experimente durchgeführt. Für Id3 konnte eine entsprechende Herunterregulation durch $OH^{\bullet}$ bereits nach ca. 1h gezeigt werden (Abb. 3.3), der einzige kommerziell erhältliche Antikörper gegen GKLF führte jedoch zu keinen zufriedenstellenden Ergebnissen, da keine spezifische Bindung an GKLF erfolgte.

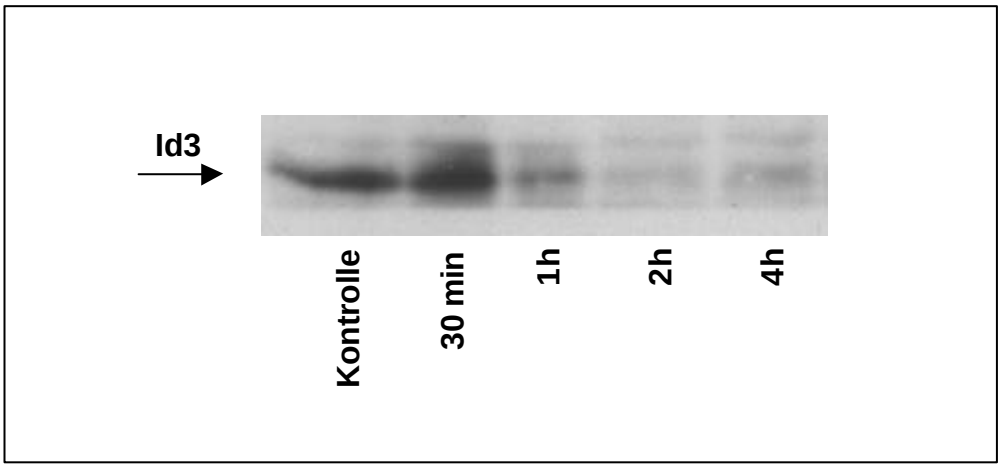


Abb. 3.3: Western Blot von Id3 in VSMC nach Behandlung mit 10^{-4} M H_2O_2 und 10^{-5} M Fe^{3+}NTA.

3.2 Wirkung von $O_2^{\bullet-}$ auf die Expression der charakterisierten Gene

Nachdem die differentielle Expression von Id3 und GKLF anhand der beschriebenen Kontrollversuche zweifelsfrei nachgewiesen werden konnte, wurde die Expression dieser beiden Gene in VSMC nach Stimulation mit einer weiteren reaktiven Sauerstoffspezies untersucht, dazu wurden die Zellen mit einer Kombination aus Purin und dem Enzym Xanthinoxidase behandelt, um $O_2^{\bullet-}$ zu erzeugen.

Zunächst wurde die Wirkung von $O_2^{\bullet-}$ auf die mRNA-Expression von Id3 und GKLF mit Hilfe der bereits beschriebenen semiquantitativen RT-PCR unter-

sucht. Die mRNA von Id3 zeigt keine signifikante Regulation durch $O_2^{\bullet -}$, die mRNA von GKLF wird nur leicht herabreguliert (Abb. 3.4).

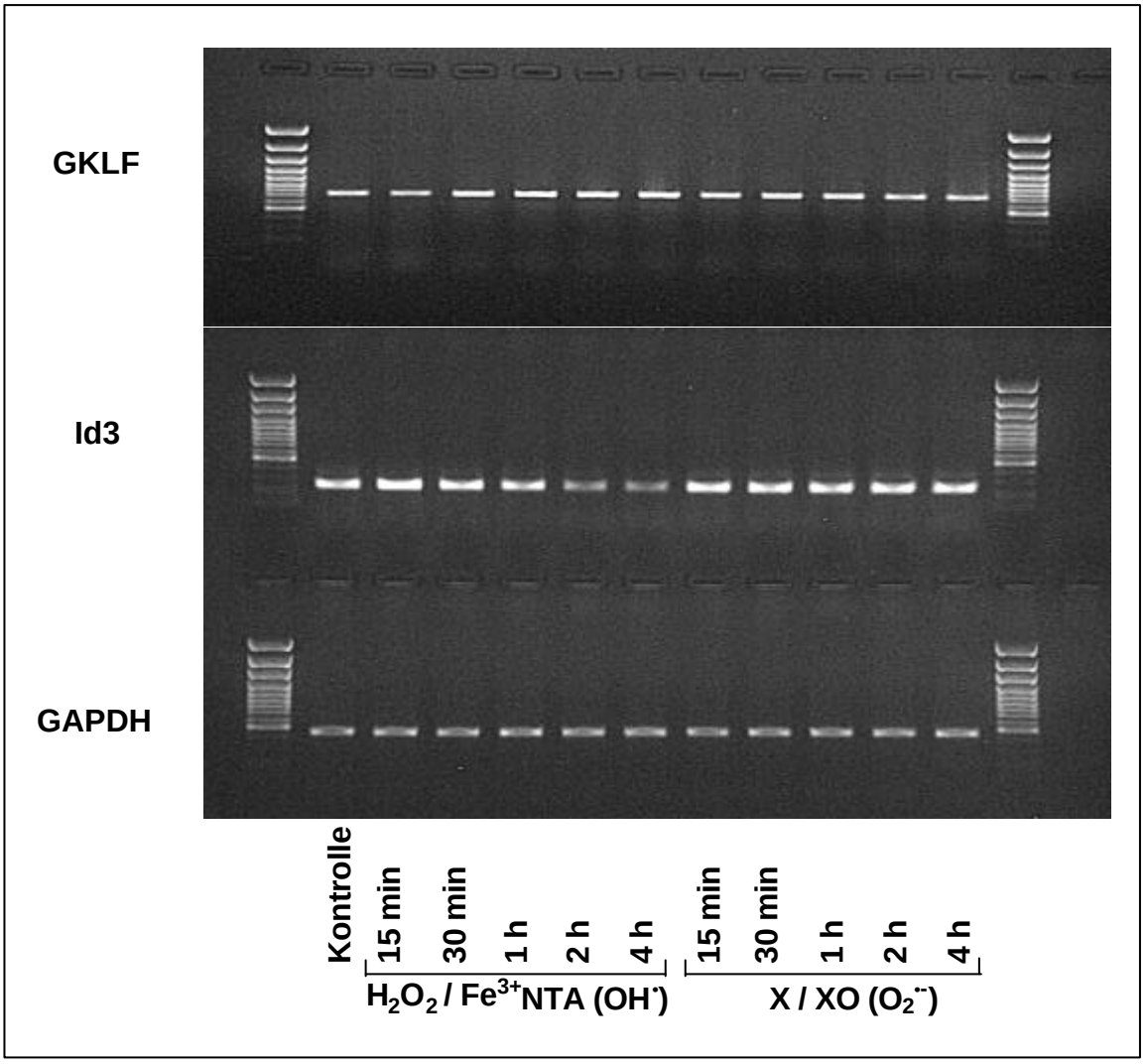


Abb. 3.4: Regulation von Id3 und GKLF durch $OH^{\bullet}$ und $O_2^{\bullet -}$. Nachweis durch RT-PCR und Ethidiumbromidfärbung. Als Kontrolle diente GAPDH.

Im Westernblot konnte für Id3 jedoch eine deutliche Heraufregulation durch $O_2^{\bullet -}$ bereits nach 30 min gezeigt werden, im Gegensatz zur Herabregulation durch Behandlung von VSMC mit Hydroxylradikalen (Abb. 3.3, Abb. 3.5)

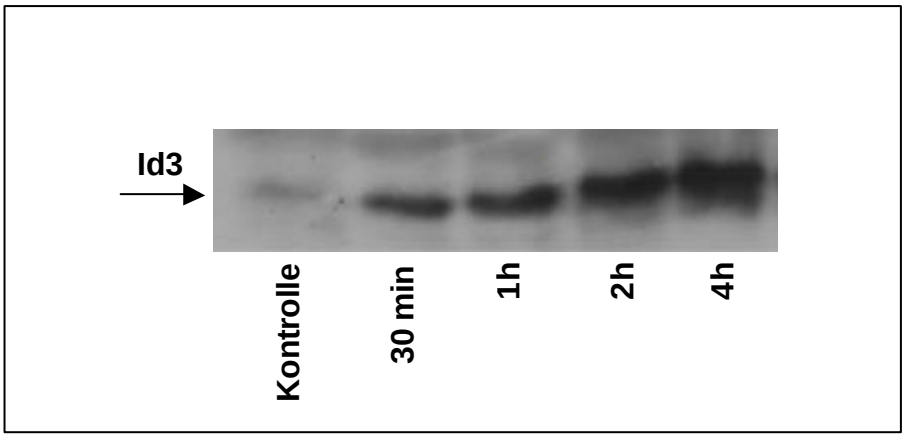


Abb. 3.5: Western Blot von Id3 in VSMC nach Behandlung mit 100 µM Purin und 1,6 10^{-3} U/ml Xanthinoxidase.

3.3 Untersuchungen zur Proliferation und Apoptose von VSMC

Bei Id3 handelt es sich um einen negativen Regulator von *basic helix-loop-helix* (bHLH) Transkriptionsfaktoren, es gehört selbst zur Familie der HLH-Proteine, ihm fehlt jedoch die basische DNA-bindende Domäne. bHLH-Transkriptionsfaktoren können erst nach Dimerisierung in Homo- oder Heterodimeren an die DNA binden, Id3 sequestriert die Monomere und unterbindet so die Auslösung der Transkription. Allgemein gilt Id3 als positiver Regulator der Zellproliferation und negativer Regulator der Differenzierung, außerdem konnte durch eine Überexpression Apoptose induziert werden (Loveys, Streiff, et al. 1996, Norton & Atherton 1998).

Der *Gut-enriched Krüppel-like Factor* GKLF (auch KLF4) wurde im Zusammenhang mit einem zellulären Wachstumsarrest isoliert und charakterisiert (Shields, Christy, et al. 1996). Es handelt sich um ein Mitglied der Cys_2His_2-Zinkfinger-Familie von Transkriptionsfaktoren. Eine Heraufregulation von GKLF wurde mit einem Arrest zellulären Wachstums in Verbindung gebracht.

Eine Herabregulation von Id3 bzw. eine Heraufregulation von GKLF könnte also folglich bedeuten, daß hier die Zellproliferation gehemmt wurde, in diesem Falle durch die Wirkung von Hydroxylradikalen. Die Heraufregulation von Id3 im Western Blot in Reaktion auf das Superoxydradikal könnte außerdem eine Induktion zellulären Wachstums bedeuten. Um diese Vermutung zu verifizieren, wurde die Proliferation von VSMC unter dem Einfluß von ROS untersucht. Da der Zellteilung die Verdoppelung der nukleären DNA vorausgeht, diente als Maß für die Proliferationsrate der Einbau von BrdU in die neusynthetisierte DNA.

Die in Mikrotiterplatten ausgesäten VSMC wurden nach Wachstumsarretierung durch Serumentzug für 12 Stunden mit $OH^{\bullet}$, $O_2^{\bullet -}$ oder H_2O_2 behandelt. Als Positivkontrolle für die Induktion der Proliferation diente eine Behandlung mit 10% fetalem Kälberserum (FKS) für 24 Stunden. Um möglicherweise einen inhibierenden Effekt auf die Proliferation zeigen zu können, wurden die Zellen außerdem parallel mit FKS und $OH^{\bullet}$ stimuliert. Dazu wurden die Zellen zunächst durch Serumentzug wachstumsarretiert, dann erfolgte eine 12-stündige Vorstimulation mit 10% FKS gefolgt von einer 12-stündigen Behandlung mit $OH^{\bullet}$. So konnte ausgeschlossen werden, daß der wachstumsarretierende Effekt von $OH^{\bullet}$ lediglich auf eine Schädigung der im FKS enthaltenen Wachstumsfaktoren zurückzuführen ist.

Die Darstellung der Ergebnisse repräsentiert eine Zusammenstellung aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen (Abb. 3.6 A).

Durch FKS wurde wie erwartet eine signifikante Induktion der DNA-Synthese erreicht. Bei Stimulation von VSMC mit FKS und $OH^{\bullet}$ zeigte sich eine signifikant geringere DNA-Synthese als mit FKS allein. Eine Behandlung von VSMC mit Hydroxylradikalen führte also zu einer signifikanten Einschränkung des FKS-induzierten Wachtums der Zellen. Die basale Proliferation der Zellen wird durch $OH^{\bullet}$ ebenfalls leicht verringert, wogegen Superoxid zu einer Induktion der Proliferation führt. Bei Stimulation der Zellen mit H_2O_2 zeigte sich kein Effekt auf die Proliferation.

Die Experimente zur Zellzählung zeigen in der Tendenz dieselben Ergebnisse wie die zur DNA-Synthese (Abb. 3.6 B). Die Zellen wurden hier ebenso behandelt wie zur Analyse der DNA-Synthese, um signifikante Unterschiede zu sehen, müßte evtl. über einen längeren Zeitraum als zum Nachweis erhöhter DNA-Synthese stimuliert werden.

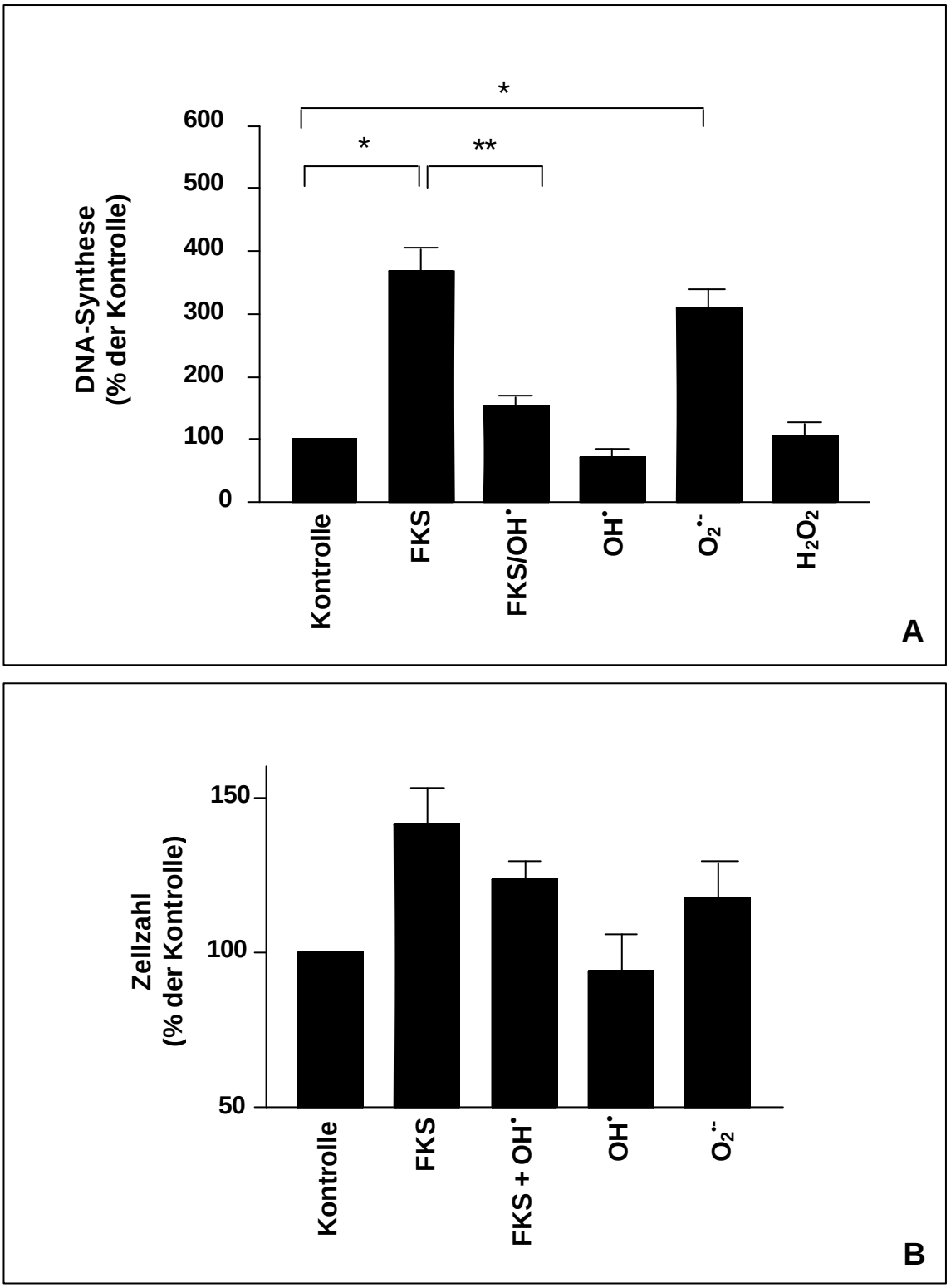


Abb. 3.6: Effekt von ROS auf die Proliferation von VSMC. **A:** Nachweis mit BrdU-Labeling neusynthetisierter DNA, **B:** Zellzählung

Um zu untersuchen, ob die verringerte DNA-Synthese durch $OH^{\bullet}$ durch eine erhöhte Apoptose der Zellen zu erklären ist, wurde die Apoptoserate als Folge der ROS-Behandlung von VSMC bestimmt. Dazu wurden VSMC mit ROS stimuliert und der Gehalt von Nucleosomen, welche durch die apoptotische DNA-Fragmentierung entstehen, im Zell-Lysat durch eine Farbreaktion bestimmt (Kap. 2.2.13).

Die Versuche zeigten, daß bei der in allen anderen Experimenten verwendeten ROS-Konzentration von 10^{-5}M Apoptose bei den beobachteten Effekten keine Rolle zu spielen scheint (Abb. 3.7).

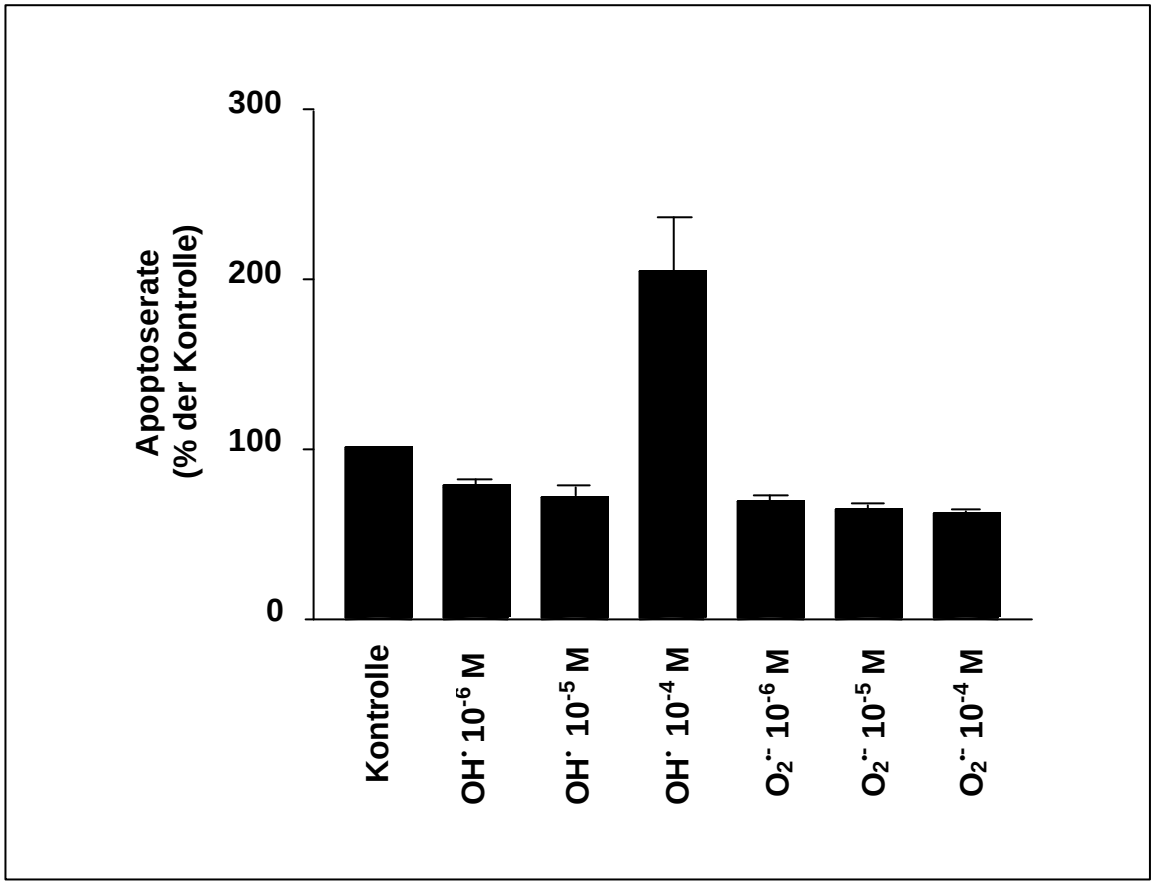


Abb. 3.7: Effekt von ROS auf die Apoptose von VSMC.

3.4 Untersuchung der Aufgaben von Id3 und GKLF in der Zelle

Die Expression von Id3 wurde durch die Wirkung von Hydroxylradikalen verringert, die von GKLF erhöht. Gleichzeitig scheinen diese Radikale einen Wachstumsarrest in diesen Zellen zu verursachen. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen diesen Ereignissen zu zeigen, wurden Id3 und GKLF in VSMC über- bzw. unterexprimiert und die Auswirkungen dessen auf die Proliferation der Zellen untersucht.

Dazu wurden die vollständigen cDNAs von Id3 und GKLF mittels PCR-Amplifikation hergestellt und zunächst über TA-Klonierung in den pCR™II-Vektor inseriert (Kap. 2.2.8). Die Orientierung der Inserts wurde über Sequenzierung bestimmt und die vollständigen Sense- und Antisense-Fragmente mit geeigneten Restriktions-endonukleasen aus dem Plasmid herausgeschnitten und in entsprechend geschnittene pcDNA3-Plasmide in Sense- und Antisense-Richtung eingebracht (s. Kap. 2.2.8 und Anhang). Durch Elektroporation wurden VSMC mit diesen Konstrukten transient transfiziert (Kap. 2.2.11), als Kontrolle diente dabei die Transfektion mit leerem Vektor. Die erfolgreiche Über- bzw. Unterexpression des Proteins in der Zelle konnte für Id3 anhand von Western Blots gezeigt werden (Abb. 3.8).

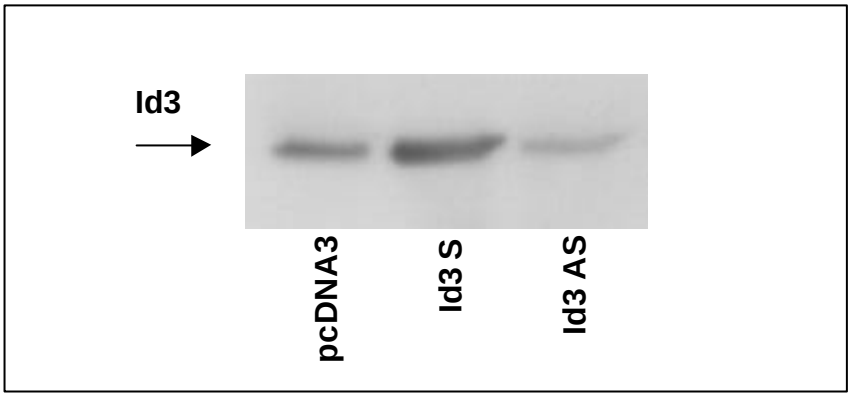


Abb. 3.8: Nachweis der erfolgreichen Über- bzw. Unterexpression von Id3 in transient transfizierten VSMC (Western Blot). pcDNA3: leerer Vektor, Id3 S: Id3-Sense, Id3 AS: Id3-Antisense.

Die so transfizierten VSMC wurden nun ebenfalls im Mikrotiterplatten ausgesät und die DNA-Synthese sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach Stimulation mit FKS und ROS quantifiziert (Abb. 3.9).

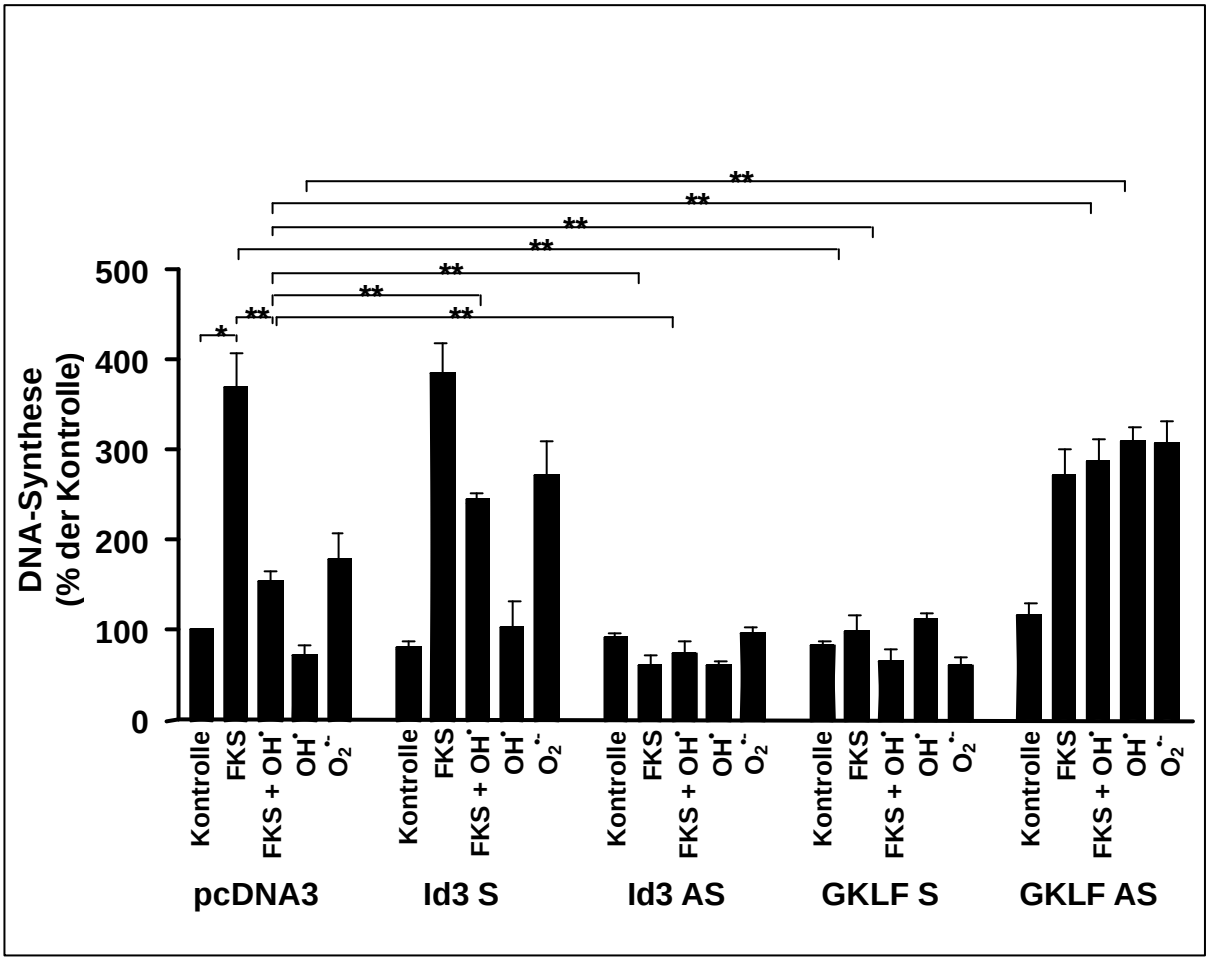


Abb. 3.9: Einfluß der Über- bzw. Unterexpression von Id3 und GKLF auf den Effekt von ROS auf die DNA-Synthese in VSMC. pcDNA3: leerer Vektor, Id3/GKLF S: Id3/GKLF-Sense, Id3-/GKLF AS: Id3/GKLF-Antisense.

Bei der Unterexpression von Id3 (Id3 AS) oder der Überexpression von GKLF (GKLF S) zeigte sich eine signifikant verringerte DNA-Synthese als Reaktion auf 10% FKS im Vergleich zu mit leerem Vektor transfizierten Kontrollzellen.

Allgemein zeigten die mit Id3-Antisense und die mit GKLF-Sense transfizierten Zellen eine deutlich verringerte DNA-Synthese im Vergleich zur Kontrolle. Auch das durch $O_2^{\bullet-}$ induzierte Wachstum wurde in diesen Zellen vollkommen aufgehoben.

Die Überexpression von Id3 in VSMC (Id3 S) bewirkt einen signifikant verringerten Effekt von $OH^{\bullet}$ auf die FKS-induzierte DNA-Synthese, ansonsten zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zur Kontrolle. Jedoch ist in der Tendenz eine verstärkte DNA-Synthese nach Stimulation mit $O_2^{\bullet-}$ zu beobachten.

Die Unterexpression von GKLF (GKLF AS) dagegen hebt den wachstumsarretierenden Effekt von $OH^{\bullet}$ vollkommen auf, die Zellen zeigen selbst unter basalen Bedingungen, sowie nach Stimulation mit $OH^{\bullet}$ oder $O_2^{\bullet-}$ eine signifikant erhöhte DNA-Syntheserate. Lediglich das durch FKS induzierte Wachstum ist geringer als in den Kontrollzellen, eventuell könnte hier Apoptose eine Rolle spielen.

3.5 Wirkung von ROS auf die Regulation Zellzyklus-assoziierter Proteine

Da $OH^{\bullet}$ in VSMC einen Wachstumsarrest, $O_2^{\bullet-}$ dagegen Proliferation zu induzieren scheint, wurde die Wirkung dieser ROS auf andere mit dem Zellzyklus assoziierte Komponenten untersucht. Mit Hilfe von Western Blots wurde die Expression des Tumorsupressors p53 und der Zyklinkinase-Inhibitoren $p21^{WAF1/Cip1}$ und $p27^{Kip}$, sowie der Phosphorylierungszustand des Retinoblastoma-Proteins Rb in Reaktion auf ROS zeitabhängig untersucht (Abb. 3.10, repräsentativ für je 3 unterschiedliche Versuche).

$OH^{\bullet}$ bewirkte in diesen Versuchen eine schnelle Heraufregulation des Tumorsuppressors p53 und der Cdk-Inhibitoren $p21^{WAF1/Cip1}$ und $p27^{Kip}$. Das Retinoblastoma-Protein Rb, welches durch Stimulation der Zellen mit FKS eine Phosphorylierung erfährt (obere Bande), bleibt durch Behandlung mit $OH^{\bullet}$ unphosphoryliert und wandert so schneller durch das Gel (untere Bande).

Bei Behandlung der Zellen mit $O_2^{\bullet-}$ zeigt sich dagegen eine Herabregulation von p53 und $p21^{WAF1/Cip1}$. Rb wird unter $O_2^{\bullet-}$-Einfluß ebenso wie durch FKS-Behandlung hyperphosphoryliert. Im Gegensatz zur Regulation durch $OH^{\bullet}$ scheint

der Cdk-Inhibitor $p27^{Kip}$ bei Stimulation mit $O_2^{\bullet -}$ weitgehend unbeeinflußt zu bleiben.

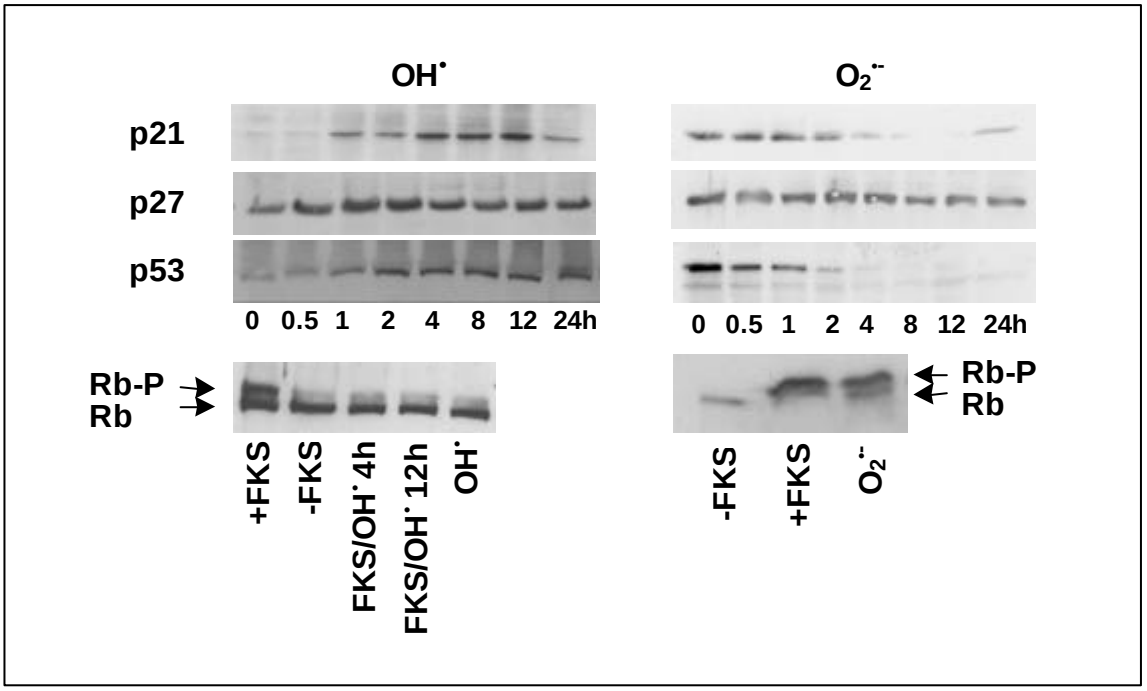


Abb. 3.10: Einfluß von ROS auf die Expression von $p21^{WAF1/Cip}$, $p27^{Kip}$ und p53 und die Phosphorylierung von Rb.

3.6 Einfluß von Id3 und GKLF auf die Regulation Zellzyklus-assoziierter Proteine

Wie zuvor gezeigt wird sowohl die Expression von Id3 und GKLF als auch die Expression von p53, $p21^{WAF1/Cip1}$ und $p27^{Kip1}$ und die Phosphorylierung von Rb durch ROS, namentlich $OH^{\bullet}$ und $O_2^{\bullet -}$, gesteuert. Nun sollte gezeigt werden, ob Id3 und GKLF diesen Komponenten des Zellzyklus nachgeordnet sind, oder ob sie selbst an deren Regulation beteiligt sind. Dazu wurden in VSMC wie bereits beschrieben Id3 und GKLF durch transiente Transfektion mit den entsprechenden Konstrukten überexprimiert bzw. inhibiert.

Die Inhibierung von Id3 bewirkte wie die Überexpression von GKLF eine verstärkte Expression von p53, $p21^{WAF1/Cip1}$ und $p27^{Kip}$, und eine Hypophosphorylierung von Rb. Eine verstärkte Expression von Id3 oder verringerte Expression

von GKLF dagegen zeigte den entgegengesetzten Effekt: p53, $p21^{WAF1/Cip1}$ und $p27^{Kip}$ wurden vermindert und Rb blieb unphosphoryliert (Abb. 3.11).

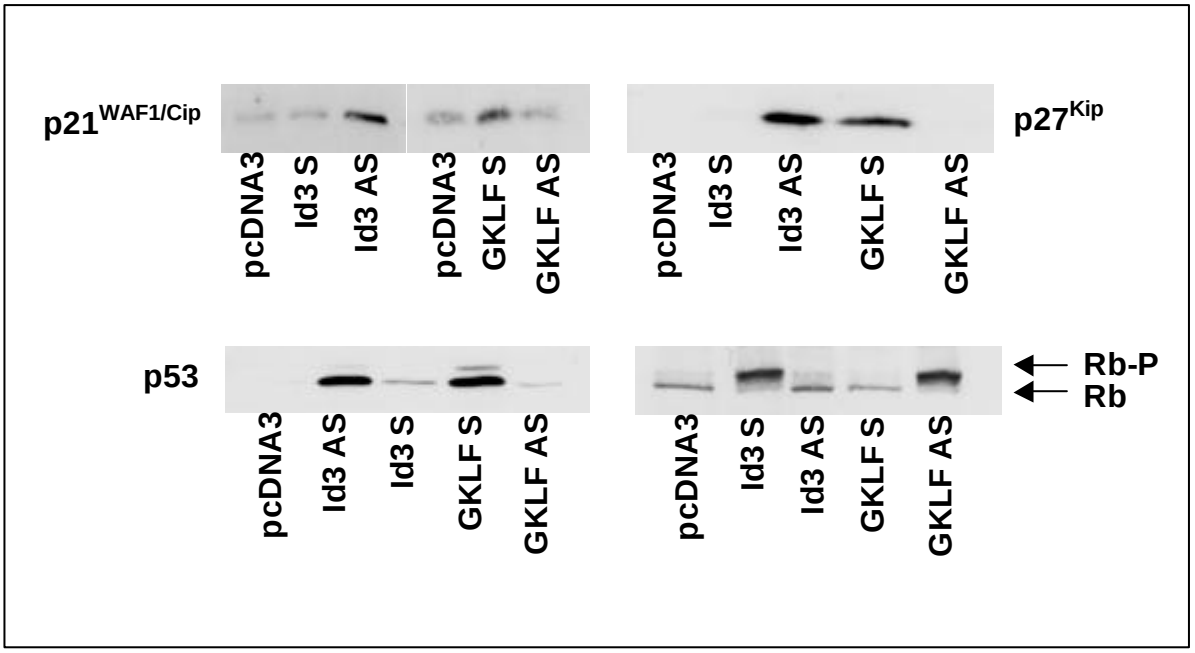


Abb. 3.11: Einfluß der Über- bzw. Unterexpression von Id3 und GKLF auf die Expression von $p21^{WAF1/Cip1}$, $p27^{Kip}$ und p53 und die Phosphorylierung von Rb, Western Blots. pcDNA3: leerer Vektor, Id3/GKLF S: Id3/GKLF-Sense, Id3-/GKLF AS: Id3/GKLF-Antisense

4 Diskussion

4.1 Differential Display

Mit Hilfe des Differential Display von mRNA sollte der Effekt reaktiver Sauerstoffspezies auf die Genexpression in glatten Gefäßmuskelzellen untersucht werden. Unter Anwendung von 48 verschiedenen Primerkombinationen konnten 25 im Differential Display-Gel zunächst differentiell exprimierte cDNAs isoliert und weiter charakterisiert werden.

Sämtliche aus den Differential Display Gelen eluierten cDNAs wurden nach der Reamplifikation zunächst sequenziert. War die Sequenzierung aussagekräftig, wurden die zugehörigen mRNAs durch einen Datenbankabgleich identifiziert, andernfalls wurden die cDNAs zunächst kloniert und anschließend sequenziert, um dann die Synthetisierung spezifischer Primer für semiquantitative RT-PCRs zu ermöglichen. Diese RT-PCRs wurden für alle Klone mit Total-RNA aus derselben RNA-Präparation und mindestens drei weiteren unterschiedlichen Präparationen durchgeführt. In diesen Versuchen konnte lediglich die differentielle Expression zweier cDNAs bestätigt werden, alle anderen unterlagen keiner Regulation. Bei 12 cDNAs erbrachte der Datenbankabgleich in BLAST, daß es sich um mitochondriale Gene für die 16S rRNA und die tRNAs für Leucin und Valin handelte. Da diese cDNA mit den unterschiedlichsten Primerkombinationen wiederholt isoliert wurde, wurde angenommen, daß hier eventuell sogar eine bedeutsame Regulation vorliegen könnte. Einer dieser Klone wurde daher exemplarisch auf seine differentielle Expression hin untersucht, diese konnte jedoch mit RT-PCR nicht bestätigt werden (hier nicht gezeigt). Die Ergebnisse der Untersuchungen der übrigen Klone können der Tabelle im Anhang entnommen werden.

Die hohe Anzahl falsch positiver Klone stellt ein generelles Problem des Differential Display dar (Liang & Pardee 1992, Poirier, Pyati, et al. 1997, Wadhwa, Duncan, et al. 1996, Zhao, Ooi, et al. 1995), da aufgrund der niedrigen Stringenz der Bedingungen in der Differential Display PCR bei einer Primer-Annealing-Temperatur von nur 40°C Primer-Fehlpaarungen Bandenmuster erzeugen, die nicht unbedingt reproduziert werden können. Daher muß eine große Anzahl von

Primerkombinationen auf die zu untersuchenden Proben angewandt werden, um tatsächlich differentiell exprimierte Gene aufzufinden.

Bei den beiden durch die Behandlung glatter Gefäßmuskelzellen mit $OH^{\bullet}$ tatsächlich differentiell exprimierten cDNAs handelte es sich um Id3 und GKLF.

4.1.1 Inhibitor of DNA-Binding (Id3)

Beim "*Inibitor of DNA-Binding*" Id3 handelt es sich um ein Protein mit *helix-loop-helix*-Struktur, zwei a-Helices sind durch eine Schlaufe verbunden und bilden so einen Winkel zueinander. Die Wirkung von Id3 (und anderen Id-Proteinen wie Id1, 2 und 4) besteht darin, Transkriptionsfaktoren vom *basic helix-loop-helix* (bHLH)-Typ an der DNA-Bindung zu hindern (Benezra, Davis, et al. 1990). Diese Transkriptionsfaktoren, die wichtige Regulatoren der zellulären Entwicklung und Differenzierung sind, verfügen über eine N-terminal gelegene basische DNA-bindende Domäne in ihrer bHLH-Domäne (Murre, McCaw, et al. 1989). Die DNA-Bindung dieser Proteinfaktoren erfolgt nach Dimerisierung zu Homo- oder Heterodimeren an eine Promotorregion, die als E-Box bezeichnet wird und die Consensussequenz CANNTG besitzt (Blackwell & Weintraub 1990).

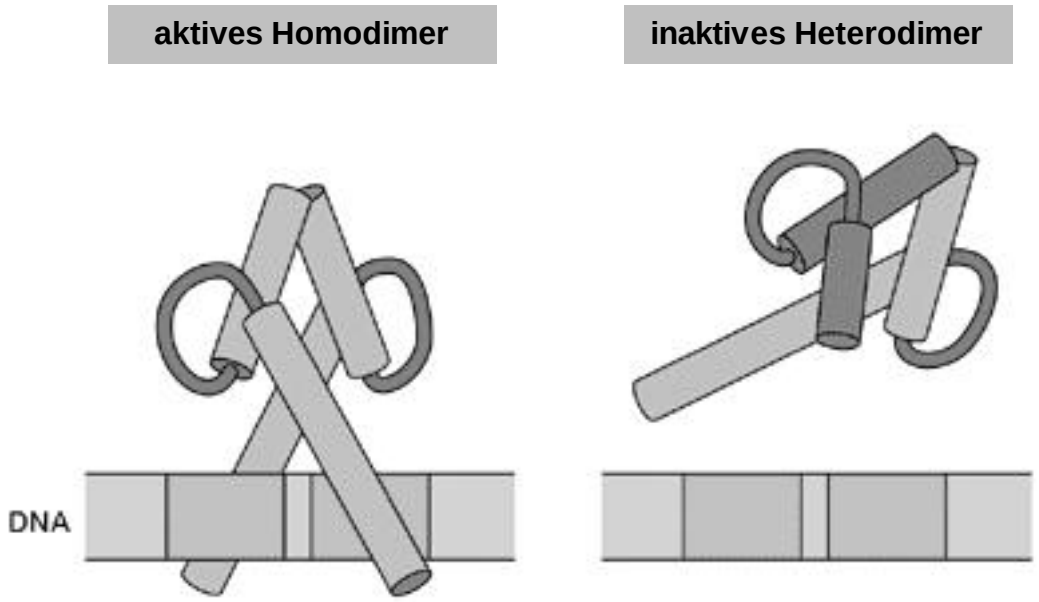


Abb. 4.1: Wirkungsweise von Id-Proteinen (aus: Alberts, Bray, et.al. 1995)

Im Unterschied zu solchen Transkriptionsfaktoren verfügt Id3 nicht über diese basische Region, sondern die entsprechende Helix ist verkürzt (Norton, Deed, et al. 1998). Über die Schlaufenregion sind die Id-Proteine gleichwohl imstande, mit bHLH-Transkriptionsfaktoren Heterodimere zu bilden (Langlands, Yin, et al. 1997). Durch diese Dimerisierung ensteht jedoch keine funktionsfähige DNA-bindende Domäne, die Bindung und die Transkription der entsprechenden Gene unterbleiben (Benezra, Davis, et al. 1990).

Zu den bHLH-Transkriptionsfaktoren, die mit Id-Proteinen dimerisieren können, gehören zum Einen die Klasse A E-Proteine (Produkte des E2A-Gens E12 und E47, E2-2 und HEB), an die eine starke Bindung durch Id1-3 gezeigt werden konnte (Langlands, Yin, et al. 1997). Zum Anderen gehören dazu gewebsspezifische Transkriptionsfaktoren (Klasse B), beispielsweise die *myogenic regulatory factors* (MRFs: MyoD, myogenin, Myf-5 and MRF4/Myf-6), die die Myogenese steuern oder Hämatopoietische Faktoren (Scl/Tal-1, Tal-2 und Lyl-1)(Bounpheng, Melnikova, et al. 1999, Moldes, Lasnier, et al. 1997, Nogueira, Mitjavila-Garcia, et al. 2000). Die Bindung an die MRFs scheint jedoch bedeutend schwächer zu sein, ob die Id-Proteine mit den blutbildenden Faktoren dimerisieren ist strittig (Langlands, Yin, et al. 1997, Nogueira, Mitjavila-Garcia, et al. 2000). Beispielsweise wird aber eine E-Box im Muskel-Kreatinkinase Promotor von einem E-Protein/MyoD-Komplex erkannt, der durch alle Id-Proteine aufgebrochen werden konnte (Langlands, Yin, et al. 1997). Erst nach der Bindung an ein E-Protein werden die Id-Proteine in den Kern transloziert (Deed, Armitage, et al. 1996).

Neben ihrer Rolle als dominant negative Regulatoren von Transkriptonsfaktoren wird den Id-Proteinen aber auch eine eigene transkriptonelle Aktivität zugeschrieben (Bounpheng, Melnikova, et al. 1999).

Es konnte gezeigt werden, daß eine starke Expression von Id3 mit zellulärer Proliferation assoziiert ist (Christy, Sanders, et al. 1991), im Verlauf der Differenzierung von Zellen geht die Expression von Id3 dagegen zurück (Moldes, Lasnier, et al. 1997). Außerdem konnte durch eine vermehrte Expression von Id3 der programmierte Zelltod in unterschiedlichen Zelltypen eingeleitet werden (Norton & Atherton 1998).

4.1.2 Gut-enriched Krüppel-like Factor (GKLF)

Der *Gut-enriched Krüppel-like Factor* GKLF/KLF4 wurde im Zuammenhang mit einem zellulären Wachstumsarrest isoliert. Er besitzt drei Tandem-Zinkfinger vom Cys_2His_2-Typ, die ihn als Mitglied der Krüppel-Familie von Transkriptionsfaktoren ausweisen (Shields, Christy, et al. 1996). Die Bezeichnung „Krüppel“ stammt von einem Segmentierungsgen aus *Drosophila melanogaster* (Schuh, Aicher, et al. 1986), mit dem GKLF strukturelle Verwandtschaft besitzt. Die charakteristische Zinkfinger-Struktur wird durch zwei antiparallele ß-Faltblätter, gefolgt von einer a-Helix gebildet (Abb. 4.2). Die meisten Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren besitzen mehrere Tandem-Wiederholungen dieses Motivs, wodurch eine Spezifität der einzelnen Faktoren für bestimmte DNA-Sequenzen erreicht wird (Shields & Yang 1998).

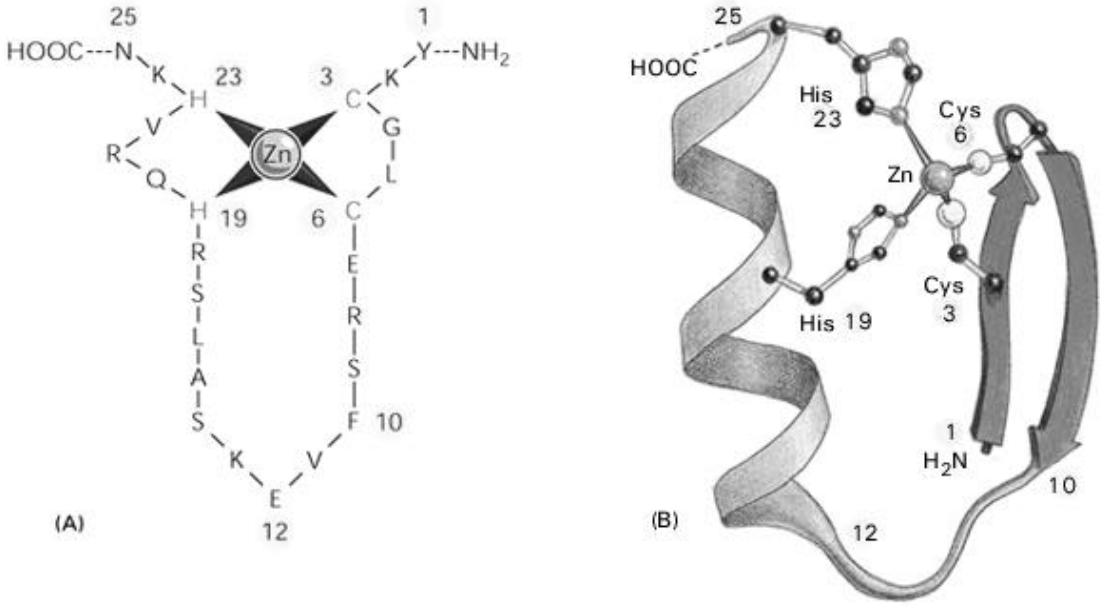


Abb. 4.1: Aufbau des Cys_2His_2-Typs des Zinkfinger-DNA-Bindungsmotivs (aus: Alberts, Bray, et al. 1995).

GKLF ist ein pleiotroper Transkriptionsfaktor, d.h. er besitzt aktivierende und reprimierende Eigenschaften (Geiman, Ton-That, et al. 2000). DNA-Sequenzen, die von GKLF erkannt werden sind z.B. das CACCC-Element des ß-Globin-Gens, an das auch EKLF bindet, sowie das *basic transcription element* BTE aus dem Cytochrom P450IA1 (*CYP1A1)* -Promotor, welches mit SP1 und verschiedenen ähnlichen Faktoren interagiert (Garrett-Sinha, Eberspaecher, et al. 1996, Shields & Yang 1998, Zhang, Shields, et al. 1998). Durch basenspezifische Mutagenese konnte das Element 5'-$^{G}/_{A}{}^{G}/_{A}GG^{C}/_{T}G^{C}/_{T}$-3' als Konsensussequenz für die Bindung von GKLF bestimmt werden (Shields & Yang 1998).

Diese Krüppel-ähnlichen Proteine sind an diversen Aspekten eukaryontischer Genregulation beteiligt, wie z.B. zellulärer Proliferation und Differenzierung (z.B. Egr-1 oder zif/268 (Christy, Lau, et al. 1988, Shields & Yang 1998, Sukhatme, Cao, et al. 1988), und der *erythroid Krüppel-Like factor* EKLF (Miller & Bieker 1993)), allgemeiner Transkription (z.B. Sp1 (Kadonaga, Carner, et al. 1987)), Oncogenese (z.B. das Wilms Tumor Gen WT1 (Call, Glaser, et al. 1990)) und Embryogenese (z.B. Krüppel (Schuh, Aicher, et al. 1986) und Hunchback (Stanojevic, Hoey, et al. 1989))

GKLF ist ausschließlich im Zellkern lokalisiert, eines der beiden *nuclear localization signals* (NLS) liegt selbst in der Zinkfinger-Domäne (Shields & Yang 1997).

An kultivierten Fibroblasten wurde gezeigt, daß die Expression von GKLF in wachstumsarretierten Zellen am höchsten ist, am niedrigsten dagegen in Zellen im exponentiellen Wachstumstadium (Shields, Christy, et al. 1996).

4.2 Der Effekt von ROS auf die Proliferation von VSMC

Es wurde gezeigt, daß die Expression von Id3 durch $OH^{\bullet}$ herunterreguliert, die Expression von GKLF jedoch erhöht wurde (Abb. 3.1, Kap. 3). Ein solcher Zusammenhang der Regulation dieser beiden Gene mit einer Wirkung reaktiver Sauerstoffspezies wurde bisher noch nicht gezeigt. Beide Gene werden wie be-

reits erwähnt mit zellulärer Proliferation bzw. einem Arrest zellulären Wachstums in Verbindung gebracht (Norton & Atherton 1998, Shie, Chen, et al. 2000, Shields, Christy, et al. 1996).

Dies legte die Vermutung nahe, daß $OH^{\bullet}$ nicht nur die Expression dieser beiden Gene reguliert, sondern daß diese Regulation in Zusammenhang stehen könnte mit einer Beeinflussung des Proliferationsverhaltens von VSMC durch $OH^{\bullet}$ oder die Einleitung von Apoptose. Es wurde bereits gezeigt, daß ROS wie $OH^{\bullet}$, $O_2^{\bullet -}$ und H_2O_2 Einfluß auf die Proliferation und auch die Apoptose in verschiedenen Zelltypen nehmen (Greene, Velarde, et al. 2000, Griendling & Harrison 1999, Li, Dietz, et al. 1997 , Li, Dietz, et al. 1997, Li, Maasch, et al. 1999, Rao & Berk 1992).

Hier konnte ebenfalls gezeigt werden, daß eine Behandlung glatter Gefäßmuskelzellen mit $OH^{\bullet}$ deren Proliferation zu hemmen vermag (Abb. 3.6, Kap. 3). Gleichzeitig konnte in diesen Zellen ein verringerter Spiegel an Id3-mRNA und ein erhöhter Spiegel an GKLF-mRNA nachgewiesen werden, bzw. der wachstumsarretierende Effekt konnte anstelle von $OH^{\bullet}$ auch durch die transiente Transfektion von VSMC mit GKLF-Sense- oder Id3-Antisense-Konstrukten herbeigeführt werden (Abb. 3.9, Kap. 3). Dies deutet darauf hin, daß die Herabregulation von Id3 und die Heraufregulation von GKLF ursächlich mit dem $OH^{\bullet}$-induzierten Arrest des Wachstums in VSMC zusammenhängen, diese beiden Moleküle also die Inhibierung des Wachstums von VSMC durch $OH^{\bullet}$ vermitteln könnten.

4.3 Der Effekt von ROS auf p53, $p21^{WAF1/Cip1}$, $p27^{Kip1}$ und Rb

Weitere Aufklärung erbrachte die Untersuchung der Wirkung von ROS auf die Expression von p53, $p21^{WAF1/Cip1}$ und $p27^{Kip1}$, sowie den Phosphorylierungszustand von Rb. Diese vier Faktoren sind eng mit der Kontrolle des Zellzyklus verbunden (Agarwal, Taylor, et al. 1998, el-Deiry, Tokino, et al. 1993, el-Deiry 1998, Harper, Adami, et al. 1993, Hartwell & Kastan 1994, Ko & Prives 1996, Levine 1997, Sherr & Roberts 1995).

p53

Bei dem Tumorsuppressor p53 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor, der die Expression von sechs oder sieben bekannten Genen verstärkt, die zumindest teilweise die p53-abhängigen Funktionen in der Zelle ausführen: $p21^{WAF1/Cip1}$, MDM2, GADD45, Cyclin G, Bax und IGF-BP3 (Ko & Prives 1996, Levine 1997).

p53 ist in den meisten Zellen in geringen Mengen vorhanden und besitzt eine kurze Halbwertszeit im Rahmen von Minuten. Es wird allgemein angenommen, daß eine Induktion durch post-transkriptionelle Mechanismen geschieht (Kastan, Onyekwere, et al. 1991). Eine solche Induktion wird z.B. durch ionisierende oder UV-Bestrahlung und DNA-Strangbrüche hervorgerufen (Nelson & Kastan 1994), außerdem wird eine generelle Streßantwort durch p53 angenommen, beispielsweise durch Hypoxie, Hitze oder Serumentzug (Graeber, Peterson, et al. 1994, Zhan, Carrier, et al. 1993).

$p21^{WAF1/Cip1}$

$p21^{WAF1/Cip1}$ (el-Deiry, Tokino, et al. 1993, Harper, Adami, et al. 1993, Xiong, Zhang, et al. 1993) ist das am besten untersuchte p53-*response* Gen. Das codierte Protein bildet in normalen Zellen einen quaternären Komplex mit Zyklinen, Zyklin-abhängigen Kinasen (CDKs 1, 2 und 4) und dem *proliferating cell nuclear antigen* PCNA (Xiong, Hannon, et al. 1993). In hohen Konzentrationen wirkt $p21^{WAF1/Cip1}$ als potenter Inhibitor von CDKs, besonders denen, die in der G_1-Phase des Zellzyklus eine Rolle spielen (Gu, Turck, et al. 1993, Harper, Adami, et al. 1993, Xiong, Zhang, et al. 1993). Nach Bestrahlung mit ionisierender oder UV-Strahlung wird der p53-abhängige G_1-Arrest zumindest teilweise durch $p21^{WAF1/Cip1}$ vermittelt (Macleod, Sherry, et al. 1995, Michieli, Chedid, et al. 1994, Parker, Eichele, et al. 1995).

$p27^{Kip1}$

$p27^{Kip1}$ besitzt zu $p21^{WAF1/Cip1}$ signifikante Homologien in der Aminosäuresequenz der N-terminalen Region, welche auch eine Inhibition von CDKs herbeiführen kann; eine Überexpression von $p27^{Kip1}$ bewirkt so einen G_1-Arrest (Polyak, Lee, et al. 1994). Der $p27^{Kip1}$-vermittelte Wachstumsarrest scheint jedoch nicht unbedingt

p53-oder Rb-abhängig zu sein (Polyak, Lee, et al. 1994, Sherr & Roberts 1995, Toyoshima & Hunter 1994). Außerdem wurde beobachtet, daß der $p27^{Kip1}$-Spiegel unverändert blieb, obwohl die untersuchten Zellen die G_0-Phase verließen und in den Zellzyklus eintraten (Toyoshima & Hunter 1994), was jedoch eventuell als Anpassung verschiedener etablierter Zell-Linien an die Kulturbedingungen gedeutet werden könnte (Sherr & Roberts 1995).

Substanzen, die den cAMP-Spiegel erhöhen oder selbst als cAMP-Analoga wirken, können den Eintritt in die G_1-Phase verhindern, ebenso wird der intrazelluläre Spiegel von $p27^{Kip1}$ erhöht und mehr Moleküle akkumulieren in Komplexen mit Zyklin D1-Cdk4, wodurch die Phosphorylierung durch die CAK verhindert wird (Kato, Matsuoka, et al. 1994, Polyak, Lee, et al. 1994).

Rb

Das Retinoblastoma Protein Rb übt die meisten, wenn nicht alle seine Effekte in einem definierten Zeitfenster in den ersten beiden Dritteln der G_1-Phase des Zellzyklus aus (Weinberg 1995). In den ersten Stunden der G_1-Phase liegt es in hypophosphorylierter Form vor, gegen Ende der G_1-Phase liegt jedoch der größte Teil in hyperphosphorylierter Form vor, die über den restlichen Zellzyklus aufrechterhalten wird. Rb verliert seine multiplen Phosphatgruppen erst nach Abschluß der M-Phase (Weinberg 1995).

In der hypophosphorylierten Form ist Rb an den Transkriptionsfaktor E2F – eigentlich eine Gruppe von mindestens fünf eng verwandten Transkriptionsfaktoren – gebunden. Die Phosphorylierung – beispielsweise nach Stimulation mit Mitogenen – bewirkt, daß E2F freigesetzt wird und die Transkription verschiedener Zellzyklusgene aktivieren kann (Chellappan, Hiebert, et al. 1991).

Die Hyperphosphorylierung von Rb kann durch verschiedene Signale blockiert werden, bekannte physiologische Signale sind TGFß, cAMP und Kontaktinhibition, dabei spielt auch der Cdk-Inhibitor $p27^{Kip1}$ eine Rolle (Kato, Matsuoka, et al. 1994, Polyak, Kato, et al. 1994).

Abbildung 4.3 zeigt einen Überblick über die Funktion der beschriebenen Zellzyklus-Komponenten.

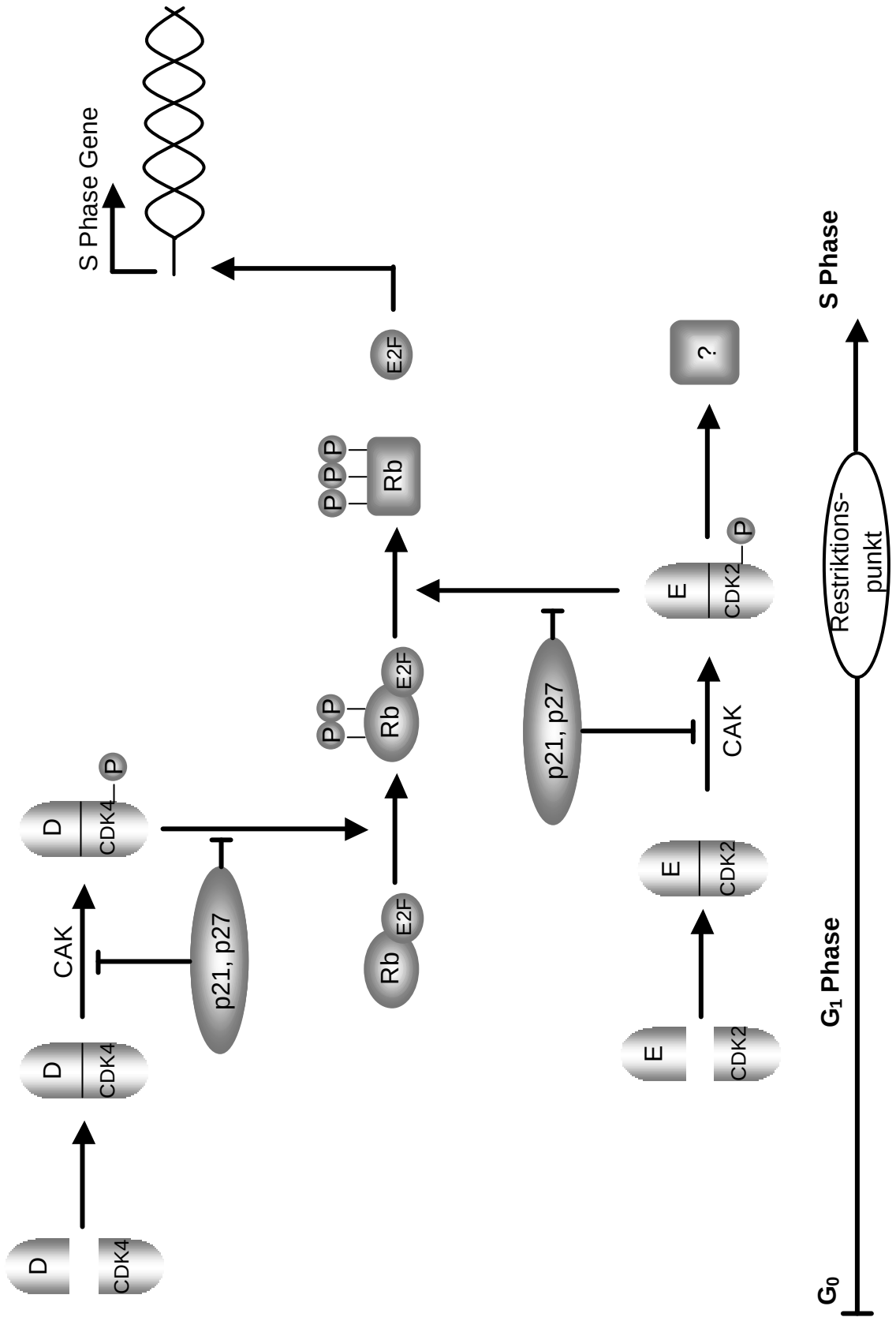


Abb. 4.3: Übersicht über den Zellzyklus und die Beteiligung von $p21^{WAF1/Cip1}$, $p27^{Kip}$ und Rb (nach Sherr & Roberts 1995).

Glatte Gefäßmuskelzellen wurden mit ROS behandelt, durch Stimulation mit H_2O_2 und Fe^{3+}NTA wurde $OH^{\bullet}$ erzeugt, durch Behandlung mit X/XO wurde $O_2^{\bullet -}$ erzeugt. Mit Hilfe von Westernblots wurde die Wirkung dieser ROS auf die Expression von p53, $p21^{WAF1/Cip1}$ und $p27^{Kip1}$, sowie auf den Phosphorylierungszustand von Rb untersucht (Abb. 3.10, Kap. 3).

$OH^{\bullet}$ erhöhte in diesen Versuchen die Expression von p53, $p21^{WAF1/Cip1}$ und $p27^{Kip1}$; die Phosphorylierung von Rb, die bei Stimulation mit FKS eintritt, wurde durch die Zugabe von $OH^{\bullet}$ verhindert.

Die Untersuchungen zur Proliferation und Apoptose in VSMC unter ROS-Einfluß zeigten, daß die DNA-Synthese von ROS durch $OH^{\bullet}$ eingeschränkt wird und Apoptose bei den verwendeten Konzentrationen von $OH^{\bullet}$ keine Rolle spielt.

Der Vergleich dieser Ergebnisse mit den Untersuchungen zur Regulation der Zellzyklus-Proteine unter $OH^{\bullet}$-Einfluß macht deutlich, daß es hier tatsächlich zu einem Wachstumsarrest in VSMC durch $OH^{\bullet}$ kommt. Dieser gezeigte Wachstumsarrest scheint nach den vorliegenden Daten über eine Aktivierung von p53, $p21^{WAF1/Cip1}$ und $p27^{Kip1}$ zu geschehen, das Rb-Protein bleibt zudem unphosphoryliert.

Der Zusammenhang der Regulation dieser Zellzyklusproteine und der Regulation der durch Differential Display identifizierten Faktoren Id3 und GKLF ist bisher nur teilweise aufgeklärt.

4.4 Die Rolle von Id3 und GKLF im $OH^{\bullet}$-induzierten Wachstumsarrest

4.4.1 GKLF

Für GKLF läßt sich ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der eigenen und der Regulation der Zellzyklusproteine herstellen: Kürzlich wurde gezeigt, daß GKLF und $p21^{WAF1/Cip1}$ gleichzeitig in Reaktion auf Serumentzug und DNA-Schädigung induziert werden. Die Heraufregulation der Expression von GKLF und

$p21^{WAF1/Cip1}$ war dabei p53-abhängig. Überdies war GKLF in der Lage, an ein Sp1-ähnliches *cis*-Element im $p21^{WAF1/Cip1}$–Promotor zu binden, und die Expression dieses Faktors zu aktivieren (Zhang, Geiman, et al. 2000). Die Heraufregulation von $p21^{WAF1/Cip1}$ durch p53 geschah über dasselbe *cis*-Element. Dabei erfolgte ebenfalls eine direkte Protein-Protein-Interaktion zwischen GKLF und p53.

Da nach den vorliegenden Ergebnissen GKLF durch $OH^{\bullet}$ heraufreguliert und gleichzeitig die DNA-Synthese verhindert wird, liegt die Vermutung nahe, daß GKLF an der Vermittlung des durch $OH^{\bullet}$ induzierten Wachstumsarrests maßgeblich beteiligt ist. Dies wird zusätzlich dadurch gestützt, daß eine Überexpression von GKLF allein bereits eine zelluläre Proliferation auch nach Behandlung der transfizierten VSMC mit Wachstumsfaktoren verhindert (Abb. 3.9 und Shields, Christy, et al. 1996). Außerdem zeigt die Untersuchung der Expression von $p21^{WAF1/Cip1}$ in GKLF-überexprimierenden Zellen ebenfalls eine verstärkte Expression von $p21^{WAF1/Cip1}$ (Abb. 3.11).

Überraschend war die Tatsache, daß in diesen Zellen auch p53, welches in der Signalkaskade als über GKLF stehend angesehen wird, ebenfalls verstärkt exprimiert wurde. Es scheint hier also eine gegenseitige Regulation dieser beiden Faktoren vorzuliegen.

$p27^{Kip1}$ wird in GKLF-überexprimierenden VSMC ebenfalls heraufreguliert und könnte also ebenfalls eine Rolle in der Vermittlung des Wachstumsarrests durch $OH^{\bullet}$ spielen. Diese Heraufregulation könnte dadurch bedingt sein, daß GKLF auch positiv auf die Regulation von p53 wirkte. Da beobachtet wurde, daß $p27^{Kip1}$ auch unabhängig von einer Induktion von p53 heraufreguliert werden kann (Polyak, Lee, et al. 1994, Sherr & Roberts 1995, Toyoshima & Hunter 1994) könnte diese Heraufregulation aber auch direkt, ohne Einbeziehung von p53 erfolgen.

Da durch die Heraufregulation der Cdk-Inhibitoren das Rb-Protein nicht mehr phosphoryliert werden kann, wird E2F nicht freigesetzt und es kommt nicht zum Eintritt in die S-Phase (vgl. Abb.4.1). Diese ausbleibende Phosphorylierung konnte ebenfalls sowohl durch Stimulation von VSMC mit $OH^{\bullet}$ als auch durch Überexpression von GKLF erreicht werden (Abb. 3.10, 3.11).

Neben dem Zusammenhang zwischen GKLF und der Kontrolle des Wachstums in VSMC könnte außerdem eine Beziehung zur Apoptose bestehen. Neben $p21^{WAF1/Cip1}$ wurde ein weiteres Zielgen für GKLF identifiziert: Es konnte eine Sup-

pression des CYPIA1-Promotors durch GKLF gezeigt werden (Zhang, Shields, et al. 1998), die über das BTE in diesem Promotor vermittelt wird. Der CYPIA1-Promotor ist für die Transkription des Cytochrom P450 1A verantwortlich, und es konnte gezeigt werden, daß Cytochrom P-450 reaktive Metaboliten erzeugt, die Apoptose verursachen können (Haouzi, Lekehal, et al. 2000) und eine Akkumulation von Cytochrom P450 1A mit Apoptose nach cytotoxischer Stimulantien einhergeht (Cantrell, Joy-Schlezinger, et al. 1998).

Zusammenfassend läßt sich die Hypothese aufstellen, daß GKLF nicht nur einen Wachstumsstop in VSMC nach Stimulation mit $OH^{\bullet}$ vermittelt, sondern eventuell gleichzeitig auch daran beteiligt ist, daß die Einleitung der Apoptose verhindert wird.

Es ist bekannt, daß $OH^{\bullet}$-Radikale eine DNA-Schädigung durch Strangbrüche verursachen können, besonders auch, wenn sie durch H_2O_2 und Fe^{3+}NTA erzeugt wurden (Duell, Lengfelder, et al. 1995, Halliwell & Aruoma 1991, Inoue & Kawanishi 1987, Mello Filho & Meneghini 1985, Min, Nishida, et al. 1999).

Die Zelle reagiert bei einer Schädigung der Erbsubstanz mit einem Schutzmechanismus, der die Weitergabe geschädigten Genoms an Tochterzellen verhindern soll. Dieser Schutzmechanismus ist eng mit dem Tumorsuppressor p53 verknüpft, welcher entweder die Apoptose einleitet oder einen Wachstumsstop vermittelt, um eine Reparatur der geschädigten DNA zu ermöglichen (Agarwal, Taylor, et al. 1998, Chen, Ko, et al. 1996, Kastan, Onyekwere, et al. 1991, Ko & Prives 1996, Nelson & Kastan 1994, Zhan, Carrier, et al. 1993).

Wie genau die DNA-Schädigung von p53 wahrgenommen wird, ist bisher noch unklar, fest steht, daß daraufhin die Proteinmenge von p53 erhöht wird. Dies geschieht oft über die Verlängerung der Halbwertszeit (Maltzman & Czyzyk 1984), kann aber auch über eine Erhöhung der Translations-Initiationsrate geschehen (Mosner, Mummenbrauer, et al. 1995). Andererseits konnte auch eine transkriptionelle Aktivierung gezeigt werden, und zwar durch p53 selbst, ohne daß eine direkte Interaktion von p53 mit seinem Promotor nachgewiesen werden konnte (Deffie, Wu, et al. 1993). Diese Heraufregulation geschieht über ein NF-KappaB – Bindungselement, der Promotor verfügt aber auch über ein GKLF-Konsensuselement und eine Sp1-Bindungsstelle (s. Anhang), über die eine transkriptionelle Regulation von p53 erfolgen könnte.

Außerdem konnte auch eine Regulation der p53-Proteinmenge über die Ubiquitin-abhängige Degradation gezeigt werden (Maki & Howley 1997), diese wurde durch UV- und ionisierende Bestrahlung beeinträchtigt: p53 verlor seine Ubiquitinierung, wodurch eine Stabilisierung des p53-Proteins erreicht wurde. Ionisierende und UV-Strahlung verursachen auch eine DNA-Schädigung und $OH^{\bullet}$-Produktion (Skov 1984), so kann hier ein Zusammenhang zwischen der Stabilisierung von p53 und der $OH^{\bullet}$-Produktion gesehen werden. Da eine direkte Protein-Protein-Interaktion von p53 und GKLF gezeigt werden konnte (Zhang, Geiman, et al. 2000), könnte der Verlust der Ubiquitinierung beispielsweise durch eine Maskierung des entsprechenden Signals geschehen (Kornitzer & Ciechanover 2000).

4.4.2 Id3

Der dominant negative Regulator von bHLH-Transkriptionsfaktoren Id3 wurde in den beschriebenen Versuchen durch $OH^{\bullet}$ stark herabreguliert (Abb. 3.1, 3.2). Generell wurde für diesen Faktor eine Förderung der Proliferation und Hemmung der Differenzierung in verschiedenen Zelltypen beschrieben, außerdem steht eine Überexpression von Id3 im Zusammenhang mit der Einleitung des programmierten Zelltods (Norton & Atherton 1998). Die beobachtete Herabregulation von Id3 durch $OH^{\bullet}$ korreliert mit dem beobachteten Wachstumsstop, die transiente Transfektion von VSMC mit einem Id3-Antisense-Konstrukt induziert selbst eine verringerte DNA-Synthese (Abb. 3.9) und stützt somit die Vermutung, daß dieser Faktor ebenfalls maßgeblich an der Vermittlung des $OH^{\bullet}$ -induzierten Wachstumsarrests beteiligt ist.

Die Expression von p53 und der Cdk-Inhibitoren $p21^{WAF1/Cip1}$ und $p27^{Kip1}$ in diesen Id3-Antisense-transfizierten VSMC verhält sich ebenso, wie in GKLF-Sense transfizierten VSMC: alle werden verstärkt exprimiert.

Für einen der Faktoren kann ein Zusammenhang zu Id3 hergeleitet werden: Die Expression des Cdk-Inhibitors $p21^{WAF1/Cip1}$ kann durch den bHLH-Transkriptionsfaktor E2A induziert werden, im Muskel verursacht das bHLH-Protein MyoD terminalen Wachstumsarrest über eine Aufregulation von $p21^{WAF1/Cip1}$ (Puri, Avantaggiati, et al. 1997). Der Promotor des $p21^{WAF1/Cip1}$-Gens besitzt acht E-Boxen, von denen drei für die Bindung von E2A essentiell sind. Au-

ßerdem konnte durch Überexpression von E47 ein Wachstumsarrest induziert werden, der durch Überexpression von Id1 verhindert werden konnte (Prabhu, Ignatova, et al. 1997). Obwohl diese Untersuchungen in diesem Fall nur für Id1 durchgeführt wurden, wurde bereits gezeigt, daß Id3 ebenfalls an die E-Proteine oder MyoD bindet (Deed, Jasiok, et al. 1998, Langlands, Yin, et al. 1997, Loveys, Streiff, et al. 1996).

Eine Herabregulation von Id3 würde folglich bedeuten, daß E-Proteine wie E2A und E47 bzw. gewebsspezifische Transkriptionsfaktoren wie MyoD nicht länger in inaktiven Heterodimeren mit Id3 sequestriert blieben, sondern daß sie freigesetzt würden und die Expression von $p21^{WAF1/Cip1}$ aktivieren könnten. Dieser Gedanke wird dadurch gestützt, daß auch eine p53-unabhängige Aktivierung von $p21^{WAF1/Cip1}$ vermutet wird (Macleod, Sherry, et al. 1995, Sheikh, Li, et al. 1994). So könnte die Herabregulation von Id3 ein weiteres Bindeglied zwischen der Wirkung von $OH^{\bullet}$ und der Arretierung des Wachstums in VSMC darstellen.

Interessant ist auch die Tatsache, daß der Id3-Promotor auch über potentielle Bindungsstellen für GKLF verfügt, an drei Stellen des humanen Id3-Promotors konnte die Konsensussequenz für die Bindung von GKLF (Shields & Yang 1998) gefunden werden, außerdem findet sich eine Sp1-Bindungsstelle (s. Anhang und Yeh & Lim 2000). Dies könnte bedeuten, daß GKLF selbst an der Herunterregulation von Id3 beteiligt sein könnte. Um diese Vermutung zu verifizieren, müßte der Id3-Promotor kloniert und einem Reportergen vorgeschaltet werden.

Der Zusammenhang zwischen einer Überexpression von Id3 und der Induktion von Apoptose konnte ebenfalls gezeigt werden, dabei wurde die Apoptose auf einem p53-unabhängigen Weg vermittelt und konnte durch Überexpression von Bcl2, BClXL oder E47 verhindert werden (Norton & Atherton 1998). Außerdem konnte Id3 den Eintritt von Fibroblasten unter Serumentzug in die S-Phase bewirken. Die Herabregulation von Id3 könnte demnach ebenfalls einen Weg zur Verhinderung der Apoptose bei gleichzeitigem Wachstumsarrest darstellen.

Auffällig bei der Regulation der Id3-mRNA und des Proteins durch $OH^{\bullet}$ ist, daß das Protein ebenso schnell herabreguliert wird wie die mRNA. Ähnliches gilt für die Regulation durch $O_2^{\bullet -}$ (s. auch nächster Abschnitt): Während die mRNA

zumindest bei Untersuchungen mittels RT-PCR keiner Regulation zu unterliegen scheint (Abb. 3.4), wird das Protein bereits nach 30 min stark heraufreguliert (Abb. 3.5).

So könnte neben der Regulation der Transkription des Id3-Gens durch $OH^{\bullet}$ auch die Regulation des Protein-Turnovers eine Rolle bei der ROS-vermittelten Signaltransduktion durch Id3 spielen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß nach den vorliegenden Ergebnissen eine DNA-Schädigung durch $OH^{\bullet}$ stattgefunden haben könnte, und daß die Zelle durch Aktivierung der p53-Maschinerie und der Cdk-Inhibitoren $p21^{WAF1/Cip1}$ und $p27^{Kip1}$ die Replikation unterdrückt, um genomische Instabilität zu vermeiden. Dabei scheint GKLF ebenfalls eine Rolle zu spielen. Gleichzeitig wird auch die Apoptose verhindert, evtl. auch durch die Herabregulation der Cytochrom P-450 Expression durch GKLF und die Herabregulation von Id3. Diese Mechanismen könnten der Zelle eine Reparatur ihrer DNA anstelle des Absterbens durch Apoptose ermöglichen.

4.5 Die Rolle von Id3 und GKLF im $O_2^{\bullet-}$-induzierten Zellwachstum

Bei der Untersuchung der ROS-Wirkung auf glatte Gefäßmuskelzellen mit Hilfe des Differential Display wurde zunächst nur der Einfluß von $OH^{\bullet}$ betrachtet. Die dabei charakterisierten mRNAs und dazugehörigen Gene Id3 und GKLF, sowie die Proliferation und Apoptose von VSMC wurden aber auch im Zusammenhang mit der Wirkung von $O_2^{\bullet-}$ untersucht.

Die Wirkung von $O_2^{\bullet-}$ auf die Expression von Id3 und GKLF ist anders als die von $OH^{\bullet}$: Die mRNA-Spiegel der beiden Gene blieben in den hier durchgeführten Versuchen weitgehend unbeeinflußt (Abb. 3.4), für Id3 ließ sich dennoch eine Heraufregulation auf der Proteinebene nachweisen (Abb. 3.5). Hier könnte ein posttrankriptioneller Mechanismus oder aber auch eine Beeinflussung des Proteinturnovers stattfinden.

Es wurde gezeigt, daß Id3 ein sehr kurzlebiges Protein ist und (wie auch Id1 und 2) über den Ubiquitin-Proteasom-Weg degradiert wird (Bounpheng, Dimas, et al. 1999), die Regulation der Proteinmenge könnte also auch über diesen Weg geschehen. Ist Id3 z.B. an E47 gebunden, wird der Ubiquitin-abhängige Abbau signifikant reduziert (Bounpheng, Dimas, et al. 1999). Außerdem wurde eine ZyklinA- und E-Cdk2-abhängige Phosphorylierung von Id3 nachgewiesen, die die Bindungseigenschaften an andere bHLH-Proteine verändert (Deed, Hara, et al. 1997). In unphosphorylierter Form konnte Id3 beispielsweise zwar E12-Homodimere, nicht aber E12-MyoD-Heterodimere aufbrechen. In phosphorylierter Form konnte jedoch auch ein solches Heterodimer aufgebrochen werden. In diesem Fall stünde also eine erhöhte Anzahl von Dimerisierungspartnern für Id3 zur Verfügung, was den Ubiquitin-abhängigen Abbau erschweren würde. So könnte $O_2^{\bullet-}$ in einer positiven Rückkopplung die Erhöhung der Id3-Proteinmenge bei gleichbleibender Transkriptionsrate bewirken.

Im Gegensatz zu $OH^{\bullet}$ bewirkt $O_2^{\bullet-}$ in subapoptotischen Konzentrationen (Abb. 3.7) keine Inhibierung, sondern eine Induktion der zellulären Proliferation (Abb. 3.6), diese Wachstum-stimulierende Wirkung der Superoxidradikals wurde bereits zuvor beobachtet (Baas & Berk 1995, Berk 1999, Conrad, Millhorn, et al. 2000, Griendling & Harrison 1999, Rao & Berk 1992). In Id3-unterexprimierenden oder GKLF-überexprimierenden Zellen ist das durch $O_2^{\bullet-}$-induzierte Wachstum aufgehoben, Id3-überexprimierende oder GKLF unterexprimierenden Zellen zeigen ein verstärktes Wachstum als Reaktion auf $O_2^{\bullet-}$ (Abb. 3.9). Die basale und durch FKS-induzierte Proliferation blieben durch eine Überexpression von Id3 weitgehend unbeeinflußt.

Eventuell nimmt $O_2^{\bullet-}$ also über eine Heraufregulation von Id3 – evtl. durch Stabilisierung des Proteins – und eine Herabregulation von GKLF (die hier aber nicht direkt gezeigt werden konnte) Einfluß auf die Proliferation von VSMC.

Einen Überblick über nach den hier durchgeführten Versuchen mögliche, durch ROS-induzierte Vorgänge zeigt Abb. 4.4.

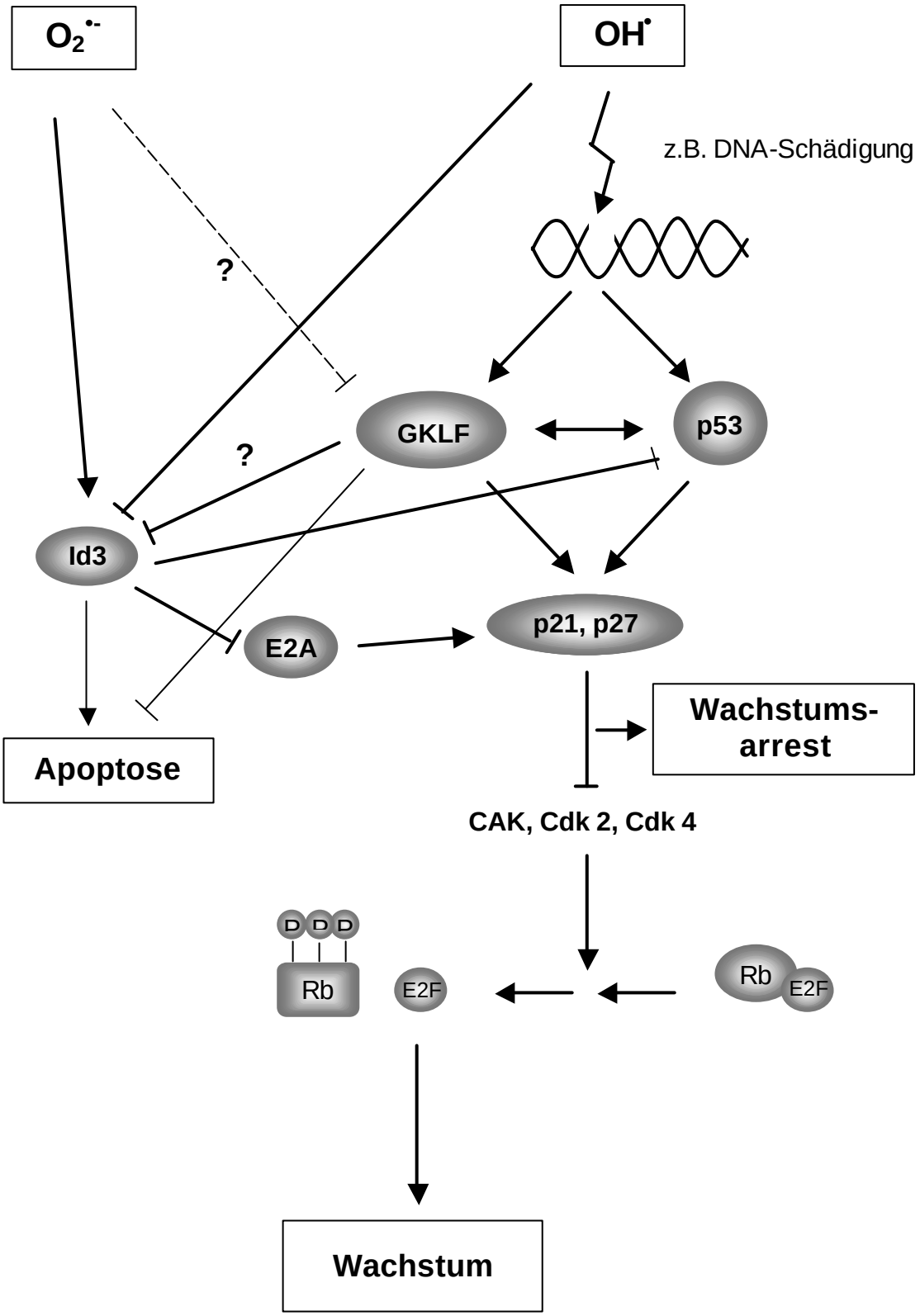


Abb. 4.4: Übersicht über mögliche Wirkungen von ROS auf Id3, GKLF und Proteine des Zellzyklus.

5 Zusammenfassung

Reaktive Sauerstoffspezies spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese von endothelialer Dysfunktion und Arteriosklerose. Ihre Wirkungen in der Zelle sind vielfältig, die Mechanismen jedoch weitgehend ungeklärt. Die beschriebenen Experimente erbrachten folgende Ergebnisse:

- Das Hydroxylradikal $OH^{\bullet}$ induziert in VSMC einen Wachstumsarrest, Superoxid ($O_2^{\bullet -}$) dagegen Proliferation.
- Mit Hilfe des Differential Display von mRNA konnten in glatten Gefäßmuskelzellen zwei Gene charakterisiert werden, deren Expression ROS-sensitiv ist: Die Expression des Inhibitor of DNA-binding Proteins Id3 wird durch $OH^{\bullet}$ verringert, die des Gut-enriched Krüppel-like Factors GKLF aktiviert. $O_2^{\bullet -}$ dagegen erhöht die Expression von Id3.
- Experimente in transient transfizierten VSMC haben gezeigt, daß die Herunterregulation von Id3 und die Heraufregulation von GKLF für den $OH^{\bullet}$-induzierten Wachstumsarrest verantwortlich sind. Eine verstärkte Expression von Id3 ist überdies mit der Induktion des Wachstums durch $O_2^{\bullet -}$ assoziiert.
- $OH^{\bullet}$ bewirkt eine Heraufregulation des Tumorsuppressors p53, der CKIs $p21^{WAF1/Cip1}$ und $p27^{Kip1}$, sowie eine Hypophosphorylierung von Rb. Dieser Effekt kann ebenfalls durch eine Überexpression von GKLF oder die Verhinderung der Expression von Id3 erreicht werden.
- $O_2^{\bullet -}$ zieht eine verminderte Expression von p53, $p21^{WAF1/Cip1}$ und $p27^{Kip1}$ und eine Hyperphosphorylierung von Rb nach sich, das Gleiche bewirkt die Unterexpression von GKLF oder die Überexpression von Id3.

ROS induzieren differentielle Effekte auf das Wachstum von VSMC. Die im Differential Display identifizierten Gene Id3 und GKLF sind daran über eine Regulation von p53, $p21^{WAF1/Cip1}$, $p27^{Kip1}$ und Rb beteiligt.

Dabei könnte der Grund für den $OH^{\bullet}$-induzierten Wachstumsarrest in einer DNA-Schädigung liegen, die untersuchten Proteine würden dann einen Wachstumsarrest bei gleichzeitiger Unterdrückung der Apoptose vermitteln, um eine Reparatur der DNA zu ermöglichen.

6 Literatur

1 Agarwal ML, Taylor WR, Chernov MV, Chernova OB, Stark GR. The p53 network. J Biol Chem 1998; 273(1): 1-4.

2 Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff, M., Roberts K, Watson JD. Molekularbiologie der Zelle. 3 ed. 1995.

3 Allen RG, Tresini M. Oxidative stress and gene regulation. Free Radic Biol Med 2000; 28(3): 463-499.

4 Baas AS, Berk BC. Differential activation of mitogen-activated protein kinases by H2O2 and O2- in vascular smooth muscle cells. Circ Res 1995; 77(1): 29-36.

5 Babior BM. Phagocytes and oxidative stress. Am J Med 2000; 109(1): 33 -44.

6 Babior BM, Kipnes RS, Curnutte JT. Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. J Clin Invest 1973; 52(3): 741-744.

7 Barnes PJ. Reactive oxygen species and airway inflammation. Free Radic Biol Med 1990; 9(3): 235-243.

8 Bech-Laursen J, Somers M, Kurz S, Warnholtz A, McCann l, Freeman B, Tarpey M, Fukai T, Harrison D. Endothelial regulation of vasomotion in Apo(E)-deficient mice: implications for interactions between peroxynitrite and tetrahydrobiopterin. Circulation 2000; In press.

9 Benezra R, Davis RL, Lockshon D, Turner DL, Weintraub H. The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. Cell 1990; 61(1): 49-59.

10 Berk BC. Redox signals that regulate the vascular response to injury. Thromb Haemost 1999; 82(2): 810-817.

11 Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res 1979; 7(6): 1513-1523.

12 Blackwell TK, Weintraub H. Differences and similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection. Science 1990; 250(4984): 1104-1110.

13 Bolli R. Oxygen-derived free radicals and postischemic myocardial dysfunction ("stunned myocardium"). J Am Coll Cardiol 1988; 12(1): 239-249.

14 Bounpheng MA, Dimas JJ, Dodds SG, Christy BA. Degradation of Id proteins by the ubiquitin-proteasome pathway. FASEB J 1999; 13(15): 2257-2264.

15 Bounpheng MA, Melnikova IN, Dimas JJ, Christy BA. Identification of a novel transcriptional activity of mammalian Id proteins. Nucleic Acids Res 1999; 27(7): 1740-1746.

16 Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. Circ Res 2000; 87(10): 840-844.

17 Call KM, Glaser T, Ito CY, Buckler AJ, Pelletier J, Haber DA, Rose EA, Kral A, Yeger H, Lewis WH. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. Cell 1990; 60(3): 509-520.

18 Cantrell SM, Joy-Schlezinger J, Stegeman JJ, Tillitt DE, Hannink M. Correlation of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced apoptotic cell death in the embryonic vasculature with embryotoxicity. Toxicol Appl Pharmacol 1998; 148(1): 24-34.

19 Cardillo C, Kilcoyne CM, Cannon RO, III, Quyyumi AA, Panza JA. Xanthine oxidase inhibition with oxypurinol improves endothelial vasodilator function in hypercholesterolemic but not in hypertensive patients. Hypertension 1997; 30(1 Pt 1): 57-63.

20 Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. Physiol Rev 1979; 59(3): 527-605.

21 Chellappan SP, Hiebert S, Mudryj M, Horowitz JM, Nevins JR. The E2F transcription factor is a cellular target for the RB protein. Cell 1991; 65(6): 1053-1061.

22 Chen X, Ko LJ, Jayaraman L, Prives C. p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. Genes Dev 1996; 10(19): 2438-2451.

23 Cheng TH, Shih NL, Chen SY, Wang DL, Chen JJ. Reactive oxygen species modulate endothelin-l-induced c-fos gene expression in cardiomyocytes. Cardiovasc Res 1999; 41(3): 654-662.

24 Christy BA, Lau LF, Nathans D. A gene activated in mouse 3T3 cells by serum growth factors encodes a protein with "zinc finger" sequences. Proc Natl Acad Sci U S A 1988; 85(21): 7857-7861.

25 Christy BA, Sanders LK, Lau LF, Copeland NG, Jenkins NA, Nathans D. An Id-related helix-loop-helix protein encoded by a growth factor-inducible gene. Proc Natl Acad Sci U S A 1991; 88(5): 1815-1819.

26 Conrad PW, Millhorn DE, Beitner-Johnson D. Hypoxia differentially regulates the mitogen- and stress-activated protein kinases. Role of Ca2+/CaM in the activation of MAPK and p38 gamma. Adv Exp Med Biol 2000; 475: 293-302.

27 Dart RC, Sanders AB. Oxygen free radicals and myocardial reperfusion injury. Ann Emerg Med 1988; 17(1): 53-58.

28 Das DK, Engelman RM, Maulik N. Oxygen free radical signaling in ischemic preconditioning. Ann N Y Acad Sci 1999; 874: 49-65.

29 de Groot H. Reactive oxygen species in tissue injury. Hepatogastroenterology 1994; 41(4): 328-332.

30 De Keulenaer GW, Alexander RW, Ushio-Fukai M, Ishizaka N, Griendling KK. Tumour necrosis factor alpha activates a p22phox-based NADH oxidase in vascular smooth muscle. Biochem J 1998; 329 (Pt 3): 653-657.

31 Deed RW, Armitage S, Norton JD. Nuclear localization and regulation of Id protein through an E protein-mediated chaperone mechanism. J Biol Chem 1996; 271(39): 23603-23606.

32 Deed RW, Hara E, Atherton GT, Peters G, Norton JD. Regulation of Id3 cell cycle function by Cdk-2-dependent phosphorylation. Mol Cell Biol 1997; 17(12): 6815-6821.

33 Deed RW, Jasiok M, Norton JD. Lymphoid-specific expression of the Id3 gene in hematopoietic cells. Selective antagonism of E2A basic helix-loop-helix protein associated with Id3-induced differentiation of erythroleukemia cells. J Biol Chem 1998; 273(14): 8278-8286.

34 Deffie A, Wu H, Reinke V, Lozano G. The tumor suppressor p53 regulates its own transcription. Mol Cell Biol 1993; 13(6): 3415-3423.

35 Djeha A, Brock JH. Uptake and intracellular handling of iron from transferrin and iron chelates by mitogen stimulated mouse lymphocytes. Biochim Biophys Acta 1992; 1133(2): 147-152.

36 Dreher D, Junod AF. Differential effects of superoxide, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical on intracellular calcium in human endothelial cells. J Cell Physiol 1995; 162(1): 147-153.

37 Duell T, Lengfelder E, Fink R, Giesen R, Bauchinger M. Effect of activated oxygen species in human lymphocytes. Mutat Res 1995; 336(1): 29-38.

38 Durante W, Sen AK, Sunahara FA. Impairment of endothelium-dependent relaxation in aortae from spontaneously diabetic rats. Br J Pharmacol 1988; 94(2): 463-468.

39 el-Deiry WS. Regulation of p53 downstream genes. Semin Cancer Biol 1998; 8(5): 345-357.

40 el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. Cell 1993; 75(4): 817-825.

41 Ferrari R, Agnoletti L, Comini L, Gaia G, Bachetti T, Cargnoni A, Ceconi C, Curello S, Visioli O. Oxidative stress during myocardial ischaemia and heart failure. Eur Heart J 1998; 19 Suppl B: B2-11.

42 Finkel T. Oxygen radicals and signaling. Curr Opin Cell Biol 1998; 10(2): 248-253.

43 Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species in non-phagocytic cells. J Leukoc Biol 1999; 65(3): 337-340.

44 Finkel T. Redox-dependent signal transduction. FEBS Lett 2000; 476(1-2): 52-54.

45 Franceschi D, Graham D, Sarasua M, Zollinger RM, Jr. Mechanisms of oxygen free radical-induced calcium overload in endothelial cells. Surgery 1990; 108(2): 292-297.

46 Gamaley IA, Klyubin IV. Roles of reactive oxygen species: signaling and regulation of cellular functions. Int Rev Cytol 1999; 188: 203-255.

47 Garrett-Sinha LA, Eberspaecher H, Seldin MF, de CB. A gene for a novel zinc-finger protein expressed in differentiated epithelial cells and transiently in certain mesenchymal cells. J Biol Chem 1996; 271(49): 31384-31390.

48 Geeraerts MD, Ronveaux-Dupal MF, Lemasters JJ, Herman B. Cytosolic free Ca2+ and proteolysis in lethal oxidative injury in endothelial cells. Am J Physiol 1991; 261(5 Pt 1): C889-C896.

49 Geiman DE, Ton-That H, Johnson JM, Yang VW. Transactivation and growth suppression by the gut-enriched Kruppel-like factor (Kruppel-like factor 4) are dependent on acidic amino acid residues and protein-protein interaction. Nucleic Acids Res 2000; 28(5): 1106-1113.

50 Gimbrone MA, Jr. Vascular endothelium: an integrator of pathophysiologic stimuli in atherosclerosis. Am J Cardiol 1995; 75(6): 67B-70B.

51 Goldhaber JI, Weiss JN. Oxygen free radicals and cardiac reperfusion abnormalities. Hypertension 1992; 20(1): 118-127.

52 Gomes LF, Cuccovia IM, Chaimovich H, Barbieri DH, Politi MJ. Permeation of superoxide anion through the bilayer of vesicles of a synthetic amphiphile. Biochim Biophys Acta 1993; 1152(1): 78-82.

53 Graeber TG, Peterson JF, Tsai M, Monica K, Fornace AJ, Jr., Giaccia AJ. Hypoxia induces accumulation of p53 protein, but activation of a G1-phase checkpoint by low-oxygen conditions is independent of p53 status. Mol Cell Biol 1994; 14(9): 6264-6277.

54 Greene EL, Velarde V, Jaffa AA. Role of reactive oxygen species in bradykinin-induced mitogen-activated protein kinase and c-fos induction in vascular cells. Hypertension 2000; 35(4): 942-947.

55 Griendling KK, Harrison DG. Dual role of reactive oxygen species in vascular growth. Circ Res 1999; 85(6): 562-563.

56 Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. Circ Res 1994; 74(6): 1141-1148.

57 Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. Circ Res 2000; 86(5): 494-501.

58 Gu Y, Turck CW, Morgan DO. Inhibition of CDK2 activity in vivo by an associated 20K regulatory subunit. Nature 1993; 366(6456): 707-710.

59 Gutteridge JM, Halliwell B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. Trends Biochem Sci 1990; 15(4): 129-135.

60 Halliwell B, Aruoma OI. DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. FEBS Lett 1991; 281(1-2): 9-19.

61 Haouzi D, Lekehal M, Moreau A, Moulis C, Feldmann G, Robin MA, Letteron P, Fau D, Pessayre D. Cytochrome P450-generated reactive metabolites cause mitochondrial permeability transition, caspase activation, and apoptosis in rat hepatocytes. Hepatology 2000; 32(2): 303-311.

62 Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. Cell 1993; 75(4): 805-816.

63 Harrison DG. Endothelial function and oxidant stress. Clin Cardiol 1997; 20(11 Suppl 2): II-7.

64 Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. Science 1994; 266(5192): 1821-1828.

65 Heinzel B, John M, Klatt P, Bohme E, Mayer B. Ca2+/calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase. Biochem J 1992; 281 (Pt 3): 627-630.

66 Hensley K, Robinson KA, Gabbita SP, Salsman S, Floyd RA. Reactive oxygen species, cell signaling, and cell injury. Free Radic Biol Med 2000; 28(10): 1456-1462.

67 Herbst U, Toborek M, Kaiser S, Mattson MP, Hennig B. 4-Hydroxynonenal induces dysfunction and apoptosis of cultured endothelial cells. J Cell Physiol 1999; 181(2): 295-303.

68 Hevel JM, White KA, Marletta MA. Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. J Biol Chem 1991; 266(34): 22789-22791.

69 Higson FK, Kohen R, Chevion M. Iron enhancement of ascorbate toxicity. Free Radic Res Commun 1988; 5(2): 107-115.

70 Hirosumi J, Ouchi Y, Watanabe M, Kusunoki J, Nakamura T, Orimo H. Effect of superoxide and lipid peroxide on cytosolic free calcium concentration in cultured pig aortic endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun 1988; 152(1): 301-307.

71 Holland JA, Meyer JW, Chang MM, O'Donnell RW, Johnson DK, Ziegler LM. Thrombin stimulated reactive oxygen species production in cultured human endothelial cells. Endothelium 1998; 6(2): 113-121.

72 Inoue S, Kawanishi S. Hydroxyl radical production and human DNA damage induced by ferric nitrilotriacetate and hydrogen peroxide. Cancer Res 1987; 47(24 Pt 1): 6522-6527.

73 Irani K. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival : A review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. Circ Res 2000; 87(3): 179-183.

74 Israel N, Gougerot-Pocidalo MA. Oxidative stress in human immunodeficiency virus infection. Cell Mol Life Sci 1997; 53(11-12): 864-870.

75 Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL. Harrisons Innere Medizin 1. 13 ed. 1995.

76 Jaeschke H. Mechanisms of oxidant stress-induced acute tissue injury. Proc Soc Exp Biol Med 1995; 209(2): 104-111.

77 Jornot L, Junod AF. Hypoxanthine-xanthine oxidase-related defect in polypeptide chain initiation by endothelium. J Appl Physiol 1989; 66(1): 450-457.

78 Jornot L, Petersen H, Junod AF. Differential protective effects of O-phenanthroline and catalase on H2O2-induced DNA damage and inhibition of protein synthesis in endothelial cells. J Cell Physiol 1991; 149(3): 408-413.

79 Kadonaga JT, Carner KR, Masiarz FR, Tjian R. Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. Cell 1987; 51(6): 1079-1090.

80 Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. Cancer Res 1991; 51(23 Pt 1): 6304-6311.

81 Kato JY, Matsuoka M, Polyak K, Massague J, Sherr CJ. Cyclic AMP-induced G1 phase arrest mediated by an inhibitor (p27Kip1) of cyclin-dependent kinase 4 activation. Cell 1994; 79(3): 487-496.

82 Klebanoff SJ, Pincus SH. Hydrogen peroxide utilization in myeloperoxidase-deficient leukocytes: a possible microbicidal control mechanism. J Clin Invest 1971; 50(10): 2226-2229.

83 Kloner RA, Przyklenk K, Whittaker P. Deleterious effects of oxygen radicals in ischemia/reperfusion. Resolved and unresolved issues. Circulation 1989; 80(5): 1115-1127.

84 Ko LJ, Prives C. p53: puzzle and paradigm. Genes Dev 1996; 10(9): 1054-1072.

85 Kojda G, Harrison D. Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. Cardiovasc Res 1999; 43(3): 562-571.

86 Kornitzer D, Ciechanover A. Modes of regulation of ubiquitin-mediated protein degradation. J Cell Physiol 2000; 182(1): 1-11.

87 Kunsch C, Medford RM. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature. Circ Res 1999; 85(8):753-766.

88 Lander HM. An essential role for free radicals and derived species in signal transduction. FASEB J 1997; 11(2): 118-124.

89 Langlands K, Yin X, Anand G, Prochownik EV. Differential interactions of Id proteins with basic-helix-loop-helix transcription factors. J Biol Chem 1997; 272(32): 19785-19793.

90 Lefer DJ, Granger DN. Oxidative stress and cardiac disease. Am J Med 2000; 109(4): 315-323.

91 Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. Cell 1997; 88(3): 323-331.

92 Levine GN, Frei B, Koulouris SN, Gerhard MD, Keaney JF, Jr., Vita JA. Ascorbic acid reverses endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. Circulation 1996; 93(6): 1107-1113.

93 Li PF, Dietz R, von HR. Differential effect of hydrogen peroxide and superoxide anion on apoptosis and proliferation of vascular smooth muscle cells. Circulation 1997; 96(10): 3602-3609.

94 Li PF, Dietz R, von HR. Reactive oxygen species induce apoptosis of vascular smooth muscle cell. FEBS Lett 1997; 404(2-3): 249-252.

95 Li PF, Maasch C, Haller H, Dietz R, von HR. Requirement for protein kinase C in reactive oxygen species-induced apoptosis of vascular smooth muscle cells. Circulation 1999; 100(9): 967-973.

96 Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. Science 1992; 257(5072): 967-971.

97 Lockette W, Otsuka Y, Carretero O. The loss of endothelium-dependent vascular relaxation in hypertension. Hypertension 1986; 8(6 Pt 2): II61-II66.

98 Loveys DA, Streiff MB, Kato GJ. E2A basic-helix-loop-helix transcription factors are negatively regulated by serum growth factors and by the Id3 protein. Nucleic Acids Res 1996; 24(14): 2813-2820.

99 Lusis AJ. Atherosclerosis. Nature 2000; 407(6801): 233-241.

100 Macleod KF, Sherry N, Hannon G, Beach D, Tokino T, Kinzler K, Vogelstein B, Jacks T. p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage. Genes Dev 1995; 9(8): 935-944.

101 Maki A, Berezesky IK, Fargnoli J, Holbrook NJ, Trump BF. Role of [Ca2+]i in induction of c-fos, c-jun, and c-myc mRNA in rat PTE after oxidative stress. FASEB J 1992; 6(3): 919-924.

102 Maki CG, Howley PM. Ubiquitination of p53 and p21 is differentially affected by ionizing and UV radiation. Mol Cell Biol 1997; 17(1): 355-363.

103 Maltzman W, Czyzyk L. UV irradiation stimulates levels of p53 cellular tumor antigen in nontransformed mouse cells. Mol Cell Biol 1984; 4(9): 1689-1694.

104 Marletta MA. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. Cell 1994; 78(6): 927-930.

105 Marumo T, Schini-Kerth VB, Fisslthaler B, Busse R. Platelet-derived growth factor-stimulated superoxide anion production modulates activation of transcription factor NF-kappaB and expression of monocyte chemoattractant protein 1 in human aortic smooth muscle cells. Circulation 1997; 96(7): 2361-2367.

106 Masumoto N, Tasaka K, Miyake A, Tanizawa O. Superoxide anion increases intracellular free calcium in human myometrial cells. J Biol Chem 1990; 265(36): 22533-22536.

107 Masutani H. Oxidative stress response and signaling in hematological malignancies and HIV infection. Int J Hematol 2000; 71(1): 25-32.

108 Mello Filho AC, Meneghini R. Protection of mammalian cells by o-phenanthroline from lethal and DNA-damaging effects produced by active oxygen species. Biochim Biophys Acta 1985; 847(1): 82-89.

109 Michieli P, Chedid M, Lin D, Pierce JH, Mercer WE, Givol D. Induction of WAF1/CIP1 by a p53-independent pathway. Cancer Res 1994; 54(13): 3391-3395.

110 Miller IJ, Bieker JJ. A novel, erythroid cell-specific murine transcription factor that binds to the CACCC element and is related to the Kruppel family of nuclear proteins. Mol Cell Biol 1993; 13(5): 2776-2786.

111 Min KS, Nishida K, Onosaka S. Protective effect of metallothionein to ras DNA damage induced by hydrogen peroxide and ferric ion-nitrilotriacetic acid. Chem Biol Interact 1999; 122(3): 137-152.

112 Minor RL, Jr., Myers PR, Guerra R, Jr., Bates JN, Harrison DG. Diet-induced atherosclerosis increases the release of nitrogen oxides from rabbit aorta. J Clin Invest 1990; 86(6): 2109-2116.

113 Moldes M, Lasnier F, Feve B, Pairault J, Djian P. Id3 prevents differentiation of preadipose cells. Mol Cell Biol 1997; 17(4): 1796-1804.

114 Mosner J, Mummenbrauer T, Bauer C, Sczakiel G, Grosse F, Deppert W. Negative feedback regulation of wild-type p53 biosynthesis. EMBO J 1995; 14(18): 4442-4449.

115 Mugge A, Elwell JH, Peterson TE, Hofmeyer TG, Heistad DD, Harrison DG. Chronic treatment with polyethylene-glycolated superoxide dismutase partially restores endothelium-dependent vascular relaxations in cholesterol-fed rabbits. Circ Res 1991; 69(5): 1293-1300.

116 Murad F. Regulation of cytosolic guanylyl cyclase by nitric oxide: the NO-cyclic GMP signal transduction system. Adv Pharmacol 1994; 26: 19-33.

117 Murre C, McCaw PS, Baltimore D. A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. Cell 1989; 56(5): 777-783.

118 Nelson WG, Kastan MB. DNA strand breaks: the DNA template alterations that trigger p53-dependent DNA damage response pathways. Mol Cell Biol 1994; 14(3): 1815-1823.

119 Nogueira MM, Mitjavila-Garcia MT, Le Pesteur F, Filippi MD, Vainchenker W, Dubart KA, Sainteny F. Regulation of Id gene expression during embryonic stem cell-derived hematopoietic differentiation. Biochem Biophys Res Commun 2000; 276(2): 803-812.

120 Norton JD, Atherton GT. Coupling of cell growth control and apoptosis functions of Id proteins. Mol Cell Biol 1998; 18(4): 2371-2381.

121 Norton JD, Deed RW, Craggs G, Sablitzky F. Id helix-loop-helix proteins in cell growth and differentiation. Trends Cell Biol 1998; 8(2): 58-65.

122 O'Donnell VB, Chumley PH, Hogg N, Bloodsworth A, Darley-Usmar VM, Freeman BA. Nitric oxide inhibition of lipid peroxidation: kinetics of reaction with lipid peroxyl radicals and comparison with alpha-tocopherol. Biochemistry 1997; 36(49): 15216-15223.

123 Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. J Clin Invest 1993; 91(6): 2546-2551.

124 Olakanmi O, Stokes JB, Britigan BE. Acquisition of iron bound to low molecular weight chelates by human monocyte-derived macrophages. J Immunol 1994; 153(6): 2691-2703.

125 Orie NN, Zidek W, Tepel M. Chemoattractant- and mitogen-induced generation of reactive oxygen species in human lymphocytes: the role of calcium. Exp Physiol 1999; 84(3): 515-520.

126 Oyama Y, Kawasaki H, Hattori Y, Kanno M. Attenuation of endothelium-dependent relaxation in aorta from diabetic rats. Eur J Pharmacol 1986; 132(1): 75-78.

127 Parker SB, Eichele G, Zhang P, Rawls A, Sands AT, Bradley A, Olson EN, Harper JW, Elledge SJ. p53-independent expression of p21Cip1 in muscle and other terminally differentiating cells. Science 1995; 267(5200): 1024-1027.

128 Patel RP, Moellering D, Murphy-Ullrich J, Jo H, Beckman JS, Darley-Usmar VM. Cell signaling by reactive nitrogen and oxygen species in atherosclerosis. Free Radic Biol Med 2000; 28(12): 1780-1794.

129 Pieper GM, Langenstroer P, Siebeneich W. Diabetic-induced endothelial dysfunction in rat aorta: role of hydroxyl radicals. Cardiovasc Res 1997; 34(1): 145-156.

130 Poirier GM, Pyati J, Wan JS, Erlander MG. Screening differentially expressed cDNA clones obtained by differential display using amplified RNA. Nucleic Acids Res 1997; 25(4): 913-914.

131 Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, Sherr CJ, Massague J, Roberts JM, Koff A. p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. Genes Dev 1994; 8(1): 9-22.

132 Polyak K, Lee MH, Erdjument-Bromage H, Koff A, Roberts JM, Tempst P, Massague J. Cloning of p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals. Cell 1994; 78(1): 59-66.

133 Pou S, Pou WS, Bredt DS, Snyder SH, Rosen GM. Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. J Biol Chem 1992; 267(34):24173-24176.

134 Prabhu S, Ignatova A, Park ST, Sun XH. Regulation of the expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 by E2A and Id proteins. Mol Cell Biol 1997; 17(10): 5888-5896.

135 Pryor WA, Squadrito GL. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. Am J Physiol 1995; 268(5 Pt 1): L699-L722.

136 Puri PL, Avantaggiati ML, Balsano C, Sang N, Graessmann A, Giordano A, Levrero M. p300 is required for MyoD-dependent cell cycle arrest and muscle-specific gene transcription. EMBO J 1997; 16(2): 369-383.

137 Rao GN, Berk BC. Active oxygen species stimulate vascular smooth muscle cell growth and proto-oncogene expression. Circ Res 1992; 70(3): 593-599.

138 Richard VJ, Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Oxygen-derived free radicals and postischemic myocardial reperfusion: therapeutic implications. Fundam Clin Pharmacol 1990; 4(1): 85-103.

139 Richardson D, Baker E. The uptake of inorganic iron complexes by human melanoma cells. Biochim Biophys Acta 1991; 1093(1): 20-28.

140 Robinson KA, Stewart CA, Pye QN, Nguyen X, Kenney L, Salzman S, Floyd RA, Hensley K. Redox-sensitive protein phosphatase activity regulates the phosphorylation state of p38 protein kinase in primary astrocyte culture. J Neurosci Res 1999; 55(6): 724-732.

141 Schuh R, Aicher W, Gaul U, Cote S, Preiss A, Maier D, Seifert E, Nauber U, Schroder C, Kemler R. A conserved family of nuclear proteins containing structural elements of the finger protein encoded by Kruppel, a Drosophila segmentation gene. Cell 1986; 47(6): 1025-1032.

142 Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS. Oxidative stress and cell cycle checkpoint function (1). Free Radic Biol Med 2000; 28(9): 1387 -404.

143 Sheikh MS, Li XS, Chen JC, Shao ZM, Ordonez JV, Fontana JA. Mechanisms of regulation of WAF1/Cip1 gene expression in human breast carcinoma: role of p53-dependent and independent signal transduction pathways. Oncogene 1994; 9(12): 3407-3415.

144 Sherr CJ, Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. Genes Dev 1995; 9(10): 1149-1163.

145 Shie JL, Chen ZY, Fu M, Pestell RG, Tseng CC. Gut-enriched Kruppel-like factor represses cyclin D1 promoter activity through Sp1 motif. Nucleic Acids Res 2000; 28(15): 2969-2976.

146 Shields JM, Christy RJ, Yang VW. Identification and characterization of a gene encoding a gut-enriched Kruppel-like factor expressed during growth arrest. J Biol Chem 1996; 271(33): 20009-20017.

147 Shields JM, Yang VW. Two potent nuclear localization signals in the gut-enriched Kruppel-like factor define a subfamily of closely related Kruppel proteins. J Biol Chem 1997; 272(29): 18504-18507.

148 Shields JM, Yang VW. Identification of the DNA sequence that interacts with the gut-enriched Kruppel-like factor. Nucleic Acids Res 1998; 26(3): 796-802.

149 Skov KA. The contribution of hydroxyl radical to radiosensitization: a study of DNA damage. Radiat Res 1984; 99(3): 502-510.

150 Solzbach U, Hornig B, Jeserich M, Just H. Vitamin C improves endothelial dysfunction of epicardial coronary arteries in hypertensive patients. Circulation 1997; 96(5): 1513-1519.

151 Speir E, Shibutani T, Yu ZX, Ferrans V, Epstein SE. Role of reactive oxygen intermediates in cytomegalovirus gene expression and in the response of human smooth muscle cells to viral infection. Circ Res 1996; 79(6): 1143-1152.

152 Stadtman ER. Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. Free Radic Biol Med 1990; 9(4): 315-325.

153 Stanojevic D, Hoey T, Levine M. Sequence-specific DNA-binding activities of the gap proteins encoded by hunchback and Kruppel in Drosophila. Nature 1989; 341(6240): 331-335.

154 Stryer L. Biochemie. 5 ed. 1991.

155 Sukhatme VP, Cao XM, Chang LC, Tsai-Morris CH, Stamenkovich D, Ferreira PC, Cohen DR, Edwards SA, Shows TB, Curran T. A zinc finger-encoding gene coregulated with c-fos during growth and differentiation, and after cellular depolarization. Cell 1988; 53(1): 37-43.

156 Suzuki YJ, Ford GD. Redox regulation of signal transduction in cardiac and smooth muscle. J Mol Cell Cardiol 1999; 31(2): 345-353.

157 Suzuki YJ, Forman HJ, Sevanian A. Oxidants as stimulators of signal transduction. Free Radic Biol Med 1997; 22(1-2): 269-285.

158 Tanner FC, Noll G, Boulanger CM, Luscher TF. Oxidized low density lipoproteins inhibit relaxations of porcine coronary arteries. Role of scavenger receptor and endothelium-derived nitric oxide. Circulation 1991; 83(6): 2012-2020.

159 Ting HH, Timimi FK, Boles KS, Creager SJ, Ganz P, Creager MA. Vitamin C improves endothelium-dependent vasodilation in patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. J Clin Invest 1996; 97(1): 22-28.

160 Toyoshima H, Hunter T. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. Cell 1994; 78(1): 67-74.

161 Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martasek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, Tordo P, Pritchard KA, Jr. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. Proc Natl Acad Sci U S A 1998; 95(16): 9220-9225.

162 Wadhwa R, Duncan E, Kaul SC, Reddel RR. An effective elimination of false positives isolated from differential display of mRNAs. Mol Biotechnol 1996; 6(2): 213-217.

163 Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. Cell 1995; 81(3): 323-330.

164 Winquist RJ, Bunting PB, Baskin EP, Wallace AA. Decreased endothelium-dependent relaxation in New Zealand genetic hypertensive rats. J Hypertens 1984; 2(5): 541-545.

165 Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. Nature 1993; 366(6456): 701-704.

166 Xiong Y, Zhang H, Beach D. Subunit rearrangement of the cyclin-dependent kinases is associated with cellular transformation. Genes Dev 1993; 7(8): 1572-1583.

167 Yeh K, Lim RW. Genomic organization and promoter analysis of the murine Id3 gene. Gene 2000; 254(1-2): 163-171.

168 Zafari AM, Ushio-Fukai M, Akers M, Yin Q, Shah A, Harrison DG, Taylor WR, Griendling KK. Role of NADH/NADPH oxidase-derived H2O2 in angiotensin II-induced vascular hypertrophy. Hypertension 1998; 32(3): 488-495.

169 Zhan Q, Carrier F, Fornace AJ, Jr. Induction of cellular p53 activity by DNA-damaging agents and growth arrest [published erratum appears in Mol Cell Biol 1993 Sep;13(9):5928]. Mol Cell Biol 1993; 13(7): 4242-4250.

170 Zhang W, Geiman DE, Shields JM, Dang DT, Mahatan CS, Kaestner KH, Biggs JR, Kraft AS, Yang VW. The gut-enriched Kruppel-like factor (Kruppel-like factor 4) mediates the transactivating effect of p53 on the p21WAF1/Cip1 promoter. J Biol Chem 2000; 275(24): 18391-18398.

171 Zhang W, Shields JM, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y, Yang VW. The gut-enriched Kruppel-like factor suppresses the activity of the CYP1A1 promoter in an Sp1-dependent fashion. J Biol Chem 1998; 273(28): 17917-17925.

172 Zhao S, Ooi SL, Pardee AB. New primer strategy improves precision of differential display. Biotechniques 1995; 18(5): 842-6, 848, 850.

Anhang

Übersicht über die Differential Display-Klone

Aufgeführt sind die Klone, die in der Reamplifikation wiedergewonnen werden konnten, die Bezeichnung ergibt sich aus der verwendeten Primerkombination: A59.3 bedeutet z.B. Primerkombination H-T_{11}A und AP 59, Klon Nr. 3.

Bezeichnung (Größe)	**Ergebnis Sequenzierung**	**Differentielle Expression**
A59.4 (255 bp)	unbekannt	nein (RT-PCR)
A59.5 (249 bp)	16 S rRNA, tRNA Leu, Val (Accession V00681)	nein (RT-PCR)
C59.1 (557 bp)	Unbekannt	nein (RT-PCR)
C59.2 (449 bp)	94% von 423 bp Homologie zu: Ribonucleoprotein F	nein (RT-PCR)
C59.4 (180 bp)	16 S rRNA, tRNA Leu, Val	siehe A59.5
C59.5 (159 bp)	16 S rRNA, tRNA Leu, Val	siehe A59.5
A60.1 (190 bp)	16 S rRNA, tRNA Leu, Val	siehe A59.5
G60.1 (333 bp)	16 S rRNA, tRNA Leu, Val	siehe A59.5
G60.2 (331 bp)	Unbekannt	nein (RT-PCR)
A63.1 (242 bp)	HSP 70 (Accession S83268)	unklar
G63.1 (270 bp)	Unbekannt	nein (RT-PCR)
G63.2 (258 bp)	Id3 (Accession M60523)	**ja** (RT-PCR, Northern Blot)
A64.1 (193 bp)	Unbekannt	nein (RT-PCR)
A66.3 (218 bp)	91% von 178 bp Homologie zur Arachidonate-8S-lipoxygenase (Accession Y14696)	nein (RT-PCR)
C66.1 (194 bp)	FSH-regulated Protein (Accession L26292) (GKLF)	**ja** (RT-PCR, Northern Blot)

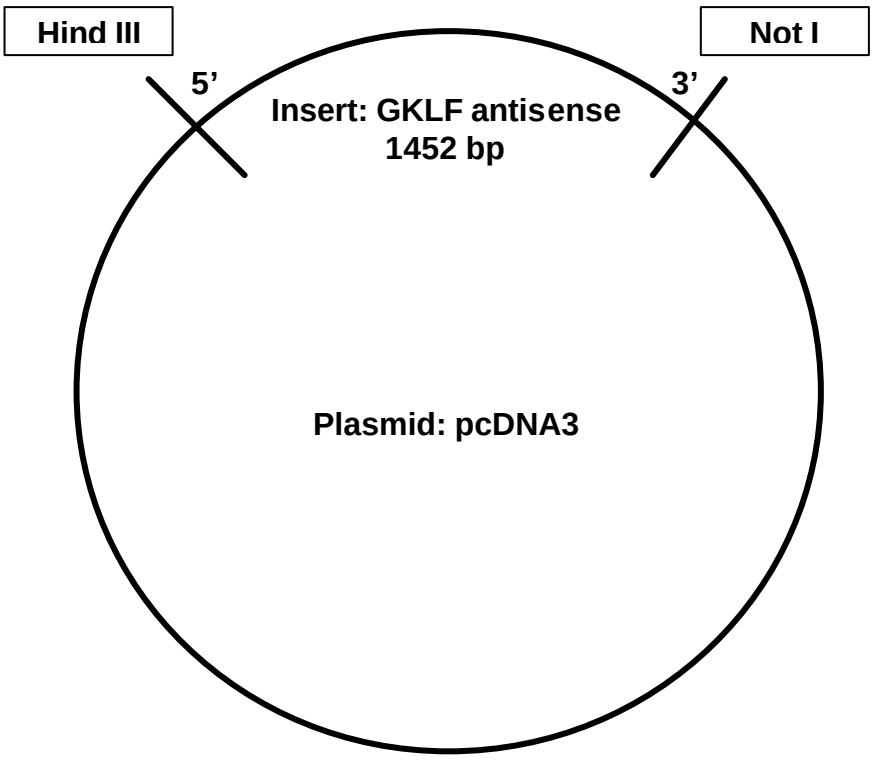
A69.1 (318 bp)	Unbekannt	nein (RT-PCR)
A69.2 (200 bp), entspr. G69.3	Unbekannt	nein (RT-PCR)
C69.1 (362 bp)	16 S rRNA, tRNA Leu, Val	siehe A59.5
C69.2 (211 bp)	16 S rRNA, tRNA Leu, Val	siehe A59.5
C69.3 (207 bp)	16 S rRNA, tRNA Leu, Val	siehe A59.5
C69.4 (180 bp)	16 S rRNA, tRNA Leu, Val	siehe A59.5
C69.6 (162 bp)	16 S rRNA, tRNA Leu, Val	siehe A59.5
G69.1 (463 bp)	16 S rRNA, tRNA Leu, Val	siehe A59.5
G69.2 (526 bp)	16 S rRNA, tRNA Leu, Val	siehe A59.5
G69.3 (196 bp), entspr. A69.2	Unbekannt	siehe A69.2

Weitere Oligonukleotide

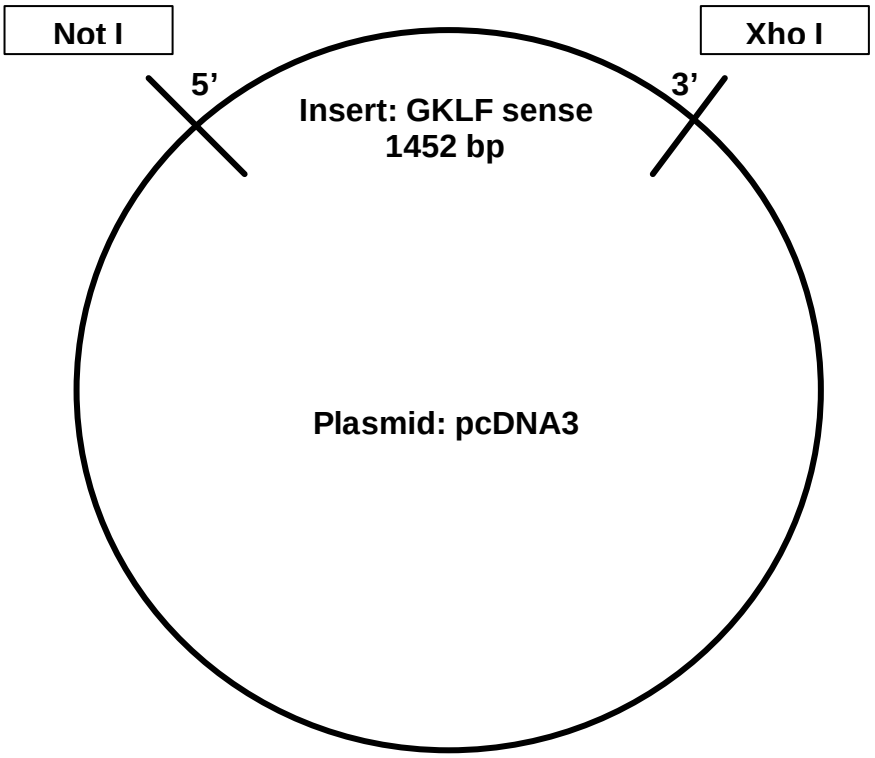
Die folgenden Oligonukleotid-Primer wurden zur Überprüfung der differentiellen Expression weiterer im Differential Display isolierter Klone in der RT-PCR verwendet:

A59.4 5’	5’-ATATCAGACGTAAGAGACATG-3’
A59.4 3’	5’-CCAGGTTTATTTCATACAATG-3’
A59.5 5’	5’-GCCTGCCCAGTGACTAAAGTT-3’
A59.5 3’	5’-GGGTCTTCTCGTCTTATTGGG-3’
C59.1 5’	5’-AGAGATTAGCCTCTCTGCCTC-3’
C59.1 3’	5’-CCCAGAAGTAAAAGTGCTGCC-3’
RNP F 5’	5’-CATGATGGGGTCGCAGGTGTT-3’
RNP F 3’	5’-TCATCCTATCCAGGCCTGCCT-3’
HSP70 5’	5’-GTGGCCTTCACCGACACCGAG-3’
HSP70 3’	5’-CGCCGTGGCCTTCACCTCGAA-3’
G63.1 5’	5’-GCCTGAAACATAGTACTACAG-3’
G63.1 3’	5’-TTTTATGATCATGGTCAGACC-3’
A64.1 5’	5’-GCAGTTTGTGTGCATGTAAAT-3’
A64.1 3’	5’-TCTTTATTGAACCAGGAGAAG-3’
A66.3 5’	5’-TGGCAAAGAGGTTAAGAGCAC-3’
A66.3 3’	5’-TGTATGTAAACACACTGTCGC-3’
Lipox 5’	5’-CCTGTGTGACATATAGAACTC-3’
Lipox 3’	5’-TGGACAAATTCCTGTGTTCCT-3’
C66.1 5’	5’-ACAAATGTGGGTGTCTATATT-3’
C66.1 3’	5’-GTGGGATTCAGAGCATATTTC-3’
A69.2 5’	5’-CCTGGGGTTGACAAGCGAGTC-3’
A69.2 3’	5’-GATAGCAGTTGGAGAGATTTCAGTC-3’

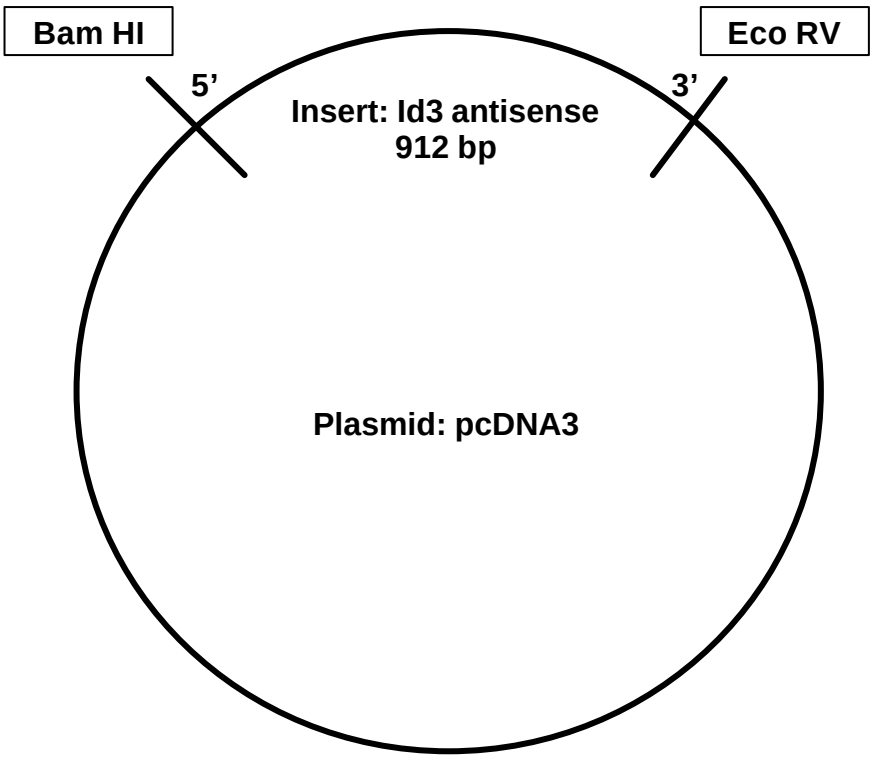
Plasmidkarten der Konstrukte für die transiente Transfektion



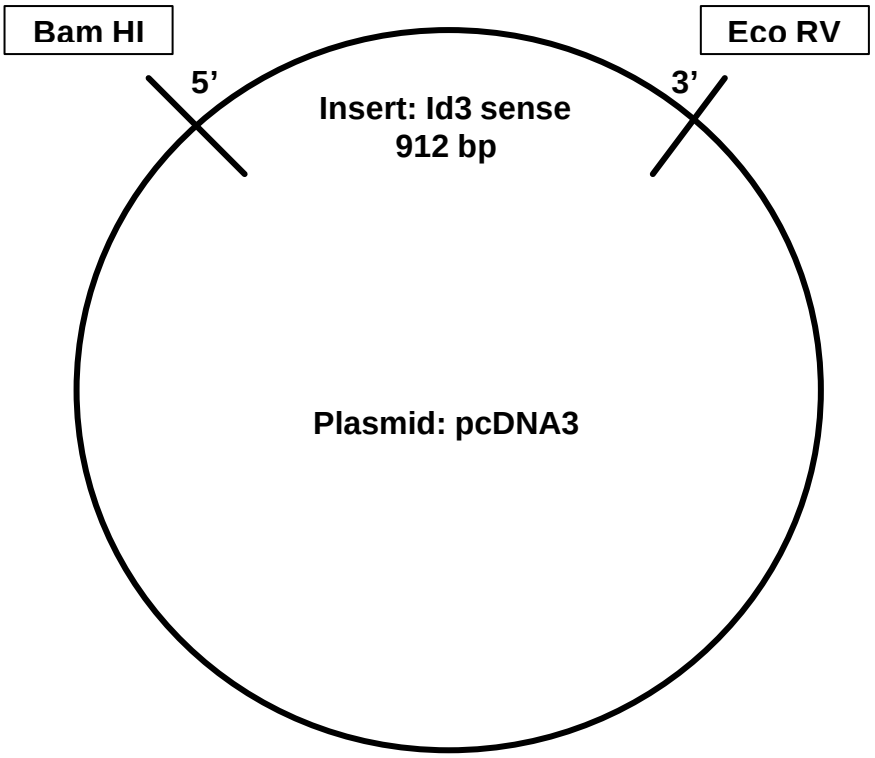

```
34_417.Seq  LENGTH: 1072  Mon, 20. Mär 2000 11:24 Uhr  CHECK: 5888  ..
     1  GNGTGANACC  CANGCTTGGT  ACCGAGCTCG  GATCCCTAGT  AACGGCCGCC
    51  AGTGTGCTGG  AATTCGGCTT  TTAAAAGTGC  CTCTTCATGT  GTAAGGCAAG
   101  GTGGTCCGAC  CTGGAAAAGG  CCCTGTCGCA  CTTCTGGCAC  TGAAAGGGCC
   151  GGTGCCCGGT  GTGTTTGCGG  TAGTGCCTGG  TCAGTTCATC  TGAGCGGGCG
   201  AATTTCCACC  CACAGCCGTC  CCAGTCACAG  TGGTAAGGTT  TCTCGCCTGT
   251  GTGAGTTCGC  AGGTGTGCCT  TGAGATGAGA  ACTCTTCGTA  TAGGTTTTGC
   301  CACAGCCTGC  ATAGTCACAA  GTGTGGGTGG  CTGTTCTTTT  CCGGAGCCAA
   351  GACCTTCTTC  CCCTCTTTGG  CTTGGGCTCC  TCTGGCAGGC  AGGATCCCGG
   401  TGGCATGAGC  TCTTGATAAT  GGAGAGAGGG  GACTTGCGAC  TGCATCTGGT
   451  CTGGCAGGAA  AGGAGGGTAG  CTGGGCCCCG  GATGGGGATG  GAATCCTGGG
   501  GGAAGAGGCA  GGCCNNGGTG  ACAGTCCCTG  CTGTTCAGCA  ATTTCCTCNG
   551  GACTCAATTG  TAAGGGGTAG  TCTGGTGGGG  GAAGCTTGCC  CGCCCCANGG
   601  GGAAGTCTTG  TGTGTTGGGC  CTNTGGCCGT  TGNTGANCCT  GGGGTCCNAG
   651  CGCTNNAAGT  GGGGCCTNTA  GGGACCGGCT  TAACCGTGCC  ANGAACGGGA
   701  ACGGGNCTCT  TGCTTAAATT  TTNGNGCACA  TACGCCNGGC  NGGNCCCACC
   751  CNCTTGTTAA  GGGGCGCCCA  CCTACCCACC  AAGGGNTGGC  CTGGCCCGTC
   801  TTGGGGGCTT  TTCTTTTTNG  CTAAACCACC  TGGNTGAACC  CNAAAGGGGN
   851  TTGGGTGTAC  TTCNTTTNTC  CAAGGNGGTG  CCTCAANAAG  ACCCCTTTTN
   901  ANNNTACAAA  ACTTTGGCCC  CANTTNANTC  CCCCNCNNCC  TTTNTCNGGC
   951  TTTAAGCTTT  TCTTTTGGGC  NGNAAATTTT  ATTTCNTGGG  TTCCCAAAAT
  1001  TNCCCGGGTC  NNCAGGGAAC  CTTNNTNNCC  CCTTAAANCC  NCCCCCCTAN
  1051  NGGGGCTTTN  CCNTTTTTTT  CT
```




```
11_452.Seq  LENGTH: 1032  Die, 6. Jun 2000 9:50 Uhr  CHECK: 3670  ..
     1  TTGANNCCCT  NGCTTGGTAC  CGAGCTCGGA  TCCACTAGTA  ACGGCCGCCA
    51  GTGTGCTGGA  ATTCTGCAGA  TATCCATCAC  ACTGGCGGCC  GCCAGTGTGA
   101  TGGATATNTG  CAGAATTCGG  CTTATGAGGC  AGCCACCTGG  CGAGTCTGAC
   151  ATGGCTGTCA  GCGACGCTCT  GCTCCCGTCC  TTCTCCACGT  TCGCGTCCGG
   201  CCCGGCGGGA  AGGGAGAAGA  CACTGCGTCC  AGCAGGTGCC  CCGACTAACC
   251  GTTGGCGAGA  GGAACTCTCT  CACATGAAGC  GACTTCCCCC  ACTTCCCGGC
   301  CGCCCCTACG  ACCTGGCGGC  GACGGTGGCC  ACAGACCTGG  AAAGTGGTGG
   351  AGCTGGTGCA  GCTTGCAGCA  GTAACAACCC  GGCCCTACCC  CGGAGGGAGA
   401  CCGAGGAGTT  CAACGATCTC  CTGGACCTAG  ACTTTATCCT  TTCCAACTTC
   451  GCTATCCCCA  CCANGAATCG  GTGGCCGCCA  CCGTGACCAC  CTCGGCGTCA
   501  GCTTTATCCT  TCGTCTTNCC  CAGCTAGCAG  CGGCCCTNCC  AGCGCGCCCT
   551  NCACCTTGCA  GCTTCAGCTA  TCCGATCCGG  GCCGGGGGTG  ACCCGGNCGT
   601  GGCTGCGGGC  AACACAGGTG  GGAGGGCTTC  CTNTACNANC  CGAATAATTN
   651  TGCCGCCACC  TTCCACNGGT  CCTCTTTCAA  NCCTGGGCNG  GACCTTCAAA
   701  TNAACCGTTG  AAGCCCCCTT  NGGGGCGGNT  TTCGTNGGCC  TTNANCCTTT
   751  CTTGCCGGCC  CCGGANNTTG  GGANCCCCAN  TTATTAACAT  TTCCGTTCAC
   801  CAAATATNNC  CTTTNATNCC  GCCNAANNTN  GNCGGGGCCT  TGNATGGGNC
   851  CAAATNTTTT  TTTCTTNAAA  GGNCNTTNTT  TTTTAANNAC  CCCCTNGGTT
   901  TNTCNNGATT  TCCCNCAAGC  CCCNTTNNGG  GTCAATTCAA  NTNNTTATGC
   951  TNAAAGGGAA  AAGCCCNNTT  ACCGGTTANC  CCNAACCCTG  TTTGGTANTT
  1001  TGGGCCCCNC  CTNNCAANAG  GTGGGCCCCC  CT
```




```
26_364.Seq  LENGTH: 1315  Mon, 22. Nov 1999 12:11 Uhr  CHECK: 6663
     1  NNNCCAAGCT  TGGTACCGAG  CTCGGATCCC  TAGTAACGGC  CGCCAGTGTG
    51  CTGGAATTCG  GCTTGTTCAA  AAATGGTTTA  TTATGCAAAA  TGTTAACTTT
   101  TATAAAAAGT  TTAATATACA  TCACATGGTT  ACAGAAAGTC  ACCTTCCTGT
   151  AAAAAAAAGG  TACAAAAGCT  ATATACTCTA  TTATAGAGTT  CATAATCAGG
   201  GCAACAGAGC  TTTTCTCCAA  GGAAACCAGA  AGACCAGCTC  TTATGCTGCC
   251  TTGGCAGTGT  GTGCAGGGCA  GCCACTCGTG  TACCCCCCAC  ACCCTTCTCG
   301  ACACCCCATT  TTCGGAAAAA  AGCCAGTCTT  TTTAAGACTT  GAGTCAGGGT
   351  GGGGACAGAG  TGACGTTGCC  CAGCTGCTGA  CCAGCGAGTG  CTAGCTAGCT
   401  CTTCAGGCCA  CCCAAGTTCA  GTCCTTCGCT  CTCGGGCTCC  AGGTCCAGCC
   451  TCGAGGCATG  AGTTCAGGGT  AAATGAAGAG  GGCTGTGGCA  AGATCGAACT
   501  CATCCATGCC  CCTCAGGCTT  CCGGCTGGAG  AGAGGGTCCC  AGAGTCCCAG
   551  GGTCCCAAGC  GGAACGGGCG  CCAGCACCTG  CGTTCGGGAG  GTGCCAGGAC
   601  GACCGGGTCA  GTGGCAAAAA  CTCCTCTTGT  CCTTGGAGAT  CACAAGTTCC
   651  GGAGTGAGCT  CAGCTGTCTG  GATCGGGAGA  TGCGGACCAT  CCGGGGGTNC
   701  AGGCGCGGGC  TCTGCCAGAA  CCGTTGAAGG  TCGAGGATGT  AGTCTCTGAC
   751  ACGCTGCAGG  ATTTNCACCT  GGCTAAGCTG  AGTGCCCNGC  GGGACTTCCG
   801  GCACCAGTTN  CCGCAGGCGC  NAGTAGCAGN  GGTTCATGNC  GTCCAAGANG
   851  CTAAGTGGCT  TCTCCGCCGA  CGGGCTNTTA  CCCCNGGCTG  CGCAATGGCT
   901  AGGGTACGTT  CCGACAGGCA  GCCACCCGCT  TNTACAAGCC  GCCCCCCGGC
  1001  CATTGGGGCG  TCAGCATGCN  TTTAANGGCC  TTTNTTTGNG  CNCNTAAGCA
  1051  AACTCNTGAC  ACCTTACTGN  CCTTTATNCA  CCNTTGTNGT  GCCCTCCCGC
  1101  TNCTTACCGG  AGGGCCTGGN  TGGCCTTTNT  AAAANNATGC  NCTTTCNGGN
  1151  GGGTNTTNTT  TTGGGGGGGN  GGGNANACAG  GGGGNGGGNA  ANNAACCNTT
  1201  TNNNNNGGGG  TTNNTTNGGG  ANANCTTGGG  TTNGGGTCCC  CCCTNGNCTT
  1251  AACNGGGGGT  NCCCNCCTCC  TCCCCTNCCC  CTTTTTTTTT  TTCNTNNNNT
  1301  TCCAATANGG  TTTTT
```




```
23_404.Seq  LENGTH: 992  Mit, 23. Feb 2000 11:57 Uhr  CHECK: 1835  ..
     1  NCCAAGCTTG  GTACCGAGCT  CGGATCCACT  AGTAACGGCC  GCCAGTGTGC
    51  TGGAATTCGG  CTTCTCCAAC  CTCCAACATG  AAGGCGCTGA  GCCCGGTGCG
   101  CGGCTGCTAC  GAGGCGGTGT  GCTGCCTGTC  GGAACGTAGC  CTAGCCATTG
   151  CGCGAGGCCG  GGGTAAGAGC  CCGTCGGCGG  AGGAGCCGCT  TAGCCTCTTG
   201  GACGACATGA  ACCACTGCTA  CTCGCGCCTG  CGGGAACTGG  TGCCGGGAGT
   251  CCCGCGGGGC  ACTCAGCTTA  GCCAGGTGGG  AATCCTGCAG  CGTGTCATAG
   301  ACTACATCCT  NGACCTTCAA  GTGGTTCTGG  CAGAGCCCGC  GCCTGGACCC
   351  CCGGATGGTC  CGCATCTCCC  GATCCAGACA  GCTGAGCTCA  CTCCGGAACT
   401  TGTGATCTCC  AAGGACAAGA  GGAGTTTTTG  CCACTGACCC  GGTCGTCCTG
   451  GCACCTCCCG  AACGCAGGTG  CTGGCGCCCG  TTCCGCTTGG  GACCCTGGGA
   501  CTCTGGGACC  CTCTCTCCAG  CCGGAAGCCT  GAGGGGCATG  GATGAGCTTN
   551  GATCTTGCCA  CAGCCCTCTT  CATTTTACCC  TGAACTCATG  CCTTNGAGGC
   601  TGGACCTGGA  GCCCGAGAGC  GAAGGACTGA  ACTTGGGTGG  CCTTGAANAG
   651  CTAGCTAGCA  ACTTCNCTTG  GTCAANAAGC  TTGGGCCAAC  GTCACTTNTG
   701  TNCCCCACCC  TTGAACTTCA  AAGGTNTTTN  AAAAAAGNAC  TTGGGCTTTT
   751  TTTTTCCCGN  AAAAAATGGG  GGNTTNCCCN  NAATAAAAGG  GGTTNTTGGG
   801  GGGGGGGTAA  CCACCGAAGT  NGGGCTTGNT  CCNTTNCAAC  CACAACTTGC
   851  TCAAAANGGT  CAATCTNTTA  AANGAAACCT  TGGGGTCTAT  TCTTGGGGTT
   901  TTCNCTTTTG  GGAAAAAAAA  ANCCTTCTGG  TTTGGNCCNN  TTGATTTTAT
   951  TGNAAAACTT  CTTNTTTAAA  TTAAGAANNG  TCTTTTTNGG  NC
```

Sequenz des humanen Id3-Promotors

```
LOCUS       HS1D3HLH     2481 bp    DNA             PRI       21-APR-1995
DEFINITION  H.sapiens Id3 gene for HLH type transcription factor.
ACCESSION   X73428
VERSION     X73428.1  GI:313212
KEYWORDS    early response gene; transcriptional factor.
SOURCE      human.
  ORGANISM  Homo sapiens
                    Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Eu-
        teleostomi;
            Mammalia; Eutheria; Primates; Catarrhini; Hominidae; Homo.
REFERENCE   1  (bases 1 to 2481)
  AUTHORS   Deed,R.W., Hirose,T., Mitchell,E.L., Santibanez-Koref,M.F. and
            Norton,J.D.
  TITLE     Structural organisation and chromosomal mapping of the human
Id-3
            gene
  JOURNAL   Gene 151 (1-2), 309-314 (1994)
  MEDLINE   95129881
REFERENCE   2  (bases 1 to 2481)
  AUTHORS   Deed,R.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (18-JUN-1993) R. Deed, Paterson Institute for Cancer
            Research, Dept of Gene Regulation, Christie Hospital NHS Trust,
            Wilmslow Road, Manchester, M20 9BX, UK
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..2481
                     /organism="Homo sapiens"
                     /db_xref="taxon:9606"
                     /chromosome="1"
                     /map="1q36.1"
                     /clone="cos 5 Hind III fragment"
                     /cell_type="lymphocytes"
                     /tissue_type="peripheral blood"
                     /clone_lib="pcos2embl"
                     /germline
     variation       584
                     /note="g/a polymorphism"
     TATA_signal     636..640
     exon            665..1038
                     /number=1
                     /evidence=experimental
     gene            join(739..1038,1146..1205)
                     /gene="Id3"
     CDS             join(739..1038,1146..1205)
                     /gene="Id3"
                     /codon_start=1
                     /evidence=experimental
                     /protein_id="CAA51827.1"
                     /db_xref="GI:313213"
                     /db_xref="SWISS-PROT:Q02535"

/translation="MKALSPVRGCYEAVCCLSERSLAIARGRGKGPAAEEPLSLLDDM
                     NHCYSRLRELVPGVPRGTQLSQVEILQRVIDYILDLQVVLAEPAPGPPDG-
PHLPIQTA
                     ELAPELVISNDKRSFCH"
     intron          1039..1145
                     /gene="Id3"
                     /number=1
```

```
     exon            1146..1219
                     /number=2
                     /evidence=experimental
     intron          1220..1739
                     /number=2
     exon            1740..2190
                     /number=3
                     /evidence=experimental
     misc_feature    2123..2129
                     /note="immediate early motif"
     polyA_signal    2173..2178
BASE COUNT      521 a    662 c    699 g    599 t
ORIGIN
        1 agctttcttc ttttccctgt tgctcaaata aatagtgttc tttgctcaaa cccccttccc
       61 ctcctccttc tgcaatctca gcgcctagcg aaatctgttt tcttcattgt aacctcagct
      121 tcaccgcaat taattttttt tccctctggt cacaagataa ttcctgacgc cagtgagtct
      181 ggaggtcaga cgaacagcaa attggggaac aaggcggcac taattcctta caagttcctt
      241 gaaaaatctt tcgcttaaaa aaaacggggg gtgggggggag cttctttgct gttcagggat
      301 ttatgcctcg cggagctgtg gctcgaacca gtgttggcta aggcggactg gcaggggcag
      361 ggaagctcaa agatctgggg tgctgccagg aaaaagcaaa ttctggaagt taatggtttt
      421 gagtgatttt taaatccttg ctggcggaga ggcccgcctc tccccggtat cagcgcttcc
      481 tcattctttg aatccgcggc tccgcggtct tcggcgtcag accagccgga ggaagcctgt
      541 ttgcaattta agcgggctgt gaacgcccag ggccggcggg ggcagggccg aggcgggcca
      601 ttttgaataa agaggcgtgc cttccaggca ggctctataa gtgaccgccg cggcgagcgt
      661 gcgcgcgttg caggtcactg tagcggactt cttttggttt tctttctctt tggggcacct
      721 ctggactcac tccccagcat gaaggcgctg agcccggtgc gcggctgcta cgaggcggtg
      781 tgctgcctgt cggaacgcag tctggccatc gcccggggcc gagggaaggg cccggcagct
      841 gaggagccgc tgagcttgct ggacgacatg aaccactgct actcccgcct gcgggaactg
      901 gtacccggag tcccgagagg cactcagctt agccaggtgg aaatcctaca gcgcgtcatc
      961 gactacattc tcgacctgca ggtagtcctg gccgagccag cccctggacc ccctgatggc
     1021 ccccaccttc ccatccaggt aagcctcgaa gtcgggacag ggctgaacac ccaggcaagg
     1081 atgctgcggg accctcggag ctcccgattg cctcgcgtaa ctcttccctc ttttcctcta
     1141 atcagacagc cgagctcgct ccggaacttg tcatctccaa cgacaaaagg agcttttgcc
     1201 actgactcgg ccgtgtcctg acacctccag gtgagtatct cctctcttgg agagggaggt
     1261 ttaaacggca agtcctggag ttggcagacg ttttgaaaaa ttgccactca ctcggtttag
     1321 ggaaactgag gccagagagg gacaagtgac ttgcccatgg ttgcatcaaa tgaatggcag
     1381 agtcagtttc catgtgatgt gcatttaagc cttaatgcgc ctggccctgc ctccgcagtg
     1441 gccgaggtct ggcaagtaga catggtccga ctaaatacaa gtctttctgt tccatgttgt
     1501 ataggagctg tcttcggcag ccccctccca gctagtgtca attccaagta ggaggggtag
     1561 cgcaacgtcc gcctgtggtc tttggcgcca actgggtggg ggcagcgtgg ggggcggagt
     1621 tatcaggctg gaggtacaga ccaagtttcc tccctggcgc cggccagtct gcggacggcc
     1681 cccgcctcgg cacgctcggc ggaaactgac tgctccttgg tcttctttcc tcccccgccc
     1741 agaacgcagg tgctggcgcc cgttctgcct gggaccccgg gaacctctcc tgccggaagc
     1801 cggacggcag ggatgggccc caacttcgcc ctgcccactt gacttcacca aatcccttcc
     1861 tggagactaa acctggtgct caggagcgaa ggactgtgaa cttgtggcct gaagagccag
     1921 agctagctct ggccaccagc tgggcgacgt caccctgctc ccaccccacc cccaagttct
     1981 aaggtctttt cagagcgtgg aggtgtggaa ggagtggctg ctctccaaac tatgccaagg
     2041 cggcggcaga gctggtcttc tggtctcctt ggagaaaggt tctgttgccc tgatttatga
     2101 actctataat agagtatata ggttttgtac ctttttaca ggaaggtgac tttctgtaac
     2161 aatgcgatgt atattaaact ttttataaaa gttaacattt tgcataataa acgattttta
     2221 aacacttgtg tatatgatga cacccgtctc cattaagtac taatgatgct ttctcgcaca
     2281 tggccgaatt ttgggagctt tgggaaagtg aacttgctta ttctacgaga gggaaatgaa
     2341 aaactgcctg gttgagaggg gatggggtgg agagagaagg gttcatgatg ggagtctcat
     2401 gtccattgag ggatgggtgc agagaaaagt tctggctctg cctcattatt tcagagatga
     2461 aaccagagac tggtgcaagc t
```

Fett gedruckt: Konsensussequenzen für GKLF-Bindung an 377, 612 und 741
Sp1-Bindungsstelle an 585

Sequenz des murinen p53-Promotors

```
LOCUS       AF287146     1929 bp    DNA             ROD       01-AUG-2000
DEFINITION  Mus musculus p53 tumor suppressor gene, promoter and exon 1.
ACCESSION   AF287146
VERSION     AF287146.1  GI:9624489
KEYWORDS    .
SOURCE      house mouse.
  ORGANISM  Mus musculus
            Eukaryota; Metazoa; Chordata; Craniata; Vertebrata; Euteleo-
stomi; Mammalia; Eutheria; Rodentia; Sciurognathi; Muridae; Murinae; Mus.
REFERENCE   1  (bases 1 to 1929)
  AUTHORS   Reisman,D., Eaton,E., Doudican,N. and McMillin,D.
  TITLE     Cloining of murine p53 upstream sequences reveals additional
            positive transcriptional regulatory elements
  JOURNAL   Unpublished
REFERENCE   2  (bases 1 to 1929)
  AUTHORS   Reisman,D. and Doudican,N.
  TITLE     Direct Submission
  JOURNAL   Submitted (13-JUL-2000) Biological Sciences, University of
SouthCarolina, 401 CLS, Columbia, SC 29208, USA
FEATURES             Location/Qualifiers
     source          1..1929
                     /organism="Mus musculus"
                     /strain="C57/BL"
                     /db_xref="taxon:10090"
                     /chromosome="11"
     mRNA            1584..>1799
                     /product="p53 tumor suppressor"
     exon            1584..1799
                     /number=1
BASE COUNT      443 a    528 c    482 g    476 t
ORIGIN
        1 ttctcctgac tccaactcgg ggagattcgt ttcttctccg gggaagactc gcatgttcag
       61 aaacatcttg ctcctggatc ccaggactca actcacgtgg aagtattaaa ttctactccc
      121 agaggtacag agtccccctg ttgaagctcc tgggacacaa ccaagctagc cacgggatct
      181 gtggctagct ggggttggtc atcaccaccg catggcggag gcaccggttc aaagtctgta
      241 tttttctccg ctggggaacc ttggggtacc ggagctgggc ccaggtcagg agggaggcta
      301 tccggagcta agagtcgctc ctccgacgtt ttcattctgt agagtaagcc cccggaaggc
      361 agaggtcggg caagtctcgc tgagccggct accagctgcc gaggctagag tgcattaccg
      421 ttcccaggga tgctcagaga ccggagtccg ctttcctctt ccggaaaatg taagccgaac
      481 ctaaagcaat caccagggaa cgagtgtcca aagccaaggc ctagggtcgc tagcgccgcc
      541 agggcttctt gtctcgcggg agtcgggcca ccttccgata ggctctccgg catcctcctc
      601 cgattccgag cgggaaggcg ggaaggaacg actttgccta cacctcaagc gctggagaat
      661 tcctagaggt ttctgggagt tgtagtctga actctgggcc ttggcgaaaa ctacacggag
      721 cgccccctac cgtcccctgg gggtaattct taaagcgcct atcctccctg gcctgcagag
      781 ggcgcataat ttctacagtt tttgcccctc ttgactatct tgttttgaat cccggtaacc
      841 tcaggtttcc tttctcccca tctctccccc cttcttgttc ctctctttcc ctttctcccc
      901 cgccctccct tcattcattc gacatttatt atcaagttct tactgcctaa cccaggacta
      961 tacaaggcat tgggaaaaaa atagcaatgt tttctagttc ttaatctcca taaagttttc
     1021 ggttgctgtg caattaaagg ctgtgaaaac agtctttaca gagagtgata aggactgtac
     1081 aggaaattaa acacggtggt gcgataccaa gtatctcgga gaacacgtta gattgagata
     1141 ctatgaaaag cctttctaaa gtgacatttt agctaatgag gggaaaaaga acttaggggc
     1201 ccgtgttggt tcatccctgt acttggaagg cctaaagcag gaagacgccg cgaattccag
     1261 gccagccttg gctacaaaga ctctgtctta aaaatccaaa aagatggcta tgactatcta
     1321 gctggatagg aaagagcaca gagctcagaa cagtggcggt ccacttacga taaaaactta
     1381 attctttcca ctctttatac ttgacacaga ggcaggagcc ctccgaatcg gtttccaccc
     1441 attttgccct cacagctcta tatcttagac gacttttcac aaagcgttcc tgctgagggc
     1501 aacatctcag cgagaatcct gactctgcaa gtccccgcct ccaatttctt gccctcaacc
     1561 cacggaagga cttgccctta cttgttatgg cgactatcca gctttgtgcc aggagtctcg
     1621 cgggggttgc tgggattggg actttcccct cccacgtgct caccctggct aaagttctgt
```

```
1681 agcttcagtt cattgggacc atcctggctg taggtagcga ctacagttag ggggcaccta
1741 gcattcaggc cctcatcctc ctccttccca gcagggtgtc acgcttctcc gaagactggg
1801 taagtaattg atgagcgtga cgagacctct cggtcactgg ctctctccgt ttgcatccat
1861 aaaactagag aaaaccgtgg gggccggggg taaaacagtg gggggactca gcgcgacgaa
1921 gatgggcgg
```

Fett gedruckt: Konsensussequenz für GKLF-Bindung an 787

Sp1-Bindungsstelle an 617

Accession-Nummern in BLAST

Mouse helix-loop-helix protein (Id related) mRNA	Accession ID M60523
Rat mRNA for Id3 protein, complete cds.	Accession ID D10864
Rattus norvegicus FSH-regulated protein mRNA	Accession ID L26292
Rattus norvegicus Gut-enriched Krüppel-like Factor mRNA	Accession ID U20344
H.sapiens Id3 gene for HLH type transcription factor	Accession ID X73428

Erklärung:

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; daß sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Frau Prof. S. Korsching betreut worden.

Teilpublikationen:

S. Baudler, H. Welzel, G. Nickenig

Einfluss von freien Radikalen auf die Expression von Inhibitor of DNA-binding(ID)-Proteinen in glatten Muskelzellen. (2000)

66. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim, Gefäße, experimentell, P579

S. Baudler, H. Welzel, M. Böhm, G. Nickenig

Effect of reactive oxygen species on the expression of the mRNAs of “Inhibitor of DNA-binding 3" (Id3) and “Gut-enriched Kruppel-like Faktor" (GKLF), and growth of vascular smooth muscle cells. (2000)

XXII ESC Annual Congress**,** Amsterdam, Growth factors and proliferation: cell signalling and transcription factors in atherosclerosis, P3485

G. Nickenig, S. Baudler, H. Welzel, M. Boehm

Identification of Two Novel Redox-Sensitive Genes in Vascular Smooth Muscle Cells: The Inhibitor of DNA-Binding 3 (Id3) And The Gut-Enriched Krüppel-Like Factor (GKLF)

Circ 2000, Suppl 102(18), p.II-18

Wirkungen reaktiver Sauerstoffspezies: Charakterisierung zweier ROS-sensitiver Gene und ihre Rolle bei der Kontrolle des zellulären Wachstums

Zusammenfassung:

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wie Superoxid ($O_2^{\bullet -}$), Wasserstoffperoxid und das Hydroxylradikal ($OH^{\bullet}$) spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese von endothelialer Dysfunktion und Arteriosklerose. Die hier beschriebenen Versuche zeigen, daß $O_2^{\bullet -}$ in kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) als Mitogen wirkt, wogegen $OH^{\bullet}$ zu einem Wachstumsarrest führt. Durch Differential Display von mRNA wurden zwei Gene charakterisiert, die durch ROS differentiell reguliert werden. Der Transkriptionsfaktor *Gut-enriched Krüppel-like Factor* GKLF wird durch $OH^{\bullet}$, aber nicht durch $O_2^{\bullet -}$ heraufreguliert. Der dominant negative Regulator von *helix-loop-helix* Transkriptionsfaktoren Id3 (*Inhibitor of DNA-binding 3*) wird durch $O_2^{\bullet -}$ induziert und durch $OH^{\bullet}$ herabreguliert. Eine Überexpression von GKLF oder Inhibierung von Id3 führen zu Wachstumsarrest und verhindern die serum-induzierte Proliferation. Die Überexpression von Id3 oder Inhibierung von GKLF verringern den wachstumshemmenden Effekt von $OH^{\bullet}$ und erhöhen die Mitogenität von $O_2^{\bullet -}$. Diese Effekte von Id3 und GKLF werden durch eine Modulation von p53, $p21^{WAF1/Cip1}$, $p27^{Kip1}$ und des Retinoblastom-Genproduktes Rb vermittelt.

Effects of Reactive Oxygen Species: Characterization of Two ROS-Sensitive Genes and their Implication in The Control of Cellular Growth

Abstract:

Reactive oxygen species such as superoxide ($O_2^{\bullet -}$), hydrogen peroxide and hydroxyl radicals ($OH^{\bullet}$) have been implemented in the pathogenesis of endothelial dysfunction and atherosclerosis.

The present results show that $O_2^{\bullet -}$ acts as mitogen for cultured vascular smooth muscle cells (VSMC), whereas $OH^{\bullet}$ causes growth arrest of VSMC. Differential Display analysis led to the identification of two genes which are differentially regulated by $O_2^{\bullet -}$ and $OH^{\bullet}$. The transcription factor Gut-enriched Krüppel-like Factor (GKLF) is induced by $OH^{\bullet}$ and not by $O_2^{\bullet -}$. The dominant negative regulator of helix-loop-helix transcription factors Id3 (Inhibitor of DNA-binding) is induced by $O_2^{\bullet -}$ and down-regulated by $OH^{\bullet}$. Overexpression of GKLF or inhibiton of Id3 lead to growth arrest and abrogate serum-induced cell proliferation. Overexpression of Id3 or inhibition of GKLF diminish the growth-inhibiting effects of $OH^{\bullet}$ and increase the mitogenicity of $O_2^{\bullet -}$. GKLF and Id3 effects are mediated through modulation of p53, $p21^{WAF1/Cip1}$, $p27^{KIP1}$, and the retinoblastoma gene product Rb.

Lebenslauf

Stephanie Baudler

Biggestr. 11

50931 Köln

23.02.1972	geboren in Koblenz
	Eltern: Dr. med. Claus Baudler und Uta Baudler, geb. Templin
	Staatsangehörigkeit deutsch
1978-1980	Grundschule Niederfell
1280-1982	Grundschule St. Clemens, Mayen
1982-1991	Megina Gymnasium Mayen
1991	Abitur
Oktober 1991	Aufnahme des Studiums der Biologie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
November 1993	Vordiplom
Juli 1996-Juli1997	Diplomarbeit in der Klinik III für Innere Medizin der Universität zu Köln unter Betreuung von Prof. Dr. K.H. Scheidtmann, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, und unter Anleitung von Prof. Dr. M. Böhm, Universität zu Köln
23.07.1997	Diplom, Hauptfach Genetik, Nebenfächer Zellbiologie, Chemie
Oktober 1997	Beginn der experimentellen Arbeiten zur Promotion unter Betreuung von Frau Prof. Dr. S. Korsching, Institut für Genetik der Universität zu Köln, unter Anleitung von Prof. Dr. M. Böhm in der Klinik III für Innere Medizin der Universität zu Köln
März 1998 – Februar 2001	Förderung durch das Graduiertenkolleg „Molekularbiologische Grundlagen pathophysiologischer Vorgänge“
21.05.01	Promotion

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. S. Korsching für die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit, Herrn Prof. Dr. M. Böhm und Herrn Priv.-Doz. Dr. G. Nickenig für die Überlassung des interessanten Themas und die freundliche Unterstützung, sowohl fachlich als auch finanziell.

Meinen Kollegen im Labor der Klinik III für Innere Medizin danke ich für die gute Zusammenarbeit, das angenehme Arbeitsklima und ihre Hilfsbereitschaft.

Und natürlich danke ich meiner Familie und meinen Freunden.