

**Struktur-/Funktionsanalyse des humanen
Guanylatbindungsproteins-1 (GBP-1) – einem
Inhibitor der endothelialen Zellproliferation**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Kristin Töpol
aus Freital

November 2003

Die Arbeit wurde in der Abteilung Virale Vaskulopathie (Leitung: Prof. Dr. Michael Stürzl) des
Instituts für Molekulare Virologie am GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit, in
Neuherberg durchgeführt.

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 12 Abs. 3 der Promotionsordnung von Herrn PD Dr. Brian Salmons betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 05.10.2003

Kristin Töpolt

Dissertation eingereicht: 03.11.2003

1. Gutachter:	PD Dr. Brian Salmons
2. Gutachter:	Prof. Dr. Elisabeth Weiß
Sondergutachter:	Prof. Dr. Michael Stürzl

Mündliche Prüfung am: 16.04.2004

Meinen Eltern

Zusammenfassung

Abkürzungen

1. Einleitung	1
1.1 Endothelaktivierung während der Angiogenese	1
1.2 Angiogene Wachstumsfaktoren	3
1.3 Endothelaktivierung durch inflammatorische Zytokine	8
1.4 Das humane Guanylatbindungsprotein-1 (GBP-1)	13
1.5 Zelluläre Signalwege und programmierter Zelltod (Apoptose)	16
1.5.1 Apoptose	16
1.5.2 MAPK-Signalwege	17
1.5.2.1 Aktivierung der MAPK ERK1/2	18
1.5.2.2 Aktivierung der MAPK p38	19
1.5.2.3 Aktivierung der MAPK SAPK/JNK	20
1.5.3 Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B	21
1.5.4 Kalzium – ein wichtiger Botenstoff bei der Regulation zellulärer Prozesse	22
1.6 Ziele dieser Arbeit	24
2. Material und Methoden	26
2.1 Material	26
2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial	26
2.1.2 Enzyme	28
2.1.3 Radiochemikalien	28
2.1.4 Primäre polyklonale Antikörper	29
2.1.5 Primäre monoklonale Antikörper	29
2.1.6 Sekundärantikörper	30
2.1.7 Vektoren und Plasmide	30
2.1.8 HIV-1-Tat-GBP-1-Fusionspeptide	31
2.1.9 Biologisches Material	32
2.1.9.1 Bakterienstämme	32
2.1.9.2 Eukaryontische Zellen	32
2.2. Methoden	33
2.2.1 Allgemein benötigte Puffer, Lösungen und Medien	33
2.2.2 Zellbiologische Methoden	34
2.2.2.1 Allgemeine Zellkultur	34

2.2.2.2	Produktion infektiöser retroviraler Partikel	36
2.2.2.3	Transduktion von HUVEC	36
2.2.2.4	Proliferationsuntersuchungen	37
2.2.2.5	Immunzytochemische Färbungen von Einzelzellen	38
2.2.2.6	Morphologische Untersuchungen transduzierter Endothelzellen auf Matrigel	39
2.2.2.7	Untersuchung zur Aufnahme fluoreszenzgekoppelter HIV-1-Tat-GBP-1-Fusionspeptide von HUVEC	40
2.2.2.8	Untersuchung der proliferationsinhibitorischen Aktivität von HIV-1-Tat-GBP-1-Fusionspeptiden auf HUVEC	40
2.2.2.9	Herstellung von Proteinextrakten aus eukaryontischen Zellen	41
2.2.2.10	Kalziumbestimmung in lebenden Zellen mittels Fluoreszenzspektroskopie	42
2.2.3	DNA-Technologie	44
2.2.3.1	Plasmidisolierung	44
2.2.3.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	44
2.2.3.3	Reinigung der PCR-Fragmente	47
2.2.3.4	Quantitative Nukleinsäurebestimmung	47
2.2.3.5	Enzymatische Spaltung von DNA-Molekülen mit Restriktionsendonukleasen	47
2.2.3.6	Dephosphorylierung linearer DNA-Fragmente	48
2.2.3.7	Agarose-Gelelektrophorese	49
2.2.3.8	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	50
2.2.3.9	Ligation von DNA-Molekülen	50
2.2.3.10	Transformation von Bakterien mit Plasmiden	50
2.2.3.11	Konstruktion von GBP-1-Mutanten durch ortsgerichtete Mutagenese	51
2.2.3.12	Herstellung radioaktiv markierter Sonden	53
2.2.4	RNA-Technologie	54
2.2.4.1	Isolierung von gesamtzellulärer RNA aus eukaryontischen Zellen	54
2.2.4.2	Isolierung viraler RNA	54
2.2.4.3	<i>Northern blot</i> – Analyse	54
2.2.4.4	RT-PCR	57
2.2.5	Proteinchemische Methoden	58
2.2.5.1	Proteinkonzentrationsbestimmung	58

2.2.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	58
2.2.5.3 Anfärben von Proteinen	59
2.2.5.4 Elektrotransfer von Proteinen	59
2.2.5.5 <i>Western blot</i> – Analyse	60
2.2.5.6 Herstellung von rekombinantem D ₁₈₄ N-GBP-1-His ₆ -Protein in <i>E. coli</i>	61
2.2.5.7 Bestimmung der Proteinlöslichkeit und optimaler Expressionsbedingungen	61
2.2.5.8 Präparative Proteinexpression und –reinigung	62
2.2.5.9 Bestimmung der GTPase-Aktivität	63
2.2.6 Apoptoseuntersuchungen	64
2.2.6.1 <i>In situ</i> Nachweis von Apoptose durch die TUNEL-Methode	64
2.2.6.2 Nachweis der Apoptose durch aktivierte Caspase-3 im <i>Western blot</i>	65
3. Ergebnisse	66
3.1 Inflammatorische Zytokine hemmen konzentrationsabhängig die Proliferation mikro- und makrovaskulärer Endothelzellen	66
3.2 IL-1 β , TNF- α und IFN- γ induzieren in Endothelzellen <i>in vitro</i> die Expression des humanen Guanylatbindungsproteins-1	67
3.3 Angiogene Wachstumsfaktoren hemmen in Endothelzellen die IZ-induzierte GBP-1-Expression	69
3.4 In KS-Zellen führt die Stimulierung mit IL-1 β zu einer Aktivierung der Proliferation und bewirkt nicht die Induktion der GBP-1-Expression	70
3.4.1 In KS-Zellen wird die Proliferation durch IL-1 β , jedoch nicht durch IFN- γ aktiviert	70
3.4.2 Nachweis der KS-Zellaktivierung durch IL-1 β über die Aktivierung von NF- κ B	71
3.4.3 GBP-1 wird in KS-Zellen nicht durch IL-1 β induziert	73
3.5 GBP-1 vermittelt die IZ-induzierte Hemmung der endothelialen Zellproliferation	75
3.6 Die Expression von GBP-1 in Endothelzellen induziert keine Apoptose	78
3.6.1 <i>Western blot</i> - Analyse zum Nachweis aktivierter Caspase-3	78
3.6.2 Analyse der DNA-Fragmentierung mittels TUNEL-Analyse	78
3.7 Zwischenzusammenfassung: GBP-1-Expression und zellbiologische Wirkung in Endothelzellen	80

3.8	Der Einfluss von GBP-1 auf die Hauptsignalwege in der Zelle	82
3.8.1	Die Expression von GBP-1 beeinflusst nicht die Aktivierung der extrazellulär regulierten MAPK ERK1/2 in Endothelzellen	82
3.8.2	Die Expression von GBP-1 hat keinen Einfluss auf die Aktivierung der MAPK p38	83
3.8.3	Die GBP-1-Expression in Endothelzellen beeinflusst nicht die Aktivierung des MAPK-Signalweges SAPK/JNK	86
3.8.4	Die Expression von GBP-1 hat keinen Einfluss auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B	89
3.9	Die Expression von GBP-1 in Endothelzellen führt zu einer Änderung der Kalziumregulation in Endothelzellen	91
3.9.1	Die Stimulation von HUVEC mit Histamin führt zu einem sofortigen Anstieg der freien intrazellulären Kalziumkonzentration	92
3.9.2	Die Expression von GBP-1 verringert den Anstieg der freien intrazellulären Kalziumkonzentration nach Histamin-Stimulierung	93
3.10	Zwischenzusammenfassung: Der Einfluss von GBP-1 auf die Hauptsignalwege der Zelle	99
3.11	GBP-1 als Regulator der endothelialen Zellproliferation: Struktur- und Funktionsbeziehung	100
3.11.1	Herstellung von cDNA-Molekülen zur konstitutiven Expression von GBP-1 und mutierter GBP-1-Proteine in HUVEC	100
3.11.2	Ein Aminosäureaustausch D ₁₈₄ N im aktiven Zentrum von GBP-1 reduziert die GTPase-Aktivität	102
3.11.2.1	Herstellung und Reinigung von rekombinantem D ₁₈₄ N-GBP-1	102
3.11.2.2	D ₁₈₄ N-GBP-1 weist eine stark reduzierte GTPase-Aktivität auf	104
3.11.3	Die helikale Domäne vermittelt den antiproliferativen Effekt von GBP-1 auf Endothelzellen	105
3.11.4	Eingrenzung des proliferationsinhibierenden Bereiches der helikalen Domäne von GBP-1	106
3.11.4.1	Expression von Fragmenten der helikalen Domäne in retroviral transduzierten HUVEC	106
3.11.4.2	Ein Fragment der helikalen Domäne von 166 Aminosäuren vermittelt die Inhibierung	

der Endothelzellproliferation durch GBP-1	111
3.11.5 Weitere Eingrenzung des proliferationsinhibierenden Bereiches mittels synthetischer GBP-1-Peptide sowie retroviral transduzierter HUVEC	113
3.11.5.1 PeptidAuswahl	113
3.11.5.2 Die PTD von HIV-1-Tat, Tat ₄₇₋₅₇ , vermittelt eine effiziente Aufnahme von GBP-1-Peptiden in die Zelle	115
3.11.5.3 Die HIV-1-Tat-GBP-1-Fusionspeptide besitzen keine inhibitorische Aktivität auf die Endothelzellproliferation	116
3.11.5.4 Die verkürzten GBP-1-Proteine $\alpha 9^{1/2-12}$, $\alpha 9^{1/2-11}$ und $\alpha 10/11$ inhibierten nicht die Proliferation von Endothelzellen	118
3.11.6 Zwischenzusammenfassung: Struktur- und Funktionsanalyse von GBP-1	123
4. Diskussion	124
4.1 GBP-1 vermittelt die antiproliferative Wirkung inflammatorischer Zytokine auf Endothelzellen	125
4.2 Die Expression von GBP-1 in Endothelzellen führt nicht zu Apoptose und beeinträchtigt nicht die Aktivierung der MAPK- Signalwege oder des Transkriptionsfaktors NF- κ B	126
4.3 GBP-1 führt zu einer basalen Erhöhung der freien intra- zellulären Kalziumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) in Endothelzellen sowie einem verminderten Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ nach Histaminstimulierung	127
4.4 Die proliferationshemmende Wirkung wird von einem 166 Amino- säuren-langen Bereich der helikalen Domäne von GBP-1 vermittelt	133
4.5 Die Bedeutung von GBP-1 als proliferationsinhibierendes Molekül im Hinblick auf anti- und proangiogene Therapiemöglichkeiten vaskulärer Erkrankungen	136
5. Literatur	142
6. Lebenslauf und Publikationsliste	171
Danksagung	175

Zusammenfassung

Vaskuläre Endothelzellen kleiden die gesamte innere Oberfläche jedes einzelnen Blutgefäßes des Körpers aus. Bei zahlreichen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen wie Wundheilung, Entzündung, Allergie, Herz-Kreislauf-Erkrankung und Tumorstadium spielt das Endothel eine entscheidende Rolle. Die Aktivierung der Endothelzellen wird dabei durch eine Vielzahl von Faktoren gesteuert, die im Blut zirkulieren oder von benachbarten Zellen freigesetzt werden. Verschiedene Faktoren steuern den gleichen Phänotyp und können zu wirkungsgleichen Gruppen zusammengefasst werden. Angiogene Wachstumsfaktoren wie bFGF und VEGF aktivieren die Endothelzellproliferation, wohingegen inflammatorische Zytokine, wie IL-1 β , TNF- α und IFN- γ die Proliferation inhibieren und die Adhäsionsfähigkeit von Leukozyten an das Endothel erhöhen. Kürzlich konnte in unserem Labor ein Gen identifiziert werden, dessen Expression spezifisch durch die inflammatorischen Zytokine IL-1 β , TNF- α und IFN- γ induziert wird und durch die angiogenen Wachstumsfaktoren bFGF und VEGF gehemmt wird. Dieses Gen kodiert für das humane Guanylatbindungsprotein-1 (GBP-1). Erste Untersuchungen zeigten, dass GBP-1 maßgeblich an der Proliferationshemmung von Endothelzellen durch inflammatorische Zytokine beteiligt ist.

Das Ziel dieser Arbeit war, den Mechanismus der Proliferationshemmung durch GBP-1 auf Endothelzellen zu untersuchen, mögliche Signalwege, die daran beteiligt sind, zu analysieren sowie den proliferationshemmenden Bereich von GBP-1 einzugrenzen.

Durch den Einsatz von retroviralen Expressionsvektoren wurde die konstitutive Expression von GBP-1 sowie einer *antisense*-GBP-1 mRNA in primären Endothelzellen, zur Hemmung der GBP-1-Expression, ermöglicht. Dabei konnte gezeigt werden, dass GBP-1 notwendig ist, um den antiproliferativen Effekt von inflammatorischen Zytokinen auf Endothelzellen zu vermitteln und ausreicht die Proliferation entsprechend stark zu inhibieren. Die Proliferationshemmung durch GBP-1 beruhte nicht auf der Induktion von Apoptose. Weitere zellbiologische Untersuchungen zeigten, dass GBP-1 zudem die Kapillarbildungsfähigkeit von Endothelzellen in Matrigel nicht beeinflusst.

Bei der Untersuchung welcher zelluläre Signalweg an der GBP-1-induzierten Proliferationsinhibierung beteiligt ist, zeigte sich, dass die Aktivierung der MAPK-Signalwege ERK1/2, p38 und SAPK/JNK sowie des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch GBP-1 nicht beeinträchtigt werden. Interessanterweise wiesen konstitutiv GBP-1-exprimierende Endothelzellen ein erhöhtes Basisniveau an freiem intrazellulärem Ca²⁺ auf und reagierten im Vergleich zu Kontrollzellen mit deutlich reduzierten Kalziumsignalen auf die Stimulierung mit Histamin. Ca²⁺ spielt eine wichtige Rolle bei der Proliferationsaktivierung und könnte somit an der GBP-1-induzierten Inhibierung der endothelialen Zellproliferation beteiligt sein.

Untersuchungen zur Struktur- und Funktionsbeziehung von GBP-1 ergaben, dass weder die Isoprenylierung noch die GTPase-Aktivität von GBP-1 für die Hemmung der Endothelzellproliferation notwendig ist. Durch die sukzessive Verkürzung des gesamten GBP-1-Moleküls konnte der proliferationsinhibierende Bereich schließlich auf 166 Aminosäuren der helikalen Domäne eingegrenzt werden.

Die in dieser Arbeit dargestellte Aufklärung der Struktur-/Funktionsbeziehung der proliferationshemmenden Wirkung von GBP-1 sowie die Eingrenzung der beteiligten Signalwege bilden eine wichtige Voraussetzung für einen möglichen therapeutischen Einsatz dieses Moleküls zur Modulation der Gefäßsprossung bei der Tumorangiogenese, chronischen Entzündungen und Retinopathien.

Abkürzungen

A	Absorption
Abb.	Abbildung
AMP-PNP	Adenylyl-imidodiphosphat-Tetralithiumsalz
APS	Ammoniumpersulfat
AS	<i>antisense</i>
AWF	angiogene Wachstumsfaktoren
aFGF	saurer Fibroblastenwachstumsfaktor (<i>acid fibroblast growth factor</i>)
bFGF	basischer Fibroblastenwachstumsfaktor (<i>basic fibroblast growth factor</i>)
BM	Basalmembran
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
cm	Zentimeter
Ci	Curie
cpm	counts per minute
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DAPI	4',6'-diamino-2-phenylindol
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DDRT-PCR	<i>differential display reverse transcription polymerase chain reaction</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
EBM	Endothelzellbasalmedium
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EtOH	Ethanol
EZ	Endothelzellen
FBS	Fötale Kälberserum
FGF	Fibroblastenwachstumsfaktor (<i>fibroblast growth factor</i>)
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
g	Gramm

<i>g</i>	Gravitationskonstante
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphate-Dehydrogenase
GBP-1	humanes Guanylatbindungsprotein-1
GDP	Guanosindiphosphat
Glo	globuläre Domäne
GMP	Guanosinmonophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
hEGF	<i>human epidermal growth factor</i>
Hel	helikale Domäne
HIV-1	<i>human immunodeficiency virus-1</i>
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykane
HUVEC	humane Nabelschnurendothelzellen
IC	Immuncytochemie
IFN	Interferon
IL-1	Interleukin-1
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IZ	inflammatorische Zytokine
kD	Kilo-Dalton
KHB	Krebs-Henseleit-Bikarbonat-Lösung
KS	Kaposi's Sarcoma
kV	Kilovolt
KV	Kontrollvektor
l	Liter
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LSM	<i>laser scanning microscope</i>
mA	Milliampere
mg	Milligramm
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
ms	Millisekunde
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (<i>messenger RNA</i>)
MVEC	mikrovaskuläre Endothelzellen
μ l	Mikroliter

Abkürzungsverzeichnis

μM	mikromolar
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxyd
nt	Nukleotide
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMC	periphere Blutmononukleäre Zellen (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEI	Polyethylenimin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RB	Laufpuffer
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfat</i>)
S-GBP-1	sense-GBP-1
ss	einzelsträngig
STD	Standardabweichung
TCEP	Tris(2-carboxyethyl)phosphine
TE-Puffer	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N',-Tetramethylethyldiamin
TNF-α	Tumornekrosisfaktor-α
tRNA	transfer RNA
TUNEL	TdT-mediated dUTP nick end labeling
U	Einheiten
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	vaskulärer Endothelzellwachstumsfaktor (<i>vascular endothelial cell growth factor</i>)
WB	<i>Western blot</i>

1. Einleitung

Tumorerkrankungen und Herz-Kreislauf-Erkrankungen sind die häufigsten Todesursachen in Deutschland [Statistisches Bundesamt Deutschland (2001); www.destatis.de]. Betrachtet man die Statistik, so wird etwa jeder Dritte im Verlaufe seines Lebens an einem Tumorleiden erkranken und jeder Vierte daran sterben. Tumorerkrankungen stehen nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen an zweiter Stelle der Todesursachenstatistik - bei Frauen im Alter zwischen 40 und 60 Jahren sogar an erster Stelle [Statistisches Bundesamt Deutschland (2001); www.destatis.de].

Bei der Entstehung von Tumoren wird der Neubildung von Blutgefäßen, der Angiogenese, eine ganz entscheidende Rolle zugesprochen. Untersuchungen zeigen, dass ein Tumor ab einer kritischen Größe von nur drei Millimeter Durchmesser aus seiner näheren Umgebung nicht mehr ausreichend Sauerstoff und Nährstoffe beziehen kann (Folkman, 2000). Zum Überleben brauchen solche Tumorherde einen Anschluss an das Blutgefäßsystem, das Nährstoffe und Sauerstoff heranbringt. Ausgelöst durch Sauerstoff- und Nährstoffmangel, stellen die Tumorzellen bestimmte Wachstumsfaktoren her, die die Neubildung von Blutgefäßen anregen. Mit der Neubildung von Blutgefäßen ist auch der gefürchteten Streuung der Tumorzellen der Weg geebnet: über die feinen Blutgefäße können sie den Primärtumor verlassen und sich an anderen Stellen des Körpers als Metastasen ansiedeln. Trotz der großen Bedeutung der Tumorangiogenese für das Tumorwachstum ist noch immer recht wenig über die molekularen Mechanismen dieses biologischen Prozesses bekannt. Antiangiogene Therapien, die Angiogenese und somit Tumorwachstum und -metastasierung verhindern könnten, werden derzeit als vielversprechende Ergänzung zur Chemotherapie in der Krebsbehandlung angesehen (Cao, 2001). Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein neuer intrazellulärer Regulator der Proliferation von Endothelzellen, eines der wichtigsten Prozesse der Angiogenese, untersucht.

1.1 Endothelaktivierung während der Angiogenese

Das Gefäßsystem ist mit einer Fläche von 900 m² eines der größten Organe des menschlichen Körpers (Griffioen und Molema, 2000). Jedes einzelne Blutgefäß ist luminal mit Endothelzellen ausgekleidet, die sich in direktem Kontakt mit dem Blut und subendothelial lokalisierten Perizyten, Glattmuskelzellen, Fibroblasten, der

Basalmembran (BM) und der extrazellulären Matrix (*extracellular matrix*, ECM) befinden (Griffioen und Molema, 2000). Während der Embryonalentwicklung differenzieren sich hämatopoetische Stammzellen mesodermaler Herkunft über Angioblasten zu Endothelzellen aus und bilden nachfolgend ein primitives Netzwerk, den sogenannten primären vaskulären Plexus aus (Risau und Flamme, 1995). Diesen Prozess, der fast ausschließlich auf die Embryonalentwicklung beschränkt ist, bezeichnet man als Vaskulogenese (Risau und Flamme, 1995).

Man findet jedoch im postnatalen Organismus endotheliale Vorläuferzellen aus dem Knochenmark, die unterstützend in die Gefäßneubildung mit einbezogen werden, was nahe legt, dass Vaskulogenese auch im adulten Organismus auftreten kann (Asahara *et al.*, 1999). Den nachfolgenden Prozess des Sprossens neuer Kapillaren aus bereits vorhandenen Gefäßen, bezeichnet man als Angiogenese (Folkman und Haudenschild, 1980). Dieser komplexe Prozess beinhaltet das Ablösen muraler peri-endothelialer Zellen, den lokalen Abbau der ECM durch proteolytische Enzyme, wie Matrix-Metalloproteasen, die Migration und Proliferation der Endothelzellen, die Neubildung von Kapillaren und die Stabilisierung der neuen Gefäße durch das Wiederanlagern peri-endothelialer Zellen (Folkman und Klagsbrun, 1987). Akzessorische Zellen, die regulierende Funktionen ausüben und für den Erhalt und die Stabilität der Gefäße sorgen, sind bei kleineren Kapillaren Perizyten, bei größeren Gefäßen Glattmuskelzellen und im Herzen Herzmuskelzellen (Ausprunk und Folkman, 1977; Folkman und Klagsbrun, 1987; Hanahan, 1997; Pepper *et al.*, 1996).

Angiogenese findet nicht nur bei physiologischen Vorgängen, wie der Wundheilung oder dem Menstruationszyklus statt, sondern ist ebenso Teil vieler pathologischer Prozesse. So spielt die Angiogenese eine wichtige Rolle bei Tumorerkrankungen, Herz-Kreislauf-Erkrankungen, chronischen Entzündungen und Retinopathien (Griffioen und Molema, 2000). Im normalen adulten Organismus befindet sich das Endothel im Ruhezustand und die biologische Erneuerung dieser Zellen ist sehr gering. Angiogenese wird unter normalen physiologischen Bedingungen durch ein Gleichgewicht zwischen pro- und antiangiogenen Faktoren reguliert. Während bei unkontrollierter Angiogenese die angiogenen Faktoren überwiegen, wird der physiologische Ruhezustand der Endothelzellen durch die Dominanz von negativen Regulatoren erhalten (Bouck, 1990; Liotta *et al.*, 1991; Pepper *et al.*, 1996). Die Aktivierung der Endothelzellen erfolgt durch Faktoren, die im Blut zirkulieren oder von

benachbarten Zellen beziehungsweise Tumorzellen freigesetzt werden (Pepper *et al.*, 1996). Diese Faktoren sind entweder löslich, membran- oder ECM-gebunden oder selbst Komponenten der ECM. Auch Endothelzellen selbst können Angiogenese-regulierende Zytokine freisetzen und von diesen aktiviert werden. Diese löslichen Polypeptidmediatoren dienen sowohl als Signale zur Kommunikation mit Leukozyten, die primär diese Moleküle produzieren, als auch mit verschiedenen Geweben und Organen (Mantovani *et al.*, 1992).

1.2 Angiogene Wachstumsfaktoren

Die am besten charakterisierten und am stärksten pro-angiogenen Faktoren sind der vaskuläre Endothelzell-Wachstumsfaktor (*vascular endothelial cell growth factor*, VEGF) sowie der saure und der basische Fibroblasten-Wachstumsfaktor (*acidic* und *basic fibroblast growth factor*, aFGF und bFGF); (Gerwins *et al.*, 2000).

VEGF ist einer der Schlüsselregulatoren der physiologischen und pathologischen Angiogenese (Carmeliet *et al.*, 1996; Connolly *et al.*, 1989; Kim *et al.*, 1993) und unterscheidet sich von anderen angiogenen Faktoren durch seine Endothelzell-spezifische mitogene Wirkung (Keck *et al.*, 1989; Leung *et al.*, 1989; Myoken *et al.*, 1991). VEGF bezeichnet eine Familie, bestehend aus sechs strukturell ähnlichen Wachstumsfaktoren, VEGF-A, *placental growth factor* (PlGF), VEGF-B, VEGF-C, *c-fos-induced growth factor* (Figf)/VEGF-D und VEGF-E (Betsholtz *et al.*, 1986; Joukov *et al.*, 1997; Keck *et al.*, 1989; Maglione *et al.*, 1991; Meyer *et al.*, 1999; Ogawa *et al.*, 1998; Olofsson *et al.*, 1996; Orlandini *et al.*, 1996); (Abb. 1). Von den VEGF-Liganden wirken VEGF-A, PlGF, VEGF-B und VEGF-E präferentiell jedoch nicht ausschließlich auf vaskuläre Endothelzellen, während VEGF-C und VEGF-D hauptsächlich lymphatische Endothelzellen aktivieren (Gerwins *et al.*, 2000).

Das humane VEGF-A kann durch alternatives Spleißen der mRNA in verschiedenen homodimeren Isoformen (VEGF₁₂₁, VEGF₁₃₈, VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₂, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆) auftreten, wobei jedes Monomer aus 121, 138, 145, 162, 165, 189 beziehungsweise 206 Aminosäuren gebildet wird (Kim *et al.*, 1993; Lange *et al.*, 2003; Mattei *et al.*, 1996); (Abb. 1). Die Spleißvarianten von VEGF unterscheiden sich in ihren biologischen Eigenschaften, wie Rezeptorerkennung und ihrer Interaktion mit Heparansulfat-Proteoglykanen (HSPG). VEGF₁₂₁ kann nicht an HSPG binden, da beide voneinander unabhängigen HSPG-Bindedomänen, kodiert durch Exon 6 und 7 des VEGF-Gens, fehlen (Neufeld *et al.*, 2002). Die biologische Wirkung

von VEGF wird durch die Bindung an spezifische Tyrosinkinase-Rezeptoren vermittelt. Auf Endothelzellen wurden bislang folgende hochaffine VEGF-Rezeptoren identifiziert: der VEGF-Rezeptor-1 (VEGFR-1), kodiert durch das *flt-1*-Gen; VEGFR-2, kodiert durch das *flk-1/KDR*-Gen, VEGFR-3, kodiert durch das *flt-4*-Gen, sowie Neuropilin-1 (*np1*) und Neuropilin-2 (*np2*); (Abb. 1). Neuropilin-1 scheint als Korezeptor zu agieren, da es die Aktivität von VEGFR-2 in Anwesenheit von VEGF₁₆₅ verstärkt, was vermutlich aus einer Komplexbildung von Neuropilin-1 mit VEGFR-2 resultiert (Bussolino *et al.*, 1997; Carmeliet, 2000; Gluzman-Poltorak *et al.*, 2000; Neufeld *et al.*, 2002; Soker *et al.*, 1998).

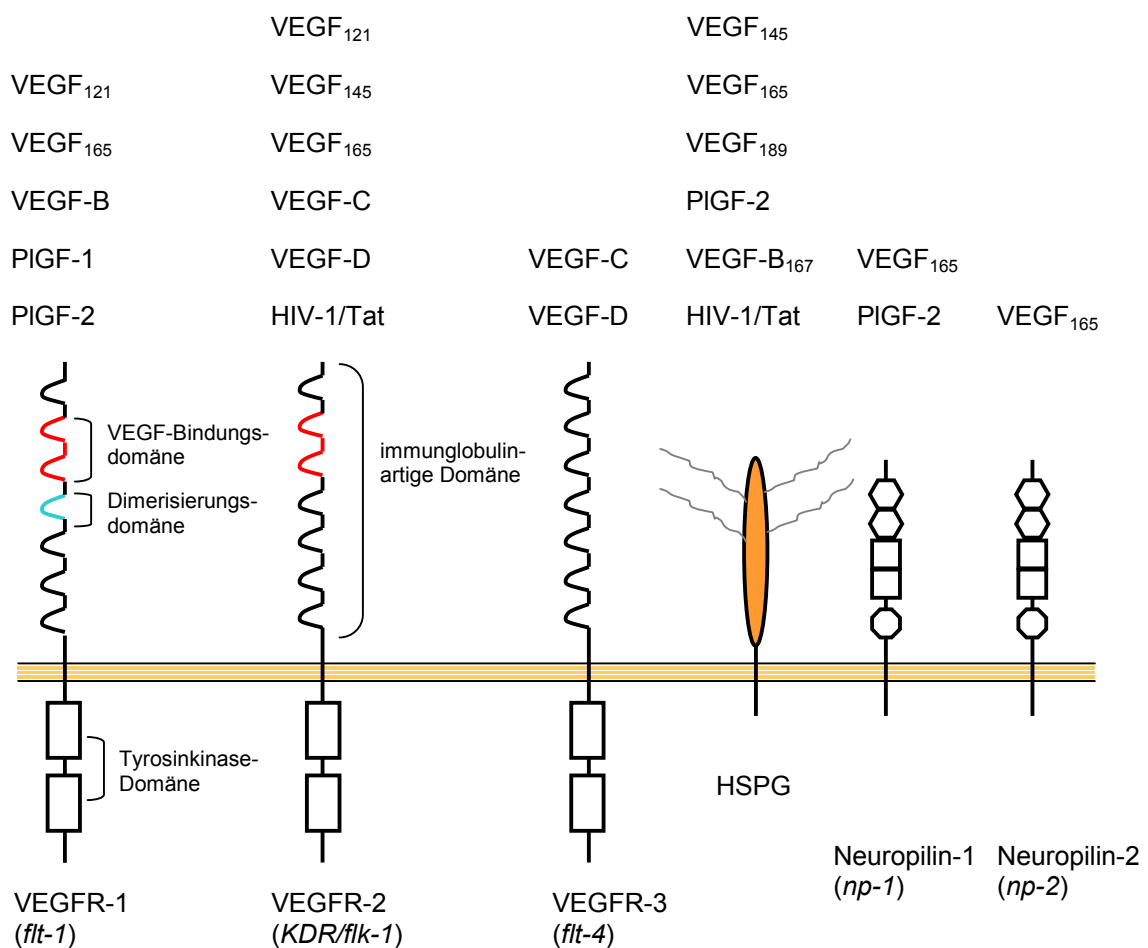


Abb. 1: Wachstumsfaktoren und Rezeptoren der VEGF-Familie. Darstellung der strukturellen Merkmale der Tyrosinkinase-Rezeptoren der VEGF-Familie, VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3, der Neuropilin-Rezeptoren Neuropilin-1 und Neuropilin-2 sowie des VEGF-bindenden Heparansulfat-Proteoglykans (HSPG) sowie den entsprechenden Liganden (Neufeld *et al.*, 1999).

Auf vaskulären Endothelzellen werden vorrangig VEGFR-1 und VEGFR-2 exprimiert, während VEGFR-3 auf lymphatischen und nur während der Embryonalentwicklung auch auf vaskulären Endothelzellen exprimiert wird (Gerwins *et al.*, 2000).

Die zellulären Antworten auf VEGF-A scheinen hauptsächlich über den VEGFR-2 vermittelt zu werden (Gerwins *et al.*, 2000). Die Aktivierung des VEGFR-2 führt zu einer Erhöhung der endothelialen Zellproliferation und Migration und erhöht die Gefäßpermeabilität (Abedi und Zachary, 1997; Griffioen und Molema, 2000; Kroll und Waltenberger, 1997; Ziche *et al.*, 1997). Die VEGF-Rezeptoren, VEGFR-1, VEGFR-2 und VEGFR-3, bestehen aus sieben extrazellulären immunoglobulinartigen Domänen, einer Transmembransequenz und einer intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne (Gerwins *et al.*, 2000). Die Bindung von VEGF induziert die Dimerisierung der VEGF-Rezeptoren, die zur Aktivierung der Kinase führt, wodurch die spezifische Bindung von Signaltransduktionsmolekülen ermöglicht wird. Die verschiedenen Signalmoleküle besitzen keine intrinsische Enzymaktivität, können aber mit verschiedenen Enzymen interagieren, die dadurch aktiviert werden (Gerwins *et al.*, 2000). Die so eingeleitete Signalkaskade reguliert verschiedene VEGF-induzierte zelluläre Antworten wie Proliferation, Migration oder Differenzierung (Gerwins *et al.*, 2000).

Die Aktivierung der Proliferation von Endothelzellen kann einerseits über den Ras/mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) - Weg oder Ras-unabhängig über die Aktivierung der Phospholipase C- γ (PLC- γ) erfolgen. Das letztgenannte Enzym aktiviert nachfolgend Mitglieder der Proteinkinase C - Familie, die wiederum Serin-Kinasen *downstream* des Ras-Moleküls phosphorylieren und aktivieren (Gerwins *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 1999). Die Stimulierung von Endothelzellen mit VEGF führt zur Aktivierung der extrazellulär regulierten MAP-Kinasen (ERK), ERK1 und ERK2 (ERK1/2). Wird die Aktivierung von ERK1/2 mit Hilfe eines spezifischen Inhibitors verhindert, so wird die VEGF-induzierte Proliferation von Endothelzellen gehemmt (Yu und Sato, 1999).

Unter Serumangel kann VEGF in mikrovaskulären Endothelzellen die Apoptose verhindern, indem es der stressaktivierten Proteinkinase (SAPK) durch Aktivierung der MAPK ERK1/2 entgegenwirkt (Gupta *et al.*, 1999).

Die meisten VEGF-Isoformen induzieren die Proliferation von vaskulären Endothelzellen, induzieren Angiogenese und erhöhen die Permeabilität von Blutgefäßen. Die VEGF-Spleißvarianten besitzen unterschiedliche Rezeptor- und

HSPG-Bindungseigenschaften, was sich in unterschiedlichen Wirkungen der Spleißformen widerspiegelt. So wurde zum Beispiel herausgefunden, dass Mäuse, die nur VEGF₁₂₁ exprimieren, Defekte in der Gefäßentwicklung aufweisen (Carmeliet *et al.*, 1999; Stalmans *et al.*, 2002), da auch die HSPG-bindenden VEGF-Varianten, wie VEGF₁₄₅, VEGF₁₆₅ und VEGF₁₈₉, für die korrekte Vernetzung von Blutgefäßen während der Embryonalentwicklung benötigt werden (Ruhrberg *et al.*, 2002). Ebenso zeigten Mäuse, die nur VEGF₁₈₉ exprimierten, eine beeinträchtigte arterielle Entwicklung (Stalmans *et al.*, 2002). Daraus lässt sich schließen, dass jede VEGF-Variante spezifische Charakteristika besitzt und, dass die verschiedenen VEGF-Formen für eine ausgewogene angiogene Antwort zusammenwirken müssen (Lange *et al.*, 2003).

Von großer Bedeutung im Bezug auf die biologische Rolle von VEGF, war auch die Entdeckung, dass die Expression von VEGF im räumlichen und zeitlichen Zusammenhang mit physiologischen Ereignissen der Angiogenese *in vivo* steht. So konnte gezeigt werden, dass die Inhibierung der VEGF-Aktivität mit neutralisierenden Antikörpern oder durch Einbringen von dominant negativen VEGF-Rezeptoren in Endothelzellen tumorassoziierter Blutgefäße, zu einer Hemmung des Tumorwachstums und der Tumorprogression führte (Kim *et al.*, 1993; Millauer *et al.*, 1996; Millauer *et al.*, 1994). Die VEGF-induzierte Angiogenese spielt ebenso bei verschiedenen Krankheiten, die mit einer abnormalen Angiogenese assoziiert sind, wie zum Beispiel bei Retinopathien, eine entscheidende Rolle (Lange *et al.*, 2003).

Auch die Mitglieder der *fibroblast growth factor* (FGF) Familie sind starke angiogene Faktoren. Sie wirken pleiotrop und stimulieren neben Endothelzellen auch das Wachstum von Fibroblasten, Glattmuskelzellen und Epithelzellen (Gospodarowicz *et al.*, 1987; Lindner und Reidy, 1991; O'Keefe *et al.*, 1988). Von den 19 strukturell ähnlichen Mitgliedern der FGF-Familie sind aFGF und bFGF (auch FGF-1 und FGF-2 genannt) präferentiell an der Angiogenese beteiligt (Gerwins *et al.*, 2000; Okada-Ban *et al.*, 2000). bFGF ist eines der ersten angiogenen Moleküle, die entdeckt und charakterisiert wurden (Esch *et al.*, 1985; Schweigerer *et al.*, 1987). Das Protein wird hauptsächlich von Fibroblasten synthetisiert und konnte ubiquitär in normalen humanen Geweben in der subendothelialen Basalmembran aller Blutgefäße nachgewiesen werden (Cordon-Cardo *et al.*, 1990).

bFGF ist ein HSPG-bindender Wachstumsfaktor, der in verschiedenen Isoformen vorkommen kann, die aus alternativen Translationsstarts an CUG-Codons *upstream*

vom AUG-Codon resultieren (Okada-Ban *et al.*, 2000). So treten neben der 18 kDa-umfassenden zytoplasmatischen Isoform noch vier weitere, nukläre, Isoformen mit einem größeren Molekulargewicht (22; 22,5; 24 und 34 kDa) auf (Arnaud *et al.*, 1999).

Die verschiedenen Effekte von bFGF auf eine Reihe von Zellen und Geweben wurden hauptsächlich für die 18 kDa Isoform beschrieben, die in vielen Geweben nachweisbar ist (Okada-Ban *et al.*, 2000). BFGF ist speziell im Nervensystem und bei der Knochenbildung in Embryogenese und Morphogenese involviert (Coffin *et al.*, 1995; Wagner, 1991). Es fördert die korrekte Funktion des Nervensystems und scheint als *survival factor* neuronale Zellen vor Apoptose zu schützen (Basilico und Moscatelli, 1992). Auf Fibroblasten wirkt bFGF mitogen und ist an Gewebsumbau und Gewebsregenerierung beteiligt (Okada-Ban *et al.*, 2000). Daneben ist bFGF ein starker angiogener Faktor, der die Migration, Proliferation und Differenzierung von Endothelzellen induziert und besonders bei kardiovaskulären Erkrankungen und deren Therapie von Bedeutung ist (Gerwins *et al.*, 2000). Wie am Tiermodell gezeigt wurde, konnte durch die Behandlung mit bFGF die Anzahl an Arteriolen und Kapillaren in der Infarktregion des Herzens erhöht werden, wodurch eine bessere Durchblutung und eine Verkleinerung des Infarktareals erreicht wurde (Yanagisawa-Miwa *et al.*, 1992).

Auch beim Wachstum von Tumoren oder bei der Wundheilung unterstützt die proangiogene Wirkung von bFGF die Neubildung von Gefäßen (Dow und deVere White, 2000; Kandel *et al.*, 1991). Bei der Induktion der Angiogenese kann bFGF synergistisch mit VEGF agieren. Stimuliert man Endothelzellen, die auf Kollagengelen ausgebracht wurden, mit bFGF oder VEGF, so induziert man die Bildung kapillarähnlicher Gefäße, die durch synergistische Wirkung beider Faktoren noch verstärkt werden kann (Goto *et al.*, 1993; Pepper *et al.*, 1992). Auch *in vivo* konnte die Wirkung von bFGF und VEGF auf die Angiogenese durch die kombinierte Applikation beider Faktoren synergistisch erhöht werden (Asahara *et al.*, 1995; Cornali *et al.*, 1996; Gerwins *et al.*, 2000).

Die biologische Wirkung von bFGF wird über die spezifische Bindung an hochaffine Transmembran-Rezeptoren, FGF-Rezeptor 1-4 (FGFR-1 bis FGFR-4), die zur Familie der Tyrosinkinase-Rezeptoren gehören, vermittelt (Klein *et al.*, 1997). Diese Rezeptoren sind von ihrer Struktur her ähnlich aufgebaut und bestehen aus einer zytoplasmatischen Tyrosinkinase-Domäne, einer Transmembransequenz und einer

extrazellulären ligandenbindenden Domäne (Bikfalvi *et al.*, 1997; Hou *et al.*, 1991). Zusätzlich kann die Bindung auch über niedrigaffine FGF-Rezeptoren erfolgen. Diese bestehen aus Polysaccharidkomponenten von Heparansulfat-Proteoglykanen, die sich auf der Zelloberfläche oder in der ECM befinden (Miao *et al.*, 1996). Die niedrigaffinen Rezeptoren agieren dabei als Hilfsmoleküle bei der Bindung an die hochaffinen Rezeptoren (Yayon *et al.*, 1991).

BFGF beeinflusst auch die Expression von Integrinen auf dem Endothel (Enenstein *et al.*, 1992). In der Regulation der Antwort von Endothelzellen auf lösliche Wachstumsfaktoren, einschließlich bFGF, spielt die Expression und Aktivierung von Integrinen eine wichtige Rolle. So wird das $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, welches während der Angiogenese von Endothelzellen stark exprimiert wird, für die Aufrechterhaltung der bFGF-induzierten Neovaskularisierung benötigt (Brooks *et al.*, 1994; Friedlander *et al.*, 1995; Tanghetti *et al.*, 2002).

Bei der Bindung von bFGF an den FGFR kommt es zur Dimerisierung und nachfolgender Autophosphorylierung der Rezeptoren, wodurch Signalwege *downstream* des Rezeptors aktiviert werden (Suhardja und Hoffman, 2003). Durch die Bindung von bestimmten Signaltransduktionsmolekülen an den phosphorylierten Rezeptor wird die Phosphorylierung von Kinasen des Ras-MAPK ERK1/2-Signalweges induziert, was zu einer Aktivierung der endothelialen Zellproliferation führt (Klein *et al.*, 1997). Daneben können auch die Phospholipase C (PLC- γ) oder Cortactin, ein aktinbindendes Protein, als Substrate des FGF-Rezeptors aktiviert werden (Bikfalvi *et al.*, 1997).

1.3 Endothelaktivierung durch inflammatorische Zytokine

Entzündungsreaktionen spielen bei einer Reihe von Krankheiten, wie Atherosklerose, Ischämien, AIDS-assoziiertem Kaposi-Sarkom (Ensoli und Stürzl, 1998), septischem Schock und Autoimmunerkrankungen eine wichtige Rolle (Tedgui und Mallat, 2001). Die inflammatorische Reaktion umfasst die komplexe Interaktion zwischen inflammatorischen Zellen, wie Neutrophilen, Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen sowie den Zellen des Gefäßsystems, wie Endothelzellen und Glattmuskelzellen (Tedgui und Mallat, 2001). Am Entzündungsherd sind eine Reihe von Zytokinen und Wachstumsfaktoren vorhanden, die jeder für sich die Ausprägung der inflammatorischen Antwort beeinflussen können. Die durch diese multiplen Faktoren aktivierten Endothel- und Glattmuskelzellen regulieren die

immuninflammatorische Antwort durch die Expression von Adhäsionsmolekülen, Zytokinen, Chemokinen, Matrix-Metalloproteinasen und Wachstumsfaktoren (Tedgui und Mallat, 2001). Der Verlauf der Entzündungsreaktion und somit der klinische Verlauf der Erkrankung wird durch die Balance von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen, die während des inflammatorischen Prozesses gebildet werden, bestimmt. Die am Anfang der inflammatorischen Kaskade gebildeten inflammatorischen Zytokine (IZ) führen zu einer erhöhten Akkumulation von Leukozyten am Entzündungsort, eines der frühesten und wahrscheinlich wichtigsten Ereignisse der Inflammation (Cotran und Pober, 1990). Die erhöhte Adhäsionskompetenz von Endothelzellen für Leukozyten wird speziell durch die inflammatorischen Zytokine, Interleukin-1 (IL-1) und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), gesteuert (Pober, 1987). Diese induzieren die Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche, die als Liganden für die komplementären Moleküle der Leukozyten dienen, und erhöhen die Permeabilität der endothelialen Zellschicht (Cotran und Pober, 1990; Mantovani *et al.*, 1992). Sowohl Leukozyten als auch Endothelzellen tragen zur erhöhten Adhäsion bei (Cotran und Pober, 1990).

Vaskuläre Zellen können einerseits Ziel und andererseits auch Quelle von IZ sein (Mantovani *et al.*, 1992). So induziert die Stimulierung mit IL-1 die endotheliale Expression von Leukozyten-aktivierenden Faktoren und Zytokinen, einschließlich IL-1 α/β sowie dem *platelet-activating factor* (PAF), dem Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF), IL-6, IL-8 oder dem *monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1); (Cotran und Pober, 1990; Pober und Cotran, 1990a). Durch die IL-1-induzierte Synthese Leukozyten-aktivierender Faktoren und der erhöhten Adhäsionskompetenz wird die Transmigration von Neutrophilen durch die Endothelschicht *in vitro* bewirkt. Neben der erhöhten Adhäsionskompetenz beeinflusst IL-1 auch die Morphologie von Endothelzellen, die von einer typischen pflastersteinartigen (epithelialen) Zellform zu einer länglichen spindelartigen (fibroblastoiden) Zellform übergeht (Cotran und Pober, 1990; Pober und Cotran, 1990a).

Des Weiteren wurde gezeigt, dass IL-1 das endotheliale Wachstum *in vivo* und *in vitro* inhibiert und zu einem Zellzyklusarrest von proliferierenden kultivierten Endothelzellen in der G1-Phase führt (Cozzolino *et al.*, 1990; Feder und Laskin, 1994; Guenzi *et al.*, 2001; Norioka *et al.*, 1987; Saegusa *et al.*, 1990). Die Hemmung der Proliferation durch IL-1 erfolgt dosisabhängig und parallel zur Bindung an die IL-

1-Oberflächenrezeptoren. IL-1 inhibiert neben der Proliferation auch die FGF-induzierte Gefäßbildung, wie in einem *in vivo* Angiogenesemodell gezeigt wurde. Die Behandlung der Kaninchen-Kornea mit IL-1 β führte dabei zu einer starken Inhibierung der bFGF-induzierten Neoangiogenese (Cozzolino *et al.*, 1990). Es wurde vermutet, dass IL-1 β die endotheliale Zellproliferation hemmt, indem es die Expression der FGF-Rezeptoren auf dem Endothel vermindert (Cozzolino *et al.*, 1990). Im Gegensatz dazu hat IL-1 auf endothelzellähnliche Kaposi-Sarkom-Kulturen, Zellen eines stark vaskularisierten Tumors, eine proliferationsaktivierende Wirkung (Nakamura *et al.*, 1988; Stürzl *et al.*, 1995).

Durch *in vitro* und *in vivo* Studien konnten für IL-1 und auch für TNF- α sowohl angiogene als auch antiangiogene Eigenschaften aufgezeigt werden. Obwohl die gezeigten wachstumsregulierenden Eigenschaften dieser Zytokine auf Endothelzellen in Abhängigkeit vom Gewebe und vom Spezies schwanken, inhibieren diese Zytokine im allgemeinen die Endothelzellproliferation und wirken der Gefäßneubildung entgegen (Cozzolino *et al.*, 1990; Frater-Schroder *et al.*, 1987; Gerol *et al.*, 1998; Meyrick *et al.*, 1991; Norioka *et al.*, 1992; Norioka *et al.*, 1987; Sato *et al.*, 1986).

Die Interleukin-1 Familie besteht aus drei Mitgliedern (Abb. 2), den Agonisten IL-1 α und IL-1 β sowie dem IL-1-Rezeptor-Antagonisten IL-1Ra (Dinarello, 1996). Für IL-1 wurden zwei primäre Rezeptoren, der IL-1-Rezeptor I (IL-1RI), welcher Signale transduziert, der IL-1-Rezeptor II (IL-1RII), der IL-1 bindet, aber keine Signale weiterleiten kann sowie ein Rezeptor-akzessorisches Protein (IL-1R-AcP) identifiziert (Colotta *et al.*, 1994; McMahan *et al.*, 1991; Sims *et al.*, 1988). Beide Rezeptoren sowie das IL-1R-AcP besitzen einen extrazellulären Bereich mit drei immunglobulinartigen Domänen, eine Transmembran-Domäne und einen zytoplasmatischen Teil (Dinarello, 1996; McMahan *et al.*, 1991; Sims *et al.*, 1988). Der extrazelluläre oder lösliche (soluble) Teil des IL-1RI (IL-1sRI) und des IL-1RII (IL-1sRII) kann proteolytisch vom Gesamtprotein abgespalten werden, im Blut zirkulieren und so der Bindung von IL-1 α , IL-1 β oder IL-1Ra als „natürlicher Puffer“ entgegenwirken (Dinarello, 1996).

Nach Bindung von IL-1 an den IL-1RI kommt es zur Komplexbildung von IL-1RI und dem IL-1R-AcP (Greenfeder *et al.*, 1995). Die Bildung dieses heterodimeren Komplexes (IL-1R/IL-1R-AcP) ist wiederum für die anschließende Weiterleitung von Signalen notwendig (Dinarello, 1996).

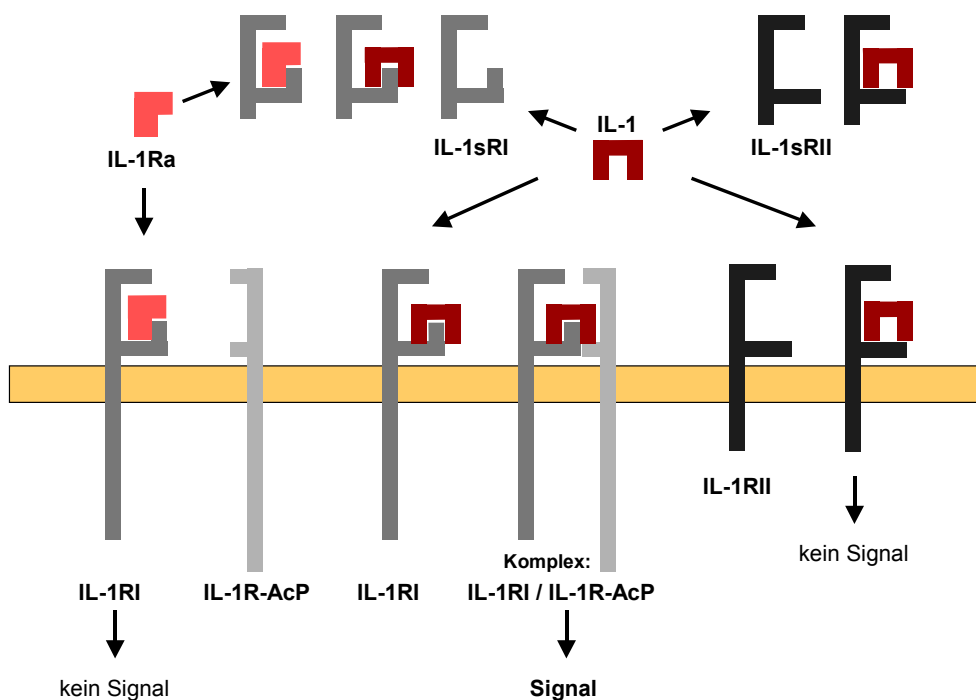


Abb. 2: Schematische Darstellung der membrangebundenen IL-1 Rezeptoren: IL-1RI und IL-1RII, der löslichen IL-1-Rezeptorformen: IL-1sRI und IL-1sRII sowie des IL-1-Rezeptor-akzessorischen Proteins IL-1R-AcP. Das Modell zeigt die verschiedenen Bindungsmöglichkeiten zwischen IL-1 (IL-1 α und IL-1 β), IL-1Ra und den Rezeptoren sowie die resultierenden Signalaktivitäten (Dinarello, 1996).

So werden durch IL-1 Proteinkinasen aktiviert, die zur Phosphorylierung von Mitgliedern der MAP-Kinase-Familie, MAPK p38, der stressaktivierten Proteinkinase JNK (SAPK/JNK) und der MAPK ERK1/2, führen können (Dinarello, 1996). IL-1 bewirkt außerdem die Phosphorylierung des NF- κ B-Inhibitorproteins I κ B, wodurch NF- κ B in den Zellkern wandert und die Gentranskription induziert (Stylianou *et al.*, 1992). Der IL-1RII kann aufgrund seines sehr kurzen zytosolischen Teils, dem die Signalübertragungsdomäne fehlt, keine extrazellulären Signale weiterleiten (Sims *et al.*, 1993; Sims *et al.*, 1994). Dieser Rezeptor scheint daher als Ködermolekül speziell für IL-1 β zu agieren. Er bindet IL-1 β nur schwach, inhibiert aber dadurch die IL-1 β -Bindung am IL-1RI und reduziert somit die Aktivität von IL-1 β (Colotta *et al.*, 1993). Der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) löst eine Reihe von proinflammatorischen Antworten in Endothelzellen aus, die sich weitgehend überlappen mit denen, die durch IL-1 induziert werden (Mantovani und Dejana, 1989). So wird durch TNF- α neben der erhöhten Adhäsionskompetenz für Neutrophile, Basophile, Eosinophile und Lymphozyten, die Sekretion von IL-1, GM-CSF, IL-6, MCP-1 und IL-8 angeregt und die Reorganisation der endothelialen Zellschicht von der epithelialen zur fibroblastoiden Morphologie induziert. Die TNF- α -induzierten morphologischen

Veränderungen gehen einher mit einer Reorganisation des zytoplasmatischen Aktingerüsts von dichten peripheren Aktinbahnen in längsgerichtete Stressfasern (Stolpen *et al.*, 1986). Die Auflösung der dichten peripheren Bahnen im Endothel hat wiederum eine erhöhte vaskuläre Permeabilität zur Folge (Wong und Gotlieb, 1988). Neben TNF- α bewirken auch andere inflammatorische Zytokine, wie IL-1 oder IFN- γ eine erhöhte vaskuläre Durchlässigkeit (Pober und Cotran, 1990b; Stolpen *et al.*, 1986). *In vitro* ist TNF- α ein starker Inhibitor des endothelialen Zellwachstums, wobei jedoch *in vivo* auch eine angiogene Wirkung gezeigt werden konnte, möglicherweise als Folge der Infiltration von Leukozyten, die angiogene Wachstumsfaktoren freisetzen können (Frater-Schroder *et al.*, 1987).

Die Regulation der zellulären Antworten von Endothelzellen auf TNF- α erfolgt über bestimmte Signalwege, die über die Bindung von TNF- α an zwei TNF-Oberflächenrezeptoren, TNFR-1 und TNFR-2, aktiviert werden (Wallach *et al.*, 1999). In Endothelzellen wird die spezifische Wirkung von TNF- α dabei hauptsächlich über den TNFR-1 vermittelt, der größtenteils im Golgi lokalisiert ist (Loetscher *et al.*, 1993; Madge und Pober, 2001). Obwohl beide Rezeptoren zur Aktivierung von unabhängigen Signalwegen führen, scheint TNFR-2 primär für die schnelle Liganden-Bindung und zum Weiterleiten von löslichem TNF- α zu TNFR-1 verantwortlich zu sein. Die Liganden-induzierte Aktivierung des TNFR-1 führt zur Bindung eines zytosolischen Adapterproteins, dem sogenannten *TNF receptor-1-associated death domain protein* (TRADD) an die intrazelluläre Domäne des Rezeptors (Hsu *et al.*, 1995; Madge und Pober, 2001). Nach Aktivierung weiterer Signalmoleküle werden sowohl durch TNF- α als auch durch IL-1 die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 aktiviert. Diese Aktivierung ist notwendig für die Expression der Leukozyten-Adhäsionsmoleküle E-Selektin, *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) und *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1), wodurch die Adhäsion von Neutrophilen am Endothel vermittelt wird (Madge *et al.*, 1999).

Interferone sind eine Gruppe von Zytokinen, die ursprünglich als antivirale Substanzen beschrieben wurden und speziell bei der Etablierung einer effektiven Infektionsabwehr eine wesentliche Rolle spielen. Sie werden unterteilt in Typ I – Interferone (IFN- α , IFN- β) und Typ II – Interferone (IFN- γ); (Pepper *et al.*, 1996). Interferon- γ (IFN- γ) war das erste molekular identifizierte Zytokin, das eine Wirkung auf Endothelzellen zeigte (Pober *et al.*, 1983). In seiner nativen Form als ein 40 kDa homodimeres Glycoprotein wird es von aktivierten T-Zellen als Teil der

Immunantwort freigesetzt (Pober und Cotran, 1990a). IFN- γ bewirkt eine erhöhte Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 (Pober *et al.*, 1986) und *endothelial leucocyte adhesion molecule -1* (ELAM-1); (Leeuwenberg *et al.*, 1990) sowie von Antigenen des *major histocompatibility complex* (MHC), der Klasse I und II (Ahmed *et al.*, 2003; Mantovani *et al.*, 1992; Mantovani *et al.*, 1997; Pober und Cotran, 1990a). Daneben erhöht IFN- γ selektiv die Adhäsion von Lymphozyten auf dem Endothel, wohingegen andere Leukozytenpopulationen nicht verstärkt adhäreren (Hughes *et al.*, 1988; Yu *et al.*, 1985). IFN- γ inhibiert das endotheliale Zellwachstum (Friesel *et al.*, 1987) und führt zu Veränderungen der Morphologie, wobei die Endothelzellen eine fibroblastoide Form bekommen, sich verlängern, überlappen und eine Reorganisation des Aktingerüsts aufweisen (Stolpen *et al.*, 1986). Diese morphologischen Veränderungen von Endothelzellen werden nicht nur durch IFN- γ sondern auch durch die inflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α induziert (Cotran und Pober, 1990). In Kombination mit TNF- α wird die Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1, ELAM-1 sowie der Antigene der MHC-Klasse I in Endothelzellen synergistisch verstärkt, zudem verändert sich die Morphologie der Zellen zu einem dendritischen Phänotyp (Cotran und Pober, 1990; Doukas und Pober, 1990; Johnson und Pober, 1990).

In bezug auf ihre Wirkung auf Endothelzellen kann zusammenfassend bemerkt werden, dass die inflammatorischen Zytokine IL-1 β , TNF- α und IFN- γ die endotheliale Zellproliferation inhibieren und zu Veränderungen des Phänotyps und der Genexpression von Endothelzellen führen (Maier *et al.*, 1999). IL-1 β und TNF- α erhöhen zudem die Adhäsionsfähigkeit für Leukozyten auf Endothelzellen sowie die Permeabilität der endothelialen Zellschicht. IFN- γ spielt eine entscheidende Rolle in der Immunantwort; es induziert die Expression von MHC-Klasse I- und II-Antigenen und erhöht zudem die Adhäsionsfähigkeit von Lymphozyten auf Endothelzellen.

1.4 Das humane Guanylatbindungsprotein-1 (GBP-1)

Wie bereits erwähnt, spielt die Aktivierung von Gefäßendothelzellen, die durch exogene Faktoren wie inflammatorische Zytokine und angiogene Wachstumsfaktoren gesteuert wird, bei verschiedenen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen eine wichtige Rolle (Folkman, 1995; Mantovani *et al.*, 1992).

Kürzlich wurde in unserem Labor mit Hilfe der differentiellen *display* – RT-PCR (DDRT-PCR) ein Gen identifiziert, dessen Expression in mikrovaskulären

Endothelzellen (MVEC) durch IZ wie IL-1 α , IL-1 β , IFN- γ oder TNF- α induziert und durch angiogene Wachstumsfaktoren (AWF) wie bFGF oder VEGF gehemmt wird (Cornali, 1999; Guenzi *et al.*, 2001). Das isolierte Gen kodiert für das humane Guanylatbindungsprotein -1 (GBP-1).

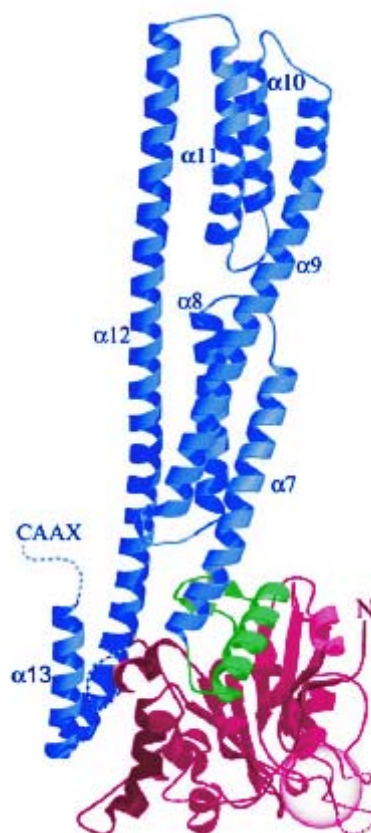
GBP-1 wurde ursprünglich als ein Interferon-induzierbares Protein in humanen Fibroblasten entdeckt (Cheng *et al.*, 1983). In diesen Zellen induzieren alle Interferone (IFN- α , β , γ) die Expression von GBP-1, wobei die Behandlung mit IFN- γ die Expression von GBP-1 am stärksten induziert (Cheng *et al.*, 1983).

Die meisten Interferon-induzierten und -regulierten Enzyme reagieren mit Nukleotiden oder Nukleinsäuren (Cheng *et al.*, 1983). Durch Untersuchungen mit Agarose-gekoppelten Nukleotiden konnte auch für GBP-1 eine Bindungsaffinität für die Guanidinnukleotide GTP, GDP und GMP nachgewiesen werden (Cheng *et al.*, 1983). GBP-1 gehört zur Gruppe der großen GTP-bindenden Proteine, wie Dynamin und Mx-Protein (Prakash *et al.*, 2000a). Mx-Proteine vermitteln die antivirale Wirkung der Typ 1 (α/β) Interferone, wobei humanes MxA eine hohe antivirale Aktivität speziell gegen negativ- und positivsträngige RNA-Viren besitzt (Arnheiter *et al.*, 1990; Di Paolo *et al.*, 1999; Hefti *et al.*, 1999; Pavlovic *et al.*, 1995). Auch für GBP-1 konnte eine antivirale Wirkung nachgewiesen werden. So wurde gezeigt, dass GBP-1 die Replikation des vesikulären Stomatitis Virus (VSV) und des Enzephalomyokarditis-Virus (EMV) in HeLa-Zellen blockiert (Anderson *et al.*, 1999). Die GTPase Dynamin ist notwendig für die rezeptorvermittelte Endozytose und kontrolliert speziell die Bildung von klathrinumhüllten Vesikeln (Sever *et al.*, 2000). Die gemeinsamen Merkmale der großen GTPasen Dynamin, Mx-Protein und GBP-1 sind eine ähnliche Molekularstruktur, eine konzentrationsabhängige GTPase-Aktivität sowie ihre Fähigkeit zur Oligomerisierung (Prakash *et al.*, 2000a).

Es wurde postuliert, dass große GTPasen im Sinne mechanochemischer Enzyme, je nach Bindung und Hydrolyse von GTP, wie molekulare Schalter agieren können (Kochs und Haller, 1999). Im Vergleich zur kleinen GTPase Ras und heterotrimeren GTP-bindenden Proteinen weist GBP-1 eine relativ niedrige Affinität zu Guaninnukleotiden auf, ist stabil in deren Abwesenheit und zeigt eine sehr starke GTPase-Aktivität (Praefcke *et al.*, 1999; Schwemmle und Staeheli, 1994). So liegt zum Beispiel die intrinsische GTPase-Reaktionsrate von Ras-Proteinen in einem Bereich von 0,001-0,1 min⁻¹, während GBP-1 über eine Reaktionsrate bis zu 80 min⁻¹ verfügt (Prakash *et al.*, 2000a). GBP-1 besitzt außerdem die Fähigkeit, neben GTP

und GDP auch GMP mit gleicher Affinität zu binden, während die meisten GTP-bindenden Proteine, GMP um ein Vielfaches weniger stark binden als GDP und GTP (Praefcke *et al.*, 1999). GBP-1 hydrolysiert GTP nicht nur zu GDP, sondern über zwei aufeinanderfolgende Phosphatabspaltungen auch zu GMP (Schwemmle und Staeheli, 1994).

Anhand seiner dreidimensionalen Struktur kann GBP-1 in zwei annähernd gleichgroße Domänen unterteilt werden, eine kompakte globuläre α,β -Domäne (Abb. 3, rot, Aminoterminus bis Aminosäure 278) und eine lange, rein aus α -Helices bestehende helikale Domäne (Abb. 3, blau, Aminosäure 306 bis Carboxyterminus).



(Prakash *et al.*, 2000a)

Abb. 3: Dreidimensionale Struktur des humanen Guanylatbindungsproteins-1 (GBP-1): globuläre α,β -Domäne mit GTPase-Funktion (rot), helikale Domäne mit CaaX-Isoprenylierungsmotiv (blau) und Verbindungsregion zwischen globulärer und helikaler Domäne (grün); (Prakash *et al.*, 2000a).

Die Domänen sind verbunden über eine kurze Aminosäuresequenz, die aus einer α -Helix und zwei β -Faltblättern besteht (Abb. 3, grün, Aminosäure 279 bis 305) und an der Stabilisierung der relativen Lage beider Domänen zueinander beteiligt sein könnte (Prakash *et al.*, 2000a).

GBP-1 verfügt wie die meisten GTP-bindenden Proteine über ein dreiteiliges Guaninbindungsmotiv, welches sich in der globulären Domäne befindet. An den ersten beiden Motiven, GxxxxGK(S/T) (GLYRTGKS, Aminosäuren 45 bis 52) und DxxG (DTEG, Aminosäure 97 bis 100) findet die Bindung der Phosphatgruppe statt (Cheng *et al.*, 1991), während das dritte Motiv (N/T)KxD (TLRD, Aminosäuren 181 bis 184) spezifisch für die Bindung der Guaninbase verantwortlich ist (Praefcke *et al.*, 1999). Ein Aminosäureaustausch von Aspartat zu Asparagin im dritten Motiv (D₁₈₄N) führt zu einer starken Abnahme der Affinität für Guanin und deaktiviert dadurch die GTPase-Funktion (Praefcke *et al.*, 1999). An seinem Carboxyterminus trägt GBP-1 ein CaaX-Motiv, welches als Isoprenylierungssignal fungiert und zur Isoprenylierung von GBP-1 *in vivo* und *in vitro* führt (Nantais *et al.*, 1996; Schwemmler und Staeheli, 1994). Die Proteinisoprenylierung ist eine der ersten post-translationalen Modifikationen, es erhöht die Hydrophobie des modifizierten Proteins, und unterstützt so die Membranassoziiierung von Proteinen, denen ein Membranbindungsmotiv fehlt (Nantais *et al.*, 1996; Schwemmler und Staeheli, 1994).

Zur Funktion von GBP-1 war bisher wenig bekannt. Anderson *et al.* konnten für GBP-1 eine antivirale Wirkung gegen VSV und EMV in HeLa-Zellen nachweisen (Anderson *et al.*, 1999). In unserem Labor konnte gezeigt werden, dass die Expression von GBP-1 spezifisch durch IZ, jedoch nicht durch AWF, in Endothelzellen induziert wird (Cornali, 1999; Guenzi *et al.*, 2001; Lubeseder-Martellato *et al.*, 2002). Dieser Befund legt nahe, dass GBP-1 die antiproliferative Wirkung von IZ auf Endothelzellen vermitteln könnte.

1.5 Zelluläre Signalwege und programmierter Zelltod (Apoptose)

Eine Inhibierung der endothelialen Zellproliferation durch GBP-1 könnte zum einen durch die Induktion von Apoptose in den Endothelzellen erfolgen oder aber durch einen Einfluss auf proliferationsaktivierende oder –deaktivierende Signalwege in der Zelle. Die grundlegenden Abläufe der Apoptose sowie die wichtigsten Signalwege der Zelle werden im Folgenden kurz vorgestellt.

1.5.1 Apoptose

Während der Apoptose, dem Prozess des programmierten Zelltods, aktiviert die Zelle eine intrinsische Suizidmaschinerie, die zur systematischen Zerstörung der Zelle führt. Die Zelloberfläche bekommt Ausstülpungen, phagozytische Signale werden

exprimiert, die Zelle schrumpft und verliert den Kontakt zu den Nachbarzellen (Fraser und Evan, 1996). Schließlich wird der Zellkern aufgelöst, das Chromatin kondensiert und gespalten und die einzelnen Zellfragmente werden in membrangebundene Vesikel verpackt (Kerr *et al.*, 1972). Diese Membranvesikel, *apoptotic bodies* genannt, werden durch benachbarte Zellen phagozytiert und rasch degradiert, wodurch inflammatorische Prozesse vermieden werden (Earnshaw, 1995; Fraser und Evan, 1996; Kerr *et al.*, 1972). Eingeleitet werden kann die Apoptose durch intrinsische Signale während der normalen Entwicklung, zum Beispiel bei Zellen, welche ihre Funktion erfüllt haben oder aufgrund eines Alterungsprozesses nicht mehr voll funktionstüchtig sind (Mallat und Tedgui, 2000). Extrinsische Signale, die zur Apoptose führen, sind unter anderem inflammatorische Zytokine, Hormone, UV- oder ionisierende Strahlung, bestimmte Chemikalien, freie Sauerstoffradikale oder der Entzug von Nährstoffen und Wachstumsfaktoren (Mallat und Tedgui, 2000; Nagata, 2000).

1.5.2 MAPK-Signalwege

Eukaryotische Zellen antworten auf viele extrazelluläre Stimuli durch die Aktivierung von MAPK-Wegen, die die Umwandlung von extrazellulären Signalen in intrazelluläre Antworten gewährleisten (Cano und Mahadevan, 1995).

Zu den drei Haupt-MAPK-Signalwegen (Abb. 4) gehören die durch extrazelluläre Signale regulierten Kinasen (ERK), ERK1 und ERK2, die MAPK p38 und die stressaktivierten Proteinkinase (SAPK) c-Jun-NH₂-terminalen Kinasen (SAPK/JNK); (Davis, 2000; Platanias, 2003). Die Übertragung extrazellulärer Reize erfolgt zunächst über die Aktivierung von membranassoziierten Tyrosinkinase-Rezeptoren. Durch die Bildung eines aktivierten Rezeptorkomplexes wird eine Signaltransduktionskaskade angeregt, die zur Aktivierung der MAPK führt, die im aktivierten Zustand in den Zellkern geht und dort durch Phosphorylierung bestimmte Transkriptionsfaktoren aktiviert (Sugden und Clerk, 1997). Dadurch wird eine Verbindung zwischen Signal, Zytoplasma und Nukleus geschaffen, indem Stimulation mit der Änderung der Genexpression gekoppelt wird (English *et al.*, 1999).

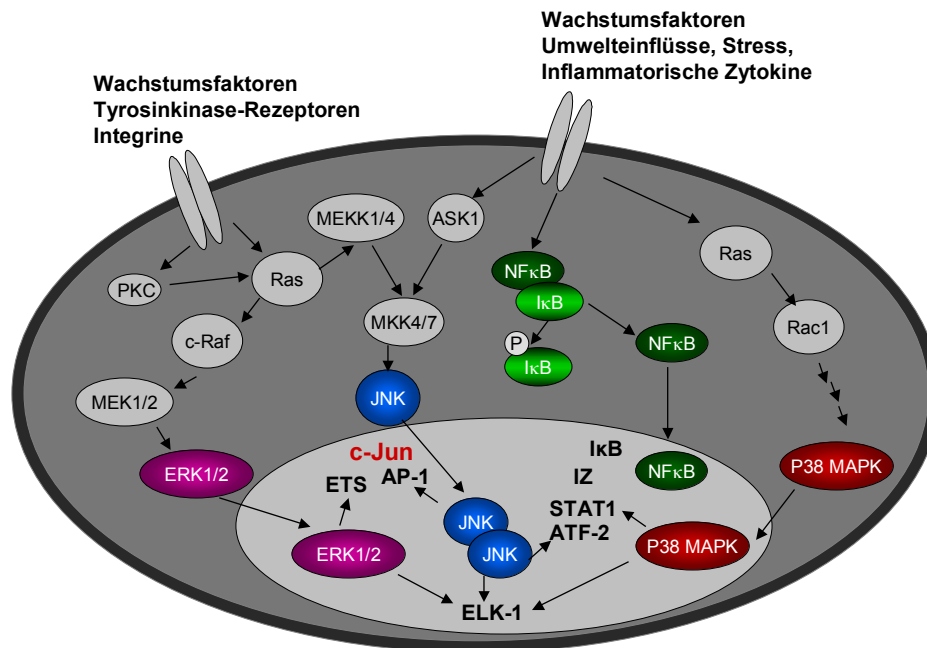


Abb. 4: Schematische Darstellung der wichtigsten Signalwege in der Zelle. Es wurde untersucht, ob die Expression von GBP-1 einen Einfluss auf die Aktivierung der MAPK-Signalwege ERK1/2, p38 und SAPK/JNK sowie des Transkriptionsfaktors NF-κB hat. Die einzelnen Moleküle der Signalwege, die auf ihre Aktivierung untersucht wurden, sind farbig dargestellt: ERK1/2 (violett), p38 (ziegelrot), SAPK/JNK (blau), c-Jun (rot) und NF-κB (grün).

1.5.2.1 Aktivierung der MAPK ERK1/2

Die Aktivierung des MAPK-Signalweges Ras-Raf-MEK-ERK1/2 (Abb. 4) kann durch eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, Hormonen, Differenzierungsfaktoren und tumorfördernden Faktoren erfolgen (Lewis *et al.*, 1998). Dabei werden solche fundamentalen zellulären Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Überleben oder programmierter Zelltod (Apoptose) kontrolliert. Die MAPK-Signalwege beinhalten mindestens drei aufeinanderfolgende Proteinkinasen, die zusammen ein Kinase-Modul bilden (English *et al.*, 1999). Die wesentlichen intrazellulären Komponenten beinhalten ein G-Protein, welches eine Serin/Threonin-spezifische MAPK-Kinase (MAPKKK) phosphoryliert, die wiederum eine MAPK-Kinase (MKK) phosphoryliert, die dadurch eine MAPK aktiviert (English *et al.*, 1999; Sugden und Clerk, 1997). Nach Ligandenbindung und Rezeptoraktivierung binden zunächst Adapterproteine, wie *Src-homology collagen* (Shc) und *growth factor receptor-binding protein 2* (Grb2) an den Rezeptor und vermitteln dadurch die Aktivierung der membranständigen GTPase Ras, was durch den Austausch von GDP zu GTP in diesem Molekül geschieht (McCormick, 1993; Schlessinger, 1993; Schlessinger,

1994). Aktiviertes Ras führt wiederum zur Aktivierung der Serin/Threoninkinase Raf, die anschließend die dualspezifischen MAPK-Kinasen MEK1/2 phosphoryliert und aktiviert (Alessi *et al.*, 1994; Huang und Erikson, 1994; Jelinek *et al.*, 1994; Kyriakis *et al.*, 1992; Zheng und Guan, 1994). Diese aktivieren ERK1/2 durch Phosphorylierung eines Thr-Glu-Tyr Motivs in der Aktivierungsschleife des Proteins (Payne *et al.*, 1991). Diese duale Phosphorylierung führt zur Aktivierung der MAPK, die daraufhin in den Zellkern transloziert und dort verschiedene Transkriptionsfaktoren phosphoryliert (Sugden und Clerk, 1997). Während Wachstumsfaktoren in der Regel ERK1/2 über den Ras-Raf-MEK-ERK1/2-Signalweg aktivieren (Cobb, 1999; Cobb und Goldsmith, 1995), kann die Aktivierung der MAPK ERK1/2 auch Ras-unabhängig über den PLC- γ -PKC-Raf-MEK-ERK1/2-Weg erfolgen, wie anhand der Stimulierung von humanen Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC) mit VEGF gezeigt werden konnte (Doanes *et al.*, 1999; Takahashi *et al.*, 1999).

Die beiden Proteine der ERK1/2-Signaltransduktionskaskade, Ras und Raf, sind als Onkogene beschrieben worden. Es überrascht daher nicht, dass dieser Signalweg Kontrollfunktionen bei der Zellproliferation, Transformation, Differenzierung und Apoptose ausübt (Lewis *et al.*, 1998).

1.5.2.2 Aktivierung der MAPK p38

Ein weiterer MAPK-Signalweg, der hauptsächlich durch Stress und inflammatorische Zytokine jedoch ebenso durch Wachstumsfaktoren aktiviert werden kann, ist die MAPK p38 (Kyriakis und Avruch, 2001). Die p38-Signalkaskade (Abb. 4) ist involviert in Entzündungsprozessen, Zellwachstum und -differenzierung, Zellzyklus und Apoptose (Ono und Han, 2000). Mittlerweile sind vier Isoformen von p38, p38 α (Han *et al.*, 1994), p38 β (Jiang *et al.*, 1996), p38 γ (oder ERK6, SAPK3) (Lechner *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1996), p38 δ (oder SAPK4); (Goedert *et al.*, 1997; Kumar *et al.*, 1997) identifiziert worden, von denen nur p38 α und p38 β ubiquitär exprimiert werden, während die beiden anderen Isoformen differentiell in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden (Ono und Han, 2000).

Die Aktivierung der p38 MAPK erfolgt über die MAPK-Kinasen (MKK), MKK3 und MKK6. Während MKK6 alle vier p38-Isoformen phosphoryliert, aktiviert MKK3 präferentiell p38 α , p38 γ und p38 δ (Keesler *et al.*, 1998). Anhand der Gene, die durch p38 reguliert werden, wird augenscheinlich, dass die p38-Signalkaskade eine wichtige Rolle bei Entzündungsprozessen einnimmt. So ist die Aktivierung von p38

wichtig für: 1) die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, wie IL-1 β , TNF- α und IL-6 (Ono und Han, 2000; Perregaux *et al.*, 1995), 2) die Induktion von Enzymen, die bei pathologischen Prozessen den Umbau des angrenzenden Gewebes kontrollieren, z.B. Cyclooxygenase-2 (Cox-2, Prostaglandin-Biosynthese); (Guan *et al.*, 1998), 3) die Expression eines intrazellulären Enzyms wie die induzierbare Stickstoffmonoxyd-Synthase (iNOS); (Badger *et al.*, 1998; Da Silva *et al.*, 1997), welches die Oxidation reguliert, 4) die Induktion von Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1 sowie einige andere entzündungsassoziierte Moleküle (Ono und Han, 2000).

In Endothelzellen wird p38 auch durch den endothelzellspezifischen Wachstumsfaktor VEGF aktiviert. Die aktivierte MAPK p38 vermittelt dabei die Induktion der Migration von Endothelzellen (Rousseau *et al.*, 1997). Zudem konnte für p38 eine proliferationsinhibierende Wirkung in HUVEC gezeigt werden (Yu und Sato, 1999). Durch Inhibierung der MAPK p38 mit einem spezifischem Inhibitor wurde dabei die Proliferation von HUVEC erhöht, was verbunden war mit der Phosphorylierung des Retinoblastom-Tumorsuppressorproteins (Rb); (Yu und Sato, 1999). Rb reguliert die Zellproliferation in der G1-Phase des Zellzyklus, wo es in seiner hypophosphorylierten Form als Transkriptionsrepressor agiert und durch Phosphorylierung den Eintritt in die S-Phase steuert (Yu und Sato, 1999).

1.5.2.3 Aktivierung der MAPK SAPK/JNK

Die c-Jun-NH₂-terminalen Kinasen (JNK), auch als stressaktivierte MAP-Kinasen (SAPK) bekannt, bilden die dritte Gruppe der MAPK (Abb. 4), die in eukaryotischen Zellen identifiziert wurden. JNK wird aktiviert durch die Behandlung von Zellen mit inflammatorischen Zytokinen, wie TNF- α und IL-1, und durch das Einwirken von verschiedenen Formen von Umweltstress, wie osmotischem Stress, Hitzeschock, UV-Strahlung, oxidativem Stress, DNA-schädigende Chemikalien (Topoisomerase-Inhibitoren und alkylierende Agenzien), mechanischem Stress und Proteinsyntheseinhibitoren wie Cycloheximid und Anisomycin (Derijard *et al.*, 1994; Ip und Davis, 1998; Kyriakis und Avruch, 1996; Kyriakis *et al.*, 1995; Pombo *et al.*, 1994). JNK kann in bestimmten Zellsystemen ebenso durch Wachstumsfaktoren, wie EGF, PDGF oder FGF aktiviert werden, die JNK im Gegensatz zu ERK1/2 jedoch nur schwach aktivieren (Kyriakis und Avruch, 1996).

Aktiviertes JNK bindet an die NH₂-terminale Aktivierungsdomäne von c-Jun (Adler *et al.*, 1992; Hibi *et al.*, 1993) und phosphoryliert dort die Aminosäuren Ser-63 und Ser-

73 (Pulverer *et al.*, 1991). Die JNK-vermittelte Aktivierung von c-Jun erhöht dessen Transkriptionsaktivität, wodurch die Expression von Genen mit *activator protein-1* (AP-1)-Bindestellen im Promotorbereich aktiviert wird. JNK phosphoryliert neben c-Jun auch andere Proteine des heterodimeren AP-1-Transkriptionsfaktorkomplexes, wie JunB, JunD und ATF-2 (Ip und Davis, 1998). AP-1 ist ein wichtiger Transaktivator für eine Reihe von Stressgenen, einschließlich IL-1 und IL-2, TNF und c-Jun. Außerdem trägt AP-1 zur transkriptionellen Aktivierung von Proteasen und Adhäsionsmolekülen bei, die bei Entzündungsprozessen eine Rolle spielen (Karin *et al.*, 1997; Kyriakis und Avruch, 2001; Read *et al.*, 1997). Im Unterschied zu ERK1/2 sind die Faktoren, die zu einer Aktivierung der JNK-Signalkaskade führen sehr zahlreich, weshalb die JNK-Signalwege an einer Vielzahl zellbiologischer Prozesse, wie Apoptose, Proliferation, Transformation, Entwicklung, Aktivierung des Immunsystems, Entzündungsreaktionen und Anpassung an Umgebungsveränderungen beteiligt sind (Davis, 2000; Kyriakis und Avruch, 2001).

Die JNK-Proteinkinasen werden durch drei separate Gene, JNK1, JNK2 und JNK3 kodiert, die durch alternatives Spleißen bis zu 10 Isoformen produzieren können (Gupta *et al.*, 1996). Die Transkripte dieser Gene kodieren für Proteine mit einer Größe von 46 bis 55 kDa. Die Aktivierung von JNK erfolgt durch die Phosphorylierung eines Thr-Pro-Tyr-Motivs durch zwei dualspezifische Proteinkinasen, MKK4 und MKK7. Dadurch kann aktiviertes JNK in den Zellkern translozieren und dort durch Phosphorylierung seine Zielproteine aktivieren (Davis, 2000).

1.5.3 Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B

Die MAPK/ERK1/2-Kinasen-Kinasen 1-4 (MEKK1-4) sind Serin/Threonin-Proteinkinasen, die in die sequentielle Proteinphosphorylierung der ERK1/2- und JNK-MAPK-Wege involviert sind (Bonvin *et al.*, 2002; Davis, 2000; Schaeffer und Weber, 1999; Widmann *et al.*, 1999). Daneben können MEKK1-3 auch den Transkriptionsfaktor NF- κ B durch die direkte Stimulierung der I κ B-Kinase aktivieren (Lee *et al.*, 1997; Nemoto *et al.*, 1998; Zhao und Lee, 1999).

NF- κ B (Abb. 4) ist ein dimerer Transkriptionsfaktor, der in ruhenden, unstimulierten Zellen im Zytoplasma lokalisiert ist, nach Aktivierung in den Zellkern transloziert, an entsprechende Signalsequenzen in Promotorbereichen bindet und die Genexpression induziert (Pahl, 1999). Die Aktivierung von NF- κ B erfolgt

hauptsächlich durch eine Reihe stressauslösender Faktoren, darunter Virusinfektionen, bakterielle Lipide, Parasiten, UV-Strahlung, mechanischer und oxidativer Stress, inflammatorische Zytokine und DNA-Schäden (Pahl, 1999). NF- κ B induziert die Expression sehr unterschiedlicher Gene, einschließlich viraler Gene (HIV-1, CMV) und Gene, die für Adhäsionsmoleküle, inflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren, Chemokine und antiapoptotische Proteine kodieren (Pahl, 1999). Neben den zahlreichen stressauslösenden Faktoren, kann NF- κ B auch durch Mitogene, Wachstumsfaktoren und Hormone aktiviert werden (Li und Stark, 2002; Pahl, 1999). In bestimmten Zellen vermittelt es eine antiapoptotische Wirkung oder induziert die Zellproliferation und die Zellzyklusprogression durch die Steuerung der Expression entsprechender Regulatorgene wie *c-myc* und *cyclin D1* (Pahl, 1999; Rayet und Gelinas, 1999).

Die Aktivierung von NF- κ B ist somit auch bei Tumorerkrankungen von entscheidender Bedeutung. So wird die Expression von Genen, die für Invasion und Metastasierung notwendig sind und für VEGF, Matrixmetalloproteinasen und Zelladhäsionsmoleküle, wie z.B. ICAM-1 kodieren, durch NF- κ B induziert (Li und Stark, 2002).

Die DNA-bindende dimere Form von NF- κ B kann aus fünf verschiedenen Untereinheiten von NF- κ B: NF- κ B1 (p50 und dessen Vorläufer p105), NF- κ B2 (p52 und dessen Vorläufer p100), c-Rel, RelB und RelA (p65) gebildet werden, wobei die am häufigsten auftretende Form ein p50-p65-Heterodimer ist. In unstimulierten Zellen wird NF- κ B durch die Assoziation mit einem Mitglied der Inhibitorproteinfamilie, I κ B, im Zytoplasma zurückgehalten, da durch die Interaktion mit I κ B die Kernlokalisierungssequenz von NF- κ B verdeckt wird (Denk *et al.*, 2001; Schmitz *et al.*, 2001). Nach Stimulierung mit NF- κ B-aktivierenden Faktoren wird I κ B phosphoryliert und nach anschließender Ubiquitinierung im Proteasom abgebaut. Dadurch kann NF- κ B in den Zellkern translozieren und an entsprechende DNA-Sequenzen in der Promotorregion seiner Zielgene binden und somit deren Transkription einleiten (Denk *et al.*, 2001).

1.5.4 Kalzium – ein wichtiger Botenstoff bei der Regulation zellulärer Prozesse

Ein weiterer wichtiger Regulator zellulärer Prozesse, wie Proliferation, Invasion, Differenzierung, Sekretion und Apoptose ist der intrazelluläre Botenstoff Kalzium (Ca^{2+}); (Berridge *et al.*, 2000; Kohn *et al.*, 1995). Zytosolisches Kalzium spielt bei vielen Signaltransduktionswegen eine wichtige Rolle und reguliert zelluläre Aktivitäten von der Zellteilung bis zum Zelltod. Die Erhöhung des zytosolischen Kalziumgehaltes ist dabei zeitlich und örtlich begrenzt (Bootman *et al.*, 2002). Abhängig vom Zelltyp und der Art der Stimulierung können Kalziumsignale transient oder oszillatorisch sein und entweder als lokalisierte oder globale Ereignisse auftreten (Bootman *et al.*, 2001b). Anhand der Vielfalt zellulärer Kalziumsignale ist es nicht überraschend, dass es eine Reihe unterschiedlicher Moleküle und Kanäle gibt, die zu einer Erhöhung des intrazellulären Kalziumgehaltes führen (Bootman *et al.*, 2002).

Verschiedene extrazelluläre Stimuli beziehungsweise intrazelluläre Moleküle bewirken eine Erhöhung der freien intrazellulären Kalziumkonzentration durch den Einstrom von Kalzium aus dem extrazellulären Raum oder durch Freisetzen von Kalzium aus intrazellulären Speichern (Berridge *et al.*, 2000; Bootman *et al.*, 2002). So werden zum Beispiel durch die Bindung von Wachstumsfaktoren, wie VEGF, an spezifische Tyrosinkinase-Rezeptoren, Signalwege eingeleitet, die zur Aktivierung der Zellproliferation führen. Zu den intrazellulären Aktivatoren der Kalziumerhöhung gehört unter anderem das Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3), Stickstoffmonoxid (NO), Sphingosin, Diacylglycerin, Arachidonsäure und Kalzium. Einige dieser Moleküle bedingen nur die intrazelluläre Freisetzung von Kalzium andere nur den Kalziumeinstrom, während die meisten aber an Kalziumfreisetzung und –einstrom beteiligt sind (Bootman *et al.*, 2002). In ruhenden Zellen liegen intrazelluläre Kalziumkonzentrationen von ca. 100 nM vor, die bei Stimulierung der Zellen durch Depolarisierung, mechanische Einflüsse, Wachstumsfaktoren oder Hormone auf das 10fache (1000 nM) ansteigen können (Berridge *et al.*, 2000). Unter den frühen Ereignissen, die durch Wachstumsfaktoren induziert werden, spielt die Erhöhung des zytosolischen Kalziumgehaltes, insbesondere durch den Einstrom von Kalzium aus dem extrazellulären Raum, eine wichtige Rolle (Berridge, 2001; Lansdown, 2002). Diese Kalziumsignale sind wiederum notwendig, um die Proliferationsaktivierung durch Wachstumsfaktoren zu induzieren. Dabei werden zum Beispiel durch die Kalziumsignale Gene aktiviert, die den Eintritt von ruhenden Zellen aus der G0-

Phase in die G1-Phase des Zellzyklus forcieren. Des weiteren spielt Kalzium bei der Einleitung der DNA-Synthese am Übergang von G1/S sowie bei der Stimulation der Transkription bestimmter Gene beim Eintritt in die Mitosephase eine wichtige Rolle (Berridge, 1995).

1.6 Ziele dieser Arbeit

Angiogene Wachstumsfaktoren, wie der vaskuläre Endothelzell-Wachstumsfaktor (VEGF) und der basische Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF), aktivieren die Proliferation von Endothelzellen, während inflammatorische Zytokine die Proliferation von Endothelzellen hemmen und die Adhäsion von Monozyten auf dem Endothelgewebe aktivieren.

Kürzlich wurde in unserem Labor ein Gen identifiziert, dessen Expression in Endothelzellen durch die inflammatorischen Zytokine, IL-1 β , TNF- α und IFN- γ , jedoch nicht durch die angiogenen Wachstumsfaktoren bFGF und VEGF induziert wird. Dieses Gen kodiert für das humane Guanylatbindungsprotein-1 (GBP-1). Anhand erster Ergebnisse konnte bereits gezeigt werden, dass GBP-1 maßgeblich an der Proliferationsinhibierung von Endothelzellen durch inflammatorische Zytokine beteiligt ist. Die Proliferation von Endothelzellen ist einer der wichtigsten Teilprozesse der Angiogenese.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden vier Ziele verfolgt:

1) Es sollte untersucht werden, ob die antiproliferative Wirkung der inflammatorischen Zytokine, IL-1 β , TNF- α und IFN- γ auf primäre humane makro- und mikrovaskulären Endothelzellen, mit der Expression von GBP-1 korreliert.

Aus der vorangegangenen Arbeit im Labor war bekannt, dass alle drei dieser IZ die Expression von GBP-1 auf RNA-Ebene induzieren. Durch weiterführende Analysen sollten diese Ergebnisse auf Proteinebene bestätigt und detaillierter in Hinblick auf Konzentrationsabhängigkeit und kombinierter Wirkung von IZ und AGF auf die Proliferation und GBP-1-Expression untersucht werden.

2) Durch die konstitutive Expression von GBP-1 sowie durch Hemmung der GBP-1-Expression mittels konstitutiver Expression einer *antisense* GBP-1 mRNA in Endothelzellen, sollte analysiert werden, ob GBP-1 den antiproliferativen Effekt inflammatorischer Zytokine auf Endothelzellen vermittelt. Mit Hilfe konstitutiv GBP-1-exprimierender Endothelzellen sollte zudem untersucht werden, ob GBP-1 in

Endothelzellen Apoptose induziert und/oder die morphologischen Eigenschaften dieser Zellen beeinflusst.

3) Da bisher noch nichts über den Wirkmechanismus dieses Proteins bekannt war, sollten zudem die zellulären Signalwege untersucht werden, die die Proliferationsinhibierung durch GBP-1 steuern könnten.

4) Durch die Struktur-/Funktionsanalyse von GBP-1 sollte der proliferationsinhibierende Bereich des Proteins eingegrenzt werden, beziehungsweise geklärt werden, welches Motiv oder welche Domäne des Proteins für die antiproliferative Wirkung verantwortlich ist.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Acrylamid / N,N – Methylenbisacrylamid (29:1)	BioRad
Agarose (DNA)	Peqlab
Agarose (RNA)	Life Technologies
Ammoniumpersulfat	Sigma
Ampicillin	Sigma
AMP-PNP	Roche
Antibiotika/Antimykotika	Life Technologies
<i>background reducing component</i>	Dako
Bacto-Agar	Difco
bFGF	Roche
bisBenzimid (Hoechst 33342)	Sigma
5-Brom-6-Chlor-3-Indolyl-beta-D-galaktosid (X-Gal)	Roche
<i>CompleteMini-Tabletten</i>	Roche
Coomassie-Färbelösung	BioRad
DAB (3,3'-Diaminobenzidin)	Biogenex
Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP)	Roche
Dextransulfat	Sigma
4',6'-Diamino-2-phenylindol (DAPI)	Molecular Probes
Diethylpyrokarbonat (DEPC)	Roth
D,L-Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
DMEM-Medium	Life Technologies
DNA-Isolierungs-Kit (QIAPREP)	Qiagen
DNA-Längenstandard	MBI Fermentas
Endothelzell-Basalmedium	Cambrex
ECL-Nachweissystem (Filme, Reagenzien)	Amersham Pharmacia
Eisessig	Riedel-de-Haen
Ethidiumbromid	Roth
Fötale Rinderserum (FCS)	Life Technologies
Fura-2 AM	Molecular Probes

Gelatine	Sigma
Gel-Blotting-Papier	Schleicher und Schuell
<i>Gill-3 hematoxylin</i>	Shandon
L-Glutamin	Life Technologies
Glutaraldehyd	Serva
Guanosin- 5'-triphosphat (GTP)	Amersham Pharmacia
Hefeextrakt	Difco
Histamin	Sigma
HIV-1-Tat-GBP-1-Fusionspeptide	Biosyntan
Hybond N ⁺ -Membran (Nylon)	Amersham Pharmacia
Hybond P-Membran (PVDF)	Amersham Pharmacia
Immu-Mount	Shandon
<i>In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein</i>	Roche
IFN- γ	Roche
IL-1 β	Roche
Isopropyl- β -D-Thiogalaktopyranosid (IPTG)	BioRad
Kanamycin	Invitrogen
Matrigel (growth factor reduced matrigel)	Becton Dickinson
<i>Mixed bed resin</i>	Sigma
MOPS	Sigma
Natrium-Laurylsarkosyl	Serva
<i>Ni-NTA-Superflow</i>	Qiagen
<i>PCR-Purification Kit</i>	Qiagen
PEI-Dünnschichtchromatographie-Platten	Macherey-Nagel
Penicillin/Streptomycin	Life Technologies
Phenylmethylsulfoxid (PMSF)	Sigma
Ponceau S – Lösung	Sigma
Protein-Molekulargewichtsmarker	Amersham Pharmacia
QIAEX II	Qiagen
RNAasin	Promega
<i>RNeasy-Kit</i>	Qiagen
RPMI 1640-Medium	Life Technologies
SDS	Roth
sssDNA (sonifizierte Heringsspermien-DNA)	Roche

TCEP	Fluka
TEMED	BioRad
TNF- α	Roche
tRNA aus <i>E.coli</i>	Roche
Trypton	Difco
VEGF	R&D Systems
Ziegenserum	Jackson ImmunoResearch

Alle sonstigen Chemikalien wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen und waren von analytischem Reinheitsgrad.

2.1.2 Enzyme

DNase I (<i>DNase free</i>)	Ambion
Restriktionsenzyme	Roche, New England Biolabs
<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>	USB
T4-DNA-Ligase	Roche
Taq-Polymerase	Perkin Elmer
rTh-Polymerase	Perkin Elmer
Pfu Turbo DNA-Polymerase	Stratagene
Trypsin/EDTA	Life Technologies

2.1.3 Radiochemikalien

[α 32 P]-GTP (2000 Ci/mmol)	Amersham Pharmacia
[α 32 P]-dCTP (3000 Ci/mmol)	Hartmann Analytic

2.1.4 Primäre polyklonale Antikörper

Primärer Antikörper	Spezies	Verwendung	Herkunft
Anti-human GBP-1/1 (α -GBP-1/1)	Kaninchen	WB: 1:1000	C.Lubeseder-Martellato
Anti-human GBP-1/3 (α -GBP-1/3)	Kaninchen	WB: 1:5000	C.Lubeseder-Martellato
Anti-Aktin (α -Aktin)	Kaninchen	WB: 1:1000	Sigma
Anti-cJun (α -c-Jun)	Kaninchen	WB: 1:1000	New England Biolabs
Anti-Phospho-cJun (α -Phospho-c-Jun)	Kaninchen	WB: 1:1000	New England Biolabs
Anti-Phospho-ERK1/2 (α -Phospho-ERK1/2)	Kaninchen	WB: 1:1000	New England Biolabs
Anti-p38 (α -p38)	Kaninchen	WB: 1:1000	New England Biolabs
Anti-Phospho-p38 (α -Phospho-p38)	Kaninchen	WB: 1:1000	New England Biolabs
Anti-NF- κ B (α -NF- κ B)	Kaninchen	IC: 1:200	Zymed
Anti-SAPK/JNK (α -SAPK/JNK)	Kaninchen	WB: 1:1000	New England Biolabs
Anti-Phospho-SAPK/JNK (α -Phospho-SAPK/JNK)	Kaninchen	WB: 1:1000	New England Biolabs
Anti-I κ B- α (α -I κ B- α)	Kaninchen	WB: 1:1000	New England Biolabs
Anti-Phospho-Raf (α -Phospho-Raf)	Kaninchen	WB: 1:1000	New England Biolabs

2.1.5 Primäre monoklonale Antikörper

Primärer Antikörper	Spezies	Verwendung	Herkunft
Anti-CD95 (FasL) (α -CD95)	Maus	Apoptoseinduktion, 0,1 μ g/ml	Dianova

Anti-Caspase-3 (α -Caspase-3)	Ratte	WB: 1:350	Zymed
Anti-GAPDH (α -GAPDH)	Maus	WB: 1:10000 bis 1:30000	Chemicon
Anti-human GBP-1; 1B1	Ratte	WB: 1:500; IC: 1:100	C.Lubeseder-Martellato

2.1.6 Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Spezies	Verwendung	Herkunft
Anti-Maus IgG–HRP	Schaf	WB: 1:5000	Amersham Pharmacia
Anti-Kaninchen IgG-HRP	Esel	WB: 1:5000	Amersham Pharmacia
Anti-Ratte IgG-HRP	Ziege	WB: 1:5000	Dianova
Anti-Kaninchen-AlexaFluor 288-IgG	Ziege	IC: 1:500	Molecular Probes
Anti-Ratte-AlexaFluor 546-IgG	Ziege	IC: 1:500	Molecular Probes
Biotinyliertes Anti-Ratte IgG	Pferd	IC: 1:500	ABC-kit, Vector Laboratories

2.1.7 Vektoren und Plasmide

Vektor:	Resistenz:	Herkunft:
pcDNA3	Ampicillin	Invitrogen
pBabePuro	Puromycin	(Morgenstern und Land, 1990)
pQE60	Ampicillin	Qiagen
pQE9	Ampicillin	Qiagen

Plasmid	Insert	Fragment	Referenz	Beschreibung
pQE9-GBP-1	GBP-1	1,8 kb	C. Lubeseder-Martellato	His ₆ -GBP-1

pQE60-GBP-1	GBP-1	1,8 kb	C. Lubeseder-Martellato	GBP-1- His ₆
pQE60-D ₁₈₄ N	GBP-1-D ₁₈₄ N	1,8 kb	diese Arbeit	D ₁₈₄ N-His ₆
pBabe-GBP-1	GBP-1	1,8 kb	E.Cornali	GBP-1
pBabe-AS-GBP-1	AS-GBP-1	1,8 kb	E.Cornali	antisense-GBP-1
pBabe-D ₁₈₄ N	GBP-1-D ₁₈₄ N	1,8 kb	diese Arbeit	Mutation im dritten GTP-bindungsmotiv D ₁₈₄ N
pBabe-ΔCaaX	GBP-1-ΔCaaX	1,8 kb	diese Arbeit	Deletion der CaaX-Box
pBabe-Glo	GBP-1-Glo	870 bp	diese Arbeit	Globuläre Domäne
pBabe-Hel	GBP-1-Hel	912 bp	diese Arbeit	Helikale Domäne
pBabe-α789 ^{1/2}	GBP-1-α789 ^{1/2}	276 bp	diese Arbeit	α-Helixbündel der α-Helices 7,8,9 ^{1/2}
pBabe-α7-11	GBP-1-α7-11	498 bp	diese Arbeit	α-Helices 7-11
pBabe-α9 ^{1/2} -12	GBP-1-α9 ^{1/2} -12	345 bp	diese Arbeit	α-Helices 9 ^{1/2} -12
pBabe-α9 ^{1/2} -11	GBP-1-α9 ^{1/2} -11	225 bp	diese Arbeit	α-Helixbündel der α-Helices 9 ^{1/2} -11
pBabe-α10/11	GBP-1-α10/11	159 bp	diese Arbeit	α-Helices 10,11
pBabe-α12/13	GBP-1-α12/13	327 bp	diese Arbeit	α-Helices 12,13

2.1.8 HIV-1-Tat-GBP-1-Fusionspeptide

Aminosäuresequenzen:

Peptid-1: NH₂-YGRKKRRQRRR-GYRLFVQKLQDLKKKYYE-COOH

Peptid-1-FITC: FITC-Ahx-YGRKKRRQRRR-GYRLFVQKLQDLKKKYYE-COOH

Peptid-3: NH₂-YGRKKRRQRRR-GIYSKPGEPKGIQDQTLT-COOH

Peptid-3-FITC: FITC-Ahx-YGRKKRRQRRR-GIYSKPGEPKGIQDQTLT-COOH

Peptid-1-FITC und Peptid-3-FITC wurden durch das Anfügen von Fluoresceinisothiocyanat (FITC) an den Aminoterminus modifiziert.

2.1.9 Biologisches Material

2.1.9.1 Bakterienstämme

XL1-Blue	Stratagene <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI^f ZΔM15 Tn10 (Tet^r)</i>]
M15 [pRep4]	Qiagen <i>nal^s str^s rif^s thi⁻ lac⁻ ara⁺ gal⁺ mtI⁻ f⁻ recA⁺ uvr⁺ lon⁺</i>

2.1.9.2 Eukaryontische Zellen

Primäre Zellen

mikrovaskuläre Endothelzellen: humane dermale Endothelzellen (HMVEC)

makrovaskuläre Endothelzellen: humane Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC)

Zelllinien

pG13/J7	Verpackungszelllinie zur Produktion von Viruspartikeln (Miller <i>et al.</i> , 1991)
M 7/3	Kaposi-Sarkom-Zelllinie, (Münchener Patient 7 mit AIDS assoziiertem Kaposi Sarkom, 3. Sublinie der Biopsie)
U937	humane monozytäre Zelllinie

2.2 Methoden

2.2.1 Allgemein benötigte Puffer, Lösungen und Medien

LB-Medium:

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
ad 1000 ml H ₂ O _{bidest}	

Für Festmedium wurden 12 g Bacto-Agar zugesetzt.

Zur positiven Selektion plasmidhaltiger Bakterien wurde dem Kulturmedium Ampicillin oder Kanamycin beigefügt.

Ampicillin: Endkonzentration im Medium: 100 µg/ml

Kanamycin: Endkonzentration im Medium: 50 µg/ml

DEPC-Wasser:

1 l destilliertes und entionisiertes Wasser (H₂O_{bidest}) wurde mit 1 ml Diethylpyrkarbonat (DEPC) versetzt, über Nacht gerührt und anschließend zweimal autoklaviert.

10 x PBS:

NaCl	80,0 g
KCl	2,0 g
Na ₂ HPO ₄	11,5 g
KH ₂ PO ₄	2,0 g
ad 1000 ml H ₂ O _{bidest}	

TE-Puffer:

1 M Tris/HCl (pH 8.0)	10 ml
0,5 M EDTA	2 ml
ad 1000 ml H ₂ O _{bidest}	

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Allgemeine Zellkultur

Primäre Zellen

Die Kultivierung der primären MVEC und HUVEC erfolgte in Endothelzellmedium (Cambrex) bei 37°C und 5% CO₂ in gelatinisierten Zellkulturflaschen.

Zum Gelatinisieren wurde 1,5%-ige Gelatine benutzt, die auf 37°C erwärmt und danach zur Benetzung des Bodens in Zellkulturflaschen verteilt wurde. Am folgenden Tag wurde die überschüssige Gelatine abgenommen und die gelatinisierte Zellkulturflasche mit Medium gewaschen.

1,5% Gelatine

Gelatine	7,5 g
1 x PBS	ad 500 ml

bei 65°C für 1 h unter ständigem Rühren lösen, anschließend autoklavieren, sterilfiltrieren, aliquotieren und bei 4°C aufbewahren.

Endothelzellmedium

Grundmedium: *Endothelial cell basal medium* (EBM - 2) 500 ml

Zusätze für Vollmedium (EBM-5%FCS):

EGM-2 BulletKit:	
5 % FCS	25 ml
Hydrocortison	0,2 ml
HFGF-B	2 ml
VEGF	0,5 ml
R ³ -IGF (<i>human recombinant insulin-like growth factor</i>)	0,5 ml
Ascorbinsäure	0,5 ml
hEGF (10 µg/ml)	0,5 ml
GA-1000 (Gentamycin, Amphotericin)	0,5 ml
Antibiotics (Penicillin 100 U/ml; Streptomycin 100 µg/ml)	
Amphotericin-B 25 µg/ml)	5 ml

Zusätze für Leermedium (EBM-0,5%FCS):

0, 5% FCS	2,5 ml
Antibiotics	5 ml

Zur Passagierung wurden die Zellen zweimal mit 1 x PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA abgelöst und mit frischem Vollmedium max. 1:6 verdünnt wieder ausgesät. Eine Passage entspricht einer Verdünnung der Zellen von 1:4.

Zelllinien

Die Kultivierung der Zelllinien PG13/J7 und M7/3 erfolgte in DMEM-Medium bei 37°C und 5% CO₂.

DMEM -Wachstumsmedium:

Grundmedium: DMEM

Zusätze: 10% FCS
 2 mM L-Glutamin
 Penicillin/Streptomycin (final: 100 U Penicillin, 100 µg Streptomycin)
 1 x *non essential amino acids**

(* enthält L-Alanin, L-Asparagin, L-Asparaginsäure, L-Glutaminsäure, Glycin, L-Prolin, L-Serin)

Die Kultivierung der monozytären Zelllinie U937 erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ in RPMI-Medium mit 10 % FCS.

Konzentration an Selektionsmittel:

Die zur Transfektion und anschließender Transduktion eingesetzten Vektoren stammen alle von dem Ausgangsvektor pBabePuro ab, der als Resistenzgen Puromycin kodiert. Für die Bildung stabiler Transfektanten beziehungsweise Transduktanten wurden folgende Konzentrationen an Puromycin verwendet:

Transfektion:	PG13/J7	3,0 µg/ml
Transduktion:	HUVEC	0,3 µg/ml.

2.2.2.2 Produktion infektiöser retroviraler Partikel

Zur Produktion infektiöser Viruspartikel wurden zunächst Zellen der Verpackungszelllinie PG13/J7 (Miller *et al.*, 1991) transfiziert und zur Erzeugung stabiler Zellklone mit Puromycin selektioniert. Dazu wurde in den retroviralen Vektor pBabePuro (Morgenstern und Land, 1990) die gesamte cDNA von GBP-1 in *sense*- oder *antisense*-Orientierung, beziehungsweise die für mutierte oder verkürzte GBP-1-Proteine kodierende cDNA, kloniert. Die Transfektion der Verpackungszellen mit den retroviralen Vektoren erfolgte durch Lipofektion mit SuperFect (Qiagen) nach Angaben des Herstellerprotokolls zur stabilen Transfektion adhärenter Zellen. Die Verpackungszellen wurden dazu in 60-mm-Kulturschalen ausgebracht und bei einer Zelldichte von 70 - 80% mit 5 und 10 µg Plasmid-DNA transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen 1:12 in DMEM-Wachstumsmedium und 3 µg/ml Puromycin als Selektionsmittel passagiert. Nach einer Selektionsdauer von 10 Tagen wurden die Viruspartikel aus den Kulturüberständen isoliert und die Virustiter semiquantitativ mittels RT-PCR bestimmt. Dazu wurden die Zellen bei einer Dichte von ca. 80% mit frischem Wachstumsmedium versehen, nach 12 h die Virus-enthaltenden Zellkulturüberstände abgenommen und zum Entfernen von Zellbestandteilen filtriert (0,45 µm). Mit Hilfe des *High Pure viral RNA Kit* (Roche) wurde die virale RNA aus den Überständen isoliert und in einer RT-PCR mit sequenzspezifischen Primern in cDNA umgeschrieben. Hierbei wurde der *Titan one step reaction procedure Kit* (Roche) entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Durch Variation der Zyklenanzahl und Verdünnung der viralen RNA wurden die retroviralen Partikel überprüft sowie die Titer semiquantitativ bestimmt. Die Reaktionsbedingungen der RT-PCR wurden wie folgt eingestellt: 50°C, 30 min; 96°C für 2 min, anschließend 10 Zyklen mit je 94°C für 30 s (Denaturierung), 52°C für 30 s (Hybridisierung) und 68°C für 1 min (Synthese); gefolgt von 25 Zyklen mit einer Synthesedauer von 1 min 30 s.

2.2.2.3 Transduktion von HUVEC

Für die Transduktion der Endothelzellen wurden die viralen Überstände der transfizierten Verpackungszellen verwendet. Dazu wurden die Zellen bei einer Dichte von 80% mit frischem DMEM-Wachstumsmedium versehen und ohne dem Zusatz von Puromycin kultiviert. Nach 12 – 15 h wurden die Überstände filtriert (0,45 µm) und mit 8 µg/ml Polybren (Sigma) versetzt, womit eine Verbesserung der Infektion

erreicht wird. Zur Transduktion wurden die HUVEC für jeweils 2 x 4 h mit den virushaltigen Medien inkubiert, unterbrochen durch eine Inkubation mit frischem Endothelzellmedium für 4 h. Um die Transduktionseffizienz zu steigern, wurde die Infektion am darauffolgenden Tag wiederholt. Nach 48 h wurden die Zellen 1:2 passagiert und zur Selektion stabiler Transduktanten mit 0,3 µg/ml Puromycin versetzt. Bevor die Zellen für weitere Versuche verwendet werden konnten, erfolgte eine Selektion mit einer Dauer von mindestens 10 Tagen, wobei aller 2 - 3 Tage ein Mediumwechsel durchgeführt wurde.

2.2.2.4 Proliferationsuntersuchungen

Untersuchungen zur Proliferation wurden mit MVEC, HUVEC sowie transduzierten HUVEC vorgenommen.

Proliferationsuntersuchungen von MVEC und HUVEC nach Stimulierung mit AWF und IZ

Diese Versuche wurden mit HUVEC und MVEC der Passagen 5,5 – 7 durchgeführt. Die Zellen wurden mit einer Zelldichte von 2×10^3 Zellen/cm² in 24-*Multiwell*-Platten ausgesät, über Nacht zur Synchronisierung der Zellen in EBM-0,5%FCS kultiviert und anschließend mit AWF (bFGF und VEGF, je 10 ng/ml) und IZ behandelt.

Um eine Abhängigkeit der Wachstumsinhibierung der Zellen in Korrelation zur Dosis des verabreichten IZ festzustellen, wurden steigende Konzentrationen an IZ bei konstanter AWF-Konzentration eingesetzt.

Die finalen Konzentrationen waren:

- bFGF 10 ng/ml
- VEGF 10 ng/ml
- AWF (bFGF und VEGF) je 10 ng/ml
- IL-1β 2, 20 oder 200 U/ml
- TNF-α 30, 300 oder 1000 U/ml
- IFN-γ 10, 100 oder 1000 U/ml.

Für jede Kombination aus IZ und AWF wurden jeweils drei Felder der 24-*Multiwell*-Platte behandelt. Am 3. Tag erfolgte ein Mediumwechsel und am 6. Tag wurde die

Zellzahl mittels Hemazytometer oder *Coulter Counter* (Coulter Electronics) bestimmt. Es wurden jeweils Dreifach-Messungen vorgenommen.

Wachstumsuntersuchungen von transduzierten HUVEC

Die transduzierten HUVEC wurden in 24-*Multiwell*-Platten mit einer Zelldichte von 2×10^3 Zellen/cm² ausgebracht und über Nacht zur Synchronisierung der Zellen in EBM-0,5%FCS kultiviert. Anschließend wurde das Medium gewechselt und die Zellen mit EBM-0,5%FCS und AWF (bFGF und VEGF, je 10 ng/ml) weiterkultiviert. Nach 3 Tagen wurde ein erneuter Mediumwechsel durchgeführt und nach 6 Tagen die Zellzahl mittels Hemazytometer bestimmt. Alle Versuche wurden in dreifacher Ausführung angefertigt.

2.2.2.5 Immunzytochemische Färbungen von Einzelzellen

Die zu untersuchenden Zellen wurden auf gelatinisierten 8-Kammer-Objektträgern (Becton Dickinson Labware) mit einer Zelldichte von $1 - 3 \times 10^4$ Zellen/cm² ausgebracht. Nach Stimulierung der Zellen mit den entsprechenden Wachstumsfaktoren oder Zytokinen wurden die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen und anschließend fixiert. Dabei wurden je nach Versuchsprotokoll unterschiedliche Fixierungsmethoden angewendet: Methanolfixierung (100 % Methanol bei -20°C für 5 min) oder Ethanolfixierung (100 % Ethanol, 4°C, 30 min).

Indirekte Immunfluoreszenzfärbung zum Nachweis von NF-κB und GBP-1

Die Zellen wurden mit Methanol fixiert, anschließend mit 1x PBS für 5 min gewaschen und zum Blockieren freier Antikörperbindungsstellen für 20 min in einer Feuchtekammer mit 10% Ziegen Serum und 1% BSA in 1x PBS benetzt. Nach zweimaligem Waschen mit 1x PBS erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper (α-NF-κB, 1:200; 1B1, 1:100), verdünnt in 5% Ziegen Serum und 1% BSA, für 1 h bei RT in der Feuchtekammer. Nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS wurden die Zellen mit den Sekundärantikörpern (α-Kaninchen-AlexaFluor 288, 1:500 und α-Ratte-AlexaFluor 546, 1:500), verdünnt in 5% Ziegen Serum und 1% BSA, inkubiert (1h, RT, Feuchtekammer). Nach dem Waschen mit PBS wurden die Zellkerne durch eine Inkubation von 5 min mit 1 µg/ml 4',6'-Diamino-2-phenylindol (DAPI, Molecular Probes) sichtbar gemacht, die Objektträger mit 50% Glycerol/1x PBS beschichtet und

mit einem Deckglas versehen. Die Auswertung erfolgte an einem inversen Fluoreszenzmikroskop (Zeiss).

Zytochemische Immunperoxidase-Färbung zum Nachweis von GBP-1

Ethanolfixierte Zellen wurden in 1x PBS gewaschen, für 4 min mit 0,05% Triton-X100 permeabilisiert und mit dem monoklonalen GBP-1-Antikörper 1B1 (1:100), gelöst in *background reducing component* (Dako), für 1 h bei RT in der Feuchtekammer inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS wurden die Zellen mit dem Sekundärantikörper (Biotinyliertes Pferd Anti-Ratte IgG, ABC-kit Vector Laboratories), gelöst in *background reducing component* (Dako), inkubiert. Nach erneutem Waschen mit 1x PBS, wurde die Reaktion mit DAB (Biogenex) für 8 min bei RT entwickelt. Abschließend wurden die Zellkerne mit *Gill-3 hematoxylin* (Shandon) gefärbt, die Objektträger mit Immumount (Shandon) beschichtet und mit einem Deckglas versehen. Die Auswertung erfolgte an einem inversen Mikroskop (Leica).

2.2.2.6 Morphologische Untersuchungen transduzierter Endothelzellen auf Matrigel

Endothelzellen besitzen die Fähigkeit auf Matrigel kapillarähnliche Strukturen auszubilden. Matrigel, ein Modellsystem der extrazellulären Matrix, enthält als Hauptmatrixkomponenten Laminin, Kollagen Typ IV, Entactin, und Heparansulphat-Proteoglykan (HSPG); (Grant *et al.*, 1985; Kleinman *et al.*, 1986).

Über Nacht auf Eis aufgetautes, flüssiges *growth factor-reduced* (GFR)-Matrigel (Becton Dickinson) wurde bei 4°C in 30-mm-Kulturschalen ausgebracht (300 µl/Schale) und zum Festwerden für 2 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach vorsichtigem Waschen der Schalen mit EBM-Vollmedium wurden HUVEC, transduziert mit dem Leervektor pBabePuro (Kontrollvektor, KV), beziehungsweise zur Expression von rekombinantem GBP-1 mit pBabePuro-GBP-1 (GBP-1), in Vollmedium auf dem Matrigel mit einer Zelldichte von 1×10^5 Zellen/Schale ausgebracht. Nach dem Anwachsen der Zellen nach ca. 2 h wurde das Medium auf EBM-Leermedium mit AWF (bFGF und VEGF, je 10 ng/ml) gewechselt und die Zellen für weitere 24 h kultiviert. Mit einer Digitalkamera (Coolpix) wurden die Phasenkontrastbilder der Zellen dokumentiert.

2.2.2.7 Untersuchung zur Aufnahme fluoreszenzgekoppelter HIV-1-Tat-GBP-1-Fusionspeptide von HUVEC

Zur Untersuchung der proliferationsinhibitorischen Aktivität eines bestimmten Sequenzabschnittes von GBP-1 wurden zwei HIV-1-Tat-GBP-1-Fusionspeptide mit einer Länge von 29 (Peptid-1) beziehungsweise 30 Aminosäuren (Peptid-3) synthetisiert (Biosynthan Berlin). Von den beiden Peptiden wurden jeweils 2 mg am C-Terminus mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC), einem Fluoreszenzfarbstoff, markiert, um deren Aufnahme in Endothelzellen zu testen. HUVEC wurden mit einer Zelldichte von 2×10^4 Zellen/cm² in gelatinisierte 8-Kammer-Objektträger ausgebracht und für 30 und 60 min in EBM-Vollmedium mit den Peptiden in einer Endkonzentration von 1, 5 und 10 µM kultiviert. Die lyophilisierten Peptide wurden dazu vorher in Wasser gelöst. Nach 30 und 60 min wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen, methanolfixiert und die Zellkerne durch eine Inkubation von 5 min mit 1 µg/ml 4',6'-Diamino-2-phenylindol (DAPI, Molecular Probes) sichtbar gemacht. Anschließend wurden die Objektträger mit 50% Glycerol/1x PBS beschichtet und mit einem Deckglas versehen. Die Auswertung erfolgte an einem inversen Fluoreszenzmikroskop (Zeiss).

2.2.2.8 Untersuchung der proliferationsinhibitorischen Aktivität von HIV-1-Tat-GBP-1-Fusionspeptiden auf HUVEC

HUVEC wurden mit einer Zelldichte von 2×10^3 Zellen/cm² in 24-*Multiwell*-Platten ausgebracht und zum Synchronisieren über Nacht in EBM-0,5%FCS kultiviert. Anschließend wurde das Medium gewechselt und die Zellen wie folgt behandelt:

- EBM-0,5%FCS und AWF (bFGF und VEGF, je 10 ng/ml)
- EBM-0,5%FCS, AWF (bFGF und VEGF, je 10 ng/ml) und 1 µM Peptid-1
- EBM-0,5%FCS, AWF (bFGF und VEGF, je 10 ng/ml) und 1 µM Peptid-3
- EBM-0,5%FCS, AWF (bFGF und VEGF, je 10 ng/ml) und je 1 µM Peptid-1 und Peptid-3
- EBM-0,5%FCS, AWF (bFGF und VEGF, je 10 ng/ml) und 100 U/ml IFN-γ
- EBM-0,5%FCS, AWF (bFGF und VEGF, je 10 ng/ml) und 200 U/ml IL-1β
- EBM-0,5%FCS, AWF (bFGF und VEGF, je 10 ng/ml), 100 U/ml IFN-γ und 1 µM Peptid-1
- EBM-0,5%FCS, AWF (bFGF und VEGF, je 10 ng/ml), 200 U/ml IL-1β und 1 µM Peptid-1

- EBM-0,5%FCS, AWF (bFGF und VEGF, je 10 ng/ml), 100 U/ml IFN- γ und 1 μ M Peptid-3
- EBM-0,5%FCS, AWF (bFGF und VEGF, je 10 ng/ml), 200 U/ml IL-1 β und 1 μ M Peptid-3
- EBM-0,5%FCS, AWF (bFGF und VEGF, je 10 ng/ml), 100 U/ml IFN- γ und je 1 μ M Peptid-1 und Peptid-3
- EBM-0,5%FCS, AWF (bFGF und VEGF, je 10 ng/ml), 200 U/ml IL-1 β und je 1 μ M Peptid-1 und Peptid-3

Das Medium wurde alle 2 Tage gewechselt und nach 6 Tagen wurde die Zellzahl mittels Hemazytometer bestimmt. Alle Versuche wurden in dreifacher Ausführung angefertigt.

2.2.2.9 Herstellung von Proteinextrakten aus eukaryontischen Zellen

Für *Western blot* - Analysen wurden Proteinextrakte von stimulierten oder transduzierten HUVEC eingesetzt. Dazu wurden sowohl Proteinextrakte in Ripa-Puffer als auch Proteinextrakte in 2 x SDS-Probenpuffer verwendet. Wobei letztere für die Untersuchung von Signaltransduktionswegen eingesetzt wurden.

Herstellung von Proteinextrakten in Ripa-Puffer:

Zur Isolierung von Gesamtprotein aus adhärennten Zellen wurden die Zellen zweimal mit 1x PBS gewaschen und durch anschließendes Behandeln mit Trypsin/EDTA abgelöst. Nach Aufnahme der Zellen in Kulturmedium wurden die Zellpellets durch Zentrifugation gesammelt, dreimal mit 1x PBS gewaschen und in Ripa-Puffer resuspendiert. Nicht-adhärennte Zellen wurden durch Zentrifugation gesammelt und nach den Waschschrinen in Ripapuffer aufgenommen. Nach der Zellyse bei 4°C für 15 min wurde das Zellysat bei 14000 Upm und 4°C 15 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet verworfen. Die Lagerung der Proteinextrakte erfolgte bei -20°C.

Ripa-Puffer:

50 mM	Tris/HCl, pH 7,5
150 mM	NaCl
1 %	Nonidet P40
0,5 %	Natriumdesoxycholat

0,1 %	SDS
1	<i>CompleteMini</i> *-Tablette (Roche) auf 10 ml

(* *CompleteMini*-Tabletten enthalten einen Mix aus verschiedenen Proteasehemmern mit breiter Spezifität für die Inhibierung von Serin/Cystein- und Metalloproteasen in bakteriellen, Säuger-, Hefe- und Pflanzenzellextrakten.)

Herstellung von Proteinextrakten für Signaltransduktionsuntersuchungen:

Für *Western blot* - Analysen von Signaltransduktionswegen sind nur kurzzeitige Stimulierungen notwendig, die nach Ablauf der Stimulierungsdauer auch umgehend gestoppt werden müssen. Dafür wurden die synchronisierten Zellen mit frischem Kulturmedium und dem entsprechenden Zytokin für die gewünschte Zeit inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit eiskaltem 1x PBS gewaschen. Die Zellen wurden durch Zugabe von 2 x SDS-Probenpuffer (100 µl/Loch einer 6-*Multiwell*-Platte) lysiert, umgehend in ein 1,5ml-Eppendorfgefäß überführt und auf Eis gestellt. Um die hochviskosen DNA-Bestandteile zu reduzieren, wurden die Proben für 10 bis 15 s mit Ultraschall behandelt. Für *Western blot*-Analysen wurden 15 µl Proteinextrakt eingesetzt.

2.2.2.10 Kalziumbestimmung in lebenden Zellen mittels Fluoreszenzspektroskopie

Zur Messung der Änderung der Kalziumkonzentration in Histamin-stimulierten HUVEC wurde der Ca^{2+} -sensitive Fluoreszenzfarbstoff Fura-2 AM (Molecular Probes) verwendet. Durch eine Acetoxymethylgruppe (AM), die als Ester an die Salzform gebunden ist, kann Fura-2 AM durch die Zellmembran diffundieren. In der Zelle wird durch intrazelluläre Esterasen die AM-Estergruppe hydrolytisch abgespalten, sodass das Molekül für die Zellmembran impermeabel wird und nicht weiter in andere Organellen diffundieren kann.

Fura-2 AM wird als direkter Indikator zur Messung der freien intrazellulären Kalziumkonzentration eingesetzt. Charakteristisch für diesen Fluoreszenzfarbstoff ist, dass sich das Emissionsspektrum mit steigender Kalziumkonzentration ändert. Die Fluoreszenzintensität nimmt mit steigendem Kalziumgehalt bei einer Anregung von 340 nm zu und bei Anregung mit 380 nm ab. Der Quotient (ratio) der

Emissionsintensitäten bei 340 und 380 nm ist ein Maß für die freie intrazelluläre Kalziumkonzentration.

Für die Kalziummessungen wurden HUVEC mit einer Zelldichte von 70 - 80% auf gelatinisierten Deckgläschen ausgebracht und über Nacht in EBM-Vollmedium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 3 μM Fura-2 AM für 20 min mit dem Fluoreszenzfarbstoff beladen, und nach einem Waschschrift von 20 min mit KHB, wurden die Deckgläschen als Boden in eine temperierte Messkammer (37°C) eingesetzt. Die verwendete Versuchsanordnung ist mit einer 4-Kanal-überströmvorrichtung ausgestattet, die ein kontinuierliches Überströmen der Zellen mit verschiedenen Versuchslösungen erlaubt, zwischen denen im Zehntelsekundenbereich umgeschaltet werden kann.

Die Zellen wurden zunächst für 3 min mit KHB und anschließend für je 3 min mit KHB + 1 μM Histamin überströmt. Diese Sequenz wurde zweimal wiederholt. Die für die Messung benötigten Anregungswellen wurden mittels eines Monochromators (TILL), der innerhalb von 2 ms zwischen den benötigten Wellenlängen 340 nm und 380 nm umschalten kann, aus dem Licht einer Xenon-Hochdrucklampe erzeugt. Die Auswertung, der an einem inversen Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 100, Zeiss) erzeugten Bildsequenzen, erfolgte mit der Software von TILLVision.

Krebs-Henseleit-Bikarbonat-Lösung (KHB):

Glukose	10 mM
Natriumchlorid (NaCl)	115 mM
Kaliumchlorid (KCl)	5,9 mM
Kalziumchlorid (CaCl ₂)	1,2 mM
Magnesiumsulphat (MgSO ₄)	1,2 mM
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	25 mM

Zur Sättigung mit O₂ wird 1 l der Lösung für 15 min mit Karbogen (95% O₂ und 5% CO₂) begast. Anschließend wird der pH auf 7,4 eingestellt und die Lösung bei 8°C gelagert.

2.2.3 DNA-Technologie

2.2.3.1 Plasmidisolierung

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte aus LB-Übernachtskulturen, angeimpft mit einer Einzelkolonie der plasmidhaltigen Bakterien. Die Kultur wurde mit dem Antibiotikum versetzt, gegen welches das Plasmid ein Resistenzgen trägt.

Die Präparation der Plasmid-DNA wurde mit Kits der Firma QIAGEN durchgeführt und beruht auf dem Prinzip einer Säulenchromatographie mit einem Anionenaustauscher. Für eine Menge von 20 - 50 µg DNA wurde der Kit *Qiaprep Spin Miniprep*, für 200 - 500 µg DNA der *Qiagen Plasmid Maxi Kit* verwendet.

2.2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (*PCR*) können definierte DNA-Sequenzen aus einem komplexen Gemisch von DNA selektiv angereichert werden. Man benötigt hierzu zwei Oligonukleotide (*Primer*), von denen der eine zum 3'-Bereich der gewünschten DNA-Sequenz und der andere zum Gegenstrang des 5'- Bereichs komplementär ist. Die exponentielle Amplifikation der DNA wird durch wiederholte thermische Strangtrennung der DNA, Bindung der *Primer* und DNA-Synthese aus Desoxyribonukleotiden mit Hilfe der thermostabilen DNA-Polymerase erreicht.

Die PCR wurde mit der rTh-Polymerase (Perkin Elmer) beziehungsweise der Pwo-Polymerase (Peqlab) und den dazugehörigen mitgelieferten Reagenzien nach Angaben des Herstellers im Thermocycler (Perkin Elmer GeneAmp 9600) durchgeführt. Ein typischer PCR-Ablauf für PCR-Reaktionen mit Primerpaaren von ca. 20 nt und einer zu amplifizierenden DNA-Sequenz von 1 kb wurde folgendes PCR-Programm durchlaufen:

Denaturierung	2 min	94°C	1 Zyklus
---------------	-------	------	----------

Denaturierung	20 s	94°C	10 Zyklen
Hybridisierung	30 s	52°C	
Synthese	45 s	68°C	

Denaturierung	20 s	94°C	25 Zyklen
Hybridisierung	30 s	52°C	
Synthese	1 min 20 s	68°C	

letzte Synthese	4 min	68°C	1 Zyklus
-----------------	-------	------	----------

Variationen dieses Programmes hinsichtlich Hybridisierungstemperatur und Synthesedauer wurden in Abhängigkeit von der Schmelztemperatur, des Primerpaares sowie der Länge der zu amplifizierenden DNA-Sequenz vorgenommen.

Die PCR wurde zur Herstellung von cDNA-Molekülen, kodierend für mutierte oder verkürzte GBP-1-Proteine eingesetzt. In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Primerpaare zur Synthese der GBP-1-Konstrukte aufgelistet:

Konstrukt	Primer	Sequenz	Bindungsstelle in GBP-1*
D ₁₈₄ N-GBP-1	D ₁₈₄ NF	5'-GTG TGG ACA CTG AGA AAT TTC TCC CTG GAC -3'	603 - 632
	D ₁₈₄ NR	5'-GTC CAG GGA GAA ATT TCT CAG TGT CCA CAC -3'	632 - 603
ΔCaaX-GBP-1	StopF	5'-GAC GAC GAA AGG CAT AAA CCA TAA GCT AAT CTA GAC GGG-3'	1819 - 1847
	StopR	5'-CCC GTC TAG ATT AGC TTA TGG TTT ATG CCT TTC GTC GTC-3'	1847 - 1819
Hel	Dom2-fw	5'-CCG GAA TTC GCC GCC <u>ATG</u> GTC AAC GGG CCT CGT CTA GAG-3'	929 - 950
	Dom2-rv	5'-CGC GGA TCC GAA TTC <u>TTA</u> GCT TAT GGT ACA TGC CTT TCG-3'	1847 - 1824
Glo	Dom1-fw	5'-CCG GAA TTC GCC GCC <u>ATG</u> GCA TCA GAG ATC CAC ATG-3'	68 - 89

	Revglob	5'-CGC GGA TCC GAA TTC <u>TTA</u> CCC GTT GAC CTG GAT GCC-3'	938 - 921
$\alpha 789^{1/2}$	For789	5'-CGG AAT TCG CCG CCA <u>TGG</u> AGA ACG CAG TCC TG-3'	1001 - 1019
	Rev789	5'-GCG GAT TCG AAT TCT <u>TAT</u> GAT GAT GCT TCC TG-3'	1280 - 1254
$\alpha 7-11$	For789	5'-CGG AAT TCG CCG CCA <u>TGG</u> AGA ACG CAG TCC TG-3'	1001 - 1019
	Rev7-11	5'-GCG GAT CCG AAT TCT <u>TAT</u> GTC TGG AGA ATT GC-3'	1502 - 1488
$\alpha 9^{1/2-12}$	For9-12	5'-CGG AAT TCG CCG CCA <u>TGT</u> CAT CAG ATC GTT GC-3'	1275 - 1292
	Rev9-12	5'-GCG GAT CCG AAT TCT <u>TAT</u> TCC ATC ATC TGC TC-3'	1622 - 1608
$\alpha 12/13$	For12/13	5'-CGG GAT CCG CCG CCA <u>TGA</u> CAG AAA AAG AAA AG-3'	1515 - 1529
	Rev12/13	5'-CGG AAT TCT <u>TAG</u> CTT ATG GTA CAT GCC TTT CG-3'	1847 - 1824
$\alpha 9^{1/2-11}$	For 9-12	5'-CGG AAT TCG CCG CCA <u>TGT</u> CAT CAG ATC GTT GC-3'	1275 - 1292
	Rev 7-11	5'-GCG GAT CCG AAT TCT <u>TAT</u> GTC TGG AGA ATT GC-3'	1502 - 1488
$\alpha 10/11$	Hel 10For	5'-CGG AAT TCG CCG CCA <u>TGG</u> GAA TTT ATT CG-3'	1341 - 1352
	Rev 7-11	5'-GCG GAT CCG AAT TCT <u>TAT</u> GTC TGG AGA ATT GC-3'	1502 - 1488

*Position in *GBP-1* (NCBI-Accession: M55542, GI: 183001)

Die in obenstehender Tabelle aufgeführten synthetischen Oligonukleotide wurden als Primer für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt. Sie wurden von Herrn Linzner (Institut für Pathologie, GSF Neuherberg) hergestellt.

Die in den Primern enthaltenen Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme, Eco RI (GAATTC) beziehungsweise BamH I (GGATCC) wurden fett hervorgehoben. Diese Schnittstellen wurden auch für den jeweiligen Restriktionsverdau bei der Klonierung der GBP-1-Konstrukte in den retroviralen Vektor pBabePuro verwendet. Die Primer enthalten zum Teil auch andere Schnittstellen, die für diese Klonierungen jedoch nicht berücksichtigt wurden. Bei allen *forward*-Primern wurde nach der Klonierungsschnittstelle die optimale *Kozak*-Sequenz (GCC GCC), gefolgt von einem ATG als Transkriptionsstartcodon eingefügt. Alle *revers*-Primer enthalten nach der Klonierungsschnittstelle TAA als Stoppcodon. Die beiden Konstrukte D₁₈₄N-GBP-1 und ΔCaaX-GBP-1 wurden mittels ortsgerichteter Mutagenese, siehe 2.2.3.11 hergestellt.

2.2.3.3 Reinigung der PCR-Fragmente

Zur Reinigung der amplifizierten PCR-Produkte wurde der *PCR Purification Kit* (Qiagen) entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

Das Prinzip beruht darauf, dass die Nukleinsäuren in Anwesenheit eines Salzes an Silicagel-Membransäulchen binden. Nach mehrfachen Wasch- und Zentrifugationsschritten werden Salze, Proteine und andere Verunreinigungen entfernt und anschließend die gereinigten DNA-Fragmente eluiert.

2.2.3.4 Quantitative Nukleinsäurebestimmung

Die Bestimmung der Konzentration von DNA, RNA oder Oligonukleotiden erfolgte photometrisch bei 260 nm am Spektralphotometer (GeneQuant, Amersham Pharmacia). In Quarzküvetten einer Schichtdicke von 1 cm entspricht ein Extinktionswert von 1,0 dem Gehalt von 50 µg ds DNA/ml, 40 µg ss DNA oder RNA/ml oder 20 µg Oligonukleotid/ml. Zur Bestimmung der Reinheit präparierter DNA wird der Quotient aus A_{260}/A_{280} gebildet. Reine DNA-Lösung besitzt einen Wert von 1,8, reine RNA-Lösung von 2,0. Bei Kontaminationen mit Proteinen oder Phenol ist der Wert entsprechend kleiner.

2.2.3.5 Enzymatische Spaltung von DNA-Molekülen mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsenzyme binden und spalten an spezifischen Erkennungsstellen doppelsträngiger DNA-Moleküle. Die Enzyme hydrolysieren dabei

Phosphodiesterbindungen zwischen je zwei Basen in beiden Strängen der DNA. Aufgrund der Lage der Spaltstellen entstehen Fragmente definierter Größe, die durch Gelelektrophorese aufgetrennt werden können.

Das geschnittene DNA-Molekül wird anhand des spezifischen Bandenmusters der Größe nach analysiert. Eingesetzt wurden Restriktionsenzyme (Endonukleasen Typ II) für DNA-Modifikationen sowie zum Analysieren der DNA nach ihrem Bandenmuster.

Die Restriktionshydrolysen wurden mit Enzymen der Firma Roche oder New England Biolabs sowie den mitgelieferten 10fach Inkubationspuffern durchgeführt. Für einen Reaktionsansatz von 20 µl wurden 1 – 2 µg DNA-Lösung und 0,5 – 1 Einheiten Restriktionsenzym verwendet. Die Inkubation erfolgte bei der für das Enzym spezifischen Temperatur für 1 – 2 h im Wasserbad. Für präparative DNA-Spaltungen wurden entsprechend größere Mengen an DNA eingesetzt und der Ansatz über Nacht inkubiert.

Restriktionsenzym	Spaltsequenz	entstehendes Ende der DNA
BamH I	G/GATCC	5'-überhängend
EcoR I	G/AATTC	5'-überhängend
Hind III	A/AGCTT	5'-überhängend
Sal I	G/TCGAC	5'-überhängend

2.2.3.6 Dephosphorylierung linearer DNA-Fragmente

Die Dephosphorylierung von Vektor-DNA wurde bei Klonierungsexperimenten im Anschluss an die enzymatische Restriktionshydrolyse vor der Ligation von Vektor und Insert durchgeführt. Alkalische Phosphatase katalysiert die Abspaltung von 5'-Phosphatgruppen von DNA-Enden unter Bildung freier 5'-Hydroxylgruppen. Sie wird eingesetzt, um zu verhindern, dass linearisierte Vektor-DNA rezirkularisiert. So behandelte DNA kann bei Klonierungsexperimenten nicht mit sich selbst ligieren. Die zur Ligation notwendigen Phosphatgruppen müssen daher von anderen DNA-Molekülen (Insert) geliefert werden. Zur Dephosphorylierung von Vektor-DNA wurde 1 µl *Shrimp Alkaline Phosphatase* (1 U/µl) im Anschluss an die Restriktionshydrolyse zum Reaktionsansatz zugeben und dieser für 30 min bei 37°C inkubiert. Zur

Inaktivierung des Enzyms wurde die Probe für 10 min auf 65°C erhitzt. Danach erfolgte die Auftrennung der DNA im Agarosegel.

2.2.3.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine einfache und sehr effektive Methode zum Trennen, Identifizieren und Reinigen von DNA-Fragmenten. Zunächst wird ein Gel mit einer Agarosekonzentration hergestellt, die der Größe der zu trennenden DNA-Fragmente angemessen ist. Das Gel wird mit den DNA-Proben beladen und nach Anlegen einer elektrischen Spannung bewegen sich die negativ geladenen DNA-Fragmente zur Anode. Das Agarosegel wirkt dabei als Molekularsieb und die DNA kann nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Durch das Anfärben des Gels mit Ethidiumbromid, das in die DNA interkaliert, können die Fragmente unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 254 nm sichtbar gemacht werden. Für DNA-Fragmente, größer 1kb wurden 1%-ige, für Fragmente kleiner als 1 kb wurden 2%-ige Agarosegele angefertigt. Als Elektrolyt wurde 1 x TAE-Puffer verwendet. Zur Herstellung des Gels wurde die Agarose in der entsprechenden Konzentration in 1 x TAE-Puffer aufgekocht und vollständig gelöst. Nach Abkühlen des Gels auf ca. 60 °C wurde Ethidiumbromid (final 0,5 µg/ml) zugegeben und in die vorgesehene Gelapparatur gegossen. Das festgewordene Gel wurde mit 1 x TAE-Puffer überschichtet, mit den DNA-Proben, die mit 6 x DNA-Auftragspuffer versetzt waren, beladen und der Gellauf durch das Anlegen einer Spannung von 5 - 10 V/cm gestartet. Nach dem Lauf wurden die DNA-Fragmente mit UV-Licht nachgewiesen und photographiert.

50 x TAE-Puffer:

Tris	2,0 M
Eisessig	1,0 M
EDTA	0,1 M
ad 1000 ml H ₂ O _{bidest}	

6 x DNA-Auftragspuffer:

Bromphenolblau (Farbmarker)	0,25 %
Xylen-Cyanol (Farbmarker)	0,25 %
Sucrose	40,0 %

2.2.3.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für Klonierungen sowie für die Herstellung von spezifischen Sonden wurden mit Restriktionsenzymen geschnittene DNA-Fragmente oder Plasmide im Agarosegel elektrophoretisch getrennt. Aus den ethidiumbromidgefärbten Gelen wurden die gewünschten DNA-Fragmente mit einem Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten. Zur Elution der DNA aus dem Gelstück wurde der Kit *QIAEX II Agarose Gel Extraction* (QIAGEN) verwendet und nach Angaben des Herstellers ausgeführt. Dabei wird zunächst die Agarose gelöst und die DNA an Silikonkugeln gebunden. Nach mehrfachen Waschschritten wurde die DNA mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$ gelöst und durch Zentrifugation von den Silikonkugeln abgetrennt.

2.2.3.9 Ligation von DNA-Molekülen

Zur Ligation verschiedener DNA-Fragmente wurde der *Rapid DNA Ligation Kit* (Roche), der eine T4-DNA-Ligase sowie entsprechende Puffer enthält, eingesetzt und nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die T4-DNA-Ligase katalysiert unter Verbrauch von ATP die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen der freien Hydroxylgruppe am 3'-Ende des einen und der 5'-Phosphatgruppe des anderen DNA-Fragmentes. Für Ligationen wurden die zu inserierenden DNA-Fragmente, in dreifachem molarem Überschuss mit der dephosphorylierten linearisierten Vektor-DNA gemischt. Nach Zugabe der Puffer und des Enzyms erfolgte die Ligrationsreaktion bei RT für eine Inkubationsdauer von 5 min. Ein Drittel des Ligrationsansatzes wurde anschließend direkt zur Transformation eingesetzt.

2.2.3.10 Transformation von Bakterien mit Plasmiden

Das Einbringen von Plasmid-DNA in *E.coli* kann auf verschiedene Arten erfolgen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde sowohl die Elektroporation als auch die Kalziumchlorid-Transformation eingesetzt.

Elektroporation von Bakterien

Zur Elektroporation der Bakterien wurde ein Elektroporationsgerät (BioRad) mit folgenden Einstellungen eingesetzt:

Pulse-Controller: 200 Ω ,

Gene Pulser: 25 μF ; 2,5 kV.

Zur Elektroporation wurden 50 µl elektroporationskompetente XL-1blue (Stratagene) oder M15 (Qiagen) auf Eis aufgetaut und mit 1 – 10 ng Plasmid-DNA für 5 min inkubiert. Das Bakterien-DNA-Gemisch wurde luftblasenfrei in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (Elektrodenabstand 0,1 cm) gefüllt. Nach dem kurzzeitigen Anlegen einer Spannung wurden 450 µl auf 37°C vorgewärmtes SOC-Medium zugegeben, die Mischung in ein steriles Eppendorfgefäß überführt und für 60 min bei 37°C und 200 Upm geschüttelt. Aliquots des Zellgemisches wurden anschließend auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden Einzelkolonien zum Animpfen von LB-Kulturen gepickt.

SOC-Medium:

Hefeextrakt	0,50 g
Trypton	2,00 g
MgCl ₂	0,20 g
MgSO ₄	0,25 g
Glukose	0,36 g
Ad 100 ml H ₂ O _{bidest}	

Kalziumchlorid-Transformation von Bakterien

Durch das Einwirken von Kalziumionen werden Zellen kompetent, beziehungsweise befähigt DNA, aufzunehmen. Zur Transformation wurden 50 µl kompetente oder superkompetente XL-1blue (Stratagene) auf Eis aufgetaut und mit 10 – 50 ng Plasmid-DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch für 45 s auf 42°C erhitzt und für 2 min auf Eis gestellt. Nach Zugabe von 450 µl SOC-Medium (37°C) wurde das Bakterien-DNA-Gemisch bei 37°C und 200 rpm für 60 min geschüttelt und anschließend auf LB-Platten, die das entsprechende Antibiotikum enthielten, ausplattiert. Nach Inkubation der Platten über Nacht bei 37°C konnten am darauffolgenden Tag Einzelkolonien gepickt werden.

2.2.3.11 Konstruktion von GBP-1-Mutanten durch ortsgerichtete Mutagenese

Die ortsgerichtete Mutagenese wurde eingesetzt, um in GBP-1 einen Austausch von Aspartat zu Asparagin an Aminosäure 184 (D₁₈₄N) vorzunehmen. Zum Einfügen der Mutation in die cDNA von GBP-1 wurde der *QuickChangeTM Site-Directed*

Mutagenesis Kit (Stratagene) verwendet und nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Dieses System erlaubt direkte ortsspezifische Mutationen in doppelsträngigen Plasmiden. Dazu werden zwei Primer synthetisiert, die die gewünschte Mutation in der Mitte der Oligonukleotide und jeweils 10-15 Basen der korrekten Sequenz an beiden Enden tragen. Die Primer binden zum jeweils komplementären Strang des Plasmides. Mittels PCR erfolgt die exponentielle Amplifikation der DNA durch Denaturierung der DNA, Bindung der Primer und DNA-Synthese mit Hilfe einer PfuTurboTM DNA Polymerase.

Zur PCR wurde als Ausgangsplasmid pcDNA3-GBP-1 sowie die beiden Primer:

D₁₈₄NF : 5'-GTGTGGACACTGAGAAATTTCTCCCTGGAC-3' (+603 bis +632)*

D₁₈₄NR: 5'-GTCCAGGGAGAAATTTCTCAGTGTCCACAC-3' (+632 bis +603)*

(Praefcke *et al.*, 1999) eingesetzt. Die Mutation in der Primersequenz ist unterstrichen.

*Position in *GBP-1* (NCBI-Accession: M55542, GI: 183001)

Die PCR wurde entsprechend dem Herstellerprotokoll im Thermocycler (Perkin Elmer GeneAmp 9600) durchgeführt. Im Anschluß daran wurde das PCR-Produkt zum Abbau des Ausgangsplasmids mit 1 µl Dpn I (10 U/µl) bei 37°C für 1 h inkubiert. Die Endonuklease Dpn I spaltet spezifisch methylierte DNA. Das eingesetzte Ausgangsplasmid ist durch die Isolierung aus *E.coli dam*-methyliert und kann somit durch Dpn I verdaut werden. Aliquots von je 1 µl und 10 µl des Dpn I-behandelten PCR-Produkts wurden danach zur Transformation in superkompetente XL-1blue eingesetzt. Nach dem Animpfen von LB-Kulturen mit Einzelkolonien der plasmidhaltigen Bakterien wurde das neu entstandene Plasmid pcDNA3-D₁₈₄N-GBP-1 isoliert und die korrekte Sequenz durch das Sequenzierlabor Metzger Vaterstetten bestätigt.

Die Mutation von D₁₈₄N in GBP-1 wurde ebenso durch ortsgerichtete Mutagenese in das Plasmid pQE60-GBP-XH eingeführt. Um potentielle Mutationen im Vektor auszuschließen, wurde das Insert anschließend ausgeschnitten, erneut in pQE60 kloniert und schließlich sequenziert (Sequenzierlabor Metzger, Vaterstetten).

Über Subklonierung wurde die veränderte GBP-1-Sequenz, D₁₈₄N-GBP-1 auch in den retroviralen Vektor pBabePuro eingebracht.

Zum Entfernen der CaaX-Box von GBP-1 wurde ein Stoppcodon an Aminosäure 588 ebenfalls mit Hilfe ortsgerichteter Mutagenese eingeführt. Diese Arbeit wurde bereits

von C. di Bartolo mit pcDNA3-GBP-1 als Ausgangsplasmid durchgeführt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die mutierte GBP-1-Sequenz, Δ CaaX-GBP-1-, über eine Subklonierung in den retroviralen Vektor pBabePuro eingesetzt und die Sequenz durch das Sequenzierlabor Metzger Vaterstetten bestätigt.

2.2.3.12 Herstellung radioaktiv markierter Sonden

Die radioaktive Markierung von DNA erfolgte durch eine Primerverlängerung. Diese Methode beruht auf einer Kettenverlängerung (Polymerisationsreaktion) unter Einbau von radioaktiv markiertem α -[32 P]-dCTP, wobei Oligonukleotide verschiedenster Sequenz-Kombinationen als Startstelle dienen. Zur radioaktiven Markierung von DNA wurde der *High Prime Kit* von Roche verwendet.

Ansatz:

25 ng (11 μ l) denaturierte (100 °C, 10 min) DNA

4 μ l *High-Prime*-Lösung

5 μ l (50 μ Ci) α -[32 P]-dCTP, spezifische Aktivität: 3000 Ci/mM

Der Ansatz wurde für 60 min bei 37 °C inkubiert, abzentrifugiert, mit 80 μ l H₂O_{DEPC} verdünnt und auf Eis gestellt.

Um nicht eingebaute Nukleotide vor der Hybridisierung abzutrennen, wurde ein Reinigungsschritt durchgeführt. Dafür wurden *Bio-Spin* Polyacrylamidgel-Zentrifugationssäulchen (BioRad) mit einer Ausschlußgrenze von 20 bp eingesetzt. Die Zentrifugationssäulchen wurden 2 min bei 2500 Upm (Biofuge) zentrifugiert, um den Puffer zu entfernen. Danach wurden die 100 μ l Lösung der radioaktiv markierten DNA-Sonde auf die Säule gegeben und für 4 min bei 3500 Upm zentrifugiert. Nicht eingebaute dNTP's werden in der Gelmatrix zurückgehalten und mit der Säule verworfen, die größeren radioaktiv markierten DNA-Moleküle liegen im Eluat vor.

Bestimmung der spezifischen Aktivität der radioaktiv markierten Sonde

Nach der Reinigung wurde 1 μ l der Sonde mit 10 ml Szintillationslösung vermischt und im Szintillationszähler die Zerfälle pro Minute (cpm) gemessen. Radioaktiv markierte cDNA-Fragmente, deren spezifische Aktivität größer als 1×10^8 cpm/ μ g DNA war, wurden für die Hybridisierung eingesetzt.

2.2.4 RNA-Technologie

2.2.4.1 Isolierung von gesamtzellulärer RNA aus eukaryontischen Zellen

Zur Isolierung von gesamtzellulärer RNA aus Endothelzellen wurde der *RNeasy-Mini-Kit* (Qiagen) verwendet und entsprechend dem Herstellerprotokoll durchgeführt.

Nach Ablösen mit Trypsin/EDTA wurden die Zellen (5×10^5 Zellen) durch Zentrifugation (1000 rpm, 10min) gesammelt und in einem Zellysepuffer (700 μ l RLT-Puffer) resuspendiert. Dieser Puffer enthält Guanidiniumisothiocyanat sowie β -Mercaptoethanol und sorgt für die Lysis der Zellen. Zur vollständigen Homogenisierung wurde das Lysat durch *Shredder-Säulen* (Qiagen) zentrifugiert (13000 rpm, 2min), anschließend mit einem Volumenanteil 70%-igem Ethanol versetzt, gut vermischt und zur Bindung der RNA durch eine Minisäule zentrifugiert. Nach wiederholtem Waschen erfolgte die Elution der RNA mit RNase-freiem Wasser.

2.2.4.2 Isolierung viraler RNA

Die Isolierung viraler RNA aus Zellkulturüberständen von transfizierten Verpackungszellen (PG13/J7) erfolgte mit dem *High Pure viral RNA Kit* (Roche) nach Angaben des Herstellers. Dazu wurden die Zellen bei einer Zelldichte von ca. 80% mit frischem DMEM-Kulturmedium versehen und über Nacht inkubiert. Die Überstände wurden anschließend filtriert (0,45 μ m) und zum Lysieren der Viren mit einem Lyse-/Bindepuffer (enthält Guanidiniumchlorid, Triton X-100 sowie poly(A) carrier-RNA) versetzt. Das Lysat wurde auf Zentrifugationssäulchen gegeben, wo die RNA in Anwesenheit eines chaotropen Salzes spezifisch an Glasfaseroberflächen gebunden wird. Durch mehrfache Waschschrte wurden Verunreinigungen durch Salze oder Proteine entfernt und danach wurde die RNA eluiert.

2.2.4.3 Northern blot - Analyse

Spezifische Sequenzen in RNA-Präparationen können mit Hilfe der *Northern blot* – Analyse nachgewiesen werden. Dabei wird fraktionierte RNA von einem Agarosegel auf eine Membran transferiert und kann anschließend durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten DNA- oder RNA-Sonde analysiert werden.

Da einzelsträngige RNA durch intramolekulare Basenpaarung sekundäre Strukturen ausbilden kann, die das Laufverhalten während der Elektrophorese beeinflussen,

erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der RNA-Probe unter denaturierenden Bedingungen. Hierzu wurde die *Agarose/Formaldehyd-Gelelektrophorese* eingesetzt.

Agarose/Formaldehyd-Gelelektrophorese

1 g Agarose (*ultra pure*, Life Technologies) wurde in 72 ml H₂O_{DEPC} durch Kochen vollständig gelöst und nach Zugabe von 10 ml 10 x RB-Puffer unter Rühren auf 70°C abgekühlt. Danach wurden 18 ml 12,3 M Formaldehyd zugegeben und das Gel in eine vertikale Gelapparatur gegossen.

Die RNA (20 – 30 µg) wurde mit zwei Volumenanteilen 100%-igem Ethanol vermischt und im Vakuum getrocknet. Danach wurde die Probe in 20 µl Puffer I aufgenommen und für 5 min bei 80 °C erhitzt. Die denaturierte RNA wurde auf Eis gestellt und nach Zugabe von 4 µl RNA-Auftragspuffer auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der RNA erfolgte je nach Größe der nachzuweisenden RNA-Sequenzen zwischen 2 und 4 h bei 30 mA und 4°C.

RB-Puffer (10 x):

MOPS	41,86 g
2 M Natriumacetat (pH 7,0)	25 ml
0,5 M EDTA	2 ml
ad 1000 ml H ₂ O _{DEPC}	

Nach dem Autoklavieren wurde der pH-Wert auf 7,0 eingestellt.

Formamid (deionisiert):

Formamidlösung	100 ml
<i>Mixed bed resin</i> (Sigma)	10 g

1 h bei RT rühren, anschließend filtrieren und bei 4°C lagern.

Puffer I:

Formamid (deionisiert)	200 µl
Formaldehyd (37 %)	70 µl
10 x RB-Puffer	40 µl
Ethidiumbromid (0,5 mg/ml)	14 µl
H ₂ O _{DEPC}	76 µl

Transfer der RNA auf Nylonmembranen

Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 10 min in H_2O_{DEPC} und für weitere 10 min in 10 x SSC gelegt. Durch diesen Schritt wird das Formaldehyd ausgewaschen, welches den Transfer der RNA auf die Nylonmembran behindern kann. Anschließend wurde das Gel in 50 mM NaOH für 10 min neutralisiert und auf eine Nylonmembran HybondTM-N⁺ (Amersham Pharmacia) gebracht, die zuvor in H_2O_{DEPC} und 10 x SSC eingelegt war. Der Transfer der RNA wurde dann mit 10 x SSC in einer Vakuum-Blot-Apparatur (Millipore) für 2 – 3 h bei einem Unterdruck von 30 – 40 mbar durchgeführt. Nach dem Transfer wurde die Membran kurz in H_2O_{DEPC} gewaschen und anschließend getrocknet.

Zur Fixierung der RNA wurde die Membran für 5 min mit UV-Licht der Wellenlänge 312 nm bestrahlt. Durch das im Puffer I enthaltene Ethidiumbromid, in dem die RNA zur Gelelektrophorese aufgenommen wurde, konnten die 28 S- und 18 S-Banden der rRNA unter UV-Licht im Intensitätsverhältnis 2:1 nachgewiesen werden. Diese Banden wurden als Molekulargewichtsmarker auf der Membran markiert.

Prähybridisierung, Hybridisierung und Waschen der Membran

Durch die Prähybridisierung wurden vor der Zugabe der radioaktiven Sonde unspezifische Bindungsstellen abgesättigt. Dazu wurde die Membran mit 10 ml Prähybridisierungslösung in eine Hybridisierungsröhre gegeben und über Nacht bei 42 °C im Rolleninkubator gedreht.

Zur Hybridisierung wurde eine frische Prähybridisierungslösung hergestellt, die zusätzlich die radioaktiv markierte hitzedenaturierte (10 min, 100 °C) DNA-Sonde enthielt. Die spezifische Aktivität der Sonde betrug zwischen $5 - 8 \times 10^8$ cpm/ μ g DNA, wovon $1 - 2 \times 10^6$ cpm/ml Hybridisierungslösung eingesetzt wurden.

Die Hybridisierung erfolgte ebenfalls über Nacht bei 42 °C. Danach wurde die Membran zweimal für 10 min bei Raumtemperatur in Waschlösung I und anschließend zweimal für je 20 min bei 50 °C in Waschlösung II gewaschen.

Zur Autoradiographie wurden *BioMax MR* Filme von KODAK verwendet und die Exposition der Filme erfolgte bei – 70 °C.

Prähybridisierungslösung:

20 x SSC	2,5 ml
H_2O_{DEPC}	2,5 ml

Formamid (deionisiert)	5,0 ml
Dextransulfat	1,0 g

Die angegebenen Komponenten wurden gemischt und vollständig gelöst. Danach erfolgte die Zugabe von 286 µl Natriumsarcosyl, 150 µl hitzedenaturierter (10 min, 100 °C), sonifizierter, einzelsträngiger Heringsspermien-DNA (10 µg/µl) und 150 µl hitzedenaturierter t-RNA (20 µg/µl).

Waschlösung I:

20 x SSC	200 ml
Natriumsarkosyl	28 ml
ad 2 l mit H ₂ O _{DEPC}	

Waschlösung II:

20 x SSC	10 ml
Natriumsarkosyl	6 ml
ad 2 l mit H ₂ O _{DEPC}	

Strip-wash

Zur Entfernung der spezifisch gebundenen radioaktiven Sonde wurde die Membran nach der Autoradiographie 20 min in 0,01 % SDS/0,01 x SSC gekocht. Durch diese Behandlung wird eine weitere Hybridisierung der Membran zu einem späteren Zeitpunkt ermöglicht.

2.2.4.4 RT-PCR

Bei der RT-PCR wurde die cDNA-Synthese nach der Hybridisierung der RNA mit einem spezifischen Oligomer, und die PCR-Amplifikation der synthetisierten cDNA, in einem Reaktionsgefäß durchgeführt. Dazu wurde der Kit *Titan one tube RT-PCR system* (Roche) entsprechend den Herstellerangaben verwendet. Um eventuelle Kontaminationen mit DNA auszuschließen, wurde die aus den Zellen isolierte Gesamt-RNA zunächst mit einer Dnase I (*DNA free*, Ambion) verdaut. Die Reaktionsbedingungen der RT-PCR wurden wie folgt eingestellt: 50°C, 30 min (reverse Transkription); 96°C für 2 min, anschließend 10 Zyklen mit je 94°C für 30 s (Denaturierung), 52°C für 30 s (Hybridisierung) und 68°C für 1 min (Synthese); gefolgt von 25 Zyklen mit einer Synthesedauer von 1 min 30 s.

2.2.5 Proteinchemische Methoden

2.2.5.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in Proteinlösungen oder Zelllysaten wurde der *DC Protein Assay* (BioRad) verwendet und nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Prinzip dieser kolorimetrischen Messung basiert auf der Methode nach Lowry.

2.2.5.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) werden Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Durch Zusatz von Natriumdodecylsulfat (SDS) und das Erhitzen der SDS-Proteinlösung werden nichtkovalente Wechselwirkungen in nativen Proteinen aufgehoben. Eine Reduzierung der Disulfidbrücken des Proteins kann durch Zugabe von Dithiothreitol (DTT) oder β -Mercaptoethanol erreicht werden. Die denaturierten Polypeptide binden SDS-Anionen und erhalten dadurch eine negative Ladung. Da die Menge an gebundenem SDS proportional zum Molekulargewicht der Proteine ist, wandern die SDS-Polypeptidkomplexe entsprechend der Größe der Polypeptide durch das Polyacrylamidgel. Als Referenz zur Bestimmung der Größe dienen Markerproteine mit bekanntem Molekulargewicht.

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgele, bestehend aus zwei Einheiten: einem 5%-igem Sammelgel (pH 6,8) und einem Trenngel (pH 8,8) gegossen. Als Gelapparaturen wurden *mighty small* Gießstände und Laufkammern (Amersham Pharmacia) benutzt. Für die Herstellung der Trenngele wurde je nach Größe der zu analysierenden Proteine, die Konzentration an Polyacrylamid auf 10-15 % eingestellt.

In der folgenden Tabelle ist die Zusammensetzung für je 5 ml Trenngel sowie 2 ml Sammelgel aufgeführt.

Komponente	Trenngel 10%	Trenngel 12%	Trenngel 15%	Sammelgel 5%
H ₂ O	1,9 ml	1,6 ml	1,1 ml	1,4 ml
30% Acrylamid Mix (29:1)	1,7 ml	2,0 ml	2,5 ml	0,33 ml

1,5 M Tris pH 8.8	1,3 ml	1,3 ml	1,3 ml	-
1,0 M Tris pH 6.8	-	-	-	0,25 ml
10% SDS	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,02 ml
10% Ammoniumpersulfat	0,05 ml	0,05 ml	0,05 ml	0,02 ml
TEMED	0,002 ml	0,002 ml	0,002 ml	0,002 ml

Die aufzutrennenden Proteinlösungen wurden mit 2 x SDS-Probenpuffer (BioRad) versetzt und für 5 min bei 100°C denaturiert. Um die Disulfidbrücken zu reduzieren, wurde dem Probenpuffer β -Mercaptoethanol nach Angaben des Herstellers zugefügt. Die Elektrophorese erfolgte bei 20 mA/Gel in 1 x SDS-Laufpuffer (10 x SDS Tris/Glycin – Laufpuffer, BioRad).

2.2.5.3 Anfärben von Proteinen

Coomassie-Blau –Färbung:

Zum Nachweis von Proteinen in SDS-Gelen können die Gele mit Coomassie-Blau-R250 gefärbt werden. Das Gel wird dabei für 30 min in eine Coomassie-Blau-Lösung gelegt und leicht geschwenkt. Nach einer anschließenden Entfärbung des Gels werden die Proteinbanden sichtbar.

Coomassie-Färbelösung (BioRad)

Entfärbelösung: 45% Methanol
15% Essigsäure

Ponceau-Färbung:

Die Färbung mit Ponceau S Solution (Sigma) wird nach dem Proteintransfer auf eine Membran verwendet. Die Membran wird kurz in Ponceau S Lösung geschwenkt und nach Entfärben mit Wasser werden die Proteinbanden rot sichtbar. Während die Färbung von Proteinen mit Coomassie-Lösung irreversibel ist, kann durch längeres Waschen mit Wasser die Ponceau-gefärbte Membran wieder vollständig entfärbt und für *Western blot* – Analysen verwendet werden.

2.2.5.4 Elektrotransfer von Proteinen

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe einer Tankblot-Apparatur (Amersham Pharmacia) auf eine PVDF-Membran transferiert. Dazu wurde

das Proteingel luftblasenfrei auf die Membran gelegt, zwischen mehrere Schichten mit Transferpuffer getränktem 3-MM-Whatmanpapier gepackt und in die Apparatur eingesetzt. Der Proteintransfer vom Gel auf die Membran erfolgte elektrophoretisch in Transferpuffer bei 250 mA für 2 h.

Transferpuffer:

Tris	5,8 g
Glycin	2,9 g
10 % SDS-Lösung	3,7 ml
Methanol	200 ml
ad 1000 ml H ₂ O _{bidest}	

2.2.5.5 *Western blot* – Analyse

Unter Verwendung von polyklonalen oder monoklonalen Antikörpern wurden verschiedene Proteine immunochemisch im *Western blot* nachgewiesen. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE elektrophoretisch getrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Danach wurde die Membran wie folgt weiterbehandelt:

- blockieren der Membran, um unspezifische Proteinbindungen zu verhindern: 1 x *Blocking Solution* (Roche) in 1x PBS/ 0,1% Tween20, über Nacht, 4°C
- 1x PBS/ 0,1%Tween20, 15 min RT, unter Schwenken
- 1x PBS/ 0,1%Tween20/ 0,5x *Blocking Solution*, 5 min RT, unter Schwenken
- Inkubation der Membran mit dem Primärantikörper, gelöst in 1x PBS/ 0,1% Tween20/ 0,5x *Blocking Solution*; 1 - 2 h RT
- Waschen der Membran mit 1x PBS/ 0,1%Tween20, 3 x 10 min RT, unter Schwenken
- 1x PBS/ 0,1%Tween20/ 0,5x *Blocking Solution*, 10 min RT, unter Schwenken
- Inkubation der Membran mit dem Sekundärantikörper, gelöst in 1x PBS/ 0,1%Tween20/ 0,5x *Blocking Solution*; 1 h RT
- Waschen der Membran mit 1x PBS/ 0,1%Tween20, 4 x 10 min RT, unter Schwenken.

Als Sekundärantikörper wurden *horseradish peroxidase* (HRP) – gekoppelte Antikörper verwendet, sodass der Nachweis der Proteine über eine von Peroxidase katalysierte Reaktion, mittels Chemilumineszenz erfolgte. Dabei wird durch die Peroxidase die Oxidation von Luminol katalysiert, was durch die Exposition mit einem Röntgenfilm nachgewiesen werden kann. Hierzu wurde das *ECL Detection System* sowie ECL-Röntgenfilme der Firma Amersham Pharmacia verwendet und nach den Angaben des Herstellers eingesetzt.

2.2.5.6 Herstellung von rekombinantem D₁₈₄N-GBP-1-His₆-Protein in *E.coli*

Zur Herstellung und Reinigung von rekombinantem Histidin-markiertem D₁₈₄N-GBP-1-His₆ wurde das QIAexpress-System (Qiagen) verwendet. Dazu wurde das mittels ortsgerechter Mutagenese und Klonierungsarbeiten (siehe 2.2.3.11) erzeugte Plasmid pQE60-D₁₈₄N-GBP-1 eingesetzt. pQE-Vektoren (Qiagen) sind speziell für die *high-level*-Expression von His₆-Fusionsproteinen in *E.coli* konstruiert wurden. Sie enthalten ein optimiertes *promoter-operator element* bestehend aus einem T5-Promotor und zwei *lac* Operatorsequenzen, die die Repression des T5-Promotors durch Bindung von *lac*-Repressoren ermöglichen. Dadurch kann die hohe Transkriptionsrate, die durch den T5-Promotor erreicht wird, reguliert und reprimiert werden. Durch den in diesem System verwendeten *E.coli*-Wirtsstamm M15 [pRep4], der das *low-copy* Plasmid pREP4 enthält, werden stets ausreichende Mengen an *lac*-Repressorprotein exprimiert. Um die Transkription der Sequenzen *downstream* vom Promotor zu induzieren, wird Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid (IPTG) zugegeben, das an das *lac*-Repressorprotein bindet und dieses damit inaktiviert. Dadurch kann die Expression des rekombinanten Proteins kontrolliert werden. Der verwendete pQE60-Vektor enthält im 3'-Bereich der Klonierungsregion eine Sequenz, die für 6 Histidinreste kodiert. Dadurch wird die Reinigung des rekombinanten Histidin-markierten Proteins mittels Affinitätschromatographie ermöglicht.

2.2.5.7 Bestimmung der Proteinlöslichkeit und optimaler Expressionsbedingungen

Nach Transformation des Plasmids pQE60-D₁₈₄N-GBP-1-His₆ in den *E.coli*-Wirtsstamm M15 wurden die Klone auf Überexpression des Proteins, sowie die Proteinlöslichkeit und die optimalen Expressionsbedingungen untersucht. Dazu wurden 10ml-Kulturen angesetzt, die nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,7 mit IPTG induziert und nach einer Kultivierungsdauer von 2 h und 4 h mittels SDS-PAGE und

anschließender Coomassie-Färbung analysiert wurden. Die Untersuchung der Löslichkeit des Proteins der Mutante D₁₈₄N-GBP-1-His₆ erfolgte nach Anleitung des *QiaExpressionist*-Kits (Qiagen).

Zur Bestimmung der optimalen Proteinexpressionsbedingungen wurden die IPTG-Konzentrationen (0; 0,1; 0,5 und 1mM IPTG) sowie die Inkubationstemperaturen (RT, 37°C) variiert. Die Induktion mit IPTG erfolgte bei einer OD₆₀₀ von 0,7. Proben wurden jeweils vor der Induktion sowie nach einer Kultivierung von 2h und 4h mit IPTG, entnommen. Nach Zentrifugation der Proben (14000 Upm, 3 min) wurde das Pellet in Lysispuffer gelöst und die Zellsuspension mit Ultraschall (60 W, 3 x 10 s) behandelt. Nach erneuter Zentrifugation (14000 Upm, 30 min, 4°C) wurden die im Überstand enthaltenen löslichen Proteine sowie die unlöslichen Proteine im Zellpellet, mit SDS-Probenpuffer versetzt und mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung analysiert.

2.2.5.8 Präparative Proteinexpression und –reinigung

Herstellung von Gesamtprotein-Zellysat zur Aufreinigung

Für die Herstellung größerer Mengen an rekombinantem Protein wurden 1l-Kulturen angeimpft, 1:50 mit Übernachtskultur versetzt, und bei 37°C und 120 rpm bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,7 kultiviert. Anschließend wurde die Expression des Proteins durch Zugabe von 0,1mM IPTG induziert und die Schüttelkultur für weitere 4 – 5 h bei 37°C inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (4000 g, 30 min, Sorvall) wurde das Zellpellet in 5 ml Lysispuffer aufgenommen. Der Zellaufschluß erfolgte mittels French Press (SLM/AMINCO, Rochester, USA). Die Zellsuspension wurde daraufhin zentrifugiert (30 min, 15000 g, 4°C) und das Pellet, welches die unlöslichen Proteine und Zellbestandteile enthält, verworfen.

Chromatographische Aufreinigung

Die Reinigung der Histidin-markierten Proteine aus den Proteinlysaten erfolgte mit Hilfe einer Metallchelate-Affinitätschromatographie. Nach dem Auftragen des Proteinlysats werden die Histidin-markierten Proteine an das Säulenmaterial, welches aus einer Nickel-NTA-Agarose besteht, gebunden. Dabei ist das Ni²⁺-Ion als Zentralion eines Chelatkomplexes über 4 seiner 6 Bindungsstellen mit *Nitrilo Triacetic Acid* (NTA) an die Matrix verknüpft und bindet über die zwei freien Bindungsstellen zwei benachbarte Histidinreste des His-fusionierten Proteins. Diese Verknüpfung

kann entweder durch die Senkung des pH-Wertes gelöst werden, oder die Histidine werden durch überschüssig zugegebenes Imidazol aus dem Komplex kompetitiv verdrängt. Die Reinigung der Proteine über die Bindung an Nickel-NTA-Agarose erfolgte durch FPLC an der *BioLogic Workstation* (BioRad). Das Zelllysate wurde zunächst filtriert (0,45 µm) und auf eine 5ml-Ni-NTA-Säule (Material Qiagen, Säule und Zubehör von BioRad) aufgetragen. Nach Waschen mit 7 Säulenvolumen Waschpuffer erfolgte die Elution über einen flachen linearen Gradienten von 20 mM bis 250 mM Imidazol mit ca. 60 ml und einem Fluss von 1,0 ml/min. Das von der Säule eluierte Protein wurde in 1ml-Fractionen gesammelt und mittels SDS-PAGE analysiert. Danach wurden die SDS-Polyacrylamidgels zur Visualisierung der Proteine mit Coomassie-Blau gefärbt.

Lösungen:

Lysispuffer:	50 mM	NaH ₂ PO ₄ , pH 8,0
	500 mM	NaCl
	20 mM	Imidazol
	10 %	Glycerol
	2 mM	TCEP

Waschpuffer:	50 mM	NaH ₂ PO ₄ , pH 8,0
	300 mM	NaCl
	20 mM	Imidazol
	10 %	Glycerol
	2 mM	TCEP

Elutionspuffer:	50 mM	NaH ₂ PO ₄ , pH 8,0
	300 mM	NaCl
	500 mM	Imidazol
	10 %	Glycerol
	2 mM	TCEP

2.2.5.9 Bestimmung der GTPase-Aktivität

Die Untersuchung der GTPase-Aktivität des gereinigten Histidin-markierten Proteins GBP-1-D₁₈₄N erfolgte mittels Dünnschichtchromatographie, wie in der Literatur

beschrieben (Pitossi *et al.*, 1993; Schwemmle und Staeheli, 1994). Als Kontrolle wurde gereinigtes rekombinantes GBP-1-His₆ und His₆-GBP-1 eingesetzt.

Das Protein (2,5 µg) wurde mit Puffer E (20 µl) gemischt und für 1 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von SDS (final 0,5% SDS) abgestoppt und Proben von 2 µl und 5 µl auf Polyethylenimin (PEI)-Dünnschichtplatten (Merck) aufgetragen. Die Trennung der Reaktionsprodukte erfolgte in einer Chromatographiekammer mit 1 M LiCl/1,6 M Essigsäure als Laufmittel. Nach dem Trocknen der Platten wurde das Ergebnis autoradiographisch sichtbar gemacht.

Puffer E:

- 50 mM Tris/HCl pH 8,0
- 5 mM MgCl₂
- 0,1 mM DTT
- 12 nM radiomarkiertes [α -³²P]GTP (3000 Ci/mmol)
- 130 nM AMP-PNP
- 130 µM GTP

2.2.6 Apoptoseuntersuchungen

2.2.6.1 *In situ* Nachweis von Apoptose durch die TUNEL-Methode

Mit der *TdT-mediated dUTP nick end labeling* (TUNEL) - Methode können apoptotische Zellen identifiziert werden. Dabei wird fragmentierte DNA, die während der Apoptose durch die Spaltung chromosomaler DNA mit der DNase CAD (*caspase-activated DNase*) auftritt, nachgewiesen. Mit Hilfe einer terminalen Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT) werden an die 3'-OH-Fragmentenden der DNA fluoreszenzmarkierte Nukleotide (dUTP-FITC) angehängt und die so markierten apoptotischen Zellen im Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen. Die TUNEL-Analyse wurde mit dem *In Situ Cell-Death Detection-Kit, Fluorescein*® (Roche) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Transduzierte HUVEC wurden mit einer Zelldichte von 10⁴ Zellen/cm² in 8-Kammer-Objektträger (Becton Dickinson Labware) ausgebracht und über Nacht in EBM-0,5%FCS kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 24 h in EBM-0,5%FCS oder

EBM-0,5%FCS + 30 U/ml TNF- α (Positivkontrolle) inkubiert und mit 100% Ethanol für 30 min bei 4°C fixiert. Die Zellen wurden anschließend mit 1x PBS gewaschen, für 4 min mit 0,05% Triton-X100 bei 4°C permeabilisiert und wie im Herstellerprotokoll beschrieben, weiterbehandelt. Nachdem die Objektträger mit 50% Glycerol/1x PBS beschichtet und mit einem Deckglas versehen waren, erfolgte die Auswertung an einem inversen Fluoreszenzmikroskop (Leica).

2.2.6.2 Nachweis der Apoptose durch aktivierte Caspase-3 im *Western blot*

Caspasen bilden eine Gruppe Cystein-spezifischer Proteasen, die in apoptotischen Zellen aktiviert werden. Alle Caspasen werden als Proenzyme synthetisiert und entweder autoproteolytisch oder durch Spaltung einer upstream-Protease der intrazellulären Kaskade aktiviert. Die Aktivierung der Caspase-3 während der Apoptose lässt sich durch das Auftreten der Spaltprodukte (17 und 12 kDa) im *Western blot* nachweisen. Von KV-, AS- und GBP-1-transduzierten HUVEC wurden mit Ripa-Puffer Proteinextrakte hergestellt und je 30 μ g Gesamtprotein für eine SDS-PAGE eingesetzt. Der Nachweis aktivierter Caspase-3 erfolgte durch *Western blot*-Analyse mit einem spezifischen anti-Caspase-3-Antikörper (α -Caspase-3; 1:350), der neben der Procaspase 3 auch die Caspase-3-Spaltprodukte erkennt. Als Positivkontrolle wurden Zellextrakte von U937-Zellen verwendet, die zur Induktion der Apoptose über Nacht mit einem CD95-Antikörper (0,1 μ g/ml), inkubiert wurden.

3. Ergebnisse

3.1 Inflammatorische Zytokine hemmen konzentrationsabhängig die Proliferation mikro- und makrovaskulärer Endothelzellen

Um das Wachstumsverhalten von Endothelzellen in Anwesenheit von inflammatorischen Zytokinen (IZ) zu untersuchen, wurden Proliferationsversuche mit makrovaskulären, humanen Nabelschnur-Endothelzellen (HUVEC) und mikrovaskulären dermalen Endothelzellen (MVEC) durchgeführt. HUVEC und MVEC wurden 6 Tage mit steigenden Konzentrationen an IL-1 β (2, 20, 200 U/ml), TNF- α (30, 300, 1000 U/ml) oder IFN- γ (10, 100, 1000 U/ml) in Anwesenheit von angiogenen Wachstumsfaktoren (AWF), bFGF und VEGF (je 10 ng/ml) inkubiert und die Proliferation der Zellen bestimmt (Abb. 5).

Die Behandlung von HUVEC (Abb. 5A) und MVEC (Abb. 5B) mit AWF, in Abwesenheit von IZ (0), führte im Vergleich zu den nicht AWF-behandelten Zellen (K) zu einer starken Aktivierung der Zellproliferation. Bei gleichzeitiger Zugabe von IZ wurde die AWF-induzierte Proliferation konzentrationsabhängig gehemmt. Alle drei IZ (IL-1 β , TNF- α und IFN- γ) bewirkten dabei eine dosisabhängige Proliferationsinhibierung sowohl in makrovaskulären (Abb. 5A) als auch in mikrovaskulären (Abb. 5B) Endothelzellen.

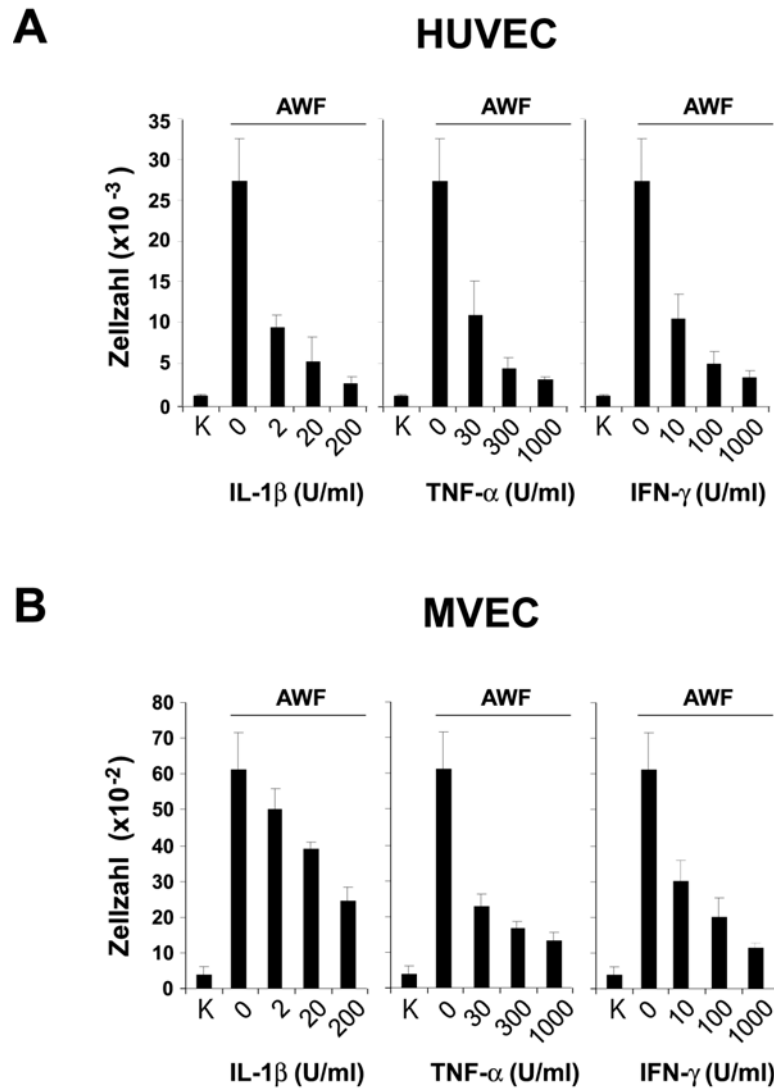


Abb. 5: Inflammatorische Zytokine (IL-1 β , TNF- α und IFN- γ) hemmen die Proliferation makrovaskulärer (A) und mikrovaskulärer (B) Endothelzellen konzentrationsabhängig. HUVEC (A) und MVEC (B) wurden in Anwesenheit von AWF (bFGF und VEGF, je 10 ng/ml) mit unterschiedlichen Konzentrationen an IL-1 β (2, 20 oder 200 U/ml), TNF- α (30, 300 oder 1000 U/ml) und IFN- γ (10, 100 oder 1000 U/ml) behandelt. Am dritten Tag erfolgte ein Mediumwechsel und nach 6 Tagen wurde die Zellzahl mittels *Coulter counter* bestimmt. Als Kontrolle dienten unstimulierte (K) beziehungsweise zum Nachweis der Proliferationsaktivierung AWF-stimulierte (0) Zellen. Die Abbildungen zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen von neun unabhängigen Versuchen.

3.2 IL-1 β , TNF- α und IFN- γ induzieren in Endothelzellen *in vitro* die Expression des humanen Guanylatbindungsproteins-1

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Proliferationsverhalten von Endothelzellen nach IZ-Stimulierung (Abb. 5) und der GBP-1-Expression zu untersuchen, wurden *Western blot* - Studien durchgeführt. Zum Nachweis der GBP-1-Expression wurde der monoklonale anti-GBP-1-Antikörper 1B1 eingesetzt

(Lubeseder-Martellato *et al.*, 2002). Die Stimulierung der Zellen erfolgte analog zu den Proliferationsexperimenten, d.h. die Endothelzellen wurden in Anwesenheit von AWF (bFGF und VEGF, je 10 ng/ml) mit IL-1 β (2, 20 oder 200 U/ml), TNF- α (30, 300 oder 1000 U/ml) oder IFN- γ (10, 100 oder 1000 U/ml) stimuliert (Abb. 6).

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Behandlung von HUVEC als auch von MVEC nach 24 h zu einer deutlichen GBP-1-Expression führte (Abb. 6). Eine konzentrationsabhängige Erhöhung der GBP-1-Expression wurde für die IZ IL-1 β sowie TNF- α beobachtet, während IFN- γ , als Hauptinduktor von GBP-1, bereits bei kleinster Dosis (10 U/ml) eine starke GBP-1-Expression induzierte (Abb. 6).

Diese Ergebnisse zeigen, dass unter dem Einfluß von IZ die Expression von GBP-1 invers mit der Endothelzellproliferation *in vitro* korreliert (vergleiche Abb. 5 und Abb. 6).

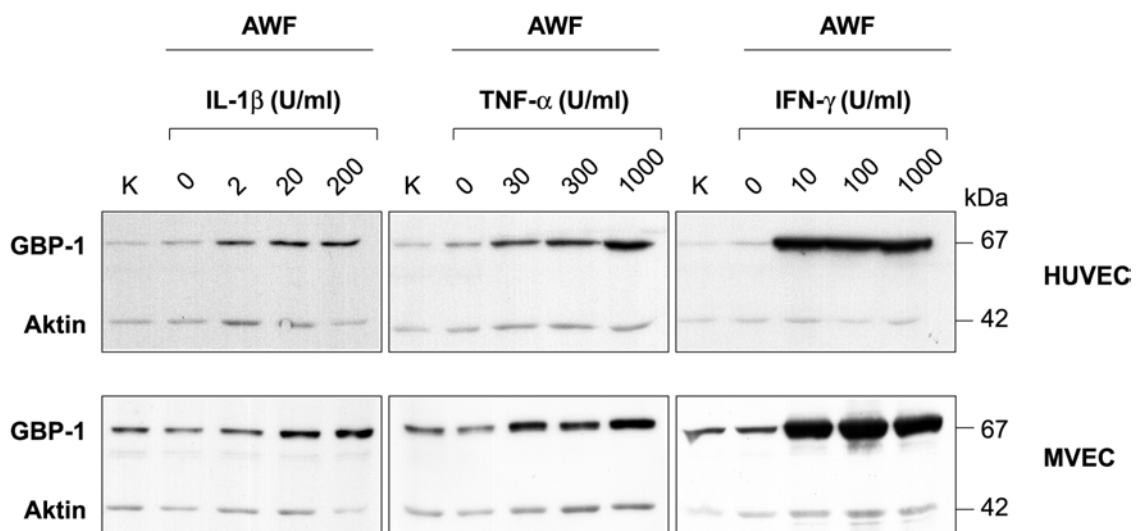


Abb. 6: Inflammatorische Zytokine (IL-1 β , TNF- α und IFN- γ) induzieren in Endothelzellen die Expression von GBP-1.

Western blot – Analysen der GBP-1-Expression in HUVEC und MVEC, die für 24 h mit steigenden Konzentrationen an IL-1 β , TNF- α oder IFN- γ in Anwesenheit von AWF (bFGF und VEGF, je 10 ng/ml) behandelt wurden. Als Kontrolle dienten unstimulierte (K) und AWF-stimulierte (0) Zellen. Zum Nachweis der GBP-1-Expression wurde ein monoklonaler anti-GBP-1-Antikörper (1B1) eingesetzt. Der gleichzeitige Nachweis von Aktin diente als Vergleich der aufgetragenen Proteinmengen.

3.3 Angiogene Wachstumsfaktoren hemmen in Endothelzellen die IZ-induzierte GBP-1-Expression

Wie unter 3.2 beschrieben, steigt proportional zur Konzentration an IZ die Expression von GBP-1 auch in Anwesenheit von AWF. Um zu untersuchen, ob die IZ-induzierte GBP-1-Expression durch AWF herunterreguliert wird, wurden Endothelzellen entweder mit IZ allein oder zusammen mit AWF für 24 h behandelt.

Wie gezeigt werden konnte, führte die Stimulierung der Zellen mit IZ zu einer starken Induktion von GBP-1, während die gleichzeitige Gabe von IZ und AWF eine deutlich verminderte GBP-1-Expression bewirkte (Abb. 7).

Bei gleichzeitiger Gabe von IL-1 β und AWF exprimierten HUVEC ca. 75 % und MVEC etwa 83% weniger GBP-1 als im Vergleich zur Stimulierung mit IL-1 β allein (Abb. 7, unten). Die TNF- α -induzierte Expression von GBP-1 wurde durch AWF in HUVEC um 45% und in MVEC um 48% abgeschwächt (Abb. 7, unten). Am stärksten wurde die Expression von GBP-1 durch IFN- γ induziert. Die Zugabe von AWF bewirkte hier eine um 42% geringere GBP-1-Expression in HUVEC und eine um 36% verminderte GBP-1-Expression in MVEC (Abb. 7, unten).

Demzufolge wird die Induktion der GBP-1-Expression durch IZ in Endothelzellen bei Vorhandensein von AWF abgeschwächt.

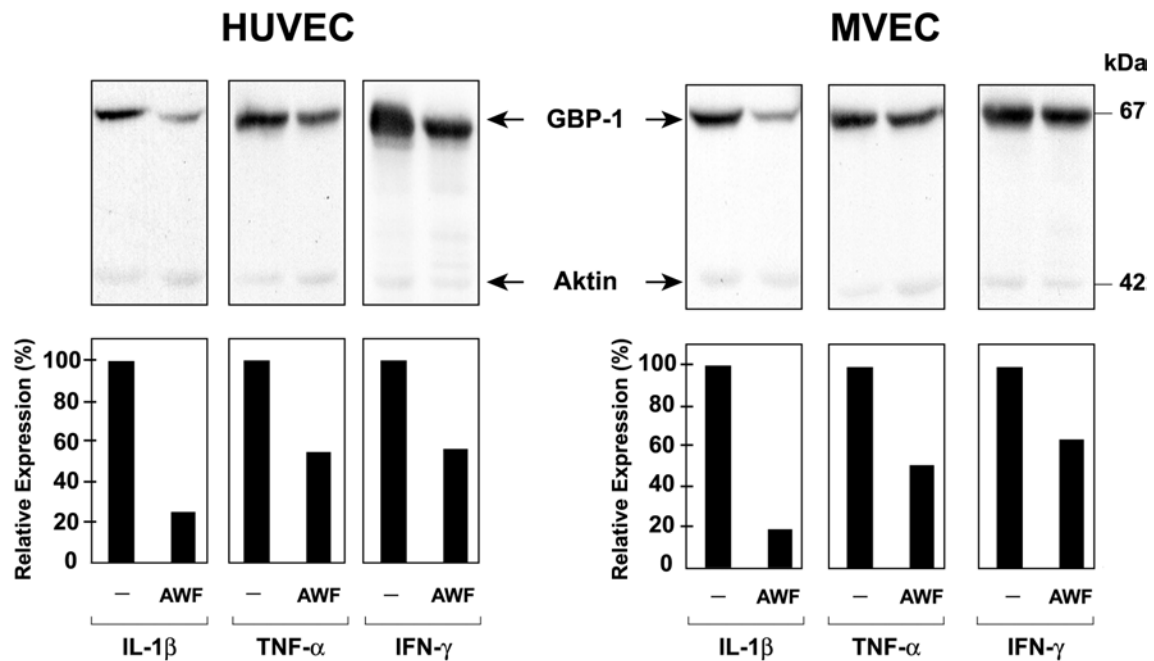


Abb. 7: Angiogene Wachstumsfaktoren inhibieren die durch inflammatorische Zytokine (IL-1 β , TNF- α , bzw. IFN- γ) induzierte Expression von GBP-1.

Western blot - Analysen der GBP-1 Expression in Endothelzellen, die mit den angeführten inflammatorischen Zytokinen, jeweils in An- oder Abwesenheit von AWF (bFGF und VEGF, je 10 ng/ml) für 24 h stimuliert wurden. Folgende Konzentrationen an IZ wurden eingesetzt: 200 U/ml IL-1 β , 300 U/ml TNF- α und 100 U/ml IFN- γ . Zum Nachweis der GBP-1-Expression wurde ein polyklonaler anti-GBP-1-Antikörper (α -GBP-1/3) eingesetzt. Die gleichzeitige Färbung mit Aktin zeigt, dass gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden.

3.4 In KS-Zellen führt die Stimulierung mit IL-1 β zu einer Aktivierung der Proliferation und bewirkt nicht die Induktion der GBP-1-Expression

3.4.1 In KS-Zellen wird die Proliferation durch IL-1 β , jedoch nicht durch IFN- γ aktiviert

In Endothelzellen führt die Stimulierung mit den inflammatorischen Zytokinen IL-1 β , TNF- α und IFN- γ zu einer Inhibierung der Proliferation, die mit der Induktion der GBP-1-Expression einhergeht. Von fibro-endothelialen Zellen, die aus Kaposi-Sarkom (KS)-Läsionen isoliert wurden (KS-Zellen), ist bekannt, dass die *in vitro* - Behandlung mit IL-1 β eine Aktivierung der Proliferation bewirkt (Stürzl *et al.*, 1995). Anhand von Proliferationsexperimenten mit den KS-Zellkulturen (M7/3) konnte bestätigt werden, dass IL-1 β die Proliferation von KS-Zellen aktiviert (Abb. 8A). Die stärkste Proliferationsaktivierung wurde dabei bei einer Konzentration von 20 U/ml IL-1 β gemessen (Abb. 8A). Von IFN- γ ist bekannt, dass es die Proliferation von Serum-

stimulierten KS-Zellen *in vitro* inhibiert (Anders, 1993). In den hier durchgeführten Wachstumsversuchen mit unstimulierten M7/3 zeigte IFN- γ keinen Effekt auf die Proliferation dieser Zellen (Abb. 8A).

3.4.2 Nachweis der KS-Zellaktivierung durch IL-1 β über die Aktivierung von NF- κ B

IL-1 β aktiviert den Transkriptionsfaktor NF- κ B. Um zu zeigen, dass die Proliferationsaktivierung von M7/3 auf einem IL-1 β -spezifischen Effekt beruht, wurden zytochemische Immunfluoreszenzfärbungen zum Nachweis der NF- κ B-Aktivierung durchgeführt. NF- κ B ist ein Transkriptionsfaktor, der in ruhenden unstimulierten Zellen im Zytoplasma lokalisiert ist und nach Aktivierung in den Zellkern wandert und die Genexpression induziert. Mit Hilfe eines polyklonalen anti-NF- κ B-Antikörpers und indirekter Immunfluoreszenzfärbung wurden HUVEC und M7/3 auf die NF- κ B-Aktivierung nach IL-1 β -Stimulierung untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit IL-1 β in HUVEC und M7/3 zu einer Translokation in den Zellkern und damit zu einer Aktivierung von NF- κ B führte (Abb. 8B). In unstimulierten Zellen befindet sich NF- κ B als Komplex assoziiert mit seinem Inhibitorprotein I κ B, im Zytoplasma (Abb. 8B, Pfeile) und in IL-1 β -stimulierten Zellen im Zellkern (Abb. 8B, Pfeilspitzen).

Damit wurde bewiesen, dass das verwendete IL-1 β eine Wirkung auf die KS-Zellen besitzt und der entsprechende Rezeptor für dieses Zytokin auch funktionell aktiv ist. IL-1 β wirkt auf KS-Zellen wie auf Endothelzellen NF- κ B-aktivierend, wie anhand der NF- κ B-Translokation in den Zellkern gezeigt wurde.

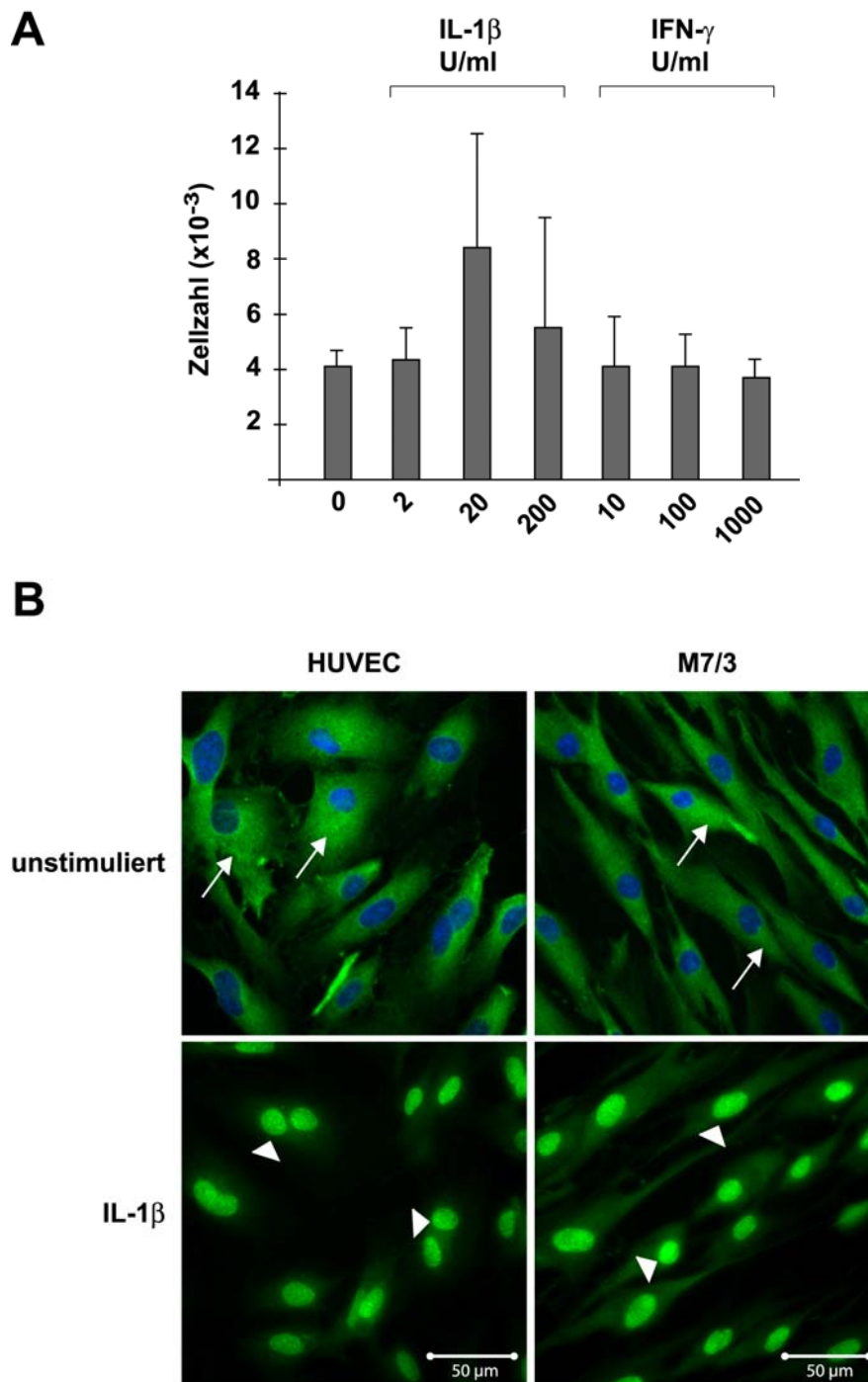


Abb. 8: IL-1 β jedoch nicht IFN- γ aktiviert die Proliferation von M7/3.

(A) Proliferationsexperiment mit M7/3, die mit den angegebenen Konzentrationen an IL-1 β oder IFN- γ behandelt wurden. Ein Mediumwechsel wurde nach drei Tagen vorgenommen und nach 6 Tagen die Zellzahl mittels *Coulter counter* bestimmt. In der Abbildung sind die Mittelwerte und Standardabweichungen von neun unabhängigen Versuchen dargestellt.

(B) Nachweis der KS- und Endothelzellaktivierung durch IL-1 β über die Translokationsaktivierung von NF- κ B. Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von M7/3 und HUVEC, die entweder unstimuliert waren oder für 40 min mit 200 U/ml IL-1 β behandelt wurden. Zum Nachweis von NF- κ B sowie der nukleären Translokation wurde ein polyklonaler anti-NF- κ B-Antikörper und ein Fluorochrom-gekoppelter (AlexaFluor 488) anti-Kaninchen-Antikörper (grün), eingesetzt. In unstimulierten Zellen war NF- κ B im Zytoplasma (weiße Pfeile) und in TNF- α -behandelten Zellen im Zellkern (weiße Pfeilspitzen) lokalisiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) gefärbt. Die Fluoreszenzbilder wurden am LSM (Zeiss) aufgenommen.

3.4.3 GBP-1 wird in KS-Zellen nicht durch IL-1 β induziert

Um zu untersuchen, wie IL-1 β in KS-Zellen auf die GBP-1-Expression wirkt, wurden *Western blot* – Analysen durchgeführt (Abb. 9). Dazu wurden M7/3 (Abb. 9A) und HUVEC (Abb. 9B) mit IL-1 β (200 U/ml) und IFN- γ (100 U/ml) allein oder in Kombination mit angiogenen Wachstumsfaktoren für 24 h stimuliert. Hierbei wurden für HUVEC AWF (bFGF und VEGF, je 10 ng/ml) und für die KS-Zellen, aufgrund der autokrinen Produktion von VEGF (Cornali *et al.*, 1996), nur bFGF (10 ng/ml) eingesetzt. Mit Hilfe eines monoklonalen anti-GBP-1-Antikörpers wurde die Expression von GBP-1 in diesen Zellen untersucht.

Dabei konnte gezeigt werden, dass die Stimulierung von HUVEC mit IL-1 β und IFN- γ für 24 h, zu einer starken Induktion der GBP-1-Expression führte, die durch gleichzeitige Behandlung mit angiogenen Wachstumsfaktoren gehemmt werden konnte (Abb. 9B, vergleiche auch Abb. 7).

Interessanterweise konnte in den M7/3 die GBP-1-Expression durch IL-1 β nicht beziehungsweise nur sehr schwach induziert werden, während durch IFN- γ eine vergleichbar starke GBP-1-Expression wie in HUVEC induziert wurde (Abb. 9A).

Wie in Abb. 9C dargestellt, entspricht bei gleichen Mengen an eingesetztem Protein, die IFN- γ -induzierte GBP-1-Expression in KS-Zellen ungefähr der von HUVEC. Vergleicht man die GBP-1-Expression nach Induktion mit IL-1 β , so ist bei gleichen Proteinkonzentrationen GBP-1 in den KS-Zellen nicht beziehungsweise nur äußerst schwach nachweisbar (Abb. 9C).

Anhand dieser Ergebnisse wurde gezeigt, dass in KS-Zellen die proliferationsstimulierende Wirkung von IL-1 β damit einhergeht, dass in diesen Zellen GBP-1 nicht durch IL-1 β induziert werden kann. Daraus lässt sich schließen, dass GBP-1 möglicherweise notwendig ist, um die proliferationsinhibierende Wirkung von IL-1 β in Endothelzellen zu vermitteln.

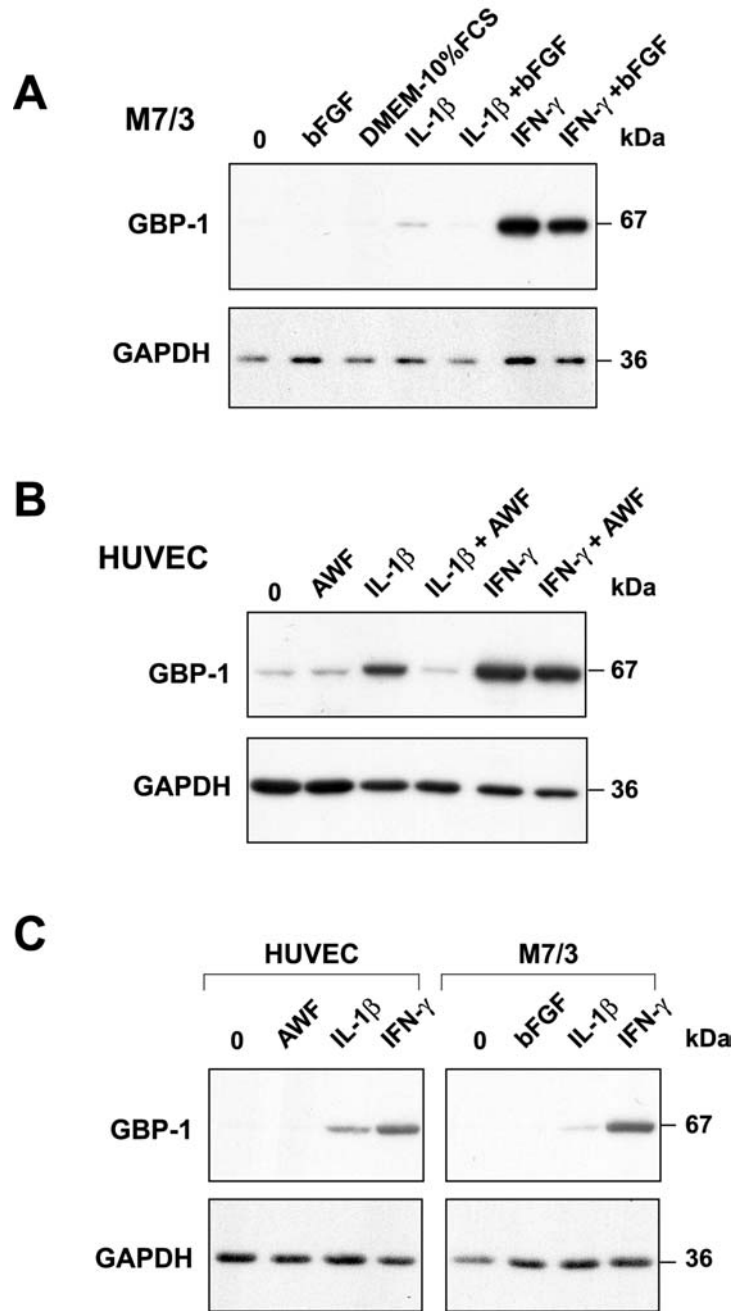


Abb. 9: In KS-Zellen wird die Expression von GBP-1 nicht durch IL-1 β induziert.

Western blot – Analysen zum Nachweis der GBP-1-Expression in KS-Zellen (M7/3) und Endothelzellen (HUVEC) mit einem monoklonalen anti-GBP-1-Antikörper (1B1).

(A) M7/3 waren entweder unstimuliert (0) oder wurden für 24 h mit bFGF (10 ng/ml), DMEM-10%FCS, IL-1 β (200 U/ml) oder IL-1 β in Kombination mit bFGF; IFN- γ (100 U/ml) oder IFN- γ in Kombination mit bFGF behandelt.

(B) HUVEC, entweder unstimuliert (0) oder für 24 h mit AWF (bFGF und VEGF, je 10 ng/ml), IL-1 β oder IL-1 β in Kombination mit AWF; IFN- γ oder IFN- γ in Kombination mit AWF behandelt.

(C) HUVEC, entweder unstimuliert (0) oder mit AWF, IL-1 β oder IFN- γ behandelt und M7/3, unstimuliert (0) oder mit bFGF, IL-1 β oder IFN- γ behandelt. Zum Vergleich der eingesetzten Proteinkonzentrationen wurden die Membranen nach Entfernen des gebundenen anti-GBP-1-Antikörpers mit einem monoklonalen anti-GAPDH-Antikörper gefärbt.

3.5 GBP-1 vermittelt die IZ-induzierte Hemmung der endothelialen Zellproliferation

Um festzustellen, ob GBP-1 in die IZ-induzierte Proliferationshemmung von Endothelzellen involviert ist beziehungsweise diese sogar vermittelt, wurden HUVEC mit Hilfe eines retroviralen Vektorsystems transduziert, um GBP-1 beziehungsweise eine *antisense*-GBP-1 mRNA für die Hemmung der GBP-1-Expression konstitutiv zu exprimieren (Abb. 10). Zu diesem Zweck wurde die für GBP-1 kodierende cDNA in *sense*- (Abb. 10A, GBP-1) und *antisense*-Orientierung (Abb. 10A, AS) in den retroviralen Vektor pBabePuro (Morgenstern und Land, 1990); (Abb. 10A; Kontrollvektor, KV) eingesetzt.

Die transduzierten Zellen wurden zunächst auf ihre morphologischen Eigenschaften kontrolliert und es wurde untersucht, ob GBP-1 die Fähigkeit von Endothelzellen zur Bildung kapillarähnlicher Strukturen beeinflusst. Ein charakteristisches Merkmal von Endothelzellen ist ihre Fähigkeit zur Ausbildung von kapillarähnlichen Strukturen auf Matrigel. Matrigel wird als Modellsystem der extrazellulären Matrix betrachtet und enthält als Hauptmatrixkomponenten Laminin, Kollagen Typ IV, Entactin, und Heparansulphat-Proteoglykan (HSPG); (Grant *et al.*, 1985; Kleinman *et al.*, 1986). Es wird vorrangig eingesetzt, um die Differenzierung von Neuronen, Oligodendrozyten, Hepatozyten, vaskulären Endothelzellen und Melanomzellen zu studieren. Außerdem dient es als Substrat für Untersuchungen der Kapillarbildungsfähigkeit von Endothelzellen.

KV- und GBP-1-transduzierte HUVEC wurden auf Gelatine sowie auf *growth factor-reduced* (GFR)-Matrigel kultiviert. Bei den auf Gelatine ausgebrachten Zellen wurde der für HUVEC typische Zellrasen beobachtet, während die Zellen unter den gleichen Bedingungen auf Matrigel kapillarähnliche Strukturen ausbildeten (Abb. 10B). GBP-1-transduzierte HUVEC wiesen zu KV-transduzierten HUVEC eine vergleichbare Anzahl an Vernetzungspunkten (Abb. 10B, Pfeil) sowie vergleichbare Kapillarlängen (Abb. 10B, Stern) auf. Es wurde kein Unterschied in der Morphologie von KV- und GBP-1-transduzierten Zellen festgestellt, beide bildeten kapillarähnliche Strukturen auf den mit Matrigel beschichteten Platten (Töpolt *et al.*, 2002).

Mit Hilfe eines polyklonalen anti-GBP-1-Antikörpers wurde die GBP-1-Expression der transduzierten Zellen untersucht. Eine starke Expression von GBP-1 konnte in GBP-1-transduzierten und in IL-1 β -behandelten KV-transduzierten HUVEC nachgewiesen werden (Abb. 10C). Durch die Expression der *antisense*-GBP-1 (AS) mRNA (Abb.

10C, AS) konnte die Genexpression von endogenem GBP-1 reduziert werden. Ebenso wurde die IL-1 β -induzierte GBP-1-Expression sehr effizient in den AS-transduzierten Zellen blockiert (Abb. 10C, IL-1 β , AS).

In Proliferationsuntersuchungen mit GBP-1- und KV-transduzierten HUVEC konnte gezeigt werden, dass mit steigenden Konzentrationen an AWF (bFGF und VEGF, je 1, 10 oder 100 ng/ml) die Proliferation von HUVEC durch die konstitutive Expression von GBP-1 gehemmt wurde (Abb. 10D, weiße Balken), im Vergleich zu den KV-transduzierten HUVEC (Abb. 10D, graue Balken). Die maximale Proliferationsrate wurde bereits bei einer Konzentration von 10 ng/ml AWF erreicht.

Die durch AWF (bFGF und VEGF, je 10 ng/ml) induzierte Proliferation von KV-transduzierten HUVEC konnte durch die Zugabe von IL-1 β dosisabhängig gehemmt werden (Abb. 10E, graue Balken, vergleiche auch Abb. 5A). Im Vergleich dazu konnte die Proliferation der AS-transduzierten Zellen nicht mehr durch IL-1 β gehemmt werden (Abb. 10E, schwarze Balken).

Durch diese Ergebnisse wurde gezeigt, dass GBP-1 notwendig ist, um die antiproliferative Wirkung von IZ zu vermitteln. Die IZ-induzierte GBP-1-Expression (Abb. 10C) führte zu einer Hemmung der Proliferation (Abb. 10E), während durch Blockierung der GBP-1-Expression mit einer *antisense*-GBP-1 mRNA (Abb. 10C), die Zellen auch in Anwesenheit von IZ proliferierten (Abb. 10E).

Es wurde weiterhin demonstriert, dass GBP-1 ausreichend ist, um die IZ-induzierte Proliferationshemmung zu vermitteln. Die konstitutive Expression von GBP-1 in Endothelzellen (GBP-1, Abb. 10C) führte zu einer starken Hemmung der Proliferation in Anwesenheit angiogener Wachstumsfaktoren (Abb. 10D); (Cornali, 1999; Guenzi *et al.*, 2001; Stürzl *et al.*, 2003; Töpolt *et al.*, 2002).

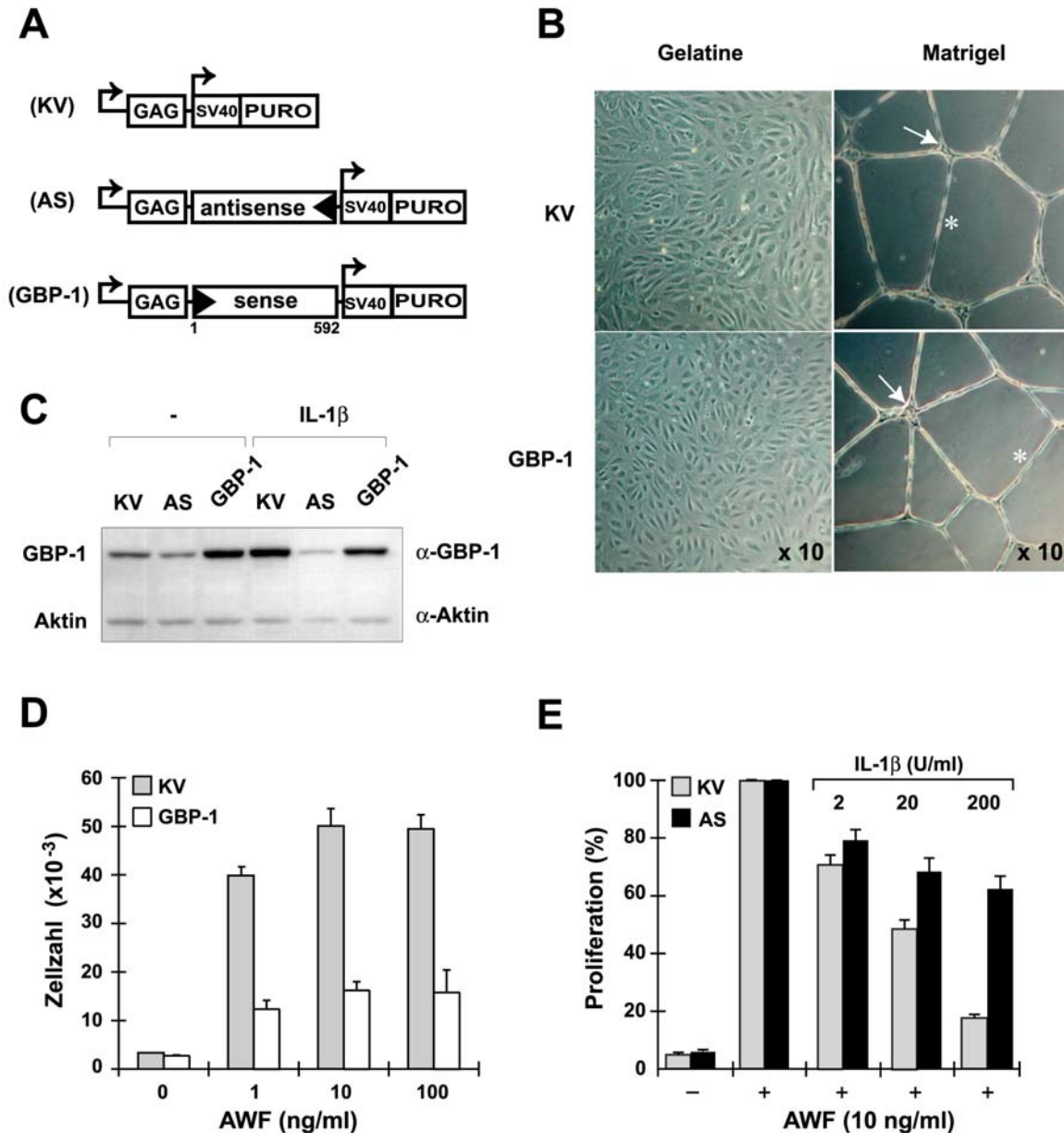


Abb. 10: GBP-1 vermittelt die antiproliferative Wirkung inflammatorischer Zytokine in Endothelzellen. (A) Schematische Darstellung des retroviralen Expressionsvektors pBabePuro (KV), in den die GBP-1-cDNA in *sense*- und *antisense*-Orientierung für die konstitutive Expression von GBP-1 beziehungsweise einer *antisense*-GBP-1-mRNA (AS) eingesetzt wurde. (B) Morphologie transduzierter HUVEC auf Gelatine und Matrigel. Phasenkontrastaufnahmen von KV- und GBP-1-transduzierten HUVEC, die mit 3×10^4 Zellen/cm² auf Gelatine oder *growth factor reduced* (GFR)-Matrigel ausgebracht und in Anwesenheit von AWF (bFGF und VEGF, je 10 ng/ml) für 24 h kultiviert wurden. Auf Matrigel bildeten KV- und GBP-1-transduzierte HUVEC kapillarähnliche Netzwerkstrukturen aus. Die jeweiligen Bilder wurden mit einem 10x Objektiv an einem Phasenkontrast-Mikroskop (Zeiss) vorgenommen. (C) *Western blot* – Analyse der GBP-1-Expression mit Hilfe eines polyklonalen anti-GBP-1-Antikörpers (α -GBP-1/3) in KV-, GBP-1- oder AS-transduzierten HUVEC, die entweder unstimuliert (-) waren oder für 24 h mit IL-1 β (20 U/ml) behandelt wurden. (D) Proliferationsexperimente mit KV- und GBP-1-transduzierten HUVEC in Anwesenheit von steigenden Konzentrationen angiogener Wachstumsfaktoren (bFGF und VEGF). (E) Proliferationsexperimente von KV und AS-transduzierten HUVEC in Anwesenheit von AWF (bFGF und VEGF, je 10 ng/ml) und steigenden Konzentrationen an IL-1 β . Ein Mediumwechsel wurde nach drei Tagen durchgeführt und nach 6 Tagen die Zellzahl mittels *Coulter counter* bestimmt. Die Abbildungen (D) und (E) stellen jeweils die Mittelwerte und Standardabweichungen von neun unabhängigen Versuchen dar.

3.6 Die Expression von GBP-1 in Endothelzellen induziert keine Apoptose

Wie in Kapitel 3.5 gezeigt wurde, vermittelt GBP-1 die IZ-induzierte Hemmung der Endothelzellproliferation. Daraus ergibt sich die Frage, ob der Mechanismus über den GBP-1 die Inhibierung der Proliferation vermittelt, durch Induktion von Apoptose erfolgt. Die Untersuchung der Apoptose wurde mit transduzierten HUVEC durchgeführt, die entweder eine *antisense*-GBP-1 mRNA (AS) oder GBP-1 konstitutiv exprimierten, oder mit dem Kontrollvektor (KV) transduziert worden waren. Zum Nachweis apoptotischer Zellen wurden sowohl die Expressionsanalyse aktivierter Caspase-3, als auch der zytochemische Nachweis von DNA-Strangbrüchen auf Einzelzellebene mittels TUNEL-Analyse, angewandt.

3.6.1 Western blot - Analyse zum Nachweis aktivierter Caspase-3

Ein zentrales Ereignis der Apoptose ist die Aktivierung der Caspasen-Kaskade. Caspasen sind eine Familie von Proteasen, die an der Transduktion eines apoptotischen Signals beteiligt sind. Sie werden als inaktive Procaspasen gebildet und durch proteolytische Spaltung, katalysiert durch andere Caspasen, in ihre aktive Form umgewandelt. Beispielsweise wird die inaktive Procaspase-3 in ihre aktiven Untereinheiten p17 und p12 gespalten (Earnshaw *et al.*, 1999). Daraus ergibt sich eine Möglichkeit zur Identifizierung apoptotischer Zellen, über den Nachweis aktiver Caspase-Fragmente mittels *Western blot* – Analyse. Proteinextrakte von KV-, GBP-1- oder AS-transduzierten HUVEC wurden mittels SDS-PAGE elektrophoretisch getrennt und mit einem spezifischen anti-Caspase-3-Antikörper, der neben der Procaspase-3 auch die Caspase-3-Spaltprodukte erkennt, im *Western blot* analysiert (Abb. 11A). Weder bei GBP-1-exprimierenden HUVEC (GBP-1) noch bei KV- oder AS-transduzierten HUVEC wurde ein aktiviertes Caspase-3-Spaltprodukt (17 kDa-Fragment) festgestellt (Abb. 10A). Im Vergleich dazu zeigten U937-Zellen, die zur Induktion der Apoptose über Nacht mit dem Fas-Liganden (FasL) inkubiert wurden, das 17 kDa-Spaltfragment aktivierter Caspase-3 (Abb. 11A).

3.6.2 Analyse der DNA-Fragmentierung mittels TUNEL-Analyse

In einem späten Schritt der apoptotischen Reaktionskaskade wird eine *caspase-activated-DNAse* (CAD) aktiviert, die zum Abbau der chromosomalen DNA führt. Die bei der Spaltung der DNA auftretenden Einzelstrangbrüche können mit Hilfe der *TdT-mediated dUTP nick end labeling* (TUNEL)-Methode nachgewiesen werden.

Unabhängig von ihrer GBP-1 Expression wurden weder in den KV- oder AS-transduzierten HUVEC noch in den GBP-1-transduzierten HUVEC apoptotische Zellen nachgewiesen (Abb. 11B); (Guenzi *et al.*, 2001). Im Vergleich dazu, konnten apoptotische Zellen bei TNF- α -behandelten KV-transduzierten HUVEC anhand fluoreszenzmarkierter DNA-Strangbrüche nachgewiesen werden (Abb. 11B).

Dadurch konnte gezeigt werden, dass die konstitutive Expression von GBP-1 nicht zur Induktion von Apoptose in Endothelzellen führt.

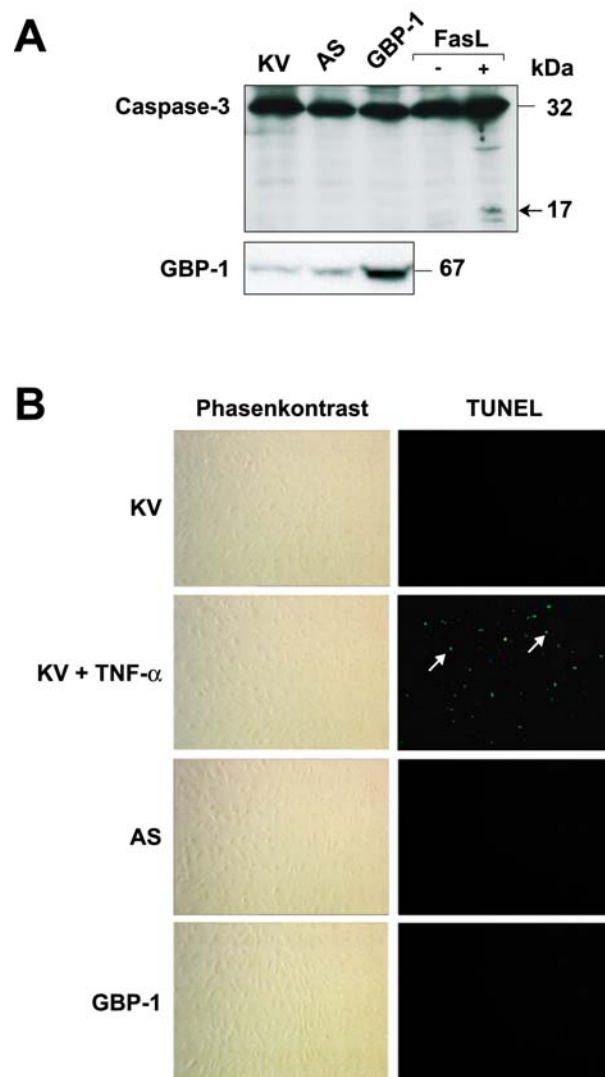


Abb. 11: GBP-1 induziert keine Apoptose in Endothelzellen.

(A) *Western blot* - Analyse zum Nachweis aktivierter Caspase-3 in KV-, GBP-1- und AS-transduzierten HUVEC mit einem monoklonalen anti-Caspase-3-Antikörper, der sowohl nicht aktivierte Caspase-3 (32 kDa), als auch das 17 kDa-Spaltprodukt aktivierter Caspase-3 erkennt (Pfeil). Als Positivkontrolle dienten U937-Zellen, die zur Apoptoseinduktion für 16 h mit FasL, einem monoklonalen CD95-Antikörper, behandelt wurden. Zum Nachweis der GBP-1-Expression wurde die Membran nach Entfernen des gebundenen anti-Caspase-3-Antikörpers mit einem polyklonalen anti-GBP-1-Antikörper (α -GBP-1/3) gefärbt.

(B) TUNEL-Analyse (rechts) sowie das entsprechende Phasenkontrastbild (links) von KV-, GBP-1- und AS-transduzierten HUVEC sowie als Positivkontrolle von KV-transduzierten HUVEC, die für 24 h mit TNF- α (30 U/ml) behandelt wurden. Die Zellen wurden auf gelatinisierten 8-Kammer-Objektträgern (1×10^4 Zellen/Kammer) kultiviert, nach der TNF- α -Behandlung fixiert, permeabilisiert und für eine 1 h mit dem TUNEL-Reaktionsgemisch bei 37°C inkubiert. Die DNA-Strangbrüche apoptotischer Zellen (Pfeile) werden dabei fluoreszenzmarkiert. Die jeweiligen Bilder wurden mit einem 10x Objektiv an einem inversen Fluoreszenzmikroskop (Leica) aufgenommen.

3.7 Zwischenzusammenfassung: GBP-1-Expression und zellbiologische Wirkung in Endothelzellen

Bei der Vielzahl von Faktoren, die auf das Endothel einwirken, können bestimmte Faktoren, die die gleichen Aktivierungszustände hervorrufen, zu wirkungsgleichen Gruppen zusammengefasst werden. So bedingen die inflammatorischen Zytokine, IL-1 β , TNF- α und IFN- γ dosisabhängig die Inhibierung der Proliferation in mikro- und makrovaskulären Endothelzellen, während die angiogenen Wachstumsfaktoren (AWF), bFGF und VEGF, die Proliferation aktivieren (Abb. 5). Stimuliert man Endothelzellen mit IZ, so wird die Expression des humanen Guanylatbindungsproteins-1 (GBP-1) induziert. Die gleichzeitige Behandlung von Endothelzellen mit IZ und AWF führt dagegen zu einer Reduktion der GBP-1-Expression (Abb. 7).

Von Kaposi-Sarkom (KS)-Zellen war aus der Literatur bekannt, dass IL-1 β in diesen Zellen *in vitro* die Proliferation aktiviert (Stürzl *et al.*, 1995). Diese Ergebnisse konnten im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Damit im Einklang stand, dass die Expression von GBP-1 in diesen Zellen nicht beziehungsweise nur sehr schwach durch IL-1 β induziert wurde (Abb. 9). Daraus ließ sich vermuten, dass GBP-1 notwendig ist, um die proliferationsinhibierende Wirkung von IL-1 β zu vermitteln.

Zur Untersuchung, ob GBP-1 die antiproliferative Wirkung von IZ vermittelt, wurden Endothelzellen mit retroviralen Vektoren transduziert, um GBP-1 beziehungsweise eine *antisense*-GBP-1-mRNA zur Hemmung der GBP-1-Expression, konstitutiv zu exprimieren.

Anhand von Proliferationsexperimenten konnte demonstriert werden, dass GBP-1 die Proliferation inhibiert. Desweiteren konnte durch IZ, die Proliferation von Endothelzellen, in denen die GBP-1-Expression durch die *antisense*-GBP-1-mRNA gehemmt war, nicht mehr inhibiert werden. Dadurch wurde gezeigt, dass GBP-1 notwendig und ausreichend ist, um die antiproliferative Wirkung inflammatorischer Zytokine in Endothelzellen zu vermitteln (Abb. 10).

Die Morphologie und die Kapillarbildungsfähigkeit von Endothelzellen wurden durch GBP-1 nicht beeinflusst (Abb. 10B).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die durch GBP-1 verursachte Hemmung der endothelialen Zellproliferation nicht mit Apoptose assoziiert ist (Abb. 11) und somit potentiell reversibel ist. Das heisst, GBP-1 vermittelt in Endothelzellen einen potentiell reversiblen nicht-proliferativen Zustand, der durch IZ induziert wird.

3.8 Der Einfluss von GBP-1 auf die Hauptsignalwege in der Zelle

Nachdem gezeigt wurde, dass GBP-1 die Proliferation von Endothelzellen hemmt, stellte sich die Frage nach den molekularen Mechanismen der Proliferationshemmung. Hierbei wurde untersucht, ob die Expression von GBP-1 einen Einfluss auf die Aktivierung von Signalwegen hat, die durch angiogene Wachstumsfaktoren aktiviert werden können. Hierzu wurde der Einfluß der GBP-1-Expression auf die Aktivierung der MAPK-Wege ERK1/2 (3.8.1), p38 (3.8.2) und SAPK/JNK (3.8.3), des Transkriptionsfaktors NF- κ B (3.8.4) sowie der intrazellulären Kalziumfreisetzung (3.8.5) in Endothelzellen untersucht (Übersicht der Signalwege siehe Abb. 4).

3.8.1 Die Expression von GBP-1 beeinflusst nicht die Aktivierung der extrazellulär regulierten MAPK ERK1/2 in Endothelzellen

Die Ras-Raf-MEK-ERK1/2-Kaskade spielt eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Endothelzellproliferation. So wird ERK1/2 in Endothelzellen durch VEGF und bFGF aktiviert, und die Inhibierung dieses Signalweges führt zu einer Hemmung der endothelialen Zellproliferation (Berra *et al.*, 2000). Da GBP-1 die durch angiogene Wachstumsfaktoren aktivierte Proliferation von Endothelzellen inhibiert, sollte untersucht werden, ob GBP-1 einen Einfluss auf die Aktivierung des MAPK-Signalweges ERK1/2 hat.

KV- und GBP-1-transduzierte HUVEC wurden mit 10 ng/ml VEGF, 10 ng/ml bFGF oder beiden Faktoren in Kombination (je 10 ng/ml) für 7,5 min stimuliert und die Aktivierung von ERK1/2 im *Western blot* analysiert (Abb. 12). Hierzu wurde ein spezifischer Antikörper (α -Phospho-ERK1/2) eingesetzt, der nur die ERK1/2-Moleküle erkennt, die durch Phosphorylierung an Thr-202/Tyr-204 aktiviert wurden. Durch die Inkubation der Membran mit einem monoklonalen GBP-1-Antikörper wurde die Expression von GBP-1 kontrolliert (Abb. 12).

Es zeigte sich, dass die Stimulierung mit VEGF, bFGF oder beiden Faktoren in Kombination in KV-transduzierten gleichermaßen wie in GBP-1-transduzierten Zellen eine Phosphorylierung von ERK1/2 induzierte (Abb. 12). ERK1 und ERK2, wurden durch Stimulierung der Zellen mit VEGF, bFGF und AWF aktiviert, wie an der spezifischen Doppelbande (Abb. 12, Phospho-ERK1/2, 44 und 42 kDa) erkennbar ist. In GBP-1-transduzierten Zellen war in jedem Falle eine hohe Expression von GBP-1 nachweisbar. Nach einer Stimulierung über 15 und 30 min wurden

vergleichbare Ergebnisse erhalten (Ergebnisse nicht gezeigt). Dies zeigt, dass GBP-1 die Aktivierung des ERK1/2-Signalweges nicht beeinflusst.

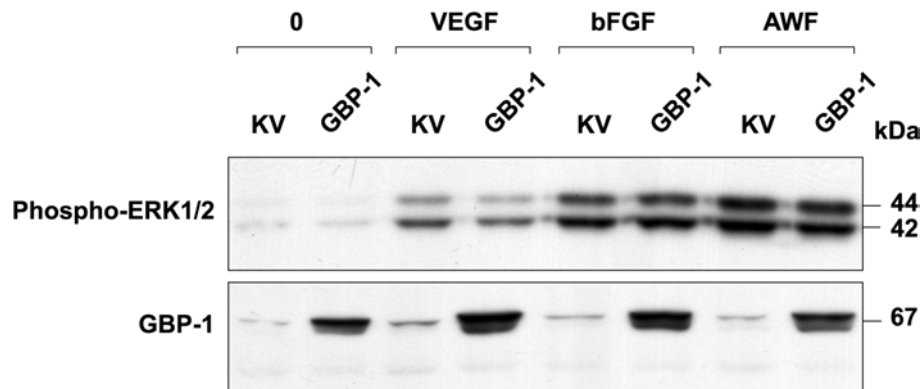


Abb. 12: Die Expression von GBP-1 hat keinen Einfluss auf die Aktivierung von ERK1/2. *Western blot* - Analyse der Aktivierung des MAPK-Signalweges ERK1/2. KV- und GBP-1-transduzierte HUVEC waren unstimuliert (0) oder wurden zur Aktivierung von ERK1/2 mit den angiogenen Wachstumsfaktoren VEGF (10 ng/ml), bFGF (10 ng/ml) oder AWF (bFGF und VEGF, je 10 ng/ml) für 7,5 min behandelt. Der Nachweis der phosphorylierten Formen von ERK1/2 erfolgte mit einem spezifischen polyklonalen anti-Phospho-ERK1/2-Antikörper. Die Aktivierung der beiden Proteine der MAPK ERK1/2, ERK1 und ERK2, ist an der spezifischen Doppelbande ersichtlich (Phospho-ERK1/2, 44 und 42 kDa). Die GBP-1 Expression wurde mit einem monoklonalen anti-GBP-1-Antikörper (1B1) nachgewiesen.

3.8.2 Die Expression von GBP-1 hat keinen Einfluss auf die Aktivierung der MAPK p38

Die MAP-Kinase p38 kann in Endothelzellen sowohl durch die endothelialen Wachstumsfaktoren, VEGF und bFGF, als auch durch inflammatorische Zytokine aktiviert werden (Matsumoto *et al.*, 2002; Ono und Han, 2000). Es wurde untersucht, ob GBP-1 die Aktivierung von p38 durch AWF oder IZ beeinflusst (Abb. 13). Dazu wurden KV- und GBP-1-transduzierte HUVEC mit AWF (bFGF und VEGF, je 10 ng/ml; Abb. 13A) oder IL-1 β (200 U/ml; Abb. 13B) für 7,5; 15 oder 30 min stimuliert und die Zellextrakte anschließend im *Western blot* auf die Aktivierung von p38 untersucht. Aktiviertes p38 wurde mit einem spezifischen polyklonalen Antikörper (Abb. 13, Phospho-p38), der die Phosphorylierung von p38 an Thr-180/Tyr-182 erkennt, nachgewiesen.

Sowohl in GBP-1-exprimierenden als auch in KV-transduzierten HUVEC, konnte p38 durch die Stimulierung der Zellen mit AWF oder IL-1 β aktiviert werden (Abb. 13). Bei der Behandlung mit AWF erfolgte die Phosphorylierung von p38 bereits nach 7,5

min, verstärkte sich noch bei einer Stimulierung von 15 min und nahm nach 30 min wieder ab (Abb. 13A). Die Stimulierung der Zellen mit IL-1 β führte im Vergleich zur Behandlung mit AWF zu einer länger andauernden Phosphorylierung von p38, da nach 30 min noch keine Abnahme der Aktivierung zu beobachten war (Abb. 13B). Um zu zeigen, dass die Aktivierung von p38 über die spezifische Phosphorylierung erfolgte, wurde die unphosphorylierte Form von p38 ebenfalls mittels eines spezifischen Antikörpers (α -p38, 1:1000) nachgewiesen (Abb. 13). Es zeigte sich, dass diese Form in allen Ansätzen gleichermaßen vorhanden war (Abb. 13, p38). Der Nachweis von GBP-1 zeigte, dass dieses Protein in allen GBP-1-transduzierten Zellen stark exprimiert wurde (Abb. 13, GBP-1). Der Nachweis von GAPDH ermöglicht die Abschätzung der eingesetzten Proteinkonzentrationen (Abb. 13, GAPDH). Diese Ergebnisse zeigten, dass GBP-1 die Aktivierung von p38 durch AWF und IZ nicht beeinflusst.

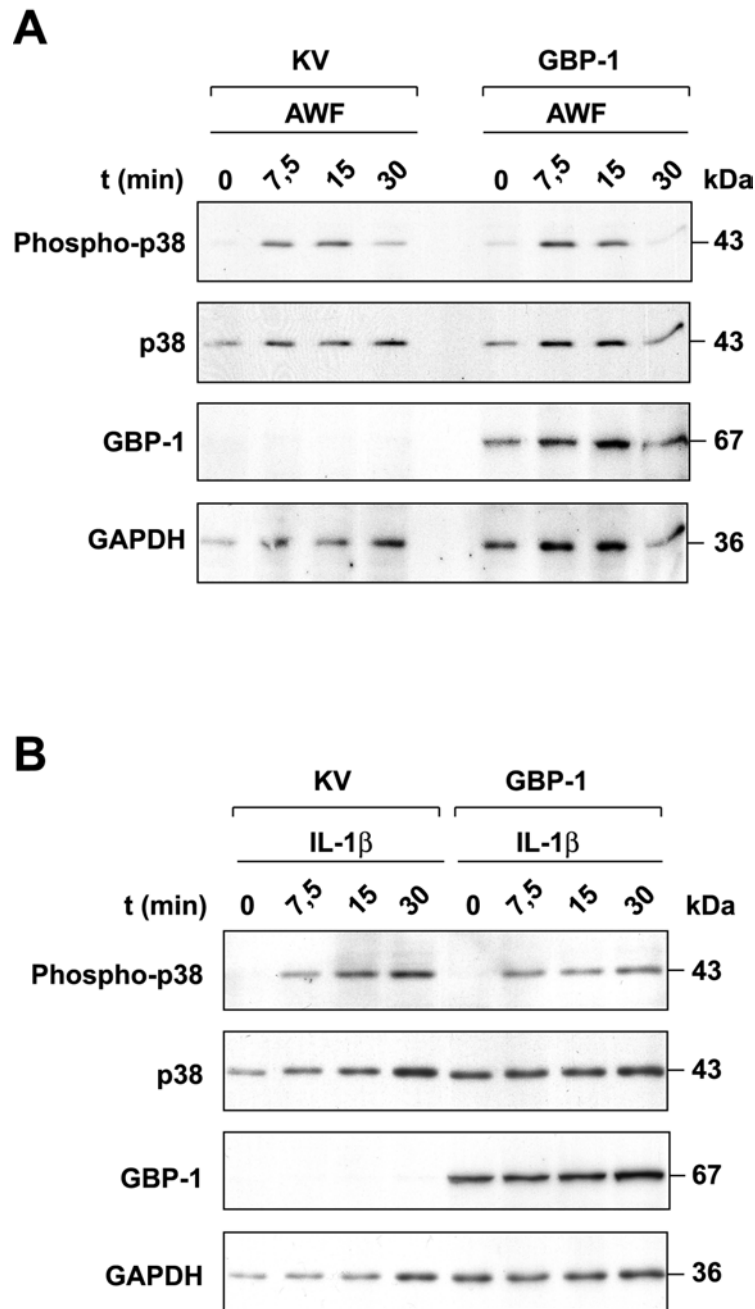


Abb. 13: Die Expression von GBP-1 hat keinen Einfluss auf die Aktivierung von p38 über angiogene Wachstumsfaktoren oder IL-1 β .

Western blot - Analysen der Aktivierung der MAPK p38. KV- und GBP-1-transduzierte HUVEC waren entweder unstimuliert (0) oder wurden mit angiogenen Wachstumsfaktoren (A; AWF: bFGF und VEGF, je 10 ng/ml) oder [B; IL-1 β (200 U/ml)] für 7,5 min, 15 min oder 30 min stimuliert. Nach Stimulierung mit AWF ging die Phosphorylierung von p38 bereits nach 30 min wieder zurück (A), während bei Stimulierung mit IL-1 β die Phosphorylierung von p38 länger anhielt und bei allen drei Stimulierungszeiten (7,5; 15 und 30 min) zu beobachten war (B). Der Nachweis der phosphorylierten Form von p38 erfolgte mit einem spezifischen polyklonalen anti-Phospho-p38-Antikörper und der unphosphorylierten Form von p38 mit einem polyklonalen anti-p38-Antikörper. Zum Nachweis der GBP-1-Expression sowie zum Vergleich der eingesetzten Proteinkonzentrationen wurde die Membran nach Entfernen der gebundenen Antikörper mit einem monoklonalen anti-GBP-1-Antikörper in Kombination mit einem monoklonalen anti-GAPDH-Antikörper inkubiert.

3.8.3 Die GBP-1-Expression in Endothelzellen beeinflusst nicht die Aktivierung des MAPK-Signalweges SAPK/JNK

Die stressaktivierten MAP-Kinasen SAPK/JNK können ebenso sowohl durch Wachstumsfaktoren als auch durch inflammatorische Zytokine aktiviert werden (Cuenda, 2000). Aktiviertes JNK bindet an c-Jun, welches Teil des Transkriptionsfaktorkomplexes AP-1 ist, und phosphoryliert zwei Aminosäurereste (Ser-63 und Ser-73) von c-Jun (Pulverer *et al.*, 1991). Die dadurch erhöhte Transkriptionsaktivität führt zur Expression von Genen, die Wachstum, Differenzierung, Überleben und Apoptose steuern.

KV- und GBP-1-transduzierte HUVEC wurden mit AWF (bFGF und VEGF, je 10 ng/ml; Abb. 14A, AWF) oder 200 U/ml IL-1 β (Abb. 14B) für 7,5; 15 und 30 min stimuliert und die Proteinextrakte anschließend immunochemisch im *Western blot* analysiert. Die Aktivierung von SAPK/JNK wurde mit einem Antikörper nachgewiesen, der gegen SAPK/JNK gerichtet ist, welches an den Aminosäuren Thr-183/Tyr-185 phosphoryliert ist (Abb. 14A,B; Phospho-SAPK/JNK). Die Aktivierung von c-Jun wurde mit einem Antikörper nachgewiesen, der gegen c-Jun gerichtet ist, das an Aminosäure Ser-63 phosphoryliert ist (Abb. 14C, Phospho-c-Jun).

Der Nachweis von phosphoryliertem SAPK/JNK zeigte, dass die Stimulierung der Zellen mit AWF und IL-1 β zur differentiellen Aktivierung der verschiedenen JNK-Isoformen führte. Die Behandlung mit AWF aktivierte hauptsächlich die p46-Isoformen von SAPK/JNK, JNK1 und JNK3 (Abb. 14A), während die Behandlung mit IL-1 β in der Aktivierung der p46 (JNK1/3)- und p54 (JNK2)-Isoformen von SAPK/JNK resultierte (Abb. 14B).

Sowohl in KV- als auch in GBP-1-transduzierten HUVEC war nach 7,5 min AWF-Behandlung eine Phosphorylierung von SAPK/JNK nachweisbar, die sich nach 15 min verstärkte und nach 30 min wieder den unstimulierten Zustand erreichte (Abb. 14A). Bei der Behandlung der Zellen mit IL-1 β war die Aktivierung von SAPK/JNK (Abb. 14B) und c-Jun (Abb. 14C) im Vergleich zu den AWF-induzierten Zellen verzögert. So wurde eine Phosphorylierung von SAPK/JNK und c-Jun erst ab 15 min beobachtet, die nach 30 min IL-1 β -Stimulierung noch gesteigert wurde (Abb. 14 B,C). Es wurden jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen KV- und GBP-1-transduzierten Zellen beobachtet (Abb. 14).

Für den Nachweis, dass die Aktivierung von SAPK/JNK und c-Jun über die Phosphorylierung erfolgte, wurden unphosphoryliertes SAPK/JNK (Abb. 14A,B;

SAPK/JNK) und c-Jun (Abb. 14C, c-Jun) nachgewiesen, das in allen Ansätzen in vergleichbaren Mengen vorhanden war.

Die Phosphorylierung von c-Jun äußerte sich zudem, in Übereinstimmung mit anderen Arbeiten (Li *et al.*, 2002; Madge und Pober, 2000), beim Nachweis der unphosphorylierten Form von c-Jun, in der Änderung der elektrophoretischen Laufhöhe des phosphorylierten Proteins (Abb. 14C).

Beim anschließenden Nachweis von GBP-1 (Abb. 14, GBP-1) und von GAPDH (Abb. 14, GAPDH) wurde gezeigt, dass GBP-1-transduzierte Zellen GBP-1 stark exprimierten, und dass vergleichbare Mengen an Protein in allen Ansätzen aufgetragen wurden. Zusammenfassend zeigten diese Ergebnisse, dass GBP-1 weder das Ausmaß, noch die Kinetik der Aktivierung von SAPK/JNK und c-Jun mit AWF oder IL-1 β in Endothelzellen beeinflusst.

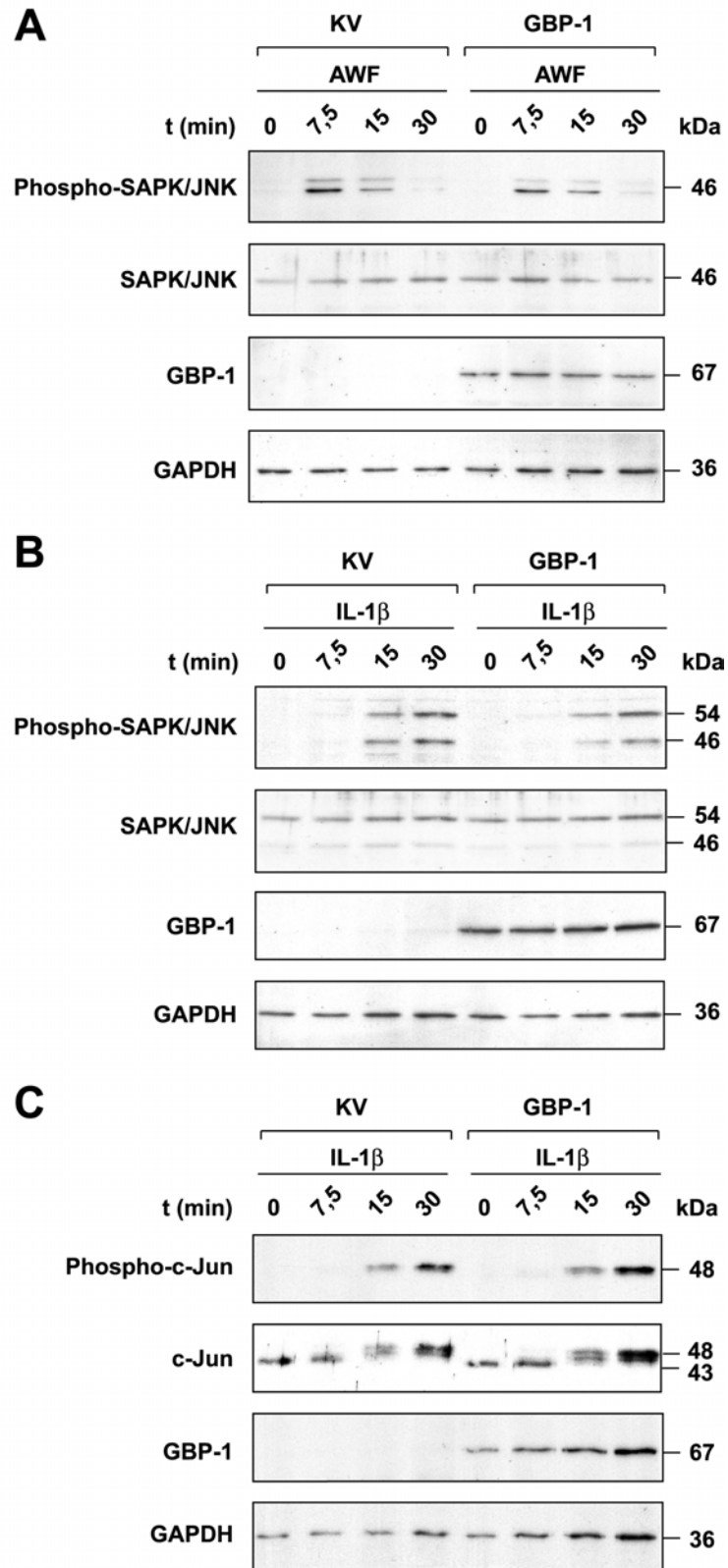


Abb. 14: Die Expression von GBP-1 hat auf die Aktivierung des MAPK-Signalweges SAPK/JNK keinen Einfluss.

Western blot - Analysen der Aktivierung von SAPK/JNK und c-Jun. KV- und GBP-1-transduzierte HUVEC wurden mit angiogenen Wachstumsfaktoren (A; AWF: bFGF und VEGF, je 10 ng/ml) oder mit IL-1 β (B, C; 200 U/ml) für 7,5 min, 15 min oder 30 min stimuliert und anschließend im *Western blot* auf

die Aktivierung von SAPK/JNK (A,B) oder c-Jun (C) untersucht. Der Nachweis der phosphorylierten Formen von SAPK/JNK und c-Jun erfolgte mit spezifischen polyklonalen anti-Phospho-SAPK/JNK- oder anti-Phospho-c-Jun-Antikörpern, und der Nachweis der unphosphorylierten Formen mit polyklonalen anti-SAPK/JNK- beziehungsweise anti-c-Jun-Antikörpern. Die Stimulierung der Zellen mit AWF und IL-1 β führte zur differentiellen Aktivierung der verschiedenen JNK-Isoformen. Die Behandlung mit AWF aktivierte hauptsächlich die p46-Isoformen von SAPK/JNK, JNK1 und JNK3 (A), während die Behandlung mit IL-1 β die p46 (JNK1/3)- und p54 (JNK2)-Isoformen von SAPK/JNK aktivierte (B). Die Phosphorylierung von SAPK/JNK war bei Stimulierung der Zellen mit AWF nach 7,5 min am stärksten und nahm bereits nach 15 min wieder ab. Bei Stimulierung mit IL-1 β war phosphoryliertes SAPK/JNK erst nach 15 min nachweisbar und wurde in der Menge noch nach 30 min gesteigert.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Aktivierung von SAPK/JNK und c-Jun in KV- und GBP-1-transduzierten HUVEC festgestellt werden.

Zum Nachweis der GBP-1-Expression sowie zum Vergleich der eingesetzten Proteinkonzentrationen wurden die Membranen nach Entfernen der gebundenen Antikörper mit einem monoklonalen anti-GBP-1-Antikörper in Kombination mit einem monoklonalen anti-GAPDH-Antikörper inkubiert. (C) Die Stimulierung mit IL-1 β führte bei KV-transduzierten HUVEC ebenso wie bei GBP-1-transduzierten HUVEC zu einer Phosphorylierung von c-Jun nach 15 und 30 min.

3.8.4 Die Expression von GBP-1 hat keinen Einfluss auf die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B

NF- κ B kann durch eine Reihe verschiedener Faktoren, wie mitogene Substanzen, Wachstumsfaktoren, Hormone sowie inflammatorische Zytokine aktiviert werden (Li und Stark, 2002). Bei der Aktivierung von NF- κ B wird das NF- κ B-assoziierte Inhibitorprotein I κ B phosphoryliert und der NF- κ B/I κ B-Komplex aufgelöst, wodurch NF- κ B in den Zellkern translozieren kann. GBP-1-transduzierte (GBP-1, Abb. 15) und KV-transduzierte (Abb. 15, KV) HUVEC wurden mit TNF- α (40 min) stimuliert und in zytochemischen Immunfluoreszenzfärbungen mit einem polyklonalen anti-NF- κ B-Antikörper (Abb. 15; NF- κ B, grün) und einem monoklonalen GBP-1-Antikörper (Abb. 15; GBP-1, rot) gleichzeitig gefärbt. In unstimulierten Zellen war NF- κ B sowohl in GBP-1-exprimierenden als auch in KV-transduzierten HUVEC ausschließlich im Zytoplasma nachweisbar (Abb. 15, Pfeile). Die Behandlung mit TNF- α führte bei beiden Kulturen zu einer Translokation von NF- κ B in den Zellkern (Abb. 15, Pfeilspitzen). Die Überlagerung der Signale (Abb. 15, NF- κ B/GBP-1) zeigte in GBP-1-exprimierenden unstimulierten Zellen die Kolo-kalisation von GBP-1 mit NF- κ B im Zytoplasma (Abb. 15, gelb) und in TNF- α -stimulierten Zellen die unterschiedliche Lokalisation von GBP-1 im Zytoplasma (Abb. 15, rot) und NF- κ B im Zellkern (Abb. 15, grün).

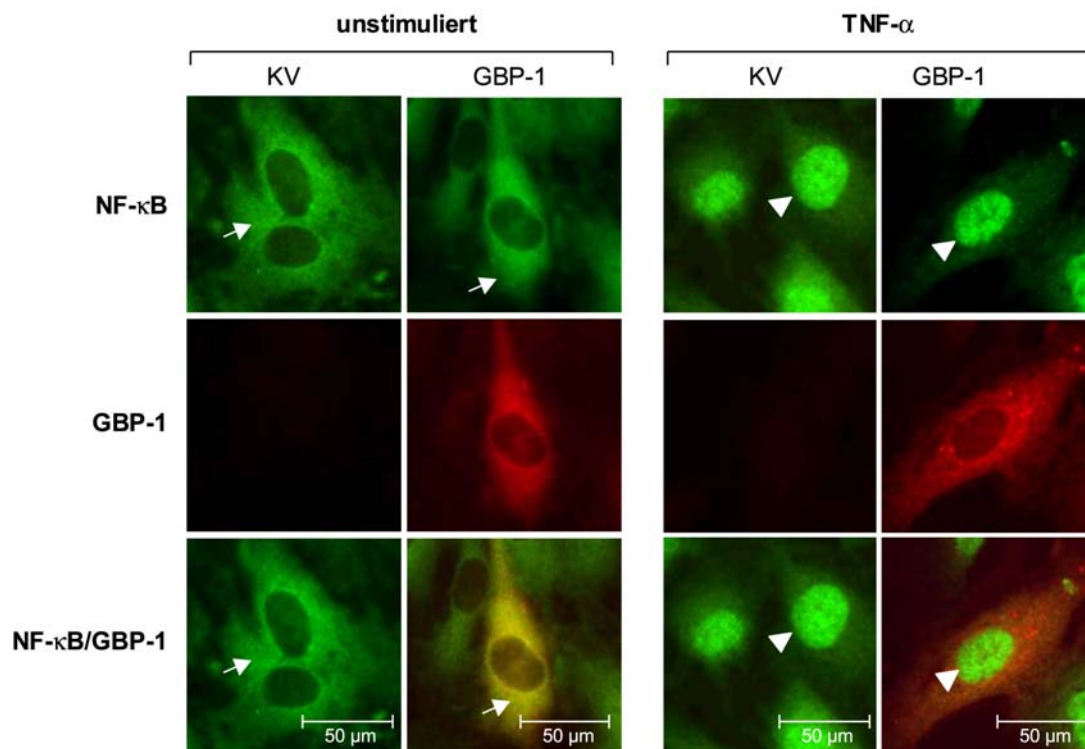


Abb. 15: Die Expression von GBP-1 hat keinen Einfluss auf die Aktivierung von NF- κ B in Endothelzellen.

Indirekte Doppel-Immunfluoreszenzfärbung mit einem polyklonalen anti-NF- κ B-Antikörper in Kombination mit einem monoklonalen anti-GBP-1-Antikörper, gefolgt von Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörpern. KV- und GBP-1-transduzierte HUVEC, unstimuliert oder mit TNF- α (1000 U/ml, 40 min) behandelt, wurden auf die Expression und Translokation von NF- κ B (grüne Fluoreszenz) und GBP-1 (rote Fluoreszenz) untersucht. Zytoplasmatisches NF- κ B (Pfeile) in unstimulierten und nukläres NF- κ B (Pfeilspitzen) in TNF- α -behandelten Zellen sind gekennzeichnet. Die Überlagerung der Signale (NF- κ B/GBP-1) zeigt eine gelbe Kolo-kalisation beider Proteine in unstimulierten GBP-1-transduzierten HUVEC. Die Fluoreszenzbilder wurden am LSM (Zeiss) aufgenommen.

In *Western blot* - Analysen mit einem monoklonalen I κ B- α -Antikörper konnte die Aktivierung von NF- κ B durch den Abbau von I κ B- α bestätigt werden. Nach Stimulierung mit TNF- α war sowohl in KV- als auch in GBP-1-transduzierten HUVEC der vollständige Rückgang der I κ B- α -Banden zu beobachten (Abb. 16).

Diese Ergebnisse zeigten, dass GBP-1 die Aktivierung von NF- κ B in Endothelzellen nicht beeinflusst.

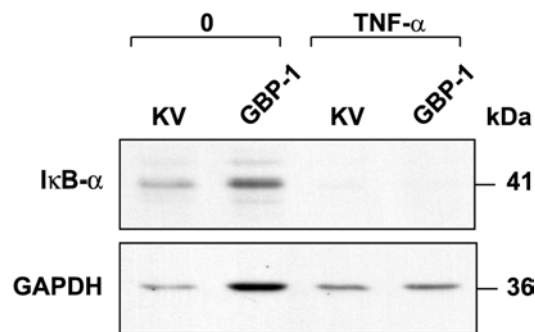


Abb. 16: Die Expression von GBP-1 beeinflusst nicht den Abbau von IκB-α.

Western blot - Analyse der Expression von IκB-α. KV- und GBP-1-transduzierte HUVEC waren entweder unstimuliert (0) oder wurden mit TNF-α (300 U/ml) für 7,5 min behandelt. Zellextrakte wurden präpariert und IκB-α mit einem polyklonalen anti-IκB-α-Antikörper nachgewiesen. Zum Vergleich der eingesetzten Proteinkonzentrationen wurde die Membran mit einem monoklonalen anti-GAPDH-Antikörper inkubiert.

3.9 Die Expression von GBP-1 in Endothelzellen führt zu einer Änderung der Kalziumregulation in Endothelzellen

Kalzium ist ein wichtiger intrazellulärer *messenger* für viele Wachstumsfaktoren, welche durch das Freisetzen von Kalzium aus intrazellulären Speichern und die Stimulation eines Kalzium *influx*, die freie intrazelluläre Kalziumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) erhöhen können (Berridge, 1995). Schon ein geringer Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ kann zahlreiche Zellreaktionen einschließlich Sekretion und Zellproliferation auslösen (Berridge, 1993; Berridge, 1995). Diese Kalziumerhöhungen bewegen sich in einem Bereich von ~50 – 600 nM und aktivieren Effektormoleküle in unmittelbarer Nähe von Kalziumkanälen (Bootman *et al.*, 2001b; Thomas *et al.*, 2000). In der Nähe von IP₃-Rezeptoren sorgen lokal begrenzte Ca²⁺-Signale, sogenannte Ca²⁺ *puffs* (engl. puff = Hauch, Luftzug) zur Öffnung von Kalziumkanälen, wodurch intrazelluläre Kalziumwellen ausgelöst werden können (Berridge *et al.*, 2003; Bootman *et al.*, 2001b).

Durch die Stimulierung von Endothelzellen mit Histamin wird ein transienter Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ durch das Freisetzen von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern und dem Einstrom von Ca²⁺ aus dem extrazellulären Raum bewirkt (Li *et al.*, 1999).

3.9.1 Die Stimulation von HUVEC mit Histamin führt zu einem sofortigen Anstieg der freien intrazellulären Kalziumkonzentration

Um die Kalziumregulation von Endothelzellen zu testen, wurden nicht-transduzierte HUVEC mit Histamin stimuliert (Abb. 17). In dem eingesetzten Versuchsaufbau kann mit Hilfe einer 4-Kanalvorrichtung das Inkubationsmedium kontinuierlich appliziert und umgehend gewechselt werden, indem auf einen anderen Überstromkanal umgeschaltet wird. Zum Messen der intrazellulären Kalziumregulation wurden die Zellen mit Fura-2 AM (3 μM), einem Ca^{2+} -sensitiven Fluoreszenzfarbstoff gefärbt. Wie in Abb. 21A am Kurvenverlauf zweier typischer Zellen dargestellt ist, führte die kontinuierliche Gabe von 1 μM Histamin (Abb. 17A, rote Zeit-Balken) zu einem sofortigen Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$, die jedoch noch während der Histaminbehandlung wieder abnahm. Das Waschen der Zellen für 3 min im Lösungspuffer KHB (Abb. 17A, blaue Zeit-Balken) bewirkte die sofortige Abnahme der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ auf die Ausgangskonzentration. Bei der zweiten und dritten Stimulierung mit Histamin wurde nicht mehr die maximale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ erreicht, bei der dritten Stimulierung fiel zudem die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ schneller auf ihre Ausgangskonzentration zurück. Die beiden vermessenen Zellen zeigten bei der Behandlung mit Histamin einen nahezu identischen Kurvenverlauf (Abb. 17A). In Abb. 17B ist in einer typischen Zelle die Zunahme der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mit der damit verbundenen Farbänderung des Indikators von blau nach rot visualisiert. Diese Ergebnisse zeigten, dass in Endothelzellen die Änderung der freien intrazellulären Kalziumkonzentration gemessen werden konnte, und dass durch den gewählten Versuchsaufbau Mehrfachstimulierungen und Aktivierungen der Zellen möglich sind. Die Zellen können durch Histamin soweit synchronisiert werden, dass reproduzierbare Kurvenverläufe bei unterschiedlichen Einzelzellmessungen erhalten wurden.

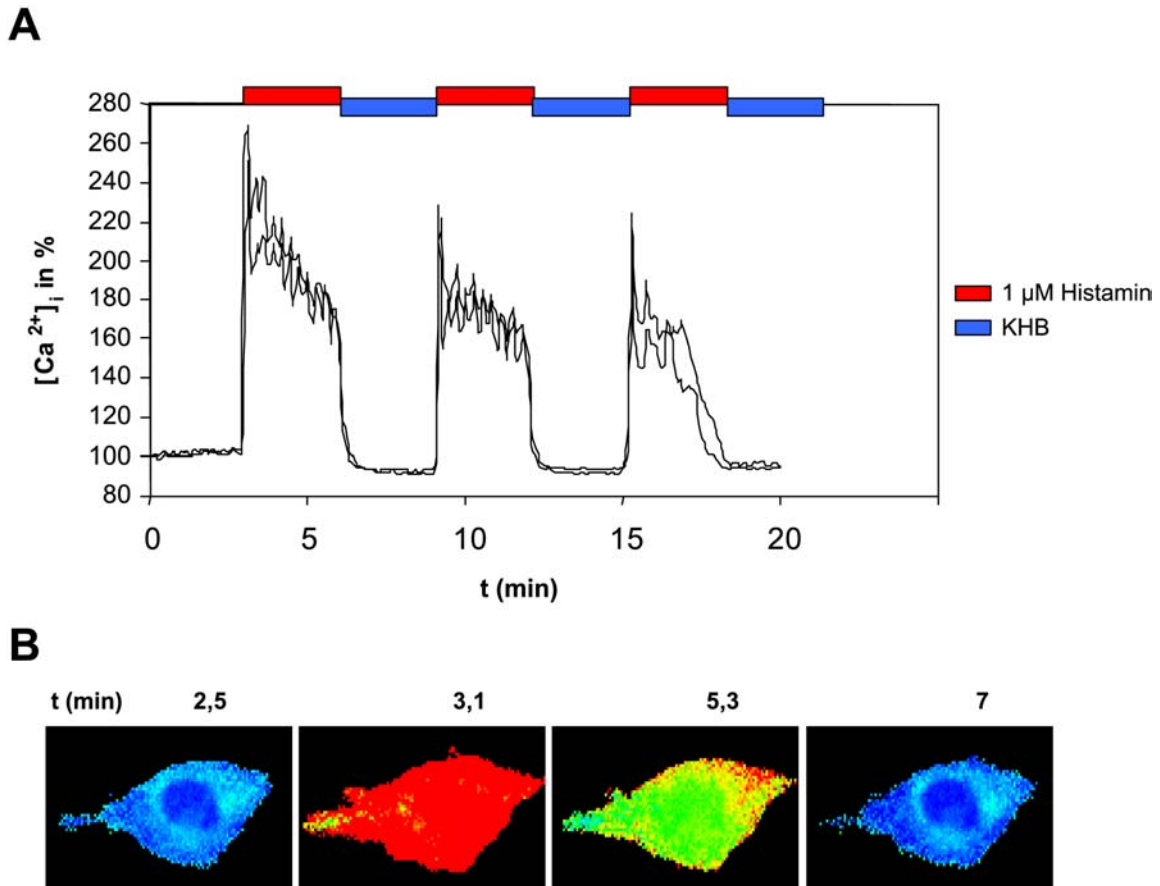


Abb. 17: Zeitverlauf der freien intrazellulären Kalziumkonzentration in Endothelzellen unter dem Einfluß von Histamin.

Die Stimulierung mit Histamin bewirkt einen sofortigen, schnellen Anstieg der freien intrazellulären Kalziumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) in Endothelzellen. HUVEC wurden 3x für jeweils 3 min mit 1 μ M Histamin in Krebs-Henseleit-Bikarbonat-Lösung (KHB) stimuliert (rote Balken) und zwischen den Stimulierungen für 3 min mit KHB überspült (blaue Balken). $[Ca^{2+}]_i$ der einzelnen Zellen wurde durch Messen der Fura-2 Fluoreszenz (510 nm) bei alternierender Anregung bei 340 und 380 nm bestimmt. $[Ca^{2+}]_i$ entspricht dem Verhältnis der Emissionsintensitäten bei 340 und 380 nm Anregung. In (A) ist der typische Kurvenverlauf zweier Zellen bei Histaminstimulierung dargestellt. Die Kurven sind auf den Wert vor Histaminzugabe (100%) normiert. In (B) wird die Zunahme der $[Ca^{2+}]_i$ durch einen Farbumschlag von blau nach rot beziehungsweise die Abnahme der $[Ca^{2+}]_i$ durch einen Farbumschlag nach blau in einer Endothelzelle nach Histamingabe im angegebenen Zeitverlauf gezeigt.

3.9.2 Die Expression von GBP-1 verringert den Anstieg der freien intrazellulären Kalziumkonzentration nach Histamin-Stimulierung

Um den Einfluss von GBP-1 auf die Kalziumregulation in Endothelzellen zu untersuchen, wurden KV- und GBP-1-transduzierte HUVEC mit 3 μ M Fura-2 AM beladen. Nachfolgend wurden die Zellen dreimal für jeweils 3 min mit 1 μ M Histamin in KHB stimuliert, unterbrochen durch dreiminütige Waschschrte mit KHB (Abb. 18). Die KV-transduzierten HUVEC (Abb. 18A) verhielten sich wie die nicht-transduzierten HUVEC (Abb. 17A), bei beiden war ein annähernd gleicher Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ nach

Histaminstimulation zu beobachten, wodurch ein möglicher negativer Einfluss durch das Transduktionsverfahren ausgeschlossen werden kann.

Die konstitutive Expression von GBP-1 in HUVEC bewirkte im Vergleich zu den KV-transduzierten HUVEC (Abb. 18A) eine Erhöhung der basalen Konzentration an $[Ca^{2+}]_i$ um 13% (Abb. 18B). Die Überlagerung der beiden Messkurven zeigt, dass zudem nach Stimulierung mit Histamin in den GBP-1-transduzierten HUVEC (Abb. 18C, rote Kurve) die maximale $[Ca^{2+}]_i$ geringer war als bei den KV-transduzierten HUVEC (Abb. 18C, schwarze Kurve).

Bei der ersten Stimulierung mit Histamin erreichten GBP-1-transduzierte HUVEC zudem nicht den Maximalwert der Kalziumfreisetzung KV-transduzierter HUVEC (Abb. 18C). Nachfolgende Stimulierungen jedoch führten zu annähernd gleichen Kalziumfreisetzungen in KV- und GBP-1-transduzierten Zellen (Abb. 18C).

Zudem ging der Basalwert der $[Ca^{2+}]_i$ GBP-1-transduzierter HUVEC beim ersten Waschschrift überraschenderweise auf das Niveau von KV-transduzierten HUVEC zurück. Dieser Basalwert der $[Ca^{2+}]_i$ stieg jedoch im Unterschied zu den KV-transduzierten über die Waschdauer an, erreichte jedoch im Rahmen der Waschdauer von 3 min nicht das Ausgangsniveau an $[Ca^{2+}]_i$ vor Histaminstimulierung (Abb. 18B,C).

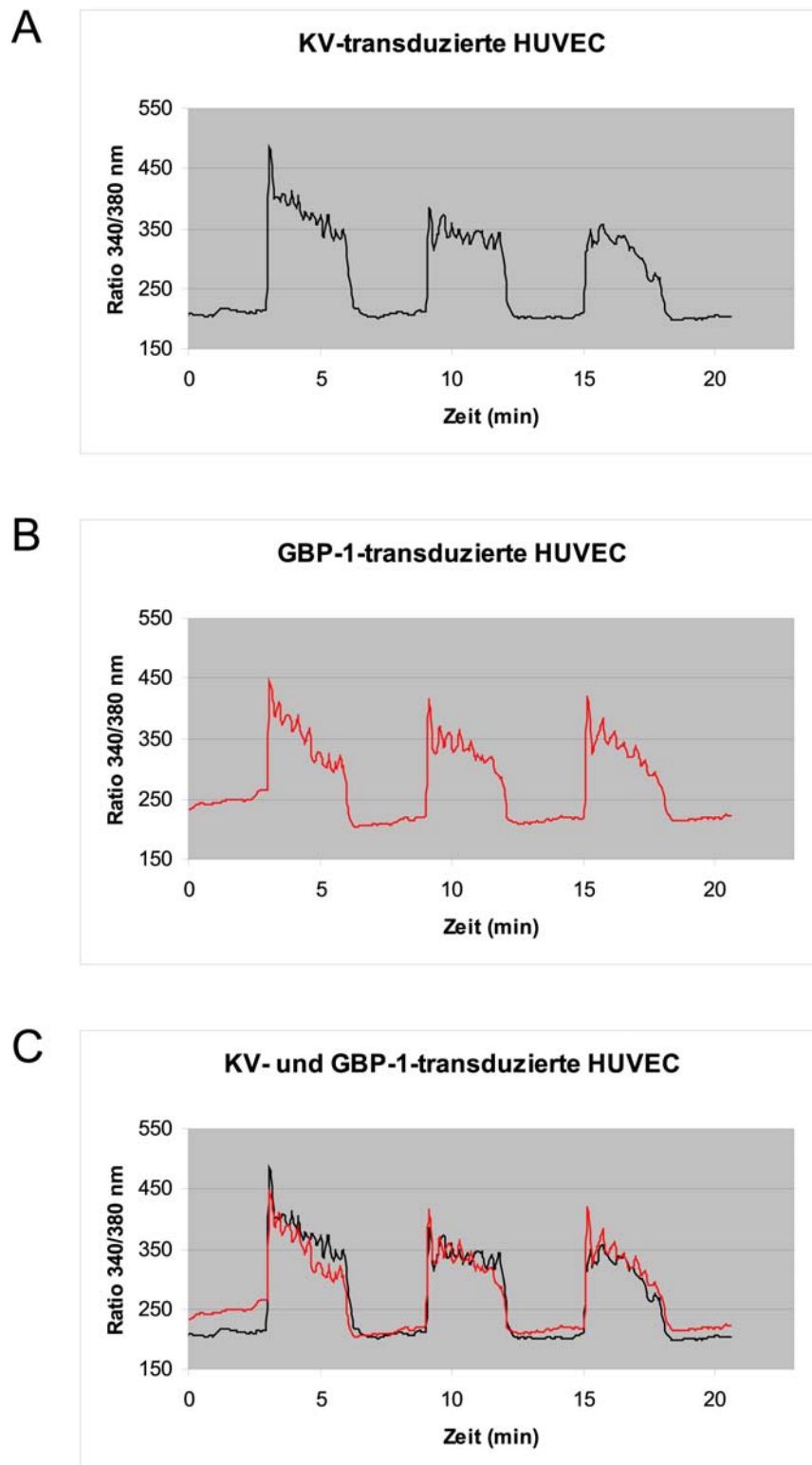


Abb. 18: Die Expression von GBP-1 bewirkt eine Änderung der Kalziumregulation in Endothelzellen. Zeitverlauf der $[Ca^{2+}]_i$ nach Histaminstimulierung in KV-transduzierten (A) und GBP-1-transduzierten (B) HUVEC. In GBP-1-exprimierenden Zellen ist die $[Ca^{2+}]_i$ vor Stimulierung mit Histamin höher als in KV-transduzierten Zellen. In (C) wurden die Kurvenverläufe der KV- und GBP-1-transduzierten HUVEC in einem Diagramm überlagert. Die Kurvenverläufe in (A) und (B) sind jeweils aus dem Mittelwert von 6 repräsentativen Zellen eines Versuches berechnet.

Um die Induktionsamplitude der durch Histamin hervorgerufenen Änderungen der $[Ca^{2+}]_i$ in den verschiedenen Zellen vergleichen zu können, wurden die Ausgangswerte von KV- und GBP-1-transduzierten Zellen auf 100% normiert (Abb. 19). Hierbei wird bei Überlagerung der Messkurven erneut deutlich, dass die maximale Änderung der $[Ca^{2+}]_i$ in GBP-1-transduzierten Zellen durchgehend geringer ist, als bei KV-transduzierten HUVEC. Zudem zeigt diese Darstellung auch, dass nach Stimulierung die $[Ca^{2+}]_i$ in KV-transduzierten HUVEC auf ihren basalen Ausgangswert zurückkehrt (Abb. 19C, schwarze Kurve), während die $[Ca^{2+}]_i$ in GBP-1-transduzierten HUVEC (Abb. 19C, rote Kurve) zunächst unter den Ausgangswert fällt und nur nach der dritten Stimulierung den Ausgangswert unstimulierter Zellen erreicht.

Die Zeit des Auswaschens nach Beendigung der ersten und Beginn der zweiten Histaminstimulierung reichte nicht aus, um den ursprünglichen Ausgangszustand an $[Ca^{2+}]_i$ in GBP-1-transduzierten HUVEC wieder zu erreichen, aber bereits innerhalb des dreiminütigen Auswaschens wird ein zunehmender Anstieg auf den Basiszustand an $[Ca^{2+}]_i$ deutlich (Abb. 18B,C; 19B,C).

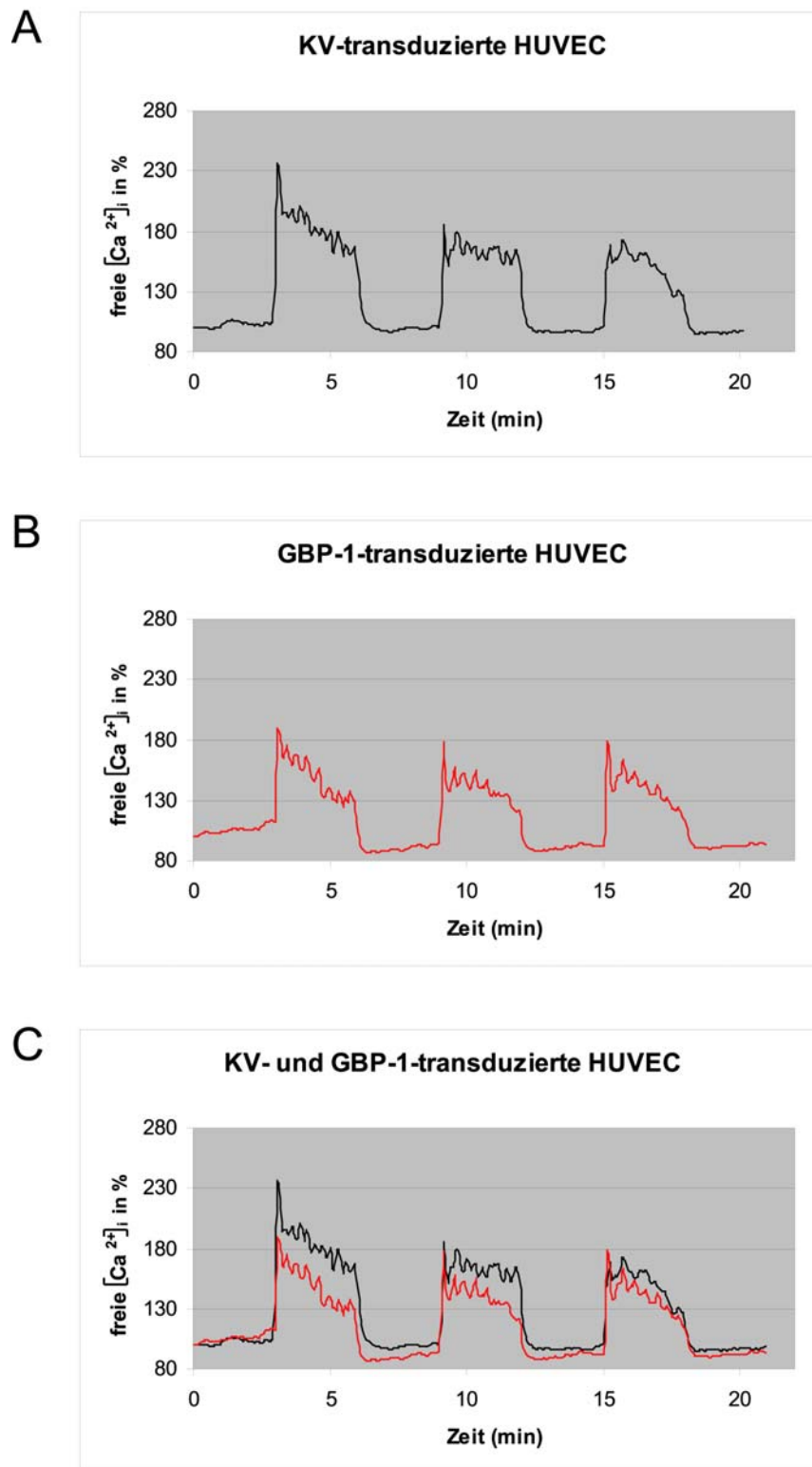


Abb. 19: Die Expression von GBP-1 bewirkt eine Änderung der Kalziumregulation in Endothelzellen. Kurven der Abbildung 22, wobei die $[Ca^{2+}]_i$ vor Stimulierung bei KV- und GBP-1-transduzierten Zellen auf 100 % normiert wurde.

Nach statistischer Auswertung von 3 Versuchstagen mit KV- und GBP-1-transduzierten HUVEC (KV, n=16; GBP-1, n=18) betrug der Unterschied in der maximalen $[Ca^{2+}]_i$ zwischen KV- und GBP-1-transduzierten HUVEC bei der ersten Stimulierung 22% (Abb. 20). Dieser Wert setzt sich zusammen aus dem Unterschied KV- und GBP-1-transduzierter Zellen in ihrer basalen $[Ca^{2+}]_i$ und der Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ bei Histaminstimulierung. GBP-1-transduzierte Zellen wiesen dabei bereits eine um 14% höhere basale $[Ca^{2+}]_i$ als KV-transduzierte HUVEC auf und erreichten zudem nicht das Ca^{2+} -Signal-Maximum KV-transduzierter HUVEC. Die statistische Auswertung mittels *unpaired t-test* bezeichnete diesen Unterschied in der $[Ca^{2+}]_i$ als hoch-signifikant ($p < 0,001$).

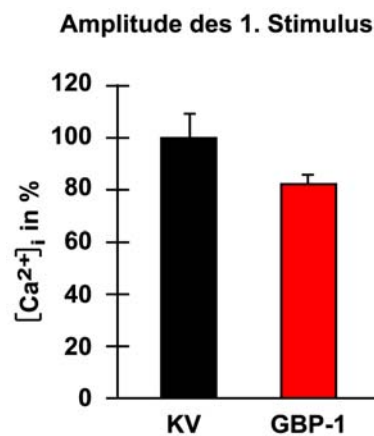


Abb. 20: Die Expression von GBP-1 in HUVEC bewirkt eine erhöhte basale Konzentration an freiem intrazellulärem Kalzium.

Im Diagramm wurde die basale Konzentration an freiem intrazellulärem Kalzium ($[Ca^{2+}]_i$ in %) vor Histaminstimulierung von KV- und GBP-1-transduzierten HUVEC aus 16 (KV) und 18 (GBP-1) Einzelwerten als Mittelwert + STD dargestellt. Die Unterschiede zwischen beiden Mittelwerten sind hoch-signifikant ($p < 0,001$; *unpaired t-test*).

3. 10 Zwischenzusammenfassung: Der Einfluss von GBP-1 auf die Hauptsignalwege der Zelle

Die IZ-induzierte Expression von GBP-1 bewirkt in Anwesenheit von angiogenen Wachstumsfaktoren eine Hemmung der endothelialen Zellproliferation. Um herauszufinden, wie GBP-1 diesen Effekt vermittelt, wurde der Einfluss von GBP-1 auf die wichtigsten zellulären Signalwege von Endothelzellen untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der MAPK-Signalwege: ERK1/2, p38 oder SAPK/JNK nicht durch GBP-1 beeinträchtigt wird. Ebenso wurde die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B nicht durch GBP-1 beeinflusst. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass die Expression von GBP-1 zu eine Veränderung der Kalziumregulation in Endothelzellen führte. So wurde in GBP-1-exprimierenden HUVEC ein erhöhter Basiswert an freiem intrazellulären Ca^{2+} festgestellt und bei Stimulierung mit Histamin eine geringere Kalziumfreisetzung verzeichnet. Da Kalzium als zellulärer Botenstoff bei verschiedenen Prozessen, unter anderem der Proliferationsaktivierung von Bedeutung ist, könnte GBP-1 seine proliferationsinhibierende Wirkung möglicherweise über die veränderte Kalziumregulation vermitteln.

3.11 GBP-1 als Regulator der endothelialen Zellproliferation: Struktur- und Funktionsbeziehung

Durch die genauere Untersuchung der Struktur-/Funktionsbeziehung sollte analysiert werden, welche strukturellen Merkmale oder biochemischen Eigenschaften die antiproliferative Wirkung von GBP-1 bedingen. Dazu sollten verschiedene cDNA-Moleküle erzeugt werden, mit denen verkürzte und mutierte GBP-1-Proteine konstitutiv exprimiert werden können. Die Wirkung dieser verkürzten oder mutierten GBP-1-Proteine auf das Wachstumsverhalten von Endothelzellen sollte anschließend in Proliferationsstudien getestet werden.

3.11.1 Herstellung von cDNA-Molekülen zur konstitutiven Expression von GBP-1 und mutierter GBP-1-Proteine in HUVEC

Unter Verwendung des amphotropen retroviralen Expressionsvektors pBabePuro (Kontrollvektor, KV) wurden verschiedene Plasmide zur Expression mutierter und verkürzter GBP-1-Proteine konstruiert, die nachfolgend beschrieben werden.

GBP-1 gehört zur Gruppe der großen GTPasen, es hydrolysiert GTP zu GMP über zwei aufeinanderfolgende Phosphatabspaltungen. Die Bindung von GTP erfolgt über ein dreiteiliges Motiv, wobei die Sequenz der dritten Bindungsstelle, (Aminosäuren 181 –184) spezifisch für die Erkennung der Guaninbase ist. In diesem Motiv wurde die Aminosäure 184, Aspartat, gegen Asparagin ausgetauscht (Abb. 21, D₁₈₄N). Diese Punktmutation führt zu einer starken Abnahme der Bindungsaffinität für Guanin (Praefcke *et al.*, 1999).

Anhand seiner dreidimensionalen Struktur kann GBP-1 in zwei annähernd gleichgroße Domänen unterteilt werden, eine kompakte globuläre α,β -Domäne am Aminoterminus, die auch das GTPase-Motiv enthält, sowie eine nur aus α -Helices bestehende helikale Domäne am Carboxyterminus. Zwei retrovirale Expressionsplasmide wurden erzeugt, die entweder, die für die globuläre Domäne (Aminosäuren 1 - 290) kodierende oder die für die helikale Domäne (Aminosäuren 288-592) kodierende cDNA von GBP-1 enthielten (Abb. 21, Glo, Hel).

Am Carboxyterminus von GBP-1 befindet sich ein Isoprenylierungssignal (CaaX), welches das Protein zur Anhaftung an Membranen befähigen kann. In dieses Motiv wurde ein Stoppcodon (TAA) anstelle des Cysteins (Aminosäure 588) der CaaX-Box eingebracht, um damit die Isoprenylierung des Proteins zu verhindern (Abb. 21, Δ CaaX).

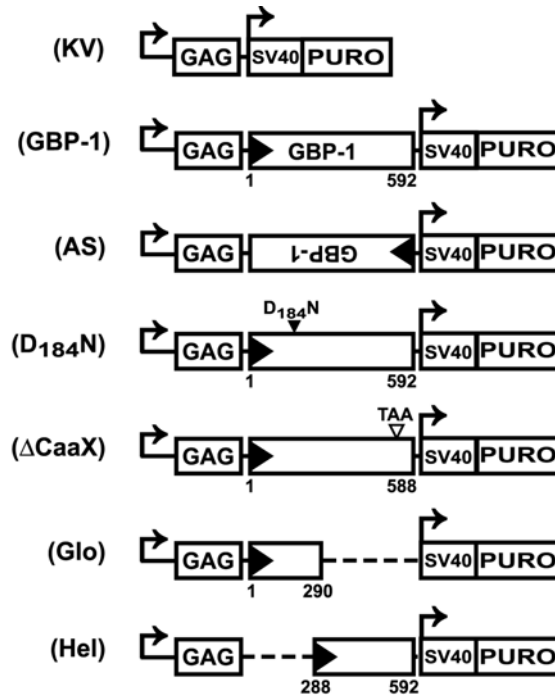


Abb. 21: Schematische Darstellung des retroviralen Expressionsvektors pBabePuro (KV), der die GBP-1-cDNA in *sense*-Orientierung (GBP-1) oder in *antisense*-Orientierung (AS-GBP-1, AS) trägt, sowie für die verschiedenen GBP-1-Mutanten kodiert: GTP-bindungsdefiziente Mutante (GBP-1-D₁₈₄N, D₁₈₄N); die GBP-1-Mutante ohne Isoprenylierungsmotiv (GBP-1-ΔCaaX, ΔCaaX), die globuläre Domäne (Glo-GBP-1, Glo) und die helikale Domäne (Hel-GBP-1, Hel). Die angegebenen Zahlen stehen für die Positionen der terminalen Aminosäuren. Die Punktmutation D zu N im GTPase-Motiv ist durch ein schwarzes Dreieck und das Stoppcodon, TAA, welches in das CaaX-Motiv eingefügt wurde, mit einem weißen Dreieck gekennzeichnet.

Die Expression des rekombinanten GBP-1 wurde durch immunzytochemische Färbungen an KV- und GBP-1-transduzierten HUVEC und zur Kontrolle an HUVEC, die mit 1000 U/ml IFN- γ für 24 h behandelt wurden, auf Einzelzellebene nachgewiesen (Abb. 22). GBP-1 (braune Färbung) wurde in nahezu allen GBP-1-transduzierten (Abb. 22, GBP-1, Pfeil) und in den IFN- γ -stimulierten HUVEC (Abb. 22, IFN- γ , Pfeil), jedoch nicht in unstimulierten KV-transduzierten HUVEC nachgewiesen (Abb. 22, KV).

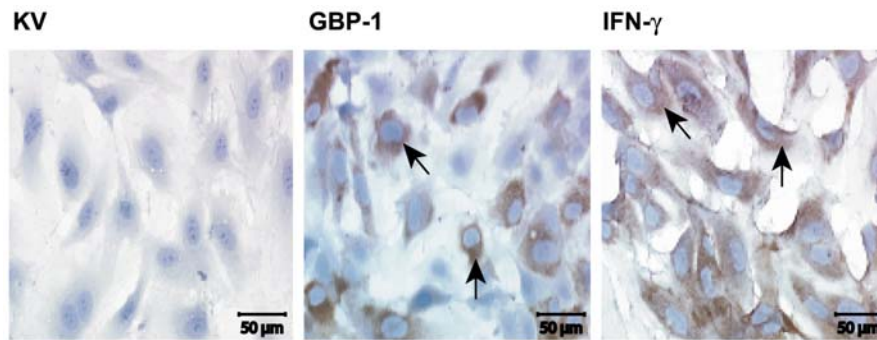


Abb. 22: Expression von GBP-1 in transduzierten HUVEC.

Zytochemische Immunfärbung zum Nachweis der GBP-1-Expression. KV- und GBP-1-transduzierte HUVEC wurden in gelatinisierten 8-Kammer-Objektträgern (2×10^4 Zellen/Kammer) kultiviert. Nach Fixierung der Zellen wurde die Expression von GBP-1 (braun) mit einem monoklonalen anti-GBP-1-Antikörper, gefolgt von einer ABC-Immunperoxidase-Färbung, nachgewiesen (Pfeile). Als Positivkontrolle (IFN- γ) dienten HUVEC, die mit 100 U/ml IFN- γ für 24 h stimuliert worden waren. Die Zellkerne wurden mit *Gill-3 hematoxylin* (blau) gefärbt. Die Auswertung erfolgte an einem inversen Mikroskop (Leica).

3.11.2 Ein Aminosäureaustausch D₁₈₄N im aktiven Zentrum von GBP-1 reduziert die GTPase-Aktivität

3.11.2.1 Herstellung und Reinigung von rekombinantem D₁₈₄N-GBP-1

Für den Nachweis, dass D₁₈₄N-GBP-1 eine reduzierte GTPase-Aktivität aufweist, war es notwendig, gereinigtes Protein herzustellen, mit dem die GTPase Aktivität *in vitro* getestet werden konnte. Dazu wurde der Proteinexpressionsvektor pQE60 verwendet, in den die GBP-1-kodierende cDNA eingesetzt wurde. Durch ortsggerichtete Mutagenese wurde das Codon für Aspartat, der Aminosäure 184, mit einem Codon für Asparagin ausgetauscht. Über 6 Histidinreste, die am C-Terminus des rekombinanten Proteins angefügt werden, wurde die Reinigung mittels Affinitätschromatographie über eine Nickel-Nitril-Essigsäure (Ni-NTA) - Säule ermöglicht.

Die Proteinexpression des rekombinanten D₁₈₄N-GBP-1-His₆-Fusionsproteins erfolgte im *E.coli*-Stamm M15 und wurde durch Zugabe von IPTG induziert. Zunächst wurden die optimalen Bedingungen für die Expression des rekombinanten Proteins untersucht. Dabei wurde der Einfluss verschiedener Konzentrationen an IPTG (0,1; 0,5 und 1 mM IPTG), Inkubationstemperaturen [Raumtemperatur (RT), 37°C] und Inkubationszeiten (2 h, 4 h) untersucht. Die Induktion der Expression wurde jeweils bei einer Bakteriendichte (OD₆₀₀) von 0,7 durchgeführt. Die Expression des D₁₈₄N-

GBP-1-His₆-Fusionsproteins konnte sowohl bei 37°C als auch bei Raumtemperatur mit den eingesetzten IPTG-Konzentrationen induziert werden.

Für die Untersuchung der Löslichkeit des exprimierten Proteins wurden Induktionen mit 0,1; 0,5 und 1 mM IPTG nach 2 h bei RT beziehungsweise nach 4 h bei 37°C gewählt (Abb. 23). Die Expression des rekombinanten Proteins war bei 37°C und einer Kultivierungszeit von 4 h höher als bei einer Kultivierung von 2 h bei RT, wobei keine Unterschiede in der Ausbeute bei verschiedenen IPTG-Konzentrationen festgestellt wurden (Abb. 23). Für die präparativen Expressionsansätze wurde deshalb eine IPTG-Konzentration von 0,1 mM mit einer Inkubationszeit von 4 h bei 37°C gewählt. Nach dem Lysieren der Bakterien befand sich der Großteil des rekombinanten Proteins in der löslichen Fraktion der bakteriellen Lysate (Abb. 23).

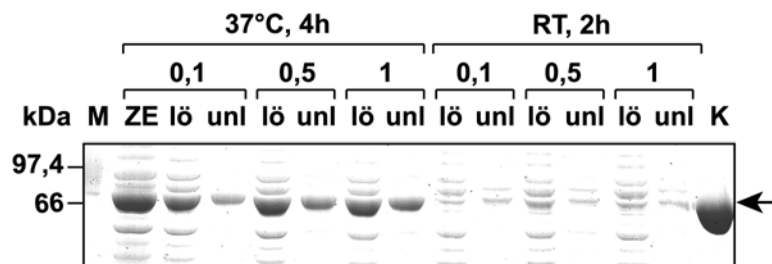


Abb. 23: Expression und Löslichkeit von rekombinantem D₁₈₄N-GBP-1-His₆ in *E.coli*.

Bestimmung der Löslichkeit des bei Raumtemperatur (RT) für 2 h beziehungsweise bei 37°C für 4 h exprimierten Proteins. Die löslichen (lö) und unlöslichen Proteine (unl) wurden durch Zentrifugation getrennt, einer SDS-PAGE unterzogen und mit Coomassie Blau gefärbt. Zum Vergleich wurde der Zellextrakt (ZE) und als Positivkontrolle (K) gereinigtes Wildtyp-GBP-1-protein aufgetragen. Ein Proteinstandard (M) diente zur Bestimmung des Molekulargewichts der rekombinanten Proteine. Die Bande des rekombinanten D₁₈₄N-GBP-1 und des gereinigten Wildtyp-GBP-1-Proteins, GBP-1-His₆, (K) und ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

Die Isolierung des D₁₈₄N-GBP-1-His₆ aus der löslichen Fraktion des Bakterienlysates erfolgte über eine Nickel-NTA-Affinitätschromatographie. Dabei wird das Histidin-gekoppelte Protein durch die 6 Histidine am Carboxyterminus an die Ni-NTA-Säule gebunden und nach dem Waschen der Säule mit einem linearen Imidazolgradienten kompetitiv eluiert. Bei dem D₁₈₄N-GBP-1-His₆-Fusionsprotein erfolgte die Elution zwischen 150 und 200 mM Imidazol. Die Reinheit des eluierten Proteins betrug über 90%, wie durch die Färbung mit Coomassie Blau gezeigt werden konnte (Abb. 24, Eluat-Fractionen 5 – 22).

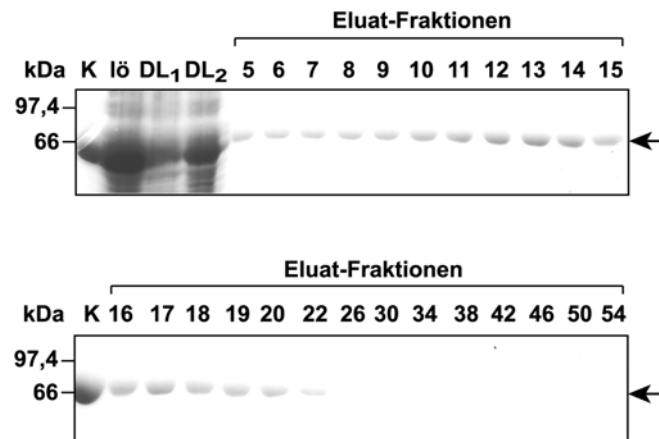


Abb. 24: Reinigung des D₁₈₄N-GBP-1-His₆ mittels Affinitätschromatographie über eine Ni-NTA-Säule. Die Aufreinigung des rekombinant hergestellten D₁₈₄N-GBP-1-His₆ erfolgte über eine Nickel-NTA-Säule. Es wurden jeweils Proben des Proteins vor der Reinigung (lö), von Durchlauf 1 und 2 (DL) sowie einzelnen Eluat-Fractionen (5-54) elektrophoretisch getrennt und mit Coomassie Blau visualisiert. Als Kontrolle (K) diente gereinigtes Wildtyp-GBP-1-Protein, GBP-1-His₆. Die Proteinbanden für rekombinantes GBP-1-His₆ (K) und D₁₈₄N-GBP-1-His₆ sind durch einen Pfeil gekennzeichnet.

3.11.2.2 D₁₈₄N-GBP-1 weist eine stark reduzierte GTPase-Aktivität auf

Zur Untersuchung der GTPase-Aktivität des rekombinanten D₁₈₄N-GBP-1-His₆-Fusionsproteins wurde ein Reaktionsgemisch aus radioaktiv markiertem GTP, mit dem gereinigten D₁₈₄N-GBP-1-His₆-Fusionsprotein inkubiert und die radioaktiv markierten Nukleotide anschließend mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt (Abb. 25). His₆-fusionierte Wildtyp-GBP-1-Proteine wiesen wie erwartet eine starke enzymatische Aktivität auf, unabhängig ob die His₆-Reste mit dem N-Terminus (Abb. 25, His₆-GBP-1) oder dem C-Terminus (Abb. 25, GBP-1-His₆) fusioniert waren. Im Gegensatz dazu konnte D₁₈₄N-GBP-1-His₆ GTP nicht mehr zu GMP und nur in sehr geringem Ausmaß zu GDP hydrolysieren (Abb. 25, D₁₈₄N-GBP-1-His₆).

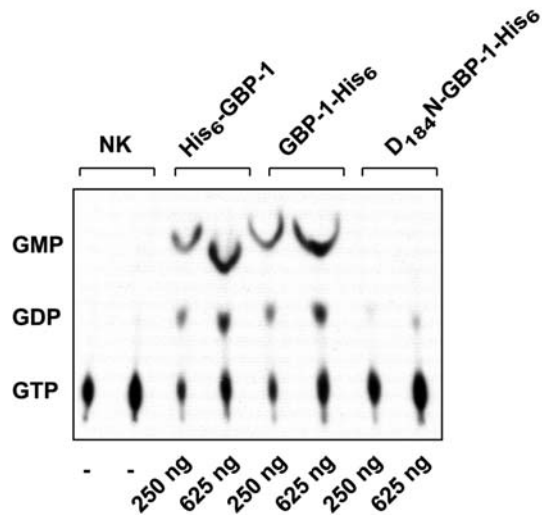


Abb. 25: Der Austausch von Aspartat (D) zu Asparagin (N) an Aminosäure 184 führt zu einer stark verminderten GTPase-Aktivität von GBP-1.

GTPase-Aktivität von gereinigtem Wildtyp-GBP-1-Protein, das am N-Terminus (His₆-GBP-1) oder am C-Terminus (GBP-1-His₆) mit 6 Histidinresten fusioniert war, und von C-terminal His₆-fusioniertem D₁₈₄N-GBP-1 (D₁₈₄N-GBP-1-His₆). 250 ng und 625 ng gereinigtes Protein wurden jeweils mit 12nM [α -³²P]-GTP und 130 μ M GTP gemischt und für 60 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden durch Dünnschichtchromatographie auf PEI-beschichteten Platten aufgetrennt und über Autoradiographie sichtbar gemacht. Die bei der Hydrolyse von GTP entstehenden Reaktionsprodukte, GDP und GMP, traten bei beiden Reaktionsansätzen mit dem Wildtyp-GBP-1-Protein (His₆-GBP-1, GBP-1-His₆) auf. Im Vergleich dazu trat bei D₁₈₄N-GBP-1-His₆ kein GMP und nur eine sehr schwaches Signal für GDP auf. Als Negativkontrolle (NK) wurde der ohne Protein inkubierte Reaktionsansatz aufgetragen.

3.11.3 Die helikale Domäne vermittelt den antiproliferativen Effekt von GBP-1 auf Endothelzellen

Um die Wirkung der verkürzten und mutierten GBP-1-Proteine auf das Wachstumsverhalten von Endothelzellen zu untersuchen, wurden Proliferationsstudien mit transduzierten HUVEC durchgeführt (Abb. 26).

Anhand dieser Versuche konnte gezeigt werden, dass in Anwesenheit von angiogenen Wachstumsfaktoren die globuläre Domäne (Abb. 26, Glo) die Proliferation nicht hemmte, während die helikale Domäne (Abb. 26, Hel), sowie die GBP-1-Mutanten D₁₈₄N-GBP-1 und Δ CaaX-GBP-1 die gleiche inhibitorische Aktivität wie GBP-1 aufwiesen (Abb. 26). Die Proliferationshemmung betrug nahezu 70% im Vergleich zu den KV-transduzierten Zellen (Abb. 26). Daraus lässt sich schließen, dass die antiproliferative Wirkung von GBP-1 unabhängig von seiner GTPase-Aktivität oder Isoprenylierung ist und spezifisch durch die C-terminale helikale Domäne des Moleküls vermittelt wird.

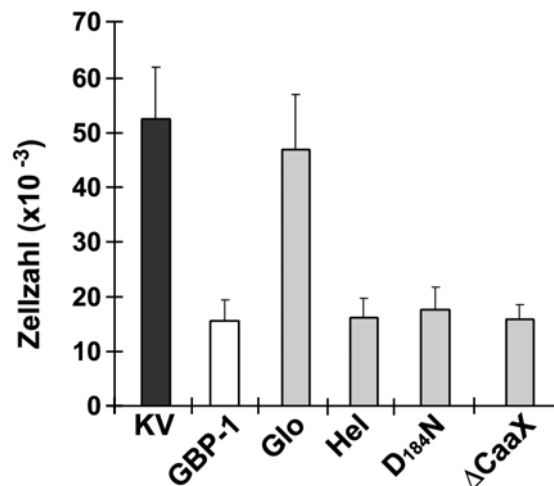


Abb. 26: Die Hemmung der endothelialen Zellproliferation wird durch die helikale Domäne von GBP-1 vermittelt.

HUVEC, die entweder mit dem Kontrollvektor (KV) transduziert waren oder mit Vektoren, die die Expression von GBP-1 beziehungsweise verkürzter oder mutierter GBP-1-Proteine steuern: globuläre Domäne von GBP-1 (Glo, Aminosäuren 1-290), helikale Domäne (Hel, Aminosäuren 288-592), GTPase-Mutante (D₁₈₄N) und Isoprenylierungsmutante (ΔCaaX) wurden zur Bestimmung der Proliferationsrate in 24-Multiwell-Platten ausgebracht. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Anwesenheit von AWF (bFGF und VEGF, je 10 ng/ml). Nach 3 Tagen wurde das Medium gewechselt und nach 6 Tagen die Proliferation bestimmt. In drei unabhängigen Versuchen wurde jeder Ansatz in dreifacher Ausführung angefertigt. Davon wurde jeweils 10fach die Zellzahl bestimmt und Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet.

3.11.4 Eingrenzung des proliferationsinhibierenden Bereiches der helikalen Domäne von GBP-1

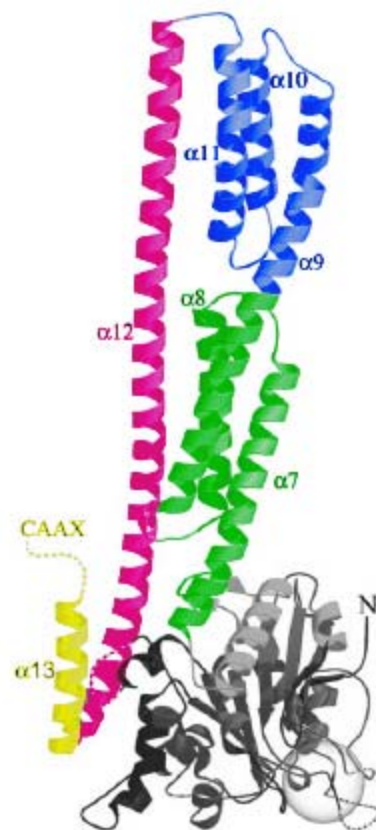
Anhand der Proliferationsergebnisse mit transduzierten HUVEC (Abb. 26) konnte gezeigt werden, dass die helikale Domäne von GBP-1 allein für die Hemmung des Wachstums verantwortlich ist. In nachfolgenden Untersuchungen sollte der Bereich der helikalen Domäne, der für die Proliferationsinhibierung verantwortlich ist, weiter eingegrenzt werden.

3.11.4.1 Expression von Fragmenten der helikalen Domäne in retroviral transduzierten HUVEC

Die helikale Domäne wird aus sieben α -Helices, α 7 - α 13, gebildet und besteht aus zwei α -Helixbündel von je 3 α -Helices, α 7, α 8 und α 9 (Abb. 27, grün; Aminosäuren 311 – 403) und α 9, α 10 und α 11 (Abb. 27, blau; Aminosäuren 404 - 482), wobei die α -Helix α 9 in beiden Bündeln vorkommt. Daran schließt sich eine sehr lange α -Helix (α -Helix 12) an, die aus 78 Aminosäuren gebildet wird (Abb. 27, rot). Sie bedeckt die beiden α -Helixbündel und reicht zurück bis zur globulären Domäne (Abb. 27, grau).

Am carboxyterminalen Ende des Moleküls grenzt an α -Helix 12 nach einer helikalen Drehung eine weitere kurze α -Helix an. Diese α -Helix, α 13 (Abb. 27, gelb) bildet mit α -Helix 12 *coiled-coil* Interaktionen.

Die beiden α -Helixbündel geben dem Molekül seine langgezogene Form und interagieren nur schwach mit α -Helix 12 (Prakash *et al.*, 2000a; Prakash *et al.*, 2000b). Durch die geringen Interaktionen mit den beiden α -Helixbündeln bildet α -Helix 12 zusammen mit α -Helix 13 einen relativ flexiblen Teil des Moleküls.



(Prakash *et al.*, 2000a)

Abb. 27: Dreidimensionale Darstellung von GBP-1 mit farbig hervorgehobenen strukturellen Fragmenten der helikalen Domäne. α -Helixbündel 789^{1/2} (grün), α -Helixbündel 9^{1/2}-11 (blau), α -Helix 12 (rot) und α -Helix 13 (gelb).

Anhand der dreidimensionalen Struktur von GBP-1 wurden für die weitere Eingrenzung der minimalen proliferationsinhibierenden Domäne, Teilfragmente der helikalen Domäne untersucht, die die folgenden α -Helices zusammenfassen:

- α 7-11, welches aus den beiden α -Helixbündeln besteht (Abb. 27, grün und blau; Aminosäuren 312 - 478);

- $\alpha 789^{1/2}$, bestehend aus dem α -Helixbündel, das an die globuläre Domäne anschließt (Abb. 27, grün; Aminosäuren 312 - 404);
- $\alpha 12/13$, zusammengesetzt aus den beiden α -Helices $\alpha 12$ und $\alpha 13$ (Abb. 27, rot und gelb; Aminosäuren 483 - 592).

Entsprechend wurden in den retroviralen Expressionsvektor pBabePuro cDNA-Moleküle kloniert, die für die helikalen Fragmente $\alpha 7-11$ (Aminosäuren 312 - 478), $\alpha 789^{1/2}$ (Aminosäuren 312 - 404) und $\alpha 12/13$ (Aminosäuren 483 - 592) kodieren (Abb. 28).

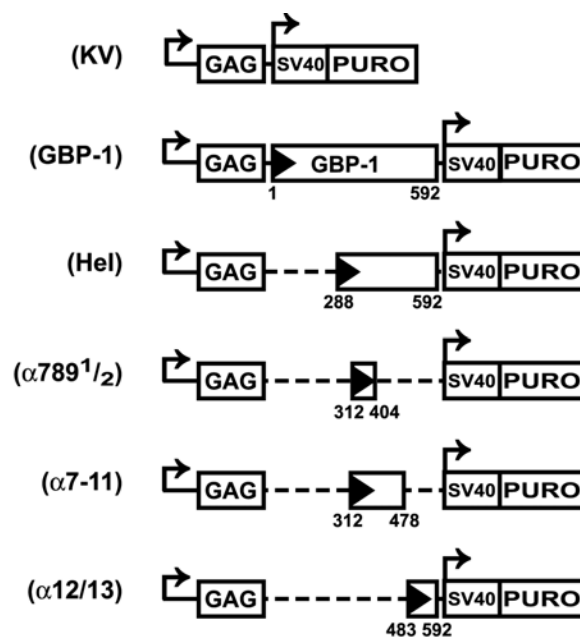


Abb. 28: Schematische Darstellung des retroviralen Expressionsvektors pBabePuro (KV) sowie von Konstrukten, die für GBP-1, die helikale Domäne und Teilbereiche davon kodieren: die helikale Domäne (Hel); das an die globuläre Domäne angrenzende α -Helixbündel $\alpha 789^{1/2}$ ($\alpha 789^{1/2}$); beide α -Helixbündel zusammengefasst ($\alpha 7-11$) sowie die beiden α -Helices 12 und 13 ($\alpha 12/13$). Die angegebenen Zahlen stehen jeweils für die Positionen der terminalen Aminosäuren.

Zum Nachweis der mRNA-Expression der verkürzten GBP-1-Fragmente wurde die zelluläre RNA transduzierter HUVEC einer *Northern blot* - Analyse unterzogen (Abb. 29B). Als Sonde wurde eine radioaktiv markierte cDNA von GBP-1 (1800 bp) eingesetzt.

In der *Northern blot* - Hybridisierung konnten nachgewiesen werden:

- die *antisense*-GBP-1 RNA (Abb. 29B, AS) sowie die für
- GBP-1 (Abb. 29B, GBP-1),
- die globuläre Domäne (Abb. 29B/C, Glo),

- die helikale Domäne (Abb. 29B/C, Hel) sowie die helikalen Teilbereiche
- $\alpha 7-11$ (Abb. 29C),
- $\alpha 789^{1/2}$ (Abb. 29C) und
- $\alpha 12/13$ (Abb. 29C)

kodierenden mRNA-Moleküle transduzierter Endothelzellen.

Die RNA, die aus KV-transduzierten HUVEC isoliert wurde, zeigte kein Signal (Abb. 29B, KV).

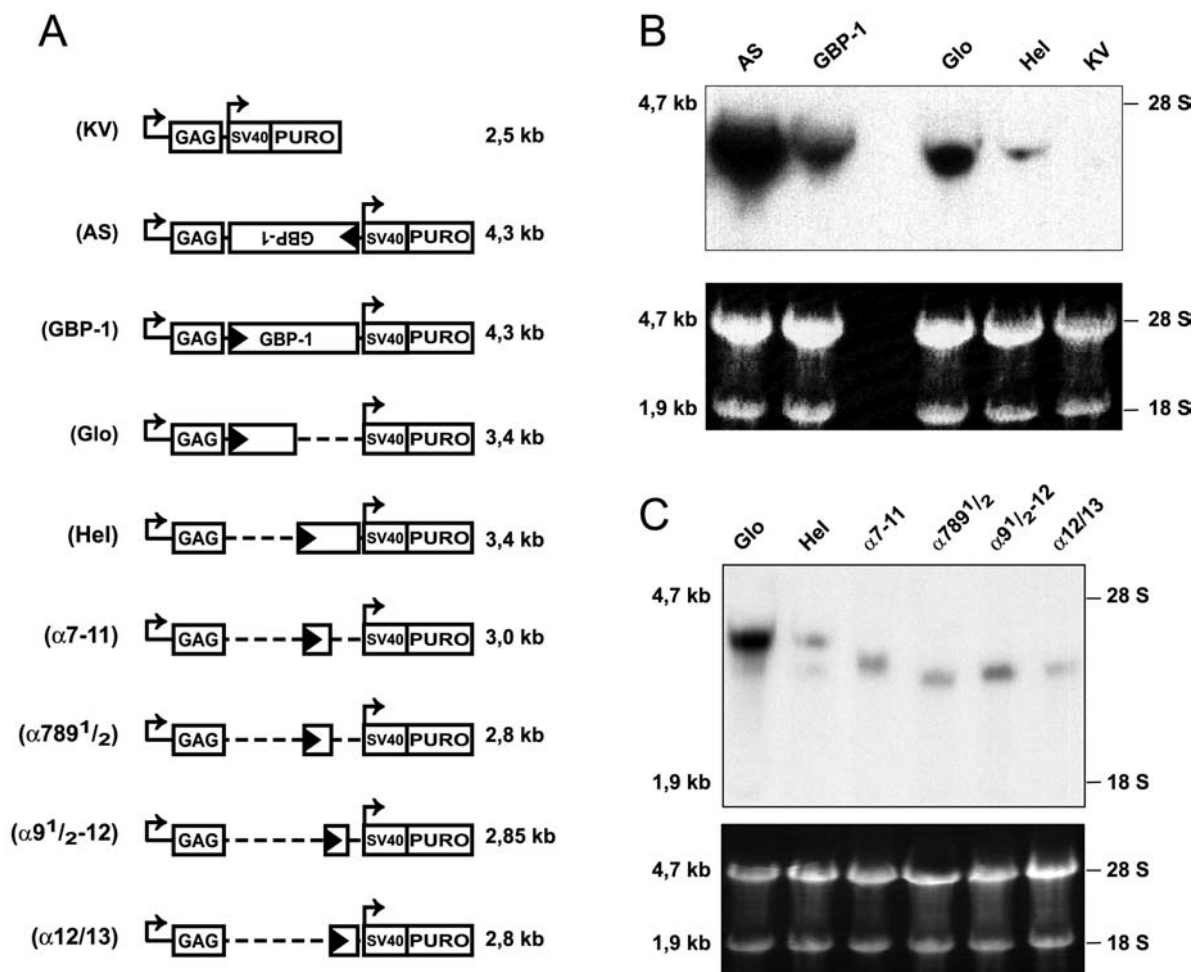


Abb. 29: Northern blot – Analysen zum Nachweis der mRNA verkürzter GBP-1-Fragmente in transduzierten HUVEC.

(A) Schematische Darstellung der retroviralen Konstrukte mit den entsprechenden Größen der kodierten mRNAs (rechts). (B) Northern blot – Analyse mit zellulärer RNA, isoliert aus transduzierten HUVEC. Je 30 μg RNA von antisense-GBP-1 (AS)-, GBP-1-, Glo-GBP-1 (Glo)-, Hel-GBP-1 (Hel)- und KV-transduzierten HUVEC wurden in einem denaturierenden Agarose/Formaldehydgel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer ^{32}P -markierten DNA-Sonde (6×10^8 cpm/ μg DNA), kodierend für GBP-1, hybridisiert. Der Nachweis der gebundenen radioaktiven Sonde erfolgte autoradiographisch. (C) Northern blot – Analyse mit zellulärer RNA, isoliert aus transduzierten HUVEC. Je 30 μg RNA von Glo-GBP-1 (Glo)-, Hel-GBP-1 (Hel)-, $\alpha 7-11$ -GBP-1 ($\alpha 7-11$)-, $\alpha 789^{1/2}$ -GBP-1 ($\alpha 789^{1/2}$)-, $\alpha 9^{1/2-12}$ -GBP-1 ($\alpha 9^{1/2-12}$)- und $\alpha 12/13$ -GBP-1 ($\alpha 12/13$)-transduzierten HUVEC wurden in einem denaturierenden Agarose/Formaldehydgel aufgetrennt und wie in (B) beschrieben, behandelt.

In einem nächsten Schritt wurde die Expression der helikalen Fragmente von GBP-1 in transduzierten HUVEC auf Proteinebene im *Western blot* mit einem polyklonalen anti-GBP-1-Antikörper untersucht (Abb. 30). Hierbei konnten die globuläre Domäne (Abb. 30A, Glo), die helikale Domäne (Abb. 30A, Hel) sowie die Fragmente aus den α -Helices 7-11 (Abb. 30A, α 7-11), und α -Helices 12/13 (Abb. 30A, α 12/13) nachgewiesen werden. Das kleinste Fragment mit nur 92 Aminosäuren (α 789^{1/2}) war nicht nachweisbar. Nach einer Verlängerung der Nachweisreaktion konnte jedoch auch die Expression dieses Fragments nachgewiesen werden (Abb. 30B, Pfeil).

In allen Fällen entsprachen die Molekulargewichte der nachgewiesenen GBP-1-Fragmente den erwarteten Molekulargewichten dieser Fragmente: globuläre Domäne (Glo, 32 kDa), helikale Domäne (Hel, 33,7 kDa), der helikalen Fragmente α 789^{1/2} (10,2 kDa), α 7-11 (18,4 kDa), α 12/13 (12,1 kDa) und α 9^{1/2}-12 (12,7 kDa). Die unterschiedlichen Bandenintensitäten sind sehr wahrscheinlich auf die unterschiedliche Anzahl von Epitopen in den verkürzten GBP-1-Proteinen zurückzuführen. Somit konnte sowohl auf RNA-Ebene im *Northern blot* als auch auf Proteinebene im *Western blot* die Expression der verkürzten GBP-1-Fragmente nachgewiesen werden.

In der *Northern blot* (Abb. 29C) – und *Western blot* (Abb. 30C) - Analyse ist ebenfalls der Nachweis der Expression eines weiteren helikalen Fragments, α 9^{1/2}-12, dargestellt, auf das in 3.11.5.4 näher eingegangen wird.

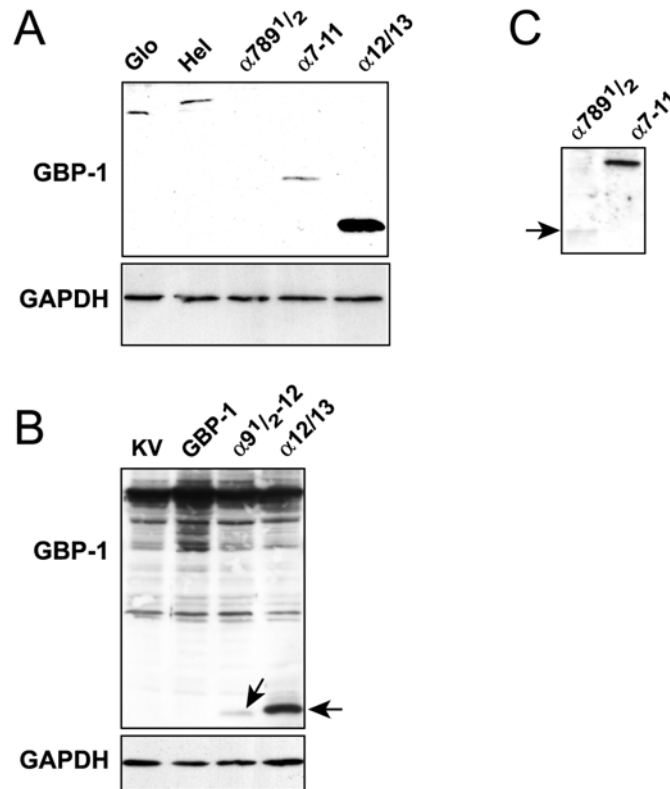


Abb. 30: Nachweis verkürzter GBP-1-Proteine in transduzierten HUVEC.

Western blot – Analyse mit zellulären Proteinextrakten, isoliert aus transduzierten HUVEC. (A) Je 30 µg zelluläres Protein von HUVEC, die mit Konstrukten transduziert waren, die für GBP-1, die globuläre Domäne (Glo), die helikale Domäne (Hel) beziehungsweise Teilbereiche der helikalen Domäne $\alpha 789^{1/2}$, $\alpha 7-11$ und $\alpha 12/13$ kodieren, wurden elektrophoretisch getrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Nachweis von GBP-1 sowie der verkürzten GBP-1-Proteine erfolgte mit einem polyklonalen anti-GBP-1-Antikörper (α -GBP-1/1). (B) Je 30 µg zelluläres Protein von HUVEC, die entweder mit dem Kontrollvektor (KV) transduziert waren oder mit Vektoren, die für GBP-1 beziehungsweise die helikalen Teilbereiche $\alpha 9^{1/2-12}$ oder $\alpha 12/13$ kodieren, wurden elektrophoretisch getrennt und wie in (A) beschrieben, behandelt. (C) Die Expression von $\alpha 789^{1/2}$ konnte nach einer Verlängerung der *Western blot* –Reaktion von (A) nachgewiesen werden und ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die den Proteinen $\alpha 9^{1/2-12}$ und $\alpha 12/13$ entsprechenden Banden sind durch Pfeile markiert (C). Nach dem Entfernen der gebundenen Antikörper wurden die Membranen zum Vergleich der aufgetragenen Proteinmengen mit einem monoklonalen anti-GAPDH-Antikörper inkubiert.

3.11.4.2 Ein Fragment der helikalen Domäne von 166 Aminosäuren vermittelt die Inhibierung der Endothelzellproliferation durch GBP-1

Für die weitere Eingrenzung des proliferationsinhibierenden Bereiches der helikalen Domäne wurden die mit den einzelnen helikalen Konstrukten transduzierten HUVEC, Proliferationsstudien unterzogen (Abb. 31). Dabei stellte sich heraus, dass die Expression von $\alpha 7-11$, welche die beiden α -Helixbündel aus je drei α -Helices umfasst, ähnlich proliferationsinhibierend auf das Endothelzellwachstum wirkte, wie die gesamte helikale Domäne beziehungsweise das gesamte GBP-1 (Abb. 31).

Im Vergleich zu den KV-transduzierten HUVEC zeigten HUVEC, die das Fragment $\alpha 7-11$ exprimierten ein um 62 % geringeres Wachstum (Abb. 31, $\alpha 7-11$). In Zellen, die GBP-1 oder die helikale Domäne von GBP-1 exprimierten, war das Wachstum um 66% (Abb. 31, GBP-1) beziehungsweise um 64% (Abb. 31, Hel) verringert.

Keine proliferationshemmende Wirkung auf die Endothelzellen hatte das α -Helixbündels $\alpha 789^{1/2}$, welches sich an die globuläre Domäne anschließt (Abb. 31, $\alpha 789^{1/2}$) sowie $\alpha 12/13$ (Abb. 31, $\alpha 12/13$).

Somit konnte zunächst die proliferationsinhibierende Domäne auf ein Teilstück begrenzt werden, welches aus den beiden α -Helixbündeln mit den α -Helices $\alpha 7-11$ besteht. Da das in diesem Fragment enthaltene α -Helixbündel $\alpha 789^{1/2}$ die Proliferation nicht hemmte, wurde vermutet, dass sich der Hemmbereich im α -Helixbündel $\alpha 9^{1/2}-11$ befinden könnte.

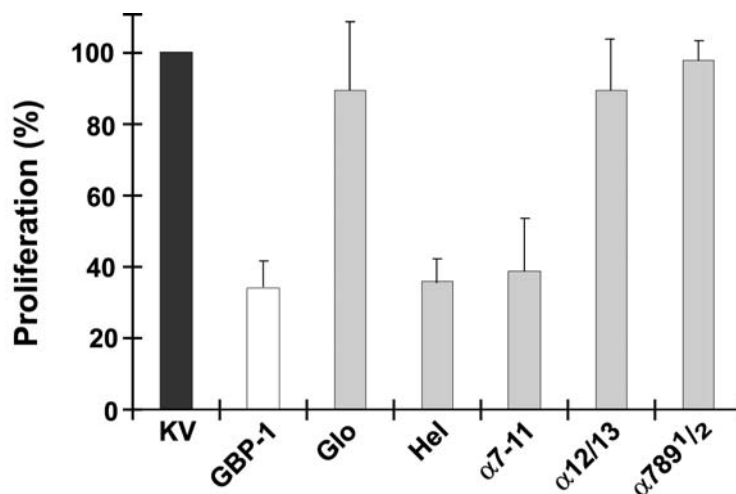


Abb. 31: Ein Fragment der helikalen Domäne von 166 Aminosäuren ($\alpha 7-11$) vermittelt die Inhibierung der Endothelzellproliferation durch GBP-1.

HUVEC wurden mit dem Kontrollvektor (KV) oder mit Vektoren, die die Expression von GBP-1 beziehungsweise der verkürzten GBP-1-Proteine, globuläre Domäne (Glo, Aminosäuren 1 - 290), helikale Domäne (Hel, Aminosäuren 288 - 592), $\alpha 7-11$ (Aminosäuren 312 - 478), $\alpha 12/13$ (Aminosäuren 483 - 592) oder $\alpha 789^{1/2}$ (Aminosäuren 312 - 404) steuern, transduziert. Zur Bestimmung der Proliferationsrate wurden die Zellen in 24-*Multiwell*-Platten ausgebracht und in Anwesenheit von AWF (bFGF und VEGF, je 10 ng/ml) kultiviert. Nach 3 Tagen wurde das Medium gewechselt und nach 6 Tagen die Proliferation bestimmt. In drei unabhängigen Versuchen wurde jeder Ansatz in dreifacher Ausführung angefertigt. Davon wurde jeweils 10fach die Zellzahl bestimmt, Mittelwerte und Standardabweichungen gebildet und die Zellzahlen in Prozent zur Kontrolle (KV = 100%) angegeben.

3.11.5 Weitere Eingrenzung des proliferationsinhibierenden Bereiches mittels synthetischer GBP-1-Peptide sowie retroviral transduzierter HUVEC

Um zu untersuchen, ob das α -Helixbündel $\alpha 9^{1/2-11}$ die Proliferation von Endothelzellen inhibiert, wurden (a) synthetische GBP-1-Peptide, die von den Endothelzellen aufgenommen werden, versus (b) noch kleineren Teilbereichen, die mit retroviralen Vektoren exprimiert werden, verwendet. Zur Versuchsdurchführung wurde folgender Ansatz vorgenommen:

- (a) synthetische GBP-1-Peptide, bestehend aus den Aminosäuren der α -Helix 10, α -Helix 11 oder den Verbindungsbereichen zwischen den α -Helices 9/10; 10/11 und 11/12 wurden erzeugt und die proliferationsinhibierende Wirkung an Endothelzellen untersucht (Abb. 32).
- (b) drei weitere cDNA-Moleküle, die für den Bereich $\alpha 9^{1/2-12}$ (Aminosäuren 403 - 518), $\alpha 9^{1/2-11}$ (Aminosäuren 403 - 478) beziehungsweise $\alpha 10/11$ (Aminosäuren 425 - 478) kodieren, wurden mittels retroviraler Vektoren in HUVEC erzeugt und bezüglich ihrer Wirkung auf die Proliferation untersucht.

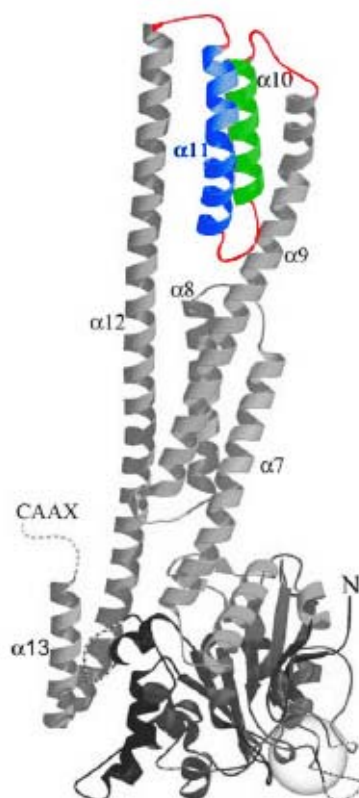
3.11.5.1 PeptidAuswahl

Zur Untersuchung der proliferationsinhibierenden Wirkung von GBP-1-Peptiden wurden drei verschiedene Aminosäuresequenzen des α -Helixbündels $\alpha 9^{1/2-11}$ ausgewählt. Um diese Peptide auf die Proliferation von Endothelzellen testen zu können, ist zunächst jedoch deren zelluläre Aufnahme in die Zellen Voraussetzung. Dafür sind Signalsequenzen notwendig, die den Eintritt der Peptide in die Zelle ermöglichen. Bestimmte Proteine enthalten sogenannte Proteintransduktionsdomänen (PTD), die sie befähigen, durch die Plasmamembran in die Zelle einzudringen. Ein solches Protein ist das vom humanen Immunschwächevirus-1 (HIV-1) kodierte *nuclear transcription activator protein* (HIV-1-Tat). Die Aufnahme von HIV-1-Tat in Zellen wird von einer kurzen Peptidsequenz, Tat₄₇₋₅₇, der basischen Region von HIV-1-Tat, vermittelt (Becker-Hapak *et al.*, 2001; Ho *et al.*, 2001; Schwarze und Dowdy, 2000; Wadia und Dowdy, 2002). Es wurde gezeigt, dass diese 11 Aminosäuren lange Region die Aufnahme von fusionierten Peptiden/Proteinen in die Zelle bewirken kann.

Für die Untersuchung des proliferationsinhibierenden Potentials von Teilbereichen des α -Helixbündels $\alpha 9^{1/2-11}$, sollten HIV-1-Tat-GBP-1-Fusionspeptide erzeugt werden und zunächst auf ihre Aufnahme in die Zelle getestet werden. Der Bereich,

auf den im Rahmen dieses Ansatzes fokussiert wurde, ist das *helix-turn-helix*-Motiv aus den α -Helices α 10 und α 11.

Es wurden HIV-1-Tat-GBP-1-Fusionspeptide erzeugt, die am Aminoterminus die PTD des HIV-1-Tat, Tat₄₇₋₅₇ (YGRKKRRQRRR), tragen, an das die Sequenz der α -Helix 10 (Peptid-1), der α -Helix 11 (Peptid-2) beziehungsweise die Aminosäuresequenz der Verbindungsregionen zwischen α 9/10, α 10/11 und α 11/12 (Peptid-3) angefügt war (Abb. 32). Das dritte Peptid wurde ausgewählt, da die Verbindungsregionen zwischen α 9/10 und α 11/12 räumlich exponiert sind und bei Interaktionen mit anderen Molekülen eine Rolle spielen könnten. Die Peptide haben eine Länge von 29 Aminosäuren (Peptid-1), 33 Aminosäuren (Peptid-2) und 30 Aminosäuren (Peptid-3). Die Synthese von Peptid-2 konnte jedoch nicht realisiert werden, da eine Konformationsänderung der α -Helix in ein unlösliches β -Faltblatt auftrat.



Proteintransduktionsdomäne (PTD) von HIV-1-Tat:

Tat₄₇₋₅₇: **YGRKKRRQRRR**

Peptid-1: HIV-1-Tat₄₇₋₅₇ - **Helix 10**

Peptid-2: HIV-1-Tat₄₇₋₅₇ - **Helix 11**

Peptid-3: HIV-1-Tat₄₇₋₅₇ - **Intermediäre Region**

(Prakash et al., 2000a)

Abb. 32: Auswahl synthetischer HIV-1-Tat-GBP-1-Fusionspeptide.

Folgende Peptide wurden zur Synthese von HIV-1-Tat-GBP-1-Fusionspeptiden ausgewählt: Peptid-1: PTD von HIV-1-Tat (Tat₄₇₋₅₇) gekoppelt mit der Aminosäuresequenz von α -Helix 10 (grün); Peptid-2: PTD von HIV-1-Tat (Tat₄₇₋₅₇) gekoppelt mit der Aminosäuresequenz von α -Helix 11 (blau); Peptid-3: PTD von HIV-1-Tat (Tat₄₇₋₅₇) gekoppelt mit der Aminosäuresequenz der Intermediärregionen zwischen α -Helix 9 und 10, 10 und 11 sowie 11 und 12 (rot).

3.11.5.2 Die PTD von HIV-1-Tat, Tat₄₇₋₅₇, vermittelt eine effiziente Aufnahme von GBP-1-Peptiden in die Zelle

Um die Internalisierung der HIV-1-Tat-GBP-1-Fusionspeptide in Endothelzellen zu prüfen, wurde jeweils ein Aliquot der Peptide am C-Terminus mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC), einem Fluoreszenzfarbstoff, markiert (Peptid-1-FITC; Peptid-3-FITC). Für die Untersuchung der Aufnahme in die Zelle, wurden HUVEC mit Peptid-1-FITC beziehungsweise Peptid-3-FITC in den Endkonzentrationen von 1 μ M, 5 μ M oder 10 μ M für 30 und 60 min inkubiert. In allen drei gewählten Konzentrationen wurden die Peptide von den Zellen aufgenommen (Abb. 33). Die Fluoreszenzintensitäten waren bei einer Behandlung mit 1 μ M Peptid-1-FITC beziehungsweise Peptid-3-FITC nach 30 min noch sehr schwach, verstärkten sich jedoch bei längerer Inkubation (Abb. 33). Bei einer Konzentration von 10 μ M konnte bereits nach 30 min bei beiden Peptiden eine starke Fluoreszenz im Zytoplasma (Abb. 33, weiße Pfeile) und im Zellkern (Abb. 33, rote Pfeilspitzen) beobachtet werden. Dieses zeigt, dass beide Peptide sehr effizient von den Zellen aufgenommen wurden.

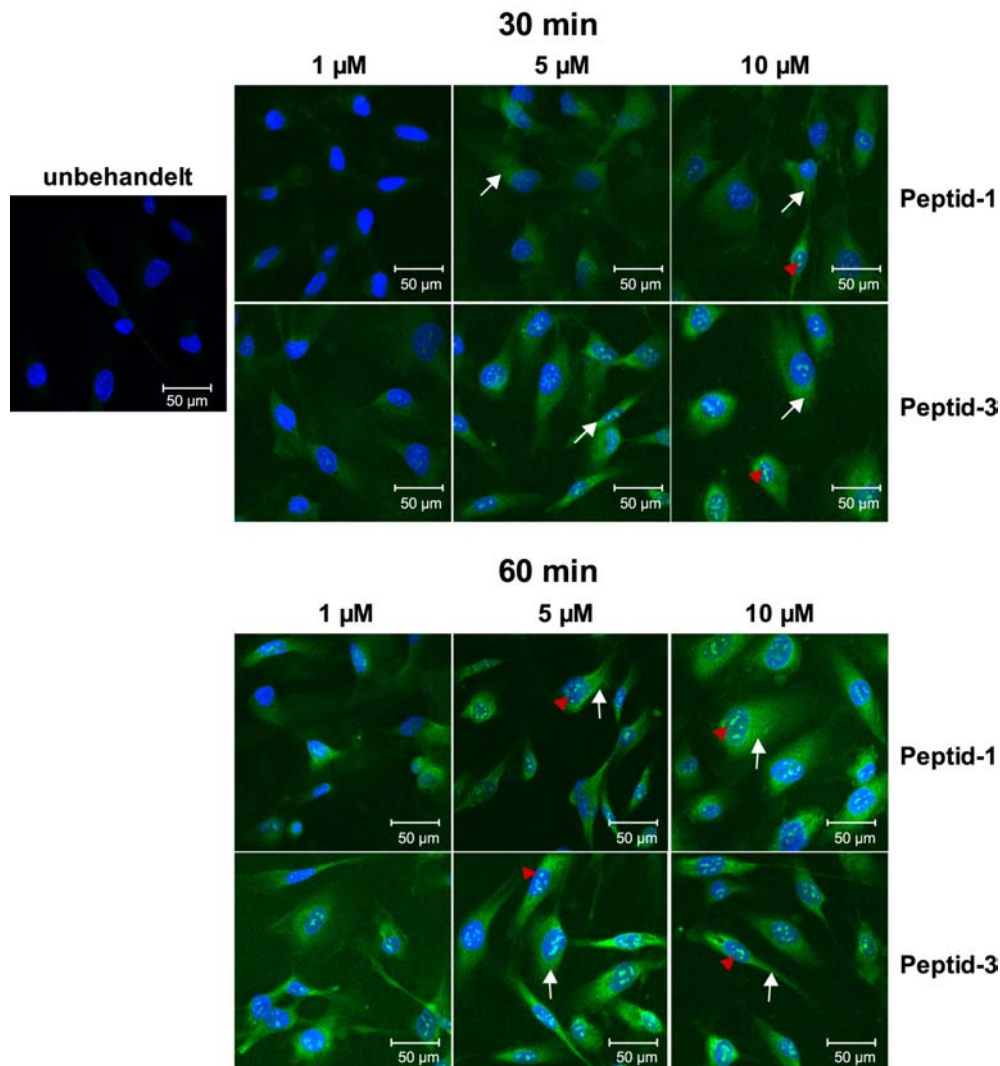


Abb. 33: Aufnahme von FITC-markierten HIV-1-Tat-GBP-1-Fusionspeptiden in Endothelzellen. Für die Untersuchung der zellulären Aufnahme der synthetisierten HIV-1-Tat-GBP-1-Fusionspeptide wurden FITC-markierte Peptide eingesetzt. HUVEC wurden in gelatinisierten 8-Kammer-Objekträgern ausgesät (2×10^4 Zellen/Kammer) und nach einer Kultivierungsdauer von 12 h in den angegebenen Konzentrationen (1, 5 oder 10 μM) von Peptid-1-FITC und Peptid-3-FITC für 30 min und 60 min inkubiert. Die Aufnahme der Peptide in die Zellen ist durch die Fluoreszenz im Zytoplasma (weiße Pfeile) und im Zellkern (rote Pfeilspitzen) angezeigt. In den Zellen, die nicht mit den Peptiden inkubiert wurden (unbehandelt), war im Vergleich dazu keine Fluoreszenz zu beobachten. Die Auswertung erfolgte nach Fixierung und Kernfärbung der Zellen mit DAPI (blau) am LSM (Zeiss).

3.11.5.3 Die HIV-1-Tat-GBP-1-Fusionspeptide besitzen keine inhibitorische Aktivität auf die Endothelzellproliferation

Anhand von Proliferationsversuchen mit HUVEC wurden die Peptide auf ihr wachstumsinhibierendes Potential untersucht. Dazu wurden HUVEC in EBM-0,5%FCS, in Anwesenheit von AWF (bFGF und VEGF, je 10 ng/ml) oder in EBM-

5%FCS mit 1 μ M Peptid-1, Peptid-3 oder Peptid-1 und Peptid-3 in Kombination (je 1 μ M) kultiviert (Abb. 34).

Die Behandlung mit angiogenen Wachstumsfaktoren oder EBM-5% FCS aktivierte die Proliferation von Endothelzellen unabhängig davon, ob HIV-1-Tat-GBP-1-Fusionspeptide anwesend waren oder nicht (Abb. 34). Weder beide Peptide allein, noch in Kombination hatten eine Hemmwirkung auf die Proliferation von HUVEC (Abb. 34).

Um zu testen, ob die Peptide durch Interaktion mit endogenem GBP-1 eine proliferationsinhibierende Aktivität entwickeln oder die Hemmwirkung von endogenem GBP-1 aufheben können, wurden die Endothelzellen mit inflammatorischen Zytokinen behandelt (Abb. 34). Die Stimulierung von HUVEC mit IFN- γ (100 U/ml) oder IL-1 β (200 U/ml) in Anwesenheit von AWF (bFGF und VEGF, je 10 ng/ml) führte zu einer Hemmung der Proliferation (Abb. 34). Die zusätzliche Gabe von Peptid-1, Peptid-3 oder beiden Peptiden in Kombination veränderte die antiproliferative Wirkung der inflammatorischen Zytokine nicht (Abb. 34).

Die Anwendung der HIV-1-Tat-GBP-1-Fusionspeptide führte zwar nicht zu einer Hemmung der Endothelzellproliferation, brachte jedoch wichtige Aussagen, die für weitere zellbiologische Untersuchungen von Nutzen sein können. So konnten mit der ausgewählten Aminosäuresequenz, der PTD von HIV-1-Tat (Tat₄₇₋₅₇), sehr effizient GBP-1-Peptide in HUVEC eingeschleust werden. Zudem wurde damit gezeigt, dass die Peptide für die Zellen nicht toxisch waren.

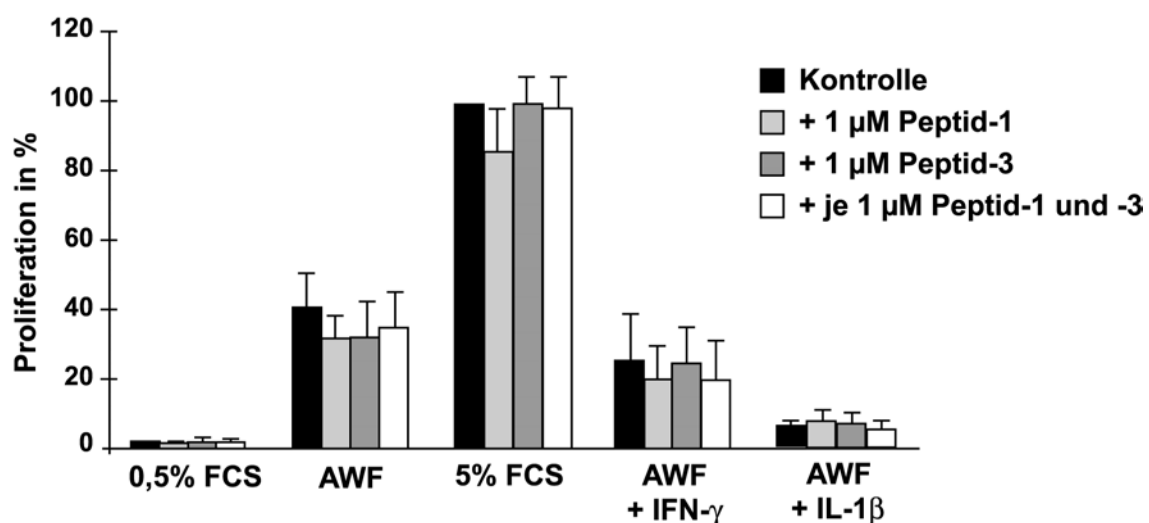


Abb. 34: Die synthetischen HIV-1-Tat-GBP-1-Fusionspeptide beeinflussen nicht das Proliferationsverhalten von HUVEC.

Wachstumsversuche mit HUVEC, die in 24-Multiwell-Platten ausgebracht wurden und entweder unbehandelt (Kontrolle, schwarz) oder in Anwesenheit von je 1 μ M Peptid-1 (hellgrau), Peptid-3

(dunkelgrau) oder je 1 μM beider Peptide in Kombination (weiß) für 6 Tage kultiviert wurden. Es wurden verschiedene Wachstumsbedingungen gewählt: 0,5% FCS (EBM-Leermedium), AWF (EBM-Leermedium mit je 10 ng/ml VEGF und bFGF), 5% FCS (EBM-Vollmedium), AWF + IFN- γ (AWF mit 100 U/ml IFN- γ) und AWF + IL-1 β (AWF mit 200 U/ml IL-1 β). Nach 3 Tagen wurde das Medium gewechselt und nach 6 Tagen die Zellzahl bestimmt. In drei unabhängigen Versuchen wurde jeder Ansatz in dreifacher Ausführung angefertigt. Davon wurde jeweils 10fach die Zellzahl bestimmt, Mittelwerte und Standardabweichungen gebildet und die Zellzahlen in Prozent zur Kontrolle (Kontrolle mit 5% FCS = 100%) angegeben.

3.11.5.4 Die verkürzten GBP-1-Proteine $\alpha 9^{1/2}$ -12, $\alpha 9^{1/2}$ -11 und $\alpha 10/11$ inhibierten nicht die Proliferation von Endothelzellen

Parallel zur Proliferationsuntersuchung mit HIV-1-Tat-GBP-1-Fusionspeptiden wurden für die weitere Eingrenzung des proliferationsinhibierenden Bereiches mittels retroviraler Vektoren, Teilfragmente des α -Helixbündels $\alpha 9^{1/2}$ -11 in HUVEC exprimiert und die Zellen auf ihre Proliferationsfähigkeit untersucht.

Hierbei wurden folgende Fragmente untersucht:

- $\alpha 9^{1/2}$ -12, welches das gesamte α -Helixbündel und 15 Aminosäuren der α -Helix 12 umfasst, um die Übergänge zwischen $\alpha 9$ und $\alpha 10$ sowie $\alpha 11$ und $\alpha 12$, die das „Schwanzende“ des Moleküls bilden, mitzuerfassen (Abb. 35A; $\alpha 9^{1/2}$ -12, Aminosäuren 403 - 518);
- $\alpha 9^{1/2}$ -11, das gesamte α -Helixbündel (Abb. 35A; $\alpha 9^{1/2}$ -11, Aminosäuren 403 - 478) und
- $\alpha 10/11$, das den Bereich der α -Helices 11 und 12 umfasst (Abb. 35A; $\alpha 10/11$, Aminosäuren 425 - 478)

Entsprechend wurden in den retroviralen Expressionsvektor pBabePuro cDNA-Moleküle kloniert, die für die helikalen Fragmente $\alpha 9^{1/2}$ -12, $\alpha 9^{1/2}$ -11 und $\alpha 10/11$ kodieren (Abb. 35A).

Zunächst wurde die Expression dieser verkürzten GBP-1-Fragmente in den retroviral transduzierten HUVEC untersucht. Die Expression des helikalen GBP-1-Fragments $\alpha 9^{1/2}$ -12 wurde auf RNA-Ebene (Abb. 29C) und Proteinebene (Abb. 30C) bereits nachgewiesen. Die Expression von $\alpha 9^{1/2}$ -11 und $\alpha 10/11$ konnte jedoch nicht im *Western blot* nachgewiesen werden (Ergebnis nicht gezeigt). Sehr wahrscheinlich tragen die relativ kurzen Fragmente von 75 ($\alpha 9^{1/2}$ -11) und 53 ($\alpha 10/11$) Aminosäuren kein entsprechendes Epitop, welches von den polyklonalen anti-GBP-1-Antikörpern erkannt werden könnte.

Nach Isolierung der zellulären RNA aus den transduzierten Zellen war jedoch der Nachweis der Expression der beiden Fragmente $\alpha^{9^{1/2}-11}$ und $\alpha^{10/11}$, auf RNA-Ebene durch RT-PCR möglich (Abb. 35B). In beiden Fällen konnten Amplifikationsprodukte mit den entsprechenden Größen ($\alpha^{9^{1/2}-11}$, 225 bp; $\alpha^{10/11}$, 160 bp) nachgewiesen werden (Abb. 35B). Dieses belegte, dass die entsprechenden cDNA-Fragmente in den transduzierten HUVEC exprimiert werden.

Die drei Fragmente der helikalen Domäne wurden in Proliferationsversuchen auf ihr wachstumsinhibierendes Potential in transduzierten HUVEC untersucht.

Weder die Expression von $\alpha^{9^{1/2}-12}$ noch von $\alpha^{9^{1/2}-11}$ oder $\alpha^{10/11}$ inhibierte jedoch die Proliferation der Endothelzellen (Abb. 35C). Somit konnte der proliferationshemmende Bereich nicht weiter reduziert werden und wird durch ein Fragment von 166 Aminosäuren mit den α -Helices 7-11 repräsentiert.

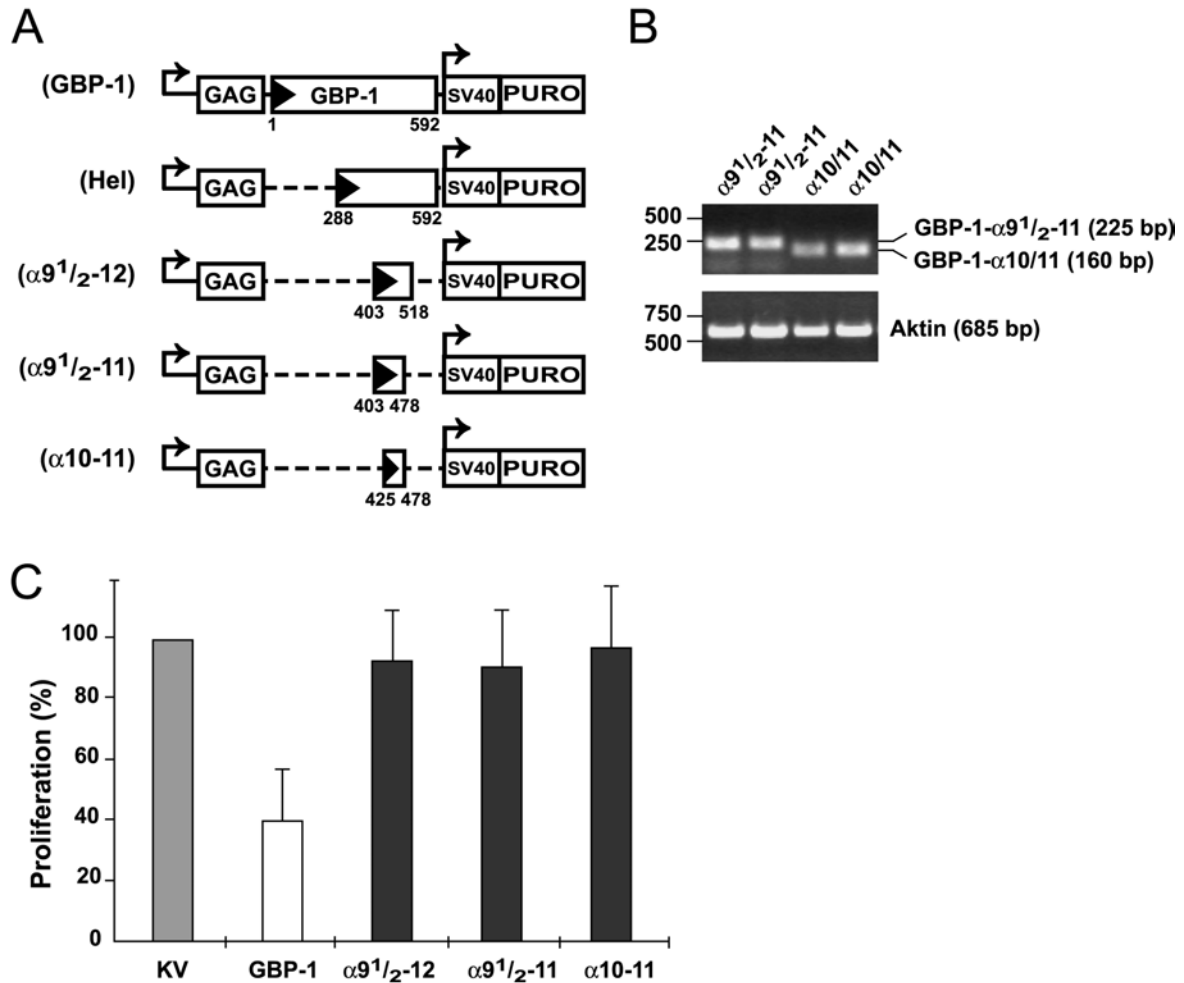


Abb. 35: Die helikalen Teilbereiche von GBP-1, $\alpha 9^{1/2-12}$, $\alpha 9^{1/2-11}$ und $\alpha 10/11$, inhibieren die Proliferation von Endothelzellen nicht.

(A) Schematische Darstellung retroviraler Expressionsvektoren, die für GBP-1, die helikale Domäne und Teilbereiche davon kodieren: die helikale Domäne (Hel); das α -Helixbündel aus den α -Helices 9^{1/2}, 10, 11 und 15 Aminosäuren der α -Helix 12 ($\alpha 9^{1/2-12}$); die α -Helices 9^{1/2-11} ($\alpha 9^{1/2-11}$) und die beiden α -Helices 10 und 11 ($\alpha 10/11$). Die angegebenen Zahlen stehen für die Positionen der terminalen Aminosäuren. (B) RT-PCR zum Nachweis der Expression von rekombinanter $\alpha 9^{1/2-11}$ - und $\alpha 10/11$ -mRNA in transduzierten HUVEC. Jeweils 100 ng Gesamt-RNA von HUVEC, transduziert mit $\alpha 9^{1/2-11}$ - oder $\alpha 10/11$ -exprimierenden Vektoren, wurden nach einer DNase I-Behandlung in cDNA umgeschrieben und mit spezifischen Primern amplifiziert. Die PCR amplifizierte ein 225 bp-Fragment spezifisch für $\alpha 9^{1/2-11}$ und ein 160 bp-Fragment, spezifisch für $\alpha 10/11$. Als Kontroll-RNA wurde Aktin-RNA amplifiziert. (C) HUVEC, die mit dem Kontrollvektor (KV) transduziert waren oder mit Vektoren, die für GBP-1 beziehungsweise die helikalen Teilbereiche $\alpha 9^{1/2-12}$, $\alpha 9^{1/2-11}$ und $\alpha 10/11$ kodieren, wurden zur Bestimmung der Proliferationsrate in 24-*Multiwell*-Platten ausgebracht. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in Anwesenheit von AWF (bFGF und VEGF, je 10 ng/ml). Nach 3 Tagen wurde das Medium gewechselt und nach 6 Tagen die Proliferation bestimmt. In drei unabhängigen Versuchen wurde jeder Ansatz in dreifacher Ausführung angefertigt. Davon wurde jeweils 10fach die Zellzahl bestimmt, Mittelwerte und Standardabweichungen gebildet und die Zellzahlen in Prozent zur Kontrolle (KV = 100%) angegeben.

In Abb. 36 sind zur Übersicht alle in dieser Arbeit verwendeten retroviralen Konstrukte schematisch dargestellt.

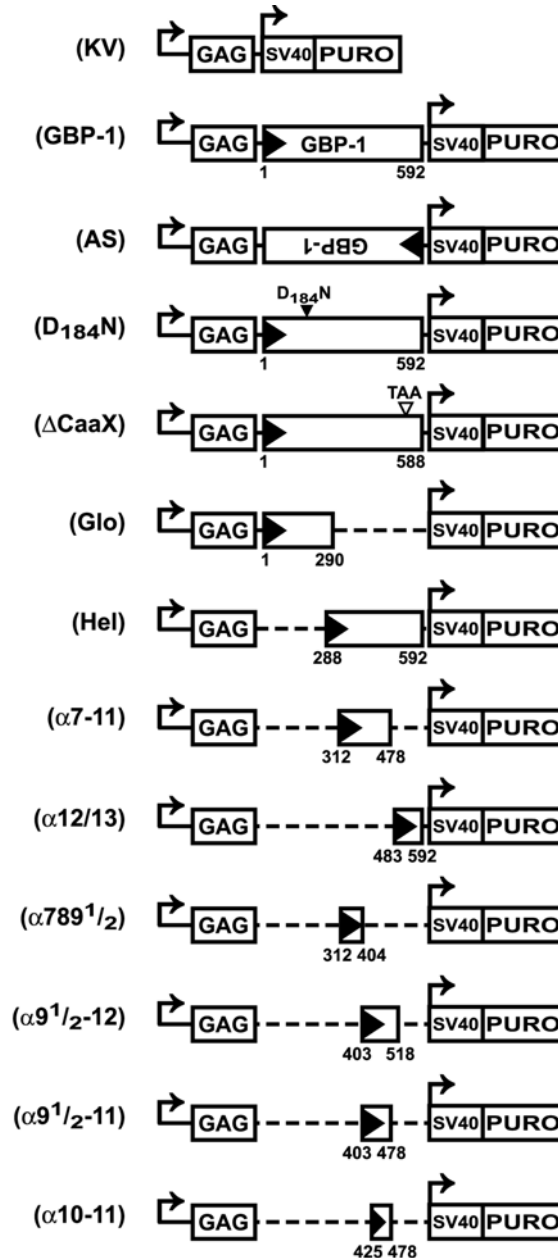


Abb. 36: Schematische Darstellung aller in dieser Arbeit verwendeten retroviralen Expressionsvektoren, die zur Untersuchung der proliferationsinhibierenden Wirkung von GBP-1 sowie verkürzter und mutierter GBP-1-Proteine in Endothelzellen eingesetzt wurden. Zur Transduktion von HUVEC wurden in dieser Arbeit folgende retrovirale Vektoren verwendet: der retrovirale Expressionsvektor pBabePuro (KV), der die GBP-1-cDNA (GBP-1) in *sense*- oder *antisense*-Orientierung (AS) trägt, sowie für verschiedene mutierte oder verkürzte GBP-1-Proteine kodiert: GTP-bindungsdefiziente Mutante (D₁₈₄N); die GBP-1-Mutante ohne Isoprenylierungsmotiv (ΔCaaX), die globuläre Domäne (Glo), die helikale Domäne (Hel) sowie die helikalen Teilbereiche: α-Helices 7-11 (α7-11), α-Helices 12 und 13 (α12/13), α-Helices 789^{1/2} (α789^{1/2}), α-Helices 9^{1/2}-12 (α9^{1/2}-12), α-Helices 9^{1/2}-11 (α9^{1/2}-11) und die α-Helices 10/11 (α10/11). Die angegebenen Zahlen stehen jeweils für die Positionen der terminalen Aminosäuren.

In Abb. 37 ist die Wirkung dieser Fragmente auf die Proliferation der transduzierten HUVEC dargestellt. Diese Übersicht verdeutlicht, dass die Proliferationshemmung durch den Bereich $\alpha 7-11$ der helikalen Domäne von GBP-1 vermittelt wird und dass dieses Fragment eine zum Gesamtmolekül vergleichbare Hemmwirkung aufweist (Abb. 37).

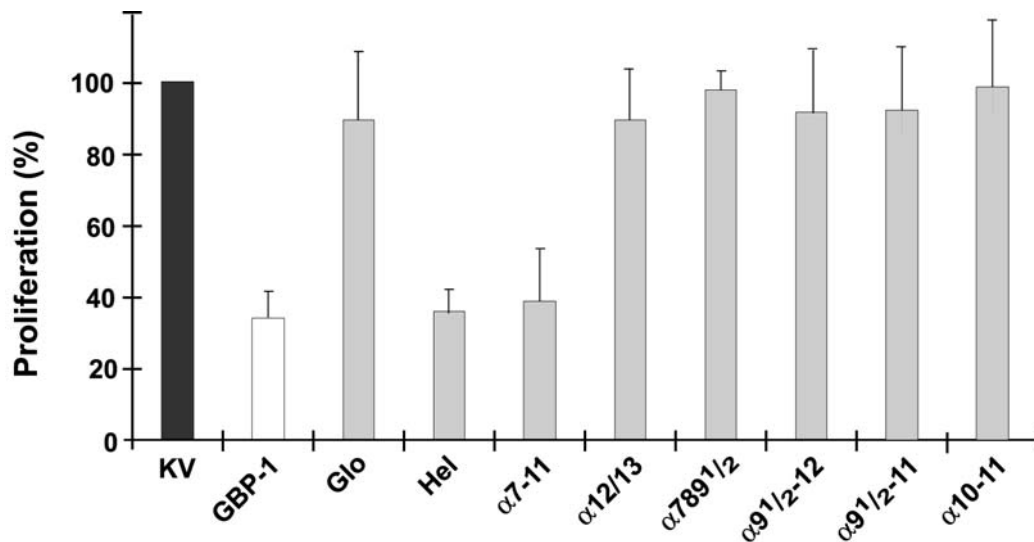


Abb. 37: Der proliferationsinhibierende Bereich von GBP-1 befindet sich in einem 166 Aminosäuren langen Teilbereich der helikalen Domäne.

Proliferation von HUVEC, die mit dem retroviralen Expressionsvektor pBabePuro (KV) beziehungsweise den entsprechenden für GBP-1 (GBP-1) sowie für die verkürzten GBP-1-Proteine: globuläre Domäne (Glo), helikale Domäne (Hel), $\alpha 7-11$, $\alpha 12/13$, $\alpha 789^{1/2}$, $\alpha 9^{1/2-12}$, $\alpha 9^{1/2-11}$ und $\alpha 10/11$, kodierenden Vektoren, transduziert worden waren. Die Zellen wurden in Anwesenheit von AWF (bFGF und VEGF, je 10 ng/ml) kultiviert und nach 6 Tagen wurde die Proliferation der Zellen anhand der Zellzahl ermittelt. Mediumwechsel erfolgte am dritten Tag. In der Abbildung ist die Proliferation in % zur Kontrolle (KV) dargestellt sowie die Ergebnisse aus den in Abb. 31 und 35 gezeigten Proliferationsexperimenten zusammengefasst.

3.11.6 Zwischenzusammenfassung: Struktur- und Funktionsanalyse von GBP-1

Durch die Struktur-/Funktionsanalyse von GBP-1 sollte untersucht werden, welches Motiv beziehungsweise welcher Bereich des Proteins für die Proliferationsinhibierung in Endothelzellen verantwortlich ist.

GBP-1 ist eine starke GTPase und gehört zur Familie der großen GTP-bindenden Proteine, wie Dynamin und Mx-Protein. Anhand seiner dreidimensionalen Struktur kann GBP-1 in zwei annähernd gleichgroße Domänen, eine kompakte globuläre α,β -Domäne am Aminoterminus und eine rein α -helikale Domäne am carboxyterminalen Ende des Proteins, unterteilt werden. Die GTPase-Aktivität von GBP-1 wird durch ein dreiteiliges GTP-Bindungsmotiv in der globulären α,β -Domäne vermittelt und kann durch einen Aminosäureaustausch von Aspartat zu Asparagin im dritten GTP-Bindungsmotiv inhibiert werden (Praefcke *et al.*, 1999). Am Carboxyterminus von GBP-1 befindet sich eine Isoprenylierungssequenz, CaaX, die das Protein zur Anhaftung an Membranen befähigt.

Mit Hilfe eines retroviralen Vektorsystems konnten nach Erzeugung verschiedener cDNA-Moleküle mutierte und verkürzte GBP-1-Proteine in primären Endothelzellen exprimiert werden. Anhand von Proliferationsuntersuchungen dieser Zellen konnte gezeigt werden, dass weder die Isoprenylierung noch die GTPase-Aktivität für die Hemmung der endothelialen Zellproliferation notwendig sind. Die minimale proliferationsinhibierende Domäne konnte auf einen Teilbereich von 166 Aminosäuren in der α -helikalen Domäne von GBP-1 eingegrenzt werden (Abb. 37).

Durch die Synthese von HIV-1-Tat-GBP-1-Fusionspeptiden konnte ein System etabliert werden, dass mit Hilfe der Proteintransduktionsdomäne (PTD) des HIV-1-Tat-Proteins die Aufnahme von GBP-1-Peptiden in die Zelle ermöglicht (Abb. 33). Dadurch gelang es, GBP-1-Peptide in Endothelzellen einzuschleusen und auf ihre proliferationsinhibierende Wirkung zu testen. Die beiden ausgewählten GBP-1-Peptide mit einer Gesamtlänge von 29 beziehungsweise 31 Aminosäuren, zeigten keine proliferationsinhibierende Aktivität in Endothelzellen (Abb. 35). Dieses System eröffnet jedoch gute Möglichkeiten, um schnell und effizient weitere GBP-1-Peptide auf ihre proliferationshemmende Wirkung zu untersuchen, sowie das gesamte GBP-1 beziehungsweise die minimale proliferationsinhibierende Domäne in Endothelzellen einzuschleusen und für antiangiogene Behandlungsformen von Tumorerkrankungen einzusetzen.

4. Diskussion

Das Gefäßsystem ist im Innern mit einer Schicht an Endothelzellen ausgekleidet, die eine selektive Barriere zwischen Blut und Gewebe bildet. Das Gefäßsystem erreicht alle Stellen des Körpers und ist sowohl an der Gewebe- und Organphysiologie beteiligt, als auch an verschiedenen pathophysiologischen Prozessen wie Inflammation und Angiogenese.

Auf der Suche nach einem Marker, der die Aktivierung von Endothelzellen durch inflammatorische Zytokine anzeigt, konnte mit Hilfe von DDRT-PCR ein Gen isoliert werden, dessen Expression spezifisch durch die inflammatorischen Zytokine, IL-1 β , TNF- α und IFN- γ , jedoch nicht durch die angiogenen Wachstumsfaktoren bFGF und VEGF induziert wird (Cornali, 1999; Guenzi *et al.*, 2001; Lubeseder-Martellato *et al.*, 2002). Dieses Gen kodiert für das humane Guanylatbindungsprotein-1 (GBP-1). GBP-1 gehört zur Familie der großen GTP-bindenden Proteine, wie Dynamin und Mx-Protein (Prakash *et al.*, 2000a). Diese großen GTPasen weisen einen ähnlichen Domänenaufbau auf und besitzen die Fähigkeit zur Oligomerisierung sowie eine konzentrationsabhängige GTPase-Aktivität (Prakash *et al.*, 2000a). Dynamin ist bei der Endozytose für die Kontrolle der Vesikelbildung verantwortlich (Sever *et al.*, 2000) und Mx-Proteine vermitteln die antivirale Wirkung von Typ 1 (α/β) Interferonen und spielen somit bei der Abwehr speziell positiv- und negativsträngiger RNA-Viren eine wichtige Rolle (Arnheiter *et al.*, 1990; Di Paolo *et al.*, 1999; Hefti *et al.*, 1999; Pavlovic *et al.*, 1995).

Bezüglich der Funktion von GBP-1 wurde 1999 durch Anderson und Mitarbeiter gezeigt, dass GBP-1 eine antivirale Wirkung gegen VSV und EMV in HeLa-Zellen aufweist (Anderson *et al.*, 1999). Unsere Arbeitsgruppe konnte durch Untersuchungen an primären Endothelzellen zeigen, dass GBP-1 die Proliferation von Endothelzellen inhibiert (Cornali, 1999; Guenzi *et al.*, 2001).

Um die antiproliferative Wirkung von GBP-1 genauer zu charakterisieren, waren detailliertere Analysen der Struktur- und Funktionsbeziehung erforderlich. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirkung von GBP-1 auf zelluläre Signalwege untersucht sowie anhand von Struktur-Funktionsanalysen der proliferationsinhibierende Bereich des Moleküls eingegrenzt.

4.1 GBP-1 vermittelt die antiproliferative Wirkung inflammatorischer Zytokine auf Endothelzellen

Da die Expression von GBP-1 spezifisch durch proliferationshemmende IZ, wie IL-1 β , TNF- α und IFN- γ induziert und durch proliferationsaktivierende AWF wie bFGF und VEGF gehemmt wird, lag es nahe, dass GBP-1 auch an der Steuerung eines IZ-aktivierten Phänotyps beteiligt sein könnte. Anhand der erzielten Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass GBP-1 spezifisch den antiproliferativen Effekt inflammatorischer Zytokine auf Endothelzellen vermittelt. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass die inflammatorischen Zytokine, IL-1 β , TNF- α und IFN- γ die AWF-aktivierte Proliferation von mikro- und makrovaskulären Endothelzellen inhibierten und die Expression von GBP-1 induzierten. Mit steigenden Konzentrationen an IZ nahm die Proliferation der Endothelzellen ab und die GBP-1-Expression zu.

Durch die Expression einer *antisense*-GBP-1 mRNA konnte die IL-1 β -induzierte endogene Expression von GBP-1 sehr effizient blockiert und damit einhergehend die Proliferationshemmung durch IL-1 β verhindert werden. Trotz steigender Konzentrationen an IL-1 β waren die HUVEC, die die *antisense*-GBP-1 mRNA exprimierten, in der Lage zu proliferieren. Das zeigt, dass GBP-1 notwendig ist, um die antiproliferative Wirkung inflammatorischer Zytokine zu vermitteln. Die konstitutive Expression von rekombinantem GBP-1 war ausreichend, um eine starke Hemmung der AWF-induzierten Proliferation zu erreichen.

Das GBP-1 notwendig ist, um die antiproliferative Wirkung von IZ zu vermitteln, konnte durch Untersuchungen an KS-Zellen erhärtet werden. KS-Zellen, die als Zellen endothelialer Herkunft betrachtet werden, zeigten bei der Behandlung mit IL-1 β eine Proliferationsaktivierung. Die Expression von GBP-1 konnte nicht durch IL-1 β induziert werden. Dadurch ließ sich vermuten, dass GBP-1 für die Proliferationshemmung durch inflammatorische Zytokine notwendig ist.

Die selektive Induktion von GBP-1 durch inflammatorische Zytokine legt nahe, dass GBP-1 ein molekularer *in vivo* - Marker für IZ-aktivierte nichtproliferierende Gefäße sein könnte. In der Tat konnte an Gewebeschnitten von Hauterkrankungen mit einer starken inflammatorischen Komponente wie allergischen Hautreaktionen, Psoriasis oder KS-Läsionen gezeigt werden, dass GBP-1 selektiv in nichtproliferierenden Gefäßendothelzellen exprimiert wurde (Guenzi *et al.*, 2001; Lubeseder-Martellato *et al.*, 2002). Diese Gefäße waren von zahlreichen infiltrierenden Monozyten und

Lymphozyten umgeben, von denen bekannt ist, dass sie IZ produzieren (Fiorelli *et al.*, 1998; Stürzl *et al.*, 1995). GBP-1 konnte nicht in proliferierenden Gefäßendothelzellen nachgewiesen werden, in denen angiogene Wachstumsfaktoren, die von den KS-Zellen sezerniert werden (Cornali *et al.*, 1996; Ensoli *et al.*, 1994; Xerri *et al.*, 1991), überwiegen (Guenzi *et al.*, 2001). GBP-1 charakterisiert somit sowohl *in vitro* als auch *in vivo* den IZ-induzierten nichtproliferierenden Phänotyp von Endothelzellen. Darüber hinaus steuert GBP-1 diesen Phänotyp über seine proliferationshemmende Wirkung.

4.2 Die Expression von GBP-1 in Endothelzellen führt nicht zu Apoptose und beeinträchtigt nicht die Aktivierung der MAPK-Signalwege oder des Transkriptionsfaktors NF- κ B

Um herauszufinden, welcher Mechanismus der GBP-1-induzierten Proliferationsinhibierung von Endothelzellen zugrunde liegt beziehungsweise welche Signalwege durch die Expression von GBP-1 an- oder abgeschaltet werden, wurde der Einfluss von konstitutiv exprimiertem GBP-1 auf die wichtigsten zellulären Signalwege untersucht.

Eine Inhibierung der endothelialen Zellproliferation durch die Expression von GBP-1 könnte entweder durch die Induktion von Apoptose oder aber durch einen Einfluss auf proliferationsaktivierende oder –deaktivierende Signalwege in der Zelle erfolgen. Anhand verschiedener Analysen zur Untersuchung der Apoptose konnte demonstriert werden, dass die Expression von GBP-1 in Endothelzellen keine Apoptose induzierte. Dies legt nahe, dass die GBP-1-induzierte Proliferationshemmung von Endothelzellen sehr wahrscheinlich reversibel ist.

Durch die Analyse intrazellulärer Signalwege, die durch AWF aktiviert werden können, wurde gezeigt, dass die Expression von GBP-1 keinen Einfluss auf die Aktivierung der MAPK ERK1/2, p38 oder SAPK/JNK hatte. Während die MAPK ERK1/2 vorwiegend durch Wachstumsfaktoren aktiviert wird (Lewis *et al.*, 1998), kann die Aktivierung der stressaktivierten Proteinkinasen JNK und p38 sowohl durch Wachstumsfaktoren als auch durch inflammatorische Zytokine erfolgen (Ip und Davis, 1998; Kyriakis und Avruch, 1996; Kyriakis und Avruch, 2001). In keinem Fall jedoch wurde die Aktivierung dieser drei Signalwege durch die Expression von GBP-1 beeinträchtigt.

Ein weiteres wichtiges Signalmolekül bei der Regulation der Zellproliferation und Apoptose ist der Transkriptionsfaktor NF- κ B, der ebenfalls sowohl durch inflammatorische Zytokine als auch durch Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmoleküle aktiviert werden kann (Mercurio *et al.*, 1997; Nomura, 2001). In vergleichenden Untersuchungen an GBP-1-exprimierenden und KV-transduzierten HUVEC konnte jedoch kein Unterschied in der NF- κ B-Aktivierung festgestellt werden. In unstimulierten Zellen lag bei beiden Zellpopulationen NF- κ B in seiner inaktiven Form, assoziiert mit seinem Inhibitorprotein I κ B im Zytoplasma vor. Nach Aktivierung translozierte NF- κ B in den Zellkern, unabhängig davon, ob die Zellen GBP-1 exprimierten oder nicht.

4.3 GBP-1 führt zu einer basalen Erhöhung der freien intrazellulären Kalziumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) in Endothelzellen sowie einem verminderten Anstieg von $[Ca^{2+}]_i$ nach Histaminstimulierung

In weiterführenden Untersuchungen zum Wirkmechanismus von GBP-1 konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Veränderung der Kalziumregulation in GBP-1-exprimierenden Endothelzellen festgestellt werden. Hierbei wurde durch die Färbung von GBP-1- und KV-transduzierten HUVEC mit einem kalziumsensitiven Fluoreszenzfarbstoff, die Kalziumregulation nach Stimulierung an lebenden Zellen untersucht.

GBP-1-exprimierende HUVEC wiesen dabei einerseits eine erhöhte basale Konzentration an freiem intrazellulären Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$) im Ruhezustand auf sowie andererseits einen verminderten Anstieg an $[Ca^{2+}]_i$ nach Stimulierung der Zellen mit Histamin. Histamin wurde zur Erzeugung von Ca^{2+} -Signalen eingesetzt, da die Stimulierung von Endothelzellen mit Histamin ebenso wie die Behandlung mit endothelialen Wachstumsfaktoren zu einer Aktivierung des IP₃-Signalweges und damit zu einer Kalziumfreisetzung führt (Brock und Capasso, 1988; Brock *et al.*, 1991; Sa *et al.*, 1995). Im Unterschied zu den Wachstumsfaktoren konnten mit Histamin reproduzierbare konstante Ca^{2+} -Signale in allen Zellen erreicht werden. Dies war eine wichtige Voraussetzung dafür, um die Kalziumregulation KV- und GBP-1-transduzierter Zellen vergleichen zu können.

Eine paradoxe Eigenschaft von Kalzium ist es, dass es sowohl das Überleben als auch den Tod der Zelle entscheidend reguliert (Berridge *et al.*, 1998). Eine erhöhte Kalziumkonzentration ist für die Aktivierung von Signalwegen notwendig, kann

jedoch, wenn sie andauernd auftritt, den Zelltod auslösen. Daher treten Kalziumsignale in der Zelle meist als kurze transiente Signale auf (Berridge *et al.*, 1998). Wenn über längere zeitliche Perioden Informationen weitergegeben werden müssen, nutzen die Zellen kurze, sich wiederholende Signale, sogenannte Kalzium-Oszillationen, die zum Beispiel ein wichtiges Wachstumssignal für viele Zellen darstellen (Berridge *et al.*, 1998). Änderungen in den Kalziumsignalen können zu dereguliertem Zellwachstum führen und sind Merkmal einiger Tumoren (Berridge *et al.*, 1998) wie zum Beispiel Prostata-Karzinome (Haverstick *et al.*, 2000), Nierentumoren, Tumoren der Bauchspeicheldrüse, Ovarialtumoren, Melanome und Lungentumoren (Kohn *et al.*, 1996). Umgekehrt dazu kann die Zellproliferation gehemmt sein, wenn die Bildung und Aktivität der Kalziumsignale beeinträchtigt ist (Berridge *et al.*, 1998).

Aus der veränderten Kalziumregulation in GBP-1-exprimierenden Zellen ergeben sich zunächst zwei Fragen: 1. Was sind die möglichen Ursachen der veränderten Kalziumregulation in GBP-1-exprimierenden Endothelzellen? und 2. Hat diese Änderung auch Auswirkungen auf nachfolgende kalziumabhängige Signalwege?

Bei der Ursache der veränderten Kalziumregulation könnten mehrere Faktoren eine Rolle spielen: a) Moleküle, die in die Signalkaskade involviert sind, die zur Ca^{2+} -Freisetzung führt, b) intrazelluläre Kalziumspeicher (ER und Mitochondrien), c) Rezeptoren und Kalziumkanäle und d) membranständige Kalziumpumpen.

Einer der Signalwege, der durch Wachstumsfaktoren aktiviert wird und zu Kalziumsignalen führt, beinhaltet die Hydrolyse von Inositollipiden (Berridge, 1995). In der Plasmamembran verankertes Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat (PIP_2) wird dabei zu Diacylglycerin (DAG) und Inositoltriphosphat (IP_3) gespalten. Das mit der Membran assoziierte DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC) und dadurch mitogene Signalwege (Abb. 38); (Berridge, 1995).

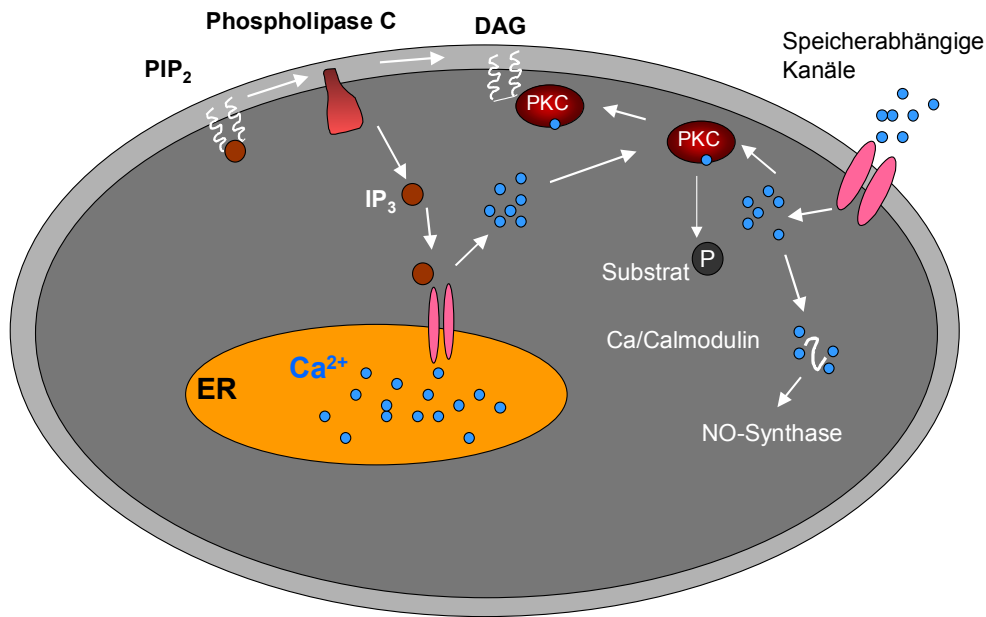


Abb. 38: Der Anstieg der freien intrazellulären Kalziumkonzentration über den IP₃-Signalweg. Nach Aktivierung von Tyrosinkinase-Rezeptoren oder G-Protein-gekoppelten Rezeptoren kommt es zur Aktivierung der Phospholipase C, die daraufhin PIP₂ zu IP₃ und Diacylglycerin (DAG) spaltet. Das IP₃ wandert durch das Zytosol zum ER, interagiert mit IP₃-sensitiven Kalziumkanälen in der ER-Membran und bedingt dadurch die Freisetzung von Ca²⁺ aus dem ER. Diese Freisetzung von Ca²⁺ aus den intrazellulären Speichern bewirkt den Einstrom von Ca²⁺ über speicherabhängige Kanäle in der Plasmamembran. Der Anstieg an cytosolischem Ca²⁺ führt zur Aktivierung der Proteinkinase C und über die Bildung von Ca/Calmodulin-Komplexen zur Aktivierung der endothelialen NO-Synthase.

Das ins Zytosol freigesetzte IP₃ wandert zum ER und führt zur Öffnung IP₃-sensitiver Kalziumkanäle, was zur Freisetzung von gespeichertem Kalzium ins Zytosol führt. Hohe zytosolische Kalziumkonzentrationen hemmen über einen Rückkopplungsmechanismus die IP₃-induzierte Kalziumfreisetzung aus den intrazellulären Speichern (Berridge, 1997). Dies erfolgt durch das Herabsetzen der Affinität des Rezeptors für IP₃, wodurch die Öffnung der Kalziumkanäle verhindert wird (Berridge, 1997).

Diese Tatsache könnte auch bei GBP-1-exprimierenden HUVEC von Bedeutung sein, da in diesen Zellen eine erhöhte [Ca²⁺]_i im Ruhezustand vorliegt und ein geringerer Anstieg der [Ca²⁺]_i nach Histaminstimulierung erfolgt. Die erhöhte basale [Ca²⁺]_i könnte die Ursache für eine verringerte Kalziumfreisetzung aus dem ER sein, indem über eine verminderte Affinität des IP₃-Rezeptors, die Öffnung der Kalziumkanäle behindert wird.

Intrazelluläre Kalziumspeicher haben eine begrenzte Speicherkapazität, verlängerte Kalziumsignale sind deshalb vom Ca²⁺-Einstrom aus dem extrazellulären Raum über

die Regulation speicherabhängiger Kalziumkanäle (SOC) abhängig (Berridge *et al.*, 2000). Die Kalziumfreisetzung nach Stimulierung ist immer transient, da Ca^{2+} -abhängige ATPasen in der Plasmamembran und in der ER-Membran Kalzium aktiv aus der Zelle heraus beziehungsweise ins ER-Lumen zurück pumpen (Berridge *et al.*, 2000; Bootman *et al.*, 2001a). Zusätzlich wird das IP_3 zu Inositol-1,4-bisphosphat hydrolysiert, welches nicht mehr die Kalziumfreisetzung aus dem ER oder dem Ca^{2+} -Einstrom aus dem extrazellulärem Raum zu stimulieren vermag. IP_3 reguliert die Kalziumfreisetzung aus dem ER und bei Entleerung dieser Speicher den Kalziumeinstrom aus dem extrazellulärem Raum. Da in GBP-1-exprimierenden Zellen transiente Kalziumsignale beobachtet wurden und keine wesentlichen Unterschiede im zeitlichen Ablauf dieser Signale zu nicht-GBP-1-exprimierenden Zellen auftraten, ist es unwahrscheinlich, dass die Funktion der ATPase-Pumpen durch GBP-1 gestört wird.

In GBP-1-exprimierenden Zellen könnte also durch die erhöhte basale $[\text{Ca}^{2+}]_i$ die Affinität der IP_3 -Rezeptoren vermindert sein und dadurch die Freisetzung von Kalzium aus dem ER verringert werden. Ebenso wäre denkbar, dass die Speicherkapazität in GBP-1-exprimierenden Zellen verringert ist und dadurch nicht so hohe Ca^{2+} -Signale erreicht werden können wie in KV-transduzierten Zellen.

Wie anhand der Ergebnisse gezeigt werden konnte, wird durch die Expression von GBP-1 die Proliferation von Endothelzellen gehemmt. Wie wichtig Kalzium bei der Zellteilung und Proliferation ist, wurde durch eine Reihe verschiedener Arbeiten demonstriert. Den ersten Hinweis, dass Kalzium eine wichtige Rolle im Zellzyklus spielt, gaben Studien, in denen eine Reduzierung des extrazellulären Kalziumgehaltes zu einer Inhibierung des Zellwachstums führte (Whitfield *et al.*, 1980). Bei transformierten Zellen trat im Vergleich zu normalen Zellen keine Wachstumsinhibierung auf, was darauf schließen ließ, dass kalziumsensitive Signalwege bei transformierten Zellen konstitutiv aktiviert sind (Berridge, 1995; Wojnowski *et al.*, 1994).

Zudem führen viele durch Wachstumsfaktoren aktivierte Signalwege zu einer Erhöhung des intrazellulären Kalziumgehaltes (Berridge, 1995). Die Kalziumsignale führen dabei zur Aktivierung von frühen Genen, die verantwortlich sind, um in der G₀-Phase ruhende Zellen wieder in den Zellzyklus zu bringen oder um die DNA-Synthese durch den Übergang von G₁/S einzuleiten (Berridge, 1995). Die Aktivierung von Kalziumsignalen über einen längeren Zeitraum ist für die

Stimulierung der Proliferation notwendig (Berridge *et al.*, 2000). Zum Beispiel wird die Proliferation von *chinese hamster ovary* (CHO)-Zellen stimuliert, wenn oszillatorische Kalziumsignale für mindestens zwei Stunden aufrechterhalten werden (Berridge *et al.*, 2000). Um diese länger andauernden Kalziumsignale tolerieren zu können, nutzen die Zellen Kalzium-Oszillationen (Berridge *et al.*, 1998).

Dass Kalzium eine wichtige Rolle in der Zellproliferation spielt, wird auch durch die steigende Zahl an Krebstherapeutika deutlich, die auf das Eingreifen in Kalziumsignalwege gerichtet sind (Berridge, 1995). Auch antiangiogene Substanzen, die in die Kalziumregulation eingreifen, sind für die Behandlung von Tumoren bereits in klinischen Studien. Darunter auch Carboxyamidotriazol (CAI), ein Inhibitor kalziumvermittelter Signaltransduktionswege, der durch Blockierung von Kalziumkanälen den rezeptorvermittelten Einstrom von Kalzium (Kohn *et al.*, 1994a) und die Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären Speichern (Faehling *et al.*, 2001) hemmt. CAI vermittelt seine antiangiogenen Eigenschaften *in vitro* und *in vivo* durch die Herunterregulierung der Matrix-Metalloproteinase-2 (Kohn *et al.*, 1994b).

Bei der Frage, ob die veränderte Kalziumregulation in GBP-1-exprimierenden Zellen auch Auswirkungen auf nachfolgende kalziumabhängige Signalwege hat, wäre der Einfluss der GBP-1-Expression auf kalziumabhängige Signalwege oder Signalmoleküle zu analysieren.

Durch die erhöhte basale $[Ca^{2+}]_i$ sowie dem verminderten Anstieg an $[Ca^{2+}]_i$ könnten in GBP-1-exprimierenden Endothelzellen Signalwege betroffen sein, für deren Aktivierung ein Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ erforderlich ist. In Endothelzellen führt die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ zur Aktivierung der endothelialen Stickstoffmonoxid (NO) - Synthase (eNOS) und damit zur Bildung von NO (Dedkova und Blatter, 2002). Somit könnte durch den verminderten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in GBP-1-exprimierenden Endothelzellen die Aktivierung der eNOS möglicherweise gehemmt und damit verbunden die Bildung von NO reduziert sein. Von NO ist bekannt, dass es proangiogen wirkt (Ziche und Morbidelli, 2000), die Proliferation von Endothelzellen stimuliert (Ziche *et al.*, 1993) und Endothelzellen vor Apoptose schützt (Tzeng *et al.*, 1997). In verschiedenen Zelltypen, einschließlich Glattmuskelzellen, Makrophagen, Keratinozyten und Tumorzellen konnte gezeigt werden, dass NO die Synthese des endothelialen Wachstumsfaktors VEGF induziert (Dulak und Jozkowicz, 2003). Endotheliales NO, das durch die eNOS produziert wird, ist ein klassischer relaxierender Faktor für Blutgefäße (Forstermann *et al.*, 1991). Die Bildung von NO

durch eNOS in Endothelzellen wird durch einen Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ induziert (Abb. 38). Freies intrazelluläres Ca^{2+} bindet an Calmodulin und der Ca^{2+} /Calmodulin-Komplex kann daraufhin mit eNOS interagieren und dieses Enzym aktivieren. Die Aktivierung der eNOS führt zur vermehrten Bildung von NO, welches von den Endothelzellen freigesetzt wird, auf die angrenzenden Glattmuskelzellen wirkt und so die Erweiterung der Blutgefäße induziert (Andrew und Mayer, 1999; Fleming und Busse, 1999).

Ein weiteres Molekül, dass durch den Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ aktiviert wird und entscheidend an der Proliferationsaktivierung beteiligt ist, ist die Proteinkinase C (Abb. 38). Bei der Aktivierung der Kalziumfreisetzung durch die Hydrolyse von Phosphoinositiden zu IP_3 und DAG, bewirkt IP_3 die Aktivierung IP_3 -abhängiger Rezeptoren am ER und damit verbunden die Öffnung von Kalziumkanälen. DAG dagegen bewirkt die Aktivierung der Proteinkinase C, eines der mitogenen Signalwege, die zu Proliferationsaktivierung führen (Nishizuka, 1992). Die PKC tritt in verschiedenen Isoformen auf, die unterschiedliche regulatorische und biochemische Eigenschaften aufweisen (Nishizuka, 1988; Nishizuka, 1989). So konnte gezeigt werden, dass die beiden PKC-Isoformen, die $[Ca^{2+}]_i$ -sensitive PKC- α und die atypische PKC- ζ für die VEGF-induzierte Proliferation von Endothelzellen benötigt werden (Wellner *et al.*, 1999). Die Behandlung von Endothelzellen mit VEGF führt zu einer konzentrations- und zeitabhängigen Steigerung der PKC-Aktivierung, wobei spezifisch die Ca^{2+} -sensitiven PKC-Isoformen, PKC- α und PKC- β II durch VEGF aktiviert werden (Xia *et al.*, 1996). Yoshiji H. et al. veröffentlichten, dass speziell die PKC-Isoform, PKC- β einer der Hauptregulatoren der VEGF-vermittelten Tumorentwicklung und Tumorangiogenese ist (Yoshiji *et al.*, 1999). Ob nun die veränderte Kalziumregulation in GBP-1-exprimierenden Endothelzellen auch mit einer Aktivierungsänderung kalziumabhängiger Signalmoleküle, wie der PKC oder eNOS einhergeht, bleibt allerdings offen. Eine Inhibierung der Zellproliferation durch die Aktivierungsänderung dieser Moleküle wäre jedenfalls denkbar und sollte in diesem Zusammenhang weiter untersucht werden.

4.4 Die proliferationshemmende Wirkung wird von einem 166 Aminosäurelangen Bereich der helikalen Domäne von GBP-1 vermittelt

Neben der Bestimmung möglicher Signalwege, die an der GBP-1-induzierten Hemmung der endothelialen Zellproliferation beteiligt sein könnten, war die Eingrenzung des proliferationshemmenden Bereichs von GBP-1 ein wichtiges Teilprojekt dieser Arbeit.

Dabei wurde zunächst untersucht, ob die Isoprenylierung von GBP-1 oder die GTPase-Aktivität für die Proliferationsinhibierung notwendig sind. Weiterhin wurde untersucht, ob die globuläre oder die helikale Domäne von GBP-1 die antiproliferative Wirkung vermittelt. Mit Hilfe eines retroviralen Expressionssystem wurden die GBP-1-Mutanten: D₁₈₄N-GBP-1, zur Inhibierung der GTPase-Aktivität; Δ CaaX-GBP-1, um die Isoprenylierung zu verhindern, sowie die beiden Domänen, globuläre (Glo) und helikale Domäne (Hel) in HUVEC exprimiert und die Zellen auf ihr Wachstumsverhalten untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass die GTPase-Aktivität oder Isoprenylierung des Proteins nicht für die proliferationshemmende Wirkung von GBP-1 notwendig sind, und dass die Inhibierung der Endothelzellproliferation spezifisch durch die helikale Domäne vermittelt wird.

Für die weitere Eingrenzung des proliferationsinhibierenden Bereiches wurde nach dem in Abb. 39A dargestellten Schema verfahren.

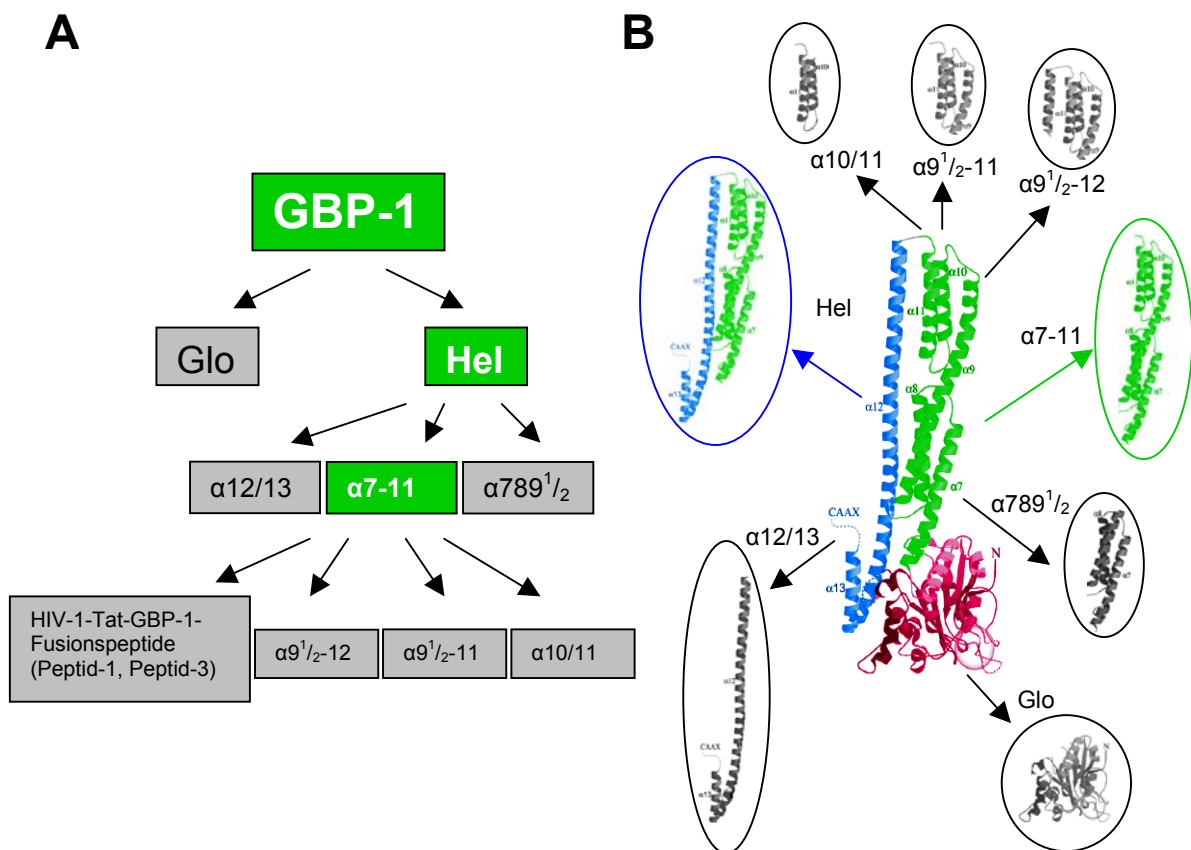


Abb. 39: Versuchsabfolge zur Eingrenzung des proliferationsinhibierenden Bereiches und dreidimensionale Darstellung der untersuchten helikalen Bereiche.

(A) Schematische Darstellung der Versuchsabfolge zur Eingrenzung des proliferationsinhibierenden Bereiches von GBP-1. Die GBP-1-Konstrukte mit inhibierender Wirkung auf die endotheliale Zellproliferation sind in grün dargestellt. (B) Darstellung der verschiedenen GBP-1-Konstrukte anhand ihrer drei-dimensionalen Struktur, die mittels retroviraler Vektoren in Endothelzellen exprimiert und auf ihre Wirkung auf die endotheliale Zellproliferation untersucht wurden. Dreidimensionale Struktur von GBP-1 und der erzeugten rekombinanten verkürzten GBP-1-Proteine, Glo, Hel, $\alpha 7-11$, $\alpha 789^{1/2}$, $\alpha 9^{1/2-12}$, $\alpha 9^{1/2-11}$, $\alpha 10/11$ und $\alpha 12/13$. Die GBP-1-Bereiche mit antiproliferativer Wirkung sind farbig dargestellt.

Nachdem gezeigt wurde, dass die helikale Domäne von GBP-1 die Proliferation von Endothelzellen inhibierte, wurde dieser Bereich in drei weitere Teile aufgegliedert. Der erste Bereich wird von den α -Helices 7-11 ($\alpha 7-11$) gebildet und umfasst zwei α -Helixbündel aus je drei α -Helices ($\alpha 789^{1/2}$ und $\alpha 9^{1/2-11}$), die sich an die globuläre Domäne anschließen (Abb. 39B; $\alpha 7-11$, grün).

Der zweite Bereich beinhaltet das an die globuläre Domäne angrenzende α -Helixbündel ($\alpha 789^{1/2}$) und der dritte Bereich umfasst den an $\alpha 11$ angrenzenden Abschnitt bis zum C-Terminus des Proteins. Dieser Bereich wird von den α -Helices 12 und 13, $\alpha 12/13$ (Abb. 39B, $\alpha 12/13$) gebildet und stellt einen relativ flexiblen Teil des Moleküls dar, der nur wenige Interaktionen mit den beiden α -Helixbündeln ($\alpha 789^{1/2}$ und $\alpha 9^{1/2-11}$) eingeht. Die Analyse dieser helikalen Teilbereiche bezüglich

der Proliferation ergab, dass nur der Bereich von $\alpha 7-11$ die Proliferation inhibierte. Dieser Bereich besteht aus zwei α -Helixbündeln, von denen das erste α -Helixbündel die Proliferation nicht inhibierte. Daraufhin wurde das zweite α -Helixbündel genauer untersucht.

Mit Hilfe des retroviralen Expressionssystems wurde das zweite α -Helixbündel, $\alpha 9^{1/2}-11$ (Abb. 39B, $\alpha 9^{1/2}-11$), das zweite α -Helixbündel sowie 15 Aminosäuren der α -Helix 12, $\alpha 9^{1/2}-12$ (Abb. 39B, $\alpha 9^{1/2}-12$) und die beiden α -Helices 10 und 11, $\alpha 10/11$ (Abb. 39B, $\alpha 10/11$) in HUVEC exprimiert und das Wachstumsverhalten dieser Zellen untersucht. Parallel dazu wurden zwei Peptide synthetisiert, Peptid-1 bestehend aus den Aminosäuren der α -Helix 10 und Peptid-3 aus den Verbindungsbereichen zwischen den α -Helices 9/10; 10/11 und 11/12. Peptid-2, welches aus den Aminosäuren der α -Helix 11 bestehen sollte, konnte nicht synthetisiert werden, da Konformationsänderungen auftraten. Für die zelluläre Aufnahme wurden die GBP-1-Peptide mit der Proteintransduktionsdomäne (PTD) von HIV-1-Tat (HIV-1-Tat₄₇₋₅₇) fusioniert. Die Proliferationsuntersuchungen der retroviral transduzierten sowie der peptidbehandelten HUVEC zeigten, dass auch das zweite α -Helixbündel ($\alpha 9^{1/2}-11$) keine proliferationsinhibierende Wirkung mehr aufwies.

Allerdings können Konformationsänderungen in diesen Fragmenten von GBP-1 nicht ausgeschlossen werden. Eine Änderung der Konformation könnte eine Inaktivierung der Funktion des Moleküls zur Folge haben.

Zusammenfassend konnte der proliferationsinhibierende Bereich von GBP-1 bis auf den helikalen Teilbereich, $\alpha 7-11$, der beide α -Helixbündel umfasst, eingegrenzt werden. Dieses GBP-1-Fragment, das von 166 Aminosäuren gebildet wird, wies annähernd die gleiche antiproliferative Aktivität wie das vollständige GBP-1-Protein auf.

Somit konnte in dieser Arbeit der proliferationsinhibierende Bereich von GBP-1 von 592 Aminosäuren des gesamten Proteins über 304 Aminosäuren der helikalen Domäne auf 166 Aminosäuren der α -Helices 7-11 eingegrenzt werden. Da weder der 75 Aminosäuren umfassende Bereich aus den α -Helices $9^{1/2}-11$ noch der 92 Aminosäuren umfassende Bereich der α -Helices $789^{1/2}$ zur Proliferationshemmung führte, kann gemutmaßt werden, dass die gesamten 166 Aminosäuren für die Hemmung der Zellproliferation notwendig sind.

Es ist jedoch noch zu überprüfen, ob vom C-terminalen und N-terminalen Ende von $\alpha 7-11$ noch Aminosäurereste entfernt werden können, ohne die

proliferationsinhibierende Funktion zu beeinflussen. Möglicherweise könnte dadurch der proliferationsinhibierende Bereich von GBP-1 noch weiter eingegrenzt werden.

4.5 Die Bedeutung von GBP-1 als proliferationsinhibierendes Molekül im Hinblick auf anti- und proangiogene Therapiemöglichkeiten vaskulärer Erkrankungen

Im Hinblick auf einen möglichen Einsatz von GBP-1 zur Behandlung vaskulärer Erkrankungen sowie von Tumorerkrankungen wären sowohl angiogenesefördernde als auch -inhibierende Therapiemöglichkeiten denkbar. GBP-1 könnte einerseits als antiangiogenes Molekül bei der Tumorbehandlung zur Verhinderung der Gefäßbildung eingesetzt werden, andererseits könnte die Hemmung von GBP-1 in Kombination mit einer dosierten Gabe an angiogenen Wachstumsfaktoren die kollaterale Gefäßbildung bei Ischämien unterstützen.

Mehrere Punkte sprechen dafür, dass GBP-1 ein sehr guter Hemmstoff der Tumorangiogenese sein könnte:

- a) GBP-1 hemmt die Proliferation von Endothelzellen, eines der wichtigsten Teilprozesse der Angiogenese,
- b) GBP-1 inhibiert die Proliferation von mikrovaskulären Kapillargefäß-Endothelzellen ebenso wie von makrovaskulären Gefäßendothelzellen. Das heisst, die Heterogenität von Endothelzellen, ein wichtiger Punkt bei der antiangiogenen Therapie, spielt somit eine untergeordnete Rolle.
- c) GBP-1 hemmt auch die Invasions- und Kapillarbildungsfähigkeit von Endothelzellen in Kollagen-1, indem es die Expression der Matrix-Metalloproteinase-1 (MMP-1) in Endothelzellen hemmt, wie wir in weiteren funktionellen Untersuchungen in unserem Labor zeigen konnten (Guenzi *et al.*, 2003).

In Geweben in denen hohe Konzentrationen inflammatorischer Zytokine vorliegen und in denen die Neubildung von Gefäßen, wie zum Beispiel bei Ischämien, angeregt werden soll, könnte die Hemmung der GBP-1-Wirkung die Neubildung von Blutgefäßen unterstützen.

Die therapeutische Angiogenese spielt insbesondere für die kardiovaskuläre Medizin eine große Rolle. Hierbei wäre die Neubildung von Gefäßen bei Gefäßverschlüssen sowie das Verhindern einer arteriellen Restenose wünschenswert (Ferrara und Alitalo, 1999). Durch *antisense*-GBP-1-Moleküle sind Endothelzellen auch unter

inflammatorischen Bedingungen in der Lage zu proliferieren. Dadurch kann auch im inflammatorischen Umfeld bei gleichzeitiger Applikation von angiogenen Wachstumsfaktoren die Gefäßbildung angeregt werden.

Verschiedene angiogene Moleküle wurden zur Bildung neuer kollateraler Gefäße in Myokard-Ischämien in zahlreichen Tierversuchen getestet, darunter bFGF, aFGF und verschiedene VEGF-Isoformen, wobei am intensivsten VEGF und bFGF studiert wurden (Ferrara und Alitalo, 1999). Diese wurden als rekombinante Proteine beziehungsweise mittels Gentransfer über adenovirale Vektoren appliziert (Ferrara und Alitalo, 1999). Die intra-arterielle Gabe von rekombinantem VEGF erhöhte die Durchblutung und die Bildung kollateraler Gefäße bei Ischämien im Tiermodell (Ferrara und Alitalo, 1999). Gleiche Ergebnisse wurden auch bei intramuskulärer oder intra-arterieller Gabe von aFGF, bFGF und VEGF-C erzielt (Asahara *et al.*, 1995; Ferrara und Alitalo, 1999; Witzenbichler *et al.*, 1998).

Weiter wurde gezeigt, dass die adenovirale VEGF-Expression nicht nur die Angiogenese stimulierte, sondern auch vor nachfolgendem Gefäßverschluß schützte (Mack *et al.*, 1998). Ausgehend von den positiven Ergebnissen der Tierversuche wurden mittlerweile klinische Studien initiiert, um die therapeutische Wirkung von VEGF, bFGF und aFGF zur Rekonstitution der Blutgefäßversorgung bei Ischämien zu überprüfen (Freedman und Isner, 2002). Das Verabreichen der angiogenen Wachstumsfaktoren mittels Gentherapie würde nicht nur unerwünschte Nebeneffekte, wie Hypotonie (VEGF) oder nephrotoxischer Wirkung (bFGF) minimieren, sondern auch eine längerfristige kontinuierliche Freisetzung der Faktoren über 1 - 2 Wochen ermöglichen (Ferrara und Alitalo, 1999). Dies könnte auch durch die Verpackung des Faktors in Mikrosphären erreicht werden, wobei hier das potentielle Risiko des viralen Gentransfers nicht bestünde (Ferrara und Alitalo, 1999). Allerdings sind die durch VEGF-induzierten neu gebildeten Gefäße zumeist durchlässiger und es ist derzeit noch offen, ob die abnormale Gefäßmorphologie nicht zu einer Verschlechterung der Mikrozirkulation führt (Carmeliet und Jain, 2000; Jain und Munn, 2000).

Da Ischämien vor allem in der frühen Phase mit inflammatorischen Prozessen assoziiert sind (Wilson *et al.*, 2003), könnte durch die Hemmung von GBP-1 mit *antisense*-GBP-1-Molekülen, die Aktivierung von Angiogenese über angiogene Wachstumsfaktoren nachhaltig unterstützt werden.

Für die Verabreichung der *antisense*-GBP-1-Moleküle könnten zum Beispiel virale Vektoren eingesetzt werden. Voraussetzung für eine therapeutische Wirkung von GBP-1 ist jedoch in diesem Fall immer die Aktivierung der Angiogenese durch angiogene Wachstumsfaktoren.

GBP-1 ist jedoch vor allem auch durch seine antiangiogenen Eigenschaften sehr interessant für antiangiogene Therapien. Die Angiogenese ist aufgrund ihrer wichtigen Rolle im Tumorwachstum, Invasion und Metastasierung zu einem sehr vielversprechenden Ziel bei der Entwicklung von Antikrebstherapien geworden (Berlin, 2002).

Durch die Erkenntnis, dass die Progression solider Tumoren von einer adäquaten Versorgung mit Blutgefäßen abhängt, deren Wachstum vom Tumor selbst induziert wird, wurde die Hoffnung erweckt, mittels antiangiogener Therapien den Tumor aushungern zu können. Mittlerweile befinden sich mehr als 40 Substanzen in verschiedenen Phasen der klinischen Prüfung (Augustin, 2003). Die anfänglichen hohen Erwartungshaltungen in antiangiogene Therapien, die durch zahlreiche Publikationen und zum Teil sehr erfolgreichen Ergebnissen vorklinischer Studien gemacht wurden, sind durch das Scheitern einiger fortgeschrittener klinischer Versuche mit Angiogeneseinhibitoren der Ernüchterung und Skepsis gewichen (Augustin, 2003). Das jüngste Beispiel dafür ist der Abbruch der klinischen Prüfung des neutralisierenden VEGF-Antikörpers bevacizumab (Avastin), der sich bei fortgeschrittenem Mammakarzinom bereits in Phase III Prüfung befand (Augustin, 2003). Bei Patienten mit metastasierendem Kolorektalkarzinom erreichte man allerdings durch die Therapie von Avastin kombiniert mit konventioneller Chemotherapie eine signifikante Verbesserung. Diese Studie ist die erste klinische Studie der Phase 3 die zeigt, dass ein antiangiogener Wirkstoff sehr wirksam bei der Tumorbehandlung sein kann. Bei einer Studie mit mehr als 800 Patienten, verlängerte sich die Lebensdauer der Patienten, die Avastin in Kombination mit einer Standardchemotherapie erhielten um ca. 5 Monate, im Vergleich zu den Patienten, die nur die Standardchemotherapie erhielten (McCarthy, 2003).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Heterogenität der Tumoren und des Endothels bei der antiangiogenen Tumorthherapie ein sehr große Rolle spielt. Diejenigen Wirkstoffe, die bei der Behandlung einer bestimmten Tumorart eine Verbesserung erzielen, können bei einer anderen Tumorart versagen. Mittlerweile hat man erkannt,

dass dabei die Komplexität der angiogenen Kaskade bei der Identifizierung wirksamer therapeutischer Ziele entscheidend ist (Augustin, 2003).

Die Manipulation der Angiogenese hat einige besondere Eigenschaften, die therapeutisch von großem Vorteil sind:

1. Angiogenese ist im adulten Organismus ein herunterregulierter Vorgang, bei einer antiangiogenen Therapie wird daher speziell die Neoangiogenese angegriffen und auch bei längerer Therapie sollte es dadurch nicht zu unerwünschten Nebenwirkungen kommen.
2. insbesondere bei der Therapie von Tumoren gilt, dass die Antiangiogenese nicht in dem Maße Resistenzmechanismen unterliegt wie dies bei antitumoralen Medikamenten der Fall ist.
3. das Gefäßbett ist direkt zugänglich, antiangiogene Substanzen können also direkt im Gefäßbett wirken, im Gegensatz zu Substanzen, die ihren Wirkort außerhalb des Gefäßbettes haben. Dadurch können therapeutische Konzentrationen sehr effektiv erreicht werden (Augustin, 2003).

Durch GBP-1 haben wir ein sehr interessantes antiangiogenes Molekül entdeckt, dass nicht nur die Proliferation von Endothelzellen, sondern auch die Invasion und Kapillarbildungsfähigkeit inhibiert (Guenzi *et al.*, 2001). GBP-1 könnte also sowohl in Tumoren mit verstärkt proliferierenden Endothelzellen als auch in Tumoren, die mit verstärkter Invasion assoziiert sind, wirken. Weitere wichtige Vorteile sind, dass die Expression von GBP-1 sehr stark mit vaskulären Endothelzellen assoziiert ist und dass GBP-1 ein körpereigenes Molekül ist (Lubeseder-Martellato *et al.*, 2002). Dadurch würde sich das Risiko von Abwehrreaktionen bei einer antiangiogenen Therapie mit GBP-1 minimieren. Da Entzündungsreaktionen auch mit Angiogenese einhergehen, könnte es sein, dass GBP-1, aufreguliert durch inflammatorische Zytokine, für die Termination der Angiogenese verantwortlich ist. Durch die Inhibierung der Proliferation, der Invasion und Kapillarbildungsfähigkeit von Endothelzellen könnte damit der Übergang in den physiologischen Zustand des Endothels wiederhergestellt werden (Guenzi *et al.*, 2003; Lubeseder-Martellato *et al.*, 2002). Zudem konnten wir zeigen, dass GBP-1 sowohl auf mikrovaskuläre als auch auf makrovaskuläre Endothelzellen wirkt.

Ein wichtiger Aspekt für die antiangiogene Nutzung von GBP-1 ist jedoch die intrazelluläre Verfügbarkeit in Endothelzellen. Dies könnte ebenfalls durch viralen Gentransfer in Endothelzellen erreicht werden. Daneben wurde im Rahmen dieser

Arbeit ein wichtiger Ansatz erprobt, mit dem möglicherweise gereinigtes Protein verabreicht werden kann.

Im allgemeinen ist die Plasmamembran eukaryontischer Zellen für die meisten Proteine und Peptide undurchlässig. Bestimmte Proteine enthalten jedoch *protein transduction domains* (PTDs), die sie befähigen, durch die Plasmamembran in die Zelle einzudringen. PTDs könnten genutzt werden, um GBP-1 in Zellen einzuschleusen. Im speziellen Fall des *nuclear transcription activator protein* (Tat), kodiert von HIV Typ 1 (HIV-1), wird die Aufnahme in die Zelle von einer kurzen basischen Peptidsequenz, Tat₄₇₋₅₇, die die basische Domäne von HIV-1-Tat enthält, vermittelt (Becker-Hapak *et al.*, 2001; Ho *et al.*, 2001; Schwarze und Dowdy, 2000; Wadia und Dowdy, 2002). Durch kovalente Bindung an die PTD von HIV-1-Tat beziehungsweise das gesamte HIV-1-Tat, wurden bereits mehrere Proteine, darunter ein Inhibitor des humanen Papillomavirus Typ 16 (HPV-16) (Pepinsky *et al.*, 1994), die CDK-Inhibitoren p27Kip1 (Nagahara *et al.*, 1998) und p16INK4a (Gius *et al.*, 1999) oder Caspase-3 (Vocero-Akbani *et al.*, 1999) erfolgreich in Zellen eingeschleust. Außer HIV-1-Tat gibt es noch weitere Proteine mit PTDs, darunter Antennapedia (Antp) von *Drosophila* (Derossi *et al.*, 1998; Lindgren *et al.*, 2000), VP22, ein Strukturprotein vom Herpes Simplex Virus (HSV); (Elliott und O'Hare, 1998), das Translokationsmotiv PreS2-TLM des Hepatitis-B-Virus (Oess und Hildt, 2000) oder der Kaposi-Fibroblastenwachstumsfaktor (Lin *et al.*, 1995).

In dieser Arbeit wurden bereits Fusionspeptide, bestehend aus der PTD des HIV-1-Tat-proteins und Aminosäuresequenzen der helikalen Domäne eingesetzt. Hierbei konnte bereits sehr erfolgreich demonstriert werden, dass die Peptide höchst effizient von Endothelzellen aufgenommen werden. Das heißt, die ausgewählte Aminosäuresequenz von HIV-1-Tat ist für das Einbringen von Peptiden durch das effektive und schnelle Einschleusen in Zellen gut geeignet. Die zur Untersuchung ihres proliferationsinhibierenden Potentials ausgewählten GBP-1-Sequenzen zeigten keine inhibitorische Wirkung auf die Endothelzellproliferation, was nachfolgend durch Expression der entsprechenden Bereiche mittels retroviraler Vektoren auch bestätigt wurde. Auf jeden Fall zeigten diese Experimente, dass die Peptide nicht toxisch auf die Endothelzellen wirkten und selbst keine proliferationsinhibierenden oder –aktivierenden Eigenschaften aufwiesen. Demzufolge könnte diese Methode eine Grundlage bieten, um GBP-1 im Rahmen antiangiogener Therapieansätze in Endothelzellen einzuschleusen.

Durch seine besonderen Eigenschaften bietet GBP-1 gute Perspektiven sowohl für anti- als auch proangiogene Ansätze zur Behandlung von Ischämien und Tumorerkrankungen.

5. Literatur

Abedi, H., and Zachary, I. (1997). Vascular endothelial growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesions of focal adhesion kinase and paxillin in endothelial cells. *J Biol Chem* 272, 15442-15451.

Adler, V., Polotskaya, A., Wagner, F., and Kraft, A. S. (1992). Affinity-purified c-Jun amino-terminal protein kinase requires serine/threonine phosphorylation for activity. *J Biol Chem* 267, 17001-17005.

Ahmed, C. M., Burkhart, M. A., Mujtaba, M. G., Subramaniam, P. S., and Johnson, H. M. (2003). The role of IFN γ nuclear localization sequence in intracellular function. *J Cell Sci* 116, 3089-3098.

Alessi, D. R., Saito, Y., Campbell, D. G., Cohen, P., Sithanandam, G., Rapp, U., Ashworth, A., Marshall, C. J., and Cowley, S. (1994). Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. *Embo J* 13, 1610-1619.

Anders, S. (1993). Die Wirkung von Interferon auf kultivierte Kaposi-Sarkom-Zellen. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften.

Anderson, S. L., Carton, J. M., Lou, J., Xing, L., and Rubin, B. Y. (1999). Interferon-induced guanylate binding protein-1 (GBP-1) mediates an antiviral effect against vesicular stomatitis virus and encephalomyocarditis virus. *Virology* 256, 8-14.

Andrew, P. J., and Mayer, B. (1999). Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res* 43, 521-531.

Arnaud, E., Touriol, C., Boutonnet, C., Gensac, M. C., Vagner, S., Prats, H., and Prats, A. C. (1999). A new 34-kilodalton isoform of human fibroblast growth factor 2 is cap dependently synthesized by using a non-AUG start codon and behaves as a survival factor. *Mol Cell Biol* 19, 505-514.

Arnheiter, H., Skuntz, S., Noteborn, M., Chang, S., and Meier, E. (1990). Transgenic mice with intracellular immunity to influenza virus. *Cell* 62, 51-61.

Asahara, T., Bauters, C., Zheng, L. P., Takeshita, S., Bunting, S., Ferrara, N., Symes, J. F., and Isner, J. M. (1995). Synergistic effect of vascular endothelial

growth factor and basic fibroblast growth factor on angiogenesis in vivo. *Circulation* 92, 11365-371.

Asahara, T., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka, C., Pastore, C., Silver, M., Kearne, M., Magner, M., and Isner, J. M. (1999). Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 85, 221-228.

Augustin, H. G. (2003). [Angiogenesis research--quo vadis?]. *Ophthalmologe* 100, 104-110.

Ausprunk, D. H., and Folkman, J. (1977). Migration and proliferation of endothelial cells in preformed and newly formed blood vessels during tumor angiogenesis. *Microvasc Res* 14, 53-65.

Badger, A. M., Cook, M. N., Lark, M. W., Newman-Tarr, T. M., Swift, B. A., Nelson, A. H., Barone, F. C., and Kumar, S. (1998). SB 203580 inhibits p38 mitogen-activated protein kinase, nitric oxide production, and inducible nitric oxide synthase in bovine cartilage-derived chondrocytes. *J Immunol* 161, 467-473.

Basilico, C., and Moscatelli, D. (1992). The FGF family of growth factors and oncogenes. *Adv Cancer Res* 59, 115-165.

Becker-Hapak, M., McAllister, S. S., and Dowdy, S. F. (2001). TAT-mediated protein transduction into mammalian cells. *Methods* 24, 247-256.

Berlin, J. D. (2002). Targeting vascular endothelial growth factor in colorectal cancer. *Oncology (Huntingt)* 16, 13-15.

Berra, E., Milanini, J., Richard, D. E., Le Gall, M., Vinals, F., Gothie, E., Roux, D., Pages, G., and Pouyssegur, J. (2000). Signaling angiogenesis via p42/p44 MAP kinase and hypoxia. *Biochem Pharmacol* 60, 1171-1178.

Berridge, M. J. (1993). Cell signalling. A tale of two messengers. *Nature* 365, 388-389.

Berridge, M. J. (1995). Calcium signalling and cell proliferation. *Bioessays* 17, 491-500.

Berridge, M. J. (1997). Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Exp Biol* 200 (Pt 2), 315-319.

Berridge, M. J. (2001). The versatility and complexity of calcium signalling. *Novartis Found Symp* 239, 52-64; discussion 64-57, 150-159.

Berridge, M. J., Bootman, M. D., and Lipp, P. (1998). Calcium--a life and death signal. *Nature* 395, 645-648.

Berridge, M. J., Bootman, M. D., and Roderick, H. L. (2003). Calcium: Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 517-529.

Berridge, M. J., Lipp, P., and Bootman, M. D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1, 11-21.

Betsholtz, C., Johnsson, A., Heldin, C. H., Westermark, B., Lind, P., Urdea, M. S., Eddy, R., Shows, T. B., Philpott, K., Mellor, A. L., and et al. (1986). cDNA sequence and chromosomal localization of human platelet-derived growth factor A-chain and its expression in tumour cell lines. *Nature* 320, 695-699.

Bikfalvi, A., Klein, S., Pintucci, G., and Rifkin, D. B. (1997). Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocr Rev* 18, 26-45.

Bonvin, C., Guillon, A., van Bemmelen, M. X., Gerwins, P., Johnson, G. L., and Widmann, C. (2002). Role of the amino-terminal domains of MEKKs in the activation of NF kappa B and MAPK pathways and in the regulation of cell proliferation and apoptosis. *Cell Signal* 14, 123-131.

Bootman, M. D., Berridge, M. J., and Roderick, H. L. (2002). Calcium signalling: more messengers, more channels, more complexity. *Curr Biol* 12, R563-565.

Bootman, M. D., Collins, T. J., Peppiatt, C. M., Prothero, L. S., MacKenzie, L., De Smet, P., Travers, M., Tovey, S. C., Seo, J. T., Berridge, M. J., Ciccolini, F., and Lipp, P. (2001a). Calcium signalling--an overview. *Semin Cell Dev Biol* 12, 3-10.

Bootman, M. D., Lipp, P., and Berridge, M. J. (2001b). The organisation and functions of local Ca(2+) signals. *J Cell Sci* 114, 2213-2222.

Bouck, N. (1990). Tumor angiogenesis: the role of oncogenes and tumor suppressor genes. *Cancer Cells* 2, 179-185.

Brock, T. A., and Capasso, E. A. (1988). Thrombin and histamine activate phospholipase C in human endothelial cells via a phorbol ester-sensitive pathway. *J Cell Physiol* 136, 54-62.

Brock, T. A., Dvorak, H. F., and Senger, D. R. (1991). Tumor-secreted vascular permeability factor increases cytosolic Ca²⁺ and von Willebrand factor release in human endothelial cells. *Am J Pathol* 138, 213-221.

Brooks, P. C., Clark, R. A., and Cheresh, D. A. (1994). Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science* 264, 569-571.

Bussolino, F., Mantovani, A., and Persico, G. (1997). Molecular mechanisms of blood vessel formation. *Trends Biochem Sci* 22, 251-256.

Cano, E., and Mahadevan, L. C. (1995). Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *Trends Biochem Sci* 20, 117-122.

Cao, Y. (2001). Endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic implications. *Int J Biochem Cell Biol* 33, 357-369.

Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6, 389-395.

Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoeck, A., Harpal, K., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Risau, W., and Nagy, A. (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380, 435-439.

Carmeliet, P., and Jain, R. K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407, 249-257.

Carmeliet, P., Ng, Y. S., Nuyens, D., Theilmeier, G., Brusselmans, K., Cornelissen, I., Ehler, E., Kakkar, V. V., Stalmans, I., Mattot, V., Perriard, J. C., Dewerchin, M., Flameng, W., Nagy, A., Lupu, F., Moons, L., Collen, D., D'Amore, P. A., and Shima, D. T. (1999). Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in

mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Nat Med* 5, 495-502.

Cheng, Y. S., Colonna, R. J., and Yin, F. H. (1983). Interferon induction of fibroblast proteins with guanylate binding activity. *J Biol Chem* 258, 7746-7750.

Cheng, Y. S., Patterson, C. E., and Staeheli, P. (1991). Interferon-induced guanylate-binding proteins lack an N(T)KXD consensus motif and bind GMP in addition to GDP and GTP. *Mol Cell Biol* 11, 4717-4725.

Cobb, M. H. (1999). MAP kinase pathways. *Prog Biophys Mol Biol* 71, 479-500.

Cobb, M. H., and Goldsmith, E. J. (1995). How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem* 270, 14843-14846.

Coffin, J. D., Florkiewicz, R. Z., Neumann, J., Mort-Hopkins, T., Dorn, G. W., 2nd, Lightfoot, P., German, R., Howles, P. N., Kier, A., O'Toole, B. A., and et al. (1995). Abnormal bone growth and selective translational regulation in basic fibroblast growth factor (FGF-2) transgenic mice. *Mol Biol Cell* 6, 1861-1873.

Colotta, F., Dower, S. K., Sims, J. E., and Mantovani, A. (1994). The type II 'decoy' receptor: a novel regulatory pathway for interleukin 1. *Immunol Today* 15, 562-566.

Colotta, F., Re, F., Muzio, M., Bertini, R., Polentarutti, N., Sironi, M., Giri, J. G., Dower, S. K., Sims, J. E., and Mantovani, A. (1993). Interleukin-1 type II receptor: a decoy target for IL-1 that is regulated by IL-4. *Science* 261, 472-475.

Connolly, D. T., Heuvelman, D. M., Nelson, R., Olander, J. V., Eppley, B. L., Delfino, J. J., Siegel, N. R., Leimgruber, R. M., and Feder, J. (1989). Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest* 84, 1470-1478.

Cordon-Cardo, C., Vlodavsky, I., Haimovitz-Friedman, A., Hicklin, D., and Fuks, Z. (1990). Expression of basic fibroblast growth factor in normal human tissues. *Lab Invest* 63, 832-840.

Cornali, E. (1999). Molecular characterization of differential endothelial cell activation through the study of AIDS-associated vasculopathy, with a special insight into the

pathogenesis of Kaposi's Sarcoma. Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften.

Cornali, E., Zietz, C., Benelli, R., Weninger, W., Masiello, L., Breier, G., Tschachler, E., Albini, A., and Sturzl, M. (1996). Vascular endothelial growth factor regulates angiogenesis and vascular permeability in Kaposi's sarcoma. *Am J Pathol* 149, 1851-1869.

Cotran, R. S., and Pober, J. S. (1990). Cytokine-endothelial interactions in inflammation, immunity, and vascular injury. *J Am Soc Nephrol* 1, 225-235.

Cozzolino, F., Torcia, M., Aldinucci, D., Ziche, M., Almerigogna, F., Bani, D., and Stern, D. M. (1990). Interleukin 1 is an autocrine regulator of human endothelial cell growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 6487-6491.

Cuenda, A. (2000). Mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4). *Int J Biochem Cell Biol* 32, 581-587.

Da Silva, J., Pierrat, B., Mary, J. L., and Lesslauer, W. (1997). Blockade of p38 mitogen-activated protein kinase pathway inhibits inducible nitric-oxide synthase expression in mouse astrocytes. *J Biol Chem* 272, 28373-28380.

Davis, R. J. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 103, 239-252.

Dedkova, E. N., and Blatter, L. A. (2002). Nitric oxide inhibits capacitative Ca²⁺ entry and enhances endoplasmic reticulum Ca²⁺ uptake in bovine vascular endothelial cells. *J Physiol* 539, 77-91.

Denk, A., Goebeler, M., Schmid, S., Berberich, I., Ritz, O., Lindemann, D., Ludwig, S., and Wirth, T. (2001). Activation of NF-kappa B via the Ikappa B kinase complex is both essential and sufficient for proinflammatory gene expression in primary endothelial cells. *J Biol Chem* 276, 28451-28458.

Derijard, B., Hibi, M., Wu, I. H., Barrett, T., Su, B., Deng, T., Karin, M., and Davis, R. J. (1994). JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 76, 1025-1037.

Derossi, D., Chassaing, G., and Prochiantz, A. (1998). Trojan peptides: the penetratin system for intracellular delivery. *Trends Cell Biol* 8, 84-87.

Di Paolo, C., Hefti, H. P., Meli, M., Landis, H., and Pavlovic, J. (1999). Intramolecular backfolding of the carboxyl-terminal end of MxA protein is a prerequisite for its oligomerization. *J Biol Chem* 274, 32071-32078.

Dinarello, C. A. (1996). Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 87, 2095-2147.

Doanes, A. M., Hegland, D. D., Sethi, R., Kovesdi, I., Bruder, J. T., and Finkel, T. (1999). VEGF stimulates MAPK through a pathway that is unique for receptor tyrosine kinases. *Biochem Biophys Res Commun* 255, 545-548.

Doukas, J., and Pober, J. S. (1990). IFN-gamma enhances endothelial activation induced by tumor necrosis factor but not IL-1. *J Immunol* 145, 1727-1733.

Dow, J. K., and deVere White, R. W. (2000). Fibroblast growth factor 2: its structure and property, paracrine function, tumor angiogenesis, and prostate-related mitogenic and oncogenic functions. *Urology* 55, 800-806.

Dulak, J., and Jozkowicz, A. (2003). Regulation of vascular endothelial growth factor synthesis by nitric oxide: facts and controversies. *Antioxid Redox Signal* 5, 123-132.

Earnshaw, W. C. (1995). Nuclear changes in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 7, 337-343.

Earnshaw, W. C., Martins, L. M., and Kaufmann, S. H. (1999). Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 68, 383-424.

Elliott, G., and O'Hare, P. (1998). Herpes simplex virus type 1 tegument protein VP22 induces the stabilization and hyperacetylation of microtubules. *J Virol* 72, 6448-6455.

Enenstein, J., Waleh, N. S., and Kramer, R. H. (1992). Basic FGF and TGF-beta differentially modulate integrin expression of human microvascular endothelial cells. *Exp Cell Res* 203, 499-503.

English, J., Pearson, G., Wilsbacher, J., Swantek, J., Karandikar, M., Xu, S., and Cobb, M. H. (1999). New insights into the control of MAP kinase pathways. *Exp Cell Res* 253, 255-270.

Ensoli, B., Gendelman, R., Markham, P., Fiorelli, V., Colombini, S., Raffeld, M., Cafaro, A., Chang, H. K., Brady, J. N., and Gallo, R. C. (1994). Synergy between basic fibroblast growth factor and HIV-1 Tat protein in induction of Kaposi's sarcoma. *Nature* 371, 674-680.

Ensoli, B., and Stürzl, M. (1998). Kaposi's sarcoma: a result of the interplay among inflammatory cytokines, angiogenic factors and viral agents. *Cytokine Growth Factor Rev* 9, 63-83.

Esch, F., Baird, A., Ling, N., Ueno, N., Hill, F., Denoroy, L., Klepper, R., Gospodarowicz, D., Bohlen, P., and Guillemin, R. (1985). Primary structure of bovine pituitary basic fibroblast growth factor (FGF) and comparison with the amino-terminal sequence of bovine brain acidic FGF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 6507-6511.

Faehling, M., Koch, E. D., Raithel, J., Trischler, G., and Waltenberger, J. (2001). Vascular endothelial growth factor-A activates Ca²⁺-activated K⁺ channels in human endothelial cells in culture. *Int J Biochem Cell Biol* 33, 337-346.

Feder, L. S., and Laskin, D. L. (1994). Regulation of hepatic endothelial cell and macrophage proliferation and nitric oxide production by GM-CSF, M-CSF, and IL-1 beta following acute endotoxemia. *J Leukoc Biol* 55, 507-513.

Ferrara, N., and Alitalo, K. (1999). Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat Med* 5, 1359-1364.

Fiorelli, V., Gendelman, R., Sirianni, M. C., Chang, H. K., Colombini, S., Markham, P. D., Monini, P., Sonnabend, J., Pintus, A., Gallo, R. C., and Ensoli, B. (1998). gamma-Interferon produced by CD8⁺ T cells infiltrating Kaposi's sarcoma induces spindle cells with angiogenic phenotype and synergy with human immunodeficiency virus-1 Tat protein: an immune response to human herpesvirus-8 infection? *Blood* 91, 956-967.

Fleming, I., and Busse, R. (1999). Signal transduction of eNOS activation. *Cardiovasc Res* 43, 532-541.

Folkman, J. (1995). Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med* 333, 1757-1763.

Folkman, J. (2000). Incipient angiogenesis. *J Natl Cancer Inst* 92, 94-95.

Folkman, J., and Haudenschild, C. (1980). Angiogenesis in vitro. *Nature* 288, 551-556.

Folkman, J., and Klagsbrun, M. (1987). Angiogenic factors. *Science* 235, 442-447.

Forstermann, U., Pollock, J. S., Schmidt, H. H., Heller, M., and Murad, F. (1991). Calmodulin-dependent endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase activity is present in the particulate and cytosolic fractions of bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 1788-1792.

Fraser, A., and Evan, G. (1996). A license to kill. *Cell* 85, 781-784.

Frater-Schroder, M., Risau, W., Hallmann, R., Gautschi, P., and Bohlen, P. (1987). Tumor necrosis factor type alpha, a potent inhibitor of endothelial cell growth in vitro, is angiogenic in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 5277-5281.

Freedman, S. B., and Isner, J. M. (2002). Therapeutic angiogenesis for coronary artery disease. *Ann Intern Med* 136, 54-71.

Friedlander, M., Brooks, P. C., Shaffer, R. W., Kincaid, C. M., Varner, J. A., and Cheresh, D. A. (1995). Definition of two angiogenic pathways by distinct alpha v integrins. *Science* 270, 1500-1502.

Friesel, R., Komoriya, A., and Maciag, T. (1987). Inhibition of endothelial cell proliferation by gamma-interferon. *J Cell Biol* 104, 689-696.

Gerol, M., Curry, L., McCarroll, L., Doctrow, S., and RayChaudhury, A. (1998). Growth regulation of cultured endothelial cells by inflammatory cytokines: mitogenic, anti-proliferative and cytotoxic effects. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol* 120, 397-404.

Gerwins, P., Skoldenberg, E., and Claesson-Welsh, L. (2000). Function of fibroblast growth factors and vascular endothelial growth factors and their receptors in angiogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol* 34, 185-194.

Gius, D. R., Ezhevsky, S. A., Becker-Hapak, M., Nagahara, H., Wei, M. C., and Dowdy, S. F. (1999). Transduced p16INK4a peptides inhibit hypophosphorylation of the retinoblastoma protein and cell cycle progression prior to activation of Cdk2 complexes in late G1. *Cancer Res* 59, 2577-2580.

Gluzman-Poltorak, Z., Cohen, T., Herzog, Y., and Neufeld, G. (2000). Neuropilin-2 is a receptor for the vascular endothelial growth factor (VEGF) forms VEGF-145 and VEGF-165 [corrected]. *J Biol Chem* 275, 18040-18045.

Goedert, M., Cuenda, A., Craxton, M., Jakes, R., and Cohen, P. (1997). Activation of the novel stress-activated protein kinase SAPK4 by cytokines and cellular stresses is mediated by SKK3 (MKK6); comparison of its substrate specificity with that of other SAP kinases. *Embo J* 16, 3563-3571.

Gospodarowicz, D., Neufeld, G., and Schweigerer, L. (1987). Fibroblast growth factor: structural and biological properties. *J Cell Physiol Suppl Suppl* 5, 15-26.

Goto, F., Goto, K., Weindel, K., and Folkman, J. (1993). Synergistic effects of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cells within collagen gels. *Lab Invest* 69, 508-517.

Grant, D. S., Kleinman, H. K., Leblond, C. P., Inoue, S., Chung, A. E., and Martin, G. R. (1985). The basement-membrane-like matrix of the mouse EHS tumor: II. Immunohistochemical quantitation of six of its components. *Am J Anat* 174, 387-398.

Greenfeder, S. A., Nunes, P., Kwee, L., Labow, M., Chizzonite, R. A., and Ju, G. (1995). Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex. *J Biol Chem* 270, 13757-13765.

Griffioen, A. W., and Molema, G. (2000). Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacol Rev* 52, 237-268.

Guan, Z., Buckman, S. Y., Pentland, A. P., Templeton, D. J., and Morrison, A. R. (1998). Induction of cyclooxygenase-2 by the activated MEKK1 --> SEK1/MKK4 --> p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 273, 12901-12908.

Guenzi, E., Töpolc, K., Cornali, E., Lubeseder-Martellato, C., Jörg, A., Matzen, K., Zietz, C., Kremmer, E., Nappi, F., Schwemmle, M., Hohenadl, C., Barillari, G., Tschachler, E., Monini, P., Ensoli, B., and Stürzl, M. (2001). The helical domain of GBP-1 mediates the inhibition of endothelial cell proliferation by inflammatory cytokines. *Embo J* 20, 5568-5577.

Guenzi, E., Töpolc, K., Lubeseder-Martellato, C., Jörg, A., Naschberger, E., Benelli, R., Albin, A., and Stürzl, M. (2003). The guanylate binding protein-1 GTPase controls the invasive and angiogenic capability of endothelial cells through inhibition of MMP-1 expression. *Embo J* 22, 3772-3782.

Gupta, K., Kshirsagar, S., Li, W., Gui, L., Ramakrishnan, S., Gupta, P., Law, P. Y., and Hebbel, R. P. (1999). VEGF prevents apoptosis of human microvascular endothelial cells via opposing effects on MAPK/ERK and SAPK/JNK signaling. *Exp Cell Res* 247, 495-504.

Gupta, S., Barrett, T., Whitmarsh, A. J., Cavanagh, J., Sluss, H. K., Derijard, B., and Davis, R. J. (1996). Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *Embo J* 15, 2760-2770.

Han, J., Lee, J. D., Bibbs, L., and Ulevitch, R. J. (1994). A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* 265, 808-811.

Hanahan, D. (1997). Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* 277, 48-50.

Haverstick, D. M., Heady, T. N., Macdonald, T. L., and Gray, L. S. (2000). Inhibition of human prostate cancer proliferation in vitro and in a mouse model by a compound synthesized to block Ca²⁺ entry. *Cancer Res* 60, 1002-1008.

Hefti, H. P., Frese, M., Landis, H., Di Paolo, C., Aguzzi, A., Haller, O., and Pavlovic, J. (1999). Human MxA protein protects mice lacking a functional alpha/beta interferon system against La crosse virus and other lethal viral infections. *J Virol* 73, 6984-6991.

Hibi, M., Lin, A., Smeal, T., Minden, A., and Karin, M. (1993). Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev* 7, 2135-2148.

Ho, A., Schwarze, S. R., Mermelstein, S. J., Waksman, G., and Dowdy, S. F. (2001). Synthetic protein transduction domains: enhanced transduction potential in vitro and in vivo. *Cancer Res* 61, 474-477.

Hou, J. Z., Kan, M. K., McKeehan, K., McBride, G., Adams, P., and McKeehan, W. L. (1991). Fibroblast growth factor receptors from liver vary in three structural domains. *Science* 251, 665-668.

Hsu, H., Xiong, J., and Goeddel, D. V. (1995). The TNF receptor 1-associated protein TRADD signals cell death and NF-kappa B activation. *Cell* 81, 495-504.

Huang, W., and Erikson, R. L. (1994). Constitutive activation of Mek1 by mutation of serine phosphorylation sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8960-8963.

Hughes, C. C., Male, D. K., and Lantos, P. L. (1988). Adhesion of lymphocytes to cerebral microvascular cells: effects of interferon-gamma, tumour necrosis factor and interleukin-1. *Immunology* 64, 677-681.

Ip, Y. T., and Davis, R. J. (1998). Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol* 10, 205-219.

Jain, R. K., and Munn, L. L. (2000). Leaky vessels? Call Ang1! *Nat Med* 6, 131-132.

Jelinek, T., Catling, A. D., Reuter, C. W., Moodie, S. A., Wolfman, A., and Weber, M. J. (1994). RAS and RAF-1 form a signalling complex with MEK-1 but not MEK-2. *Mol Cell Biol* 14, 8212-8218.

Jiang, Y., Chen, C., Li, Z., Guo, W., Gegner, J. A., Lin, S., and Han, J. (1996). Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). *J Biol Chem* 271, 17920-17926.

Johnson, D. R., and Pober, J. S. (1990). Tumor necrosis factor and immune interferon synergistically increase transcription of HLA class I heavy- and light-chain genes in vascular endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 5183-5187.

Joukov, V., Kaipainen, A., Jeltsch, M., Pajusola, K., Olofsson, B., Kumar, V., Eriksson, U., and Alitalo, K. (1997). Vascular endothelial growth factors VEGF-B and VEGF-C. *J Cell Physiol* 173, 211-215.

Kandel, J., Bossy-Wetzel, E., Radvanyi, F., Klagsbrun, M., Folkman, J., and Hanahan, D. (1991). Neovascularization is associated with a switch to the export of bFGF in the multistep development of fibrosarcoma. *Cell* 66, 1095-1104.

Karin, M., Liu, Z., and Zandi, E. (1997). AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9, 240-246.

Keck, P. J., Hauser, S. D., Krivi, G., Sanzo, K., Warren, T., Feder, J., and Connolly, D. T. (1989). Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 246, 1309-1312.

Keesler, G. A., Bray, J., Hunt, J., Johnson, D. A., Gleason, T., Yao, Z., Wang, S. W., Parker, C., Yamane, H., Cole, C., and Lichenstein, H. S. (1998). Purification and activation of recombinant p38 isoforms alpha, beta, gamma, and delta. *Protein Expr Purif* 14, 221-228.

Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.

Kim, K. J., Li, B., Winer, J., Armanini, M., Gillett, N., Phillips, H. S., and Ferrara, N. (1993). Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* 362, 841-844.

Klein, S., Roghani, M., and Rifkin, D. B. (1997). Fibroblast growth factors as angiogenesis factors: new insights into their mechanism of action. *Exs* 79, 159-192.

Kleinman, H. K., McGarvey, M. L., Hassell, J. R., Star, V. L., Cannon, F. B., Laurie, G. W., and Martin, G. R. (1986). Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry* 25, 312-318.

Kochs, G., and Haller, O. (1999). GTP-bound human MxA protein interacts with the nucleocapsids of Thogoto virus (Orthomyxoviridae). *J Biol Chem* 274, 4370-4376.

Kohn, E. C., Alessandro, R., Spoonster, J., Wersto, R. P., and Liotta, L. A. (1995). Angiogenesis: role of calcium-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1307-1311.

Kohn, E. C., Felder, C. C., Jacobs, W., Holmes, K. A., Day, A., Freer, R., and Liotta, L. A. (1994a). Structure-function analysis of signal and growth inhibition by carboxyamido-triazole, CAI. *Cancer Res* 54, 935-942.

Kohn, E. C., Jacobs, W., Kim, Y. S., Alessandro, R., Stetler-Stevenson, W. G., and Liotta, L. A. (1994b). Calcium influx modulates expression of matrix metalloproteinase-2 (72-kDa type IV collagenase, gelatinase A). *J Biol Chem* 269, 21505-21511.

Kohn, E. C., Reed, E., Sarosy, G., Christian, M., Link, C. J., Cole, K., Figg, W. D., Davis, P. A., Jacob, J., Goldspiel, B., and Liotta, L. A. (1996). Clinical investigation of a cytostatic calcium influx inhibitor in patients with refractory cancers. *Cancer Res* 56, 569-573.

Kroll, J., and Waltenberger, J. (1997). The vascular endothelial growth factor receptor KDR activates multiple signal transduction pathways in porcine aortic endothelial cells. *J Biol Chem* 272, 32521-32527.

Kumar, S., McDonnell, P. C., Gum, R. J., Hand, A. T., Lee, J. C., and Young, P. R. (1997). Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles. *Biochem Biophys Res Commun* 235, 533-538.

Kyriakis, J. M., App, H., Zhang, X. F., Banerjee, P., Brautigan, D. L., Rapp, U. R., and Avruch, J. (1992). Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature* 358, 417-421.

Kyriakis, J. M., and Avruch, J. (1996). Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. *Bioessays* 18, 567-577.

Kyriakis, J. M., and Avruch, J. (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81, 807-869.

Kyriakis, J. M., Woodgett, J. R., and Avruch, J. (1995). The stress-activated protein kinases. A novel ERK subfamily responsive to cellular stress and inflammatory cytokines. *Ann N Y Acad Sci* 766, 303-319.

Lange, T., Gutman-Raviv, N., Baruch, L., Machluf, M., and Neufeld, G. (2003). VEGF162 : A new heparin binding VEGF splice form that is expressed in transformed human cells. *J Biol Chem*.

Lansdown, A. B. (2002). Calcium: a potential central regulator in wound healing in the skin. *Wound Repair Regen* 10, 271-285.

Lechner, C., Zahalka, M. A., Giot, J. F., Moller, N. P., and Ullrich, A. (1996). ERK6, a mitogen-activated protein kinase involved in C2C12 myoblast differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 4355-4359.

Lee, F. S., Hagler, J., Chen, Z. J., and Maniatis, T. (1997). Activation of the I κ B α kinase complex by MEKK1, a kinase of the JNK pathway. *Cell* 88, 213-222.

Leeuwenberg, J. F., von Asmuth, E. J., Jeunhomme, T. M., and Buurman, W. A. (1990). IFN-gamma regulates the expression of the adhesion molecule ELAM-1 and IL-6 production by human endothelial cells in vitro. *J Immunol* 145, 2110-2114.

Leung, D. W., Cachianes, G., Kuang, W. J., Goeddel, D. V., and Ferrara, N. (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246, 1306-1309.

Lewis, T. S., Shapiro, P. S., and Ahn, N. G. (1998). Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv Cancer Res* 74, 49-139.

Li, B. S., Zhang, L., Takahashi, S., Ma, W., Jaffe, H., Kulkarni, A. B., and Pant, H. C. (2002). Cyclin-dependent kinase 5 prevents neuronal apoptosis by negative regulation of c-Jun N-terminal kinase 3. *Embo J* 21, 324-333.

Li, L., Bressler, B., Prameya, R., Dorovini-Zis, K., and Van Breemen, C. (1999). Agonist-stimulated calcium entry in primary cultures of human cerebral microvascular endothelial cells. *Microvasc Res* 57, 211-226.

Li, X., and Stark, G. R. (2002). NF κ B-dependent signaling pathways. *Exp Hematol* 30, 285-296.

Li, Z., Jiang, Y., Ulevitch, R. J., and Han, J. (1996). The primary structure of p38 gamma: a new member of p38 group of MAP kinases. *Biochem Biophys Res Commun* 228, 334-340.

Lin, Y. Z., Yao, S. Y., Veach, R. A., Torgerson, T. R., and Hawiger, J. (1995). Inhibition of nuclear translocation of transcription factor NF-kappa B by a synthetic peptide containing a cell membrane-permeable motif and nuclear localization sequence. *J Biol Chem* 270, 14255-14258.

Lindgren, M., Hallbrink, M., Prochiantz, A., and Langel, U. (2000). Cell-penetrating peptides. *Trends Pharmacol Sci* 21, 99-103.

Lindner, V., and Reidy, M. A. (1991). Proliferation of smooth muscle cells after vascular injury is inhibited by an antibody against basic fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 3739-3743.

Liotta, L. A., Steeg, P. S., and Stetler-Stevenson, W. G. (1991). Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 64, 327-336.

Loetscher, H., Stueber, D., Banner, D., Mackay, F., and Lesslauer, W. (1993). Human tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) mutants with exclusive specificity for the 55-kDa or 75-kDa TNF receptors. *J Biol Chem* 268, 26350-26357.

Lubeseder-Martellato, C., Guenzi, E., Jörg, A., Töpol, K., Naschberger, E., Kremmer, E., Zietz, C., Tschachler, E., Hutzler, P., Schwemmler, M., Matzen, K., Grimm, T., Ensoli, B., and Stürzl, M. (2002). Guanylate-binding protein-1 expression is selectively induced by inflammatory cytokines and is an activation marker of endothelial cells during inflammatory diseases. *Am J Pathol* 161, 1749-1759.

Mack, C. A., Patel, S. R., Schwarz, E. A., Zanzonico, P., Hahn, R. T., Ilercil, A., Devereux, R. B., Goldsmith, S. J., Christian, T. F., Sanborn, T. A., Kovesdi, I., Hackett, N., Isom, O. W., Crystal, R. G., and Rosengart, T. K. (1998). Biologic bypass with the use of adenovirus-mediated gene transfer of the complementary deoxyribonucleic acid for vascular endothelial growth factor 121 improves myocardial perfusion and function in the ischemic porcine heart. *J Thorac Cardiovasc Surg* 115, 168-176; discussion 176-167.

Madge, L. A., and Pober, J. S. (2000). A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway, activated by tumor necrosis factor or interleukin-1, inhibits apoptosis but does not activate NFkappaB in human endothelial cells. *J Biol Chem* 275, 15458-15465.

Madge, L. A., and Pober, J. S. (2001). TNF signaling in vascular endothelial cells. *Exp Mol Pathol* 70, 317-325.

Madge, L. A., Sierra-Honigmann, M. R., and Pober, J. S. (1999). Apoptosis-inducing agents cause rapid shedding of tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1). A nonpharmacological explanation for inhibition of TNF-mediated activation. *J Biol Chem* 274, 13643-13649.

Maglione, D., Guerriero, V., Viglietto, G., Delli-Bovi, P., and Persico, M. G. (1991). Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 9267-9271.

Maier, J. A., Morelli, D., Lazzerini, D., Menard, S., Colnaghi, M. I., and Balsari, A. (1999). Inhibition of fibronectin-activated migration of microvascular endothelial cells by interleukin-1alpha, tumour necrosis factor alpha and interferon gamma. *Cytokine* 11, 134-139.

Mallat, Z., and Tedgui, A. (2000). Apoptosis in the vasculature: mechanisms and functional importance. *Br J Pharmacol* 130, 947-962.

Mantovani, A., Bussolino, F., and Dejana, E. (1992). Cytokine regulation of endothelial cell function. *Faseb J* 6, 2591-2599.

Mantovani, A., Bussolino, F., and Introna, M. (1997). Cytokine regulation of endothelial cell function: from molecular level to the bedside. *Immunol Today* 18, 231-240.

Mantovani, A., and Dejana, E. (1989). Cytokines as communication signals between leukocytes and endothelial cells. *Immunol Today* 10, 370-375.

Matsumoto, T., Turesson, I., Book, M., Gerwins, P., and Claesson-Welsh, L. (2002). p38 MAP kinase negatively regulates endothelial cell survival, proliferation, and differentiation in FGF-2-stimulated angiogenesis. *J Cell Biol* 156, 149-160.

Mattei, M. G., Borg, J. P., Rosnet, O., Marme, D., and Birnbaum, D. (1996). Assignment of vascular endothelial growth factor (VEGF) and placenta growth factor (PLGF) genes to human chromosome 6p12-p21 and 14q24-q31 regions, respectively. *Genomics* 32, 168-169.

McCarthy, M. (2003). Antiangiogenesis drug promising for metastatic colorectal cancer. *Lancet* 361, 1959.

McCormick, F. (1993). Signal transduction. How receptors turn Ras on. *Nature* 363, 15-16.

McMahan, C. J., Slack, J. L., Mosley, B., Cosman, D., Lupton, S. D., Brunton, L. L., Grubin, C. E., Wignall, J. M., Jenkins, N. A., Brannan, C. I., and et al. (1991). A novel IL-1 receptor, cloned from B cells by mammalian expression, is expressed in many cell types. *Embo J* 10, 2821-2832.

Mercurio, F., Zhu, H., Murray, B. W., Shevchenko, A., Bennett, B. L., Li, J., Young, D. B., Barbosa, M., Mann, M., Manning, A., and Rao, A. (1997). IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated I κ B kinases essential for NF- κ B activation. *Science* 278, 860-866.

Meyer, M., Clauss, M., Lepple-Wienhues, A., Waltenberger, J., Augustin, H. G., Ziche, M., Lanz, C., Buttner, M., Rziha, H. J., and Dehio, C. (1999). A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *Embo J* 18, 363-374.

Meyrick, B., Christman, B., and Jesmok, G. (1991). Effects of recombinant tumor necrosis factor- α on cultured pulmonary artery and lung microvascular endothelial monolayers. *Am J Pathol* 138, 93-101.

Miao, H. Q., Ishai-Michaeli, R., Atzmon, R., Peretz, T., and Vlodavsky, I. (1996). Sulfate moieties in the subendothelial extracellular matrix are involved in basic fibroblast growth factor sequestration, dimerization, and stimulation of cell proliferation. *J Biol Chem* 271, 4879-4886.

Millauer, B., Longhi, M. P., Plate, K. H., Shawver, L. K., Risau, W., Ullrich, A., and Strawn, L. M. (1996). Dominant-negative inhibition of Flk-1 suppresses the growth of many tumor types in vivo. *Cancer Res* 56, 1615-1620.

Millauer, B., Shawver, L. K., Plate, K. H., Risau, W., and Ullrich, A. (1994). Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative Flk-1 mutant. *Nature* 367, 576-579.

Miller, A. D., Garcia, J. V., von Suhr, N., Lynch, C. M., Wilson, C., and Eiden, M. V. (1991). Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia virus. *J Virol* *65*, 2220-2224.

Morgenstern, J. P., and Land, H. (1990). Advanced mammalian gene transfer: high titre retroviral vectors with multiple drug selection markers and a complementary helper-free packaging cell line. *Nucleic Acids Res* *18*, 3587-3596.

Myoken, Y., Kayada, Y., Okamoto, T., Kan, M., Sato, G. H., and Sato, J. D. (1991). Vascular endothelial cell growth factor (VEGF) produced by A-431 human epidermoid carcinoma cells and identification of VEGF membrane binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 5819-5823.

Nagahara, H., Vocero-Akbani, A. M., Snyder, E. L., Ho, A., Latham, D. G., Lissy, N. A., Becker-Hapak, M., Ezhevsky, S. A., and Dowdy, S. F. (1998). Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27Kip1 induces cell migration. *Nat Med* *4*, 1449-1452.

Nagata, S. (2000). Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res* *256*, 12-18.

Nakamura, S., Salahuddin, S. Z., Biberfeld, P., Ensoli, B., Markham, P. D., Wong-Staal, F., and Gallo, R. C. (1988). Kaposi's sarcoma cells: long-term culture with growth factor from retrovirus-infected CD4+ T cells. *Science* *242*, 426-430.

Nantais, D. E., Schwemmle, M., Stickney, J. T., Vestal, D. J., and Buss, J. E. (1996). Prenylation of an interferon-gamma-induced GTP-binding protein: the human guanylate binding protein, huGBP1. *J Leukoc Biol* *60*, 423-431.

Nemoto, S., DiDonato, J. A., and Lin, A. (1998). Coordinate regulation of I κ B kinases by mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 and NF- κ B-inducing kinase. *Mol Cell Biol* *18*, 7336-7343.

Neufeld, G., Cohen, T., Gengrinovitch, S., and Poltorak, Z. (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *Faseb J* *13*, 9-22.

Neufeld, G., Cohen, T., Shraga, N., Lange, T., Kessler, O., and Herzog, Y. (2002). The neuropilins: multifunctional semaphorin and VEGF receptors that modulate axon guidance and angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med* *12*, 13-19.

Nishizuka, Y. (1988). The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 334, 661-665.

Nishizuka, Y. (1989). The Albert Lasker Medical Awards. The family of protein kinase C for signal transduction. *Jama* 262, 1826-1833.

Nishizuka, Y. (1992). Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258, 607-614.

Nomura, Y. (2001). NF-kappaB activation and IkappaB alpha dynamism involved in iNOS and chemokine induction in astroglial cells. *Life Sci* 68, 1695-1701.

Norioka, K., Borden, E. C., and Auerbach, R. (1992). Inhibitory effects of cytokines on vascular endothelial cells: synergistic interactions among interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1. *J Immunother* 12, 13-18.

Norioka, K., Hara, M., Kitani, A., Hirose, T., Hirose, W., Harigai, M., Suzuki, K., Kawakami, M., Tabata, H., Kawagoe, M., and et al. (1987). Inhibitory effect of human recombinant interleukin-1 alpha and beta on growth of human vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 145, 969-975.

Oess, S., and Hildt, E. (2000). Novel cell permeable motif derived from the PreS2-domain of hepatitis-B virus surface antigens. *Gene Ther* 7, 750-758.

Ogawa, S., Oku, A., Sawano, A., Yamaguchi, S., Yazaki, Y., and Shibuya, M. (1998). A novel type of vascular endothelial growth factor, VEGF-E (NZ-7 VEGF), preferentially utilizes KDR/Flk-1 receptor and carries a potent mitotic activity without heparin-binding domain. *J Biol Chem* 273, 31273-31282.

Okada-Ban, M., Thiery, J. P., and Jouanneau, J. (2000). Fibroblast growth factor-2. *Int J Biochem Cell Biol* 32, 263-267.

O'Keefe, E. J., Chiu, M. L., and Payne, R. E., Jr. (1988). Stimulation of growth of keratinocytes by basic fibroblast growth factor. *J Invest Dermatol* 90, 767-769.

Olofsson, B., Pajusola, K., Kaipainen, A., von Euler, G., Joukov, V., Saksela, O., Orpana, A., Pettersson, R. F., Alitalo, K., and Eriksson, U. (1996). Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 2576-2581.

Ono, K., and Han, J. (2000). The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal* 12, 1-13.

Orlandini, M., Marconcini, L., Ferruzzi, R., and Oliviero, S. (1996). Identification of a c-fos-induced gene that is related to the platelet-derived growth factor/vascular endothelial growth factor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11675-11680.

Pahl, H. L. (1999). Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18, 6853-6866.

Pavlovic, J., Arzet, H. A., Hefti, H. P., Frese, M., Rost, D., Ernst, B., Kolb, E., Staeheli, P., and Haller, O. (1995). Enhanced virus resistance of transgenic mice expressing the human MxA protein. *J Virol* 69, 4506-4510.

Payne, D. M., Rossomando, A. J., Martino, P., Erickson, A. K., Her, J. H., Shabanowitz, J., Hunt, D. F., Weber, M. J., and Sturgill, T. W. (1991). Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *Embo J* 10, 885-892.

Pepinsky, R. B., Androphy, E. J., Corina, K., Brown, R., and Barsoum, J. (1994). Specific inhibition of a human papillomavirus E2 trans-activator by intracellular delivery of its repressor. *DNA Cell Biol* 13, 1011-1019.

Pepper, M. S., Ferrara, N., Orci, L., and Montesano, R. (1992). Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 189, 824-831.

Pepper, M. S., Mandriota, S. J., Vassalli, J. D., Orci, L., and Montesano, R. (1996). Angiogenesis-regulating cytokines: activities and interactions. *Curr Top Microbiol Immunol* 213 (Pt 2), 31-67.

Perregaux, D. G., Dean, D., Cronan, M., Connelly, P., and Gabel, C. A. (1995). Inhibition of interleukin-1 beta production by SKF86002: evidence of two sites of in vitro activity and of a time and system dependence. *Mol Pharmacol* 48, 433-442.

Pitossi, F., Blank, A., Schroder, A., Schwarz, A., Hussi, P., Schwemmler, M., Pavlovic, J., and Staeheli, P. (1993). A functional GTP-binding motif is necessary for antiviral activity of Mx proteins. *J Virol* 67, 6726-6732.

Platanias, L. C. (2003). Map kinase signaling pathways and hematologic malignancies. *Blood* 101, 4667-4679.

Pober, J. S. (1987). Effects of tumour necrosis factor and related cytokines on vascular endothelial cells. *Ciba Found Symp* 131, 170-184.

Pober, J. S., and Cotran, R. S. (1990a). Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol Rev* 70, 427-451.

Pober, J. S., and Cotran, R. S. (1990b). The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation* 50, 537-544.

Pober, J. S., Gimbrone, M. A., Jr., Cotran, R. S., Reiss, C. S., Burakoff, S. J., Fiers, W., and Ault, K. A. (1983). Ia expression by vascular endothelium is inducible by activated T cells and by human gamma interferon. *J Exp Med* 157, 1339-1353.

Pober, J. S., Gimbrone, M. A., Jr., Lapierre, L. A., Mendrick, D. L., Fiers, W., Rothlein, R., and Springer, T. A. (1986). Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin 1, tumor necrosis factor, and immune interferon. *J Immunol* 137, 1893-1896.

Pombo, C. M., Bonventre, J. V., Avruch, J., Woodgett, J. R., Kyriakis, J. M., and Force, T. (1994). The stress-activated protein kinases are major c-Jun amino-terminal kinases activated by ischemia and reperfusion. *J Biol Chem* 269, 26546-26551.

Praefcke, G. J., Geyer, M., Schwemmler, M., Robert Kalbitzer, H., and Herrmann, C. (1999). Nucleotide-binding characteristics of human guanylate-binding protein 1 (hGBP1) and identification of the third GTP-binding motif. *J Mol Biol* 292, 321-332.

Prakash, B., Praefcke, G. J., Renault, L., Wittinghofer, A., and Herrmann, C. (2000a). Structure of human guanylate-binding protein 1 representing a unique class of GTP-binding proteins. *Nature* 403, 567-571.

Prakash, B., Renault, L., Praefcke, G. J., Herrmann, C., and Wittinghofer, A. (2000b). Triphosphate structure of guanylate-binding protein 1 and implications for nucleotide binding and GTPase mechanism. *Embo J* 19, 4555-4564.

Pulverer, B. J., Kyriakis, J. M., Avruch, J., Nikolakaki, E., and Woodgett, J. R. (1991). Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. *Nature* 353, 670-674.

Rayet, B., and Gelinas, C. (1999). Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer. *Oncogene* 18, 6938-6947.

Read, M. A., Whitley, M. Z., Gupta, S., Pierce, J. W., Best, J., Davis, R. J., and Collins, T. (1997). Tumor necrosis factor alpha-induced E-selectin expression is activated by the nuclear factor-kappaB and c-JUN N-terminal kinase/p38 mitogen-activated protein kinase pathways. *J Biol Chem* 272, 2753-2761.

Risau, W., and Flamme, I. (1995). Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11, 73-91.

Rousseau, S., Houle, F., Landry, J., and Huot, J. (1997). p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. *Oncogene* 15, 2169-2177.

Ruhrberg, C., Gerhardt, H., Golding, M., Watson, R., Ioannidou, S., Fujisawa, H., Betsholtz, C., and Shima, D. T. (2002). Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. *Genes Dev* 16, 2684-2698.

Sa, G., Murugesan, G., Jaye, M., Ivashchenko, Y., and Fox, P. L. (1995). Activation of cytosolic phospholipase A2 by basic fibroblast growth factor via a p42 mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation pathway in endothelial cells. *J Biol Chem* 270, 2360-2366.

Saegusa, Y., Ziff, M., Welkovich, L., and Cavender, D. (1990). Effect of inflammatory cytokines on human endothelial cell proliferation. *J Cell Physiol* 142, 488-495.

Sato, N., Goto, T., Haranaka, K., Satomi, N., Nariuchi, H., Mano-Hirano, Y., and Sawasaki, Y. (1986). Actions of tumor necrosis factor on cultured vascular endothelial cells: morphologic modulation, growth inhibition, and cytotoxicity. *J Natl Cancer Inst* 76, 1113-1121.

Schaeffer, H. J., and Weber, M. J. (1999). Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* 19, 2435-2444.

Schlessinger, J. (1993). How receptor tyrosine kinases activate Ras. *Trends Biochem Sci* 18, 273-275.

Schlessinger, J. (1994). SH2/SH3 signaling proteins. *Curr Opin Genet Dev* 4, 25-30.

Schmitz, M. L., Bacher, S., and Kracht, M. (2001). I kappa B-independent control of NF-kappa B activity by modulatory phosphorylations. *Trends Biochem Sci* 26, 186-190.

Schwarze, S. R., and Dowdy, S. F. (2000). In vivo protein transduction: intracellular delivery of biologically active proteins, compounds and DNA. *Trends Pharmacol Sci* 21, 45-48.

Schweigerer, L., Neufeld, G., Friedman, J., Abraham, J. A., Fiddes, J. C., and Gospodarowicz, D. (1987). Capillary endothelial cells express basic fibroblast growth factor, a mitogen that promotes their own growth. *Nature* 325, 257-259.

Schwemmler, M., and Staeheli, P. (1994). The interferon-induced 67-kDa guanylate-binding protein (hGBP1) is a GTPase that converts GTP to GMP. *J Biol Chem* 269, 11299-11305.

Sever, S., Damke, H., and Schmid, S. L. (2000). Dynamin:GTP controls the formation of constricted coated pits, the rate limiting step in clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol* 150, 1137-1148.

Sims, J. E., Gayle, M. A., Slack, J. L., Alderson, M. R., Bird, T. A., Giri, J. G., Colotta, F., Re, F., Mantovani, A., Shanebeck, K., and et al. (1993). Interleukin 1 signaling occurs exclusively via the type I receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 6155-6159.

Sims, J. E., Giri, J. G., and Dower, S. K. (1994). The two interleukin-1 receptors play different roles in IL-1 actions. *Clin Immunol Immunopathol* 72, 9-14.

Sims, J. E., March, C. J., Cosman, D., Widmer, M. B., MacDonald, H. R., McMahan, C. J., Grubin, C. E., Wignall, J. M., Jackson, J. L., Call, S. M., and et al. (1988). cDNA expression cloning of the IL-1 receptor, a member of the immunoglobulin superfamily. *Science* 241, 585-589.

Soker, S., Takashima, S., Miao, H. Q., Neufeld, G., and Klagsbrun, M. (1998). Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* 92, 735-745.

Stalmans, I., Ng, Y. S., Rohan, R., Fruttiger, M., Bouche, A., Yuce, A., Fujisawa, H., Hermans, B., Shani, M., Jansen, S., Hicklin, D., Anderson, D. J., Gardiner, T., Hammes, H. P., Moons, L., Dewerchin, M., Collen, D., Carmeliet, P., and D'Amore, P. A. (2002). Arteriolar and venular patterning in retinas of mice selectively expressing VEGF isoforms. *J Clin Invest* 109, 327-336.

Stolpen, A. H., Guinan, E. C., Fiers, W., and Pober, J. S. (1986). Recombinant tumor necrosis factor and immune interferon act singly and in combination to reorganize human vascular endothelial cell monolayers. *Am J Pathol* 123, 16-24.

Stürzl, M., Brandstetter, H., Zietz, C., Eisenburg, B., Raivich, G., Gearing, D. P., Brockmeyer, N. H., and Hofschneider, P. H. (1995). Identification of interleukin-1 and platelet-derived growth factor-B as major mitogens for the spindle cells of Kaposi's sarcoma: a combined in vitro and in vivo analysis. *Oncogene* 10, 2007-2016.

Stürzl, M., Lubeseder-Martellato, C., Töpolt, K., and Naschberger, E. (2003). Das Guanylat-Bindungsprotein-1: Ein neuer Marker und Regulator der Gefäßaktivierung. *BIOforum*.

Stylianou, E., O'Neill, L. A., Rawlinson, L., Edbrooke, M. R., Woo, P., and Saklatvala, J. (1992). Interleukin 1 induces NF-kappa B through its type I but not its type II receptor in lymphocytes. *J Biol Chem* 267, 15836-15841.

Sugden, P. H., and Clerk, A. (1997). Regulation of the ERK subgroup of MAP kinase cascades through G protein-coupled receptors. *Cell Signal* 9, 337-351.

Suhardja, A., and Hoffman, H. (2003). Role of growth factors and their receptors in proliferation of microvascular endothelial cells. *Microsc Res Tech* 60, 70-75.

Takahashi, T., Ueno, H., and Shibuya, M. (1999). VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells. *Oncogene* 18, 2221-2230.

Tanghetti, E., Ria, R., Dell'Era, P., Urbinati, C., Rusnati, M., Ennas, M. G., and Presta, M. (2002). Biological activity of substrate-bound basic fibroblast growth factor (FGF2): recruitment of FGF receptor-1 in endothelial cell adhesion contacts. *Oncogene* 21, 3889-3897.

Tedgui, A., and Mallat, Z. (2001). Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall. *Circ Res* 88, 877-887.

Thomas, D., Lipp, P., Tovey, S. C., Berridge, M. J., Li, W., Tsien, R. Y., and Bootman, M. D. (2000). Microscopic properties of elementary Ca²⁺ release sites in non-excitable cells. *Curr Biol* 10, 8-15.

Töpol, K., Guenzi, E., Lubeseder-Martellato, C., Jörg, A., Naschberger, E., and Stürzl, M. (2002). Structure-Function Analysis of the Anti-proliferative Effect of the Human Guanylate Binding Protein-1 (GBP-1) in Endothelial Cells. Paper presented at: 22nd Meeting of the European Society for Microcirculation. The Microcirculation and Vascular Biology (Exeter U.K., Monduzzi Editore S.p.A. - Medimond).

Tzeng, E., Kim, Y. M., Pitt, B. R., Lizonova, A., Kovesdi, I., and Billiar, T. R. (1997). Adenoviral transfer of the inducible nitric oxide synthase gene blocks endothelial cell apoptosis. *Surgery* 122, 255-263.

Vocero-Akbani, A. M., Heyden, N. V., Lissy, N. A., Ratner, L., and Dowdy, S. F. (1999). Killing HIV-infected cells by transduction with an HIV protease-activated caspase-3 protein. *Nat Med* 5, 29-33.

Wadia, J. S., and Dowdy, S. F. (2002). Protein transduction technology. *Curr Opin Biotechnol* 13, 52-56.

Wagner, J. A. (1991). The fibroblast growth factors: an emerging family of neural growth factors. *Curr Top Microbiol Immunol* 165, 95-118.

Wallach, D., Varfolomeev, E. E., Malinin, N. L., Goltsev, Y. V., Kovalenko, A. V., and Boldin, M. P. (1999). Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol* 17, 331-367.

Wellner, M., Maasch, C., Kupprion, C., Lindschau, C., Luft, F. C., and Haller, H. (1999). The proliferative effect of vascular endothelial growth factor requires protein

kinase C-alpha and protein kinase C-zeta. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19, 178-185.

Whitfield, J. F., Boynton, A. L., MacManus, J. P., Rixon, R. H., Sikorska, M., Tsang, B., Walker, P. R., and Swierenga, S. H. (1980). The roles of calcium and cyclic AMP in cell proliferation. *Ann N Y Acad Sci* 339, 216-240.

Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M. B., and Johnson, G. L. (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 79, 143-180.

Wilson, E. M., Moainie, S. L., Baskin, J. M., Lowry, A. S., Deschamps, A. M., Mukherjee, R., Guy, T. S., St John-Sutton, M. G., Gorman, J. H., 3rd, Edmunds, L. H., Jr., Gorman, R. C., and Spinale, F. G. (2003). Region- and type-specific induction of matrix metalloproteinases in post-myocardial infarction remodeling. *Circulation* 107, 2857-2863.

Witzenbichler, B., Asahara, T., Murohara, T., Silver, M., Spyridopoulos, I., Magner, M., Principe, N., Kearney, M., Hu, J. S., and Isner, J. M. (1998). Vascular endothelial growth factor-C (VEGF-C/VEGF-2) promotes angiogenesis in the setting of tissue ischemia. *Am J Pathol* 153, 381-394.

Wojnowski, L., Hoyland, J., Mason, W. T., Schwab, A., Westphale, H. J., and Oberleithner, H. (1994). Cell transformation induces a cytoplasmic Ca²⁺ oscillator in Madin-Darby canine kidney cells. *Pflugers Arch* 426, 89-94.

Wong, M. K., and Gottlieb, A. I. (1988). The reorganization of microfilaments, centrosomes, and microtubules during in vitro small wound reendothelialization. *J Cell Biol* 107, 1777-1783.

Xerri, L., Hassoun, J., Planche, J., Guigou, V., Grob, J. J., Parc, P., Birnbaum, D., and deLapeyriere, O. (1991). Fibroblast growth factor gene expression in AIDS-Kaposi's sarcoma detected by in situ hybridization. *Am J Pathol* 138, 9-15.

Xia, P., Aiello, L. P., Ishii, H., Jiang, Z. Y., Park, D. J., Robinson, G. S., Takagi, H., Newsome, W. P., Jirousek, M. R., and King, G. L. (1996). Characterization of vascular endothelial growth factor's effect on the activation of protein kinase C, its isoforms, and endothelial cell growth. *J Clin Invest* 98, 2018-2026.

Yanagisawa-Miwa, A., Uchida, Y., Nakamura, F., Tomaru, T., Kido, H., Kamijo, T., Sugimoto, T., Kaji, K., Utsuyama, M., Kurashima, C., and et al. (1992). Salvage of infarcted myocardium by angiogenic action of basic fibroblast growth factor. *Science* 257, 1401-1403.

Yayon, A., Klagsbrun, M., Esko, J. D., Leder, P., and Ornitz, D. M. (1991). Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell* 64, 841-848.

Yoshiji, H., Kuriyama, S., Ways, D. K., Yoshii, J., Miyamoto, Y., Kawata, M., Ikenaka, Y., Tsujinoue, H., Nakatani, T., Shibuya, M., and Fukui, H. (1999). Protein kinase C lies on the signaling pathway for vascular endothelial growth factor-mediated tumor development and angiogenesis. *Cancer Res* 59, 4413-4418.

Yu, C. L., Haskard, D. O., Cavender, D., Johnson, A. R., and Ziff, M. (1985). Human gamma interferon increases the binding of T lymphocytes to endothelial cells. *Clin Exp Immunol* 62, 554-560.

Yu, Y., and Sato, J. D. (1999). MAP kinases, phosphatidylinositol 3-kinase, and p70 S6 kinase mediate the mitogenic response of human endothelial cells to vascular endothelial growth factor. *J Cell Physiol* 178, 235-246.

Zhao, Q., and Lee, F. S. (1999). Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinases 2 and 3 activate nuclear factor-kappaB through IkappaB kinase-alpha and IkappaB kinase-beta. *J Biol Chem* 274, 8355-8358.

Zheng, C. F., and Guan, K. L. (1994). Activation of MEK family kinases requires phosphorylation of two conserved Ser/Thr residues. *Embo J* 13, 1123-1131.

Ziche, M., and Morbidelli, L. (2000). Nitric oxide and angiogenesis. *J Neurooncol* 50, 139-148.

Ziche, M., Morbidelli, L., Choudhuri, R., Zhang, H. T., Donnini, S., Granger, H. J., and Bicknell, R. (1997). Nitric oxide synthase lies downstream from vascular endothelial growth factor-induced but not basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis. *J Clin Invest* 99, 2625-2634.

Ziche, M., Morbidelli, L., Masini, E., Granger, H., Geppetti, P., and Ledda, F. (1993). Nitric oxide promotes DNA synthesis and cyclic GMP formation in endothelial cells from postcapillary venules. *Biochem Biophys Res Commun* 192, 1198-1203.

6. Lebenslauf und Publikationsliste

Lebenslauf

Kristin Töpolt

Geboren am: 03.04.1971 in Freital (Sachsen)

Nationalität: deutsch

Familienstand: ledig

1977 – 1987 POS Pesterwitz, Wurgwitz

1987 – 1989 EOS Freital, Abitur

1989 – 1990 Vorpraktikum im Rahmen des Studiums, VEB Getränkekombinat Berlin

1990 – 1995 Studium für Lebensmittelwissenschaft/Biotechnologie an der Humboldt-Universität Berlin und Technischen Universität Berlin (Fusionsgesetz 1991), Abschluss: Dipl.-Ing.

1995 – 1998 Aufbaustudium für Wirtschaftsingenieurwissenschaften, Technische Universität Dresden

1996 – 1997 Auslandsstudium an der Università di Roma „La Sapienza“, über das Studentenaustauschprogramm Erasmus, Economia dell'ambiente

1998 – 1999 Technische Assistentin am Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität München in der Arbeitsgruppe von PD Dr. S. Weiß

06/99 – 12/99 Doktorandin an der Technischen Universität Dresden, Medizinische Fakultät, Institut für Physiologische Chemie, Arbeitsgruppe Prof. T. Kriegel

seit 01/2000 Doktorandin am GSF-Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt, Neuherberg, Institut für Molekulare Virologie, Abt. Virale Vaskulopathie unter Leitung von Prof. Dr. Michael Stürzl,
Thema der Doktorarbeit:
Struktur-/Funktionsanalyse des humanen Guanylatbindungsproteins-1 (GBP-1) - einem Inhibitor der endothelialen Zellproliferation.

- Mai 2001 Teilnahme am 3. Endothelzell-Symposium in Giessen "Pathophysiology of the endothelium: vascular and infectious diseases", Giessen, 2001.
- Februar 2002 Teilnahme am Kurs "Erhaltung der Sachkunde nach den §§ 15 und 17 GenTSV für Projektleiter und Beauftragte der Biologische Sicherheit"
- August 2002 Teilnahme an der Konferenz: 22nd Meeting of the European society for microcirculation - The microcirculation and vascular biology, august 28-30 (2002), Exeter, U.K.
- Juli 2003 Teilnahme am 4. Symposium für Endothelzellbiologie in München „Molecular cell biology of the endothelium in development and diseases“, München, 2003

Preise

- August 2002 Lars-Erik Gelin Conference Travel Award, in recognition of the abstract "Structure-function analysis of the anti-proliferative effect of the human guanylate binding protein-1 (GBP-1) in endothelial cells", Exeter, U.K.
- August 2002 Certificate for best poster presentation within endothelial cell biology, European Society for Microcirculation, Exeter, U.K.

Publikationsliste

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Guenzi E.*, **Töpol**t K. *, Cornali E.*, Lubeseder-Martellato C.* , Jörg A., Matzen K., Zietz C., Kremmer E., Nappi F., Schwemmle M., Hohenadl C., Barillari G., Tschachler E., Monini P., Ensoli B., and Stürzl M. (2001). The helical domain of GBP-1 mediates the inhibition of endothelial cell proliferation by inflammatory cytokines. *EMBO J.* **20**: 5568-5577.

(*gleichberechtigte Erstautorenschaft)

Lubeseder-Martellato C., Guenzi E., Jörg A., **Töpol**t K., Naschberger E., Kremmer E., Zietz C., Tschachler E., Hutzler P., Schwemmle M., Matzen K., Grimm T., Ensoli B. and Stürzl M. (2002). Guanylate-binding protein-1 expression is selectively induced by inflammatory cytokines and is an activation marker of endothelial cells during inflammatory diseases. *AJP* **161**: 1749–1759.

Töpolt K., Guenzi E., Lubeseder-Martellato C., Jörg A., Naschberger E. and Stürzl, M. (2002). Structure-function analysis of the anti-proliferative effect of the human guanylate binding protein-1 (GBP-1) in endothelial cells. Proceedings of the 22nd Meeting of European Society for Microcirculation. The Microcirculation and Vascular Biology, Monduzzi Editore S.p.A. Medimond Inc. 2002: 215-219.

Stürzl M., Lubeseder-Martellato C., **Töpol**t K., Naschberger E. (2003). Das Guanylat-Bindungsprotein-1. Ein neuer Marker und Regulator der Gefäßaktivierung. *BIOFORUM*. 2003

Guenzi E., **Töpol**t K., Lubeseder-Martellato C., Jörg A., Naschberger E., Benelli R., Albin A. and Stürzl M. (2003). The guanylate binding protein-1 GTPase controls the invasive and angiogenic capability of endothelial cells through inhibition of MMP-1 expression. *EMBO J.* **22**; August 1, 2003

Veröffentlichungen, die während der Promotion entstanden sind, jedoch nicht in die Arbeit aufgenommen wurden:

Naschberger E., Werner T., Vicente A., Guenzi E., Lubeseder-Martellato C., **Töpol** K., Nelson P. and Stürzl M. c-rel/ISRE promotor module triggers GBP-1 expression in response to inflammatory cytokines in HUVEC. (submitted)

Auf verschiedenen Kongressen wurden zudem diverse Poster vorgestellt.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Michael Stürzl für die Vergabe des Themas meiner Doktorarbeit, seinen unermüdlichen Einsatz die Forschung voranzutreiben, vor allem aber für die wertvolle Unterstützung, die maßgeblich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen hat, bedanken. Danke auch für die Besuche nationaler und internationaler Kongresse.

Herrn PD Dr. Brian Salmons gilt mein besonderer Dank für die Betreuung dieser Arbeit an der biologischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Bei Andreas Stampfl möchte ich mich bedanken für die engagierte Anleitung und Betreuung der Kalziummessungen, für viele interessante Diskussionen, die den Fortgang dieser Arbeit begleiteten und seine herzliche Art, die unsere Zusammenarbeit bereichert hat.

Bei den jetzigen und ehemaligen Arbeitsgruppenmitgliedern Dr. Eric Guenzi, Anita Jörg, Kathrin Matzen, Dr. Clara Lubeseder-Martellato, Dr. Thomas Grimm, Elisabeth Naschberger, René Leubert, Frank Pogoda, Anneliese Wunderlich, Dr. Gerhard Stelz, Dr. Michael Lehmann und Dr. Gudrun Ascherl möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit, die stete Hilfsbereitschaft und die äußerst angenehme Atmosphäre im Labor bedanken, die den Arbeitsalltag erleichtert hat. Ganz besonderer Dank gilt Eric für seine konstruktiven Ideen sowie seine Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, die zur Lösung zahlreicher wissenschaftlicher Probleme und Fragestellungen beigetragen hat.

Meinen Freunden und Geschwistern danke ich für ihre Anteilnahme sowie für zahlreiche schöne Abwechslungen während dieser Arbeit. Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Freund Frank, der mit mir einige Höhen und Tiefen durchgestanden hat und mich mit viel Liebe und Geduld unterstützt hat.

Der größte Dank gebührt meinen Eltern für ihren Beistand in allen Bereichen meines Lebens. Ohne sie, wäre es mir nicht möglich gewesen, diese Arbeit durchzuführen, da sie mir ein steter Rückhalt waren.