Aus der Abteilung für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik
Fachbereich Medizin
Philipps-Universität Marburg
Direktor: Prof.Dr. med. H. Renz

Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor VEGF hemmt die Endothelzellapoptose über die Regulation von PARP

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin am Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Mareike Hörmann
aus Bremen

Marburg, 2010

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg am:
15.04.2010

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. M. Rothmund

Referent: Priv.-Doz. Dr. N. Al-Fakhri

1. Korreferent: Priv.-Doz. Dr. S. Pankuweit

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis 3
Abkürzungsverzeichnis 6
1 Einleitung 9
1.1 Arteriosklerose 9
1.2 Apoptose 12
1.3 Bedeutung der Endothelzell-Apoptose für die Arteriosklerose 15
1.4 Vascular endothelial growth factor 17
1.5 Poly (ADP-ribose) polymerase, PARP 19
1.6 Signaltransduktion bei Apoptose und Zellüberleben vaskulärer Zellen 20
1.7 Fragestellung und Zielsetzung 21
2 Materialien und Chemikalien 23
2.1 Zellkultur 23
2.1.1 Zelllinien 23
2.1.2 Zellkulturmedium, -zusätze & -chemikalien 23
2.1.3 Zellkulturmaterialien & -geräte 23
2.1.4 Chemikalien für Inkubationsversuche 24
2.2 RNA-Aufreinigung aus Einzelzellsuspensionen 24
2.2.1 Chemikalien 24
2.2.2 Materialien & Geräte 24
2.3 RNA-Konzentrationsbestimmung 24
2.3.1 Chemikalien & Geräte 24
2.4 Verdau der DNA 25
2.4.1 Chemikalien 25
2.4.2 Materialien & Geräte 25
2.5 Reverse Transkription 25
2.5.1 Chemikalien 25
2.5.2 Materialien & Geräte 25
2.6 Qualitative PCR 25
2.6.1 Chemikalien 25
2.6.2 Geräte 26
2.7 Quantitative PCR 26
2.7.1 Chemikalien 26
2.7.2 Material & Geräte 26
2.8 RNA-Interferenz (RNAi) 26
2.8.1 Chemikalien: 26
2.9 Flowzytometrische Bestimmung der apoptotischen Zellen 26
2.9.1 Chemikalien 26
2.9.2 Materialien & Geräte 27
2.10 Vitalitätstest mittels Trypanblaufärbung 27
2.10.1 Chemikalien 27
2.10.2 Materialien 27
2.11 PARP-Aktivitätsassay 27
2.11.1 Chemikalien 27

2.11.2 Materialien ... 27
2.12 Immunfluoreszenz ... 28
2.12.1 Chemikalien ... 28
2.12.2 Geräte ... 28
2.13 Protein-Aufreinigung aus Einzelzellsuspensionen ... 28
2.13.1 Chemikalien ... 28
2.13.2 Materialien & Geräte ... 28
2.14 Protein-Konzentrationsbestimmung ... 28
2.14.1 Chemikalien ... 28
2.14.2 Materialien & Geräte ... 28
2.15 Western-Blot ... 29
2.15.1 Chemikalien ... 29
2.15.2 Puffer ... 29
2.15.3 Primärantikörper ... 30
2.15.4 Sekundärantikörper ... 30
2.15.5 Software ... 30
3 Methoden ... 31
3.1 Zelllinien und Zellkultivierung ... 31
3.2 Inkubationsprotokolle ... 31
3.2.1 Protokoll für Zeit- und Dosis-Abhängigkeit der VEGF-Inkubation ... 32
3.2.2 Protokoll für Apoptosehemmung durch VEGF ... 32
3.2.3 Protokoll für Signaltransduktionsinduktion von VEGF ... 33
3.2.4 Protokoll für Inkubationen mit AD und CHX ... 33
3.2.5 Protokoll für Inkubationen mit VEGF-Rezeptorinhibitor ... 34
3.2.6 Inkubationen mit siRNA ... 34
3.3 Molekularbiologische Nachweismethoden ... 35
3.3.1 mRNA-Nachweis und –Quantifizierung ... 35
3.3.1.1 RNA-Aufreinigung aus Einzelzellsuspension ... 35
3.3.1.2 RNA-Konzentrationsbestimmung ... 35
3.3.1.3 Verdau der DNA ... 36
3.3.1.4 Reverse Transkription ... 36
3.3.1.5 Qualitative Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zur Herstellung der externen Standards ... 37
3.3.1.6 Quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion ... 39
3.3.2 RNA-Interferenz (RNAi) ... 42
3.3.3 Flowzytometrische Bestimmung der Apoptoserate ... 43
3.3.4 Vitalitätstest mittels Trypanblaufärbung ... 44
3.3.5 PARP-Aktivitätsassay ... 44
3.3.6 Immunfluoreszenzmikroskopie ... 45
3.3.7 Proteinbiochemische Methoden ... 46
3.3.7.1 Aufreinigung von Proteinen aus Einzelzellsuspensionen 46
3.3.7.2 Proteinkonzentrationsbestimmung ... 46
3.3.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ... 47
3.3.7.4 Membrantransfer von Proteinen (Western-Blot) ... 47
3.3.7.5 Detektionsverfahren Western-Blot ... 48
3.3.7.6 Densitometrische Auswertung ... 48
3.4 Statistische Auswertung der Ergebnisse ... 49

4 Ergebnisse 50
4.1 VEGF hat keinen Einfluss auf ruhende Endothelzellen 50
4.2 VEGF wirkt protektiv auf Endothelzellen nach Induktion von Apoptose. 52
4.3 Regulation der PARP-mRNA-Produktion durch VEGF 56
4.4 PARP-Proteinexpression unter VEGF-Einfluss..... 57
4.5 VEGF steigert die PARP-Aktivität in Endothelzellen 64
4.6 Intrazelluläre Regulation der VEGF-induzierten PARP-Expression 66
4.7 Aufhebung der anti-apoptotischen VEGF-Wirkung durch PARP-Knock-down 69
4.8 Rezeptoren der VEGF-Wirkung 71
4.9 Signaltransduktionswege der VEGF-Wirkung..... 74
5 Diskussion und Schlussfolgerungen 79
5.1 Bedeutung von PARP für Apoptose und Zellüberleben 80
5.2 Validität des experimentellen Settings 80
5.3 Anti-apoptotische Wirkungsweise von VEGF an Endothelzellen 82
5.4 Einfluss von VEGF auf die PARP-Proteinexpression 82
5.5 Zusammenhang zwischen Anti-Apoptose und PARP-Regulation durch VEGF 86
5.6 Einfluss von VEGF auf die PARP-Aktivität..... 87
5.7 Signalvermittlung der VEGF-Wirkung 88
5.8 Regulationsebene der VEGF-induzierten PARP-Expression..... 91
5.9 Klinische Bedeutung der Studienergebnisse 92
6 Zusammenfassung..... 95
7 Anhang..... 98
7.1 Literaturverzeichnis..... 98
7.2 Lebenslauf 110
7.3 Verzeichnis meiner akademischen Lehrer 111
7.4 Danksagung..... 112
7.5 Ehrenwörtliche Erklärung..... 113

Abkürzungsverzeichnis

AD	Actinomycin D
ADP	Adenosindiphosphat
AIF	Apoptose-induzierender Faktor
Apaf-1	Apoptotic protease factor 1
BAD	Bcl-2 associated agonist of cell-death
BCA	Bicinchoninsäure
Bcl-2	B-cell lymphoma 2 protein
bFGF	basic Fibroblast growth factor
BSA	Bovine Serum Albumin
cDNA	complementary (komplementäre) DNA
CED	Cell death protein 4
CHX	Cycloheximid
c-Myc	Cellular myelocytomatosis oncogene
Cy 2	Cyanocyanin-Farbstoff 2
Da (kDa)	Dalton (Kilodalton)
DAPI	4', 6-Diamidino-2'-phenylindol
DD	Death domain
DMSO	Dimethysulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	double-stranded (doppelsträngige) DNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNos	endotheliale NO-Synthase
ERK 1 und 2	Extrazelluläre Signal-regulierte Kinasen 1 und 2
EZM	Extrazelluläre Matrix
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FADD	Fas-associated death domain protein
FCS	Fetal calf serum (fetales Kälberserum)
hTERT	Catalytic unit of human telomerase
HUVEC	Humane umbilicalvenöse Endothelzellen
IL-1	Interleukin-1

JNK/SAPK	c-Jun-terminale Kinase/Stress-aktivierte Proteinkinase
LDL	Low density lipoproteins
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase
MAPKKK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase-Kinase
mRNA	Messenger ribonucleid acid (Messenger Ribonukleinsäure)
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NAD+	Nicotinamid-adenin-Dinucleotid
NFκB	Nuclear factor of kappa light chain enhancer in B-cells
NP-1	Neuropilin 1
PARP	Poly (ADP-Ribose)-Polymerase
p38 MAPK	Protein 38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatpuffer)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIGF	Plazenta growth factor (Plazentarer Wachstumsfaktor)
PS	Phosphatidylserin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
ROD	relative optische Dichte
SDS	Sodium (Natrium) Dodecyl Sulfat
siRNA	short interfering RNA
ssDNA	single-stranded (einzelsträngige) DNA
SV40-T	Simian virus 40 large antigen
TGF-β	Transforming growth factor β
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR1	Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1
TNS	Trypsin neutralising solution (Trypsin-neutralisierende Lösung)
TTBS	Tween® / Tris-gepufferte Salzlösung
VEGF	Vascular endothelial growth factor (Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)

VEGFR	Rezeptor für Vascular endothelial growth factor
VSMC	Vascular smooth muscle cells (glatte Gefäßmuskelzellen)

1 Einleitung

1.1 Arteriosklerose

Die Arteriosklerose und ihre vielfältigen Folgeerkrankungen sind Hauptursachen für Morbidität und Mortalität in den Industrienationen (WHO 2003). Sie befällt unterschiedliche Gefäßregionen und führt so zu verschiedenartigen Beschwerdebildern.

Die Arteriosklerose der Koronararterien führt zu Angina pectoris und Herzinfarkt. Sind die Gefäße der ZNS-Versorgung von Arteriosklerose betroffen, können transitorisch ischämische Attacken und Apoplex die Folgen sein. In der peripheren Zirkulation ist sie für die Claudicatio intermittens verantwortlich und kann zu Gangrän oder Verlust der betroffenen Extremität führen (Libby 2003). Zu den Risikofaktoren, die die Entstehung arteriosklerotischer Veränderungen begünstigen, gehören arterieller Hypertonus, Diabetes mellitus, Rauchen, Hyperlipidämie, Adipositas, männliches Geschlecht, Alter und genetische Prädisposition (Libby 2003).

Grundlage der Arteriosklerose-Entstehung und daraus resultierenden Stenosierungen ist das sogenannte Remodeling. Im Rahmen von vaskulären Remodeling-Prozessen kommt es zu einem Umbau der Gefäßwandarchitektur, es bildet sich eine verdickte, unelastische Neointima. Diese engt das Gefäß zunehmend ein und wirkt zusätzlich thrombogen (Holvoet, Collen 1997; McGrath et al. 2005).

Grundsätzlich lässt sich die Bildung der Neointima in Stadien einteilen, die allerdings fließend ineinander übergehen. Im Initialstadium kommt es zunächst zur endothelialen Dysfunktion, dann zur Schädigung der Endothelschicht mit apoptotischem Zelltod der Endothelzellen. Die Akkumulation von Lipiden in der Intima, inbesondere von Low density Lipoproteinen (LDL) und seinen oxidierten Formen (Navab et al. 2004; Gotlieb, Silver 2001; Lum, Malik 1994), charakterisiert ebenfalls das Initialstadium. Ausgelöst durch die Lipidablagerungen kommt es zur Invasion von Makrophagen in die Intima. Schließlich leitet die Migration der glatten Gefäßmuskelzellen (Vascular smooth

muscle cells, VSMC) aus der Media in die Intima und deren Proliferation die Bildung der Neointima und Entstehung arteriosklerotischer Plaques ein (Gotlieb, Silver 2001; Sanders 1994; Holvoet, Collen 1997). Die in der Intima akkumulierten Lipoproteine werden von den VSMC und Makrophagen aufgenommen, die sich in Schaumzellen umwandeln. Durch Freisetzung von Zytokinen und reaktiven Sauerstoffmolekülen treiben die Makrophagen die Schädigung der Endothelschicht weiter voran. Besonders oberhalb arteriosklerotischer Läsionen kommt es durch Endothelapoptose zur Endothel-Denudation (Gotlieb, Silver 2001). Vaskuläre Zellen und aktivierte Makrophagen produzieren Zytokine und Wachstumsfaktoren, die zur weiteren Makrophagen-Invasion, VSMC-Proliferation und starken Hochregulierung der Synthese von Substanzen der extrazellulären Matrix führen (Raines, Ross 1996; Raines 2004; Hedin et al. 2004). Das Resultat ist eine veränderte Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (EZM), bei der unter anderem Vitronektin eine Bedeutung zukommt (Holvoet, Collen 1997). Sowohl die Migration als auch die Adhäsion vaskulärer Zellen wird durch die Interaktion von EZM-Substanz mit den Integrin-Rezeptoren kontrolliert, wie der Interaktion zwischen Vitronektin und seinem Rezeptor αvβ3 (Ayad et al. 1998).

Im folgenden Adaptions-Stadium geht der Umbau der Gefäßwand weiter. Neben den arteriosklerotischen Plaqueformen bilden sich in der Neointima sogenannte Atherome, welche gruppierte Schaumzellansammlungen darstellen, mit einem großen Kern aus extrazellulärem Lipid und Zell-Debris (sogenanntem Lipid core). Außerdem bewirkt das Fortschreiten des Remodeling eine Verbreiterung der Neointima, einen Abbau der Lamina elastica und Umbau der Media und Adventitia mit weiterer Reduktion von elastischen Fasern (Gotlieb, Silver 2001). Die Schädigung des Endothels nimmt weiter zu und bewirkt den Verlust der antikoagulatorischen Endothelbarriere (Preissner et al. 1997; Preissner et al. 2000; Holvoet, Collen 1997; Gotlieb, Silver 2001).

Durch kontinuierliches Wachstum der Neointima wird die Arteriosklerose schließlich erst für den Patienten deutlich bemerkbar, im dritten Stadium oder Stadium der klinischen Symptomatik. Die Symptomatik kann schleichend durch progrediente Stenosierung des Lumens oder akut bei Plaquefissur,

hämorrhagischer Ruptur oder thrombotischem Verschluss manifest werden (Gotlieb, Silver 2001). Das Auftreten insbesondere der akuten klinischen Symptomatik hängt von der Stabilität der Plaques ab, welche wiederum abhängig ist von der Zusammensetzung der zellulären und nicht-zellulären Bestandteile. Die Regulation der Zellularität erfolgt dabei vorwiegend über Apoptose und Proliferation von VSMC und Makrophagen sowie die EZM-Produktion (Gotlieb, Silver 2001). Für die Stabilität der Plaques sind dabei der Anteil kollagener Fasern und das Verhältnis von Makrophagen zu VSMC ausschlaggebend (Viles-Gonzalez et al. 2004).

Der dargestellte stadienhafte Verlauf der Neointima-Entwicklung ist im Allgemeinen akzeptiert und auch *in vivo* belegt (Stary 1992; Stary et al. 1995; Gotlieb, Silver 2001; Xu 2004; Yanni 2004; Schwartz 1994). Plaques entstehen in der Einteilung nach Stary aus der initialen Endothelläsion (Typ I), werden dann über Lipideinlagerungen zu lipidreichen Plaques, den fatty streaks, (Typ II), und entwickeln sich über Intermediärläsionen (Typ III) zum eigentlichen Atherom (Typ IV). Aus Atheromen können Fibroatherome (Typ V) mit hohem Kollagengehalt entstehen, die in unterschiedlichem Ausmaß lipidreiche und kalzifizierte Anteile aufweisen (Typ V a-c). Das Auftreten von Komplikationen bei Läsionen vom Typ IV oder V, wie Plaque-Fissur, -Hämorrhagie und Thrombosierung, führt zum komplizierten (Fibro-) Atherom (Typ VI) (Stary 1992; Stary et al. 1994; Stary et al. 1995). In allen Plaqueformen ist Endothelapoptose nachweisbar (Gotlieb, Silver 2001).

Was für ein Ereignis aber leitet die Neointimabildung ein? Als Antwort auf diese Frage ist die „Response-to-Injury“-Hypothese am breitesten akzeptiert. Diese geht davon aus, dass Arteriosklerose der Ausdruck einer abnormen Wundheilung nach Endothelschädigung ist. Die endotheliale Dysfunktion und Apoptose von Endothelzellen bereitet den Weg für Lipidablagerungen und die konsekutive Entwicklung arteriosklerotischer Läsionen (Ross, Glomset 1976; Ross 1986). Daraus folgt, dass der intakten Endothelschicht eine zentrale Bedeutung für die Hemmung der Entstehung von Arteriosklerose und für die verminderte Neointima-Progression zukommt. Eine schnelle Regeneration nach Endothelverletzungen inhibiert die Neointima-Entwicklung. Um entstandene Defekte zu decken, müssen noch vitale Endothelzellen aus der Peripherie

einwandern. Dabei müssen die Migration und Proliferation der Zellen koordiniert ablaufen. Zwar existieren Hinweise über eine Zusammenarbeit zwischen Wachstumsfaktoren wie dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (Vascular endothelial growth factor, VEGF) und Integrinen (Zachary 2001), die genauen Zusammenhänge sind aber in ihren Mechanismen noch unzureichend aufgeklärt.

1.2 Apoptose

Apoptose ist eine spezifische Form des programmierten Zelltodes (Kerr et al. 1972; Wertz, Hanley 1996). Sie unterscheidet sich von dem nekrotischen Zelltod durch eine sehr komplexe Regulation mittels extrazellulärer Faktoren und durch miteinander vernetzte intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden (Isner et al. 1995; Wertz, Hanley 1996). Der apoptotische Zelltod ist der physiologische Gegenpart zur Proliferation in gesunden wie in pathologisch veränderten Geweben und kann durch verschiedene Faktoren induziert werden: Adhäsionshemmung von Adhärenz-abhängigen Zellen, Blockade von Rezeptoren, die zelluläre Überlebens- und Differenzierungssignale vermitteln und Schädigungen des Endothels durch Zunahme der Scherkräfte des Blutes am Endothel (Lawen 2003; Isner et al. 1995; Mallat et al. 2000; Wertz, Hanley 1996). Ebenso können extrinsische Signale wie Zytokine, Apoptose-induzierende Faktoren, Hormone, oxidierte Lipide, Chemotherapeutika und virale Wirkstoffe Apoptose initiieren (Haunstetter, Izumo 1998; Mallat et al. 2000).

Der vorprogrammierte Ablauf der Apoptose kann in mindestens vier funktionell unterschiedliche Stadien eingeteilt werden (Mallat et al. 2000). Eingeleitet wird die tödliche Kaskade durch die Initiations- oder Signalisierungsphase, während der die Zelle das Apoptose-induzierende Signal erhält. Dies geschieht im Falle des extrinsischen Signalweges beispielsweise über die Bindung von apoptosefördernden Molekülen (Tumornekrosefaktor (TNF)-α, Fas-Ligand) an Todesrezeptoren auf der Zelloberfläche (TNFR1, Fas) mit konsekutiver Rekrutierung von sogenannten „Death-Domain“-Proteinen. Die werden wiederum für die Aktivierung von Caspase 8 benötigt. Caspase 8 ist dann

zuständig für die Initiierung der letalen proteolytischen Kaskade (Ashkenazi, Dixit 1998). Der intrinsische Signalweg wird ausgelöst über DNA-Schädigung durch Chemotherapeutika, Bestrahlung, oder Entzug von Überlebenssignalen oder Wachstumsfaktoren und nachfolgender Freisetzung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium (siehe Abb. 1.1).

Auf die Initiationsphase folgt die Kontroll- und Effektorphase. Hier kommt es zur Aktivierung der Caspasen (Green, Kroemer 1998). Caspasen gehören zur Familie der Cystein-Proteasen und werden in zwei Subfamilien, die auslösenden (Initiator-) und die ausführenden (Effektor-) Caspasen eingeteilt (Thornberry, Lazebnik 1998). Sie liegen in der Zelle als inaktive Proenzyme vor und induzieren nach Aktivierung die Apoptose-typischen Prozesse in der Zelle, an deren Ende der Zellabbau zu den sog. Apoptotic bodies steht. Dabei befinden sich die Caspasen 8, 9 und 3 an entscheidenden Knotenpunkten des apoptotischen Signalweges (Mallat et al. 2000). Die Initiator-Caspasen, u.a. Capase 8 und Caspase 9, werden durch Bildung heteromerer Komplexe mit weiteren Molekülen wie den Todesfaktor-Rezeptorkomplex Fas und Fas-associated death domain (FADD) (extrinsischer Signalweg) oder Ced4/Apaf-1 und Cytochrom C (intrinsischer Signalweg) aktiviert. Die Initiator-Caspasen aktivieren die Effektorcaspasen, u.a. Caspase 3 und Caspase 6 (Rossi, Gaidano 2003; Nagata 2000; Wolf et al. 1999), die wiederum die Apoptosesignale im folgenden dritten Stadium weiter ausführen.

Das dritte Stadium der Apoptose ist das der strukturellen Veränderungen und DNA-Degradation. Wie in der Abbildung 1.1 zu sehen, führt hierbei die Caspasenaktivierung über die Effektorcaspasen 3, 6 und 7 zur Spaltung von Lamin, einem Filament der Kernhülle, sowie von Poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP) (Lawen 2003; Rossi, Gaidano 2003).

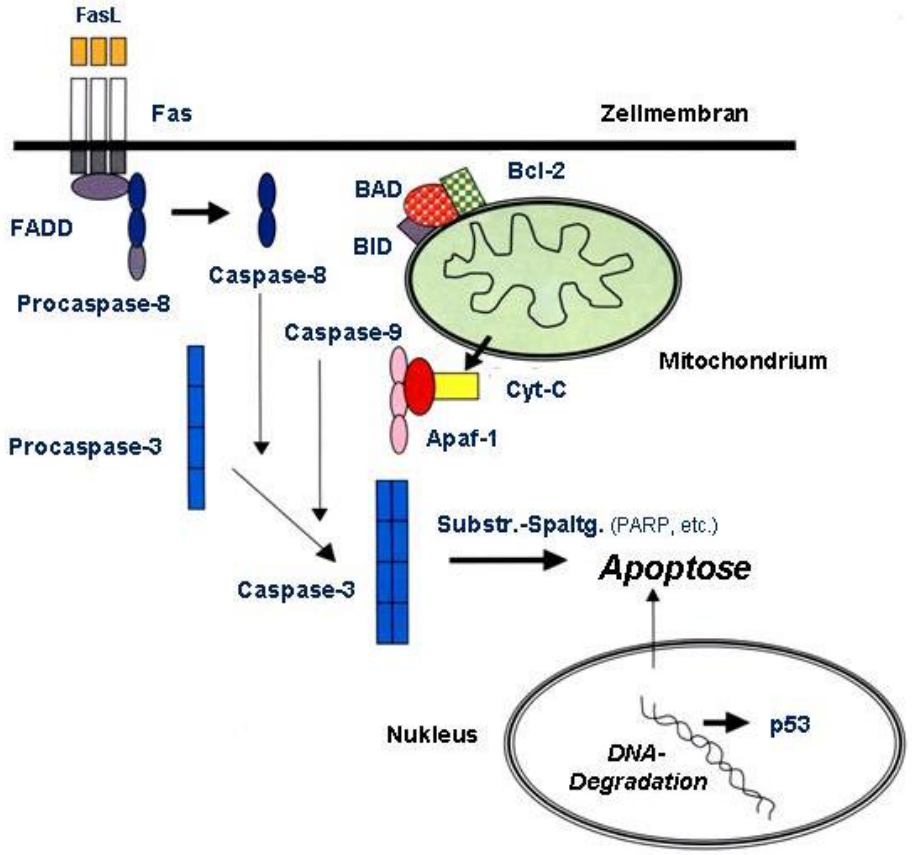


Abbildung 1.1: Modell der klassichen Signaltransuktion der Apoptose

Initiationsphase der Apoptose: Der **extrinsische Weg** wird eingeleitet durch Bindung eines Liganden, wie Fas oder TNFα, an einen Rezeptor der TNF-Rezeptor-Familie, wie FADD oder die TNFRs. Der Rezeptor rekrutiert Procaspase-8 über die Death domain (DD), aktive Caspase 8 löst die Caspasen-Kaskade aus. Der **intrinsische Weg** wird durch Tumorsuppressor-Proteine, wie Transkriptionsfaktor p53, oder Kinasen eingeleitet, die pro-apoptotische Faktoren der Bcl-2 Familie, wie Bad oder Bid, freisetzen. Diese setzen wiederum mitochondriale Faktoren frei, wie Cytochrom C oder AIF (Apoptosis inducing factor). Das Apoptosom bildet sich aus Apaf-1, Cytochrom C und Procaspase 9. Die aktivierte Caspase 9 triggert ebenfalls die Caspasen-Kaskade. **Effektorphase**: Die Effektor-Caspasen 3, 6 und 7 induzieren den apoptotischen Zelltod durch Substratspaltung (z.B. Spaltung des DNA-Reparaturenzyms PARP). Es resultiert DNA-Degradation und Membrane blebbing (Geng, 2001).

Die Fragmentierung und Degradation der genomischen DNA durch Desoxyribonucleasen leitet die Phase der irreversiblen apoptotischen Veränderungen ein. Alle davor liegenden Prozesse bis zur Spaltung der Caspasensubstrate sind prinzipiell reversible, regulierte Prozesse (Mallat et al.

2000). Es kommt zum Abbau von nucleärem Lamin und zytoskelettalem Aktin, die Zellmembran bildet Ausstülpungen (Membrane blebbing), bleibt aber intakt. Die folgende Freilegung von Phosphatidylserin (PS) in die äußere Hülle der Plasmamembran ist ein frühes Merkmal von apoptotischen Zellen und ein kritisches Ereignis für ihre Erkennung durch Makrophagen (Fadok et al. 1992; Fadok et al. 1998). Abschließend kommt es zur Erkennung der apoptotischen Zellen und Beseitigung der Apoptotic bodies aus dem Gewebe durch spezifische Erkennung und Phagozytose durch benachbarte Zellen (Lawen 2003; Rossi, Gaidano 2003).

1.3 Bedeutung der Endothelzell-Apoptose für die Arteriosklerose

Endothelzellen kleiden die Innenwände aller Blutgefäße aus. Sowohl während der normalen Entwicklung als auch in pathologischen Ereignissen sind die Ausbildung neuer Gefäße und die Rückbildung der bereits Vorhandenen von einem Gleichgewicht zwischen Endothelzellproliferation und –apoptose abhängig. Auch in vollentwickelten Gefäßen ist der endotheliale Zellumsatz ein streng regulierter Vorgang. In humanen Endothelzellen aus der Umbilicalvene (HUVEC) ist so unter stabilen Kulturbedingungen auch eine basale Apoptoserate detektierbar (Kaiser et al. 1997). Arteriosklerose ist assoziiert mit einem gesteigerten Umsatz der Endothelzellen, so dass naheliegt, die Endothelzellapoptose mit der Entwicklung von arteriosklerotischen Plaques in Zusammenhang zu bringen (Dimmeler et al. 1998).

Endothelzellen sind adhärente Zellen, die für ihr Uberleben auf Zell-Zell- und v.a. Zell-Matrix-Kontakte angewiesen sind (Brooks et al. 1994; Levkau et al. 1998; Scatena et al. 1998). Der Verlust dieser Kontakte löst Apoptose aus. Die Erklärung dieses Mechanismus liegt in den Integrinen, die die Zell-Matrix-Kontakte vermitteln und dadurch Überlebenssignale an adhäsionsabhängige Zellen übermitteln (Al-Fakhri et al. 2003; Wertz, Hanley 1996). Integrine sind membranständige Rezeptoren für EZM-Substanzen. Die Rezeptordichte und –verteilung auf der Zellmembran und das exprimierte Integrinmuster regulieren die Adhäsionsstärke. Außerdem übermitteln sie Überlebenssignale nach

intrazellulär, modulieren zelluläre Reaktionen auf Signale der Matrix, steuern die Adhäsion und fördern oder inhibieren die Migrationsfähigkeit. Damit sind sie für die Eigenkontrolle der Zellen unverzichtbar (Moiseeva 2001; Ayad et al. 1998; Isacke, Horton 2000). Für Endothelzellen spielt besonders die Interaktion von Vitronektin und αvβ3 eine bedeutende Rolle. αvβ3 erkennt eine Aminsäuresequenz, das RGD-Motif (Arg-Gly-Asp), seines EZM-Liganden (Isacke, Horton 2000). Vitronektin ist ein Glykoprotein, welches Zelladhäsion, Zellausbreitung, Proliferation, Migration und Differenzierung vermittelt. Die Blockade der Integrine durch RGD-Peptide oder anti-adhäsive Faktoren induziert über die Aktivierung von Caspase 3 und die „klassische“ Caspase-Kaskade den programmierten Zelltod (Al-Fakhri et al. 2003).

In situ ist Apoptose in tierischen und humanen arteriosklerotischen Plaques in diversen Studien nachgewiesen worden (Björkerud, Björkerud, 1996; Cai et al. 1997; Isner et al. 1995; Mallat et al. 1997). Während Apoptose in normalen Arterien nicht detektierbar ist, ist sie in fortgeschrittenen arteriosklerotischen Plaques ausgeprägt nachweisbar. Neben glatten Muskelzellen, Makrophagen und T-Lymphozyten (Björkerud, Björkerud, 1996; Cai et al. 1997; Isner et al. 1995; Mallat et al. 1997), sind vor allem auch die Endothelzellen betroffen (Tricot et al. 2000). Die Apoptose von Endothelzellen als Komponente des Gefäßwand-Remodeling stellt einen die Neointima-Progression unterstützenden Faktor dar. Da ein signifikanter Anteil von luminalen Endothelzellen über atherosklerotischen Plaques in Apoptose geht, kann gefolgert werden, dass apoptotische Endothelzellen zum einen die Plaqueerosion initiieren, zum anderen die lokale Thrombozytenaggregation und Tromboseentstehung fördern (Tricot et al. 2000; Mallat et al. 2000).

Das heißt im Umkehrschluss, dass die (therapeutische) Hemmung von endothelialer Apoptose bei Arteriosklerose der Plaqueerosion und Tromboseentstehung einerseits sowie der Neointima-Progression andererseits entgegenwirken könnte.

1.4 Vascular endothelial growth factor

VEGF ist ein Wachstumsfaktor, der unter anderem Überlebenssignale an Endothelzellen vermittelt. Er ist aktuell vor allem wegen seiner Bedeutung für die Neoangiogenese und das Tumorwachstum in das Zentrum des wissenschaftlichen Interesses gerückt. VEGF wirkt potent anti-apoptotisch und fördert die Proliferation von Endothelzellen (Zachary 2001; Choy et al. 2001). Die VEGF-Familie beinhaltet die fünf VEGF-Isoformen VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D und VEGF-E sowie Plazenta-Wachstumsfaktor, PIGF (Zachary 2001; Neufeld et al. 1999; Petrova et al. 1999). Vor allem VEGF-A in seinen unterschiedlichen biologisch aktiven Varianten spielt eine signifikante Rolle für das Endothel. Von VEGF-A gibt es mehrere Isoformen, die durch alternatives Splicen einer mRNA-Spezies entstehen, bestehend aus 121, 145, 165, 183, 189 und 206 Aminosäuren (Zachary 2001). Dabei ist VEGF-A 165 die Form mit der stärksten Wirksamkeit (Zachary 2001).

Für VEGF-A sind zwei unterschiedliche Tyrosinkinaserezeptoren identifiziert worden: VEGFR-1 und VEGFR-2. Ein dritter Tyrosinkinaserezeptor, VEGFR-3, bindet nicht VEGF-A. In Endothelzellen wird die Wirkung von VEGF-A hauptsächlich über VEGFR-2 vermittelt, so dass wir uns in der vorliegenden Arbeit auf diesen konzentriert haben. VEGFR-2 ist ein 230 kDa Protein ohne weitere Splice-Varianten (Petrova et al. 1999). Bei Bindung von VEGF-A 165 kommt es zur Rezeptordimerisierung und –aktivierung mit konsekutiver Transduktion von Signalen mit Einfluss auf die zellulären Funktionen (Matsumoto, Mugishima 2006). Einige der involvierten Signaltransduktionsmoleküle sind bereits identifiziert worden. Nach Aktivierung von VEGFR-2 durch VEGF-A 165 konnte die konsekutive Aktivierung von Extrazellulärer signal-regulierter Kinase (ERK) und von p38 mitogen-aktivierte Proteinkinase (p38 MAPK) nachgewiesen werden (Matsumoto, Mugishima 2006). Ebenfalls ist die Involvierung des Signaltransduktionsmoleküls Akt gezeigt worden, das durch Inhibierung pro-apoptotischer Signalkaskaden, unter anderem über die Hemmung der Caspase 9, das endotheliale Zellüberleben steigert (Petrova et al. 1999; Matsumoto, Mugishima 2006).

Zusätzlich konnte Neuropilin-1 (NP-1) als Korezeptor für VEGFR-2 identifiziert werden (Zachary 2001; Neufeld et al. 1999). NP-1 ist ein 130-140 kDa großes

Oberflächenglykoprotein auf Endothelzellen (Wang et al. 2003; Wang et al. 2007). Bei Koexpression von NP-1 und VEGFR-2, ist die Bindung von VEGF-A 165 viermal stärker als bei alleiniger VEGFR-2 –Expression (Zachary 2001; Wang et al. 2003; Wang et al. 2007). Mittlerweile ist bekannt, dass NP-1 auch unabhängig von VEGFR-2 wichtige Funktionen erfüllt: Das Überleben und die Migration von Endothelzellen sowie deren Adhäsion an Substanzen der extrazellulären Matrix, induziert durch VEGF, können von NP-1 vermittelt werden, auch ohne Kooperation mit VEGFR-2. Ein Mechanismus für die VEGFR-2-unabhängige, NP-1- spezifische Kontrolle des anti-apoptotischen Signalweges von VEGF in Endothelzellen wird vermittelt über Aktivierung von PI3/Akt und p53 und die Caspasenkaskade (Wang et al. 2007). Die genaue Bedeutung von NP-1 innerhalb des komplexen Netzwerkes der VEGF-Signalweiterleitung ist noch unbekannt.

Die Wirkung von VEGF-A 165 wird auch über Wechselwirkungen von Integrinen und VEGFR-2 beeinflusst. Integrin αvβ3 ist in die VEGF-abhängige Regulation von Zelladhäsion, Zellzyklus und Zellüberleben involviert (Petrova et al. 1999). So ist nachgewiesen worden, dass die VEGFR-2-Phosphorylierung und die VEGF-induzierte Mitogenität in HUVEC verstärkt waren, die auf dem αvβ3-Liganden Vitronektin kultiviert wurden. Das bedeutet., dass bestimmte Integrine wie αvβ3 zur vollen Aktivität von VEGFR-2 und damit zu einer gesteigerten VEGF-Wirkung auf Proliferation und Migration beitragen (Petrova et al. 1999; Zachary 2001). Es gibt Hinweise auf eine Beteiligung von PI3K / Akt oder Bcl-2 und A1 an der Übermittlung von Überlebenssignalen. Nachgewiesen ist die VEGF-induzierte Phosphorylierung von PI3K und Akt. Diese Wirkung wird nur über den VEGFR-2 vermittelt und ist durch den spezifischen PI3K-Inhibitor Wortmannin hemmbar (Gerber et al. 1998a). Außerdem ist gezeigt worden, dass VEGF über vermehrte mRNA-Produktion und Proteinexpression von Bcl-2 und A1 einen protektiven Effekt auf Endothelzellen vermittelt (Gerber et al. 1998b). Eine genaue Definition der Signalkaskaden existiert jedoch nicht.

1.5 Poly (ADP-ribose) polymerase, PARP

Das DNA-reparierende Enzym PARP bindet DNA und repariert DNA-Strangbrüche. Somit wirkt es den während der Apoptose aktivierten Desoxyribonucleasen entgegen. Entsprechend führt die Spaltung von PARP zur DNA-Fragmentation und Einleitung des apoptotischen Zellabbaus. Bisher sind mindestens 18 Enzyme der PARP-Superfamilie bekannt. Wir konzentrieren uns jedoch auf PARP-1, welches für über 90% der zellulären Poly(ADP-ribosyl)ationskapazität verantwortlich ist. PARP-1 ist ein 116 kDa- Enzym und stark konserviert. Es konnte in den meisten Eukaryonten nachgewiesen werden, was auf (eine) wichtige physiologische Funktion(en) hinweist. PARP hat einen schützenden Effekt auf das Überleben von Zellen und die Instandhaltung der genomischen Integrität (Bürkle 2001; Virag et al. 2002). Der primäre Aktivierungsmechanismus für PARP-1 wird durch DNA-Brüche induziert. Die biologischen Wirkungen von PARP-1 sind vielfältig: Zum Einen kann es die Exzisionsreparatur von DNA-Basen verstärken. Außerdem wirkt es über die Instandhaltung der genetischen Integrität, auf Replikationsebene, auf dem Level der Transkription und der Proteindegradation (Virag 2005). Im Rahmen der Apoptose ist PARP-1 ein Ziel der Caspasenkaskade, genauer der Effektorcaspase 3, und wird von ihr gespalten. Im Umkehrschluss führen erhöhte PARP-Level in der Zelle (z.B. durch virale Infektion) zu erniedrigter und verspäteter Apoptoseinduktion (Sacco et al. 2003; Tesfaigzi et al. 1998).

Aber zusätzlich zu diesen die Zelle schützenden Wirkungen kann PARP auch als pro-apoptotischer und proinflammatorischer Faktor wirken. Bei exzessivem DNA-Schaden in einer Zelle als Folge von oxidativem Stress kommt es zur Überaktivierung von PARP. Diese hat zur Folge, dass die Zelle, anstatt Apoptose einzuleiten, den nekrotischen Zelltod stirbt (Virag 2005). Dieser Mechanismus scheint in der Pathogenese von bleibenden Schäden nach ischämischen Organinfarkten wie Myokardinfarkt und Apoplex eine entscheidene Rolle zu spielen (Virag 2005). Im Rahmen der endothelialen Dysfunktion bei Diabetes mellitus zeigte sich im Tiermodell, dass PARP über Verbrauch des zellulären NAD^+ die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber physiologischen Stimuli steigert. In der Folge sterben die überempfindlichen Zellen bereits an unterschwelligen Todesreizen (Virag 2005). Außerdem ist

PARP in komplexer Weise an akuten und chronischen entzündlichen Erkrankungen, wie Arthritis, Colitis, Dermatitis, Uveitis und Asthma bronchiale, beteiligt (Virag 2005). Über Stabilisierung der NFκB- und AP-1-induzierten Expression von Entzündungsmediatoren scheint PARP hierbei maßgeblich die entzündliche Aktivität zu unterstützen. Daher führt die pharmakologische Hemmung von PARP zu ausgeprägtem Schutz vor Gewebsverletzungen bei Apoplex, Diabetes, diabetischer endothelialer Dysfunktion, Myokardinfarkt, Schock, und den oben genannten entzündlichen Erkrankungen (Virag 2005).
PARP hat also unterschiedliche Funktionen bei verschiedenen Zelltypen und Aktivierungszuständen von Zellen. Die Bedeutung für die Endothelapoptose erschien daher als ein weiterer wichtiger Untersuchungsgegenstand.

1.6 Signaltransduktion bei Apoptose und Zellüberleben vaskulärer Zellen

In der Regulation von Zellüberleben, Proliferation und auch Apoptose spielen verschiedene Signaltransduktionsmoleküle eine wichtige Rolle, insbesondere die mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK) p38 MAPKs, die extrazelluläre signal-regulierte Kinase-1 und -2 (ERK-1 und –2), die c-Jun NH_2-terminale Kinase (JNK/SAPK) sowie Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3) / Akt.
Die Familie der MAPK spielt eine wichtige regulatorische Rolle im Hinblick auf Proliferation und Apoptose von Zellen. Diese Proteinkinasen leiten vielfältige Stimuli als Signale von der Zellmembran an den Nukleus weiter (Davis 2000; Chang, Karin 2001; Johnson, Lapdat 2002; Werlen et al. 2003). MAPKs sind Serin/Threonin-Kinasen, die ihre spezifischen Substrate an Serin-/Threoninresten phosphorylieren. Diese Phosphorylierung kann das Substrat sowohl aktivieren, als auch inaktivieren und somit eine ganze Signalkaskade an- oder auch ausschalten. Die MAP-Kinasen vermitteln Genexpression, Mitose, Proliferation, Metabolismus, Motilität und Apoptose von Zellen (Davis 2000; Chang, Karin 2001; Johnson, Lapdat 2002; Werlen et al. 2003). Aktiviert werden sie über zweifache Phosphorylierung, die über eine MAPK-Kinase (MAPKK) vermittelt wird. Deren Aktivierung wiederum geschieht über

Phosphorylierung durch eine MAPKK-Kinase (MAPKKK). Somit werden die MAPKs über eine Kinasen-Signalkaskade aktiviert (Davis, 2000).

Die MAPK-Familie besteht aus drei Mitgliedern: den extrazellulären Signal-regulierten Kinasen, ERKs, den c-Jun NH_2-terminalen Kinasen, JNKs, und den p38 MAPKs. Jedes Familienmitglied hat seine Subfamilie: ERK-1 und ERK-2, JNK-1, -2 und-3, sowie p38 MAPK α, β, γ und δ (Davis 2000; Chang, Karin 2001; Johnson, Lapdat 2002).

ERK-1 und ERK-2 sind gut charakterisierte MAPKs, die als Reaktion auf Wachstumsstimuli aktiviert werden. Die sog. „Stresskinasen" JNKs und p38 MAPKs werden als Antwort auf unterschiedliche Stressoren aktiviert, wie Änderung der Osmolarität, DNA-Schädigung, Hitze, Ischämie, entzündliche Zytokine und UV-Bestrahlung. Alle MAPKs sind in Proliferation, Differenzierung, Zellmigration und Zytoskelett-Reorganisation, darüber hinaus aber auch in Stressreaktionen und den Zelltod involviert (Davis 2000; Chang, Karin 2001; Johnson, Lapdat 2002; Dent et al. 2003). Akt ist eine PI3K nachgeschaltete Proteinkinase. Die gemeinsame Beteiligung beider Kinasen an anti-apoptotischen Signalwegen in unterschiedlichen Zelltypen, wie Endothelzellen, Neuronen und VSMC, ist in der Literatur gut belegt (Downward 1998; Gerber et al. 1998a). Aus diesen vielfältigen Funktionen der Signalmoleküle wird die Komplexität dieses Netzwerks zur Entscheidung über Leben und Tod einer Zelle deutlich. Alle diese Signalmoleküle haben wichtige Funktionen innerhalb dieses Netzwerkes und sind daher auch Untersuchungsgegenstand der vorliegenden Arbeit im Rahmen der Analyse einer möglichen Beteiligung an VEGF-getriggerten, anti-apoptotischen Signalwegen.

1.7 Fragestellung und Zielsetzung

Die Apoptose und insbesondere die Endothelzellapoptose hat eine wichtige Bedeutung für die Entwicklung von Arteriosklerose und stellt einen entscheidenden Faktor für die Entstehung und die Progression der Arteriosklerose dar. Verschiedene anti- und pro-apoptotische Faktoren spielen bei Arteriosklerose eine Rolle, wie der Wachstumsfaktor VEGF als stärkster

anti-apoptotischer Faktor für Endothelzellen. VEGF bewirkt eine ausgeprägte Stimulation von Proliferation, Migration und Angiogenese, hierzu gibt es zahlreiche Untersuchungen (Neufeld et al. 1999; Zachary 2001). Zur anti-apoptotischen Wirkung von VEGF gibt es jedoch nur wenige Daten, die die potente Apoptose-hemmende Wirkung von VEGF an Endothelzellen nicht ausreichend erklären. Hier könnten verschiedene anti-apoptotische Signalwege über ERK -1/-2, MAPK p38, JNK und PI3K/Akt eine Rolle spielen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass VEGF über die Regulation des DNA-Schutzproteins PARP wirkt. VEGF könnte PARP induzieren, um die Auswirkung der Caspasenaktivierung zu neutralisieren und so die nukleären Zellstrukturen von Endothelzellen vor der Ausführung der Apoptose zu bewahren. In Endothelzellen könnte VEGF über die Induktion von PARP die Schwelle zur Apoptose erhöhen und so das Überleben der Endothelzellen unterstützen.

In der vorliegenden Arbeit soll daher der Effekt von VEGF auf die Regulation des intrazellulären anti-apoptotischen Proteins PARP untersucht werden.

Folgende Fragen sollen beantwortet werden:

1) Kann VEGF die durch Adhäsionshemmung induzierte Apoptose an Endothelzellen hemmen?
2) Induziert der Wachstumsfaktor VEGF die Expression des Apoptoseschutzproteins PARP in Endothelzellen? Auf welcher intrazellulären Ebene wird die durch VEGF induzierte Expression von PARP reguliert?
3) Über welchen Rezeptor bzw. welche Rezeptoren wird die Wirkung von VEGF vermittelt?
4) Welche Transduktionsmoleküle sind in die Signalvermittlung von VEGF involviert?
5) Steht die Regulation von PARP ursächlich in Zusammenhang mit dem anti-apoptotischen Effekt von VEGF?

2 Materialien und Chemikalien

2.1 Zellkultur

2.1.1 Zelllinien

HUVEC-c	Primäre Nabelschnurvenen-Endothelzellen, gepoolt von 5 Spendern (Promo-Cell, Heidelberg)
EA.hy. 926	Immortalisierte makrovaskuläre Endothelzelllinie, Fusion von HUVEC mit humaner pulmonaler Adenokarzinomlinie A549 (Edgell et al. 1983)
hCMEC/D3	Immortalisierte mikrovaskuläre Endothelzelllinie, humane zentralnervöse, mikrovaskuläre Endothelzellen, lentiviral transfiziert mit hTERT und SV40-T (Weksler et al. 2005)

2.1.2 Zellkulturmedium, -zusätze & -chemikalien

Antibiotic-Antimycotic-Solution	PAA Laboratories GmbH
DMSO	Merck
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	PAA Laboratories GmbH
Endothelial Cell Growth Mix	Promo-Cell
FCS (Fetal Calf Serum) Gold	PAA Laboratories GmbH
Hepes BSS	Detach-Kit-30, Promo-Cell
Isopropanol	Roth
Supplement Mix	Promo-Cell
Trypsin/EDTA-Lsg. 0.4%	Detach-Kit-30, Promo-Cell
Trypsin-Neutralisationslsg. (TNS) aus Sojabohnen 0.05%	Detach-Kit-30, Promo-Cell

2.1.3 Zellkulturmaterialien & -geräte

Brutschrank BBD 6220	Heraeus
Sterilbänke HERA Safe und HERA Safe H 12	Heraeus
Sterile 6-Well-Platten mit Deckel	Nunc
Zellkulturflaschen 75 cm^2	Nunc
Zellkulturschalen mit Deckel, 60×15 mm	Nunc

Zentrifuge	Heraeus

2.1.4 Chemikalien für Inkubationsversuche

Actinomycin D	Sigma
bFGF	Peprotech
BSA Albumin Fraktion V	Serva
Cycloheximid	Sigma
cRGDfV	Bachem
TGF-β	Peprotech
VEGF-165	R&D Systems GmbH
VEGFR-2-Inhibitor SU 5416	Calbiochem

2.2 RNA-Aufreinigung aus Einzelzellsuspensionen

2.2.1 Chemikalien

APL –Puffer	AllPrep RNA/Protein Kit, Qiagen
ß-Mercaptoethanol	Sigma
Ethanol (96 %; 70%)	Roth
RLT-Puffer RW1-Puffer RPE-Puffer RNase-freies Wasser	AllPrep RNA/Protein Kit, Qiagen

2.2.2 Materialien & Geräte

AllPrep Mini Spin Säulen in einem 2.0 ml Sammelröhrchen	AllPrep RNA/Protein Kit, Qiagen
RNeasy Mini Spin Säulen in einem 2.0 ml Sammelröhrchen	AllPrep RNA/Protein Kit, Qiagen
Kühlzentrifuge BIOFUGE fresco	Kendro
Sammelröhrchen (2.0 ml, 1.5 ml)	Eppendorf
Vortexer	Heidolph

2.3 RNA-Konzentrationsbestimmung

2.3.1 Chemikalien & Geräte

RNase freies Wasser	AllPrep RNA/Protein Kit, Qiagen
Ultraspec 3100pro UV/Visibel Spectrophometer	Biochrom

2.4 Verdau der DNA

2.4.1 Chemikalien

Desoxyribonuclease I Amplifikation Grade	Invitrogen
RNase freies Wasser	Qiagen

2.4.2 Materialien & Geräte

HLC Block Thermostat	HLC-Biotech
Mikrozentrifugenröhrchen (0.5 ml)	Eppendorf

2.5 Reverse Transkription

2.5.1 Chemikalien

10×DNAse Puffer dNTP Omniscript Reverse Transkriptase	Omniscript® Reverse Transcription Kit, Qiagen
Oligo-dT 18 Primer	Promega

2.5.2 Materialien & Geräte

Biometra TRIO-Thermoblock	Biometra
Mikrozentrifuge 22R	Hettich

2.6 Qualitative PCR

2.6.1 Chemikalien

Ethidiumbromidlösung	Roth
Gel-Loading-Solution Typ 1	Sigma
HotStarTaq Master Mix	Qiagen
PeqGOLD 100bp DNA-Leiter	Peqlab
Primer (sense und antisense) PARP, GAPDH	Eurofins Operon
Qiaex II Gel Extraction Kit	Qiagen
ROTI® Agarose Ultra-Qualität	Roth
TBE-Puffer 100 mM TRIZMA Base 90 mM Bor-Säure 4 mM Na_2EDTA (EDTA Dinatriumsalz Dihydrat) NaOH (Natriumhydroxid Plätzchen)	 Sigma Sigma Roth Merck

2.6.2 Geräte

Biometra TRIO-Thermoblock	Biometra
Geldokumentationsstation: GelDoc 2000 imaging system	BioRad

2.7 Quantitative PCR

2.7.1 Chemikalien

QuantiTect ™SYBR®Green PCR Master Mix	Qiagen
Primer	Eurofins Operon

2.7.2 Material & Geräte

Light-Cycler® LC II	Roche
Light-Cycler® Capillaries (20µ)	Roche
LC®-Software, Version 5.32	Roche

2.8 RNA-Interferenz (RNAi)

2.8.1 Chemikalien:

RNAi Human/Mouse Starter Kit HiPerFect Transfection Reagent AllStars Negative Control siRNA, Alexa Fluor® 488 Labeled siRNA Suspension Buffer	Qiagen
Flexi Tube siRNA (PARP)	Qiagen

2.9 Flowzytometrische Bestimmung der apoptotischen Zellen

2.9.1 Chemikalien

Annexin V-FITC 10 x Bindungs-Puffer Propidium Iodid	Annexin V-FITC Kit, Immunotech
BSA Albumin Fraktion V	Serva
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline	PAA Laboratories

2.9.2 Materialien & Geräte

Durchflusszytometer FACSort 4CS	BD Biosciences
FACS-Röhrchen	BD Biosciences
Kühlzentrifuge BIOFUGE fresco	Kendro
Sammelröhrchen (1.5 ml)	Eppendorf
Software: Mac OS 8.6	Apple
Spitzbodenröhrchen (15.0 ml)	Sarstedt
Vortexer	Heidolph

2.10 Vitalitätstest mittels Trypanblaufärbung

2.10.1 Chemikalien

Trypanblau (Trypan blue solution 0,4%)	Sigma
Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline	PAA Laboratories
FCS (Fetal Calf Serum) Gold	PAA Laboratories

2.10.2 Materialien

Cell Counter Casy Ton	Schärfe Systems

2.11 PARP-Aktivitätsassay

2.11.1 Chemikalien

3-Aminobenzamide PARP-HSA Enzyme PARP Buffer 10 x PARP Cocktail 10 x Activated DNA 10 x Strep-Diluent Strep-HRP TACS-Sapphire™	PARP Universal Corlorimetric Assay Kit, R & D-Systems
Complete Protease Inhibitor	Roche
NaCl 0,4 M	Sigma Aldrich
Tween 20%	Roth

2.11.2 Materialien

96-Well-Platte	PARP Universal Corlorimetric Assay Kit, R & D-Systems
Mikrotiterplattenreader Sunrise mit der Photometersoftware Magellan	Tecan

2.12 Immunfluoreszenz

2.12.1 Chemikalien

5 % Formaldehyd/PBS	Acros
5 % Ziegenserum	Dianova
Primärantikörper: Anti-VEGFR-2 1:1000 in PBS Anti-NP-1 1:100 in PBS	 Biosource Invitrogen
Sekundärantikörper: Cyanocyanin 2 Anti-rabbit 1:200 Cyanocyanin 3 Anti-rabbit 1:200	Dianova
DAPI (4',6-Diamidino-2'-phenylindol)	Sigma

2.12.2 Geräte

Inversmikroskop IX81	Olympus

2.13 Protein-Aufreinigung aus Einzelzellsuspensionen

2.13.1 Chemikalien

APL –Puffer	AllPrep RNA/Protein Kit, Qiagen
Azeton	Acros
Complete Protease-Inhibitor Tablette	Roche

2.13.2 Materialien & Geräte

AllPrep Mini Spin Säulen in einem 2 ml Sammelröhrchen Protein Cleanup Mini Spin Säulen	AllPrep RNA/Protein Kit, Qiagen,
Kühlzentrifuge BIOFUGE fresco	Kendro
Sammelröhrchen (2.0 ml, 1.5 ml)	Eppendorf

2.14 Protein-Konzentrationsbestimmung

2.14.1 Chemikalien

Reagenz A, Reagenz B, Albumin Standard	BCA Protein Assay Kit, Pierce

2.14.2 Materialien & Geräte

Brutschrank BBD 6220	Heraeus
Mikrotiterplattenreader Sunrise mit der Photometersoftware Magellan	Tecan
Schüttelinkubator GFL3031	GFL
96-Well-Microtiterplatte	Nunc

2.15 Western-Blot

2.15.1 Chemikalien

Ammonium-Persulfat	Roth
Blotpapier	Kobe
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	PAA Laboratories
Entwicklungslösung	Agfa
Filmpapier	Amersham
Luminiszenzlösung	SuperSignal West Pico Chemilumineszenz-Substrat, Pierce
Marker: Bench Marker	Invitrogen
Milchpulver	Roth
Ponceaulösung	Sigma
Rotiphorese Gel 30	Roth
SDS	Roth
Membran	Milipore
TEMED	Serva

2.15.2 Puffer

10 x Laufpuffer	1 % SDS 2,8 % Glycin 7,5 M TrisBase H_2O dest.	Roth Roth Roth Braun
Probenpuffer	1,5 M Tris 20 % SDS Glycerin β-Mercaptoethanol Bromphenolblau H_2O dest.	Roth Roth Roth Sigma Sigma Braun
Sammelgelpuffer	0,6 % SDS 1,5 M Tris Base H_2O dest. HCL (zu pH 6,8)	Roth Roth Roth Roth
Transferpuffer (Semi-dry-Puffer)	48 mM TrisBase 39 mM Glycin 0,04 % SDS 20 % Ethanol absolut H_2O dest.	Roth Roth Roth Roth Braun
Trenngelpuffer	0,4 % SDS 1,5 M TrisBase H_2O dest. HCL (zu pH 8,8)	Roth Roth Braun Roth

2.15.3 Primärantikörper

Anti-PARP	rabbit-anti-human (polyklonal), 1:1000 goat-anti-human (polyklonal), 1:1500 mouse-anti-human (monoklonal), 1:1000	Cell-Signaling R&D Systems Sigma, clone C-2-10
Anti-Akt, Anti-phospho-Akt (Ser473 und Thr308)	rabbit-anti-human (polyklonal) 1:500	Cell Signaling
Anti-SAPK/JNK Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)	rabbit-anti-human (polyklonal) 1:500	Cell Signaling
Anti-p44/42 MAP kinase Anti-phospho-p44/42 MAP kinase (Thr202/204)	rabbit-anti-human (polyklonal) 1:500	Cell Signaling
Anti-p38 MAP kinase Anti-phospho-p38 MAP kinase (Thr180/Tyr182)	rabbit-anti-human (polyklonal) 1:500	Cell Signaling

2.15.4 Sekundärantikörper

Anti-Goat-IgG	rabbit-anti-goat (polyklonal), 1:2000	Sigma
Anti-Mouse-IgG	goat-anti-mouse (polyklonal), 1:1000	Sigma
Anti-Rabbit-IgG	goat-anti-rabbit (polyklonal), 1:2000	Sigma

2.15.5 Software

GelDoc 2000 Imaging System	BioRad
Quantity One, Version 4.5	BioRad.
TINA-Quant, Version 2.09c	Raytest

3 Methoden

3.1 Zelllinien und Zellkultivierung

In allen Experimenten wurden zwei verschiedene Zellarten verwendet: Zum Einen die Zelllinie EA.hy926, eine humane makrovaskuläre Endothelzelllinie (Edgell et al. 1983), zum Anderen humane Endothelzellen aus der Umbilicalvene (HUVEC). Die VEGF-Stimulationsversuche mit anschließender Apoptosemessung wurden auch in hCMEC/D3, einer humanen mikrovaskulären Endothelzelllinie (Weksler et al. 2005), reproduziert (4 Versuchswiederholungen). Im Rahmen der Versuchsprotokolle wurden die Zellen in einer 75 cm^2 Kulturflasche mit 15 ml PromoCell Endothelial Cell Growth Mix in Serum- und Zusatz-freiem Medium inkubiert. Für optimale Proliferationsbedingungen wurde das Medium alle zwei Tage mit der Pipette entfernt und durch frisches Medium ersetzt.

Zum Umsetzen der Zellen wurden diese mit 7,5 ml Trypsin pro 75 cm^2 Kulturflasche gelöst, mit der gleichen Menge Trypsin-neutralisierender Lösung (TNS) neutralisiert, bei 500 × g für 4 Minuten zentrifugiert, in Vollmedium resuspendiert und je nach Menge auf zwei bis drei neue, mit Vollmedium befüllte, Kulturflaschen verteilt.

Zum Wiedereinfrieren der Zellen wurden diese wie beim Umsetzen mit Trypsin gelöst, neutralisiert, zentrifugiert und danach in 900 µl FCS + 10 µl DMSO resuspendiert und in einem Cryotube in Isopropanol zunächst bei -80°C zwischengefroren und nach einigen Stunden in flüssigem Stickstoff weggefroren.

3.2 Inkubationsprotokolle

Für alle folgenden Versuche wurden EA.hy926 bzw. HUVEC auf Vitronektin-beschichteten (2 µg/ml) 6-Well-Platten ausgesät. Für die VEGF-Stimulationen wurde VEGF-165 eingesetzt, die Isoform von VEGF-A mit der stärksten biologischen Wirksamkeit am Endothel und Ligand von VEGFR-„ und NP-1

(Zachary 2001). Im Folgenden werden EA.hy926 bzw. HUVEC vereinfachend nur als EC bezeichnet. Die Versuche zur Dosis-Abhängigkeit (siehe 3.2.1) und Apoptosehemmung durch VEGF (siehe 3.2.2) wurden in mikrovaskulären hCMEC/D3 reproduziert. Alle Experimente erfolgten im Duplikat oder Triplikat und wurden drei- bis siebenmal wiederholt

3.2.1 Protokoll für Zeit- und Dosis-Abhängigkeit der VEGF-Inkubation

EC wurden über unterschiedliche Zeitspannen von 4 bis 48 Stunden in serumfreien Medium mit oder ohne VEGF inkubiert, um die Zeitpunkte der maximalen mRNA- und Proteinproduktion von PARP zu bestimmen. Diese Inkubationen wurden mit unterschiedlichen VEGF-Konzentrationen von 100 pg/ml bis 1 µg/ml (5×10^{-12} M - 5×10^{-8} M) durchgeführt. Nach Bestimmung der optimalen VEGF-Konzentration für die RNA- und Proteinproduktion bei einmaliger VEGF-Stimulation, wurden die Inkubationsprotokolle weiter variiert. Dazu wurden Stimulationen mit VEGF 100 pg/ml bis 1 µg/ml (5×10^{-12} M - 5×10^{-8} M) ein-, zwei- oder dreifach wiederholt in Abständen von 16, 24 und 48 Stunden in serumfreiem Medium durchgeführt. Dies ermöglichte den Vergleich des Effekts einer einzigen Stimulation mit dem Resultat mehrerer VEGF-Stimulationen.

Negativkontrollen wurden ohne Zusatz von VEGF in serumfreien Medium auf Vitronektin inkubiert. Für die Positivkontrollen wurden Zellen in Wells mit dem anti-adhäsiven BSA ausgesät, welches über Adhäsionshemmung Apoptose induziert (siehe 1.2).

3.2.2 Protokoll für Apoptosehemmung durch VEGF

EC wurden mit VEGF in serumfreien Medium und mit dem αvβ3-Integrininhibitor cRGDfV (cyclo-[Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val]) laut nachfolgend beschriebenen Versuchsprotokollen inkubiert. cRGDfV ist ein spezifischer Integrininhibitor, der die Adhäsion von Endothelzellen an Vitronektin via Integrin αvβ3 hemmt und so Apoptose induziert (Al-Fakhri et al. 2003).

EC wurden für 48 Stunden mit VEGF 100 pg/ml - 100 ng/ml (5 x 10^{-12} - 5 x 10^{-9} M) inkubiert, darauf folgte die Inkubation mit dem pro-apoptotischen cRGDfV 5 µg/ml für 24 Stunden. Dieses Experiment wurde ebenfalls variiert durch zwei- oder dreimalige VEGF-Stimulationen (in Intervallen von 16, 24 und 48 Stunden) und nachfolgender cRGDfV-Inkubation über 24 Stunden. Zusätzlich wurden Zellen auch simultan mit VEGF 100 pg/ml - 100 ng/ml (5 x 10^{-12} - 5 x 10^{-9} M) und cRGDfV 5 µg/mL über 24 Stunden inkubiert. Um sicherzugehen, dass der Effekt von VEGF kein genereller Effekt von Wachstumsfaktoren ist, wurden Zellen in ähnlicher Weise wie oben beschrieben mit bFGF und TGF-β in den Konzentrationen 10 ng/ml bis 1 ng/ml (5 x 10^{-10} – 5 x 10^{-11} M) inkubiert und anschließend mit cRGDfV inkubiert.

Negativkontrollen wurden ohne Zusatz von VEGF in serumfreien Medium inkubiert. Positivkontrollen wurden nur mit cRGDfV in serum-freiem Medium auf Vitronektin-Substrat inkubiert, zusätzliche Positivkontrollen wurden auf anti-adhäsivem BSA-Substrat in serumfreien Medium inkubiert.

3.2.3 Protokoll für Signaltransduktionsinduktion von VEGF

Die zur Hochregulierung von PARP führende Signaltransduktion wurde folgendermaßen analysiert: EC wurden mit unterschiedlichen VEGF-Konzentrationen von 100 pg/ml bis 100 ng/ml (5 x 10^{-12} - 5 x 10^{-9} M) in serumfreien Medium über kurze Zeitintervalle von 15 bis 120 Minuten (15-30-60-120 Minuten) inkubiert. Negativkontrollen ohne VEGF-Stimulation wurden gleichermaßen mitgeführt.

3.2.4 Protokoll für Inkubationen mit AD und CHX

EC wurden mit VEGF 1 ng/ml bis 100 ng/ml (5 x 10^{-11} - 5 x 10^{-9} M) und mit oder ohne Zugabe der Inhibitoren Actinomycin D (AD) 1 µg/ml (Transkriptionshemmer) oder Cycloheximid (CHX) 2 µg/ml (Translationshemmer) über 24 Stunden in serumfreien Medium auf Vitronektin-Substrat inkubiert. Dadurch sollte ermittelt werden, ob die durch VEGF induzierte Produktion von PARP auf transkriptionaler (AD) oder translationaler (CHX) Ebene reguliert wird. Parallel wurden Inhibitorkontrollen mitgeführt,

indem Zellen entweder nur mit 1 µg/ml AD bzw. nur mit 2 µg/ml CHX inkubiert wurden. Negativkontrollen wurden sowohl ohne VEGF als auch ohne Inhibitoren in serumfreien Medium auf Vitronektin-Substrat inkubiert.

3.2.5 Protokoll für Inkubationen mit VEGF-Rezeptorinhibitor

Der spezifische VEGFR-2-Inhibitor SU5416 wurde eingesetzt, um zu verifizieren, dass die Interaktion zwischen VEGF und VEGFR-2 an der Hochregulation von PARP beteiligt ist. EC wurden nach einmaliger Gabe von VEGF 1 ng/ml bis 100 ng/ml (5×10^{-11} - 5×10^{-9} M) in serumfreien Medium auf Vitronektin-Substrat über 24 Stunden inkubiert, mit oder ohne Zusatz von SU5416 in den in der Literatur beschriebenen Konzentrationen von 1-5 µM (Bocci et al. 2004; Bischof et al. 2004), sowie zusätzlich 10 µM. Inhibitorkontrollen wurden nur mit SU5416 durchgeführt und Negativkontrollen ohne Zugabe von VEGF oder Inhibitoren.

3.2.6 Inkubationen mit siRNA

Short interfering RNA (siRNA) von PARP wurde genutzt, um den anti-apoptotischen Wirkmechanismus von VEGF über die Regulation von PARP zu beweisen und quantitativ abschätzen zu können. Die anti-apoptotische Wirkung von VEGF müsste sich bei Vermittlung über PARP durch Blockade der PARP-Produktion mithilfe von siRNA ganz oder teilweise aufheben lassen. In Vorversuchen wurde der Zeitpunkt der maximalen RNA- und Protein-Reduktion durch Analyse 24, 48 und 72 Stunden sowie 5 und 7 Tage nach Inkubation mit PARP siRNA bestimmt. EC wurden dabei mit oder ohne VEGF 10 ng/ml (5×10^{-10} M) inkubiert. In den Hauptversuchen wurden EC zunächst mit Transfektionsansätzen (siehe 3.3.2) inkubiert. Nach 24 Stunden erfolgte die ein- bis dreimalige Stimulation der Zellen mit VEGF 1 ng/ml bis 100 ng/ml (5×10^{-11} - 5×10^{-9} M). Die Mehrfachstimulationen erfolgten in 48-stündigen Abständen. Anschließend wurde mit cRGDfV 5 µg/ml Apoptose induziert. Wiederum 20-24 Stunden später erfolgten das Ernten der Zellen und die weitergehenden Analysen.

3.3 Molekularbiologische Nachweismethoden

3.3.1 mRNA-Nachweis und –Quantifizierung

3.3.1.1 RNA-Aufreinigung aus Einzelzellsuspension

Die Technik der RNA-Isolierung mit dem AllPrep RNA/Protein Kit (Qiagen) kombiniert das selektive Binden von RNA an eine Silica-Gel-Membran mit der gleichzeitigen Aufreinigung von Proteinen (siehe 3.3.6.1). Ein Puffersystem mit hohem Salzgehalt ermöglicht die Bindung von RNA, die länger als 200 Basen lang ist, an eine Silica-Gel-Membran. Dadurch ist diese Technik relativ spezifisch für mRNA, denn nur diese ist größer als 200 Nukleotide. Die Proben werden mit einem denaturierenden Guanidine-Isothiocyanate Puffer (RLT-Puffer mit ß-Mercaptoethanol) versetzt, welcher sofort RNAsen inaktiviert und die Zellen lysiert.

Die Zellen wurden wie in 2.1 beschrieben gewonnen, zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Maximal 1 x 10^7 Zellen aus dem Pellet wurden in 700 µl RLT-Puffer aufgenommen und durch mehrmaliges Pipettieren homogenisiert und lysiert. Die homogenisierten Proben wurden mit 700 µl 70%igem Ethanol gemischt und jeweils auf eine Spin Säule gegeben. Mit drei aufeinanderfolgenden Waschschritten in RW1- bzw RPE-Puffer wurden Zellreste und Kontaminationen entfernt. Mit einem letzten Zentrifugationsschritt wurden alle noch vorhandenen Pufferreste entfernt und die aufgereinigte RNA konnte in 30 µl RNAse-freiem Wasser von der Säule gelöst werden.

3.3.1.2 RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der mRNA wurde photometrisch bestimmt. Die RNA wurde 1:50 mit RNAse-freiem Wasser verdünnt und über Messung der Absorption der Probe bei 260 nm wurde der RNA-Gehalt ermittelt. Durch gleichzeitige Messung der Absorption bei 280 nm und Ermittlung des Quotienten aus der Absorption bei 260 nm und 280 nm konnte zudem eine Aussage über die

Reinheit der RNA-Probe gemacht werden. Bei Proben mit hohem Reinheitsgrad liegt dieser Quotient zwischen 1,8 bis 2,0.

3.3.1.3 Verdau der DNA

Um die gegebenenfalls vorhandene DNA aus der RNA-Probe zu entfernen, führte man einen DNase-Verdau durch. Hierzu wurde das Enzym Desoxyribonuclease I (DNase I) verwendet. Die RNA (1 µg/µl in RNase-freiem Wasser) wurde mit 1 U DNase I und 1 µl Reaktionspuffer vermischt (zu insgesamt 10 µl Reaktionsvolumen) und bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion des DNA-Abbaus wurde nach 15 Minuten durch Zugabe von 1 µl EDTA (25 mmol/l) und Inkubation bei 65°C gestoppt. Die DNA-freie RNA wurde bei -80°C gelagert.

3.3.1.4 Reverse Transkription

Für die weitere Analyse wurde die mRNA mithilfe von Reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Die Technik der Reversen Transkription basiert auf der Verwendung von retroviraler Reverser Transkriptase und einem Oligonukleotid (Oligo-dT $_{18}$), das zum 3'Ende eukaryotischer mRNAs komplementär ist, welches zahlreiche Adeninreste besitzt („Poly-A-Schwanz").

Die Reverse Transkription wurde mithilfe des Omniscript Kits (Qiagen) durchgeführt. Dazu wurden zu jedem Ansatz (20 µl Reaktionsvolumen mit mRNA 1 µg/µl) 0.5 mmol/l dNTP Mix, 1 µmol/l Oligo-dT$_{18}$ Primer, 4 U der Reversen Transkriptase, 10 U RNase-Inhibitor und Rnase-freies Wasser pipettiert. Für die cDNA-Synthese wurden die Reaktionsansätze zunächst für 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch Hitzeinaktivierung der Reversen Transkriptase bei 93°C für 5 Minuten wurde die Reaktion beendet. Die entstandene cDNA konnte bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert werden.

3.3.1.5 Qualitative Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) zur Herstellung der externen Standards

In der Polymerase-Ketten-Reaktion kann man beliebige DNA-Abschnitte amplifizieren und diese anschließend in einer Gelelektrophorese sichtbar machen (Coen 1999). Sie wurde zur Herstellung der externen PCR-Standards für die Real-time PCR genutzt.

Das Ziel der PCR ist die Amplifikation eines DNA-Abschnittes zwischen zwei Primern. Die Temperatur wird dabei so gewählt, dass eine spezifische Anlagerung der Primer an die DNA-Matritze stattfinden kann. Die Primer dienen als Ansatzpunkt für die DNA-Polymerase, die die komplementären DNA-Sequenzen synthetisiert. Anschließend erfolgt ein Denaturierungsschritt, um die neu entstandenen DNA-Stücke von der Matritze bzw. im weiteren Verlauf die Doppelstränge voneinander zu trennen. Es folgen weitere Zyklen mit der Hybridisierung von Primern (Annealing), der DNA-Strang-Synthese (Extension) und Denaturierung.

PCR-Programm

Aktivierung	15 min	95°C	
Denaturierung	1 min	94°C	
Annealing	40 s	PARP: 59°C GAPH: 62°C	30 Zyklen
Extension	1 min	72°C	
Finale Extension	10 min	72°C	

Die qualitative PCR wurde mithilfe des HotStarTaq Master Mix (Qiagen) durchgeführt. Die hierbei verwendete Taq-Polymerase wird erst durch einen Inkubationsschritt von 15 Minuten bei 95°C aktiviert.

PCR-Ansatz	µl
HotStarTaq	25
Primer sense (25 pmol/µl)	1
Primer antisense (25 pmol/µl)	1
H_2O	22
cDNA (10 ng/µl)	1
Gesamt	50

Die korrekte Annealingtemperatur war abhängig von der Sequenz der verwendeten Primer und wurde in Vorversuchen ausgetestet. Die Primer sind in Tabelle 3.1 gelistet.

Zum Nachweis des PCR-Produkts wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt. Hierfür versetzte man 5 µl des PCR-Produktes mit 1 µl Gel-Loading-Solution 1 (0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylene Cyanol FF und 40% Saccharose) und trug diesen Ansatz und parallel einen entsprechenden DNA-Gewichtsmarker auf ein 1,5 % iges Agarosegel (1,5 g Agarose in 100 ml TBE-Puffer) auf. Dem Gel wurden 5 µl Ethidiumbromid zugesetzt, welches in die doppelsträngige DNA interkaliert und sie dadurch anfärbt. Als Laufpuffer wurde TBE-Puffer verwendet. Die Durchführung der Elektrophorese erfolgte bei 100 Volt für 1 Stunde. Visualisiert wurde das Ergebnis mit der Gel-Dokumentationsstation unter UV-Licht. Zur Herstellung der externen Standards wurden die spezifischen Produkte aus dem Gel herausgeschnitten und mithilfe des Quiaex II Agarose Gel Extraction Kit (Qiagen) extrahiert. Die Konzentrationen der DNA-Standards wurden auf 5×10^9 Produkte/µl in Aqua dest. eingestellt.

3.3.1.6 Quantitative Polymerase-Ketten-Reaktion

Die zur Quantifizierung der PARP-1-mRNA verwendete Methode, die sog. Real-time PCR, wurde in dem Gerät Light-Cycler 1.2 (Roche) durchgeführt, einer Kombination aus PCR-Gerät und Fluoreszenzdetektor. Die PCR wurde mithilfe von QuantiTect SYBR Green-Kit (Qiagen) durchgeführt, der Taq-Polymerase, dNTP Mix, PCR-Puffer und den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green 1 enthält. Dieser Farbstoff ist fluoreszierend und interkaliert in doppelsträngige DNA. Die real-time detektierte Fluoreszenzintensität der Probe, die kontinuierlich vom Light-Cycler gemessen wird, entspricht der Menge an erzeugtem PCR-Produkt und damit der Kopienzahl. Nach einer festgelegten Anzahl von Zyklen wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, dabei wurde die Temperatur in Intervallen von 0,1°C pro Sekunde erhöht und die Fluoreszensintensität kontinuierlich gemessen. Jede doppelsträngige DNA hat eine spezifische Schmelztemperatur, die definiert ist als die Temperatur bei der 50% der DNA einzelsträngig vorliegen. Daher kann man aus dem Verlauf der Schmelzkurve erkennen, dass nur das spezifische PCR-Produkt und keine Nebenprodukte entstanden sind. Zur Durchführung wurden 10 µl QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 0,4 µl sense Primer (50 pmol/ µl), 0,4 µl antisense Primer (50 pmol/ µl), 1 µl cDNA (20 ng) aus der Reversen Transkription und 8,2 µl Aqua dest.

gemischt und in eine Light-Cycler-Kapillare pipettiert. Danach wurde die Kapillare kurz anzentrifugiert und in das Gerät gestellt. Negativkontrollen wurden ohne Zugabe von cDNA durchgeführt. Parallel zu den individuellen Läufen, wurden ebenso PCR-Reaktionen für externe Standards mit der identischen Zielsequenz in definierter 1:5 Verdünnungsserie von 5 x 10^6 bis 1 x 10^0 durchgeführt. Die externen Standards ergaben korrespondierende Standardkurven zum Abgleich der PARP- und GAPDH-Kurven. Der Ablauf der PCR im Light-Cycler war vom analysierten Gen abhängig:

PARP:			
Aktivierung	15 min	95°C	
Denaturierung	15 s	94°C	45 Zyklen
Annealing	25 s	55°C	
Extension	20 s	72 °C	
Finale Extension	120 s	72°C	
GAPDH:			
Aktivierung	15 min	95°C	
Denaturierung	15 s	94°C	55 Zyklen
Annealing	30 s	58°C	
Extension	15 s	72°C	
Finale Extension	120 s	72°C	

Direkt im Anschluss folgte die kontinuierliche Fluoreszenzmessung während schnellen Hochheizens auf 95°C und Abkühlen auf 65°C in Intervallen von 0,1°C pro Sekunde. Währenddessen wurden die entstandenen PCR-Produkte mittels Analyse ihrer Schmelzkurve charakterisiert. Elektrophorese auf einem 2,5 % Agarosegel diente dem Nachweis der Korrelation von Schmelzkurven und Produktlängen zum Ausschluss unspezifischer Produkte. Die LC-Daten wurden mit der LC-Software, Version 5.32, ausgewertet. Dabei wurde die Menge der initialen Zielsequenzkopien/µl mit Hilfe der durchschnittlichen Zykluswerte und entsprechend der externen Standardkurve in jedem Real-time

PCR-Lauf berechnet. Die endgültige Menge an mRNA-Kopien pro µl berechnete sich als Duplikation der Werte für die cDNA-Kopien pro µl, um sie an die unterschiedlichen Mengen von DNA-Strängen der cDNA-Proben (ssDNA) und der Standards (dsDNA) zu Beginn der Real-time PCR anzupassen. Die Ergebnisse in Kopien/µl wurden zu den Ergebnissen der GAPDH-mRNA normalisiert und als Mittelwerte des Quotienten mRNA-Kopien / GAPDH-mRNA-Kopien angegeben. Unterschiede zwischen den Inkubationen mit oder ohne VEGF, cRGDfV oder Inhibitoren wurden mithilfe des Student's t-Test auf Signifikanz getestet und bei einem $p < 0.05$ als signifikant angesehen.

Tabelle 3.1: Primer zur Herstellung der externen Standards und zur Durchführung der Real-time PCR:

Gen	Primer sense	Primer antisense	Produkt-größe
GAPDH	Standard: CGT CTT CAC CAC GGA GA Real-time PCR: TCT CTG CCC CCT CTG CTG	Standard: CGG CCA TCA CGC CAC AGT TT Real-time PCR: AGT GAT GGC ATG GAC TGT GGT	300 bp 185 bp
PARP-1	Standard: GCA GAG TAT GCC AAG TCC AAC AG Real-time PCR: AAG TAC GTG CAA GGG GTG TAT	Standard: GAA AGA GAA AAG GCG ATG AGG TGG ATG Real-time PCR: GGT ACC AGC GGT CAA TCA T	300 bp 110 bp

Die Primersequenzen wurden von humanen mRNA- Sequenzen in Übereinstimmung mit der GenBank hergeleitet, Oligo 5.0 Software (National Biosciences) wurde verwendet, um falsche Primersites auszuschließen, sowie die Dimerformation und Sekundärstrukturen zu überprüfen.

3.3.2 RNA-Interferenz (RNAi)

Mithilfe der RNA-Interferenz kann durch Einbringen von doppelsträngiger RNA (dsRNA) in eine Zelle die Expression von Genen gezielt ausgeschaltet werden. Dabei nutzt man doppelsträngige sog. „Short-interfering"–RNA (siRNA), ein 21-nt RNA-Paar mit symmetrischen 2-nt 3'Enden. Die siRNA wird durch Transfektion in die Zelle eingebracht und die mRNA mit der gleichen Sequenz abgebaut. Als Folge kann im Idealfall das entsprechende Protein nicht mehr exprimiert werden. Eine effizient wirkende siRNA sollte eine ausgeprägte Verminderung der Genexpression (um >80%) erreichen. Vor Durchführung der Experimente muss die generelle Transfizierbarkeit der Zellen geprüft werden. EC wurden mit Transfektionsansätzen aus Fluoreszenz-markierter siRNA in aufsteigenden Konzentrationen von 1 nM – 25 nM und dem Lipofektions-Reagenz HiPerFect (Qiagen) über 24 Stunden bei 37°C inkubiert, anschließend zweimal mit PBS gewaschen und der Transfektionserfolg mittels Fluoreszenzmikroskopie (siehe 3.3.5) überprüft. Um eine möglichst hohe Transfektionseffizienz zu erreichen, wurden in Vorversuchen verschiedene siRNAs, verschiedene siRNA-Konzentrationen (1 nM-25 nM) und verschiedene Transfektionsreagenz-Mengen (3 µl - 9 µl/Ansatz) ausgetestet. Es wurde die Versuchskonstellation ausgewählt, die die höchste Repression auf mRNA- und Protein-Ebene erzielte. Für den Hauptversuch wurde PARP 1-5 siRNA mit der Zielsequenz: 5'CCGAGAAATCTCTTACCTCAA, und einer Knockdown-Effizienz von 96% bei 10nM verwendet.

In den Hauptversuchen wurden aus Medium, PARP 1-5 siRNA und dem HiPerFect-Reagenz (Qiagen) die Transfektionsansätze mit einer Endkonzentration der siRNA von 10 nM hergestellt. Zur Ausbildung der Transfektionskomplexe wurden diese Ansätze bei RT für 10 Minuten inkubiert und anschließend 110 µl pro Well einer 12-Well-Platte zu den Zellen hinzupipettiert. Nach 24-stündiger Inkubation wurde das Medium gewechselt und das entsprechende Inkubationsprotokoll angeschlossen.

3.3.3 Flowzytometrische Bestimmung der Apoptoserate

Die Methode der flowzytometrischen Bestimmung von apoptotischen Zellen beruht auf der Tatsache, dass Membranbestandteile der Zellen angefärbt und im Flowzytometer detektiert werden können. In einer frühen Phase der Apoptose verlieren die betroffenen Zellen die charakteristische Asymmetrie ihrer Membranphospholipide, so dass das negativ geladene Phosphatidylserin (PS) von innen an die Außenseite der Zellmembran gelangt. Das im Detection-Kit enthaltene Protein Annexin V bindet mit hoher Affinität an PS, so dass die sterbende Zelle angefärbt wird, noch bevor sich ihre Morphologie weiter verändert und die DNA hydrolysiert. Die Unterscheidung zwischen Nekrose und Apoptose als Ursache des Zelltodes gelingt mit Hilfe von Propidium-Iodid (PI), welches Zellen anfärbt, die ihre Integrität verloren haben, also entweder primär nekrotisch geworden sind (diese Zellen sind dann nur mit PI angefärbt), oder zunächst die Apoptose eingeleitet haben und sekundär nekrotisch geworden sind (diese Zellen zeigen dann sowohl ein hohes Signal für Annexin V, als auch für PI). Zunächst wurden die Überstände der Zellen gesammelt. Dann wurden die Zellen geerntet, und bei 220 x g für 4 Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in 500 µl PBS resuspendiert, mit dem Überstand (enthält tote Zellen) zusammengeführt, und erneut für 4 Minuten bei 500 x g zentrifugiert. Die Zellen wurden in 200 µl 1 x Binding Buffer resuspendiert. Nach Abnahme von 100 µl, wurden die übrigen 100 µl mit je 5 µl PI (2 µg/ml Endkonzentration) und 1 µl Annexin-V-FITC (0.5 µg/ml Endkonzentration) für 15 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert, da die Farbstoffe sehr lichtempfindlich sind. Zu jeder Probe wurden 200 µl 1 x Binding Buffer hinzugegeben und die Zellen wurden bei 500 x g für 4 Minuten sedimentiert. Dieser Waschschritt wurde einmal wiederholt, dann die Zellen in 1000 µl 1 x Binding-Puffer resuspendiert und anschließend die Proben im Durchflusszytometer gemäß Standardprotokollen gemessen.

Die Analyse erfolgte aufgrund definierter Kriterien mithilfe von mitgeführten Färbekontrollen. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte aus drei Experimenten im Duplikat oder Triplikat berechnet und beziffern die relative Anzahl apoptotischer Zellen an der Anzahl aller Zellen (%) bei 20 000 gezählten Zellen pro Messung.

3.3.4 Vitalitätstest mittels Trypanblaufärbung

Die Anfärbung von Zellen mit Trypanblau dient der Unterscheidung vitaler von nicht vitalen Zellen. Nach dem Ablösen der EC durch Trypsinierung für ca. 5 Minuten wurde durch Zugabe von TNS die Trypsin-Wirkung gestoppt. Die Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt, bei 200 x g 5 Minuten abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die EC in PBS (pH 7,4) resuspendiert. Die Zellzahl wurde automatisiert ermittelt mithilfe des Casy Cell Counters und die Zellzahl auf 1 x 10^6 Zellen / ml eingestellt. 100 µl Zellsuspension wurden mit 20 µl Trypanblau (0,4 %, Sigma) vermischt, nach 30 Sekunden Färbezeit je 20 µl gefärbte Zellsuspension in eine Neubauer-Kammer gefüllt und die Zellen bei wenig geöffneter Blende gezählt. Dabei wurden in allen großen Eckquadrate die positiven (dunkelblau) und negativen (ungefärbt) Zellen ausgezählt. In der Regel wurden 200 Zellen bei Versuchsdurchführung im Duplikat gezählt. Nach Ermitteln der Mittelwerte konnte der prozentuale Anteil vitaler Zellen berechnet werden.

3.3.5 PARP-Aktivitätsassay

Das PARP-Aktivitätsassay misst die Aufnahme von biotinyliertem ADP in Histone nach Zugabe von biotinyliertem NAD+. Das aufgenommene Biotin wird mittels Streptavidin-Peroxidase und einem Peroxidase-Substrat detektiert (Bakondi et al. 2002).

Zur Herstellung der Zellextrakte werden nach dem Ernten der Zellen diese zweimal in PBS gewaschen, das Pellet in 100 µl Zellextrakt-PARP-Puffer (0,4 mM Protease-Inhibitor, 0,4 M NaCl, 1% Triton-X-100) resuspendiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Zur Lysierung der Zellmembranen werden die Zellen während dessen alle fünf Minuten mit dem Vortexer gemischt. Dann folgt ein 15-minütiger Zentrifugationsschritt bei 10000 x g und die Überstände werden in neue Eppendorfgefäße überführt.

Für die folgende Ribosylierungsreaktion müssen zunächst die Proteinkonzentrationen der Proben bestimmt werden (siehe 3.3.6.2). Dann wird

der PARP-Cocktail (20 µl 1 x PARP-Puffer + 2,5 µl 10 x aktivierte DNA + 2,5 µl 10 x PARP-Cocktail pro Well) hergestellt, der das für die Messung der PARP-Aktivität essentielle biotinylierte NAD+ enthält (Bakondi et al. 2002).

Davon werden 25 µl in jedes Well pipettiert. Dann pipettiert man zur Ermittlung einer Standardkurve PARP-HSA-Enzym in 1 x PARP-Puffer in absteigenden Konzentrationen (1 U bis 0,01 U) in 10 Wells. Zur Probenanalyse werden 20 µg Protein pro Well pipettiert. Für die Inhibitorkontrollen gibt man zu ausgewählten Proben 2 mmol/l 3-Aminobenzamid dazu. Als Negativkontrollen dienen Wells mit 1 x PARP-Puffer. Dann wird für 60 Minuten bei RT inkubiert.

Für die Detektion wird die Elisa-Platte zunächst gründlich mit 1 x PBS gewaschen. Dann wird Strep-HRP 1:500 mit 1 x Strep-Diluent verdünnt und zu jedem Well dazugegeben und die Platte 20 Minuten bei RT inkubiert. Nach erneut gründlichem Waschen der Platte mit 1 x PBS werden pro Well 50 µl des blauen Farbstoffes TACS-Sapphire hinzugegeben und nach 30 Minuten Inkubation im Dunkeln die Absorption bei 630 nm am Elisa-Reader gemessen.

3.3.6 Immunfluoreszenzmikroskopie

Die VEGF-Rezeptoren VEGFR-2 und NP-1 wurden mittels Immunfluoreszenzmikroskopie nachgewiesen auf HUVEC und EA.hy926 kultiviert auf 12-Well-Platten mit oder ohne VEGF 10 ng/ml (5×10^{-10} Mol/l) über 24 Stunden. Zunächst wurden die Zellen mit 5% igem Formaldehyd in PBS fixiert, mit 5% Ziegenserum präinkubiert und dann inkubiert mit polyklonalen Antikörpern gegen VEGFR-2 (Biosource, 1:1000) und NP-1 (Zymed / Invitrogen, 1:100) für 2 Stunden. In vorangehenden Experimenten waren die optimalen Verdünnungen für die Antikörper in Verdünnungsserien getestet worden. Für die Negativkontrollen wurden die spezifischen Antikörper durch einen irrelevanten Antikörper ersetzt. Die darauffolgenden Inkubationen wurden über eine Stunde mit entsprechenden fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern durchgeführt, markiert mit dem fluoreszierenden Farbstoff Cy2 (Carbocyanin 2). Alle Inkubationen wurden in Doppelbestimmung durchgeführt, jedes zweite Well wurde mit dem nukleären Farbstoff DAPI (4',6-

Diamidino-2'-phenylindol) 2 µg/ml für 20 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurden die Platten mit Hilfe des Inversmikroskops Olympus IX81 untersucht.

3.3.7 Proteinbiochemische Methoden

3.3.7.1 Aufreinigung von Proteinen aus Einzelzellsuspensionen

Die Proteinaufreinigung wurde mithilfe des All Prep RNA/Protein Kits (Qiagen) durchgeführt (siehe 3.3.1.1). Nach Binden der RNA an der AllPrep-Säule wird das Eluat mit der Proteinfraktion auf die Proteinsäule pipettiert und bei 240 x g 3 Minuten zentrifugiert. Dadurch erhält man im Eluat das aufgereinigte Protein, welches man nach Zugabe von Proteinase-Inhibitor-Cocktail weiterverarbeiten kann.

3.3.7.2 Proteinkonzentrationsbestimmung

Die Konzentration der aus EC aufgereinigten Proteine wurde photometrisch bestimmt. Hierzu wurde das BCA Protein Assay Kit (Pierce) verwendet.

Dieses Assay kombiniert die Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{+} durch Protein in einer alkalischen Lösung mit der sensitiven und selektiven Detektion von Cu^{+} durch Bicinchoninsäure (BCA). In einem ersten Schritt wird dabei das Prinzip der Biuret-Reaktion genutzt: in alkalischer Lösung verbinden sich Peptide mit mindestens drei Aminsosäuren mit Kupferionen zu einem farbigen Chelat. Die Intensität der entstehenden Farbe ist proportional zur Anzahl der beteiligten Peptidbindungen. Im zweiten Schritt reagiert dann BCA mit den im ersten Schritt entstandenen Kupfer-Kationen. Durch Chelatierung eines Kupferkations mit zwei Molekülen BCA entsteht das lilafarbene Reaktionsprodukt. Dieses zeigt mit zunehmender Proteinkonzentration eine streng lineare Absorptionszunahme bei 562 nm.

Zur Durchführung wurden eine Standardreihe, zwei Leerproben (H_2O dest.), sowie 25 µl der zu untersuchenden Proben in eine 96-Well-Platte pipettiert und diese nach Zugabe von 200 µl des hergestellten Arbeitsreagenz für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Abkühlen der Platte wurde die Absorption der Proben bei 562 nm gemessen und die Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben berechnet.

3.3.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) ist eine analytische Methode zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht (Laemmli 1970). Dafür wurden ein 7,5%-iges Trenngel (2,5 ml Rotiphorese Gel 30, 2,5 ml Trenngelpuffer, 5,0 ml Wasser, 50µl 10% APS, 5 µl TEMED) und ein Sammelgel (360 µl Rotiphorese Gel 30, 600 µl Sammelgelpuffer, 1,4 ml Wasser, 10 µl 10% APS, 3 µl TEMED) hergestellt, in deren Taschen jeweils 30 µg der zuvor mit Probenpuffer versetzten und bei 95°C denaturierten Proteinprobe pipettiert wurden (20 µl Gesamtvolumen pro Tasche). Die Elektrophorese erfolgte bei 40 mA, 200 V, für ca. 1 Stunde.

3.3.7.4 Membrantransfer von Proteinen (Western-Blot)

Die in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden durch einen Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran (Milipore) übertragen, um daran anschließend die Detektion der untersuchten Proteine durchzuführen (Towbin 1979). Zunächst wurden sechs Filterpapiere (Whatmanfilter), das Gel, sowie eine zurechtgeschnittene PVDF-Membran für 10 Minuten in Semidry Puffer (48 mM TrisBase, 39 mM Glycin, 0,04 % SDS, 20 % Ethanol absolut, H_2O dest) äquilibriert. Auf die Kathodenplatte der Semidryapparatur wurden drei Filterpapiere, die PVDF-Membran, das Gel und wiederum drei Filterpapiere aufeinandergeschichtet, so dass die Membran unter dem Gel lag. Dann wurde bei 12 V für ca. 15 Minuten geblottet, d.h. die Proteine von dem Gel auf die Membran übertragen, so dass sie anschließend weiter analysiert werden konnten.

Um den Erfolg des Proteintransfers vom Gel auf die Membran zu kontrollieren, wurde die Membran anschließend kurz in Ponceaulösung (0,1 % Ponceau S in 5% Essigsäure) angefärbt, um die Proteinbanden sichtbar zu machen und den Bloterfolg zu kontrollieren. Die Membran wurde mit Aqua dest. entfärbt und für mindestens 30 Minuten in 5 % igem Milchpulver inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen.

3.3.7.5 Detektionsverfahren Western-Blot

Für die Detektion der auf die Membran transferierten Proteine nutzt man die Immunfärbung mit spezifischen mono- oder polyklonalen Antikörpern. Zunächst bindet der antigenspezifische Primärantikörper an das antigene Protein. Danach erfolgt die Detektion durch einen mit Meerrettich-Peroxidase-markierten, gegen den Primärantikörper gerichteten Sekundärantikörper. Das Protein kann daraufhin durch eine peroxidasevermittelte Lumineszenzreaktion nachgewiesen werden.

Nach Inkubation (monoklonaler AK: 16 Stunden bei 4°C, Polyklonaler AK: 1Stunde bei RT) mit einem der unter 2.15.3. genannten Antikörper in der entsprechenden Verdünnung wurde die Membran sorgfältig mit 1 x TTBS gespült, mit dem entsprechenden Zweitantikörper (siehe 2.15.4) inkubiert, dann zweimal mit 1 x TTBS gespült, abschließend mit 1 x PBS gewaschen. Nach 5-minütiger Inkubation der Membran in verstärkter Chemilumineszenz-Lösung (Luminol, Santa Cruz), wurde die Membran auf Fotopapier in eine Röntgenkassette gelegt, das Fotopapier belichtet und in der Dunkelkammer entwickelt. Dadurch konnten die spezifischen Banden visualisiert werden.

3.3.7.6 Densitometrische Auswertung

Die Proteinkonzentrationen von PARP, der PARP-Spaltprodukte sowie aller Signaltransduktionsmoleküle (gesamt und phosphoryliert) wurden semiquantitativ bestimmt. Dazu wurden die Western-Blots einer densitometrischen Analyse der spezifischen Banden mithilfe der Programme GelDoc 2000 Imaging System (BioRad) und Quantity One Software, Version 4.5 (BioRad), sowie vergleichend TINA Quant Software, Version 2.09c (Raytest) unterzogen. Diese Programme messen nach Abzug des Hintergrundes die optische Dichte der Banden und geben diese als absolute Zahlenwerte an. Unterschiede zwischen den einzelnen Banden wurden mithilfe des Student’s t-Test auf Signifikanz getestet und bei einem $p< 0.05$ als signifikant angesehen (siehe 3.4).

3.4 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die Ergebnisse der Experimente wurden mithilfe von Microsoft Office Excel 2003 statistisch ausgewertet. Zunächst wurden alle Ergebnisse auf Normalverteilung geprüft. Dann erfolgte die Prüfung auf Signifikanz mithilfe des Student's t-Test. Dieser Test setzt Normalverteilung einer Wertemenge voraus, vergleicht die Mittelwerte zweier normalverteilter Wertemengen und prüft die Differenz der Mittelwerte auf Signifikanz. Bei einer Fehlerwahrscheinlichkeit von $p < 0.05$ wurden Ergebnisdifferenzen als signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 VEGF hat keinen Einfluss auf ruhende Endothelzellen

Um die Wirkung von VEGF auf die Apoptoserate von ruhenden Endothelzellen zu evaluieren, wurden EA.hy926, HUVEC und hCMEC/D3, im Folgenden vereinfachend als Endothelzellen (EC) bezeichnet, auf mit Vitronektin beschichteten Platten ausgesät und über 24 Stunden mit VEGF 100 pg/ml - 1 µg/ml (5×10^{-12} M – 5×10^{-8} M) stimuliert. In der statistischen Auswertung mithilfe des Student`s t-Test zeigte sich kein signifikanter Unterschied in dem prozentualen Anteil apoptotischer Zellen zwischen der unbehandelten Negativkontrolle und den mit VEGF in den obengenannten Konzentrationen stimulierten EC, sowie zwischen den unterschiedlichen Konzentrationen von VEGF (Tab. 4.1.1., Abb. 4.1.1.). Demnach hatte VEGF allein keinen Einfluss auf die basale Apoptoserate von kultivierten EC. EC, die ohne VEGF-Stimulation auf dem anti-adhäsiven Substrat BSA ausgesät wurden (Positivkontrolle), unterlagen einer signifikanten Steigerung der Apoptoserate.

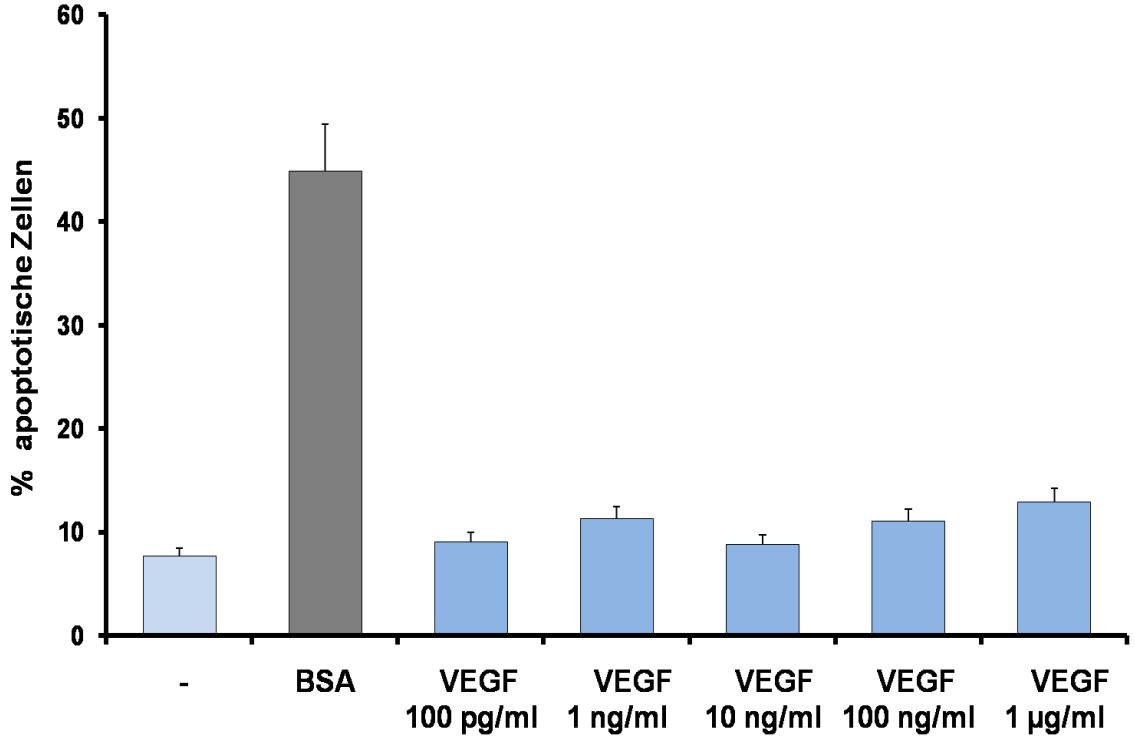


Abbildung 4.1.1: **Einfluss von VEGF auf die basale Apoptoserate von Endothelzellen**. EC wurden auf Vitronektin-Substrat kultiviert und über 24 Stunden mit VEGF 100 pg/ml - 1 µg/ml (5×10^{-12} M – 5×10^{-8} M) inkubiert (blaue Balken rechts). Die Negativkontrolle wurde ohne VEGF auf Vitronektin-Substrat kultiviert (hellblauer Balken), die Positivkontrolle wurde ohne VEGF-Stimulus auf dem anti-adhäsiven Substrat BSA ausgesät (grauer Balken). Anschließend erfolgten die Färbung der Zellen mit Annexin-V-FITC und PI und die Messung der apoptotischen Zellen. Dargestellt sind die prozentualen Anteile der apoptotischen EC an einer Gesamtzellzahl von 20000 (y-Achse) als Mittelwerte aus zwei Experimenten mit identischen Protokollen und jeweils Doppelbestimmungen der unterschiedlichen Inkubationen. Bei Inkubation mit VEGF zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der apoptotischen Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle. Kultivierung der Zellen auf dem anti-adhäsiven BSA induziert Apoptose.

Inkubation	Apoptoserate (MW. in %)	+/- SA	t-Test (Vergleich zu Neg.kontr.)	t-Test (Vergleich zu Pos.kontr.)
Neg.kontr.	7,68	2,89		*s (p<0,05)*
Pos.kontr. (BSA)	44,9	0,48	*s (p<0,05)*	
VEGF 100 pg/ml	12,95	2,22	*s (p<0,05)*	*s (p<0,05)*
VEGF 1 ng/ml	11,08	6,58	ns	*s (p<0,05)*
VEGF 10 ng/ml	8,85	3,81	ns	*s (p<0,05)*
VEGF 100 ng/ml	11,36	0,78	ns	*s (p<0,05)*
VEGF 1 µg/ml	9,09	4,29	ns	*s (p<0,05)*

Tabelle 4.1.1: **Einfluss von VEGF auf die basale Apoptoserate von EC**. EC wurden auf Vitronektin-Substrat kultiviert und über 24 Stunden mit VEGF 100 pg/ml - 1 µg/ml (5×10^{-12} M – 5×10^{-8} M) inkubiert. Anschließend erfolgten die Färbung der Zellen mit Annexin-V-FITC und PI und die Messung der apoptotischen Zellen. Die Negativkontrolle wurde ohne VEGF auf Vitronektin-Substrat kultiviert, die Positivkontrolle wurde ohne VEGF-Stimulus auf dem anti-adhäsiven Substrat BSA ausgesät. Aufgeführt sind die Mittelwerte (MW) des prozentualen Anteils von apoptotischen EC an 20000 Zellen, die dazugehörigen Standardabweichungen (+/- SA) aus zwei Experimenten mit identischen Protokollen und jeweils Doppelbestimmungen der unterschiedlichen Inkubationen und die Ergebnisse des Student's t-test. Es zeigte sich keine signifikante Änderung der Apoptoserate ruhender EC (d.h. ohne Induktion von Apoptose) nach einmaliger Inkubation mit VEGF in den Konzentrationen 100 pg/ml - 1 µg/ml (5×10^{-12} M – 5×10^{-8} M). ns: keine Signifikanz im t-Test ($p > 0,05$); *s (p<0,05)*: Signifikanz im t-Test erreicht.

4.2 VEGF wirkt protektiv auf Endothelzellen nach Induktion von Apoptose

Zur Quantifizierung der anti-apoptotischen Wirkung wurden EC auf Vitronektin-Substrat ausgesät, einmal bzw. dreimal mit VEGF 100 pg/ml – 100 ng/ml (5 ×10 -12 M – 5 × 10- 9 M) stimuliert und mithilfe des αvβ3-Integrininhibitors cRGDfV 5 µg/ml, der über Aktivierung der Effektorcaspasen 3 und 7 Apoptose in Endothelzellen induziert (Al-Fakhri et al.2003), Apoptose induziert. 24 Stunden nach Apoptoseinduktion wurde der Anteil der apoptotischen Zellen an der Gesamtzellzahl gemessen. Bei Apoptoseinduktion durch den αvβ3-Integrininhibitor cRGDfV führte VEGF-Inkubation der Zellen zu einer signifikanten Reduktion des Anteils apoptotischer Zellen im Vergleich zur Positivkontrolle, für die EC ohne VEGF-Inkubation mit cRGDfV behandelt wurden (Tab. 4.2.1, Tab. 4.2.2; Abb. 4.2.1, Abb. 4.2.2). Bei dreimaliger

Präinkubation waren geringere VEGF-Konzentrationen ausreichend, um einen statistisch signifikanten, protektiven Effekt zu erzielen. Die flowzytomterischen Ergebnisse wurden durch die Ergebnisse der Trypanblau-Färbung unterstrichen: Bei Apoptoseinduktion mit cRGDfV zeigte sich eine signifikante Verminderung nicht-vitaler, Trypanblau-positiver Zellen bei EC mit VEGF-Inkubation im Vergleich zu nicht vorbehandelten EC.

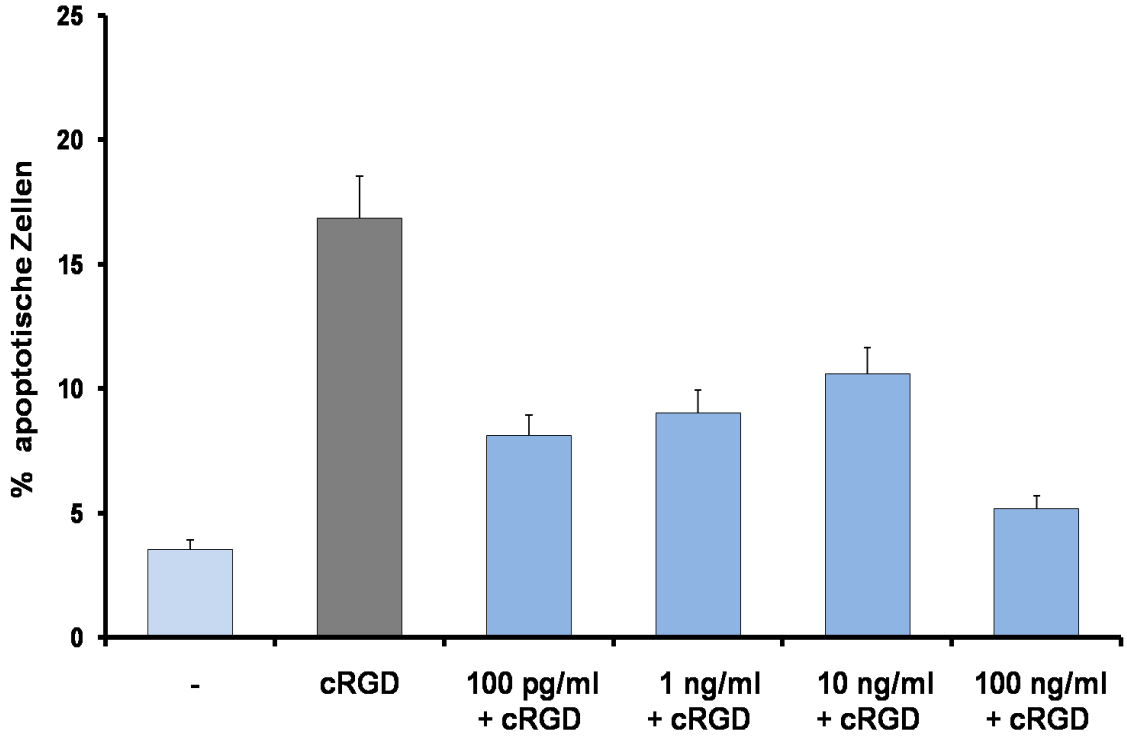


Abbildung 4.2.1: Einfluss von VEGF auf die Apoptoserate von EC nach Induktion von Apoptose. EC wurden auf Vitronektin-Substrat in serumarmen Medium ausgesät, einmal mit VEGF 100 pg/ml – 100 ng/ml (5 ×10 -12 M – 5 × 10- 9 M) über 24 Stunden stimuliert und mithilfe des αvβ3-Integrininhibitors cRGDfV 5 µg/ml Apoptose induziert (blaue Balken rechts). Für die Negativkontrolle wurden Zellen ohne VEGF-Inkubation und Apoptoseinduktion auf Vitronektin-Substrat kultiviert (hellblauer Balken), die Positivkontrolle wurde in serumarmen Medium auf Vitronektin nur mit cRGDfV inkubiert. 24 Stunden nach Apoptoseinduktion wurden die Zellen mit Annexin-V-FITC und PI angefärbt und im Durchflusszytometer der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen an einer Gesamtzellzahl von 20000 gemessen (y-Achse). Angegeben sind Mittelwerte aus drei Experimenten mit identischen Protokollen und Bestimmungen der unterschiedlichen Inkubationen jeweils im Duplikat. Signifikante Reduktion der Anzahl apoptotischer Zellen in der Annexin-V-FITC-Analyse nach VEGF-Stimulation und nachfolgender Apoptoseinduktion durch cRGDFfV 5 µg/ml.

Inkubation	Apoptotische Zellen [%]	+/- SA	t-Test (Vergleich zu Neg.kontr.)	t-Test (Vergleich zu Pos.kontr.)
Neg.kontr.	6,07	5,28		*s (p<0,05)*
Pos.kontr. (cRGD, Apoptose)	19,63	5,3	*s (p<0,05)*	
VEGF 100 pg/ml + cRGD	7,43	3,92	ns	*s (p<0,05)*
VEGF 1 ng/ml + cRGD	9,02	5,2	*s (p<0,05)*	*s (p<0,05)*
VEGF 10 ng/ml + cRGD	6,87	0,96	ns	*s (p<0,05)*
VEGF 100 ng/ml + cRGD	6,2	3	ns	*s (p<0,05)*

Tabelle 4.2.1: Einfluss von VEGF auf die Apoptoserate von EC nach Induktion von Apoptose durch cRGDfV bei einmaliger VEGF-Zufuhr. Überblick über die Werte zu Abbildung 4.2.1. Angegeben sind Mittelwerte (MW) des prozentualen Anteils von apoptotischen Zellen an einer Gesamtzellzahl von 20000 aus drei Experimenten mit identischen Protokollen und Bestimmungen der unterschiedlichen Inkubationen jeweils im Duplikat. Unter +/- SA sind die jeweiligen Standardabweichungen aufgeführt, ganz rechts die Ergebnisse des Student's t-test. ns: keine Signifikanz im t-Test ($p > 0,05$); *s (p<0,05)*: Signifikanz im t-Test erreicht.

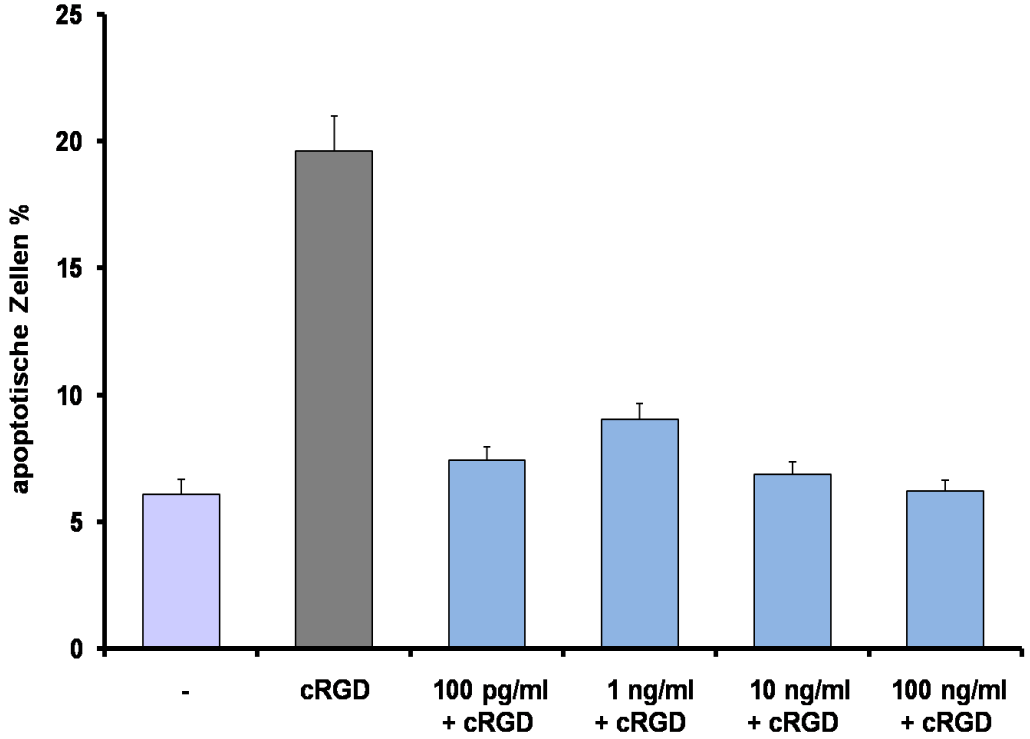


Abbildung 4.2.2: **Einfluss von VEGF auf die Apoptoserate von EC nach Induktion von Apoptose durch cRGDfV bei dreimaliger VEGF-Stimulation**. EC wurden auf Vitronektin-Substrat in serumarmen Medium ausgesät, dreimal für jeweils 24 Stunden mit VEGF 100 pg/ml – 100 ng/ml (5 ×10 -12 M – 5 × 10- 9 M) stimuliert und mithilfe des αvβ3-Integrininhibitors cRGDfV 5 µg/ml Apoptose induziert (blaue Balken rechts). Für die Negativkontrolle wurden Zellen ohne VEGF-Inkubation und Apoptoseinduktion auf Vitronektin-Substrat kultiviert (hellblauer Balken), die Positivkontrolle wurde in serumarmen Medium auf Vitronektin nur mit cRGDfV inkubiert. 24 Stunden nach Apoptoseinduktion wurden die Zellen mit Annexin-V-FITC und PI angefärbt und der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen an einer Gesamtzellzahl von 20000 im Durchflusszytometer gemessen (y-Achse). Angegeben sind Mittelwerte aus drei Experimenten mit identischen Protokollen und Bestimmungen der unterschiedlichen Inkubationen jeweils im Duplikat. Signifikante Reduktion der Anzahl apoptotischer Zellen in der Annexin-V-FITC-Analyse nach dreimaliger VEGF-Präinkubation und nachfolgender Apoptoseinduktion durch cRGDFfV 5 µg/ml.

Inkubation	Apoptotische Zellen [%]	+/- SA	t-Test (Vergleich zu Neg.kontr.)	t-Test (Vergleich zu Pos.kontr.)
Neg.kontr.	3,55	1,68		*s (p<0,05)*
Pos.kontr. (cRGD, Apoptose)	16,86	5,12	*s (p<0,05)*	
VEGF 100 pg/ml + cRGD	8,12	3	*s (p<0,05)*	*s (p<0,05)*
VEGF 1 ng/ml + cRGD	9,03	4,4	*s (p<0,05)*	*s (p<0,05)*
VEGF 10 ng/ml + cRGD	10,6	5,53	*s (p<0,05)*	*s (p<0,05)*
VEGF 100 ng/ml + cRGD	5,17	2,96	ns	*s (p<0,05)*

Tabelle 4.2.2: Einfluss von VEGF auf die Apoptoserate von EC nach Induktion von Apoptose durch cRGDfV bei dreimaliger VEGF-Stimulation. Überblick über die Werte zu Abbildung 4.2.2. Angegeben sind Mittelwerte des prozentualen Anteils von apoptotischen Zellen an einer Gesamtzellzahl von 20000 aus drei Experimenten mit identischen Protokollen und Bestimmungen der unterschiedlichen Inkubationen jeweils im Duplikat. Unter +/- SA sind die jeweiligen Standardabweichungen aufgeführt, ganz rechts die Ergebnisse des Student's t-Test. ns: keine Signifikanz im t-Test (p > 0,05); *s (p<0,05)*: Signifikanz im t-Test erreicht.

4.3 Regulation der PARP-mRNA-Produktion durch VEGF

PARP ist ein wichtiges Ziel der Caspasenkaskade, die während der durch Adhäsionshemmung induzierten Endothelapoptose aktiviert wird. Die Hochregulation von PARP konnte in pulmonalen Epithelzellen die Schwelle zur Apoptose erhöhen (Tesfaigzi et al. 1998). Daher wurde die Wirkung des anti-apoptotischen VEGF auf die PARP-Regulation untersucht. Zunächst wurden EC auf Vitronektin-Substrat über 18 Stunden mit VEGF in den Konzentrationen von 100 pg/ml bis 1 µg/ml (5 × 10-12 M – 5 × 10 -8 M) inkubiert. Nach Aufreinigung der mRNA erfolgte die Real-time RT-PCR auf PARP-1 mRNA. Die Ergebnisse zeigten, dass VEGF in enger Dosis-Wirkung-Beziehung zu einer signifikant erhöhten mRNA-Produktion von PARP-1 mRNA führt (Abb. 4.3.1). bFGF und TGF-β haben keinen Einfluss auf die PARP-1 mRNA (ohne Abb.).

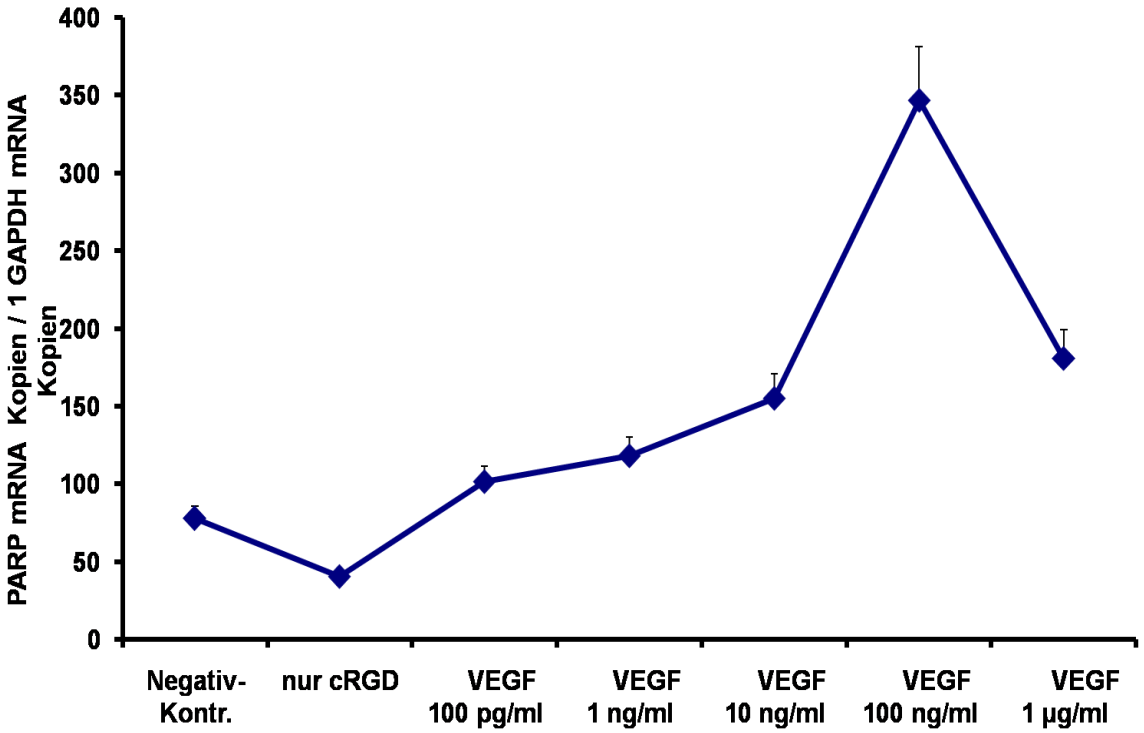


Abbildung 4.3.1: VEGF induziert die Produktion von PARP mRNA in enger Dosis-Wirkungs-Beziehung. EC wurden auf Vitronektin-Substrat in serumarmen Medium über 48 Stunden mit VEGF in den Konzentrationen von 100 pg/ml bis 1 µg/ml (5 × 10-12 M – 5 × 10 -8 M) inkubiert. Nach Aufreinigung der mRNA erfolgte die Real-time RT-PCR auf PARP-1 mRNA. Für die Negativkontrolle wurden EC auf Vitronektin ohne VEGF kultiviert, für die Positivkontrolle wurde in EC ohne VEGF-Inkubation mithilfe von cRGDfV 5 µg/ml Apoptose induziert. Angegeben ist die Anzahl von PARP-1 mRNA-Kopien normalisiert zu der Anzahl der GAPDH mRNA-Kopien (y-Achse) als Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten mit gleichem Versuchsprotokoll und jeweils Bestimmungen im Duplikat.

4.4 PARP-Proteinexpression unter VEGF-Einfluss

Analog zur Analyse der VEGF-Wirkung auf die PARP-1 mRNA erfolgte die Analyse der PARP-Proteinexpression unter Einfluss von VEGF.

Im Anschluss an einmalige Inkubation von EC mit VEGF 100 pg/ml bis 1 µg/ml (5 × 10-12 M – 5 × 10 -8 M) über 48 Stunden wurden die Proteine aufgereinigt, elektrophoretisch getrennt und mittels automatisierter Densitometrie des Western-Blots analysiert. Korrespondierend zu der vermehrten Produktion von PARP-1 mRNA, zeigte sich auf Proteinebene eine dosisabhängige

Hochregulation von PARP unter VEGF-Stimulation. PARP-Protein wurde quantifiziert durch automatisierte densitometrische Analyse (GelDoc, 2000 Quantity One, Bio Rad; TINA quant, Raytest) und die Ergebnisse mit dem Student`s t-Test auf Signifikanz getestet (Tab. 4.4.1, Abb. 4.4.1).

Ebenso wurde die Proteinexpression von PARP nach einmaliger bzw. dreimaliger Inkubation mit VEGF in den Konzentrationen von 100 pg/ml bis 100 ng/ml (5 ×10 -12 M – 5 × 10- 9 M) und anschließender Inkubation mit cRGDfV über 48 Stunden analysiert. VEGF führte demnach auch bei Induktion von Apoptose zu einer signifikanten Steigerung der Expression des Apoptoseschutzproteins PARP (Tab.4.4.2, Abb.4.4.2). Inkubationen mit bFGF und TGF-β hatten keinen Einfluss auf die Proteinproduktion von PARP (ohne Abbildung).

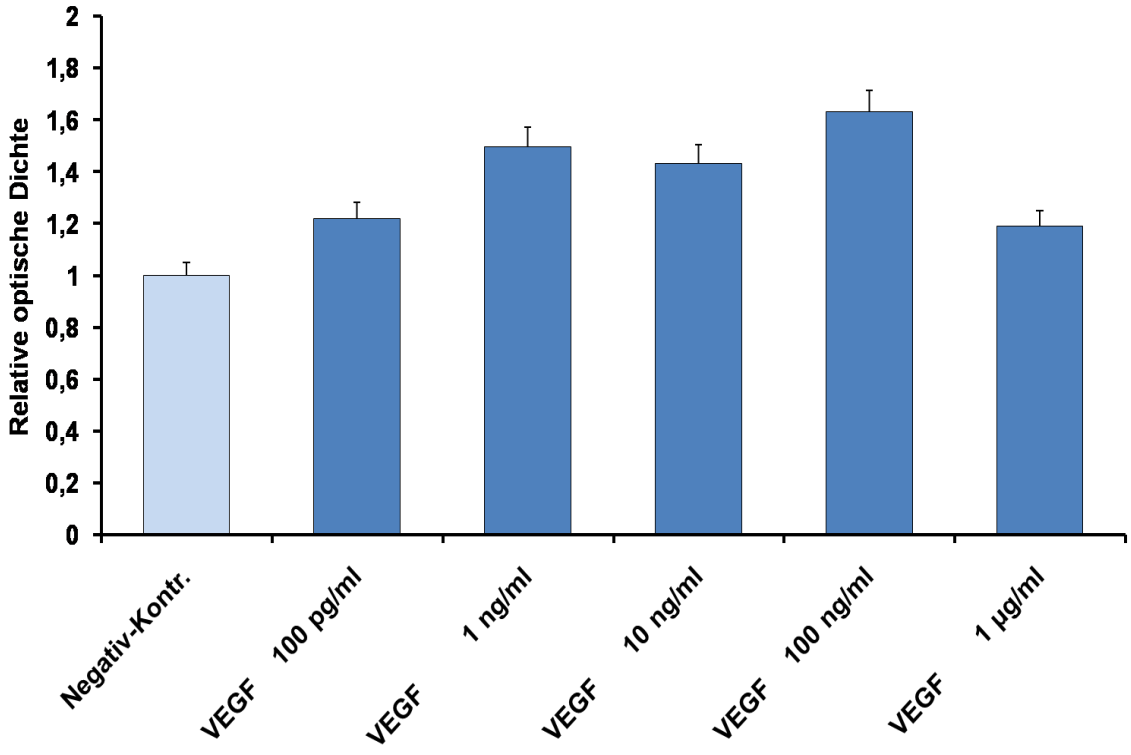


Abbildung 4.4.1: VEGF führt dosisabhängig zu einer Mehrexpression von PARP-Protein. Nach einmaliger Inkubation von EC auf Vitronektin-Substrat in serumarmen Medium mit VEGF 100 pg/ml bis 1 µg/ml (5 × 10-12 M – 5 × 10 -8 M) (blaue Balken rechts), wurden die Proteine aufgereinigt und elektrophoretisch getrennt. Als Negativkontrolle dienten EC auf Vitronektin-Substrat ohne VEGF-Inkubation (hellblauer Balken). Angegeben sind die Mittelwerte der relativen optischen Dichte (y-Achse) zweier identischer Experimente mit Doppelbestimmungen aus der automatisierten densitometrischen Analyse des Western-Blots als relative Angaben zu der Negativkontrolle (=1) (Tabelle 4.4.1).

Inkubation	MW ROD	+/- SA	t-Test (Vergleich zur Neg.kontr.).
Neg.kontr.	1	0	
VEGF 100 pg/ml	1,221	0,083	ns
VEGF 1 ng/ml	1,498	0,118	*s (p<0,05)*
VEGF 10 ng/ml	1,433	0,0898	*s (p<0,05)*
VEGF 100 ng/ml	1,634	0,146	*s (p<0,05)*
VEGF 1 µg/ml	1,191	0,1	ns

Tabelle 4.4.1: VEGF führt dosisabhängig zu einer Mehrexpression von PARP-Protein. Nach einmaliger Inkubation von EC auf Vitronektin-Substrat in serumarmen Medium mit VEGF 100 pg/ml bis 1 µg/ml (5 × 10-12 M – 5 × 10 -8 M), wurden die Proteine aufgereinigt und elektrophoretisch getrennt. Als Negativkontrolle dienten EC auf Vitronektin-Substrat ohne VEGF-Inkubation. Angegeben sind die Mittelwerte aus zwei identischen Experimenten mit Doppelbestimmungen der relativen optischen Dichte aus der automatisierten densitometrischen Analyse des Western-Blots als relative Angaben zu der Negativkontrolle (=1). Unter +/- SA sind die Standardabweichungen aufgeführt, ganz rechts die Ergebnisse des Student's t-test. ns: keine Signifikanz im t-Test ($p > 0,05$); *s (p<0,05)*: Signifikanz im t-Test erreicht.

Inkubation			MW ROD	+/- SA	t-Test (Vergleich zu Neg.kontr.)	t-Test (Vergleich zu Pos.kontr.)
Neg.kontr.			1,000	0,00		ns
Pos.kontr. (cRGD, Apoptose)			0,856	0,08	ns	
1x VEGF 100 pg/ml +cRGD			1,201	0,16	*s (p<0,05)*	*s (p<0,05)*
1x VEGF 1 ng/ml +cRGD			1,239	0,51	*s (p<0,05)*	*s (p<0,05)*
1x VEGF 10 ng/ml +cRGD			1,535	0,55	*s (p<0,05)*	*s (p<0,05)*

Tabelle 4.4.2: VEGF führt nach Induktion von Apoptose in EC zu einer dosisabhängigen Hochregulierung der PARP-Proteinexpression. Im Anschluss an einmalige Inkubation von EC auf Vitronektin in serumarmem Medium mit VEGF in den Konzentrationen von 100 pg/ml bis 100 ng/ml (5 ×10 -12 M – 5 × 10- 9 M) und Apoptoseinduktion mit cRGDfV über 48 Stunden, wurde die Proteinexpression mithilfe von automatisierter densitometrischer Analyse des Western-Blots analysiert. Als Negativkontrolle wurden EC auf Vitronektin in serumarmen Medium ohne Zusatz von VEGF und cRGDfV kultiviert, als Positivkontrollen dienten EC mit ausschließlicher Inkubation mit cRGDfV. Angegeben sind die Mittelwerte (MW) der relativen optischen Dichte (ROD) aus der automatisierten densitometrischen Analyse des Western-Blots als relative Angaben zu der Negativkontrolle (=1). VEGF führte demnach auch bei Induktion von Apoptose zu einer signifikanten Steigerung der Expression des Apoptoseschutzproteins PARP. ns: keine Signifikanz im t-Test ($p > 0,05$); *s (p<0,05)*: Signifikanz im t-Test erreicht.

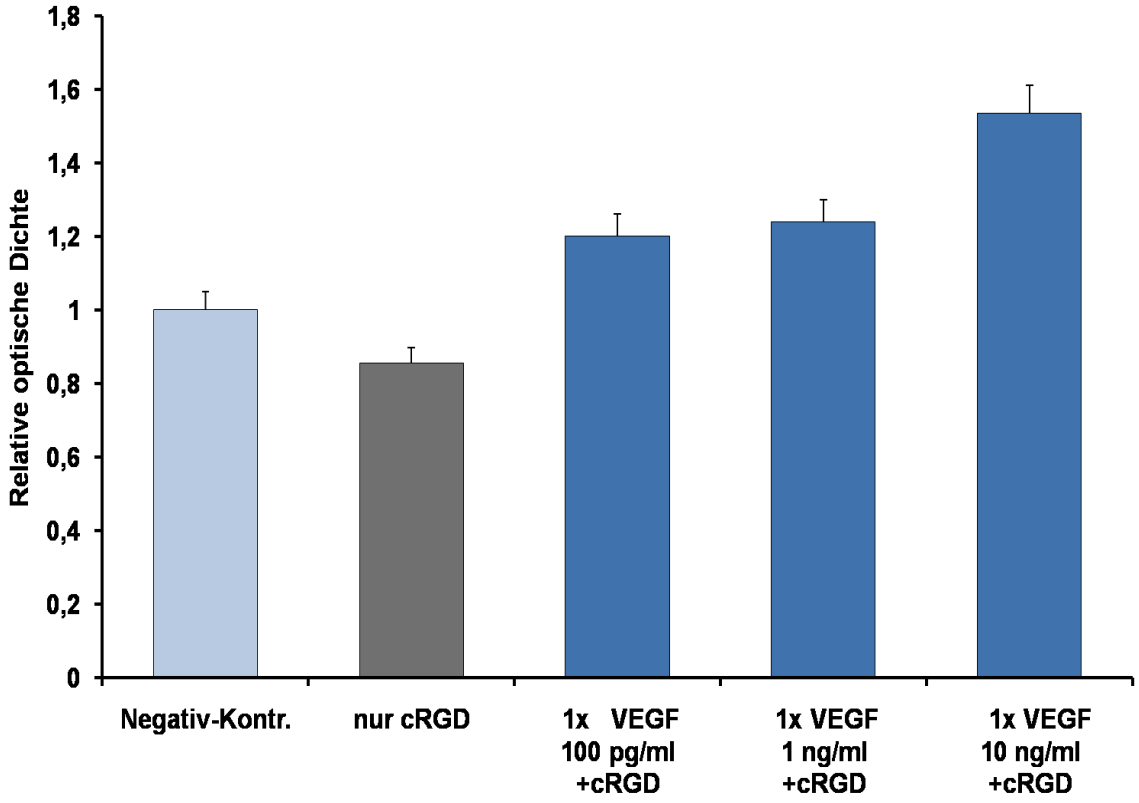


Abbildung 4.4.2: VEGF führt nach Induktion von Apoptose in EC zu einer dosisabhängigen Hochregulierung der PARP-Proteinexpression. Im Anschluss an einmalige Inkubation von EC auf Vitronektin in serumarmem Medium mit VEGF in den Konzentrationen von 100 pg/ml bis 100 ng/ml (5 ×10 -12 M – 5 × 10- 9 M) (blaue Balken rechts) und Apoptoseinduktion mit cRGDfV über 48 Stunden wurde die Proteinexpression mithilfe von automatisierter densitometrischer Analyse des Western-Blots analysiert. Als Negativkontrolle wurden EC auf Vitronektin in serumarmen Medium ohne Zusatz von VEGF und cRGDfV kultiviert (hellblauer Balken), als Positivkontrollen dienten EC mit ausschließlicher Inkubation mit cRGDfV (hellgrauer Balken). Abgebildet sind die Mittelwerte der relativen optischen Dichte (y-Achse) zweier Experimente mit Doppelbestimmungen aus der automatisierten densitometrischen Analyse des Western-Blots als relative Angaben zu der Negativkontrolle (=1). VEGF führte demnach auch bei Induktion von Apoptose zu einer signifikanten Steigerung der Expression des Apoptoseschutzproteins PARP.

Inkubation			MW ROD	+/- SA	t-Test (Vergleich zu Neg.kontr.)	t-Test (Vergleich zu Pos.kontr.)
Neg.kontr.			1,000	0,00		ns
Pos.kontr. (cRGD, Apoptose)			0,853	0,05	ns	
3x VEGF 1 ng/ml +cRGD			1,924	0,6	*s (p<0,05)*	*s (p<0,05)*
3x VEGF 10 ng/ml +cRGD			1,759	0,4	*s (p<0,05)*	*s (p<0,05)*
3xVEGF 100 ng/ml +cRGD			1,801	0,7	*s (p<0,05)*	*s (p<0,05)*

Tabelle 4.4.3: VEGF führt nach Induktion von Apoptose in EC zu einer dosisabhängigen Hochregulierung der PARP-Proteinexpression. Im Anschluss an dreimalige Inkubation von EC auf Vitronektin in serumarmem Medium mit VEGF in den Konzentrationen von 100 pg/ml bis 100 ng/ml (5 ×10 -12 M – 5 × 10- 9 M) über jeweils 24 Stunden und Apoptoseinduktion mit cRGDfV, wurde die Proteinexpression mithilfe von automatisierter densitometrischer Analyse des Western-Blots analysiert. Für die Negativkontrolle wurden EC auf Vitronektin in serumarmen Medium ohne Zusatz von VEGF und cRGDfV kultiviert, als Positivkontrollen dienten EC mit ausschließlicher Inkubation mit cRGDfV. Angegeben sind die Werte der relativen optischen Dichte aus der automatisierten densitometrischen Analyse des Western-Blots als relative Angaben zu der Negativkontrolle (=1). VEGF führte demnach auch bei Induktion von Apoptose zu einer signifikanten Steigerung der Expression des Apoptoseschutzproteins PARP. ns: keine Signifikanz im t-Test ($p > 0,05$); *s (p<0,05)*: Signifikanz im t-Test erreicht

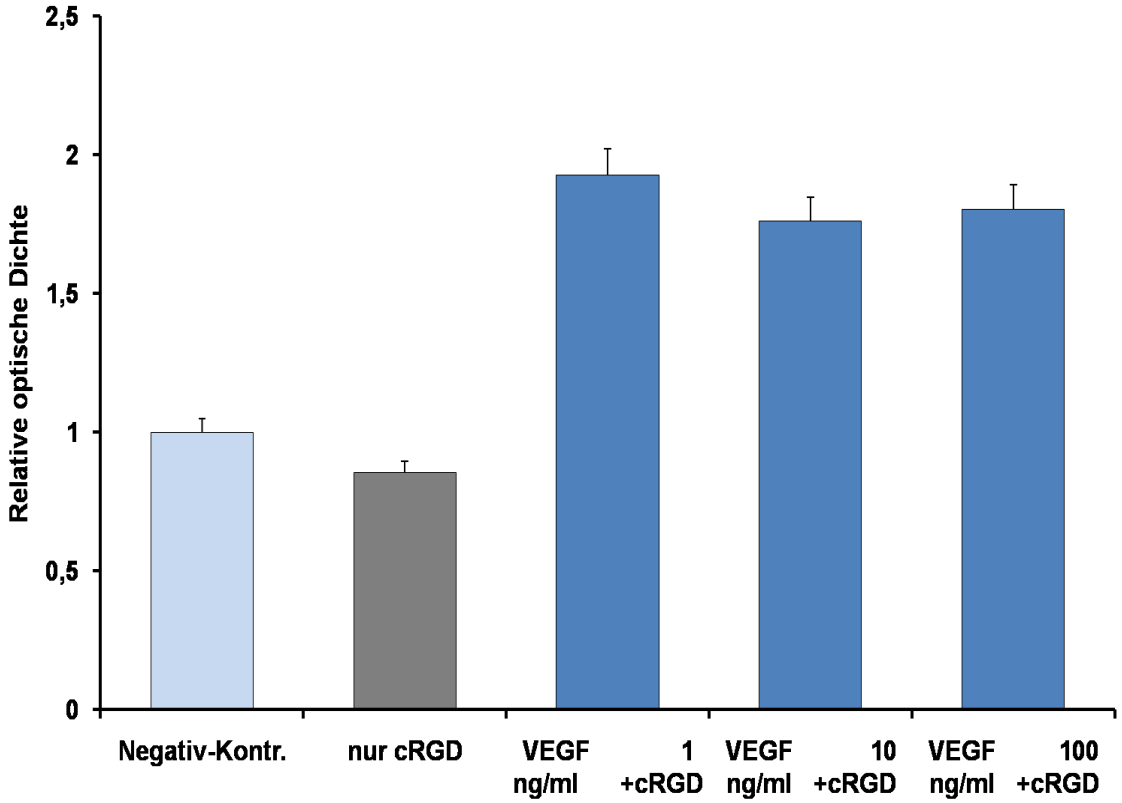


Abbildung 4.4.3: VEGF führt nach Induktion von Apoptose in EC zu einer dosisabhängigen Hochregulierung der PARP-Proteinexpression. Im Anschluss an dreimalige Inkubation von EC auf Vitronektin in serumarmem Medium mit VEGF in den Konzentrationen von 100 pg/ml bis 100 ng/ml (5 ×10 -12 M – 5 × 10- 9 M) (blaue Balken rechts) und Apoptoseinduktion mit cRGDfV über 48 Stunden wurde die Proteinexpression mithilfe von automatisierter densitometrischer Analyse des Western-Blots analysiert. Als Negativkontrolle wurden EC auf Vitronektin in serumarmen Medium ohne Zusatz von VEGF und cRGDfV kultiviert, als Positivkontrollen dienten EC mit ausschließlicher Inkubation mit cRGDfV (hellgrauer Balken). Abgebildet sind die Werte der relativen optischen Dichte (y-Achse) aus der automatisierten densitometrischen Analyse des Western-Blots als Mittelwerte zweier Experimente mit Doppelbestimmungen als relative Angaben zu der Negativkontrolle (=1). VEGF führte demnach auch bei Induktion von Apoptose zu einer signifikanten Steigerung der Expression des Apoptoseschutzproteins PARP.

4.5 VEGF steigert die PARP-Aktivität in Endothelzellen

Zur Bestätigung der Ergebnisse aus Real-time RT-PCR und Western-Blot, welche zeigten, dass VEGF die PARP-1 mRNA-Produktion und die Proteinexpression von PARP hochreguliert, erfolgte die Messung der PARP-Aktivität unter VEGF-Einfluss. Das verwendete PARP-Aktivitätsassay (R&D

Systems) misst die Aufnahme von biotinyliertem ADP in Histone nach Zugabe von biotinyliertem NAD+. Die einmalige Inkubation von EC mit VEGF in den Konzentrationen 100 pg/ml bis 100 ng/ml (5 ×10 -12 M – 5 × 10- 9 M) über 48 Stunden ergab eine signifikante Steigerung der PARP-Aktivität unter dem Einfluss von VEGF. Die Ergebnisse des PARP-Aktivitätsassays unterstreichen daher die Zunahme der PARP-Proteinexpression durch VEGF.

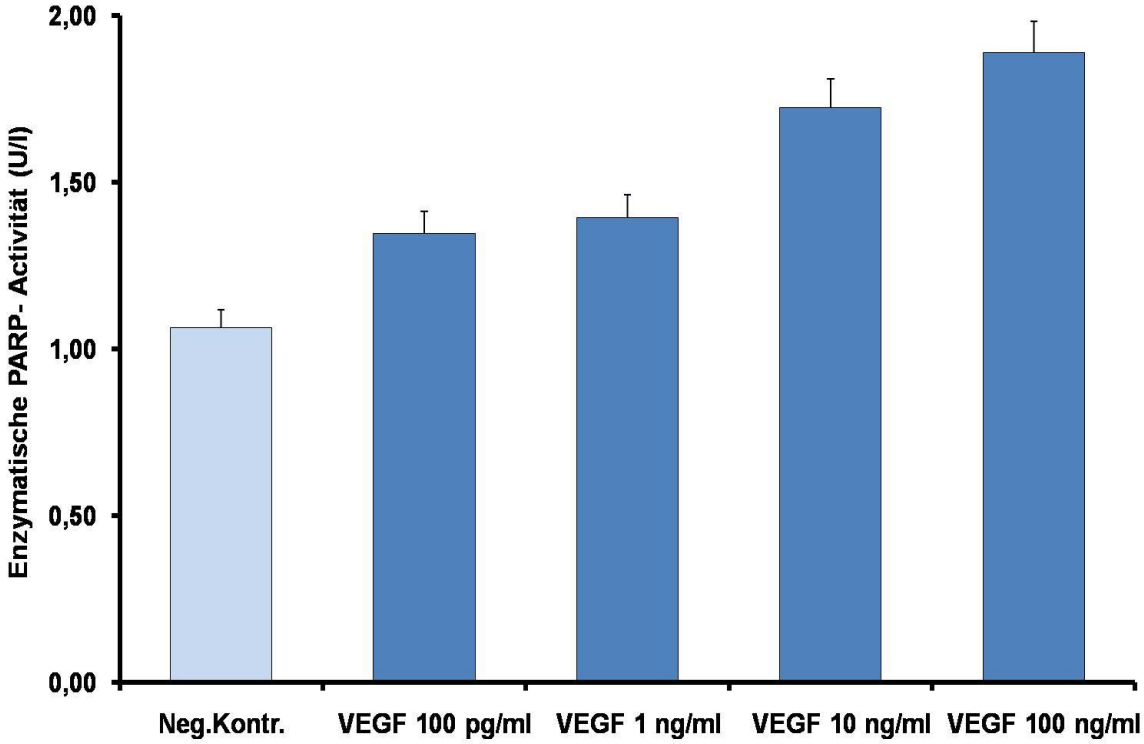


Abbildung 4.5.1: Zunahme der enzymatischen Aktivität des PARP-Proteins nach Inkubation mit VEGF. Im Anschluss an einmalige Inkubation von EC mit VEGF in den Konzentrationen 100 pg/ml bis 100 ng/ml (5 ×10 -12 M – 5 × 10- 9 M) (blaue Balken rechts) wurde ein PARP-Aktivitätsassay durchgeführt. Für die Negativkontrolle wurden EC ohne VEGF auf Vitronektin-Substrat kultiviert (hellblauer Balken). Angegeben sind die Mittelwerte der enzymatischen Aktivität von PARP in U/l (y-Achse) aus zwei Experimenten mit Doppelbestimmungen für jede Inkubation.

Inkubation	MW PARP-Aktivität [U/L]	+/- SA	t-test (Vergleich zu Neg.kontr.)
Neg.kontr.	1064	140	
VEGF 100 pg/ml	1346	120	*s (p< 0,05)*
VEGF 1 ng/ml	1393	220	*s (p< 0,05)*
VEGF 10 ng/ml	1724	190	*s (p< 0,05)*
VEGF 100 ng/ml	1888	100	*s (p< 0,05)*

Tabelle 4.5.1: Zunahme der enzymatischen Aktivität des PARP-Proteins nach Inkubation mit VEGF. Aufgeführt sind die Werte zu Abbildung 4.5.1: die Mittelwerte (MW) der enzymatischen Aktivität von PARP in [U/l] aus zwei Experimenten und Bestimmungen im Duplikat, die dazugehörigen Standardabweichungen (+/- SA), sowie die Ergebnisse des Student's t-tests. ns: keine Signifikanz im t-Test (p > 0,05); *s (p<0,05)*: Signifikanz im t-Test erreicht

4.6 Intrazelluläre Regulation der VEGF-induzierten PARP-Expression

Zur Klärung der Frage, auf welcher intrazellulären Ebene die durch VEGF induzierte Mehrproduktion von PARP reguliert wird, wurden EC auf Vitronektin-Substrat ausgesät, einmal mit VEGF in den Konzentrationen von 1 ng/ml bis 100 ng/ml (5 × 10 -11 M – 5 × 10-9 M) inkubiert und gleichzeitig mit 1 µg/ml Actinomycin D (AD), einem Transkriptionshemmer, bzw. mit Cycloheximid (CHX), einem Translationshemmer, in der Konzentration 2 µg/ml über 24 Stunden inkubiert. Zur Analyse wurden die mRNA und Proteine der Zellen aufgereinigt. Die mRNA-Produktion von PARP-1 mRNA wurde mithilfe von Real-time RT-PCR quantifiziert, die PARP-Proteinexpression wurde im Western-Blot analysiert.

In der Real-time RT-PCR ergab sich eine signifikante Reduktion der PARP-1 mRNA-Produktion unter VEGF-Einfluss nach Inkubation mit AD, während die Inkubation mit CHX keine Auswirkungen auf die mRNA-Produktion von PARP-1 hatte (ohne Abbildung).

Die densitometrische Auswertung von Western-Blots zur Analyse der PARP-Proteinexpression zeigte eine signifikante Reduktion der Proteinmenge von PARP nach VEGF-Stimulation und Inkubation mit AD (Tab. 4.6.1, Abb. 4.6.1). Die Inkubation mit CHX hatte nur geringfügig reduzierende Wirkung auf die PARP-Proteinexpression ohne Signifikanz in der statistischen Auswertung mithilfe des Student`s t-Tests (Tab. 4.6.1, Abb. 4.6.1).

Inkubation	**MW ROD PARP**	**t-test (Vergleich zu Neg.kontr.)**	**t-test (Vergleich zu Kontr. nur AD bzw. CHX)**
Neg.kontr.	1,000		*s (p<0,05)*
VEGF 1 ng/ml	1,752	*s (p<0,05)*	*s (p<0,05)*
VEGF 10 ng/ml	1,481	*s (p<0,05)*	*s (p<0,05)*
VEGF 100 ng/ml	1,893	*s (p<0,05)*	*s (p<0,05)*
VEGF 1 ng/ml + AD	0,457	*s (p<0,05)*	ns
VEGF 10 ng/ml + AD	0,608	*s (p<0,05)*	ns
VEGF 100 ng/ml + AD	0,394	*s (p<0,05)*	ns
VEGF 1 ng/ml + CHX	1,069	ns	ns
VEGF 10 ng/ml + CHX	1,097	ns	ns
VEGF 100 ng/ml + CHX	1,289	*ns*	ns
nur AD (Pos.kontr.)	0,612	*s (p<0,05)*	
nur CHX (Pos.kontr.)	0,986	ns	

Tabelle 4.6.1: Hemmung der VEGF-induzierten Mehrexpression von PARP-Protein durch Inkubation mit AD. CHX hat keinen signifikanten Einfluss auf die VEGF-induzierte Proteinexpression. Angegeben sind die Werte der relativen optischen Dichte aus der automatisierten densitometrischen Analyse des Western-Blots als relative Angaben zu der Negativkontrolle (=1) und als Mittelwerte (MW) aus vier identischen Experimenten mit Doppelbestimmungen, wie in Abbildung 4.6.1 zu sehen. ns: keine Signifikanz im t-Test ($p > 0,05$); *s (p<0,05)*: Signifikanz im t-Test erreicht

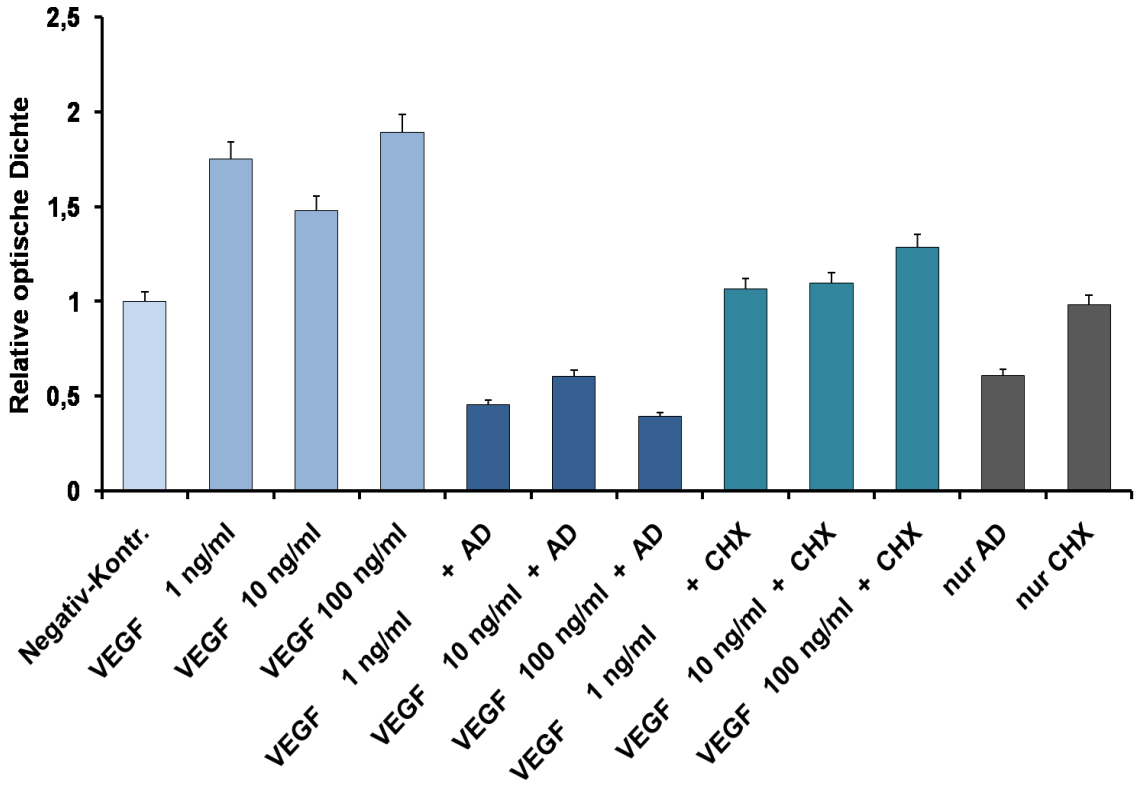


Abbildung 4.6.1: Hemmung der VEGF-induzierten Mehrexpression von PARP-Protein durch Inkubation mit AD. CHX hat keinen signifikanten Einfluss auf die VEGF-induzierte Proteinexpression. EC wurden auf Vitronektin-Substrat ausgesät, einmal mit VEGF in den Konzentrationen von 1 ng/ml bis 100 ng/ml (5 × 10 -11 M – 5 × 10-9 M) inkubiert (mittelblaue Balken) und gleichzeitig mit 1 µg/ml Actinomycin D (AD) (dunkelblaue Balken), einem Transkriptionshemmer, bzw. mit Cycloheximid (CHX) (blau-grüne Balken), einem Translationshemmer, in der Konzentration 2 µg/ml über 24 Stunden inkubiert. Für die Negativkontrolle wurden EC ohne Zugabe von VEGF und AD bzw. CHX kultiviert (hellblauer Balken), als Inhibitorkontrollen dienten EC, denen nur AD bzw. nur CHX zugesetzt wurden (graue Balken). Abgebildet sind die Werte der relativen optischen Dichte (y-Achse) aus der automatisierten densitometrischen Analyse des Western-Blots als relative Angaben zu der Negativkontrolle (=1) und als Mittelwerte aus vier identischen Experimenten mit Doppelbestimmungen der Inkubationen.

4.7 Aufhebung der anti-apoptotischen VEGF-Wirkung durch PARP-Knock-down

Um nachzuweisen, dass die anti-apoptotische Wirkung von VEGF auf EC über PARP vermittelt wird, wurde die Technik der RNA-Interferenz zum Ausschalten der PARP-Genexpression genutzt. Dabei nutzt man doppelsträngige sog. „Short-interfering"–RNA (siRNA), ein 21-nt RNA-Paar mit symmetrischen 2-nt 3'Enden, welche durch Transfektion in die Zelle eingebracht wird, die mRNA mit der gleichen Sequenz abbaut. Die Effektivität des PARP-Knock-downs wurde mittels Western-Blot-Analyse der PARP-Protein-Expression von EC nach Inkubation mit PARP-siRNA vor Durchführung der weiteren Analysen nachgewiesen (ohne Abbildung). Dann wurden EC auf Vitronektin-Substrat mit 10 nM PARP 1-5 siRNA im Transfektionsansatz für 24 Stunden inkubiert, anschließend dreimal mit VEGF in den Konzentrationen 1 ng /ml bis 100 ng/ml (5×10^{-11} M – 5×10^{-9} M) stimuliert, danach über 24 Stunden mit cRGDfV Apoptose induziert. Im Anschluss erfolgte die Analyse der apoptotischen Zellzahl im Durchflusszytometer. Es zeigte sich eine signifikante Steigerung des Anteils von EC, die trotz VEGF-Stimulation in Apoptose gingen, im Vergleich zu den nicht mit PARP 1-5 siRNA behandelten EC. Daraus folgt, dass die VEGF-Wirkung über die Hochregulation von PARP vermittelt wird.

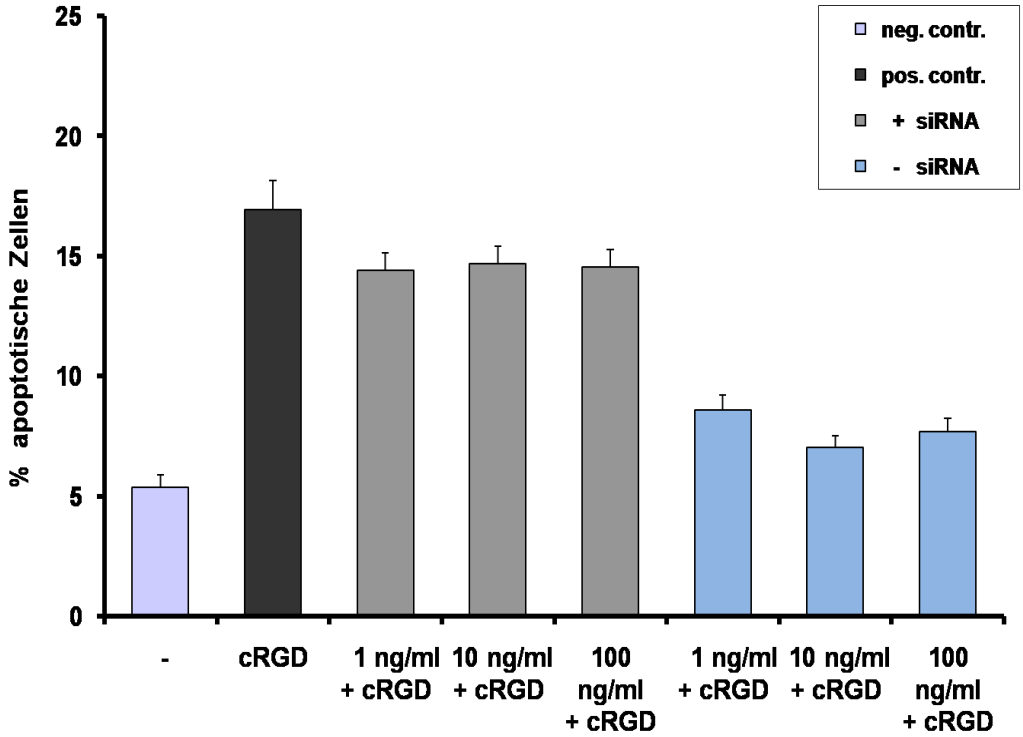


Abbildung 4.7.1: Reduktion der anti-apoptotischen VEGF-Wirkung auf EC nach Minderung der PARP-Genexpression mithilfe von PARP-siRNA. Es wurde die Technik der RNA-Interferenz zum Ausschalten der PARP-Genexpression durchgeführt. EC auf Vitronektin-Substrat wurden mit 10 nM PARP 1-5 siRNA im Transfektionsansatz für 24 Stunden inkubiert, dreimal mit VEGF in den Konzentrationen 1 ng /ml bis 100 ng/ml (5 × 10 -11 M – 5 × 10 -9 M) stimuliert und 24 Stunden später mit cRGDf Apoptose induziert (blaue Balken rechts). Ein anderer Teil der Zellen wurde ohne Transfektion mit siRNA auf gleiche Weise inkubiert (hellgraue Balken), als Negativkontrolle dienten EC auf Vitronektin ohne Transfektion und Zugabe von VEGF oder cRGDfV (hellblauer Balken). Für die Positivkontrolle wurden Zellen auf Vitronektin nur mit cRGDfV inkubiert (schwarzer Balken). Nach weiteren 24 Stunden erfolgten die Färbung mit Annexin-V-FITC und PI und die Analyse der apoptotischen Zellzahl im Durchflusszytometer. Abgebildet ist der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen an einer Gesamtzellzahl von 20000 (y-Achse) als Mittelwerte aus drei identischen Experimenten mit Doppelbestimmungen der Inkubationen.

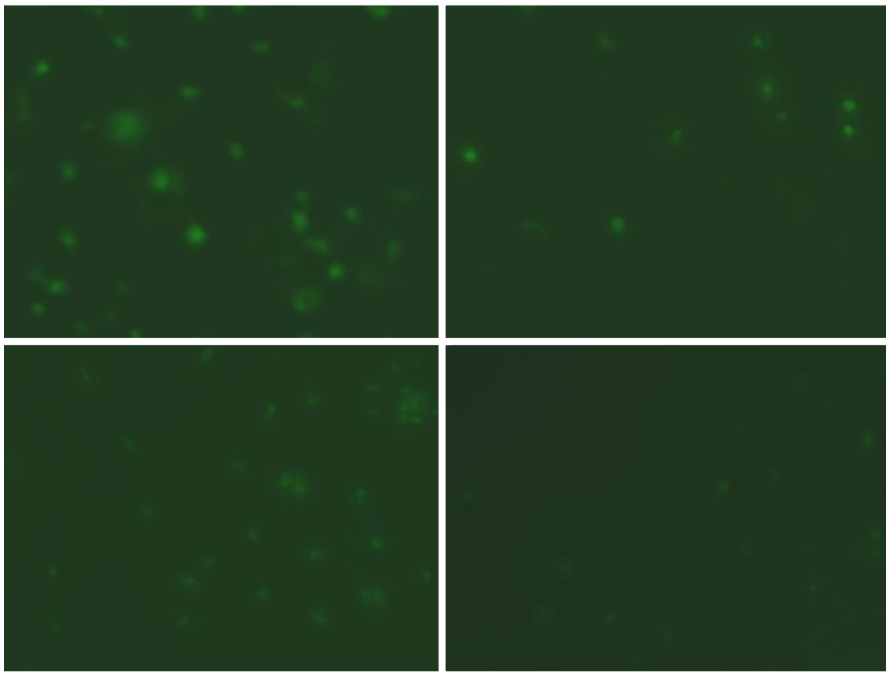
Inkubation	- siRNA	+ siRNA	t-test (Vergleich zu Neg.kontr.)	t-test (Vergleich zu Pos.kontr.)
Neg.kontr.	5,37			*s (p<0,05)*
Pos.kontr.	16,95		*s (p<0,05)*	
VEGF 1 ng/ml + cRGD		14,43	*s (p<0,05)*	ns
VEGF 10 ng/ml + cRGD		14,7	*s (p<0,05)*	ns
VEGF 100 ng/ml + cRGD		14,56	*s (p<0,05)*	ns
VEGF 1 ng/ml + cRGD	8,61		*s (p<0,05)*	*s (p<0,05)*
VEGF 10 ng/ml + cRGD	7,03		ns	*s (p<0,05)*
VEGF 100 ng/ml + cRGD	7,71		ns	*s (p<0,05)*

Tabelle 4.7.1: Reduktion der anti-apoptotischen VEGF-Wirkung auf EC nach Minderung der PARP-Genexpression mithilfe von PARP-siRNA. Angegeben ist der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen an einer Gesamtzellzahl von 20000 (y-Achse) als Mittelwerte aus drei identischen Experimenten mit Doppelbestimmungen der Inkubationen, wie in Abbildung 4.7.1 zu sehen. ns: keine Signifikanz im t-Test (p > 0,05); *s (p<0,05)*: Signifikanz im t-Test erreicht

4.8 Rezeptoren der VEGF-Wirkung

Die an der VEGF-Wirkung beteiligten VEGF-Rezeptoren wurden durch direkte Antikörper-vermittelte Detektion und mithilfe eines Rezeptorinhibitor-Assays nachgewiesen: Immunfluoreszenzmikroskopie diente dem Nachweis der auf EC exprimierten VEGF-Rezeptoren VEGFR-2 und NP-1. Dafür wurden EC auf Vitronektin-Substrat über 24 Stunden mit VEGF 10 ng/ml (5 × 10 -10 M) inkubiert, anschließend folgte der Nachweis mit spezifischen Antikörpern gegen VEGFR-2 und NP-1. Mikroskopisch zeigte sich eine deutliche Expression des VEGF-Rezeptors VEGFR-2, sowie eine etwas schwächere Expression des VEGF-Rezeptors NP-1, welche durch VEGF-Inkubation gesteigert wurde.

a b



c d

Abbildung 4.8.1: Induktion der VEGF-Rezeptoren VEGFR-2 und NP-1 durch VEGF. Immunfluoreszenzmikroskopisch vermehrter Nachweis der VEGF-Rezeptoren VEGFR-2 (a) und NP-1 (c) auf HUVEC nach Inkubation mit VEGF 10 ng/ml. EC wurden auf Vitronektin-Substrat über 24 Stunden mit VEGF 10 ng/ml (5 × 10 -10 M) inkubiert, dann folgte die Inkubation mit Antikörpern gegen VEGFR-2 und NP-1 für 2 Stunden und anschließend mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern über eine Stunde. Mikroskopisch zeigte sich eine deutliche Expression des VEGF-Rezeptors VEGFR-2, sowie eine etwas schwächere Expression des VEGF-Rezeptors NP-1. Rechts die Bilder der Immunfluoreszenzmikroskopie von EC ohne Inkubation mit VEGF (b+d).

Die Beteiligung von VEGFR-2 an der Signalvermittlung durch VEGF wurde durch Inkubation mit einem spezifischen Rezeptorantagonisten analysiert: EC wurden mit VEGF 1 ng/ml bis 100 ng/ml (5×10 – 11 M - 5×10 – 9 M) auf Vitronektin-Substrat inkubiert, und bei einem Teil der Zellen erfolgte gleichzeitig die Inkubation mit dem Rezeptorinhibitor SU5416 in den in der Literatur beschriebenen Konzentrationen von 1-5 µM (Bocci et al. 2004; Bischof et al. 2004) sowie zusätzlich 10 µM. SU5416 inhibiert spezifisch den VEGFR-2, der hauptsächlich die Wirkung von VEGF in arteriellen und venösen Gefäßen vermittelt (Petrova et al. 1999, Neufeld et al. 1999). Inhibitorkontrollen wurden

nur mit SU5416 1-5 µM durchgeführt und Negativkontrollen ohne Zugabe von VEGF oder Inhibitoren.

Die Blockade von VEGFR-2 resultierte in einer signifikanten Reduktion der VEGF-induzierten Mehrexpression von PARP auf das Niveau der PARP-Expression der Negativkontrolle, so dass sich die VEGF-Wirkung durch VEGFR-2-Blockade aufheben ließ. SU5416 alleine beeinflusste die PARP-Expression nicht, verglichen mit der Negativkontrolle. VEGFR-2 war somit in die VEGF-induzierte Expression von PARP involviert.

Inkubation	**MW ROD**:	**+/- SA**	**t-test (Vergleich zu Neg.kontr.)**	**t-test (Vergleich zu Inhib.Kontr.)**
Neg.-Kontr.	1,000	0		ns
VEGF 1 ng/ml	1,458	0,4	*s (p<0,05)*	*s (p<0,05)*
VEGF 10 ng/ml	1,330	0,29	*s (p<0,05)*	*s (p<0,05)*
VEGF 100 ng/ml	1,495	0,16	*s (p<0,05)*	*s (p<0,05)*
VEGF 1 ng/ml + SU5416	0,903	0,02	ns	ns
VEGF 10 ng/ml + SU5416	1,085	0,35	ns	ns
VEGF 100 ng/ml + SU5416	0,900	0,11	ns	ns
Inhib.-Kontr. (nur SU5416)	1,041	0,06	ns	

Tabelle 4.8.1: Reduktion der durch VEGF induzierten Mehrproduktion von PARP-Protein bei Inhibition des VEGFR-2 mithilfe von SU5416. Angegeben sind die Mittelwerte der relativen optischen Dichte (MW ROD) aus der automatisierten densitometrischen Analyse des Western-Blots als relative Angaben zu der Negativkontrolle (=1), dargestellt in Abbildung 4.8.2, die Standardabweichungen (+/- SA), sowie die Ergebnisse des Student's t-Test. ns: keine Signifikanz im t-Test ($p > 0,05$); *s (p<0,05)*: Signifikanz im t-Test erreicht.

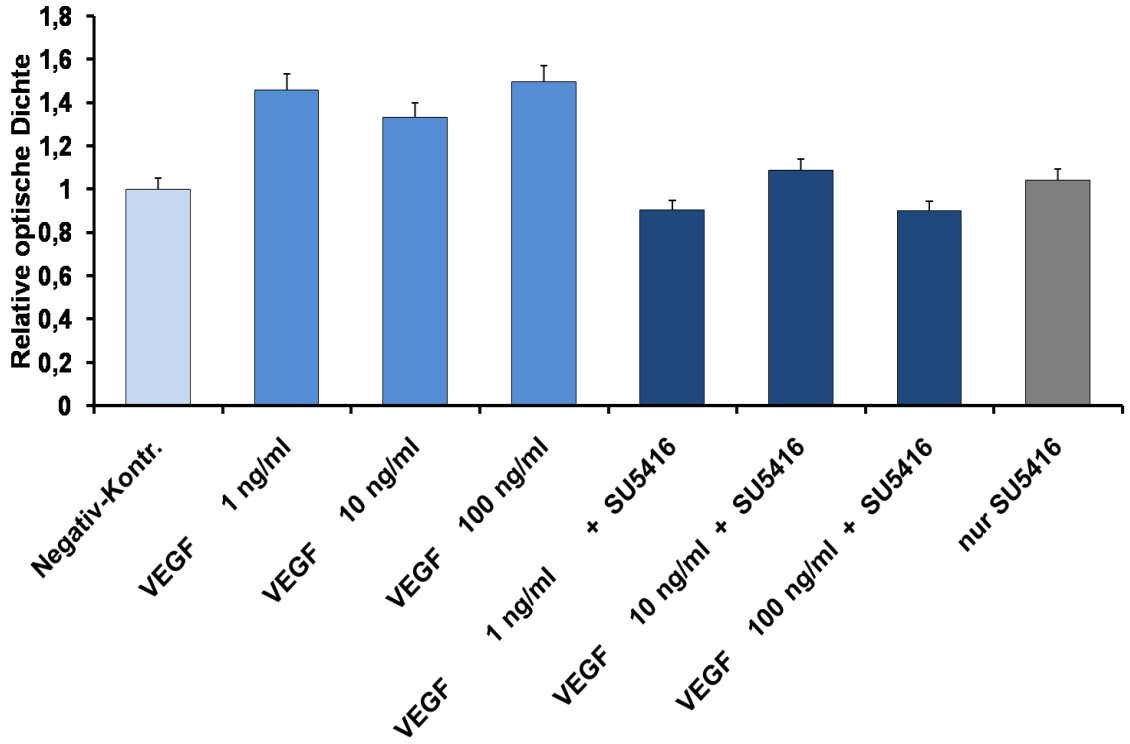


Abbildung 4.8.2: Reduktion der durch VEGF induzierten Mehrproduktion von PARP-Protein bei Inhibition des VEGFR-2 mithilfe von SU5416. EC wurden mit VEGF 1 ng/ml bis 100 ng/ml (5×10 – 11 M - 5×10 – 9 M) auf Vitronektin-Substrat inkubiert (mittleblaue Balken), und bei einem Teil der Zellen erfolgte gleichzeitig die Inkubation mit dem Rezeptorinhibitor SU5416 (dunkelblaue Balken) in den in der Literatur beschriebenen wirksamen Konzentrationen von 1-5 µM (Bocci et al. 2004; Bischof et al. 2004) und darüberhinaus mit 10 µM. SU5416 inhibiert spezifisch den VEGFR-2, der hauptsächlich die Wirkung von VEGF in arteriellen und venösen Gefäßen vermittelt (Petrova et al. 1999, Neufeld et al. 1999). Inhibitorkontrollen (grauer Balken) wurden nur mit SU5416 1-5 µM durchgeführt und Negativkontrollen (hellblauer Balken) ohne Zugabe von VEGF oder Inhibitoren. Angegeben sind die Werte der relativen optischen Dichte (y-Achse) aus der automatisierten densitometrischen Analyse des Western-Blots als relative Angaben zu der Negativkontrolle (=1).

4.9 Signaltransduktionswege der VEGF-Wirkung

Zur Klärung der Frage, welche Signaltransduktionsmoleküle downstream des Rezeptors aktiviert werden, wurden EC über 15, 30, 60 und 120 Minuten mit VEGF 10 ng/ml (5 × 10 -10 M) bzw. VEGF 100 ng/ml inkubiert und die anschließend aufgereinigten Proteine mithilfe von Western-Blot analysiert. Untersucht wurden die MAP-Kinasen JNK, p38 MAPK, Erk-1/ -2 und Akt,

welche wichtige Funktionen im Hinblick auf Überleben und Apoptose von Zellen haben (Davis 2000; Chang, Karin 2001; Johnson, Lapdat 2002; Werlen et al. 2003). Die vermehrte Phosphorylierung von diesen Signaltransduktionsmolekülen bzw. Kinasen ist ein Hinweis auf ihre Aktivierung. Daher erfolgten die Western-Blot-Analysen jeweils mithilfe von Primärantikörpern gegen das gesamte Protein und gegen die phosphorylierte Form des entsprechenden Moleküls.

Die automatisierte densitometrischen Auswertung der Western-Blots zeigte keine Veränderungen durch VEGF-Stimulation bei den phosphorylierten Anteilen von p38 und Erk -1/ -2. Bei JNK und Akt war eine signifikante Zunahme des Anteils der phosphorylierten Formen zu verzeichnen. Daraus folgt eine Signalübermittlung der VEGF-Wirkung an EC über JNK und Akt.

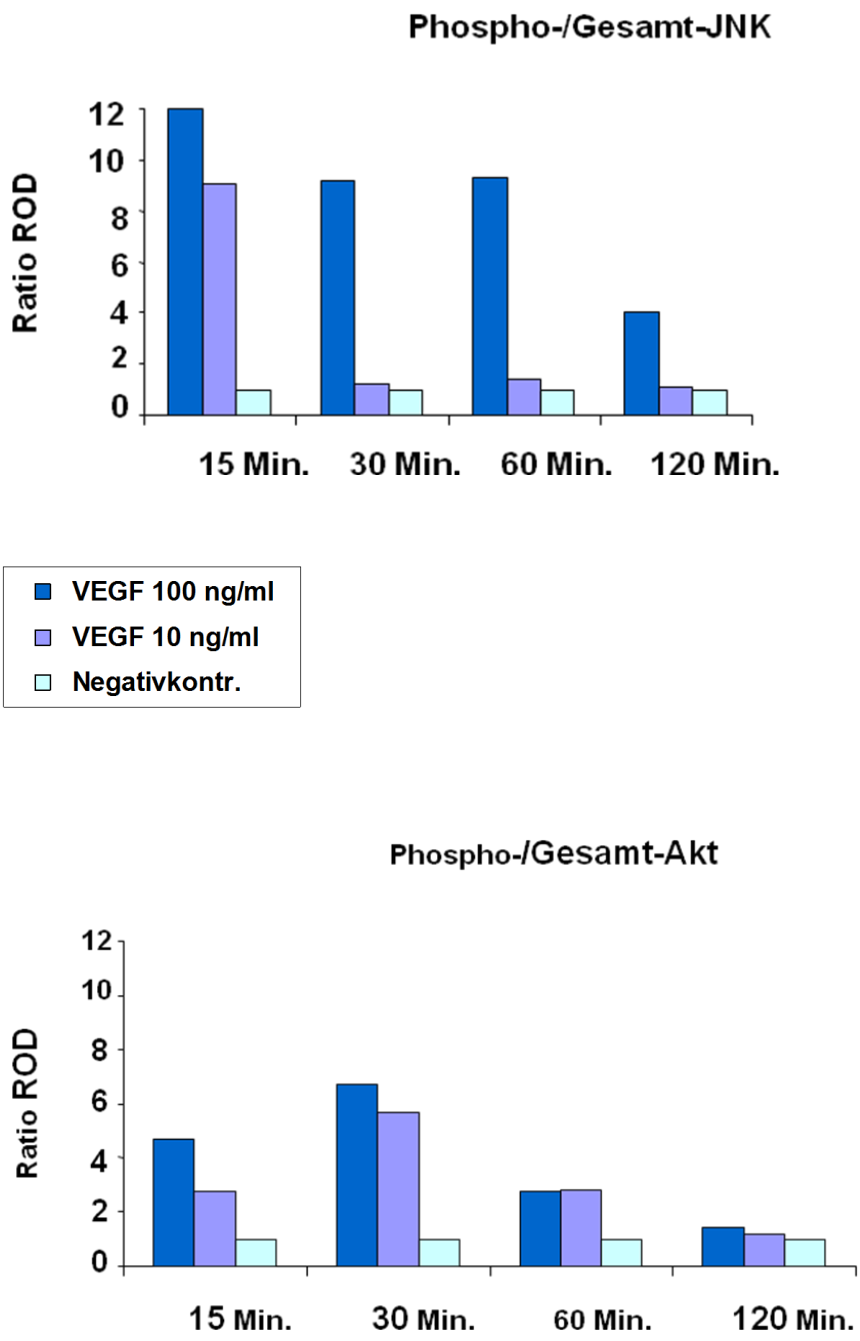


Abbildung 4.9.1: Einfluss von VEGF auf die Phosphorylierung der Signaltranduktionsmoleküle JNK (oben) und Akt (unten) in EC. Die vermehrte Phosphorylierung von diesen Signaltransduktionsmolekülen bzw. Kinasen ist ein Hinweis auf ihre Aktivierung. EC auf Vitronektin-Substrat wurden über 15, 30, 60 und 120 Minuten mit VEGF 10 ng/ml (5 × 10 -10 M) (hellblaue Balken) bzw. VEGF 100 ng/ml (dunkelblaue Balken) inkubiert und die anschließend aufgereinigten Proteine mithilfe von Western-Blot analysiert. Die Negativkontrolle wurde ohne VEGF-Inkubation auf Vitronektin kultiviert (hellgrüne Balken). Abgebildet sind die Quotienten der Werte für die relative optische Dichte der phosphorylierten

Form des Moleküls zu der für das Gesamtmolekül aus der automatisierten densitometrischen Analyse der Banden im Western-Blot (y-Achse). Signifikante Zunahme der phosphorylierten Formen von JNK (oben) und Akt (unten) unter VEGF-Stimulus.

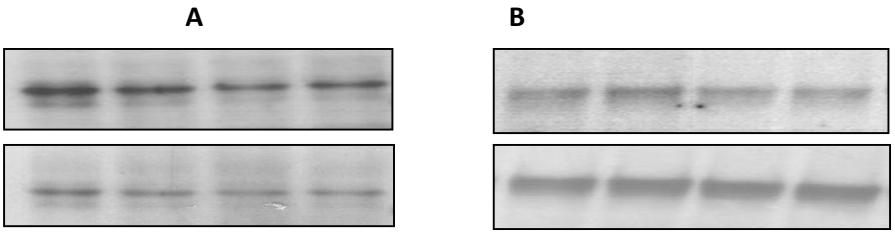


Abbildung 4.9.2: Nachweis im Western Blot von **A**: Phospho-JNK (obere Reihe) zu Gesamt-JNK (untere Bande) und **B**: Phospho-Akt zu Gesamt-Akt nach 15, 30, 60 und 120 Minuten unter Inkubation mit VEGF 100 ng/ml; vermehrte Phosphorylierung und damit Aktivierung von JNK und Akt nach 15 Minuten (Bande links außen) bzw. 30 Minuten (zweite Bande von links).

Inkubation		Ph/Ges-Akt	Ph/Ges-JNK	Ph/Ges-ERK	Ph/Ges-p38
Negativkontr.	15 Min.	1	1	1	1
	30 Min.	1	1	1	1
	60 Min.	1	1	1	1
	120 Min.	1	1	1	1
VEGF 10 ng/ml	15 Min.	2,762	8,99	0,212	0,481
	30 Min.	5,648	1,183	0,568	0,77
	60 Min.	2,806	1,443	0,362	0,86
	120 Min.	1,201	1,091	0,844	1,032
VEGF 100 ng/ml	15 Min.	4,682	12	0,199	1,041
	30 Min.	6,726	9,16	0,378	0,814
	60 Min.	2,723	9,316	0,356	0,642
	120 Min.	1,382	4,022	0,159	0,683

Tabelle 4.9.1: VEGF induziert die Phosphorylierung von JNK und Akt in Endothelzellen. Die vermehrte Phosphorylierung von diesen Signaltransduktionsmolekülen ist ein Hinweis auf ihre Aktivierung. EC auf Vitronektin-Substrat wurden über 15, 30, 60 und 120 Minuten mit VEGF 10 ng/ml (5 × 10 -10 M) bzw. VEGF 100 ng/ml) inkubiert und die anschließend aufgereinigten Proteine mithilfe von Western-Blot analysiert. Die Negativkontrolle wurde ohne VEGF-Inkubation auf Vitronektin kultiviert. Angegeben sind die Quotienten der Werte für die relative optische Dichte der phosphorylierten Form des Moleküls zu der für das Gesamtmolekül aus der automatisierten densitometrischen Analyse der Banden im Western-Blot. Die Werte der Inkubationen sind relative Angaben zu der Negativkontrolle (=1). Signifikante Zunahme der phosphorylierten Form von JNK und Akt unter VEGF-Stimulus. Die Werte für JNK und Akt sind in Abbildung 4.9.1 dargestellt.

5 Diskussion und Schlussfolgerungen

VEGF ist der stärkste Wachstumsfaktor für Endothelzellen. Er treibt die embryonale Vaskulogenese voran, im postnatalen Organismus schützt er die Integrität des Endothels (Zachary 2001). VEGF induziert Differenzierung, genauso wie Migration und Überleben von Endothelzellen (Petrova et al. 1999). Außerdem regt er das Wachstum neuer Kapillaren an, reguliert vaskuläre Permeabilität (Neufeld et al. 1999) und rekrutiert zirkulierende endotheliale Vorläuferzellen (Moreira et al. 2007).

Es sind verschiedene Mechanismen beschrieben worden, über die VEGF seine Effekte auf Endothelzellen des Gefäßsystems ausübt, wie die Hochregulierung der endothelialen und induzierbaren Stickoxidsynthase oder die verstärkte Expression von α1- und α2- Integrinen (Neufeld et al. 1999). Im letzten Jahrzehnt konzentrierte sich die VEGF-Forschung auf die Untersuchung proangiogener Mechanismen. Der anti-apoptotische Effekt war bisher weniger stark im Zentrum des Interesses.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit dem anti-apoptotischen Effekt von VEGF. Dieser trägt größenteils zum Erhalt der endothelialen Integrität in Situationen von vaskulärem Stress bei. Aber die Apoptosehemmung hilft auch, Neoangiogenese voranzutreiben. Über die Wirkmechanismen der anti-apoptotischen Wirkung von VEGF gibt es nur wenige Studien: Gerber und Mitarbeiter (1998 a) beschreiben, dass VEGF seine anti-apoptotische Funktion über die Hochregulierung der intrazellulären Proteine PI3K und Akt ausübt. Auch Fujio und Mitarbeiter (1999) beschreiben einen zytoprotektiven Effekt der VEGF-Wirkung über Akt. Weiterhin wurde eine durch VEGF induzierte Expression der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und A1 demonstriert (Gerber et al. 1998b). Demnach führt die Stimulation von HUVEC mit VEGF zu einer vermehrten mRNA-Produktion und einer dazu korrelierten gesteigerten Proteinexpression von Bcl-2 und A1. Die Signifikanz der erhöhten Expression dieser Signalmoleküle und Proteine blieb aber ungeklärt. In der vorliegenden Arbeit wird ein neuer anti-apoptotischer Mechanismus von VEGF demonstriert, der über die Hochregulation des Caspasensubstrates PARP seine Wirkung

ausübt. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Mechanismus für den Hauptanteil der anti-apoptotischen VEGF-Wirkung verantwortlich ist.

5.1 Bedeutung von PARP für Apoptose und Zellüberleben

Das Caspasensubstrat PARP kann als Mediator der Caspasen bezeichnet werden: Es stellt die Verbindung zwischen der während der Apoptose ablaufenden Caspasenkaskade und den irreversiblen Prozessen, die durch Apoptose induziert werden, dar. PARP ist ein DNA-reparierendes Enzym und muss von der Caspasenkaskade inaktiviert werden, damit Apoptose ablaufen kann. Das heißt, PARP ist ein wichtiges Substrat der Caspasen. Andererseits kann seine Regulation auch den Apoptose-Ablauf modulieren, indem es der apoptotischen Wirkung der Caspasen entgegenwirkt, daher ist PARP auch Caspasen-Mediator. Persistierende und starke Stimulation von Proliferation oder Zellreplikation erhöht PARP-Protein in der Zelle und schützt so vor dem apoptotischen Zelltod (Tesfaigzi et al. 1998). Eine Regulation von PARP durch bakterielle Toxine wurde in pulmonalen Epithelzellen gezeigt (Tesfaigzi et al. 1998), die Bedeutung der Endotoxin-induzierten Hochregulation von PARP konnte jedoch nicht aufgeklärt werden. Die Induktion der Expression des Caspasenmediators PARP vermag die apoptotische Schwelle von Endothelzellen anzuheben und so Strukturen des Zellkerns vor dem apoptotischen Zelltod zu schützen (Aguilar-Quesada et al. 2007).

5.2 Validität des experimentellen Settings

Die Beteiligung der Caspasenkaskade im Rahmen der Apoptose von adhärenten Endothelzellen durch Adhäsionshemmung war in vorangehenden Arbeiten demonstriert worden (Al-Fakhri et al. 2003). Ebenso war die Beteiligung der Spaltung von PARP im Rahmen der Apoptoseinduktion durch Adhäsionshemmung in Endothelzellen demonstriert worden: Nach Aktivierung der Caspasen 3 und 7 durch Inkubation von Endothelzellen mit cRGDfV waren vermehrt Spaltprodukte von PARP nachgewiesen und PARP als Caspasensubstrat identifiziert worden (Al-Fakhri et al. 2008). Apoptoseinduktion

durch inhibierte Integrinbindung wurde als ein natürlich vorkommender Prozess identifiziert, da die humanen anti-adhäsiven Faktoren PAI-1 und Hka ebenfalls Adhäsion hemmen und ähnlich wie cRGDfV Apoptose induzieren (Al-Fakhri et al. 2003). Die Demonstration dieser Mechanismen in humanen arteriosklerotischen Arterien unterstützte die Hypothese der physiologischen Relevanz von Adhäsionshemmung und Apoptose (Al-Fakhri et al. 2003). In den Experimenten der vorliegenden Arbeit wurde daher Apoptose induziert durch Blockade der Bindung von Integrin αvβ3 an Vitronektin durch den spezifischen αv-Inhibitor cRGDfV. Die Konzentration von cRGDfV wurde in vorangehenden Arbeiten ermittelt (Al-Fakhri et al. 2003).

Um die Wirkung von VEGF auf die Endothelapoptose und auf die Regulation von PARP zu untersuchen, wurden VEGF-Konzentrationen von 100 pg/ml bis 1 µg/ml (5×10^{-12} M - 5×10^{-8} M) eingesetzt. Diese VEGF-Konzentrationen wurden in Anlehnung an Publikationen gewählt, in denen Konzentrationen von 1 ng/ml bis 10 ng/ml (5×10^{-11} M - 5×10^{-10} M) die Migration, Proliferation und das Überleben von Endothelzellen stimuliert hatten (Kim et al. 2003; Cai et al. 2003). Zusätzlich wurden Studien berücksichtigt, in denen von VEGF-Konzentrationen von 100 pg/ml bis 5 ng/ml (5×10^{-12} M - 1×10^{-10} M) in Patienten und gesunden Menschen berichtet wurde (Kraft et al. 1999; Proczka et al. 2006; Futami et al. 2007). Konzentrationen bis zu 1 µg/ml (5×10^{-8} M), die oberhalb der bei Patienten nachweisbaren Plasmakonzentrationen lagen, wurden eingesetzt, um das gesamte Spektrum der VEGF-Effekte auszutesten. Allerdings bestätigte sich in unseren Experimenten die schon zuvor gemachte Beobachtung (Gerber et al. 1998a), dass Konzentrationen von VEGF > 100 ng/ml zu keiner weiteren Reduktion der Apoptoserate von Endothelzellen führen konnten. Möglicherweise führt ein ausgeprägter Überschuss an VEGF zu verminderter Effektivität der Rezeptordimerisierung und Signalweiterleitung, so dass mit zunehmendem Überschuss von VEGF eine zunehmende Anzahl von VEGFR2 nach Bindung seines Liganden in der monomeren Form verbleibt (Gerber et al. 1998a).

5.3 Anti-apoptotische Wirkungsweise von VEGF an Endothelzellen

Um zu verifizieren, ob die durch VEGF induzierte vermehrte Expression von PARP tatsächlich der Apoptose von Endothelzellen entgegenwirken kann, wurden HUVEC mit VEGF 100 pg/ml - 100 ng/ml (5×10^{-12} - 5×10^{-9} M) inkubiert, mit cRGDfV 5 µg/ml Apoptose induziert und die Anzahl der apoptotischen Zellen gemessen. Zunächst haben wir VEGF gleichzeitig mit cRGDfV gegeben und konnten lediglich nur eine Apoptosehemmung um weniger als 10 % beobachten. Das passt zu den Beobachtungen von Fujikawa und Mitarbeitern (1999), die zeigen konnten, dass der anti-apoptotische Effekt von VEGF auf adhärente Zellen verschwindet, sobald die Zellen ihre Adhärenz verloren hatten. Aus diesem Grund wurden die Zellen dann noch vor Apoptoseinduktion mit cRGDfV mit VEGF präinkubiert. Zunächst wurde VEGF einmal über 48 Stunden gegeben (Abb. 4.2.1, Tab. 4.2.1), dann dreimal über jeweils 24 Stunden (Abb.4.2.2, Tab. 4.2.2). Wir fanden eine Apoptosehemmung von 60 % bei einmaliger Präinkubation und von 90 % bei dreimaliger VEGF-Gabe. Es lag aufgrund der beobachteten Induzierbarkeit der anti-apoptotischen Wirkung nahe, dass es nicht ein Signalweg war, der akut aktiviert wurde, sondern ein induzierbares anti-apoptotisches Protein sein musste, das durch VEGF reguliert wurde. Aufgrund der nachgewiesenen Caspasen-Aktivierung bei Adhäsionshemmung in Endothelzellen (Al-Fakhri et al. 2003), musste dieses Protein in Verbindung mit der Caspasenkaskade stehen. Außerdem zeigten diverse pharmakologische PARP-1-Inhibitoren antiangiogene Effekte in HUVEC über Senkung der VEGF-getriggerten Proliferation, Migration und Formation der EC (Pacher, Szabó 2008). Daher wurde PARP als möglicher intrazellulärer Vermittler der VEGF-Wirkung untersucht. VEGF kann der apoptotischen Wirkung der Caspasenkaskade wirksam entgegenwirken, indem es das Caspasensubstrat PARP hochreguliert.

5.4 Einfluss von VEGF auf die PARP-Proteinexpression

Eine einzige Applikation von VEGF induzierte die Hochregulation der intakten Form von PARP in enger Dosis-Wirkungs-Beziehung von 100 pg/ml bis 1 µg/ml

(5 x 10^{-12} M - 5 x 10^{-8} M) (Abb. 4.4.1, Tab. 4.4.1). Wiederholte Inkubationen mit VEGF induzierten eine Zunahme von nochmals 25 % des intakten PARP-Proteins verglichen mit der einzelnen Inkubation. Die Produktion der mRNA von PARP zeigte einen mit der Proteinexpression korrelierten Anstieg in der Real-Time-RT-PCR (Abb. 4.3.1). Diese Dosis- und Zeitintervall-abhängige Induzierbarkeit von PARP stimmte überein mit der bei mehrfacher VEFG-Applikation beobachteten verstärkten anti-apoptotische Wirkung im Flowzytometrie-Assay, die ebenfalls eine Dosisanhängigkeit zeigte.

VEGF bewirkte daher in Endothelzellen eine Hochregulation von PARP, die auf mRNA- und Proteinebene nachweisbar war. Möglich wäre zusätzlich zu der erhöhten mRNA-Produktion durch VEGF und konsekutiv gesteigerter Proteinexpression auch eine RNA-stabilisierende Wirkung von VEGF. An Alveolarzellen, die mit bakteriellen Toxinen behandelt wurden, konnte eine reduzierte Sensitivität von Endothelzellen für die Induktion von Apoptose sowie eine PARP-Hochregulierung gezeigt werden (Tesfaigzi et al. 1998). Die vorliegenden Ergebnisse belegen, dass VEGF über die Hochregulierung von PARP die Empfindlichkeit von Endothelzellen für apoptotische Stimuli senkt. Dieser Effekt von VEGF ist für diesen Wachstumsfaktor spezifisch, da die Wachstumsfaktoren bFGF und TGF-β keinen Einfluss auf die PARP-Produktion von EC haben. Ein Überschuss an intaktem PARP-Protein kann apoptotischen Stimuli entgegenwirken, indem es die Schwelle zur Induktion von Apoptose in Endothelzellen anhebt.

Für die vollständige Ausführung der Apoptose muss PARP inaktiviert werden, indem es durch Caspasen gespalten wird. Erhöhte Level an PARP-Protein führen im Umkehrschluss also zu reduzierter Apoptose, indem sie der Caspasenkaskade entgegenwirken. Von PARP sind bis zu 18 Isoformen bekannt (Bürkle 2001, Virag et al. 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde PARP-1 untersucht, da diese Isoform für über 90% der Poly(ADP-ribosyl)ationskapazität im Menschen und im Säugetier verantwortlich ist. Ein bekannter Aktivierungsmechanismus für PARP-1 sind DNA-Brüche (Virag 2005; Virag, Szabó 2002). Kommt es in einer Zelle durch genotoxische Stimuli (Ultraviolette-Strahlung, ionisierende Strahlung, freie Radikale) zu DNA-Strangbrüchen, bindet PARP-1 an die entstandenen Strangbruchstellen und

wird so aktiviert. Dann spaltet es NAD+ in ADP-Ribose und Nicotinamid. In der Folge polymerisiert PARP ADP-Ribose, welches kovalent an PARP und Histone gebunden ist, und führt so zur Rekrutierung verschiedener Reparatur- und Effektorproteine. Die Chromatinstruktur wird durch Poly(ADP-ribosyl)ation der Histone aufgelockert, so dass die Reparaturmaschinerie an den beschädigten DNA-Abschnitten angreifen kann. Das automodifizierte PARP löst sich wieder von der DNA und diese wird repariert (Virag 2005). Die Poly(ADP-ribosyl)ation ist wichtiger Teil vieler physiologischer und pathologischer zellulärer Funktionen, wie Reparatur von DNA, Transkription von Genen, Zellzyklus-Progression, Zelltod, Chromatinfunktionen und genomische Stabilität (Pacher, Szabó 2007; Szabó et al. 2006, Virag 2005; Virag, Szabó 2002).

Seit einiger Zeit mehren sich die Beweise, dass die PARP-1-Aktivität durch verschiedene endogene und exogene Faktoren moduliert werden kann, darunter diverse Kinasen, Östrogen, Schilddrüsenhormone, Vitamin D und Metabolite des Koffeins (Pacher, Szabó 2007, Szabó et al. 2006). Kürzlich sind wiederum andere Aspekte der PARP-Aktivierung diskutiert worden: PARP ist neben seiner DNA-reparierenden Funktion mit der durch AIF induzierten Apoptose in Verbindung gebracht worden. Die Signifikanz der *In vitro*-Beobachtung, dass p53 durch PARP aktiviert werden kann, ist nicht vollständig geklärt, und die Daten sind widersprüchlich, aber es scheint keinen Zusammenhang dieses Mechanismus mit Apoptose *in vivo* zu geben (Pacher, Szabó 2007; Virag 2005). Außerdem führt starker DNA-Schaden möglicherweise zu einer suizidalen Reaktion der Zellen durch Überaktivierung von PARP, welche zur Erschöpfung der zellulären Energievorräte wie ATP führt. Daher wurde die Hypothese formuliert, dass eine übermäßige Aktivierung von PARP das Programm der Zelle von Apoptose auf Nekrose umschaltet (Virag 2005).

Eine übermäßige Aktivierung von PARP beobachtet man in Krankheiten, die sich durch extensiven Zellschaden und Zelltod durch oxidativen Stress auszeichnen, wie Myokardinfarkt und ischämischer Schlaganfall. Diskutiert wird in diesem Zusammenhang eine Bedeutung von PARP-1 in der Regulierung verschiedener proinflammatorischer Proteine (Pacher, Szabó 2007). Therapien mit PARP-Inhibitoren sind erfolgreich im Tiermodell solcher Erkrankungen

getestet worden (Virag 2005). PARP-Inhibitoren konnten begleitend zu Chemo- oder Radiotherapie die apoptotische Schwelle von Krebszellen senken (Ame et al. 2004). Zahlreiche Studien beschäftigen sich mit der Hemmung oder Gen-Ausschaltung von PARP-1, um die Signifikanz von PARP-1 für den apoptotischen Zelltod zu klären. *In vitro*-Studien mit pharmakologischen PARP-Inhibitoren oder PARP-$1^{-/-}$ Zellen sowie Studien, die Wildtyp- (PARP-$1^{+/+}$) und PARP-1 Knockout (PARP-$1^{-/-}$)- Mäuse verglichen, kamen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Etliche Studien demonstrierten die Wichtigkeit von PARP-1 für die Hemmung von Apoptose (Virag 2005). Die Bedeutung des suizidalen Signalweges über PARP im Menschen wird daher noch kontrovers diskutiert. PARP hat möglicherweise eine regulatorische Rolle in der Koordination der verschiedenen apoptotischen Signalwege (Virag 2005). Im Rahmen der Endothelzellapoptose, die nicht mit ausgeprägtem Organschaden und damit auch nicht mit PARP-Überaktivierung einhergeht, muss PARP deshalb als ein schützendes Enzym angesehen werden, welches apoptotischen Stimuli durch seine DNA-reparierende Wirkung entgegenwirkt (Virag 2005). PARP hat daher eine Apoptose-inhibierende und zellprotektive Wirkung im Rahmen des apoptotischen Endothelschadens im Initial- und Adaptions-Stadium der Arteriosklerose.

Deshalb wollten wir den Einfluss von VEGF auf PARP auch während der Induktion von Endothelzellapoptose durch cRGDfV untersuchen, da die Apoptose durch Adhäsionshemmung bei Arteriosklerose der *in vivo* bedeutsame Weg der Apoptose-Induktion ist (Al-Fakhri et al. 2003). Dafür wurden HUVEC mit VEGF 100 pg/ml - 100 ng/ml (5×10^{-12} - 5×10^{-9} M) vorinkubiert und dann mit cRGDfV 5 µg/ml Apoptose induziert. Auch hier zeigten sich eine gesteigerte mRNA-Produktion und eine erhöhte Proteinexpression von PARP in enger Dosis-Wirkungs-Beziehung zu VEGF (Abb. 4.4.2, Tab. 4.4.2, Abb. 4.4.3, Tab.4.4.3). VEGF-Inkuabtion führte auch bei zeitgleicher Inkubation mit cRGDfV zur Induktion von Apoptose dosisabhängig zu einer vermehrten Gen- und Proteinexpression des anti-apoptotischen Proteins PARP in Endothelzellen. Trotz Aktivierung der Caspasenkaskade durch cRGDfV war bei VEGF-Inkubation vermehrt PARP-Protein nachweisbar gegenüber nur mit cRGDfV-inkubierten oder unbehandelten Zellen, was für eine

Anhebung der apoptotischen Schwelle spricht. Bei dreimaliger Präinkubation mit VEGF betrug die Steigerung der PARP-Proteinexpression nach Apoptoseinduktion durchschnittlich 56 %. Über diesen Mechanismus kann VEGF möglicherweise der bereits eingeleiteten Apoptose entgegenwirken.

5.5 Zusammenhang zwischen Anti-Apoptose und PARP-Regulation durch VEGF

Der Zusammenhang zwischen der anti-apoptotischen VEGF-Wirkung und der Regulation des Schutzproteins PARP durch VEGF wurde durch mRNA-Knockdown-Versuche analysiert. In Vorversuchen wurde zunächst die Wirksamkeit der PARP-siRNA sichergestellt. Nach Transfektion der EC mit PARP-siRNA zeigte sich eine Verminderung der Genexpression von PARP-1 um > 80 %. Die Aufhebung der anti-apoptotischen VEGF-Wirkung durch PARP-1 mRNA-Knockdown kann eine ursächliche Wirkungsbeziehung zwischen beiden Mechanismen nachweisen. Dazu wurden HUVEC nach Transfektion mit PARP-siRNA mit VEGF 1 ng/ml – 100 ng/ml (5×10^{-11}- 5×10^{-9} M) inkubiert, mit cRGDfV 5 µg/ml Apoptose induziert und im Anschluss erneut die Apoptoserate gemessen (Abb. 4.7.1, Tab. 4.7.1). In den unbehandelten Zellen ergab sich eine Hemmung der Apoptoserate durch VEGF um durchschnittlich 60 %, während in den transfizierten Zellen trotz VEGF-Stimulus eine stark erhöhte Apoptoserate nach Adhäsionshemmung durch cRGDfV im Vergleich zu den nicht-transfizierten Zellen nachweisbar war. Die Apoptosehemmung durch VEGF betrug weniger als 15 % (Tabelle 4.7.1). Als Folge der Transfektion können die Zellen nur noch unwirksame Mengen des DNA-Schutzproteins PARP exprimieren. Gibt man diesen Zellen nun VEGF zur Hemmung von Apoptose, fehlt der Vermittler der schützenden VEGF-Wirkung und die Zellen gehen dennoch in Apoptose bei Adhäsionshemmung mit cRGDfV. Indem man die PARP-Expression verhindert, kann man also den anti-apoptotischen Effekt von VEGF auf Endothelzellen nahezu aufheben. Das heißt, dass VEGF den Hauptanteil seiner anti-apoptotischen Wirkung über das DNA-Schutzprotein PARP ausübt. Es induziert die mRNA-Produktion und die Proteinexpression von PARP-1. PARP-1 wirkt der durch Adhäsionshemmung aktivierten

Caspasenkaskade entgegen und schützt vor dem apoptotischen Zelltod. In den Zellen, die wegen der Behandlung mit PARP siRNA unfähig waren, als Reaktion auf den VEGF-Stimulus intaktes PARP-Protein zu exprimieren, blieb VEGF ohne schützenden Effekt auf die Apoptoserate.

5.6 Einfluss von VEGF auf die PARP-Aktivität

Die enzymatische Aktivität von PARP ist für vielfältige Zellfunktionen wichtig. Neben seiner verstärkenden Wirkung auf die Exzisionsreparatur von DNA-Basen, ist PARP an der Instandhaltung der genetischen Integrität beteiligt und wirkt außerdem auf den Ebenen von Replikation, Transkription und Proteindegradation. Wird PARP aktiviert, spaltet es NAD+ in ADP-Ribose und Nicotinamid und polymerisiert die ADP-Ribose (Virag, Szabó 2002; Virag 2005; Pacher, Szabó 2007). Für die Analyse der Enzymaktivität von PARP unter VEGF-Stimulus wurden HUVEC mit VEGF 100 pg/ml - 100 ng/ml (5×10^{-12} - 5×10^{-9} M) inkubiert und im Anschluss die PARP-Aktivität gemessen (Abb. 4.5.1, Tab. 4.5.1). Dieser Versuch sollte die PARP-Regulation durch VEGF bestätigen: Da die Inkubation von Endothelzellen mit VEGF über PARP einen endothelprotektiven Effekt erzeugt, muss dieser Effekt auch mit einer gesteigerten Aktivität von PARP in der Zelle zusammenhängen. Erhöhte Level an PARP-Protein in der Zelle ohne gleichzeitig ehöhte enzymatische Aktivität haben keinen zytoprotektiven Effekt (Bürkle 2001; Virag 2005). VEGF kann die Zelle vor der apoptotischen Caspasenkaskade schützen, indem es die enzymatische Aktivität von PARP in der Zelle steigert. Je höher die PARP-Aktivität, desto effektiver kann PARP der Apoptose entgegenwirken. Als Folge der gesteigerten Enzymaktivität hat die Zelle also eine verminderte Sensitivität gegenüber Apoptose (Tesfaigzi 1998). Tatsächlich zeigte sich eine um durchschnittlich 60 % gesteigerte Enzymaktivität von PARP in Endothelzellen unter Einfluss von VEGF als weiterer Beweis für die These, dass der schützende Effekt von VEGF über PARP vermittelt wird.

5.7 Signalvermittlung der VEGF-Wirkung

Es existieren drei Rezeptoren für VEGF, von denen zwei als Rezeptoren für VEGF-A dienen, VEGFR-1 und VEGFR-2. In Endothelzellen wird die Wirkung von VEGF hauptsächlich über den VEGFR-2 sowie zusätzlich über den VEGFR-2- Korezeptor NP-1 vermittelt (Petrova et al. 1999). In der Immunfluoreszenzmikroskopie konnte sowohl bei VEGF-inkubierten als auch bei unbehandelten EC eine deutliche Expression von VEGFR-2 auf der Oberfläche der Zellen nachgewiesen werden (Abb. 4.8.1). Zusätzlich konnte auch der Korezeptor NP-1 gezeigt werden. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Signale der schützenden Wirkung von VEGF auf das Endothel über den VEGFR-2 vermittelt werden.

In Studien anderer Autoren war bereits die Wirkungsvermittlung von VEGF über VEGFR-2 nachgewiesen worden, wobei die Phosphorylierung von PI-3/Akt induziert wurde (Gerber et al. 1998a). Die Beteiligung von VEGFR-2 an der PARP-Regulation konnte durch Inkubation von EC mit VEGF 100 pg/ml - 100 ng/ml (5×10^{-12} - 5×10^{-9} M) und dem Inhibitor des VEGFR-2, SU 5416 (Bocci et al. 2004, Bischof et al. 2004) nachgewiesen werden (Abb. 4.8.1, Tab. 4.8.1). Die verwendete Konzentration von SU 5416, einem spezifischen VEGFR-2-Antagonisten an Endothelzellen, entsprach Literaturangaben (Bocci et al. 2004, Bischof et al. 2004). In der Western-Blot-Analyse zeigte sich, dass die Wirkung von VEGF auf die PARP-Proteinexpression durch VEGFR-2-Inhibition aufgehoben wurde. Daraus folgt, dass die Induktion der PARP-Proteinexpression durch VEGF über den VEGFR-2 vermittelt wird. Die mögliche Beteiligung und Bedeutung des Korezeptors NP-1 soll in zukünftigen Studien unserer Arbeitsgruppe untersucht werden. Bisherige Daten lassen vermuten, dass NP-1 für die vollständige Wirkung von VEGF unerlässlich ist. Bei Koexpression beider Rezeptoren auf der Membran von Endothelzellen ist die VEGF-Wirkung viermal stärker als bei alleiniger Vermittlung der Signale über VEGFR-2 (Petrova et al. 1999). Unsere Ergebnisse zeigen, dass die anti-apoptotische Wirkung von VEGF über den VEGFR-2 vermittelt wird. Auch NP-1 war nachweisbar, eine Verstärkung des anti-apoptotischen Signals über VEGFR-2 durch NP-1 ist denkbar. Zur Klärung der Frage, welche Moleküle in die Signalweiterleitung der Wirkung von VEGF involviert sind, wurden HUVEC

mit VEGF 10 ng /ml oder VEGF 100 ng/ml inkubiert und nach 15, 30, 60 und 120 Minuten im Western-Blot die Signaltransduktionsmoleküle JNK, p 38 MAPK, Erk-1/Erk-2 und Akt und ihre phosphorylierten Formen analysiert (Abb. 4.9.1, 4.9.2, Tab. 4.9.1). Alle untersuchten Signaltransduktionsmoleküle werden in Zusammenhang mit anti-, teilweise auch pro-apoptotischen Signalwegen gebracht (Davis 2000; Johnson, Lapdat 2002). In der vorliegenden Arbeit konnte eine vermehrte Aktivierung (also Phosphorylierung) von JNK und Akt nachgewiesen werden. Die Rolle von JNK im Zusammenhang mit Apoptose und Zellüberleben wird noch kontrovers diskutiert: Einerseits ist eine JNK-Betieligung im Rahmen pro-apoptotischer Signalwege nachgewiesen worden, andererseits gibt es auch Arbeiten, die seine Beteiligung an anti-apoptotischen Kaskaden beschreiben (Davis 2000). Diese Kinase trägt bei zur Regulation von Wachstum, Differenzierung, Proliferation, aber auch von Apoptose und wird aktiviert durch Zytokine (TNFα, IL-1) und Stress (durch UV- und γ-Strahlung, Toxine, Hyperosmolarität, Ischämie, und Hitze). Sicher ist, dass JNK-Aktivierung den intrinsischen Weg der Apoptose auslöst, indem die mitochondriale Freisetzung von Cytochrom C induziert wird. Der genaue Mechanismus ist unklar. Als ebenfalls gesichert gilt, dass viele JNK-aktivierenden Stimuli keine apoptotische Wirkung auf die Zelle ausüben (Davis 2000). Zum Einen, weil Überlebenssignale von NFκB, Akt und ERK den apoptotischen Weg blockieren, zum Anderen, weil die Zeitspanne der Aktivierung eine wichtige Rolle zu spielen scheint (Chen, Tan 2000). Demnach ist eine vorübergehende JNK-Aktivierung nicht mit Apoptose assoziiert, da die Zellen diese im Kontext mit anderen Aktivierungsstadien innerhalb der Zelle als Überlebenssignal interpretieren (Davis, 2000). Außerdem gibt es Hinweise, dass über Integrine vermittelte Überlebenssignale ebenfalls den Signalweg über JNK nutzen (Almeida et al. 2000). Die JNK-Wirkung ist also von verschiedenen Faktoren abhängig. Neben Zelltyp, Unterschieden in Entwicklung und Differenzierung der Zelle und der Stärke des aktivierenden Signals, spielen auch Passagenummer der Zellkultur und der Status im Zellzyklus eine determinierende Rolle für die Entscheidung zwischen Überleben und Apoptose (Wada, Penninger 2004). Die vorliegenden Ergebnisse legen eine Beteiligung

von JNK an anti-apoptotischen Signalwegen im Rahmen der inhibierten Endothelzellapoptose durch VEGF nahe.

Die von uns ebenfalls untersuchte Kinase Akt ist eindeutig als eine anti-apoptotisch wirkende Proteinkinase charakterisiert (Downward 1998; Gerber et al. 1998a). Akt ist eine PI3K nachgeschaltete Kinase und vornehmlich im Zytoplasma lokalisiert, ist aber nach Stimulation auch im Nucleus nachweisbar (Ahmed et al. 1993; Neri 1994; Meier 1997; Kim 1998; Lu 1998; Marchisio 1998). Die Aktivierung von Akt über PI3K trägt zu den protektiven Effekten von VEGF-induziertem Wachstum und Überleben in Endothelzellen bei (Gerber et al. 1998a; Irani 2000). Darüberhinaus konnte gezeigt werden, dass diese Wirkung von VEGF über den VEGFR-2 vermittelt wird, und dass sowohl die Blockade dieses Rezeptors, als auch die Hemmung der PI3K den über VEGF vermittelten Apoptoseschutz drastisch vermindern (Gerber et al. 1998a). Die anti-apoptotische Funktion von Akt wird zum Einen über Inaktivierung pro-apoptotischer Moleküle wie BAD, Caspase 9 und Raf ausgeübt, zum Anderen über die Aktivierung von anti-apoptotischen eNOS und Transkriptionsfaktoren (Choy et al. 2001; Datta et al. 1999; Dimmeler, Zeiher 2000).

Die Aktivierung von Akt ist im Kontext der vorliegenden Arbeit auch als anti-apoptotischer Wirkmechanismus von VEGF anzusehen, jedoch konnte anhand der PARP-mRNA Knockdown-Versuche die Induktion der PARP-Expression als wichtigster anti-apoptotischer Wirkmechanismus von VEGF identifiziert werden.

Im Rahmen der anti-apoptotischen Wirkung von VEGF auf Endothelzellen konnten wir keine Beteiligung der p38 MAPK nachweisen. p38 MAPK wurden untersucht, da diese sowohl den Zelltod fördern (Sarkar et al. 2002; Porras et al. 2004), aber auch Überleben, Wachstum und Differenzierung der Zelle unterstützen (Liu et al. 2001; Park et al. 2002; Juretic et al. 2001; Yosimichi et al. 2001). Von p38 MAPK sind mindestens vier Isoformen bekannt: p38 MAPK α, β, γ und δ (Kyriakis, Avruch 2001). P38 MAPKs kontrollieren die Funktion von diversen Transkriptionsfaktoren, Kinasen und Phosphatasen (Davis 2000; Bulavin et al. 2001, Chang, Karin 2001). p38 MAPK-Signalkaskaden, ähnlich denen der JNKs, können je nach Zelltyp und Aktivierungsstatus der Zelle sowohl Überlebens-, als auch apoptotische Signale vermitteln (Wada, Penninger 2004).

Die Kinasen ERK-1 und ERK-2 werden synonym auch als p44 (ERK-1) und p42 (ERK-2) bezeichnet. Sie werden aktiviert über Phorphorylierung eines Threonin- und eines Tyrosinrestes durch die MAPK-Kinasen MEK-1 und MEK-2, die wiederum Ras- und Raf-Signale an die ERKs weiterleiten (Crews et al. 1992; Alessi et al. 1994). Nach ihrer Aktivierung translozieren die ERKs in den Nukleus und phosphorylieren eine Vielfalt an Substraten, darunter Phospholipasen und verschiedene Transkriptionsfaktoren (Davis 1993; Janknecht et al. 1993; Marais et al. 1993; Kowentz-Leutz et al. 1994; Wadman et al. 1994, Gille et al. 1995; Treisman 1996). Andere Autoren haben eine Aktivierung von ERK-1 und ERK-2 durch Wachstumsfaktoren wie VEGF und NGF gezeigt und eine Bedeutung für Proliferation, Differenzierung, Zellmigration und Zytoskellet-Reorganisation nachgewiesen. Auch eine Beteiligung an Stressreaktionen und Zelltod wurde beschrieben (Davis 2000; Chang, Karin 2001; Johnson, Lapdat 2002; Werlen et al. 2003). Unsere Ergebnisse konnten die Aktivierung von ERK-1 und ERK-2 durch VEGF in Endothelzellen nicht bestätigen.

5.8 Regulationsebene der VEGF-induzierten PARP-Expression

Nach der Aufklärung der Signalweiterleitung von VEGF in Endothelzellen, die für die Apoptosehemmung durch Regulation der PARP-Expression verantwortlich ist, wurde untersucht, auf welcher Ebene der Proteinexpression diese Induktion reguliert wird. Dafür wurden HUVEC mit VEGF in den Konzentrationen von 1 ng/ml bis 100 ng/ml (5×10^{-11}- 5×10^{-9} M) und 2 mg/ml Actinomycin D oder aber 1 mg/ml Cycloheximid inhibiert. In der Literatur war nach VEGF-Stimulus eine Regulierung auf Ebene der Transkription bei der Induktion von Bcl-2 und A1 in Endothelzellen beschrieben worden (Gerber et al. 1998b). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich bei gleichzeitiger Inkubation mit Actinomycin D und VEGF eine deutliche Reduktion der mRNA-Produktion (Tab. 4.6.1) und der Proteinexpression von PARP (Tab. 4.6.2, Abb. 4.6.1) noch unter das Expressions-Niveau der Negativkontrolle. Die Inkubation mit Cycloheximid und VEGF wirkte sich lediglich geringfügig auf die Proteinexpression von PARP aus. Dieser Effekt ist höchstwahrscheinlich eher auf die unspezifische

zytotoxische Wirkung des Cycloheximids zurückzuführen, als auf eine spezifische Hemmung der PARP-Expression. Cycloheximid ist ein potenter Inhibitor der Proteinsynthese auf Ebene der Translation, indem es die 60S-Untereinheit des Ribosomens blockiert (Abou Elela, Nazar 1997). Actinomycin D hat hemmende Wirkungen auf die RNA- und auf die DNA-Synthese von Organismen. Es wirkt über Bindung an DNA, Hemmung der RNA-Polymerase und Hemmung der DNA-Polymerase (Bacchetti, Whitmore, 1969). Unsere Daten zeigen, dass die Induktion der Expression von PARP in Endothelzellen durch den Wachstumsfaktor VEGF auf Ebene der Transkription reguliert wird, da sie durch Actinomycin D um 80 % hemmbar ist.

5.9 Klinische Bedeutung der Studienergebnisse

VEGF wird im Zusammenhang mit einer ganzen Reihe von Krankheiten eine große Bedeutung zugesprochen. Krankheiten wie Arteriosklerose oder Vaskulitis gehören unter anderem dazu. Der Fortschritt dieser Erkrankungen wird möglicherweise durch VEGF gehemmt, wobei es zu Vaskulitiden widersprüchliche Ergebnisse gibt (Zachary 2001; Thornton 2006). Bei Arteriosklerose wirkt VEGF nach der Mehrzahl der Autoren Gefäß-protektiv (Howell et al. 2005; Zachary 2001).

Andererseits fördert VEGF bei verschiedenen malignen Tumorarten Wachstum und Metatstasierung der Tumoren (Eccles, Welch 2007). Bei Brustkrebs ist der Gennachweis von VEGF und seinem Rezeptor VEGFR-1 sowie der Matrix-Metalloproteinasen MMP1 und MMP9 (Van't Veer et al. 2002) mit einer schlechten Prognose assoziiert. Die klassischen Therapien der mit VEGF assoziierten Erkrankungen wirken zum Großteil auf Ebene der Organstrukturen, weniger auf molekularer Ebene. Beispielsweise seien hier Operation, Radiotherapie und Chemotherapie im Kampf gegen maligne Tumore genannt. Es werden aber zunehmend Bemühungen unternommen, neue therapeutische Ansätze auf Ebene der molekularen Signalwege VEGF-assoziierter Krankheiten zu entwickeln. Im Falle der durch VEGF unterstützten Tumorentitäten wurden antiangiogenetische Wirkstoffe wie der VEGF-Antikörper Bevacizumab (Panares, Garcia 2007), oder der die Gefäßentwicklung unterbrechende Wirkstoff Combretastatin A4 (Salmon, Siemann 2007) in klinischen Studien

getestet und befinden sich zum Teil bereits in der klinischen Anwendung. In der Arteriosklerosetherapie und –diagnostik überwiegen die Untersuchung und Behandlung der klassischen Risikofaktoren sowie invasive Therapien. VEGF ist im Hinblick auf Arteriosklerose im Rahmen der Gentherapie als ein Wirkstoff eingesetzt worden, der die Neovaskularisation verbessern sollte. Experimentelle und klinische Studien an kleinen Patientenzahlen konnten eine Verbesserung von Symptomen und Durchblutung durch lokale VEGF-Gentherapie bei peripherer arterieller Verschlusskrankheit zeigen (Mikroulis et al. 2007). Dennoch sind sowohl die Sicherheit als auch die Effizienz der VEGF-Applikation nicht langfristig sichergestellt. Mögliche Nebenwirkungen wie die Induktion von Tumorwachstum oder entstehende Plaqueinstabilitäten durch induzierte Angiogenese im Plaque (Mikroulis et al., 2007) müssen bedacht werden. Weiterhin ist die genaue Rolle von VEGF in der Arteriosklerose-Entstehung und –Progredienz sowie seine klinische Bedeutung noch immer nicht ganz klar. Die vorliegende Arbeit könnte dazu beitragen, die Bedeutung von VEGF als anti-apoptotischer Faktor für Endothelzellen und als vasoprotektiver Faktor bei Arteriosklerose zu untermauern.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass ein besseres Verständnis der Mechanismen der VEGF-Wirkung auf das Endothel zu neuen Einblicken in das komplexe Netzwerk führt, das die kardiovaskuläre Funktion reguliert. Diese wiederum können für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze genutzt werden. Die vorliegenden Daten geben Hinweise auf eine neuartige Wirkung des Wachstumsfaktors VEGF, die zu einer Induktion eines Apoptose-Schutzproteins führt. Es ist zu erwarten, dass daraus eine länger anhaltende Resistenz der Endothelzellen gegenüber Apoptosestimuli resultiert, was in weiteren Untersuchungen belegt werden soll. Der nachgewiesene Mechanismus könnte zu einer erhöhten Resistenz des Endothels gegenüber Apoptosestimuli führen, da eine Verstärkung der PARP-Funktion die Wirkung aktivierter Caspasen hemmt und damit die Apoptose-Exekution aufhalten kann. Denkbar wäre in diesem Zusammenhang die Nutzung von PARP als prognostischer Marker bei Patienten mit Arteriosklerose.

Die physiologische Relevanz der Induktion anti-apoptotischer Proteine wie PARP durch VEGF könnte in einem autoprotektiven Mechanismus des Endothels bestehen, welcher die Progression von Neointima-Läsionen hemmt. Da die endothelprotektive Wirkung von VEGF möglicherweise einen therapeutischen Ansatzpunkt bei Arteriosklerose darstellt, wäre eine stärkere Fokussierung auf die Endothelapoptose bei der Aufklärung der Arterioskleroseentstehung wünschenswert. Die therapeutische Modulation der Endothelapoptose durch VEGF könnte die Folgen einer Endothelschädigung reduzieren und dadurch die Progression arteriosklerotischer Plaques verhindern bzw. die postinterventionelle Neointima-Entwicklung hemmen. Für die Entwicklung erfolgreicher und nebenwirkungsarmer VEGF-Therapien ist ein genaues Verständnis der Wirkmechanismen von VEGF unverzichtbar.

6 Zusammenfassung

Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) ist der stärkste Überlebensfaktor für Endothelzellen. Der anti-apoptotische Effekt von VEGF auf das Endothel ist allgemein bekannt, jedoch sind die Mechanismen, die zu der Apoptosehemmung führen, weitgehend unbekannt. Daher wurde die Hypothese untersucht, dass VEGF über die Regulation eines Caspasen-Mediators, wie Poly(ADP-ribose)-Polymerase (PARP), wirkt. In der vorliegenden Arbeit wird ein neuartiger Wirkmechanismus von VEGF über die Hochregulation des intrazellulären anti-apoptotischen Proteins PARP aufgezeigt.

Endothelzellen, HUVEC sowie die Zelllinien EA.hy926 und hCMEC/D3, wurden mit VEGF in unterschiedlichen Konzentrationen (100 pg/ml - 1 µg/ml) inkubiert. VEGF induzierte in Endothelzellen dosisabhängig die Proteinexpression von PARP, wie mittels automatisierter Densitometrie von Western-Blots gezeigt wurde. Die mRNA -Produktion von PARP war ebenfalls erhöht, wie in der Real-time RT-PCR demonstriert. VEGF induzierte auch eine erhöhte PARP-Aktivität, wie mithilfe des colorimetrischen PARP-Aktivitätsassays gezeigt.

Wiederholte Zugabe von VEGF zu Endothelzellen alle 48 Stunden über eine Inkubationszeit von 6 Tagen führte zu einem stärkeren Anstieg der PARP-Protein- und mRNA-Produktion. Durch durchflusszytometrische Annexin V-FITC / Propidium-Jodid-Messung konnte gezeigt werden, dass VEGF in den untersuchten Konzentrationen die Sensitivität der Endothelzellen für Apoptose, induziert durch Adhäsions-Hemmung mithilfe des αv-Integrinantagonisten cRGDfV, um 60 % bei einmaliger Applikation und um 90 % bei dreimaliger Applikation von VEGF reduzieren konnte, im Vergleich zu Zellen, die nicht mit VEGF vorbehandelt worden waren. Die Induktion von PARP durch VEGF wurde auf der Ebene der Transkription reguliert, gezeigt durch Co-Inkubation mit Actinomycin D, ein potenter Inhibitor der Transkription. Inkubation mit Cycloheximid, einem Translationsinhibitor, hatte keinen Einfluss auf das PARP-Protein. Demzufolge erhöht VEGF die Genexpression von PARP.

bFGF oder TGFβ hatten keinen Einfluss auf die PARP-Produktion, der beobachtete Effekt war daher VEGF-spezifisch.
Der VEGF-Rezeptor-2 (VEGFR-2) wurde mittels Immunfluoreszenz auf Endothelzellen nachgewiesen. Ebenfalls konnte der VEGFR-2 Ko-Rezeptor Neuropilin-1 (NP-1) auf Endothelzellen nachgewiesen werden. In die Signaltransduktion von VEGF war VEGFR-2 involviert, wie Ko-Inkubationen mit dem VEGFR-2 Inhibitor SU5416 zeigen konnten. Downstream des Rezeptors wiesen wir die Beteiligung von SAPK/JNK und Akt nach.
Um den direkten Zusammenhang zwischen VEGF und der Hochregulation von PARP nachzuweisen, wurden Endothelzellen mit PARP-siRNA behandelt und mit VEGF 100 pg/ml – 1 ng/ml präinkubiert. Transfektion mit PARP-siRNA führt zu einer fast vollständigen Reduktion der Expression von PARP-Protein in Endothelzellen. Mit PARP-siRNA transfizierte Endothelzellen zeigten keine Reduktion der im Durchflusszytometer gemessene Apoptoserate durch Präinkubation mit VEGF im Vergleich zu nicht-transfizierten Zellen, der PARP mRNA-Knockdown konnte also die Apoptosehemmung durch VEGF aufheben.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass VEGF einen Hauptteil seines anti-apoptotischen Effekts auf Endothelzellen über die Regulation der PARP-Expression ausübt. Die Hochregulierung des intrazellulären Proteins PARP durch VEGF könnte einen auto-protektiven Mechanismus der Gefäße zur Neutralisation der pro-apoptotischen Caspasen-Aktivität darstellen, um die endotheliale Empfindlichkeit gegenüber apoptotischen Stimuli zu reduzieren. Dieser Mechanismus könnte Einfluss haben auf die Angiogenese und die Entstehung von Arteriosklerose. Das Verständnis der schützenden Wirkungen von VEGF auf Endothelzellen ist der Schlüssel für die Entwicklung neuer Therapien der Arteriosklerose und anderer mit VEGF assoziierter Erkrankungen.

7 Anhang

7.1 Literaturverzeichnis

1) Abou Elela S, Nazar RN. Role of the 5.8S rRNA in ribosome translocation. Nucleic Acids Res 1997; 25: 1788-1794
2) Aguilar-Quesada R, Munoz-Gámez JA, Martin-Oliva D, Peralta-Leal A, Quiles-Pérez R, Rodriguez-Vargas JM, de Almodóvar MR, Conde C, Ruiz-Extremera A, Oliver FJ. Modulation of transcription by PARP-1: consequences in carcinogenesis and inflammation. Curr Med Chem 2007; 14 (11): 1179-1187
3) Ahmed NN, Franke TF, Bellacosa A, Datta K, Gonzalez-Portal ME, Taguchi T, Testa JR, Tsichlis PN. The protein encoded by c-akt and v-akt differ in post-translational modification, subcellular localization and oncogenic potential. Oncogene 1993; 8: 1957-1963
4) Alessi DR, Saito Y, Campbell DG, Cohen P, Sithanandam G, Rapp U, Ashworth A, Marshall CJ, Cowley S. Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. EMBO J 1994; 13(7): 1610-11619
5) Al-Fakhri N, Chavakis T, Schmidt-Wöll T, Huang B, Cherian SM, Bobryshev YV, Lord RSA, Katz N, Preissner KT. Induction of apoptosis in vascular cells by Plasminogen Activator Inhibitor-1 and High Molecular Weight Kininogen correlates with their anti-adhesive properties. Biol Chem 2003; 384 (3): 423–435
6) Al-Fakhri N, Hörmann M, Hildenberg A, Renz H. VEGF inhibiert die Apoptose von Endothelzellen durch Regulation der PARP- und ICAD-Genexpression. In: Heinle H, Schulte H, Schäfer J: DGAF-Jahresband 2008, Stuttgart: W. Kohlhammer-Verlag, 99-104
7) Almeida EA, Ilic D, Han Q, Hauck CR, Jin F, Kawakatsu H, Schlaepfer DD, Damsky CH. Matrix survival signalling: from fibronectin via focal adhesion kinase to c-Jun NH_2-terminal kinase. J Cell Biol 2000; 149: 741-754
8) Ame JC, Spenlehauer C, de Murcia G. The PARP superfamily. Bioessays 2004; 26 (8): 882-893

9) Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signalling and modulation. Science 1998; 281: 1305-1308

10) Ayad S, Boot-Handford RP, Humphries MJ, Kadler KE, Shuttleworth CA. The extracelluar matrix facts book. 2nd Edition, London: Academic Press, 1998

11) Bacchetti S, Whitmore GF. Actinomycin D: effects on mouse L-cells. Biophys J 1969; 9 (12): 1427-1445

12) Bakondi E, Bai P, Szabó É, Hunyadi J, Gergely P, Szabó C, Virág L. Detection of poly(ADP-ribose) polymerase activation in oxidatively stressed cells and tissue using biotinylated NAD substrate. J Histochem Cytochem 2002; 50: 91-98

13) Bischof M, Abdollahi A, Gong P, Stoffregen C, Lipson KE, Debus JU, Weber KJ, Huber PE. Triple combination of irradiation, chemotherapy (pemetrexed), and VEGFR inhibition (SU5416) in human endothelial and tumor cells. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2004; 60 (4): 1220-1232

14) Björkerud S, Björkerud B. Apoptosis is abundant in human atherosclerotic lesions, especially in inflammatory cells (macrophages and T cells), and may contribute to the accumulation of gruel and plaque instability. Am J Pathol 1996; 149: 367-380

15) Bocci G, Danesi R, Marangoni G, Fioravanti A, Boggi U, Esposito I, Fasciani A, Boschi E, Campani D, Bevilacqua G, Mosca F, Del Tacca M. Antiangiogenic versus cytotoxic therapeutic approaches to human pancreas cancer: an experimental study with a vascular endothelial growth factor receptor-2 tyrosine kinase inhibitor and gemcitabine. Eur J Pharmacol 2004; 498 (1-3): 9-18

16) Brooks PC, Montgomery AMP, Rosenfeld M, Reisfeld RA, Hu TH, Klier G, Cheresh DA. Integrin avß3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. Cell 1994; 79: 1157-1164

17) Brunet A, Datta SR, Greenberg ME. Transcription-dependent and –independent control auf neuronal survival by the PI3K-Akt signalling pathway. Curr Opin Neurobiol 2001; 11: 297-305

18) Bürkle A. Physiology and pathophysiology of poly (ADP-ribosyl) ation. BioEssays 2001; 23: 795-806

19) Bulavin DV, Higashimoto Y, Popoff IJ, Gaarde WA, Basrur V, Potapova O, Appella E, Fornace AJ Jr. Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase. Nature 2001; 411: 102-107

20) Cai W, Devaux B, Schaper W, Schaper J. The role of Fas/APO 1 and apoptosis in the development of human atherosclerotic lesions. Atherosclerosis 1997; 131 (2): 177-186

21) Cai M, Zhang H, Hui R. Single chain Fv antibody against angiopoietin-2 inhibits VEGF-induced endothelial cell proliferation and migration in vitro. Biochem Biophys Res Commun 2003; 309 (4): 946-951

22) Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. Nature 2001; 410: 37-40

23) ChenYR, Tan TH. The c-Jun-terminal kinase pathway and apoptotic signalling. Int J Oncol 2000; 16: 651-662

24) Choy JC, Granville DJ, Hunt DWC, McManus BM. Endothelial cell apoptosis: biochemical characteristics and potential implications for atherosclerosis. J Mol Cardiol 2001; 33: 1673-1690

25) Coen, DM. The polymerase chain reaction. In: Ausubel MF, Brent R., Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. Short protocols of molecular biology. 4th. Edition, USA: John Wiley and Sons. Inc.; 1999: P15-1-15-2

26) Crews CM, Alessandrini A, Erikson RL. The primary structure of MEK, a protein kinase that phophorylates the ERK gene product. Science 1992; 258(5081): 478-480

27) Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Akts. Genes Dev 1999; 13: 1905-2927

28) Davis RJ. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. J Biol Chem 1993; 268 (20): 14553-14556

29) Davis RJ. Signal transduction by the JNK group of MAP Kinases. Cel 2000; 103: 239-252

30) Dent P, Yacoub A, Fisher PB, Hagan MP, Grant S. MAPK pathways in radiation responses. Oncogene 2003; 22(37): 5885-5896

31) Dimmeler S, Herrmann C, Zeiher AM. Apoptosis of endothelial cells. Contribution to the pathology of atherosclerosis? Eur Cytokine Netw 1998; 9: 697-698
32) Dimmeler S, Zeiher AM. Akt takes center stage in angiogenesis signalling. Circ Res 2000; 86: 4-5
33) Downward J. Mechanisms and consequences of activation of protein kinase PI3/Akt. Curr Opin Cell Biol 1998; 10: 262-267
34) Eccles SA, Welch DR. Metastasis: recent discoveries and novel treatment strategies. Lancet 2007; 369(9574): 1742-1757
35) Edgell CJ, McDonald CC, Graham JB. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. Proc Natl Acad Sci USA 1983; 80: 3734-3737
36) Fadok VA, Savill JS, Haslett C, Bratton DL, Doherty DE, Campell PA, Henson PM. Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phophatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. J Immunol 1992; 149: 4029-4035
37) Fadok VA, Warner ML, Bratton DL, Henson PM. CD36 is required for phagocytosis of apoptotic cells by human macrophages that use either a phophatidylserine receptor or the vitronectin receptor (αvß3). J Immunol 1998; 161: 6250-6257
38) Fujikawa K, De Aos Scherpenseel I, Jain SK, Presman E, Varticovski L. Role of PI 3-Kinase in angiopoietin-1-mediated migration and attachement-dependent survival of endothelial cells. Exp Cell Res 1999; 253: 663-672
39) Fujio Y, Walsh K. Akt mediates cytoprotection of endothelial cells by vascular endothelial growth factor in an anchorage-dependent manner. J Biol Chem 1999; 274: 16349-16354
40) Futami R, Miyashita M, Nomura T, Makino H, Matsutani T, Sasajima K, Tajiri T. Increased serum vascular endothelial growth factor following major surgical injury. J Nippon Med Sch 2007; 74 (3): 223-229
41) Geng YJ. Molecular signal transduction in vascular cell apoptosis. Cell Research 2001; 11(4): 253-264

42) Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt signal transduction pathway. J Biol Chem 1998a; 273 (46): 30336-30343

43) Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. J Biol Chem 1998b; 273 (21): 13313-13316

44) Gille H, Kortenjann M, Thomae O, Moomaw C, Slaughter C, Cobb MH, Shaw PE. ERK phosphorylation potentiates Elk-1-mediated ternary complex formation and transactivation. EMBO J 1995; 14(5): 951-962

45) Gotlieb AI, Silver MD. Atherosclerosis: pathology and pathogenesis. In: Silver MD, Gotlieb AI, Schoen FJ: Cardiovascular pathology. 3rd Edition, Philadelphia/PA: Churchill/Livingstone; 2001: 68-106

46) Green D, Kroemer G. The central executioners of apoptosis: caspases or mitochondria? Trends Cell Biol 1998; 8: 267-271

47) Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. Circ Res 1998; 82: 1111-1129

48) Hedin U, Roy J, Tran PK. Control of smooth muscle cell proliferation in vascular disease. Curr Opin Lipidol 2004; 15: 559-565

49) Holvoet P, Collen D. Thrombosis and atherosclerosis. Curr Opin Lipidol 1997; 8 (5): 320-328

50) Howell WM, Ali S, Rose-Zerilli MJ, Ye S. VEGF polymorphisms and severity of atherosclerosis. J Med Genet 2005; 42: 485-490

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

52) Isner JM, Kearney M, Bortman S, Passeri J. Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis. Circulation 1995; 91: 2703-2711

53) Isacke C, Horton M. The adhesion molecule facts book. 2nd Edition, London: Academic Press 2000: 187ff.

54) Janknecht R, Ernst WH, Pingoud V, Nordheim A. Activation of ternary complex factor Elk-1 by MAP kinases. EMBO J 1993; 12 (13): 5097-5104

55) Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK and p38 protein kinases. Science 2002; 298: 1911-1912

56) Juretic N, Santibanez JF, Hurtado C, Martinez J. ERK 1, 2 and p38 pathways are involved in proliferative stimuli mediated by urokinase in SaOS-2 cell line. J Cell Biochem 2001; 83 (1): 92-98

57) Kaiser D, Freyberg MA, Friedl P. Lack of hemodynamic forces triggers apoptosis in vascular endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun 1997; 231: 586-590

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

59) Kim SJ. Insulin rapidly induces nuclear translocation of PI3-kinase in HepG2 cells. Biochem Mol Biol Int 1998; 46: 187-196

60) Kim KY, Kim SO, Lim H, Yoo SE, Hong KW. KR-31372 inhibits KDR/Flk-1 tyrosine phosphorylation via K+ (ATP) channel opening in its antiangiogenic effect. Eur J Pharmacol 2003; 465 (3): 219-228

61) Kowentz-Leutz E, Twamley G, Ansieau S, Leutz A. Novel mechanism of C/EBP beta (NF-M) transcriptional control: actvation through derepression. Genes& Dev 1994; 8: 2781-2791

62) Kraft A, Weindel K, Ochs A, Marth C, Zmija J, Schumacher P, Unger C, Marmé D, Gastl G. Vascular endothelial growth factor in the sera and effusions of patients with malignant and nonmalignant disease. Cancer 1999; 85 (1): 178-187

63) Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase pathways activated by stress and inflammation. Physiol Rev 2001; 81 (2): 807-869

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

65) Lawen A. Apoptosis-an introduction. BioEssays 2003; 25: 888-896

66) Levkau B, Herren B, Koyama H, Ross R, Raines EW. Caspase-mediated cleavage of focal adhesion kinase pp125FAK and disassembly of focal adhesions in human endothelial cell apoptosis. J Exp Red 1998; 187: 579-586

67) Libby P, übersetzt von Gröchening E. Pathogenese der Atherosklerose. In: Harrissons Innere Medizin, 15. Auflage,Berlin: ABW Wissenschaftsverlag; 2003: 1516-1524

68) Liu B, Fang M, Lu Y, Mills GB, Fan Z. Involvement of JNK-mediated pathway in EGF-mediated protection against paclitaxel-induced apoptosis in SiHa human cervical cancer cells. Br J Cancer 2001; 85: 303-311

69) Lu PJ, Hsu AL, Wang DS, Yan HY, Yin HL, Chen CS. Phosphoionisitide 3-kinase in rat liver nuclei. Biochemistry 1998; 37: 5738-5745

70) Lum H, Malik AB. Regulation of vascular endothelial barrier function. Am J Physiol 1994; 267: 223-241

71) Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG, Freyssinet JM, Tedgui A. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndrome. Circulation 2000; 101: 841-843

72) Mallat Z, Ohan J, Lesèche G, Tedgui A. Colocalization of CCP-32 with apoptotic cells in human atherosclerotic plaques. Circulation 1997; 96: 424-428

73) Marchisio M, Bertagnolo V, Colamussi ML, Capitani S, Neri LM. Phophatidylinositol 3-kinase in HL-60 nuclei is bound to the nuclear matrix and increases during granulocytic differentiation. Biochem Biophys Res Commun 1998; 253: 346-351

74) Marais R, Wynne J, Treisman R. The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. Cell 1993; 73: 381-393

75) Matsumoto T, Mugishima H. Signal transduction via Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) receptors and their roles in atherogenesis. J Atheroscler Thromb 2006; 13: 130-135

76) McGrath JC, Deighan C, Briones AM, Shafaroudi MM, McBride M, Adler J, Arribas SM, Vila E, Daly CJ. New aspects of vascular remodelling: the involvement of all vascular cell types. Exp Physiol 2005; 90 (4): 469-475

77) Meier R, Alessi DR, Cron P, Andjelkovic M, Hemmings BA. Mitogenic activation, phosphorylation, and nuclear translocation of protein kinase Bbeta. J Biol Chem 1997; 272: 30491-30497

78) Mikroulis D, Papanas N, Maltezos E, Bougioukas G. Angiogenic growth factors in the treatment of peripheral arterial disease. Curr Vasc Pharmacol 2007; 5 (3): 195-209

79) Moreira IS, Fernandes PA, Ramos MJ. Vascular endothelial growth factor (VEGF) inhibition - a critical review. Anticancer Agents Med Chem 2007; 7: 223-245

80) Moiseeva EP. Adhesion receptors of vascular smooth muscle cells and their functions. Cardiovasc Res 2001; 52 (3): 372-386

81) Nagata S. Apoptotic DNA fragmentation. Exp Cell Res 2000; 256: 12-18

82) Navab M, Ananthramaia GM, Reddy ST, Van Lenten BJ, Ansell BJ, Fonarow GC, Vahabzadeh K, Hama S, Hough G, Kamranpour N, Berliner JA, Lusis AJ, Fogelman AM. The oxidation hypothesis of atherogenesis: the role of oxidized phospholipids and HDL. J Lipid Res 2004; 45: 993-1007

83) Neri LM, Milani D, Bertolaso L, Stroscio M, Bertagnolo V, Capitani S. Nuclear translocation of phosphatidylinositol 3-kinase in rat pheochromocytoma PC 12 cells after treatment with nerve growth factor. Cell Mol Biol 1994; 40: 619-626

84) Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor and its receptors. FASEB J 1999; 13: 9-22

85) Pacher P, Szabó C. Role of Poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) in cardiovascular diseases: the therapeutic potential of PARP Inhibitors. Cardiovasc Drug Rev. 2007; 25(3): 235-260

86) Panares RL, Garcia AA. Bevacizumab in the management of solid tumors. Expert Rev Anticancer Ther 2007; 7: 433-444

87) Park JM, Greten FR, Li ZW, Karin M. Macrophage apoptosis by anthrax lethal factor through p38 MAP Kinase Inhibition. Science 2002; 297 (5589): 2048-2051

88) Petrova TV, Makinen T, Alitalo K. Signalling via vascular endothelial growth factor receptors. Exp Cell Res 1999; 253: 117-130

89) Porras A, Zuluaga S, Black E, Valladares A, Alvarez AM, Ambrosino C, Benito M, Nebreda AR. P38 mitogen-activated protein kinase sensitizes cells to apoptosis induced by different stimuli. Mol Biol Cell 2004; 15 (2): 922-933

90) Preissner KT, May AE, Wohn KD, Germer M, Kanse SM. Molecular crosstalk between adhesion receptors and proteolytic cascades in vascular remodelling. Throm Haemost 1997; 78 (1): 88-95

91) Preissner KT, Kanse SM, May AE. Urokinase receptor: a molecular organizer in cellular communication. Curr Opin Cell Biol 2000; 12 (5): 621-628

92) Proczka RM, Małecki M, Chorostowska-Wynimko J, Polański JA. Vascular-endothelial growth factor (VEGF) in patients with peripheral ischemia. J Physiol Pharmacol 2006; 57 (Suppl 4): 305-311

93) Raines EW, Ross R. Multiple growth factors are associated with lesions of atherosclerosis: specificity or redundancy? Bioessays 1996; 18 (4): 271-282

94) Raines EW. PDGF and cardiovascular disease. Cytokine Growth Factor Review 2004; 15(4): 237-254

95) Ross R. Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis. New Engl J Med 1976; 295: 369-377, 420-427

96) Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis-an update. New Engl J Med 1986; 314: 488-500

97) Rossi D, Gaidano G. Messengers of cell death: apoptotic signalling in health and disease. Haematologica 2003; 88: 212-218

98) Sacco R, Tsutsumi T, Suzuki R, Otsuka M, Aizaki H, Sakamoto S, Matsuda M, Seki N, Matsuura Y, Miyamura T, Suzuki T. Antiapoptotic regulation by hepatitis C virus core protein through up-regulation of inhibitor of caspase-activated DNase. Virology 2003; 317 (1): 24-35

99) Salmon BA, Siemann DW. Characterizing the tumor response to treatment with combretastatin A4 phosphate. Int J Radiat Oncol Biol Phys 2007; 68: 211-217

100) Sanders M. Molecular and cellular concepts in atherosclerosis. Pharmac Ther 1994; 61: 109-153

101) Sarkar D, Su ZZ, Lebedeva IV, Sauane M, Gopalkrishnan RV, Valerie K, Dent P, Fisher PB. Mda-7 (IL-24) mediates selective apoptosis in human melanoma cells by inducing the coordinated overexpression of the GADD family of genes by means of p38 MAPK. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99: 10054-10059

102) Scatena M, Almeida M, Chaisson ML, Fausto N, Nicosia RF, Giachelli CM. NFκB mediates αvß3 integrin-induced endothelial cell survival. J Cell Biol 1998; 141: 1083-1093

103) Schwartz RS. Neointima and arterial injury: dogs, rats, pigs, and more (comment). Lab Invest 1994, 71(6): 813-819

104) Stary HC. Composition and classification of human atherosclerotic lesions. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol 1992; 421 (4): 277-290

105) Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. Circulation 1994; 89 (5): 2462-2478

106) Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr., Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1995; 15 (9): 1512-1531

107) Szabó C, Pacher P, Swanson RA. Novel modulators of poly(ADP-ribose) polymerase. Trends Pharmacol Sci 2006; 27: 626-630

108) Tesfaigzi J, Wood MB, Johnson NF, Nikula KJ. Apoptosis is a pathway responsible for the resolution of endotoxin-induced alveolar type II cell hyperplasia in the rat. Int J ExpPathol 1998;79(5): 303-311

109) The World Health Organization 2003. Public health report 2003: shaping the future. Geneva, 2003.

110) Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. Science 1998; 281: 1312-1316

111) Thornton S. Contribution of angiogenic genes to the complex genetic trait underlying Kawasaki disease. Arthritis Rheum 2006; 54 (5): 1361-1365

112) Towbin H, Staehekin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from Polyacrylamide gels to Nitrocellulose sheets - procedure and some applications proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1979; 76: 4350-4354

113) Treisman R. Regulation of transcription by MAP kinase cascades. Curr Opin Cell Biol 1996; 8: 205-215

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

115) Van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. Nature 2002; 415 (6871): 530-536

116) Viles-Gonzalez JF, Anand SX, Valdiviezo C, Zafar MU, Hutter R, Sanz J, Rius T, Poon M, Fuster V, Badimon JJ. Update in atherothrombotic disease. Mt Sinai Med 2004; 71 (3): 197-208

117) Virag, L; Szabo, C. The therapeutic potential of poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors. Pharmacol Rev 2002; 54:375–429

118) Virag L. Structure and function of poly (ADP-ribose) polymerase-1: role in oxidative stress-related pathologies. Curr Vasc Pharmacol 2005, 3: 209-214

119) Wada T, Penninger JM. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. Oncogene 2004; 23: 2838-2849

120) Wadman IA, Hsu HL, Cobb MH, Baer R. The MAP kinase phosphorylation site of TAL1 occurs within a transcriptional activation domain. Oncogene 1994; 9 (12): 3713-3716

121) Wang L, Huiyan Z, Wang P, Soker S, Mukhopadhyay D. Neuropilin-1-mediated vascular permeability factor/ vascular endothelial growth factor-dependent cell migration. J Biol Chem 2003; 287(49): 48848-48860

122) Wang L, Dutta SK, Kojma T, Xu X, Koshravi-Fas R, Ekker SC, Mukhopadhyay D. Neuropilin-1 modulates p53/caspases axis to promote endothelial cell survival. PLoS ONE 2007; 2(11): e1161

123) Weksler BB, Subileau EA, Perrière N, Charneau P, Holloway K, Leveque M, Tricoire-Leignel H, Nicotra A, Bourdoulous S, Turowski P, Male DK, Roux F, Greenwood J, Romero IA, Couraud PO. Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. FASEB J 2005; 19(13): 1872-1874

124) Werlen G, Hausmann B, Naeher D, Palmer E. Signalling life and death in the thymus: timing is everything. Science 2003; 299: 1859-1863

125) Wertz IE, Hanley MR. Diverse molecular provocation of programmed cell death. TIBS 1996; 21: 359-364

126) Wolf BB, Schuler M, Echeverri F, Green DR. Caspase-3 is the primary activator of apoptotic DNA fragmentation via DNA fragmentation factor-45/inhibitor of caspase-activated DNase inactivation. J Biol Chem 1999; 274: 30651-30656

127) Xu Q. Mouse models of arteriosclerosis: from arterial injuries to vascular grafts. Am J Pathol 2004; 165 (1): 1-10

128) Yanni AE. The laboratory rabbit: an animal model of atherosclerosis research. Lab Anim 2004; 38 (3): 246-256

129) Yosimichi G, Nakanishi T, Nishida T, Hattori T, Takano-Yamamoto T, Takigawa M. CTGF/Hcs24 induces chondrocyte differentiation through a p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK), and proliferation through a p44/42 MAPK/extracellular-signal regulated kinase (ERK). Eur J Biochem 2001; 268 (23): 6058-6065

130) Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system. Nature 2000; 407: 802-809

131) Zachary I. Signalling mechanisms mediating vascular protective actions of vascular endothelial growth factor. Am J Physiol Cell Physiol 2001; 280: C1375-C1386

7.2 Lebenslauf

Persönliche Informationen

- Nationalität: Deutsch
- Geburtstag: 05.06.1982
- Geburtsort: Bremen
- Familienstand: ledig

Schullaufbahn

- 1988-1992: Grundschule Fischerhude
- 1992-1994: Orientierungsstufe Ottersberg
- 1994-2002: Gymnasium am Wall, Verden
  Abschluss: Abitur
- 1999-2000: 12. Schuljahr an der Clay-High-School,
  South Bend / Indiana, USA

Ausbildung

Studium der Humanmedizin, Philipps-Universität Marburg:

- 09/ 2004: Physikum (alte AO), Gesamtnote: „Gut“
- 12/ 2008: Zweite Ärztliche Prüfung (neue AO) , Gesamtnote: „Gut“

Famulaturen

- 03/ 2005: Klinik für Allgemein- und Unfallchirurgie
  Klinikum Links der Weser, Bremen
- 03/2006: Praxisfamulatur
  Gemeinschaftspraxis für Kardiologie Leußler& Savova, Marburg
- 09/2006: Zentrum für Innere Medizin
  Klinikum Konstanz
- 03/2007: Department f. Internal Medicine &
  Surgery Kilimanjaroo Christian Medical Centre, Moshi, Tanzania

Praktisches Jahr

- 08/2007-12/2007: Wahlfach Dermatologie,
  Zentrum für Haut- und Geschlechtskrankheiten der Universitätsklinik Marburg
- 12/2007-03/2008: Innere Medizin
  Zentrum für Innere Medizin der Universitätsklinik Marburg
- 03/2008-07/2008: Chirurgie
  Zentrum für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie und Zentrum für Viszeral- und Thoraxchirurgie der Universitätsklinik Marburg

7.3 Verzeichnis meiner akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Marburg:

Albert, Al-Fakhri, Arnold, Aumüller, Bals, Barth, Bartsch, Basler, Bauer, Baum, Baumann, Behr, Beyer, Bien, Bolm, Cetin, Czubayko, Daut, Del Rey, Dietrich, Dinges, Donner-Banzhoff, Dünne, Duda, Feiber, Feuser, Funck, Gerdes, Geyer, Görg C., Görg K., Grau, Gress, Grimm, Gudermann, Happle, Hassan, Henzel, Hermann-Lingen, Hertl, Jungclas, Kann, Kalder, Keller, Kill, Klose, Koch, König, Koolmann, Krause, Krieg, Kroll, Kühnert, Leonhardt, Lill, Löffler, Lohoff, Lübbe, Maisch, Max, Moosdorf, Moll, Mueller, Neubauer, Oertel, Pagenstecher, Remschmidt, Renz, Richter, Röhm, Roelke, Röper, Rothmund, Ruchholz, Rudolph, Schade, Schäfer, Schnabel, Schrader, Schulze, Seitz, Seyberth, Seyfarth, Steiniger, Strempel, Sundermeyer, Vogelmeier, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wulf.

7.4 Danksagung

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Nadia Al-Fakhri für die intensive wissenschaftliche Betreuung und motivierende Unterstützung bei der Durchführung meiner Arbeit und für ihre stets konstruktive Kritik.
Herrn Prof. Dr. Harald Renz, Direktor der Klink für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin des Universitätsklinikums Marburg, danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit in den Einrichtungen seines Institutes zu verwirklichen.
Vielen Dank an Herrn Andreas Hildenberg für seine unermüdliche Geduld und die Assistenz bei den experimentellen Arbeiten sowie für die beständige moralische Unterstützung.
Dank gilt auch Herrn PD Dr. Holger Garn und seinen Mitarbeitern für die Unterstützung bei den flowzytometrischen Messungen. Frau Dr. Tanja Dicke und Frau Ayse Killic danke ich im Besonderen für ihre uneingeschränkte Hilfsbereitschaft und konstruktiven Ratschläge. Vielen Dank auch an Frau Katharina Nemeth für ihre Unterstützung bei Inkubationsversuchen.
Den medizinisch-technischen Assistentinnen Frau Anja Spiess-Naumann und Frau Stefanie Achenbach sei für die hervorragende Einarbeitung in die Laborarbeit und die vielen hilfreichen Tipps im Verlauf gedankt.

Meinen Eltern und Geschwistern danke ich für ihre Geduld und ihr Verständnis. Besonderer Dank gilt meiner Schwester Friederike für ihre moralische und fachliche Unterstützung. Außerdem danke ich all meinen Freunden und meiner Mitbewohnerin Sonja Buchschatz für ihre Motivationshilfen.

7.5 Ehrenwörtliche Erklärung

„Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor VEGF hemmt die Endothelzellapoptose über die Regulation von PARP“ in der Abteilung für Klinische Chemie und Molekulare Diagnostik unter Leitung von PD Dr. Nadia Al-Fakhri mit Unterstützung durch Andreas Hildenberg ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wurde (oder wird) in folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

1) Hörmann M, Mey L, Kharip Z, Hildenberg A, Nemeth K, Heidt M, Renz H, Al-Fakhri N: Vascular endothelial growth factor promotes endothelial survival by induction of poly(ADP-ribose)-polymerase expression in the human vasculature. Eingereicht zur Publikation 01/2010 bei Circulation, Journal of the American Heart Association

2) Perfusion 2006; 19 (2): 88 (publiziertes Abstract, Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Arteriosklerosеforschung, Blaubeuren, März 2006)

3) Heinle H, Schulte H, von Eckardstein A: Neue Konzepte, Risikofaktoren und Targets bei Arteriosklerose. W. Kohlhammer-Verlag, Stuttgart, 2006: 253-256

4) Hj. Staudinger-Symposium der DGKL, Kloster Banz, Juni 2006 (Abstract)

5) Heinle H, Schulte H, Schäfer J: Neue Aspekte aus der Hämostasiologie, Lipidologie und Gefäßwandbiologie. W. Kohlhammer-Verlag, Stuttgart, 2008: 99-104; 200-203

Ort, Datum, Unterschrift