

**Identifizierung der Regulationsmechanismen
für die S-Nitrosylierung/Denitrosylierung**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der
Naturwissenschaften

Vorgelegt beim Fachbereich Biologie
der Johann Wolfgang Goethe - Universität
in Frankfurt am Main

Von
Jörg Hoffmann
aus Frankfurt

Frankfurt 2002
(D F 1)

Vom Fachbereich.....der
Johann Wolfgang Goethe - Universität als Dissertation angenommen

Dekan:.....

Gutachter:.....

Datum der Disputation:.....

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 1999 bis September 2002 in der Abteilung Molekulare Kardiologie der Medizinischen Klinik IV an der Universitätsklinik der Johann Wolfgang Goethe - Universität durchgeführt und von Prof. Dr. S. Dimmeler betreut. Herrn Prof. Dr. A.M. Zeiher danke ich für die produktiven Ideen und Diskussionen und die hervorragenden Arbeitsbedingungen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Stefanie Dimmeler für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit. Ohne ihr Engagement und ihre ständige Diskussionsbereitschaft wäre ein Gelingen dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Frau Prof. Dr. A. Starzinski-Powitz danke ich für die Übernahme der Betreuung dieser Arbeit. Die kritische Diskussion meiner Konzeption und Ergebnisse durch Sie und ihre Arbeitsgruppe haben mir sehr geholfen.

Bei Prof. R. Busse und bei Dr. R. Popp bedanke ich mich für die Überlassung der Kegelplattenviskosimeter.

Frau Dr. J. Haendeler gilt mein ganz besonderer Dank für sehr gute Ideen, konstruktive Kritik, persönliche und methodische Unterstützung und ihre ständige Hilfsbereitschaft.

Für die angenehme Arbeitsatmosphäre und den Spaß bei der Arbeit danke ich der gesamten Arbeitsgruppe der molekularen Kardiologie, insbesondere Dr. Carmen Urbich, Dr. Mariuca Vasa, Dr. Alexandra Aicher, Dr. Lothar Rössig, Dr. Cornel Badorff und Dr. Christopher Heeschen für viele Ratschläge und Diskussionen, Meike Stahmer, Barbara Lafferton, Christiane Mildner-Rihm, Rebeca Salguero-Palacios, Heike Arranda, Susanne Ficus, Melanie Näher, Andrea Knau und Thomas Brühl für die nette Zusammenarbeit.

Mein besonderer Dank gilt Christine Goy für die persönliche Unterstützung und die erfolgreiche Zusammenarbeit.

Dem Boehringer Ingelheim Fonds danke ich für die Unterstützung im Rahmen eines Stipendiums.

Meinen Eltern danke ich für die wundervolle Unterstützung während meines ganzen Studiums und im Laufe dieser Arbeit.

1. Einleitung	4
1.1. Synthese und Funktionen von Stickstoffmonoxid (NO)	4
1.2. Apoptose	6
1.3. S-Nitrosylierung.....	8
1.3.1. Reaktionswege von Stickstoffmonoxid.....	8
1.3.2. Strukturelle Voraussetzungen für eine S-Nitrosylierung	10
1.3.3. Bekannte Zielproteine für die S-Nitrosylierung.....	12
1.4. Antioxidative Systeme	13
1.4.1. Glutathion.....	14
1.4.2. Thioredoxin	15
Ziele der Doktorarbeit	18
2. Material und Methoden.....	19
2.1. Molekularbiologische Arbeiten	19
2.1.1. cDNA Klonierung	19
2.1.2. Plasmidpräparation.....	19
2.1.3. RT-PCR.....	19
2.2. Zellkultur.....	20
2.2.1. Humane Nabelschnur Endothelzellen (HUVEC).....	20
2.2.2. Humane embryonale Nierenzellen (HEK 293)	20
2.2.3. Transfektion von Oligonukleotiden	20
2.2.4. Applikation von laminarer Schubspannung.....	21
2.3. Apoptosenachweis	21
2.3.1. DAPI - Färbung.....	21
2.3.2. LacZ – Färbung	21
2.3.3. Apoptosebestimmung mittels FACS.....	21
2.4. Methoden zur Proteinanalyse.....	22
2.4.1. Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford, 1976).....	22
2.4.2. Proteinisolation aus Zellen	22
2.4.3. Immunpräzipitation	22
2.4.4. Fällung von Proteinen mit Aceton	22

2.4.5. Auftrennung von Proteinen mittels SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970).....	23
2.4.6. Transfer von Proteinen (Western Blot)	23
2.4.7. Immunologischer Nachweis membrangebundener Proteine	23
2.4.8. Immunfluoreszenzfärbung	24
2.5. Methoden zum Nachweis der S-Nitrosylierung	24
2.5.1. Detektion der S-Nitrosylierung mittels Immunfluoreszenz	24
2.5.2. Nachweis der S-Nitrosylierung in Zellextrakten mittels Saville – Griess Assay...	25
2.5.3. Nachweis der S-Nitrosylierung immunpräzipitierter Proteine (DAN – Assay).....	25
2.5.4. Nachweis der S-Nitrosylierung mittels Western Blot (<i>Biotin switch method</i>).....	26
2.6. In vitro Assays	26
2.6.1. In vitro S-Nitrosylierung von Proteinen.....	26
2.6.3. Bestimmung freier SH-Gruppen mit DTNB	26
2.6.4. Nachweis von TRX-Aktivität mittels NADPH-Oxidation im Zellextrakt.....	27
2.6.5. Nachweis der TRX-Aktivität mit aufgereinigtem Protein	27
2.6.6. Bestimmung des intrazellulären GSH Spiegels	27
2.6.7. Gelfiltration mit Sephadex G25	28
2.6.8. Bestimmung der Caspase-3 ähnlichen Aktivität in Zellextrakten.....	28
2.7. Detektion von reaktiven Sauerstoffspezies.....	28
2.8. Detektion der S-Nitrosylierung eines synthetischen Peptides mittels FPLC	29
3. Ergebnisse	30
3.1. Nachweis der S-Nitrosylierung.....	30
3.1.1. Nachweis der S-Nitrosylierung mittels Immunfluoreszenzfärbung.....	30
3.1.2. Nachweis der S-Nitrosylierung mittels Saville-Griess Assay.....	31
3.1.3. Nachweis der S-Nitrosylierung mit Hilfe des DAN - Assay	32
3.1.4. Detektion der S-Nitrosylierung mit Hilfe des Western-Blots (<i>Biotin switch method</i>).....	33
3.1.5. Identifizierung der S-nitrosylierten Moleküle in Endothelzellen.....	36
3.2. Einfluss von laminarer Schubspannung auf die S-Nitrosylierung	38
3.3. Einfluss von Zellalterung auf die S-Nitrosylierung in Endothelzellen	40
3.4. Charakterisierung einer Denitrosylierung.....	44

3.5. Identifizierung einer potentiellen Nitrosylase	47
3.5.1. Rolle der Alkoholdehydrogenase Typ I in Endothelzellen	47
3.5.2. Aufbau eines synthetischen Peptides als Substrat.....	48
3.5.3. In vitro S-Nitrosylierung des Peptides	49
3.6. Thioredoxin ein neues Zielprotein für die S-Nitrosylierung	51
3.7.1. Der Gehalt an S-Nitrosylierung ist abhängig von der TRX Expression	52
3.7.2. TRX wird an Cystein 69 S-nitrosyliert	55
3.7.3. S-Nitrosylierung an Cystein 69 ist wichtig für die Reduktaseaktivität von TRX in Endothelzellen.....	58
3.7.4. S-Nitrosylierung von Cytein 69 und die Reduktase Domäne sind wichtig für die anti-apoptische Funktion von TRX.....	62
4. Diskussion.....	65
4.1. Identifizierung der S-nitrosylierten Moleküle in Endothelzellen	65
4.2. Regulation der S-Nitrosylierung durch laminare Schubspannung	66
4.3. Zellalterung reduziert die S-Nitrosylierung in Endothelzellen	67
4.4. TNF α - und oxLDL-induzierte Denitrosylierung in Endothelzellen	68
4.5. Regulation der S-Nitrosylierung / Denitrosylierung in Endothelzellen ...	70
4.6. Strategie zur Identifizierung einer potentiellen Nitrosylase.....	71
4.7. TRX ein neues durch S-Nitrosylierung reguliertes Protein.....	72
4.8. Ausblick	76
5. Zusammenfassung.....	78
Literaturverzeichnis.....	80
Teilpublikationen.....	90
Lebenslauf	91

1. Einleitung

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein kurzlebiges Gas, welches in biologischen Systemen die unterschiedlichsten Funktionen übernehmen kann. Als physiologischer Mediator wurde NO im Jahr 1987 als „Endothelium derived relaxing factor“ (EDRF) entdeckt (Furchgott and Vanhoutte, 1989; Ignarro et al., 1987). Allerdings besitzt es weit mehr Funktionen im kardiovaskulären System. Neben der Regulation des Gefäßtonus verhindert Stickstoffmonoxid die Aggregation von Plättchen, inhibiert die Endothelzellapoptose und besitzt Funktionen als Signaltransduktionsmolekül. Außerdem spielt NO eine Rolle in der Neurotransmission und ist ein zentraler Faktor für die zelluläre Immunantwort.

1.1. Synthese und Funktionen von Stickstoffmonoxid (NO)

NO wird in Zellen aus L-Arginin synthetisiert. Dabei reagiert Sauerstoff mit L-Arginin zu L-Citrullin und NO wird freigesetzt. Diese Reaktion wird von einem Enzym, der NO-Synthase katalysiert (Nathan, 1992). Bis heute wurden drei verschiedene Isoformen der NO-Synthasen in Säugetieren identifiziert (Nathan, 1992). Die induzierbare NO-Synthase (Typ II NOS), auch iNOS genannt, und die beiden konstitutiv exprimierten NO-Synthasen nNOS, neuronale NO-Synthase (Typ I NOS) und eNOS, endotheliale NO-Synthase (Typ III NOS) die hauptsächlich posttranslational reguliert werden (Moncada et al., 1997; Nathan and Xie, 1994). Die Ca^{2+} unabhängige iNOS (Nathan and Xie, 1994) kann NO in nanomolaren Mengen synthetisieren. Diese induzierbare NOS wird z.B. durch bakterielle Toxine, Interleukin-1 oder γ -Interferon stimuliert. Wird NO in diesen hohen Konzentrationen freigesetzt fungiert es als cytotoxisches Molekül, indem es in Zielzellen an Cu-Fe Proteine bindet, wodurch Fe^{2+} und Cu^{2+} - Ionen freigesetzt werden. Dabei werden zusätzlich O_2 und toxische OH^\cdot - Radikale generiert, die mit NO zu toxischen Molekülen reagieren können, die letztendlich zur Induktion des Zelltodes führen (Moncada and Higgs, 1993). Diese hohen, pathophysiologischen Konzentrationen von NO können cytotoxische und pro-apoptische Effekte ausüben (Fehsel et al., 1995; Kröncke et al., 1994; Nicotera et al., 1997). Neben dem oben beschriebenen Mechanismus kann ein Überschuss an NO auch zum Energieverlust in Zielzellen führen, indem der respiratorische Zyklus und die Glykolyse inhibiert werden. Desweiteren kann NO direkt zu DNA-Strangbrüchen und einer Akkumulation von p53 führen (Messmer et al., 1994), und dadurch die Apoptose initiieren. Der größte Teil der bisher vorgestellten Effekte wurde in Macrophagen beschrieben.

Eine weitere bekannte Isoform der NO-Synthase ist die in Endothelzellen exprimierte endotheliale NO-Synthase (eNOS). Für die eNOS ist bekannt, dass sie konstitutiv exprimiert ist und Ca^{2+} -abhängig NO im pmol Bereich synthetisiert (Änggard, 1994). Neben dem Ca^{2+} -abhängigen Mechanismus für die Regulation der eNOS wurde auch ein Ca^{2+} -unabhängiger Mechanismus entdeckt, bei dem die eNOS von der Proteinkinase AKT durch Phosphorylierung aktiviert wird (Dimmeler et al., 1999a). Einer der wesentlichsten Stimulatoren der eNOS ist die physiologische, laminare Schubspannung des Blutes (Busse and Fleming, 1998). Die Applikation der laminaren Schubspannung in einem Zellsystem führt zur Steigerung der eNOS Proteinexpression und der Freisetzung von NO. Diese durch die eNOS gebildeten physiologischen Konzentrationen haben im Vergleich zu den oben genannten cytotoxischen Konzentrationen im nmol Bereich völlig gegensätzliche Effekte und sind essentiell für die funktionelle Integrität des Endothels (Busse and Fleming, 1996; Zeiher, 1996). Das vom Endothel gebildete NO reagiert mit der Hämgruppe der löslichen Guanylatcyclase, wodurch es zu einer gesteigerten cGMP Produktion und zu einer Vasorelaxation kommt (Moncada and Higgs, 1993). Desweiteren inhibiert es die Adhäsion von Neutrophilen und die Expression von Proteinen, die für Macrophagen chemotaktische Eigenschaften besitzen (Niu et al., 1994; Zeiher et al., 1995).

Die essentielle Rolle der eNOS für die Endothelfunktion und die Gefäßum- und neubildung wird durch Untersuchungen in eNOS $-/-$ Mäusen deutlich. Einer der ersten beschriebenen Phänotypen der eNOS $-/-$ war die Beobachtung, dass Knockout-Mäuse im Vergleich zu Wildtyp-Tieren einen Bluthochdruck entwickeln (Huang et al., 1995), d.h. dass das durch die eNOS gebildete NO von zentraler Bedeutung für die Regulation des Gefäßtonus ist. Neben der Regulation des Gefäßtonus ist NO ein essentieller Faktor für die durch Wachstumsfaktoren induzierte Angiogenese (Babaei et al., 1998; Papapetropoulos et al., 1997). Die zentrale Rolle der eNOS bei der Angiogenese konnte durch eine Studie von Murohara et al., demonstriert werden. In diesem Mausmodell wurde durch eine operativ herbeigeführte Ischämie die Angiogenese induziert. In eNOS $-/-$ Mäusen ist die Angiogenese im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen reduziert und kann auch nicht durch Applikation von Wachstumsfaktoren verbessert werden (Murohara et al., 1998). Die wichtige Funktion für das Gefäßremodeling nach Ligatur wurde ebenfalls in eNOS $-/-$ Mäusen gezeigt. Im Gegensatz zu den Wildtyp-Mäusen erfolgt bei den NO-defizienten Tieren eine paradoxe Zunahme der Wandstärke, die durch eine erhöhte Proliferation der glatten Muskelzellen bedingt ist (Rudic et al., 1998), da NO normalerweise die Proliferation von glatten Muskelzellen inhibiert. Diese Studien zeigen, dass neben der zentralen Rolle für die Regulation des Blutflusses NO ein essentieller Faktor

für die normale Gefäßneu- und umbildung ist. Ein weiterer wichtiger Effekt von NO in physiologischen Konzentrationen ist die Inhibition der Apoptose. Um diese Mechanismen näher aufzuzeigen soll im Folgenden zuerst die Signaltransduktion der Endothelzellapoptose kurz erläutert werden.

1.2. Apoptose

Die Apoptose, oder auch programmierter Zelltod genannt, ist neben der Nekrose eine der beiden bekannten Formen des Zelltodes. Bei der Apoptose kommt es zur Zellschrumpfung, die Zelle löst sich aus dem Zellverband und es kommt zu Membranabschnürungen. Außerdem erfolgt eine Kondensation des Kernes und das Chromatin wird durch Endonukleasen in definierte Fragmente gespalten (180 bp und Vielfache davon). Bei diesem Vorgang zerfällt die Zelle in viele apoptotische Partikel, ohne dabei eine Entzündungsreaktion hervorzurufen (Kerr et al., 1972). Die Apoptose wird von einem in der Evolution konservierten Programm kontrolliert, das in allen bekannten Zellen von Vertebraten identifiziert werden konnte (Jacobson et al., 1997; Weil et al., 1996). Der programmierte Zelltod ist für die normale embryonale Entwicklung und für die Aufrechterhaltung der Homöostase von entscheidender Bedeutung. Pathophysiologisch ist die Apoptose möglicherweise bei der Entstehung der Alzheimer Erkrankung, bei der Immunschwäche AIDS oder bei der Entstehung von Krebs beteiligt (Duke et al., 1997).

Der wohl bekannteste Weg zur Induktion von Apoptose in Endothelzellen erfolgt über die Familie der TNF- bzw. Fas-Rezeptoren. Nach Bindung des Rezeptoragonisten, d.h. TNF α an den TNF-Rezeptor und Fas Ligand an den Fas-Rezeptor, kommt es zur Rekrutierung von intrazellulären Proteinen zum *death inducing signalling complex* (DISC). Über diesen Komplex wird die Familie der Caspasen aktiviert. Der Name Caspasen setzt sich aus dem Englischen *cysteiny l aspartate – specific proteinases* zusammen. Caspasen sind also Cysteinproteasen die nach eine spezifischen Sequenz hinter der Asparaginsäure schneiden. Die Caspasen sind in einer Kaskade organisiert, in der es nach Aktivierung z.B. der Caspase-8 durch Stimulation des TNF-Rezeptors zu einer Spaltung der nachfolgenden Caspasen kommt bis am Ende die Caspase-3 aktiviert wird, die zentrale ausführende Protease innerhalb des apoptotischen Programms. Einige Substrate dieser Protease sind das DNA-Reparaturenzym Poly-ADP-Ribosylpolymerase (PARP), welches nach Spaltung durch Caspase-3 inaktiviert wird, oder z.B. der DNA-Fragmentierungsfaktor / Caspase aktivierte DNase (DFF/CAD) der nach Abspaltung seines Inhibitors (ICAD) durch Caspase-3 aktiviert wird (Enari et al., 1998; Liu et al., 1997).

Ein weiterer wichtiger Faktor für die Entstehung von Apoptose in Endothelzellen und der Entwicklung von Artherosklerose ist das oxidierte Low density Lipoprotein (oxLDL), ein pro-atherogener Risikofaktor. Dieses oxLDL wird über die Bindung an LOX-1 internalisiert und bedingt eine Sensibilisierung von Endothelzellen gegenüber Fas vermittelter Apoptose (Sata and Walsh, 1998a; Sata and Walsh, 1998b) und induziert selber Apoptose (Dimmeler et al., 1997a).

Neben dem oben genannten Rezeptorvermittelten Signaltransduktionsweg kann in Endothelzellen Apoptose auch durch hohe Mengen an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) ausgelöst werden.

In den letzten Jahren wurde durch verschiedene Arbeiten deutlich, das NO ein zweiseitiges Schwert für die Apoptose von Zellen ist (zur Übersicht (Chung et al., 2001; Dimmeler and Zeiher, 1997)). NO in hohen pathophysiologischen Konzentrationen kann Apoptose in unterschiedlichen Zelltypen, wie z.B. Macrophagen, Neuronen oder Tumorzellen induzieren. Dabei kann NO über mehrere Signaltransduktionswege eine Aktivierung des Apoptoseprogrammes bewirken. Zum einen durch die Freisetzung von Cytochrome C und einer daraus resultierenden Aktivierung der Caspasen (Chung et al., 2001), zum anderen über die so genannten stress-aktivierten Kinasen p38 und c-Jun N-terminale Kinase (Jun et al., 1999) oder aber über die Induktion von DNA-Strangbrüchen (Messmer et al., 1994). Auf der anderen Seite inhibiert NO in physiologischen Konzentrationen die Apoptose. (zur Übersicht siehe (Chung et al., 2001; Dimmeler and Zeiher, 1997)) . Diese Inhibition der Apoptose erfolgt zum einen über eine transkriptionelle Regulation von anti-apoptotischen Genen und über cGMP-medierte Effekte. Ein großer Teil des anti-apoptotischen Effektes von NO beruht jedoch auf der Inhibition von Caspasen durch S-Nitrosylierung des Cysteins im reaktiven Zentrum der katalytischen Untereinheit (Dimmeler et al., 1997b; Li et al., 1997; Rössig et al., 1999; Tenneti et al., 1997). Mannick et al. konnten in einer Studie zeigen, dass nach Inkubation von humanen T-Zellen mit dem pro-apoptotischen Faktor Fas-Ligand die S-Nitrosylierung der Caspase-3 deutlich reduziert ist (Mannick et al., 1999). Dies lässt vermuten, dass es je nach *in vivo* Situation eine Balance zwischen S-Nitrosylierung und Reduktion der S-Nitrosylierung gibt. Die S-Nitrosylierung und ihre Funktionen sind Schwerpunkt des folgenden Abschnittes.

1.3. S-Nitrosylierung

In den ersten Abschnitten wurden die Effekte von NO in zellulären Systemen beschrieben. Diese verschiedenen intrazellulären Wirkmechanismen von NO beruhen auf der immer größer werdenden Anzahl von Substraten in der Zelle, die mit NO reagieren können. Im wässrigen Milieu gibt es verschiedene, stabile Verbindungen von NO, beruhend auf der Oxidationsstufe des Stickstoffes: NO[•], NO⁺ und NO⁻. Die wichtigsten Reaktionswege und die Reaktionspartner von NO[•], NO⁺ und NO⁻ sollen im Folgenden näher erklärt werden (Abb. 1). Desweiteren werden die strukturellen und chemischen Voraussetzungen für die wesentlichste Modifikation von Proteinen und Peptiden durch NO, die S-Nitrosylierung, erläutert.

1.3.1. Reaktionswege von Stickstoffmonoxid

Die Reaktionswege von Stickstoffmonoxid sind zum einen abhängig von der Oxidationsstufe des Stickstoffs und zum anderen vom physiologisch-chemischen Milieu. Für das Verständnis der NO – Biochemie sind die verschiedenen Verbindungen, in denen NO auftritt, von fundamentaler Bedeutung. NO[•]-Radikal besitzt ein einzelnes Elektron in seinem 2p- π Orbital. Durch Entfernung dieses Elektrons bildet sich das positivgeladene Nitrosonium (NO⁺). Zugabe von einem Elektron bildet das Nitroxylanion (NO⁻). Diese drei unterschiedlichen Verbindungen differieren deutlich in ihren Reaktionswegen. Für NO[•] sind vom biologischen Standpunkt her gesehen die Reaktionen mit Nebengruppenmetall Zentren und O₂- Radikalen von Bedeutung (siehe Abb. 1.). Die physiologisch wichtigen Reaktionen des NO[•] mit Metallionen finden an Metallionen-Zentren von Enzymen sowie an den Fe-Ionen der Häm-Proteine statt, wobei die Bindung von NO[•] zur Oxidation der komplexierten Metallionen führen kann. NO[•] reagiert beispielsweise mit dem Eisenion der Guanylatcyclase unter Formation eines Nitrosyl-Eisenkomplexes. Dadurch kommt es zu einer Konformationsänderung und Enzymaktivierung der löslichen Guanylatcyclase und zu einer verstärkten Bildung des second messenger cGMP (Murad, 1994). Ein zweites Zielprotein, welches durch Bindung von NO[•] an eine Häm-Gruppe reguliert wird ist Cytochrom P450 (Takemura et al., 1999). Eine weiterer Komplex, der mit NO[•] reagiert sind Eisen-Schwefel-Cluster wie z.B. bei der Elektronen –Transportkette Komplex I, deren Funktion inhibiert wird (Clementi et al., 1998).

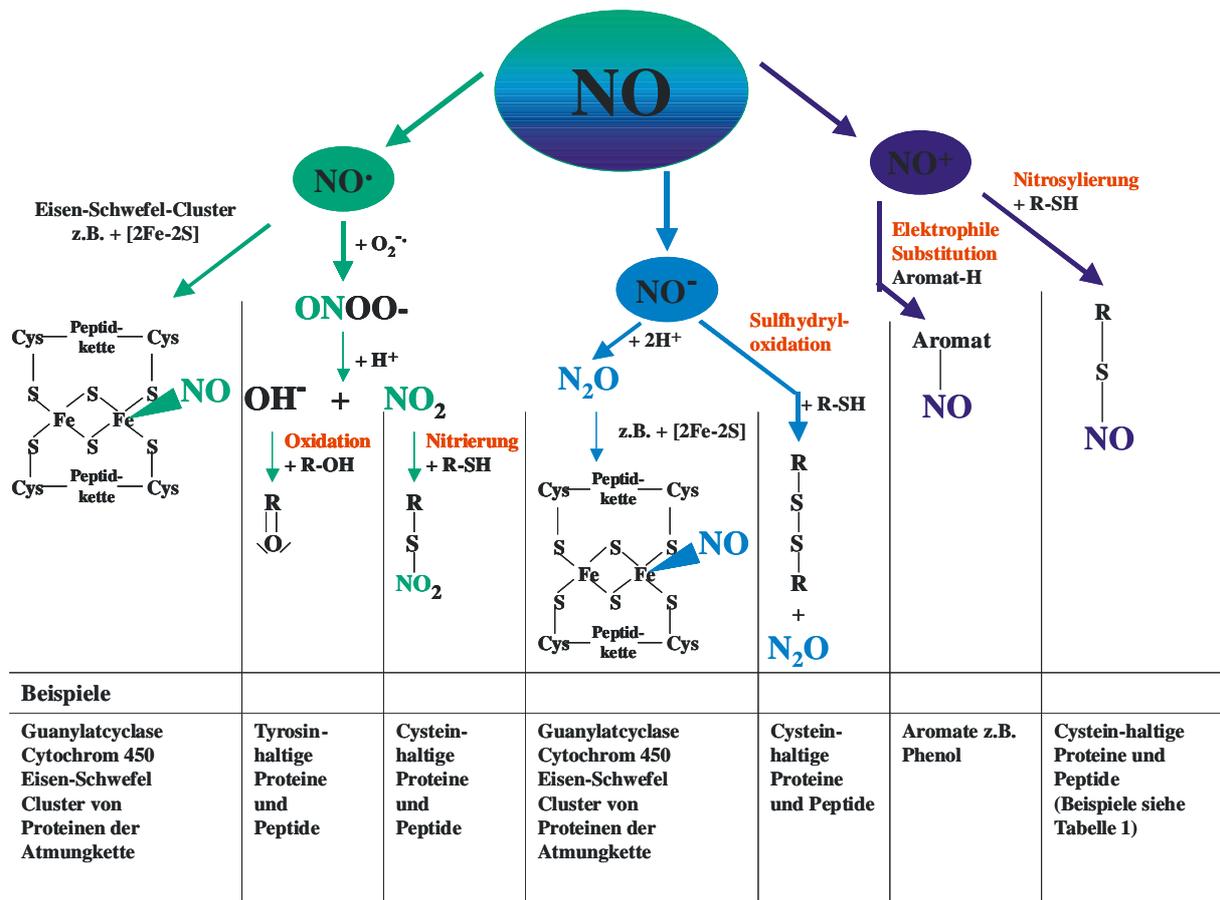


Abbildung 1.: Schema der wichtigsten Reaktionswege der unterschiedlichen Verbindungen von NO.

Die zweite wichtige Reaktion von NO^\bullet ist in wässriger Phase mit $\text{O}_2^{\bullet-}$ zu Peroxynitrit (ONOO^-). Dieser Reaktionsweg ist in vielen biologisch relevanten Prozessen beschrieben worden. Wird Peroxynitrit protoniert kommt es zur Bildung von Hydroxylanion (OH^\bullet) und NO_2 . Die Bildung von OH^\bullet führt dann zur Oxidation von Tyrosinen, was die Inaktivierung vieler Enzyme zur Folge hat, z.B. Tyrosin-Kinasen und Tyrosin-Phosphatasen. Ähnliches gilt für die durch NO_2 induzierte Nitrierung von aktiven Cysteinen. Daher führt die Entstehung von OH^\bullet und NO_2 aus protoniertem Peroxynitrit zu Gewebeschädigungen (Stamler et al., 1992). Da es sich bei diesen Oxidations- und Nitrierungsreaktionen um irreversible Prozesse handelt, kommt es durch hohe Konzentrationen von ONOO^- letztendlich zum Zelltod (Bonfoco et al., 1995; Lin et al., 1995; Salgo et al., 1995). Jedoch besitzt ONOO^- neben diesen destruktiven Effekten auch die Fähigkeit in geringeren Konzentrationen indirekt als Signaltransduktionsmolekül zu wirken. In physiologischen Konzentrationen konnte in einem Zellfreisystem gezeigt werden, dass es über die Reaktion von ONOO^- mit GSH zur Bildung von GSNO kommt, welches wiederum über Freisetzung von NO die lösliche Guanylatcyclyase aktiviert (Mayer et al., 1998).

Das Nitroxylanion reagiert zu N_2O , welches dann mit einer Fe (III) Hämgruppe analog wie NO^- reagiert. Außerdem kann es reversibel mit Thiolen über die Zwischenform $RSNOH$ zu einer Sulphydryloxidierung führen (Stamler et al., 1992).

Die Reaktivität von Nitrosonium NO^+ ist charakterisiert durch Additions- und Substitutionsreaktionen mit Nucleophilen, so dass Nitrosierung sowohl für Schwefel, Stickstoff, Sauerstoff und Cysteine in wässriger Phase bekannt ist. Unter biologischen Bedingungen reagiert NO mit Sauerstoff, es entsteht NO_2 . NO_2 reagiert dann mit einem weiteren NO zu N_2O_3 , welches als primäres Intermediär das Nitrosonium NO^+ doniert (Stamler et al., 1992). NO^+ reagiert durch elektrophile Substitution mit aktiven Aromaten wie z.B. dem Phenol. Eine weitere wesentliche Reaktion von NO^+ ist die Nitrosierung von Aminen und Thiolen, die beide hochreaktiv sind. Jedoch wird unter physiologischen Bedingungen die Reaktion mit Thiolen bevorzugt, da basische Amine vor allem in ihrer protonierten, nicht reaktiven Form vorliegen (Stamler et al., 1992). Die Nitrosylierung von reaktiven Cysteinen in Proteinen oder Peptiden durch NO^+ wird auch als S-Nitrosylierung bezeichnet. Bei der S-Nitrosylierung handelt sich im Gegensatz zu den zuvor erwähnten Oxidations- und Nitrierungsreaktionen um eine reversible Reaktion. Da die S-Nitrosylierung von Proteinen und Peptiden bedeutsam ist für die intrazelluläre Signaltransduktion, soll im Folgenden detailliert auf die Reaktion von NO mit freien SH-Gruppen in Proteinen und Peptiden eingegangen werden.

1.3.2. Strukturelle Voraussetzungen für eine S-Nitrosylierung

Bei der S-Nitrosylierung reagiert wie oben beschrieben NO mit einer freien SH-Gruppe. Ermöglicht wird diese Reaktion durch die Elektronegativität des Schwefels. Eine Voraussetzung für die Bindung von NO an die freie SH-Gruppe des Schwefels ist jedoch, eine Erhöhung seiner Elektronegativität durch eine bestimmte Umgebung von sauren/basischen Aminosäuren (acid-base-motif). In der Primärstruktur wurde hierfür ein Konsensus-Sequenzmotiv entwickelt, wobei sich die beiden wichtigsten Aminosäuren, nämlich Aspartat (D) und Glutamat (E), an Position +1 befinden (Stamler et al., 1997)(siehe Abb. 2).

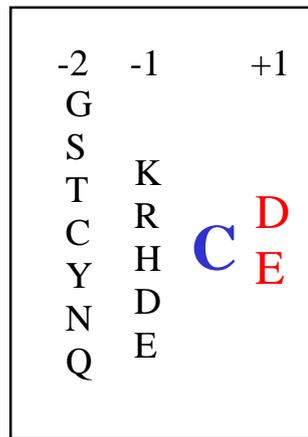


Abbildung 2: Konsensus-Sequenzmotiv für die S-Nitrosylierung nach (Stamler et al., 1997)

An Position –1 sind bei vielen Zielproteinen ebenfalls saure oder basische Aminosäuren, wobei D,E, Lysin (K), Arginin (R), Histidin (H) abhängig von der direkten Umgebung sowohl als Basen als auch als Säuren fungieren können (Stamler et al., 1997). Die Spezifität dieses Motivs konnte unter anderem anhand des NMDA-Rezeptors aus der Familie der ionotropen Glutamatrezeptoren gezeigt werden. Er besitzt an Position 744 und 798 zwei reaktive Cysteine, die in allen ionotropen Glutamatrezeptoren konserviert sind (Moriyoshi et al., 1991). Allerdings ist nur der NMDA-Rezeptor sensitiv gegenüber redox Veränderungen und NO. Vergleicht man die umgebenden Aminosäuren der beiden Cysteine an Position 744 und 798 so zeigt sich, dass nur die beiden Cysteine des NMDA-Rezeptors von sauren/basischen Aminosäuren umgeben sind (Stamler et al., 1997). Die Modifikation des NMDA-Rezeptors durch S-Nitrosylierung bewirkt eine Inhibierung seiner Aktivität. Neben diesen strukturellen Voraussetzung für eine S-Nitrosylierung bezüglich der Primärstruktur eines Zielproteins, konnte in einer neueren Arbeit gezeigt werden, dass auch die Tertiärstruktur und die Aminosäuren in naher räumlicher Umgebung die S-Nitrosylierung beeinflussen. Für die Methionin-Adenosyltransferase zeigten Mato et al., dass saure/basische Aminosäuren in naher räumlicher Umgebung essentiell sind für eine S-Nitrosylierungsreaktion (Perez-Mato et al., 1999). Im Falle der Methionin-Adenosyltransferase ist das reaktive Thiol am Cystein 121 nicht von Aminosäuren des Konsensus-Sequenzmotivs umgeben. Bei diesem Protein befinden sich die für die S-Nitrosylierung wichtigen Aminosäuren in naher räumlicher Umgebung des Cysteins. Das Cystein wird flankiert von den Aminosäuren Aspartat an Position 355 und Arginin an Position 357 und 363. Diese Aminosäuren bilden in der Faltung des Proteins eine dreidimensionale Tasche um das reaktive Cystein, die aufgrund der chemischen Eigenschaften der sauren/basischen Aminosäuren, zu einer Erhöhung der Elektronegativität des Schwefels führt. Neben diesen

biochemischen Notwendigkeiten beruht die Spezifität der S-Nitrosylierung von Proteinen aber auch auf der lokalen Freisetzung von NO.

Mit Hilfe des *acid base motif* könnten anhand von Datenbankanalysen eine sehr große Zahl an potentiellen Zielproteinen für die S-Nitrosylierung identifiziert werden. In den letzten Jahren ist eine immer größer werdende Anzahl von Proteinen mit unterschiedlichen Funktionen beschrieben worden, die durch S-Nitrosylierung modifiziert werden. Einige Beispiele hiervon sollen im folgenden Abschnitt näher dargelegt werden.

1.3.3. Bekannte Zielproteine für die S-Nitrosylierung

In einer kürzlich publizierten Übersichtsarbeit haben Stamler et al. die bis zu diesem Zeitpunkt identifizierten Zielproteine, deren Funktion durch S-Nitrosylierung modifiziert wird, zusammengefasst (online supplemental (Stamler et al., 2001)). Diese Auflistung macht deutlich, dass unter den aufgeführten Proteinen eine Reihe von unterschiedlichen Protein-
klassen als Zielproteine vertreten sind. Einige Beispiele aus dieser Auflistung sind in Tabelle 1 zusammengestellt.

<i>Ionenkanäle / Transporter</i>			
Anion exchanger-1	<i>in vivo</i>	Inhibition	(Pawloski et al., 2001)
<i>Proteinkinasen</i>			
JNK	<i>in vivo/in vitro</i>	Inhibition	(Park et al., 2000)
c-Src	<i>in vivo</i>	Aktivierung	(Akhand et al., 1999)
EGF-Rezeptor	<i>in vivo</i>	Inhibition	(Estrada et al., 1997)
<i>Transkriptionsfaktoren</i>			
AP-1;c-jun	<i>in vitro</i>	Inhibition	(Nikitovic et al., 1998; Tabuchi et al., 1994).
<i>Signaltransduktionsmolekül</i>			
p21 ^{ras}	<i>in vivo/in vitro</i>	Aktivierung	(Lander et al., 1997)

Tabelle 1: Auswahl bekannter Zielproteine für die S-Nitrosylierung

So sind z.B. Ionenkanäle, Transporter, Kinasen, Proteasen, Transkriptionsfaktoren und Signaltransduktionsmoleküle als Zielproteine für die S-Nitrosylierung beschrieben. Einige von diesen sollen im folgenden näher vorgestellt werden. Unter den Transportern ist der Anion exchanger 1 aufgeführt, bei dem es durch S-Nitrosylierung zu einem Export von NO, das vom Hämoglobin freigesetzt wurde, aus dem Erythrozyten kommt, welches dann als vasoaktives Molekül fungieren kann (Pawloski et al., 2001). In der Klasse der Kinasen sind mehrere interessante Proteine im Sinne der Gefäßbiologie zu erwähnen. Zum einen die c-Jun N-terminale Kinase, die durch S-Nitrosylierung an Cystein 116 inhibiert wird (Park et al., 2000). Zum anderen konnte in Fibroblasten eine Aktivierung der c-Src Kinase durch NO beschrieben werden (Akhand et al., 1999). Sowohl die c-Src Kinase als auch der EGF-Rezeptor (Estrada et al., 1997), ein weiteres beschriebenes Zielprotein für die S-Nitrosylierung, besitzen wichtige Funktionen für die Physiologie und Pathophysiologie von Zellen des vaskulären Systems (Griendling et al., 2000). Die immer deutlicher werdende Rolle der S-Nitrosylierung als Signaltransduktionsmechanismus wird zusätzlich unterstützt durch Studien, die eine S-Nitrosylierung von Transkriptionsfaktoren wie z.B. AP-1 oder c-jun zeigen konnten (Nikitovic et al., 1998; Tabuchi et al., 1994). Für AP-1 konnte gezeigt werden, dass der anti-apoptotische Effekt von NO zum Teil auf einer Transaktivierung durch den Transkriptionsfaktor AP-1 beruht (Melino et al., 2000). Die S-Nitrosylierung des Signaltransduktionsmoleküles p21^{ras} unterstreicht die Hypothese, dass S-Nitrosylierung ein Signaltransduktionsmechanismus darstellt, da durch Bindung von NO an Cystein C118S ein Guaninnukleotid Austausch erfolgt (Lander et al., 1997). Dieser Austausch bewirkt eine Aktivierung von p21^{ras} und somit eine Aktivierung der nachfolgenden Signaltransduktionswege wie z.B. dem MAP-Kinase Signaltransduktionsweg.

1.4. Antioxidative Systeme

Der intrazelluläre Redox-Status, d.h. die Balance zwischen Reduktions- und Oxidationsprozessen ist von fundamentaler Bedeutung für das Überleben und die Funktion der Zelle. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) werden von allen aeroben Organismen gebildet und abgebaut. Die Modulation des Gleichgewichtes zwischen diesen beiden Reaktionen führt entweder zur Bildung von niedrigen, physiologischen Konzentrationen die für die normale Zellfunktion benötigt werden, oder aber zur Bildung von hohen, pathophysiologischen Dosen die einen oxidativen Stress, eine Induktion von Apoptose oder cytotoxischen Effekten zur Folge haben. In den vorherigen Abschnitten ist bereits auf die verschiedenen Effekte und

Reaktionen von NO eingegangen worden. Diese Prozesse sind unter anderem abhängig von dem intrazellulären Redox-Status. Auf der anderen Seite ist ein NO auch ein Regulator des Redox-Status. Die bedeutenden ROS sind das Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$), Wasserstoffperoxide (H_2O_2), Hydroxylradikal ($\cdot OH$) und NO. Die intrazellulären Quellen für diese ROS sind unter anderem die Elektrontransportkette, die Xanthin-Oxidase, die NADPH-Oxidase und die NO-Synthase (zur Übersicht siehe (Nordberg and Arner, 2001)).

Für die Aufrechterhaltung des intrazellulären Redox-Status in Zellen werden so genannte antioxidative-Systeme benötigt. So verstoffwechseln die Superoxid-Dismutasen $O_2^{\cdot-}$ zu H_2O_2 , welches wiederum durch die Catalase und die Glutathion Peroxidase zu Wasser und O_2 weiter abgebaut werden. Die beiden wichtigsten antioxidativen Systeme sind das Glutathion und das Thioredoxin System.

1.4.1. Glutathion

Bei dem Glutathion System wird das Glutathion (GSH) als Antioxidants verwendet. In der Literatur wird die Rolle des Tripeptides GSH mit der Aminosäurefolge L-Glutaminsäure – Cystein – Glycin für den intrazellulären Redox-Status kontrovers diskutiert. Als Antioxidants ist GSH in der Lage Disulfidbindungen zu freien SH-Gruppen zu reduzieren. H_2O_2 wird z.B. durch die Glutathionperoxidase zu Wasser reduziert. Dabei werden zwei Moleküle GSH zu GSSG oxidiert. Dabei entstehendes, oxidiertes Glutathion (GSSG) wird seinerseits von der Glutathion Reduktase unter Verwendung des Reduktionsäquivalentes NADPH wieder zu GSH reduziert (siehe Abbildung 3). Die Glutathion Reduktase, ein dimerisches Flavoprotein, ist das kritische Enzym für den GSH Redox-Metabolismus (Becker et al., 1995). Glutathion reduziert außerdem das Glutaredoxin, welches seinerseits verschiedene Substrate reduziert, wie z.B. GSH-mixed Disulfid. Ein Beispiel dafür ist die Glutathionylierung, d.h. an eine SH-Gruppe eines Cystein gebundenes GSH (Nordberg and Arner, 2001).

Das Glutathion-System

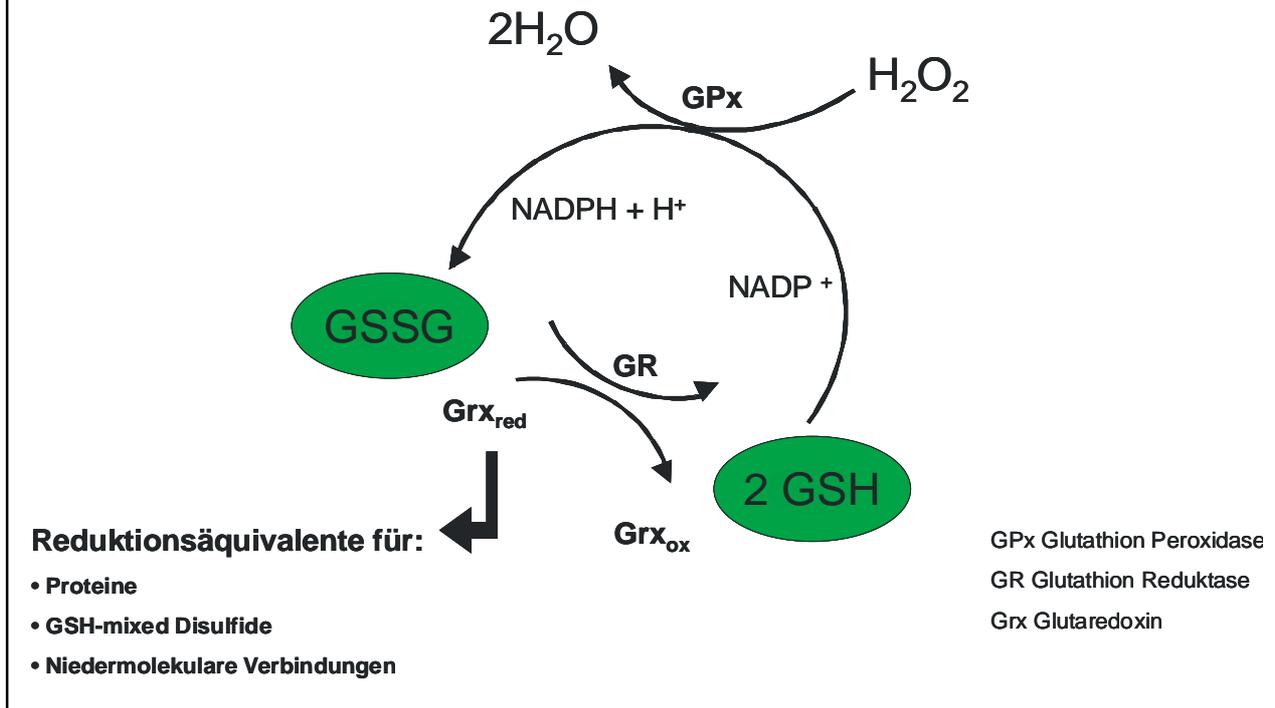


Abbildung 3: Schema des Glutathion Systems nach Nordberg (Nordberg and Arner, 2001)

Zusätzlich ist bekannt, dass GSH mit NO zu GSNO reagieren kann und damit als Speicher von NO dienen kann (Jia et al., 1996; Kashiba et al., 1999). Diese S-Nitrosylierung von GSH zu GSNO wurde lange Zeit als die zentrale Reaktion für die Bioverfügbarkeit von NO und als intrazelluläre Speicherform von NO angesehen.

1.4.2. Thioredoxin

Neben Glutathion gibt es noch als weiteres wichtiges antioxidatives-System in Zellen das Thioredoxin-System. Das Thioredoxin-System besteht aus zwei Oxidoreduktasen, Thioredoxin und Thioredoxin-Reduktase (Holmgren, 1989; Nordberg and Arner, 2001). Die Thioredoxin-Familie besteht aus drei Proteinen, Thioredoxin, Thioredoxin-2 und Sp-Thioredoxin (Miranda-Vizuete et al., 2001; Spyrou et al., 1997; Taniguchi et al., 1996). Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird nur das Thioredoxin besprochen werden. Thioredoxin ist ubiquitär in Säugetierzellen exprimiert (Holmgren, 1989). Die zentrale Rolle des Thioredoxins wird an den Befunden deutlich, dass der Phänotyp von Thioredoxin defizienten Mäusen embryonal letal ist (Matsui et al., 1996). Thioredoxin besitzt eine konservierte aktive Domäne mit der Aminosäureabfolge Cys-Gly-Pro-Cys wobei für das Thioredoxin die Cysteine an Position 32 und 35 lokalisieren. Diese aktive Domäne ist essentiell für die redox-

regulatorische Funktion der Thioredoxine (Holmgren, 1989). In Abbildung 4 ist schematisch das Thioredoxin-System gezeigt. Thioredoxin reduziert über seine redox-regulatorische Domäne Disulfidbrücken von Proteinen und wird dabei selber oxidiert. Dieses oxidierte Thioredoxin wird dann unter Verwendung von NADPH durch die Thioredoxin-Reduktase wieder reduziert und somit in seiner aktiven Form regeneriert.

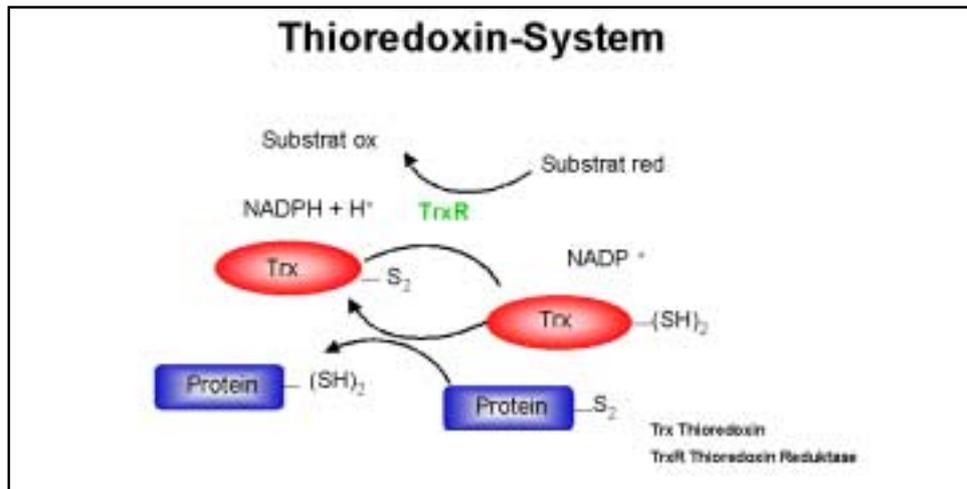


Abbildung 4 : Schema des Thioredoxin-Systems nach Holmgren (Holmgren, 1989).

Zusätzlich zu seiner Funktion als Oxidoreduktase interagiert Thioredoxin mit anderen Proteinen durch Bildung von Disulfidbrücken. Neben Bindung an die Ribonukleotid Reduktase interagiert Thioredoxin mit unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren wie z.B. p53, NFκB und AP-1 via Ref-1 (Hirota et al., 1997; Matthews et al., 1992; Reichard, 1993; Schenk et al., 1994; Tanaka et al., 2001). Im Falle von NFκB erhöht Thioredoxin über Reduktion einer Disulfidbrücke in die das Cystein 62 involviert ist die DNA-Bindung (Matthews et al., 1992). Außer dem besitzt Thioredoxin anti-apoptotische Effekte über Bindung der Apoptose-regulierenden-Kinase 1 (ASK-1). Die pro-apoptotische Kinase ASK-1 wird durch Bindung von Thioredoxin inhibiert (Saitoh et al., 1998). Die verschiedenen Funktionen von Thioredoxin sind schematisch in Abbildung 5 zusammengefasst.

Funktionen von Thioredoxin

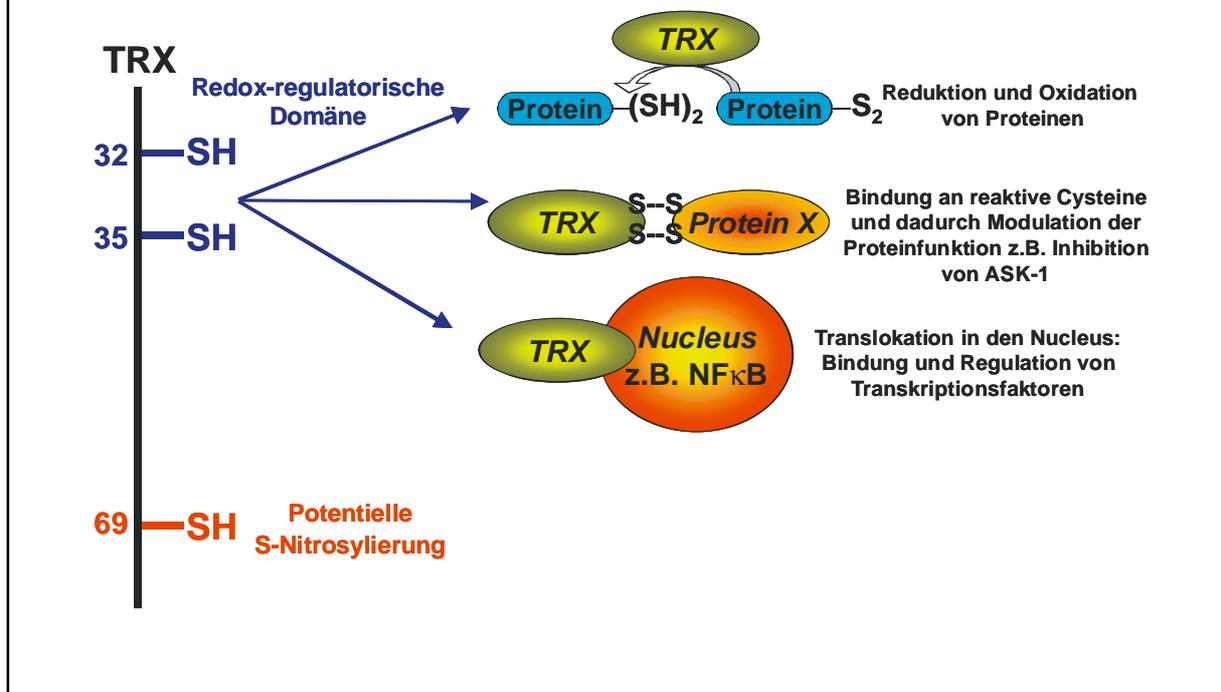


Abbildung 5: Schema der Funktionen von Thioredoxin

Neben den bereits erwähnten Cysteinen 32 und 35, die zusammen die redox-regulatorische Domäne bilden besitzt Thioredoxin ein weiteres Cystein an Position 69. Dieses Cystein 69 liegt innerhalb des oben erwähnten Konsensus-Sequenzmotiv für S-Nitrosylierung. Diese Tatsache in Verbindung mit der Beobachtung, dass Thioredoxin in einem *in vitro* Assay in der Lage ist NO aus GSNO herauszulösen, lässt vermuten, dass Thioredoxin ein neues Zielprotein für die S-Nitrosylierung ist.

Ziele der Doktorarbeit

NO ist ein wichtiger physiologischer Mediator in Endothelzellen und für das Gefäßsystem. Die Effekte von NO werden cGMP-abhängig und cGMP unabhängig vermittelt. Einer der wichtigsten cGMP-unabhängigen Mechanismen ist die S-Nitrosylierung. In den letzten Jahren ist eine Vielzahl von Zielproteinen für die S-Nitrosylierung entdeckt worden. Durch diese gefundenen Proteine, deren Funktion durch S-Nitrosylierung modifiziert wird, wird deutlich, dass S-Nitrosylierung die Funktion eines Signaltransduktionsmechanismus übernimmt. Der S-Nitrosylierung liegt die reversible Reaktion von NO mit freien SH-Gruppen zu Grunde. Der Prozess der Denitrosylierung konnte erstmals in einer publizierten Studie von Mannick et al. in humanen T-Zellen beschrieben werden (Mannick et al., 1999). Die Aufklärung der Mechanismen, die einer Regulation der Balance zwischen S-Nitrosylierung und Denitrosylierung zu Grunde liegen, würde zu einem weiteren Verständnis der Zellbiologie von NO beitragen. Daher waren die Ziele dieser Arbeit:

- Etablierung der Nachweismethoden für die S-Nitrosylierung.
- Identifizierung von Regulationsmechanismen für die S-Nitrosylierung und Denitrosylierung.
- Charakterisierung der Denitrosylierung und Identifizierung einer potentiellen Nitrosylase.
- Untersuchung von neuen Zielproteinen für die S-Nitrosylierung.

2. Material und Methoden

2.1. Molekularbiologische Arbeiten

2.1.1. cDNA Klonierung

Die Plasmide p17wt; p17 C163S und eNOS S1177D wurden in pcDNA 3.1. myc/His minus mit CMV Promotor der Fa., Invitrogen kloniert und von Prof. S. Dimmeler freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Plasmide TRXwt; TRX (C32/35S) und TRX (C69S) wurden in pcDNA 4 His mit CMV Promotor der Fa. Invitrogen kloniert und von Frau Dr. J. Haendeler freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.1.2. Plasmidpräparation

Sämtliche Plasmidpräparationen wurden mit Spin-, Mini-, oder Maxi- Plasmidpräparationen der Fa. Quiagen durchgeführt. Die Konzentration und Reinheit der DNA wurde photometrisch bestimmt. Als reine DNA wurde ein Quotient OD_{260nm}/OD_{280nm} 1,6 – 1,8 angesehen.

2.1.3. RT-PCR

Die RT-PCR wurde mit Hilfe eines one-step-RT-PCR Systems der Fa. Gibco durchgeführt. Die Primersequenzen für die Alkoholdehydrogenase Typ I waren sense: 5'-aca tgg cga acg agg tta tca agt gca agg-3' und antisense: 5'-cct tgc act tga taa cct cgt tcg cca tgt-3' Die PCR –Bedingungen sind nachfolgend aufgeführt:

1. Zyklus: 50°C für 30 min (reverse Transkription)
2. Zyklus: 94°C für 2min
3. Zyklus: 40 Zyklen:
 - i. 95°C 30 sec
 - ii. 55°C 90 sec
 - iii. 72°C 60 sec

Nach der RT-PCR wurden die Proben auf einem 1 % igen Agarosegel mit 2,5 µg / ml Ethidiumbromid aufgetragen. Der Laufpuffer war 0,5 x TBE. Anschliessend wurde mittels Polaroidkamera das Ergebnisse auf einem Transiluminator dokumentiert.

2.2. Zellkultur

2.2.1. Humane Nabelschnur Endothelzellen (HUVEC)

HUVEC wurden in Endothelzell Basalmedium (EBM) (Fa. Clonetics) mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) der Fa. Gibco und folgenden Zusätzen der Fa. Clonetics kultiviert: 1 µg/ml Hydrocortison; 12 µg/ml Rinderhirnextract; 50 µg/ml Gentamycin; 50 ng/ml Amphotericin B; 10 ng/ml epidermaler Wachstumsfaktor. Nach passagieren der Zellen mittels Trypsinverdau wurden die Zellen für 18 h kultiviert, bevor sie stimuliert und/oder transfiziert wurden. HUVEC wurden mit Superfect (Fa. Qiagen) transfiziert, wobei 25 µl Superfect und 3 µg Plasmid – DNA für eine 60 mm Zellkulturschale ($2,5 \times 10^5$ Zellen) verwendet wurden. Die Transfektionseffizienz lag bei ca. 40-50 % transfizierter Zellen (Dimmeler et al., 1997b). Für die Versuche mit alternden HUVEC wurden HUVEC kontinuierlich bis zur Passage 15 passagiert. Dabei wurden 6×10^5 Zellen in einer T75 Zellkulturflasche der Fa. Greiner ausgebracht und bis zur 95 % Konfluenz gezogen. Danach wurden die Zellen passagiert und „population doublings“ (PD) mittels der Formel $n = (\log_{10} F - \log_{10} I) / 0,301$ berechnet. Dabei entspricht $n =$ population doublings, $F =$ Zellzahl am Ende einer Passage und I Zellen die am Beginn einer Passage ausgebracht wurden. Die Dedifferenzierung wurde mit Hilfe einer Immunfluoreszenzfärbung gegen von Willebrand Faktor (vWF) ausgeschlossen. In der Passage 15 waren noch über 90% der Zellen vWF positiv.

2.2.2. Humane embryonale Nierenzellen (HEK 293)

HEK 293 Zellen wurden in DMEM – Medium mit Glutamax der Firma Gibco mit 10 % FCS kultiviert. Nach passagieren mittels Trypsinverdau wurden die Zellen für 18 h kultiviert. HEK 293 Zellen wurden mit Lipofectamin und Plus – Reagenz der Fa. Invitrogen nach Herstellerangaben transfiziert, wobei 11 µl Lipofectamin, 8 µl Plus – Reagenz und 1,3 µg Plasmid – DNA für eine 60 mm Zellkulturschale (3×10^5 Zellen) verwendet wurden. Die Transfektionseffizienz lag bei ca. 80 % transfizierter Zellen (Haendeler et al., 2000).

2.2.3. Transfektion von Oligonukleotiden

Zur Transfektion von HUVEC ($3,5 \times 10^5$ Zellen/60mm Kulturschale) mit Oligonukleotiden wurden phosphothiolierte Sense- oder Antisense – Oligonukleotide gegen Thioredoxin: sense 5´- caa gat ggt gaa gca gat cga-3´ antisense 5´- tcg atc tgc ttc acc atc ttg-3´ gegen Alkoholdehydrogenase: sense 5´aca tgg cga acg agg tta tca agt gca agg 3´antisense 5´ cct tgc act tga taa cct cgt tcg cca tgt 3´ verwendet. Je 5 µg Oligonukleotid wurde mit 5 µl Lipofektamine und 200 µl RPMI – Medium (Fa. Invitrogen) pro Ansatz für 30 min bei

Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen wurden dann unter serumfreien Bedingungen mit 2 ml RPMI – Medium mit dem Transfektionsansatz für 5h inkubiert. Anschließend wurden 3 ml EBM – Medium mit 10 % FCS und allen Zusätzen zugegeben und für weitere 18 h inkubiert.

2.2.4. Applikation von laminarer Schubspannung

HUVEC ($3,0 \times 10^5$ Zellen/60mm Kulturschale) wurden in einem konischen Kegelplattenviskosimeter laminarer Schubspannung von 15 dynes/cm^2 für verschiedene Zeitspannen ausgesetzt. Durch die gleichmäßige Rotation des Konus im Kulturmedium entsteht eine definierte laminare Schubspannung τ , die in etwa den Strömungsverhältnissen in mittelgroßen Gefäßen entspricht. Die verwendeten Apparaturen wurden von Dr. R. Popp und Prof. R. Busse (Universität Frankfurt, Physiologie) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.3. Apoptosenachweis

2.3.1. DAPI - Färbung

Die Zellen wurden mit 4% Formalin fixiert, danach dreimal mit Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und für 15 min bei Raumtemperatur mit 4,6 Diamino-2-Phenylindol (DAPI) inkubiert. Nach weiterem dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen im Fluoreszenzmikroskop bei 486 nm analysiert und die Anzahl der apoptotischen Kerne bestimmt.

2.3.2. LacZ – Färbung

Die Zellen wurden mit einem Plasmid, das für LacZ codiert, cotransfiziert und in 2% Formalin mit 0,2% Glutaraldehyd für 7 min fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen über Nacht mit Färbelösung inkubiert ($0,1648 \text{ g/100 ml K}_3[\text{Fe}(\text{Cn})_6]$; $0,2112 \text{ g/100 ml K}_4[\text{Fe}(\text{Cn})_6]$; 20mM MgCl_2 ; $0,1\% \text{ x-gal}$; in PBS). Die apoptotischen Zellen wurden im Phasenkontrast analysiert. Zur Bestimmung der Apoptoserate wurden nur LacZ positive, also blaugrün gefärbte Zellen verwendet.

2.3.3. Apoptosebestimmung mittels FACS

Die Apoptosebestimmung mittels FACS erfolgte mit Annexin V-PE und 7-Amino-actinomycin (7AAD)-FITC Färbung nach Herstellerangaben der Firma Pharmingen. Annexin V-PE ist ein Ca^{2+} - abhängiges Phospholipid – bindendes Protein, das eine hohe Affinität zu an der Zelloberfläche von apoptotischen Zellen exponierten Phosphatidylserinen hat. 7AAD-FITC ist nur zellpermeabel, wenn die Membranen geschädigt sind. Dies ist ein Marker für

nekrotischen Zelltod. Daher wurden die apoptotischen Zellen als Annexin V-PE positiv und 7AAD-FITC negativ definiert.

2.4. Methoden zur Proteinanalyse

2.4.1. Bestimmung der Proteinkonzentration (Bradford, 1976)

800 μ l H₂O (Referenz) bzw. Probe (1:800 in H₂O) wurden mit 200 μ l Färbereagenz Biorad (Fa. Biorad) versetzt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Adsorption bei $\lambda = 595$ nm bestimmt und die Proteinkonzentration mittels einer vorher mit Rinderserum Albumin (BSA) hergestellten Eichkurve berechnet.

2.4.2. Proteinisolation aus Zellen

Zellen wurden mit PBS gewaschen und in Ripa – Puffer (150mM NaCl, 1 % Nonidet-P-40, 0,5 % Deoxycholic acid, 0,1 % SDS und 50 mM Tris/HCl pH=8) für 30 min lysiert. Nach Zentrifugation (20000 x g, für 30 min, 4°C) wurde der Überstand wie unter 2.4.1. beschrieben auf seinen Proteingehalt bestimmt.

2.4.3. Immunpräzipitation

Zellextrakte, die, wie unter 2.4.2. beschrieben, gewonnen wurden, wurden für die Immunpräzipitation verwendet. Dabei wurden 500 μ g Gesamtprotein (1 μ g/ μ l Konzentration) und 2-5 μ g Antikörper gegen das zu präzipitierende Protein über Nacht bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Nach Zugabe von Protein A/G plus Agarose (Fa. Santa Cruz) wurden die Proben für weitere 2 h bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Danach wurden die Proben bei 6000 x g für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach dreimaligem Waschen mit Ripa – Puffer wurden die Pellets in 25 μ l 5 x Probenpuffer (0,3125 M Tris pH 6,8, 10 % SDS, 50 % Glycerin, 250 mM DTT, 0,05 % Bromphenolblau) versetzt und auf einer SDS – PAGE (2.4.5.) aufgetrennt.

2.4.4. Fällung von Proteinen mit Aceton

Zur Fällung von Proteinen mit Hilfe von Aceton wurden die Probe mit 2 Vol Aceton eisgekühlt versetzt und danach für mindestens 1 h bei –20°C inkubiert. Danach wurden die Proben für 30 min bei 4000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Proben in einem adäquaten Volumen Lysispuffer wieder aufgenommen.

2.4.5. Auftrennung von Proteinen mittels SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese

(Laemmli, 1970)

Durch SDS Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS – PAGE) können komplexe Proteingemische nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Die Auflösung des Geles hängt dabei vom Gelvernetzungsgrad ab, der durch den Gehalt an Acrylamid/Bisacrylamid bestimmt wird. Zwei speziell angefertigte Glasplatten werden durch einen Spacer getrennt und in eine Giessapparatur eingespannt (Mini Protean II cell, Fa. Biorad). Die Trenngellösung (1,5 M Tris/HCl pH 8,8; 0,4 % SDS mit APS + TEMED) wird mit der gewünschten Menge Arcrylamid/Bisacrylamid versetzt und eingefüllt und mit 0,1 % SDS überschichtet. Nach Polymerisation wird das SDS entfernt und die Sammelgellösung (0,5 M Tris/HCl pH 6,8; 0,4 % SDS mit APS + TEMED) eingefüllt und der Probenkamm eingesetzt. Die Proteinproben werden mit 1/5 Vol. 5 x Probenpuffer versetzt und für 2 min bei 95°C gekocht. Nach Zentrifugation bei 13000 x g für 1 min werden die Proben auf das Gel geladen. Als Laufpuffer wird 0,25 M Tris; 0,96 M Glycin und 1 % SDS verwendet.

2.4.6. Transfer von Proteinen (Western Blot)

Nach Auftrennung der Proteine mittels SDS – PAGE können Proteine mittels Western Blot auf eine PVDF – Membran (Immobilon P, Millipore, Eschborn) transferiert und somit immobilisiert werden. Die PVDF – Membran wird zuerst für 5 sec in 100 % Methanol angefeuchtet und dann für 2 min in H₂O gewässert. Danach wird die Membran in Transferpuffer (0,05 M Tris; 0,38 M Glycin; 0,05 % SDS; 20 % Methanol für Proteine > 60 kDa; 25 mM Tris; 0,19 M Glycin; 20 % Methanol für Proteine < 60 kDa) äquilibriert. Das Gel, die vorbehandelte Membran und 6 Whatmann 3MM Papiere werden in Transferpuffer äquilibriert und luftblasenfrei zwischen „Scotch pads“ eingeklemmt und in eine mit Puffer gefüllte Transferapparatur der Fa. Biorad eingehängt. Der Transfer erfolgte je nach Proteingröße für 1 – 2 h bei 80 Volt oder bei 35 Volt über Nacht.

2.4.7. Immunologischer Nachweis membrangebundener Proteine

Alle Schritte wurden auf einem HS 250 basic Schüttler der Fa. IKA, Stufen durchgeführt. Nach dem wie unter 2.4.6. beschriebenen Transfer wurden die Membranen für 1h in TBST (50 mM Tris/HCl pH 8; 150 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 0,02% Tween 20) mit 5% Rinderserumalbumin (BSA) oder Magermilchpulver inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Danach erfolgte die Inkubation mit den jeweiligen primären Antikörpern gegen das nachzuweisende Protein (anti-Thioredoxin Fa. Pharmingen 1:500 1% Milchpulver TBST; anti-xpress Fa. Invitrogen 1:500 1% Milchpulver TBST; anti-myc Fa.

Santa Cruz 1:250 1% Milchpulver TBST; anti-Tubulin Fa. NeoMarkers 1:1000 1% Milchpulver TBST; anti-eNOS Fa. Signaltransduction 1:500 1% Milchpulver TBST; anti-p21 Fa. Pharmingen 1:500 1% Milchpulver TBST alle über Nacht bei 4°C) zu den angegebenen Bedingungen. Nach dreimaligem Waschen mit TBST wurden die Membranen mit einem Peroxidase gekoppeltem sekundär Antikörper für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für 15 min mit TBST erfolgte der Nachweis mit dem kommerziell erworbenem ECL – System der Fa. Amersham, Freiburg. Nach Belichtung wurden die ECL-Filme der Fa. Amersham in einem Agfa Curix 60 entwickelt.

2.4.8. Immunfluoreszenzfärbung

Zum Nachweis der Lokalisation von Proteinen in Zellen wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt. Dazu wurden die Zellen für 15 min bei Raumtemperatur mit 4 % Paraformaldehyd (in PBS) fixiert. Nach Permeabilisierung und Blockierung von unspezifischen Bindungsstellen mit 0,3 % Triton X-100; 5 % Pferdeserum und 3 % BSA für 15 min bei Raumtemperatur wurden die Zellen mit den entsprechenden primären Antikörpern in den angegebenen Verdünnungen inkubiert (Maus anti-Xpress Fa. Invitrogen 1:50; Kaninchen anti-vWF Fa. Oncogene 1:50). Nach dreimaligem Waschen für 5 min wurden die Zellen mit einem sekundären Antikörper mit der gewünschten konjugierten Fluoreszenz inkubiert (Esel gegen Maus RhodamineRedX Fa. Jackson Immunoresearch 1:300; Esel gegen Kaninchen FITC Fa. Jackson Immunoresearch 1:100) Zur Färbung der Kerne wurde, wie unter 2.3.1. beschrieben, verfahren. Anschliessend wurden die Präparate mit Fluoromount Medium (Dianova) eingebettet. Die Visualisierung erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskop und digitaler Kamera der Fa. Zeiss (Axiovert M100; AxioCam; Axivision Software).

2.5. Methoden zum Nachweis der S-Nitrosylierung

2.5.1. Detektion der S-Nitrosylierung mittels Immunfluoreszenz

Zum Nachweis der S-Nitrosylierung mittels Immunfluoreszenz wurde ein kommerziell erhältliches Antiserum gegen Nitrosocysteine der Fa Alexis, Grünberg verwendet. Dieses Antiserum detektiert sämtliche intrazellulären Nitrosocysteine. Die Zellen wurden wie unter 2.4.8. beschrieben fixiert und mit 0,3 % Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit 0,8 % HgCl₂ in PBS für 30 min bei 37°C inkubiert, wobei alle 6 min die Lösung erneuert wurde. Zum Blockieren von unspezifischen Bindungen

wurden die Zellen mit 5% Pferdeserum und 3% BSA für 15 min inkubiert. Anschliessend wurden die Zellen mit anti-Nitrosocystein Antiserum (1:100 in PBS) für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit einem fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper (Ziege gegen Kanninchen–FITC Fa. Jackson Immunoresearch 1:100 in PBS) für 40 min bei 37°C. Nach Anfärben der Zellkerne wie unter 2.3.1. wurden die Färbungen in Mounting Medium (Fa Dianova, Hamburg) im Fluoreszenzmikroskop (Axiovert M 100, mit Digitalkamera AxioCam, sowie Axiovision Software Fa Zeiss, Göttingen) analysiert und dokumentiert.

2.5.2. Nachweis der S-Nitrosylierung in Zellextrakten mittels Saville – Griess Assay

Der Nachweis des Gesamtgehaltes an S-nitrosylierten Verbindungen in Zellen erfolgte mittels einem modifizierten Saville – Griess Assay. Die Zellen wurden in Griess Lysispuffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0; 150 mM NaCl; 5 mM KCl; 1% Nonidet –P40; 1 mM Phenylmethylsulfonyl Fluorid; 1 mM Bathocuproinedisulfonic acid; 1 mM Diethylenetriaminepenta-acetic acid; 10 mM N-ethylmaleimid) für 15 min auf Eis lysiert und danach bei 15000 x g für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Der Proteingehalt des Überstandes wurde wie unter 2.4.1. beschrieben bestimmt. 100 µg des Lysates wurde mit 1% Sulfanilamid und 0,1 % N-(1-naphthyl)-ethylenediamin in der An- oder Abwesenheit von 3,75 mM p-chloromercuribenzosulfonic acid oder 2,5 mM CuCl₂ für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Gehalt an S-nitrosylierten Verbindungen wurde photometrisch bei 540 nm bestimmt. Die Berechnung erfolgte anhand einer mit GSNO als Standard definierten Eichkurve.

2.5.3. Nachweis der S-Nitrosylierung immunpräzipitierter Proteine (DAN – Assay)

Zellen wurden wie unter 2.4.2. beschrieben lysiert und zentrifugiert. Danach wurden 500 µg Gesamtprotein mit dem jeweiligen Antikörper über Nacht bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Nach Inkubation der Proben mit 30 µl einer A/G Protein plus Agarose Lösung für mindestens 1 h bei 4°C auf dem Überkopfschüttler wurden die Proben bei 3500 rpm für 3 min bei 4°C zentrifugiert. Die Pellets wurden zweimal mit Lysispuffer und danach zweimal mit PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschen wurden die Pellets in 500 µl PBS resuspendiert und für 30 min lichtgeschützt bei Raumtemperatur mit 100 µM HgCl₂ und 100 µM 2,3-diamino-naphthalene (DAN – Reagenz) inkubiert und 100 mM NaOH zugegeben. Das gebildete fluoreszierende Triazol wurde bei einer Anregung von 375 nm und einer Emission von 450 nm in einem Fluorometer gemessen. Als Negativkontrolle wurde der jeweilige Antikörper alleine gemessen und das resultierende Fluoreszenzsignal als unspezifisches Signal abgezogen.

2.5.4. Nachweis der S-Nitrosylierung mittels Western Blot (*Biotin switch method*)

Zum Nachweis der S-Nitrosylierung mittels Western Blot wurden die Zellen in HENS Puffer (25 mM HEPES pH 7,7; 0,1 mM EDTA; 0,01 mM Neocuproine; 1% SDS) für 20 min lysiert und danach für 15 min bei 20000 x g bei 4°C zentrifugiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration (siehe 2.4.1.) wurden 800 µg Gesamtprotein für 20 min bei 50°C unter Schütteln mit 20 mM Methyl-Methanthiosulfat (MMTS) inkubiert. In diesem Schritt werden alle freien SH-Gruppen durch Methylierung maskiert. Überschüssiges MMTS wurde durch Acetonfällung (siehe 2.4.4.) aus den Lysaten entfernt. Nach Resuspendieren der Pellets in HENS Puffer wurden die Lysate mit 0,4 mM N-[6-(Biotinamido)hexyl]-3'-(2'-pyridyldithio)propionamide (Biotin-HPDP) und 1 mM Ascorbat für 1 h bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Bei dieser Reaktion wird spezifische die S-Nitrosylierung aufgelöst und Biotin-HPDP reagiert mit der entstandenen freien SH-Gruppe, so dass an der Stelle des Stickstoffmonoxid ein Biotinrest eingebaut wurde. Die Proben wurden dann wie unter 2.4.5 und 2.4.6. beschrieben auf einer SDS-Page aufgetrennt, wobei der Probenpuffer kein DTT enthielt, und auf eine PVDF-Membran transferiert, wobei sämtlich Schritte im Dunkeln durchgeführt wurden. Der Nachweis der S-nitrosylierten Proteine erfolgte dann mittels einem HRP-konjugiertem Streptavidin der Fa. Amersham, Freiburg nach Herstellerangaben.

2.6. In vitro Assays

2.6.1. In vitro S-Nitrosylierung von Proteinen

Für die S-Nitrosylierung in vitro wurden die Proteine oder Peptide für 1-2 h bei 37°C mit 100 µM PAPANONOate (NOC-15) der Fa. Alexis, Grünberg inkubiert. Diese Substanz ist ein NO[•] generierender NO-Donor mit einer Halbwertszeit von 74 min bei 37°C und pH 7,4. Um überschüssiges NOC-15 aus den Proben zu entfernen wurden die Proben in ein Centricon der Fa. Millipore, geladen und dreimal mit ausreichendem Volumen Puffer gewaschen.

2.6.3. Bestimmung freier SH-Gruppen mit DTNB

Die Bestimmung freier SH-Gruppen wurde mit einem Überschuß von 5,5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoat) (DTNB; 1 mM in Aceton) durchgeführt. Nach Titration mit einem Überschuß DTNB wurden die freien SH-Gruppen spektrophotometrisch bei 412 nm nachgewiesen. Die Berechnung erfolgte mit dem zugehörigen Extinktionskoeffizienten: 13600 M⁻¹ cm⁻¹ (Ellman, 1959).

2.6.4. Nachweis von TRX-Aktivität mittels NADPH-Oxidation im Zellextrakt

Nach Transfektion wurden die Zellen wie unter 2.5.2. beschrieben in Griess-Puffer lysiert. Zur Messung der TRX-Aktivität wurden 70 µl des Zell-Lysates mit 140 mU Thioredoxinreduktase und 450 nM NADPH inkubiert. Die NADPH Oxidation wurde mittels Photometer bei 340 nm über 2 min alle 30 Sekunden aufgezeichnet. Die TRX-Aktivität wurde nach Bestimmung des Proteingehaltes (siehe 2.4.1.) mit der folgenden Formel berechnet: $(OD_2 - OD_1) / (T_2 - T_1) / \text{mg Protein}$. OD= optische Dichte; T=Zeit in min

2.6.5. Nachweis der TRX-Aktivität mit aufgereinigtem Protein

Die Plasmide TRXwt, TRX (C32/35S) und TRX (C69S) wurden in den pcDNA4/His Vektor der Fa. Invitrogen kloniert. Dieser Vektor enthält zwischen dem Xpress-tag und der jeweiligen TRX Sequenz eine Aminosäureabfolge, die es ermöglicht mittels dem Enzym Enterokinase das Xpress-tag von dem Fusionsprotein abzuspalten. Die Plasmide TRXwt, TRX (C32/35S) und TRX (C69S) wurden in HEK 293 Zellen überexprimiert. Nach Lyse der Zellen mit RIPA-Puffer wurde eine Immunpräzipitation mit anti-Xpress Antikörper durchgeführt (siehe 2.4.3.). Die Immunpräzipitate wurden zweimal mit RIPA-Puffer und zweimal mit PBS gewaschen. Danach wurden die Präzipitate mit 2U Enterokinase der Fa. Invitrogen für 16 h bei 37°C inkubiert. Die Enterokinase wurde mittels EK-away-resin der Fa. Invitrogen nach Herstellerangaben entfernt. Der Überstand, der aufgereinigtes TRXwt bzw. TRX (C32/35S) oder TRX (C69S) enthielt, wurde dann für 2 h mit 100 µM NOC-15 bei 37°C inkubiert. Um überschüssiges NOC-15 aus den Proben zu entfernen wurden die Proben in ein Centricon der Fa. Millipore geladen und dreimal mit ausreichendem Volumen Puffer gewaschen.

Überschüssiges NOC-15 wurde mittels Centricon entfernt.

Die TRX-Aktivität wurde dann wie unter 2.6.4. beschrieben gemessen. Um den Gehalt an aufgereinigtem Protein zu bestimmen, wurden 70 µl des Assay-Gemisches für den Immunoblot mit anti TRX Antikörper verwendet. Die Blots wurden densitometrisch analysiert und die TRX-Aktivität pro densitometrischem Unit berechnet.

2.6.6. Bestimmung des intrazellulären GSH Spiegels

Nach der Inkubation mit 10 µM Butyl-N-sulfoximine (BSO) für 18 h wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und dann mit 800 µl 1% Sulfosalicylsäure überschichtet und für 2 min bei -80°C schockgefroren. Die resultierenden Lysate wurden bei 15.000 x g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde sofort mit Tris-EDTA Puffer (20 mM Tris-HCl pH 7,4; 1 mM EDTA) und Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) (DTNB) bei Raumtemperatur für 10

min inkubiert. Die optische Dichte der Proben wurde bei 412 nm photometrisch bestimmt. Die Pellets wurden in Lysispuffer (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,32 M Sucrose; 5 mM EDTA; 1% Triton, 1mM Phenylmethylsulfonyl Fluoride) für 30 min auf Eis lysiert und danach 10 min bei 15.000 xg zentrifugiert. Die Proteinkonzentration der Probe wurde bestimmt (siehe 2.4.1.) und der GSH-Spiegel pro mg Protein berechnet.

2.6.7. Gelfiltration mit Sephadex G25

Zellen wurden mit Griess-Puffer lysiert und die Proteinkonzentration bestimmt. In eine 1 ml Insulinspritze wurde über eine ca 5 mm dicke Glaswolle-Schicht 1 ml Sephadex G-25 Säule (50:50 Vol.) gepackt. Diese Säule wurde dann mit Griess-Puffer äquilibriert und mit 500 µg Zellextrakt beladen. Protein S-NO mit einem Molekulargewicht > 5 kDa wurde von S-NO Verbindungen mit einem Molekulargewicht < 5 kDa durch entsalzen mit 150 mM NaCl getrennt. Der Gehalt an S-nitrosylierten Verbindungen wurde mittels Saville-Griess Assay (2.5.2.) bestimmt.

2.6.8. Bestimmung der Caspase-3 ähnlichen Aktivität in Zellextrakten

Die Zellen wurden in 10 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,32 M Sucrose; 1 % Triton X-100, 2 mM DTT, 5 mM EDTA; 1 mM PMSF; 1 µg/ml Aprotinin; 1 µg/ml Leupeptin für 15 min auf Eis lysiert und bei 15.000 xg für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Caspase-3 ähnliche Aktivität wurde in einem Assaypuffer (50 mM HEPES pH 7,5; 10% Sucrose; 100 mM NaCl; 0,1 % Chaps; 2 mM DTT; 1 mM PMSF; 10 µg/ml Aprotinin; 10 µg/ml Leupeptin) in den erhaltenen Überständen durch proteolytische Spaltung des fluorogenen Substrates 7-Amino-4-Coumarin (AMC)-DEVD im Fluorometer mit einer Anregung von 380 nm und einer Emission von 460 nm gemessen. Der Proteingehalt der Proben wurde bestimmt und die Aktivität als relative Fluoreszenzintensität x mg Protein⁻¹ x min⁻¹ berechnet.

2.7. Detektion von reaktiven Sauerstoffspezies

Lebende Zellen wurden zur Aufnahme des Detektionsreagenz mit 20 µM 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetat (H₂DCF-DA) für 30 min inkubiert (Molecular Probes). Danach wurden die Zellen mittels Trypsinverdau abgelöst. Die Reaktion wurde mit 10% FCS in PBS gestoppt, die Zellen bei 800 x g für 10 min sedimentiert. Nach entfernen des Überstandes wurden die Zellen in PBS resuspendiert und mittels FACS-Analyse gemessen.

2.8. Detektion der S-Nitrosylierung eines synthetischen Peptides mittels FPLC

Die Detektion der S-Nitrosylierung des synthetischen Peptides erfolgte mittels einer FPLC Äkta Explorer der Fa. Amersham, Freiburg unter folgenden Bedingungen:

Säule:	SOURCE 5 RPC ST 4.6/150
Wellenlänge 1:	280 nm
Wellenlänge 2:	215 nm
Puffer A:	10 mM Ammoniumacetat in 2% Acetonitril pH 7,0
Puffer B:	70% Acetonitril
Start Konz:	0,0 (%B)
Flußrate:	1,00 (ml/min)
Äquilibrierung:	5 Säulenvolumen (CV) Puffer A
Empty loop:	5 ml
Waschen der Säule:	1 CV
Elutionsgradient:	0-100 % Puffer B

3. Ergebnisse

3.1. Nachweis der S-Nitrosylierung

Zum Nachweis der S-Nitrosylierung von intrazellulären Proteinen mussten zuerst einige Methoden etabliert werden, die im Folgenden näher erläutert werden.

3.1.1. Nachweis der S-Nitrosylierung mittels Immunfluoreszenzfärbung

Der erste Nachweis der S-Nitrosylierung erfolgte mittels Immunfluoreszenzfärbung von HUVEC (siehe 2.5.1.). Bei dieser Methode wurde ein anti-S-Nitrosocystein Antiserum verwendet. Dieses Antiserum wurde durch Immunisierung von Kaninchen mit S-nitrosyliertem Rinderserumalbumin gewonnen und erkennt intrazelluläres S-nitrosyliertes Cystein als Epitop. Durch Inkubation mit einem FITC-konjugiertem anti-Kaninchen Antikörper wurde die Färbung visualisiert (siehe Abb. 6).

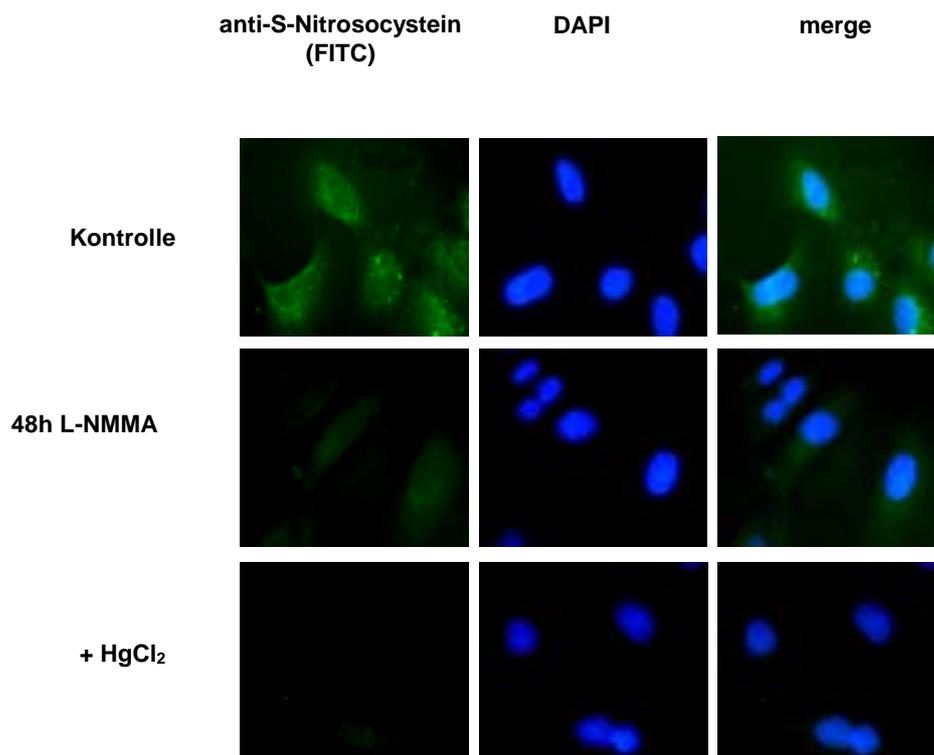


Abbildung 6 : Nachweis der S-Nitrosylierung mittels Immunfluoreszenzfärbung

HUVEC wurden basal, oder mit 1 mM L-NMMA für 18 h behandelt und wie unter 2.5.1. beschrieben fixiert und mit einem anti S-Nitrosocystein Antiserum immunfluoreszenzgefärbt. Die linke Spalte zeigt die Färbung von S-nitrosylierten Proteinen, die durch FITC-konjugierten Sekundärantikörper sichtbar gemacht wurde. Die mittlere Spalte zeigt die Färbung der Kerne mittels DAPI und die rechte Spalte den merge der beiden vorherigen. Als Negativkontrolle wurden die Zellen nach Fixierung für 30 min bei 37°C mit 0,8 % HgCl₂ inkubiert. Ein repräsentatives Bild ist gezeigt.

Als Negativkontrolle wurden die fixierten Zellen für 30 min mit 0,8 % HgCl_2 in PBS bei 37°C inkubiert. Zweiwertige Nebengruppenmetalle wie z.B. Quecksilber führen spezifisch zu einer Dissoziation der S-Nitrosylierung, wodurch NO vom Cystein abgespalten wird. Wie in Abb. 6 zu erkennen, kommt es durch Inkubation mit Quecksilberchlorid zu einem vollständigen Verlust des Fluoreszenzsignales. Weiterhin konnte die Spezifität der Färbung durch Inkubation mit dem NO-Synthase Inhibitor L-NMMA bestätigt werden. Inkubation von HUVEC mit 1 mM L-NMMA für 48 h bewirkte eine deutliche Reduktion der Fluoreszenzintensität, d.h. Inhibitor der NO-Synthase für 48 h führt zu einer Reduktion an S-nitrosylierten Verbindungen. In sämtlichen Versuchen, bei denen L-NMMA für 48 h eingesetzt wurde erfolgte die Gabe einer 2. Dosis L-NMMA nach 24 h.

3.1.2. Nachweis der S-Nitrosylierung mittels Saville-Griess Assay

Um den Gehalt an S-nitrosylierten Verbindungen in Zellen quantifizieren zu können wurde ein modifizierter Saville-Griess Assay eingesetzt. Bei diesem modifizierten Assay werden zunächst wie unter 2.5.2. beschrieben Zellextrakte hergestellt. Diese Zellextrakte wurden dann in Anwesenheit oder Abwesenheit von Kupferchlorid (CuCl_2) oder p-Chloromercuribenzosulfonic acid (PCMBS) mit Sulfanilamid und N-(1-naphthyl)-ethylenediamine für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Hierbei kommt es wiederum durch das zweiwertige Nebengruppenmetall zu einer spezifischen Freisetzung von NO aus den S-nitrosylierten Molekülen. Dieses freigesetzte NO reagiert dann in wässriger Lösung zu NO_x , das dann mit Sulfanilamid und N-(1-naphthyl)ethylenediamine zu einem Diazofarbstoff reagiert. Dieser Farbumschlag lässt sich bei 540 nm photometrisch bestimmen und quantifizieren. Die optische Dichte der Probe ohne CuCl_2 bzw. PCMBS wurde jeweils als Background der Messung abgezogen, da sie den in der Probe enthaltenen basalen Anteil an NO_x repräsentiert. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe einer Eichkurve, die mit reinem GSNO als Standard erstellt wurde. Wie in Abbildung 7 zu sehen liegt der Gehalt an S-nitrosylierten Verbindungen in HUVEC basal bei $20,12 \pm 1,59$ nmol/mg Protein. Dies kann durch Inhibition der NO-Synthase mit L-NMMA erst nach 48 h signifikant reduziert werden. Nach 18 h hingegen war kein Effekt auf die S-Nitrosylierung in HUVEC zu ermitteln. Dies

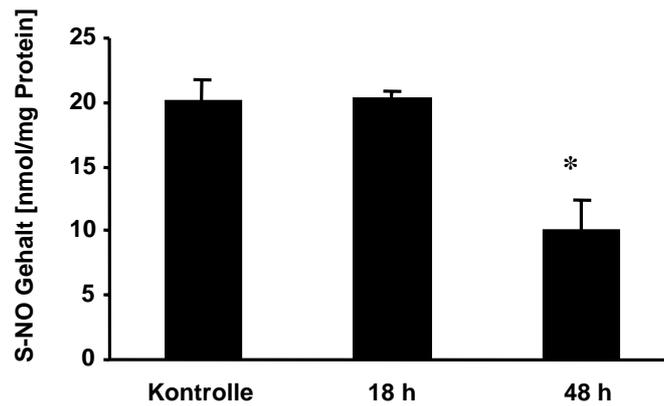


Abbildung 7 : Nachweis der S-Nitrosylierung mittels Saville-Griess Assay

HUVEC wurden für die angegebenen Zeiträume mit 1 mM L-NMMA inkubiert und der S-NO Gehalt, wie unter 2.5.2. beschrieben, mittels Saville-Griess Assay quantifiziert. Die Mittelwerte wurden bestimmt \pm S.E.M. * $p < 0,01$ $n=4$.

zeigt, dass S-Nitrosylierung unter physiologischen Bedingungen in HUVEC sehr stabil ist und eine Halbwertszeit > 18 h besitzt. Mittels des modifizierten Saville-Griess Assays lässt sich spezifisch der Gehalt an S-nitrosylierten Verbindungen in Zellextrakten bestimmen.

3.1.3. Nachweis der S-Nitrosylierung mit Hilfe des DAN - Assay

Wie unter 3.1.2. beschrieben lässt sich mittels des Saville-Griess Assays der Gehalt an S-nitrosylierten Verbindungen nachweisen. Um nun die S-Nitrosylierung eines spezifischen Proteins nachzuweisen, wurde der unter 2.5.3. beschriebene DAN-Assay verwendet. Hierbei wurden zuerst die gewünschten Zielproteine mit Hilfe der entsprechenden Antikörper immunpräzipitiert (siehe 2.4.3.) Nach Immunpräzipitation wurde der an Agarose Beads gekoppelte Antikörper-Protein-Komplex in PBS resuspendiert. Dies ist notwendig, da SDS und andere im Lysispuffer enthaltene Substanzen mit den nachfolgenden Reaktionen interferieren. Durch die Zugabe von 100 μ M HgCl_2 wird spezifisch NO aus der S-NO Verbindung freigesetzt, welches dann nach Zugabe von 100 μ M 2,3-Diamino-Naphthalen (DAN – Reagenz) zu einem fluoreszierenden Triazol reagiert. Dieses Triazol wird dann mit einer Anregung von 375 nm und mit einer Emission von 450 nm in einem Fluorometer nachgewiesen. Wie in Abbildung 8 gezeigt, wurde diese Methode mit einem bekannten Zielprotein für S-Nitrosylierung der katalytischen Untereinheit p17 der Caspase-3 durchgeführt. Basal zeigt sich eine S-Nitrosylierung von p17wt durch die endogene NO-Synthase. Durch Cotransfektion mit einem konstitutiv aktiven eNOS - Konstrukt (eNOS

S1177D), das eine vermehrte NO-Freisetzung bewirkt (Dimmeler et al., 1999a), kann die S-Nitrosylierung signifikant erhöht werden.

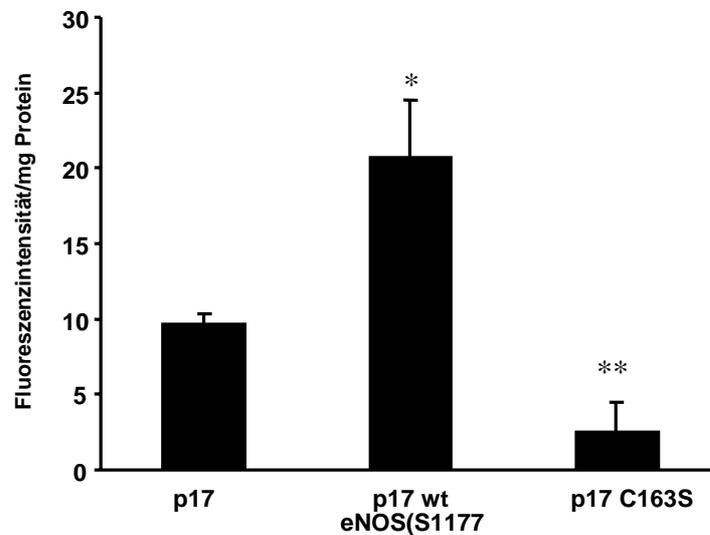


Abbildung 8 : Nachweis der S-Nitrosylierung mittels DAN-Assay

HUVEC wurden wie unter 2.2.1. beschrieben mit p17wt/lacZ cotransfiziert bzw. mit p17wt/eNOS(S1177D) oder mit p17 C163S/lacZ cotransfiziert und die S-Nitrosylierung 18 h nach Transfektion, wie unter 2.5.3. beschrieben, mittels DAN-Assay bestimmt. Die Mittelwerte wurden bestimmt \pm S.E.M., * $p < 0,05$, $n = 3-4$ gegen Kontrolle; ** $p < 0,01$, $n = 4$ gegen Kontrolle.

Die katalytische Untereinheit wird an dem Cystein 163 S-nitrosyliert. Durch Austausch der Aminosäure Cystein gegen Serin ist diese Stelle nicht mehr für eine S-Nitrosylierung zugänglich. Die Aminosäure Serin ist von der Struktur ähnlich aufgebaut wie das Cystein, jedoch befindet sich an der Stelle der SH-Gruppe für die S-Nitrosylierung bei dem Serin eine OH-Gruppe, so dass keine S-Nitrosylierung mehr stattfinden kann. Der Austausch des Cysteins 163 zu Serin bewirkte eine signifikante Reduktion des Fluoreszenzsignales. Diese Daten zeigen, dass sich mittels des DAN-Assays die S-Nitrosylierung eines spezifischen Zielproteins nachweisen lässt.

3.1.4. Detektion der S-Nitrosylierung mit Hilfe des Western-Blots (*Biotin switch method*)

Die Detektion der S-Nitrosylierung mit Hilfe des Western-Blots (*Biotin switch method*) besitzt im Vergleich zu den oben beschriebenen Methoden den Vorteil, dass eine Vielzahl an Proteinen gleichzeitig auf ihre S-Nitrosylierung untersucht werden kann. Das in der Immunfluoreszenz verwendete Antiserum kann nicht im Western-Blot verwendet werden, da die S-Nitrosylierung während der SDS-Gelelektrophorese nicht stabil ist. Diese von Jaffrey et

al publizierte Methode benötigt einige chemische Modifikation der Proteine im Zellextrakt, die im Folgenden kurz erläutert werden sollen.

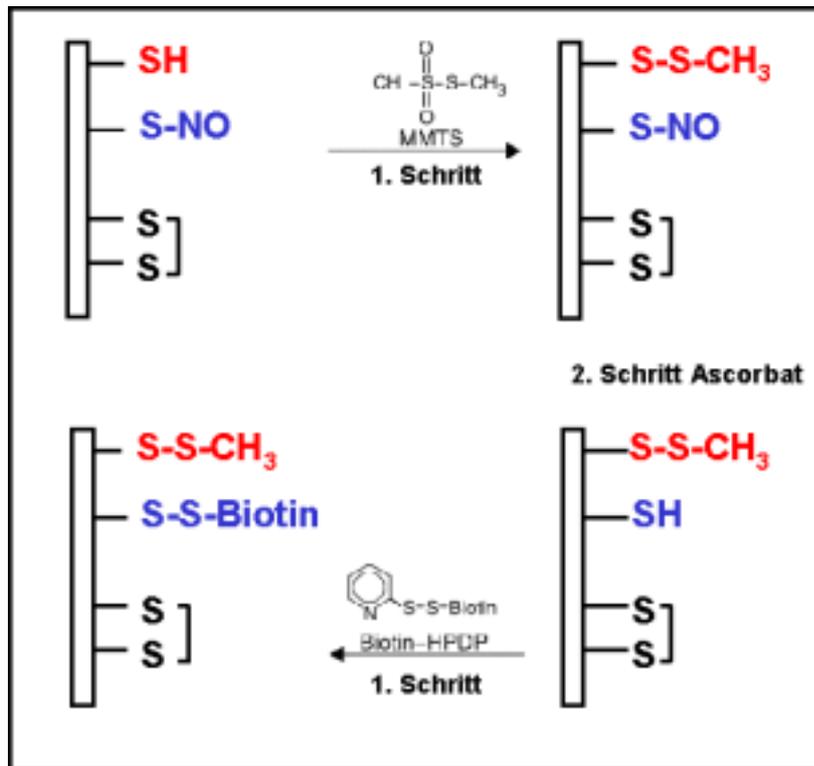


Abbildung 9 : Schematische Darstellung der *Biotin switch method* für die Detektion der S-Nitrosylierung mittels Western-Blot.

In einem ersten Schritt müssen sämtliche im Zellextrakt enthaltenen freien SH-Gruppen durch eine Methylierungsreaktion maskiert werden. Zu diesem Zweck werden die Proben mit 20 mM Methyl-Methanthiosulfat (MMTS) unter Schütteln bei 55°C für 20 min. inkubiert. Bei diesem Schritt ersetzt eine Methylgruppe (CH₃) den Wasserstoff der SH-Gruppe (siehe Abb. 9). Überschüssiges MMTS wird dann durch Acetonfällung der Proteine aus dem Extrakt entfernt (2.4.4.). In einem zweiten Schritt wird durch Inkubation der Extrakte mit 1 mM Ascorbat das NO der S-NO Gruppe durch ein Wasserstoffatom ersetzt, wodurch eine freie SH-Gruppe an der Stelle der S-Nitrosylierung entsteht. Diese reagiert dann mit dem Thiol spezifischen Reagenz N-[6-(Biotinamido)hexyl]-3'-(2'-pyridyldithio)propionamid (Biotin-HPDP), das in einer finalen Konzentration von 400 µM zugesetzt wird (siehe Abb.10 a). Nach diesen Modifikationen werden die Proben dann unter nicht reduzierenden Bedingungen (siehe 2.5.4.) auf einer SDS-Page aufgetrennt und mittels Western-Blot auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Da das Biotin-HPDP Reagenz mit einem Biotinrest konjugiert ist, können nun die S-nitrosylierten Proteine mittels HRP-konjugiertem Streptavidin und dem ECL-Reagenz nachgewiesen werden. Zur Etablierung und

Verifizierung dieser Methode wurden verschiedene Kontrollen mit Zellextrakten von HUVEC durchgeführt.

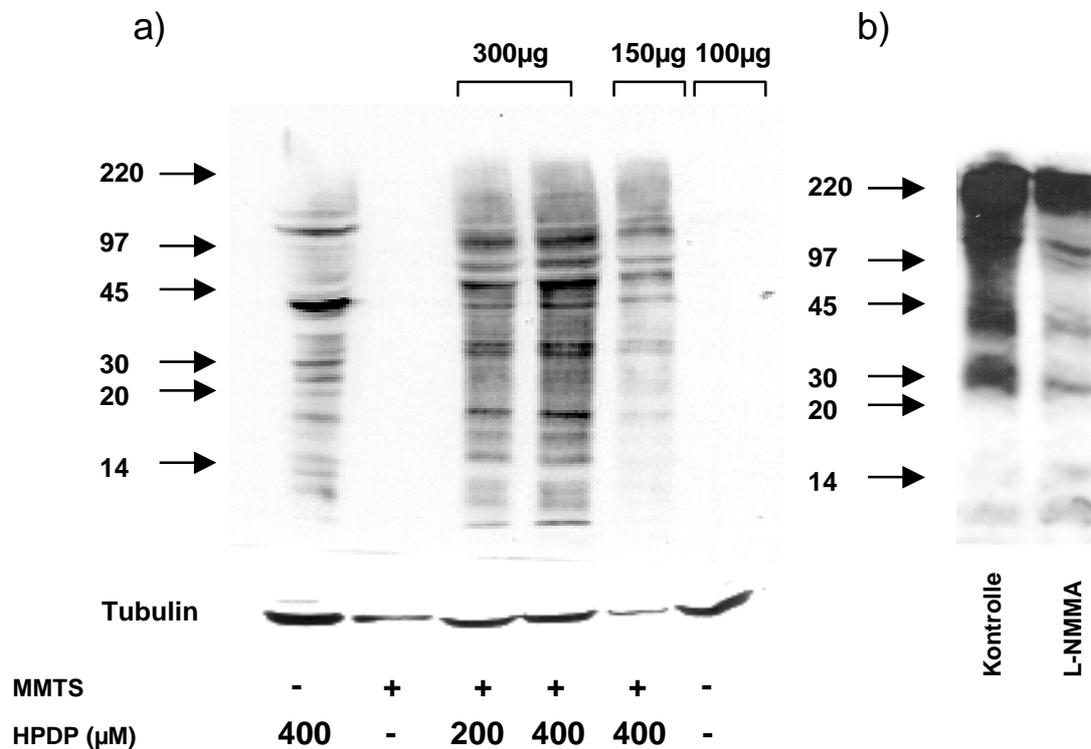


Abbildung 10 : Detektion der S-Nitrosylierung mittels der *biotin switch method*

- a) HUVEC wurden wie unter 2.5.4. beschrieben lysiert und aufgearbeitet. In Spur eins wurde die Methode ohne MMTS-Inkubation durchgeführt und in Spur 2 ohne Biotin-HPDP (HPDP). Die verwendeten Konzentrationen von Biotin-HPDP sind zu den anderen Spuren angegeben. Die Detektion erfolgte mit HRP-konjugiertem Streptavidin und dem ECL-System (siehe 2.4.7.). Ein repräsentativer Blot ist gezeigt.
- b) HUVEC wurden basal oder nach 48 h Inkubation mit 1 mM L-NMMA lysiert und aufgearbeitet. Die Detektion mittels *biotin switch method* erfolgte wie unter 2.5.4. beschrieben. Ein repräsentativer Blot ist gezeigt (n=3).

In der ersten Spur des Western-Blots in Abbildung 10 a wurde die Methode ohne das methylierende Reagenz MMTS durchgeführt. Dies führte zu einem unspezifischen Bandenmuster auf Grund der Bindung von Biotin-HPDP an sämtliche freie SH-Gruppen. Im Vergleich zu den anderen Spuren mit MMTS Inkubation, ist daher ein deutlich unterschiedliches Bandenmuster zu erkennen (Abb. 10 a, erste Spur gegen die Spuren drei, vier und fünf). Die Spezifität des Biotin-HPDP-Reagenz ist in der zweiten Spur verdeutlicht, da es ohne Inkubation dieses Reagenz nicht zu einem Signal kommt. Weiterhin besitzt das HRP-konjugierte Streptavidin keine sichtbare unspezifische Bindung auf Zellextrakt (Spur sechs). Zur Optimierung der Methode wurden unterschiedliche Mengen an Zellextrakt und

zwei Konzentrationen des Biotin-HPDP-Reagenz eingesetzt. Die Spuren drei, vier und fünf zeigen, dass die optimalen Bedingungen für einen spezifischen Nachweis der S-Nitrosylierung mittels der *biotin switch method* bei Verwendung von 300 µg Zellextrakt und einer finalen Konzentration von 400 µM Biotin-HPDP vorliegen (Abb. 10 a). Zur Überprüfung der Methode wurden HUVEC für 48 h mit 1 mM L-NMMA inkubiert und die S-Nitrosylierung mittels *biotin switch method* im Vergleich zu unbehandelten Zellen detektiert. Es zeigte sich eine deutliche Reduktion der Anzahl an S-nitrosylierten Proteinen, da die ECL-Signale schwächer waren (Abb. 10 b). Diese Daten machen deutlich, dass mittels der *biotin switch method* S-Nitrosylierung im Western-Blot nachgewiesen werden kann.

3.1.5. Identifizierung der S-nitrosylierten Moleküle in Endothelzellen

Das niedermolekulare Thiol Glutathion ist ein Tripeptid bestehend aus den Aminosäuren L-Glutaminsäure – Cystein – Glycin und wird als ein wichtiger Faktor für die Regulation des intrazellulären Redoxstatus angesehen (Andreoli et al., 1986; Suttorp et al., 1991), weil es ein reaktives Cystein besitzt. GSH kann S-nitrosyliert werden und führt somit zur Bildung von GSNO (Jia et al., 1996; Kashiba et al., 1999). Daher sollte die Bedeutung von GSH für die S-Nitrosylierung und der Anteil von GSNO am Gesamtgehalt der S-nitrosylierten Moleküle in Endothelzellen untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde ein Inhibitor für die de novo

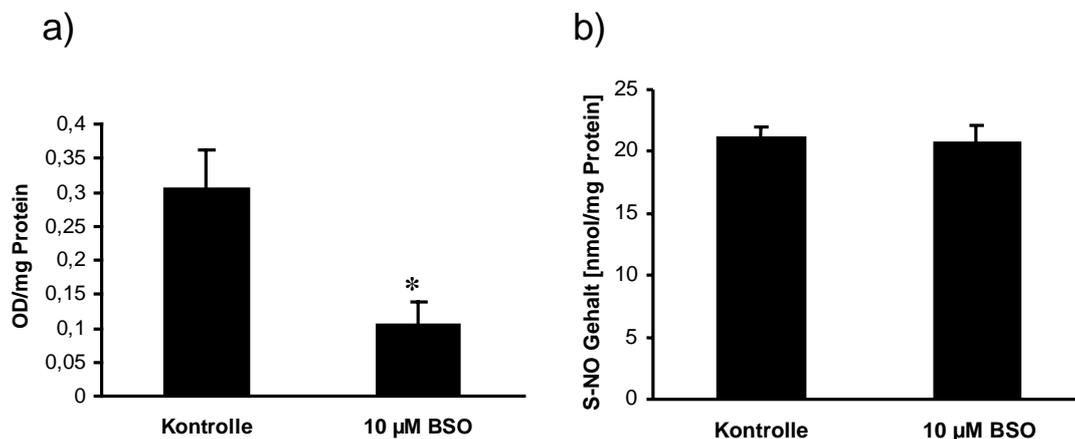


Abbildung 11: Bedeutung von GSH für die S-Nitrosylierung in Endothelzellen

a) HUVEC wurden mit 10 µM BSO für 18 h inkubiert und der GSH Spiegel bestimmt (siehe 2.6.6.). Die Mittelwerte wurden bestimmt ± S.E.M. *p<0,01 n=3-4 gegen Kontrolle.

b) HUVEC wurden mit 10 µM BSO für 18 h inkubiert und der S-NO Gehalt mittels Saville-Griess Assay bestimmt (siehe 2.5.2.). Die Mittelwerte wurden bestimmt ± S.E.M. n=3-4.

Synthese des GSH, Butyl-N-sulfoximine (BSO), eingesetzt. HUVEC wurden für 18 h mit 10 µM BSO inkubiert und danach die intrazellulären GSH Spiegel wie unter 2.6.6. beschrieben

bestimmt. Inkubation von HUVEC mit BSO für die angegebenen Zeiträume führte zu einer Reduktion des GSH Spiegels auf $36,45\% \pm 16,3\%$ des Normalwertes (siehe Abb. 11 a)). Um zu untersuchen, ob GSH bzw. GSNO einen wesentlichen Einfluss auf den Gesamtgehalt an S-Nitrosylierung in Endothelzellen besitzen, wurde die de novo Synthese von GSH mit dem Inhibitor BSO blockiert und der Gehalt an S-Nitrosylierung quantifiziert. Der Gehalt an S-nitrosylierten Verbindungen in Zellextrakten wurde mittels des Saville-Griess Assays bestimmt (2.5.2.). Wie in Abb. 11 b) zu erkennen, führte die Inhibition der GSH de novo Synthese mit BSO und somit die Senkung des GSH-Spiegels in Endothelzellen nicht zu einer Reduktion der S-nitrosylierten Verbindungen. Dieser erste Hinweis darauf, dass GSH bzw. GSNO quantitativ keine große Bedeutung für den Gesamtgehalt an S-nitrosylierten Verbindungen in Endothelzellen besitzen, sollte im Folgenden durch Gelfiltration weiter untersucht werden. Für die Gelfiltration wurde wie unter 2.6.7. beschrieben eine Sephadex G25 – Säule hergestellt, mit Hilfe derer man Verbindungen mit einem Molekulargewicht von kleiner als 5 kDa von Verbindungen mit höherem Molekulargewicht trennen kann. Zu diesem Zweck wurden Zellextrakte von HUVEC auf Sephadex G25 Säulen geladen und mit einem Puffer mit niedriger Salzkonzentration eluiert.

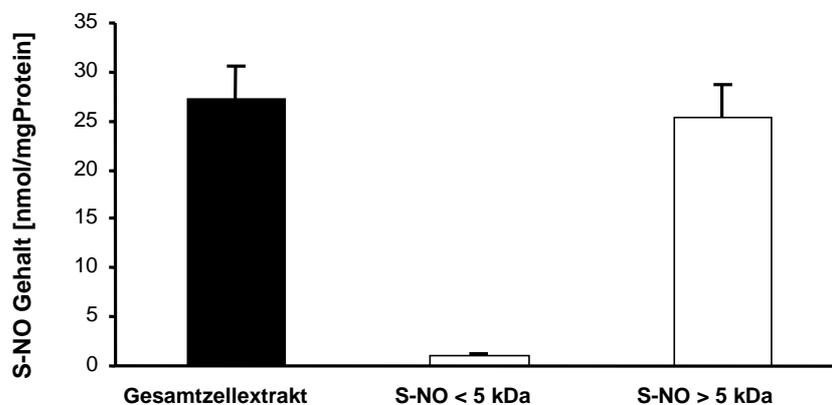


Abbildung 12: Identifizierung der S-nitrosylierten Moleküle in Endothelzellen

HUVEC wurden wie unter 2.5.2. beschrieben lysiert und die Zellextrakte über Sephadex G25 Säulen aufgetrennt (siehe 2.6.7.) und der S-NO Gehalt mittels Saville-Griess Assay bestimmt (siehe 2.5.2.). Die Mittelwerte wurden bestimmt \pm S.E.M. n=3.

Das erhaltene Eluat enthielt die Verbindungen mit einem Molekulargewicht < 5 kDa und wurde auf seinen Gehalt an S-nitrosylierten Verbindungen untersucht. Nachfolgend wurde mit einem Puffer mit hohen Salzkonzentrationen die restlichen Verbindungen mit einem Molekulargewicht > 5 kDa eluiert und mittels Saville-Griess Assay der Gehalt an S-nitrosylierten Verbindungen quantifiziert. Abbildung 12 zeigt, dass weniger als 5 % der

S-nitrosylierten Verbindungen ein Molekulargewicht von < 5 kDa besitzen und über 95 % der S-nitrosylierten Verbindungen größer als 5 kDa sind.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass GSNO einen sehr geringen Anteil, wohingegen Proteine den größten Anteil an S-nitrosylierten Molekülen in Endothelzellen ausmachen.

3.2. Einfluss von laminarer Schubspannung auf die S-Nitrosylierung

Der wichtigste physiologische Stimulus zur Bildung von NO durch die eNOS ist die laminare Schubspannung (Busse and Fleming, 1998). Es ist bekannt, dass in HUVEC durch Applikation von laminarer Schubspannung für 24 h (siehe 2.2.4.) die eNOS mRNA Expression 2-3 fach erhöht wird (Uematsu et al., 1995). Zusätzlich wird über den PI-3 Kinase Signaltransduktionsweg die eNOS durch Applikation von laminarer Schubspannung verstärkt phosphoryliert und es kommt somit zu einer verstärkten Bildung von NO (Dimmeler et al., 1999a).

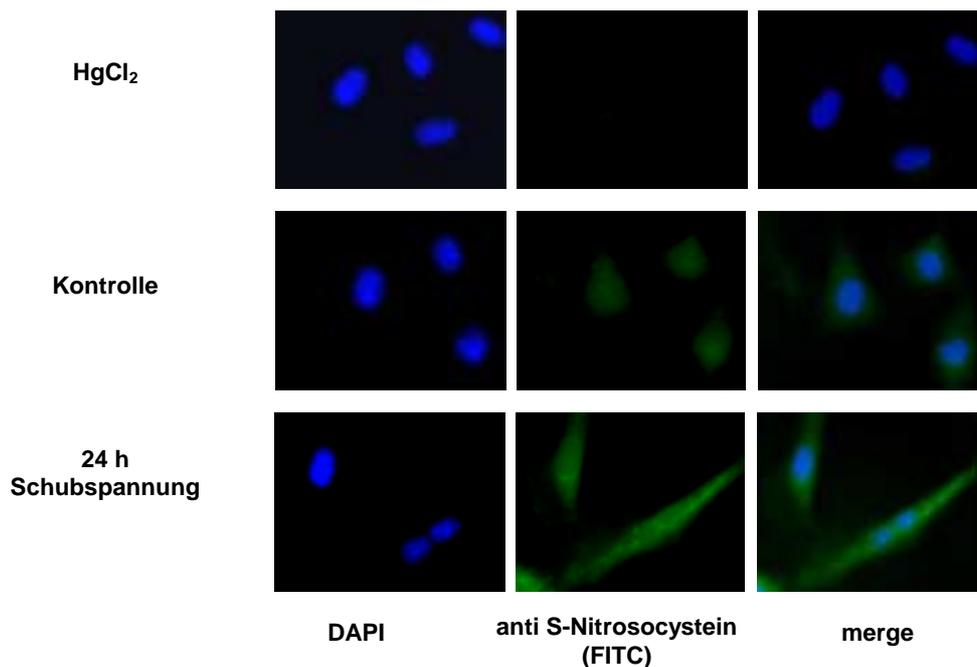


Abbildung 13: Einfluss der laminaren Schubspannung auf die S-Nitrosylierung in Endothelzellen

HUVEC wurden wie unter 2.2.4. beschrieben der laminaren Schubspannung für 24h exponiert und die S-Nitrosylierung mittels Immunfluoreszenzfärbung detektiert (2.5.1.). Die linke Spalte zeigt die Färbung der Kerne mittels DAPI. Die mittlere Spalte zeigt die Färbung von S-nitrosylierten Proteinen, visualisiert mit einem FITC-konjugierten Sekundäntikörper. Die rechte Spalte zeigt den merge der beiden Fluoreszenzfärbungen. Als Negativkontrolle wurden die Zellen nach Fixierung für 30 min bei 37°C mit 0,8 % HgCl₂ inkubiert. Eine repräsentative Aufnahme ist gezeigt.

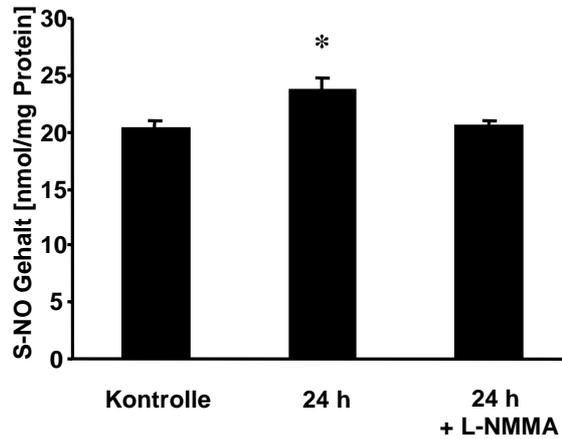


Abbildung 14: Laminare Schubspannung erhöht den Gesamtgehalt an S-Nitrosylierung in Endothelzellen

HUVEC wurden für die angegebenen Zeitpunkte laminarer Schubspannung ausgesetzt (2.2.4.) und mit 1 mM L-NMMA inkubiert und der S-NO Gehalt mittels Saville-Griess Assay bestimmt (2.5.2.). Die Mittelwerte wurden bestimmt \pm S.E.M. * $P < 0,05$, $n=3$ gegen Kontrolle.

Aus diesem Grund wurde der Effekt von laminarer Schubspannung auf die S-Nitrosylierung in HUVEC untersucht. In einem ersten Ansatz wurden HUVEC für 24 h laminarer Schubspannung ausgesetzt, fixiert und die S-Nitrosylierung mit Hilfe der Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen (2.5.1.). Die Exposition von HUVEC mit laminarer Schubspannung für 24 h resultierte in einem deutlichen Anstieg der Fluoreszenzintensität (siehe Abb. 13), d.h. Exposition mit laminarer Schubspannung für 24 h führt zur Erhöhung von S-nitrosylierten Verbindungen. Um den Effekt der laminaren Schubspannung auf den S-NO Gehalt in Endothelzellen zu quantifizieren, wurde der Saville-Griess Assay durchgeführt. Wie in Abb. 14 zu sehen, kommt es zu einer signifikanten Erhöhung des Gehaltes an S-nitrosylierten Proteinen von $20,34 \pm 0,69$ nmol/mg Protein auf $23,73 \pm 0,99$ nmol/mg Protein im Vergleich zu statischen Kontrollen. Dieser Effekt der laminaren Schubspannung ist abhängig von der NO-Synthese, da durch gleichzeitige Inkubation mit dem NOS – Inhibitor L-NMMA der Anstieg der S-Nitrosylierung komplett aufgehoben wurde. Untersuchungen an einem spezifischen, bekannten Zielprotein für S-Nitrosylierung, der katalytischen Untereinheit p17 der Caspase-3, die in HUVEC überexprimiert wurde, ergaben, dass im DAN-Assay das Fluoreszenzsignal signifikant erhöht war im Vergleich zu statischen Kontrollen ($9,73 \pm 0,63$ vs. $15,85 \pm 2,45$ (Abb. 15)). Diese Daten zeigen, dass laminare Schubspannung zur Erhöhung des Gesamtgehaltes von S-nitrosylierten

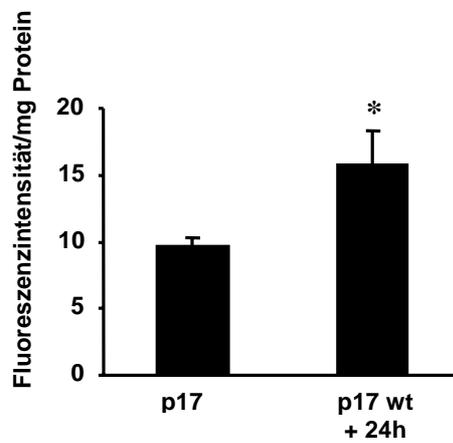


Abbildung 15: Laminare Schubspannung erhöht die S-Nitrosylierung von p17wt in HUVEC

HUVEC wurden mit p17wt transfiziert und für die angegebenen Zeitpunkte laminarer Schubspannung ausgesetzt (2.2.4.) und die S-Nitrosylierung von p17wt mittels DAN-Assay bestimmt (2.5.3.) Die Mittelwerte wurden bestimmt \pm S.E.M., * $p < 0,05$ $n=4$ gegen Kontrolle. Verbindungen und zu einer verstärkten S-Nitrosylierung von spezifischen Zielproteinen führt.

3.3. Einfluss von Zellalterung auf die S-Nitrosylierung in Endothelzellen

In dem vorangegangenen Kapitel wurde ein physiologischer Mechanismus beschrieben, der über einen Langzeiteffekt zu einer Erhöhung des Gehaltes an S-nitrosylierten Verbindungen in Endothelzellen führt. Um zu untersuchen, ob die Reduktion der NO-Synthese unter physiologischen Bedingungen die S-Nitrosylierung beeinträchtigt, wurden Versuche an alternden Endothelzellen durchgeführt. Hintergrund für diesen experimentellen Ansatz sind Daten, die auf eine Reduktion der NO-Freisetzung im Alter hinweisen (Lüscher and Noll, 1995; Tschudi et al., 1996; Zeiher et al., 1993). Daher sollte untersucht werden, ob die Zellalterung von Endothelzellen einen Einfluss auf den Gehalt an S-Nitrosylierung hat.

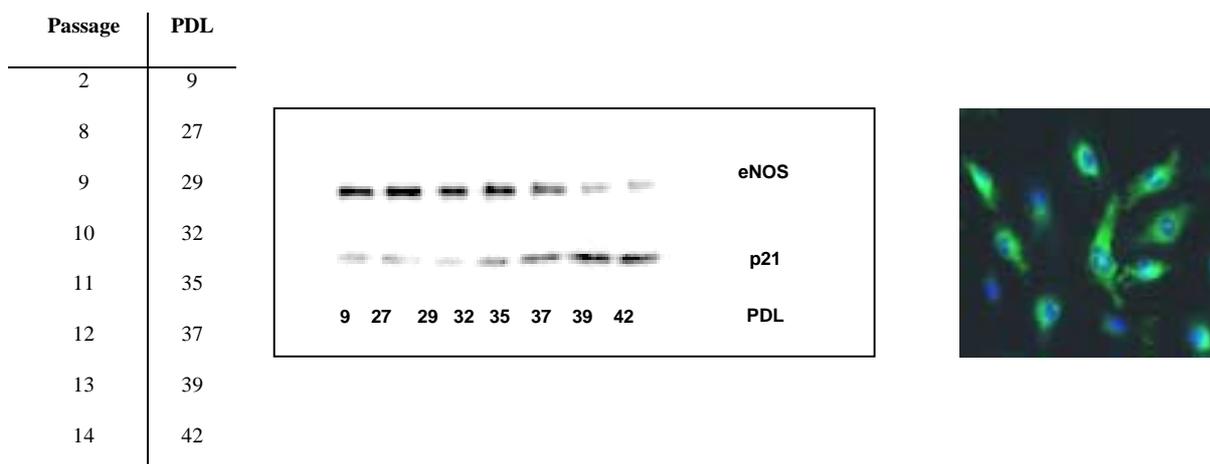


Abbildung 16: Expression der eNOS und von p21 in alternden HUVEC

HUVEC wurden für die angegebenen Zeiträume kultiviert und die Expression der eNOS und von p21 mittels Western Blot untersucht (2.4.7.) Ein repräsentativer Blot ist gezeigt ($n=4$). HUVEC mit der PDL 42 wurden auf Expression des von Willebrand Faktor mit Immunfluoreszenzfärbung untersucht (2.4.8.). Ein repräsentatives Bild ist gezeigt.

Als Modellsystem wurden HUVEC bis zur Passage 15 kultiviert und die „population doublings“ (PDL) berechnet. In Abbildung 16 ist eine Tabelle der PDL zur jeweiligen Passage angegeben.

Eine Dedifferenzierung der Zellen wurde durch Immunfluoreszenzfärbung mit von Willebrand Faktor (vWF) ausgeschlossen. Wie in Abb. 16 zu erkennen sind noch über 90 % der HUVEC in Passage 14 positiv für den von Willebrand Faktor. Nach dieser Passage kommt es zu einer raschen Dedifferenzierung und zu einem Verlust des vWF, so dass der Versuch zu diesem Zeitpunkt beendet wurde. Als erster Schritt wurde nun die Proteinexpression der eNOS in alternden Endothelzellen untersucht. Es zeigte sich, dass in alternden HUVEC die Expression der eNOS signifikant im Vergleich zu jungen Endothelzellen reduziert ist. Im Gegensatz dazu konnte eine verstärkte Expression des Zellzyklusinhibitors p21 in alternden Endothelzellen beobachtet werden (Abb. 16). Um eine Aussage über den S-NO Gehalt in alternden HUVEC treffen zu können, wurden Zellextrakte aus denselben Passagen, die für den Western-Blot eingesetzt wurden mit Hilfe des Saville-Griess Assays analysiert. Abbildung 17 zeigt dass der Gehalt an S-nitrosylierten Proteinen in alternden HUVEC auf 40 % im Vergleich zu jungen HUVEC reduziert ist. Diese Reduktion erfolgte sehr rapide ab Passage 8 (PDL 27) und ist ab Passage 10 (PDL 32) auf einem konstant niedrigen Niveau.

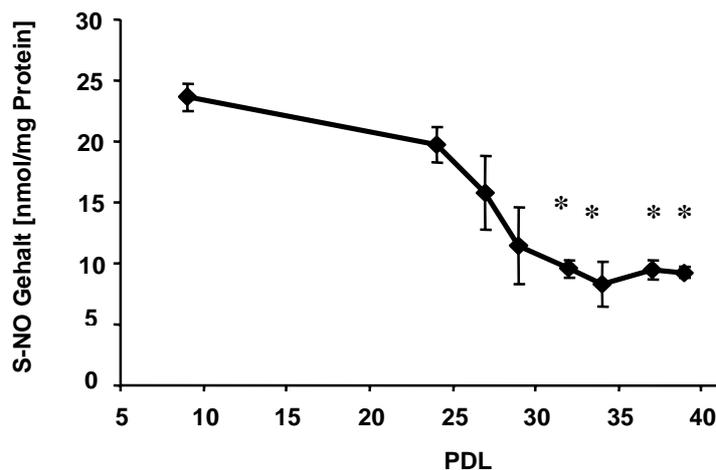


Abbildung 17: Reduktion des S-NO Gehaltes in alternden HUVEC

HUVEC wurden für die angegebenen Zeiträume kultiviert und der S-NO Gehalt wurde mittels Saville-Griess Assay bestimmt (2.5.2.). Die Mittelwerte wurden bestimmt \pm S.E.M. * $p < 0,05$ $n=4$ gegen PDL 9

Die Beobachtung, dass in alternden Endothelzellen die Proteinexpression der eNOS und der S-NO Gehalt im Vergleich zu jungen Endothelzellen drastisch reduziert sind (siehe Abb 16/17), lässt die Schlussfolgerung zu, dass somit auch die Bioverfügbarkeit von NO stark vermindert ist.

Da unterschiedliche Studien gezeigt haben, dass durch NO über die S-Nitrosylierung von Caspasen Apoptose von Endothelzellen inhibiert werden kann (Dimmeler et al., 1997b; Li et al., 1997; Rössig et al., 1999) sollte im Folgenden der Effekt von Altern und die damit verbundene Reduktion der Bioverfügbarkeit von NO auf die Sensitivität gegenüber dem proapoptischen Stimulus TNF α und dem pro-atherosklerotischen Faktor oxLDL untersucht werden. Für beide Stimuli ist bekannt, dass sie Apoptose in jungen HUVEC induzieren können und desweiteren im kardiovaskulären System für die Entstehung von Erkrankungen von Bedeutung sind.

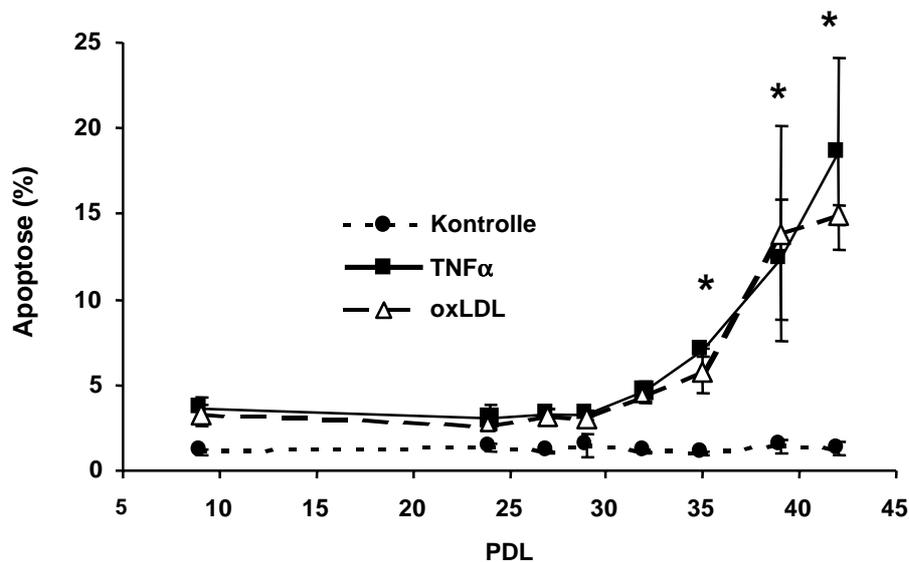


Abbildung 18: In alternden HUVEC ist die Sensitivität gegenüber TNF α - und oxLDL-induzierter Apoptose erhöht.

HUVEC wurden für die angegebenen Zeiträume kultiviert und mit 100 ng/ml TNF α oder 10 μ g/ml oxLDL für 18h inkubiert.

Die Apoptose wurde mittels DAPI-Färbung nachgewiesen (2.3.1.) Die Mittelwerte wurden bestimmt \pm S.E.M.

* $p < 0,01$ vs TNF α PDL 9 oder oxLDL PDL 9, n=4.

Die basale Apoptoserate in alternden Endothelzellen blieb im Verlauf der Kultivierung unverändert (siehe Abb. 18). Inkubation mit dem pro-apoptischen Stimulus TNF α führte zu einer drastischen Zunahme der Apoptose ab PDL 35 im Vergleich zu PDL 9. Selbiger Verlauf konnte für den pro-atherosklerotischen Faktor oxLDL beobachtet werden (siehe Abb. 18). Diese Zunahme der Apoptosesensitivität gegenüber den beiden Stimuli, TNF α und oxLDL, trat nach der Reduktion des S-NO Gehaltes in alternden Endothelzellen auf. Gleichzeitig

konnte eine Zunahme der Caspase-3 ähnlichen Aktivität (2.6.8.) nach Stimulation mit TNF α und oxLDL gemessen werden (Abb. 19).

Um zu untersuchen, ob die Reduktion der Bioverfügbarkeit von NO einen entscheidenden Anteil an der erhöhten Sensitivität gegenüber den beiden Stimuli TNF α /oxLDL besitzt wurde mittels Inkubation mit dem NO-Donor SNP exogenes NO zugegeben.

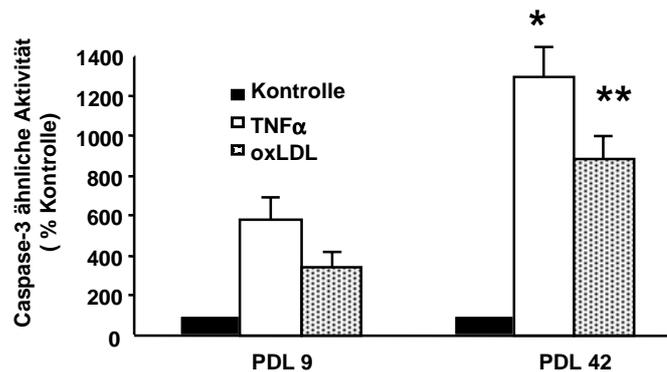


Abbildung 19: TNF α /oxLDL-induzierte Caspase-3 ähnliche Aktivität ist in alternden HUVEC erhöht

HUVEC wurden für die angegebenen Zeiträume kultiviert und für 18 h mit 100 ng/ml TNF α oder 10 μ g/ml oxLDL inkubiert. Die Caspase-3 ähnliche Aktivität wurde gemessen (2.6.8.) Die Mittelwerte wurden bestimmt \pm S.E.M. * p <0,01 gegen TNF α PDL 9; ** p <0,01 gegen oxLDL PDL9 n=5.

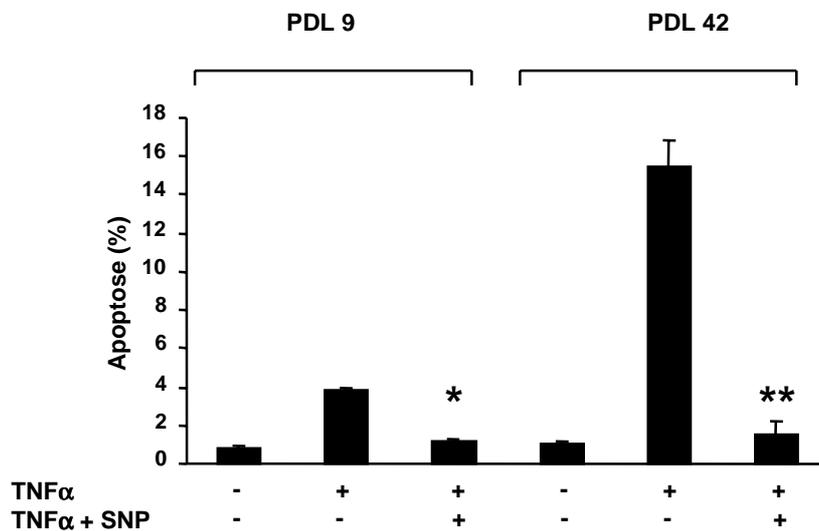


Abbildung 20: Exogenes NO inhibiert die TNF α induzierte Apoptose

HUVEC wurden für die angegebenen Zeiträume kultiviert und für 18 h mit 100 ng/ml TNF α oder mit 100 ng/ml TNF α und 10 μ M SNP inkubiert. Die Apoptose wurde mittels DAPI-Färbung bestimmt (2.3.1.) Die Mittelwerte wurden bestimmt \pm S.E.M. * p <0,01 gegen TNF α PDL 9; ** p <0,01 gegen TNF α PDL 42, n=5.

In Abbildung 20 ist zu sehen, dass Zugabe von 10 μ M SNP die Apoptose in jungen und in alternden HUVEC komplett inhibiert.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass nach der Reduktion des S-NO Gehaltes und der damit einhergehenden geringeren Bioverfügbarkeit von NO eine Erhöhung der Sensitivität gegenüber pro-apoptotischen Stimuli erfolgt.

3.4. Charakterisierung einer Denitrosylierung

In den vorangegangenen Abschnitten wurden sowohl Mechanismen, die eine Erhöhung sowie ein Reduktion der S-Nitrosylierung in Endothelzellen zur Folge haben, nachgewiesen. Ein untersuchtes spezifisches Zielprotein für die S-Nitrosylierung ist die katalytische Untereinheit p17 der Caspase-3. Diese im apoptotischen Programm zentrale Protease wird durch Bindung des NO an der SH-Gruppe des Cysteines im reaktiven Zentrum inhibiert. Die Stimulation des Fas-Rezeptors führte in humanen T-Zellen zu einer Aufhebung der S-Nitrosylierung der p17 Untereinheit der Caspase-3 (Mannick et al., 1999). Daher sollte die Frage geklärt werden, ob pro-apoptotische und pro-atherosklerotische Faktoren wie $\text{TNF}\alpha$ oder oxLDL einen ähnlichen Einfluß auf die S-Nitrosylierung in Endothelzellen besitzen. Neben dem spezifischen Zielprotein der Caspase-3 sollte vor allem der Effekt von $\text{TNF}\alpha$ und oxLDL auf den

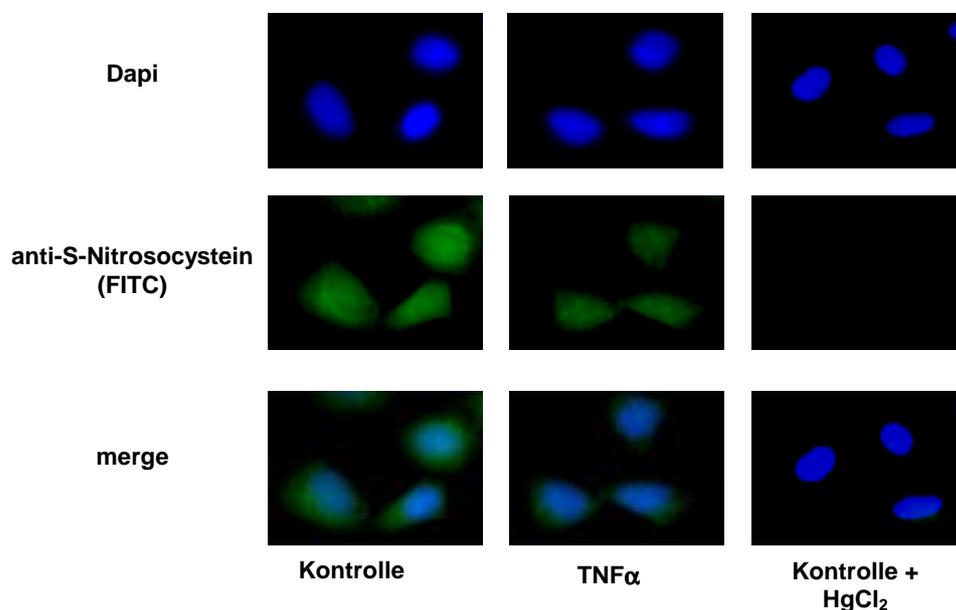


Abbildung 21: Reduktion der S-Nitrosylierung in HUVEC durch $\text{TNF}\alpha$

HUVEC wurden mit 100 ng/ml $\text{TNF}\alpha$ inkubiert und die S-Nitrosylierung mittels Immunfluoreszenzfärbung nachgewiesen (2.5.1.). Die obere Reihe zeigt die Färbung der Kerne mittels DAPI. In der mittleren Reihe ist S-nitrosyliertes Protein gezeigt, visualisiert mit FITC-konjugiertem Sekundärantikörper. Als Negativkontrolle wurden fixierte Zellen mit 0,8 % HgCl_2 für 30 min bei 37°C inkubiert. Eine repräsentative Abbildung ist gezeigt.

Gesamtgehalt an S-nitrosylierten Verbindungen untersucht werden, um der Fragestellung nachzugehen, ob neben diesem Zielprotein weitere Proteine durch diese Stimuli denitrosyliert werden. Durch Immunfluoreszenzfärbung konnte gezeigt werden, dass die Inkubation von Endothelzellen mit 100 ng/ml TNF α für 18 h zu einer deutlichen Reduktion der Fluoreszenzintensität im Vergleich zu Kontrollzellen führt (Abb. 21).

Die Beobachtung, dass Inkubation mit TNF α eine Reduktion des S-NO Gehaltes in Endothelzellen zur Folge hat, wurde mittels des Saville-Griess Assays quantifiziert.

Abbildung 22 a) zeigt, dass es zeitabhängig sowohl nach Inkubation mit TNF α als auch mit oxLDL zu einer signifikanten Reduktion des S-NO Gehaltes in Endothelzellen kommt.

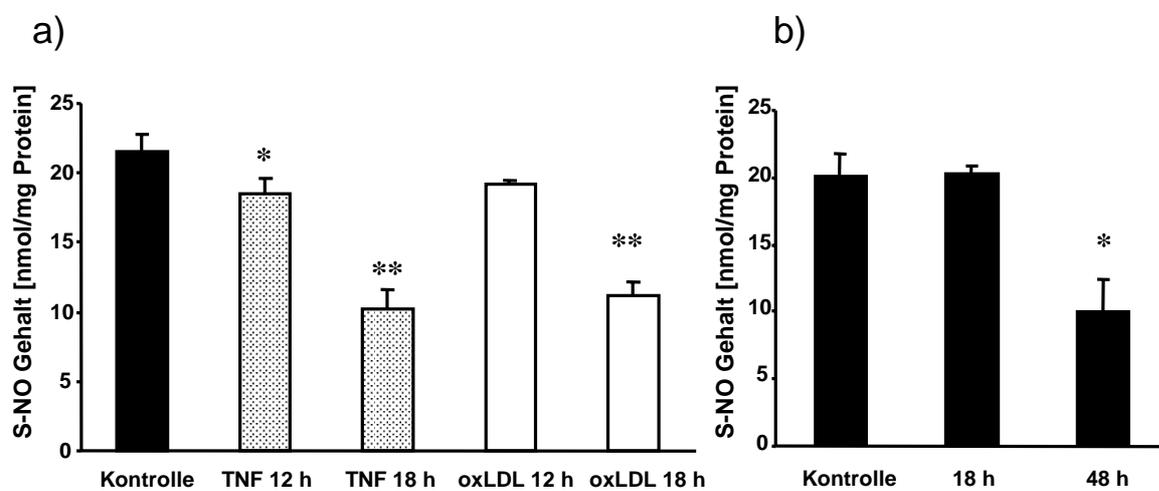


Abbildung 22: TNF α - und oxLDL-induzierte Reduktion des S-NO Gehaltes

a) HUVEC wurden für die angegebenen Zeiträume mit 100 ng/ml TNF α oder 10 μ g/ml oxLDL inkubiert und der S-NO Gehalt mittels Saville-Griess Assay nachgewiesen (2.5.2.). Die Mittelwerte wurden bestimmt \pm S.E.M. * p <0,05 n=3-4 ** p <0,01 n=3-4 gegen Kontrolle

b) HUVEC wurden für die angegebenen Zeiträume mit 1 mM L-NMMA inkubiert und der S-NO Gehalt, wie unter 2.5.2. beschrieben, mittels Saville-Griess Assay quantifiziert. Die Mittelwerte wurden bestimmt \pm S.E.M. * p <0,01 n=4.

Zusätzlich konnte durch die Inkubation mit 1 mM L-NMMA für 18 h bzw. 48 h ausgeschlossen werden, dass die Reduktion des S-NO Gehaltes auf einer Reduktion der eNOS Aktivität oder verminderten Proteinexpression beruht. Die Reduktion des S-NO Gehaltes erfolgte innerhalb von 18 h, wobei die Inhibition der eNOS erst nach 48 h einen Effekt auf den S-NO Gehalt zeigte (Abb. 22 b). Diese ersten Hinweise, dass eine Denitrosylierung von Proteinen auftritt, sollten anhand der katalytischen Untereinheit p17 der Caspase-3 näher untersucht werden. Da es in Endothelzellen nach Stimulation mit TNF α zu einer Erhöhung

der Caspase-3 ähnlichen Aktivität kommt, war die Frage, ob es analog zu den Ergebnissen von Mannick et al., in humanen T-Zellen auch in HUVEC zu einer Reduktion der S-Nitrosylierung von p17 kommt. In Abbildung 23 wurde überexprimiertes p17 immunpräzipitiert und die S-Nitrosylierung mittels DAN-Assay bestimmt (2.5.3.). Inkubation mit TNF α führte zu einer signifikanten Reduktion der S-Nitrosylierung von p17 im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen.

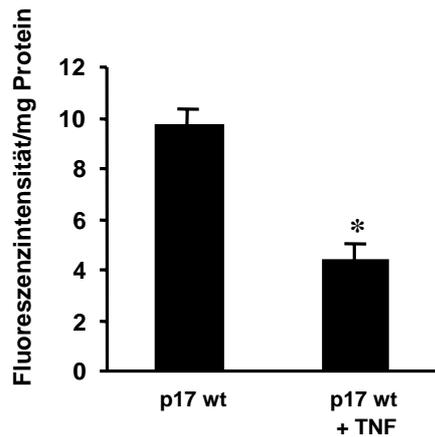


Abbildung 23: TNF α induziert Denitrosylierung von p17wt

HUVEC wurden mit p17wt transfiziert und 18 h mit 100 ng/ml TNF α inkubiert. Danach wurde die S-Nitrosylierung der immunpräzipitierten Proteine mittels DAN-Assay bestimmt (2.5.3.) Die Mittelwerte wurden bestimmt \pm S.E.M. *p<0,01 n=4 gegen Kontrolle

Neben dieser Denitrosylierung des spezifischen Zielproteins p17 wurde mit Hilfe der *biotin switch method* (2.5.4.) der Effekt von TNF α auf die S-Nitrosylierung von unterschiedlichen Proteinen untersucht.

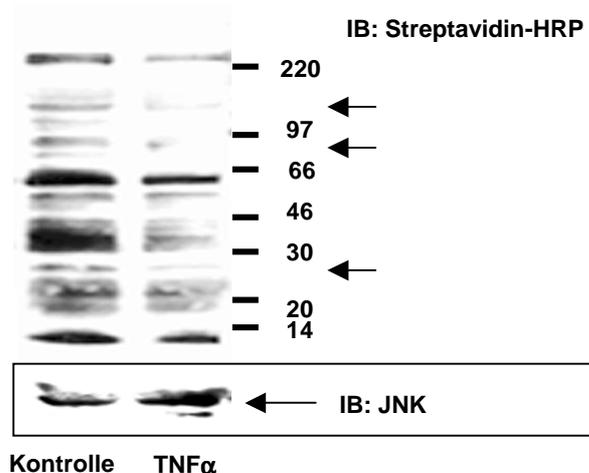


Abbildung 24: TNF α -induzierte Denitrosylierung detektiert mittels *biotin switch method*

HUVEC wurden für 18 h mit 100 ng/ml TNF α inkubiert. Danach wurde die S-Nitrosylierung mittels *biotin switch method* im Western Blot nachgewiesen (2.5.4.). Ein repräsentativer Western Blot ist gezeigt.

Nach Inkubation von Endothelzellen mit TNF α kommt es zu einer deutlichen Abnahme der S-Nitrosylierung. Neben einigen Banden die nach TNF α Inkubation ein schwächeres Signal im Western Blot im Vergleich zu Kontrollzellextrakten aufwiesen, waren andere Banden gar nicht mehr nachzuweisen (Abb. 24 mit Pfeilen markierte Banden). Als Gleichladungskontrolle wurde der Blot mit einem anti JNK Antikörper inkubiert, einem bekannten Zielprotein für die S-Nitrosylierung. Durch die Inkubation mit TNF α kommt es also zu einer quantitativen und qualitativen Denitrosylierung von unterschiedlichen Zielproteinen in Endothelzellen.

3.5. Identifizierung einer potentiellen Nitrosylase

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, neben der Charakterisierung der S-Nitrosylierung/Denitrosylierung, den Mechanismus der Denitrosylierung näher zu untersuchen. Die in den vorangegangenen Abschnitten erhobenen Daten zeigten, dass S-Nitrosylierung in vivo eine sehr stabile Verbindung ist mit einer Halbwertszeit > 18 h. Auf der anderen Seite erfolgte die Reduktion des S-NO Gehaltes nach Stimulation von Endothelzellen mit TNF α , oxLDL oder H₂O₂ innerhalb von 18 h. Diese Daten lassen den Schluss zu, dass eine Denitrosylierung möglicherweise durch die Aktivierung bzw. Induktion eines Enzyms erfolgt, das NO aus der S-NO Bindung herauslöst. Die Strategie zur Identifizierung einer potentiellen Nitrosylase, sowie erste Ergebnisse werden in den folgenden Abschnitten dargestellt.

3.5.1. Rolle der Alkoholdehydrogenase Typ I in Endothelzellen

Eine Arbeit von Liu et al. zeigte, dass die Alkoholdehydrogenase Typ I (ADH) in der Lage ist GSNO und zu einem geringen Teil auch Protein S-NO Verbindungen zu reduzieren (Liu et al., 2001). Daher wurde in ersten Experimenten die Rolle der ADH in Endothelzellen untersucht. Zu diesem Zweck wurden Antisense Oligonukleotide gegen ADH in Endothelzellen transfiziert und die mRNA Spiegel mittels RT-PCR (2.1.3.) bestimmt. Abbildung 25 zeigt, dass die ADH in Endothelzellen exprimiert wird, und dass die mRNA Spiegel durch Transfektion von Antisense Oligonukleotiden drastisch reduziert werden. Desweiteren wurde der Gesamtgehalt der S-nitrosylierten Moleküle nach Transfektion von Antisense Oligonukleotiden mittels des Saville-Griess Assays quantifiziert.

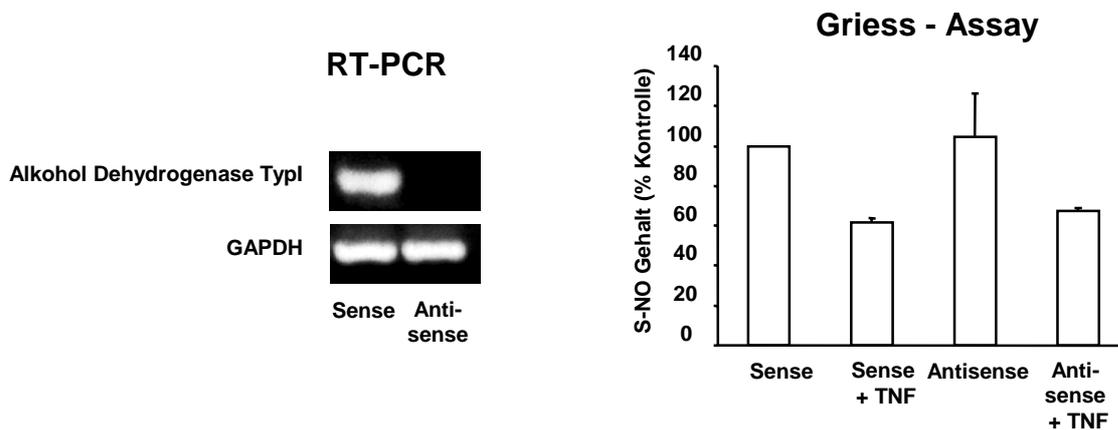


Abbildung 25: Bedeutung der ADH für den S-NO Gehalt in HUVEC

HUVEC wurden für 18 h mit 5µg Sense oder Anti-sense Oligonukleotiden transfiziert (2.2.3.) und die mRNA Spiegel mit RT-PCR (2.1.3.) oder der S-NO Gehalt basal oder nach Stimulation mit 100 ng/ml TNFα mittels Saville-Griess-Assay bestimmt (2.5.2.). Die Mittelwerte wurden bestimmt ± S.E.M n=4.

Die Transfektion von Antisense Oligonukleotiden besitzt keinen signifikanten Effekt auf den Gesamtgehalt an S-nitrosylierten Verbindungen in Endothelzellen (siehe Abb. 25). Dies legt die Vermutung nahe, dass die ADH in Endothelzellen nicht die potentielle Nitrosylase für Proteine ist.

3.5.2. Aufbau eines synthetischen Peptides als Substrat

Zur Identifizierung einer potentiellen Nitrosylase bietet sich die Verwendung eines synthetischen Peptides an, da ein Peptid mehrere Vorteile besitzt: es ist sehr rein, kann *in vitro* S-nitrosyliert werden und aufgrund seiner Struktur sollte ein kurzes Peptid als Substrat für eine potentielle Nitrosylase dienen können.

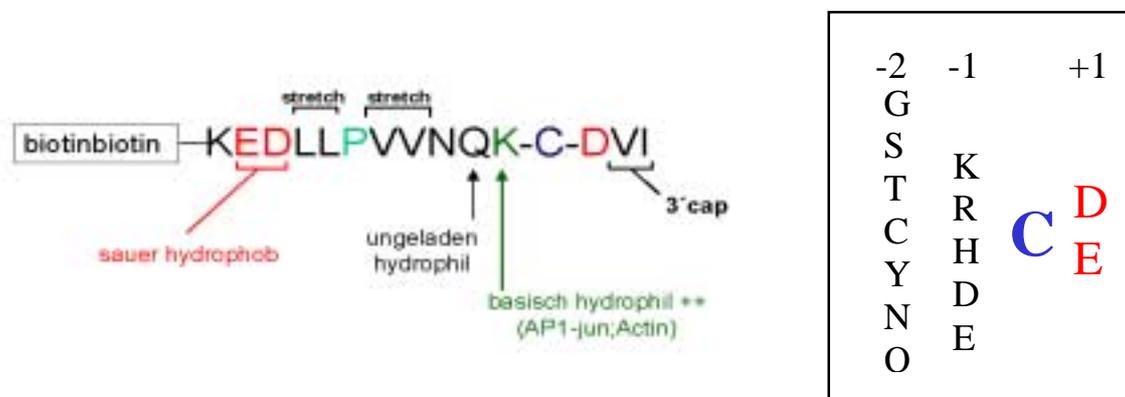


Abbildung 26: Schematische Darstellung des synthetischen Peptides.

Die Aminosäuren sind im Buchstabencode dargestellt. Im Kasten ist das Konsensus-Sequenzmotiv für die S-Nitrosylierung nach Stamler dargestellt (Stamler et al., 1997).

Wie unter 1.3.2. beschrieben gibt es ein Konsensus-Sequenzmotiv für die S-Nitrosylierung. Anhand dieses Motivs wurde die Aminosäureabfolge für das synthetische Peptid entwickelt, das in Abbildung 26 schematisch dargestellt ist. Um zusätzlich zu den Aminosäuren in direkter Umgebung des reaktiven Cysteines analog zu dem acid base motif von Perez-Mato et al., (Perez-Mato et al., 1999) eine evtl. Faltung des Peptides mit einzubeziehen, wurden nach einem neutralen Stretch mit Valin ein Prolin eingefügt, das von seiner Struktur her einen so genannten Knick bilden kann. Diesem Prolin folgt ein Stretch mit Leucin (L), um dann die beiden sauren, hydrophoben Aminosäuren (D,E) einzufügen, die die Elektronegativität des Schwefels am reaktiven Cystein erhöhen sollen. Zur Aufreinigung und Detektion des Peptides wurden am Aminoterminus zwei Biotin-Reste angefügt. Das so konstruierte Peptid sollte *in vitro* S-nitrosylierbar und als Substrat für die Identifizierung einer potentiellen Nitrosylase geeignet sein. Das Peptid mit dieser Sequenz wurde von der Fa. Affina, Berlin synthetisiert und auf seine Reinheit getestet.

3.5.3. In vitro S-Nitrosylierung des Peptides

In einem ersten Schritt wurde das Peptid *in vitro* mit NOC-15 für 1h bei 37°C inkubiert und die S-Nitrosylierung mit unterschiedlichen Methoden detektiert. Zur Überprüfung der Effizienz der S-Nitrosylierung wurden die freien SH-Gruppen mittels DTNB bestimmt.

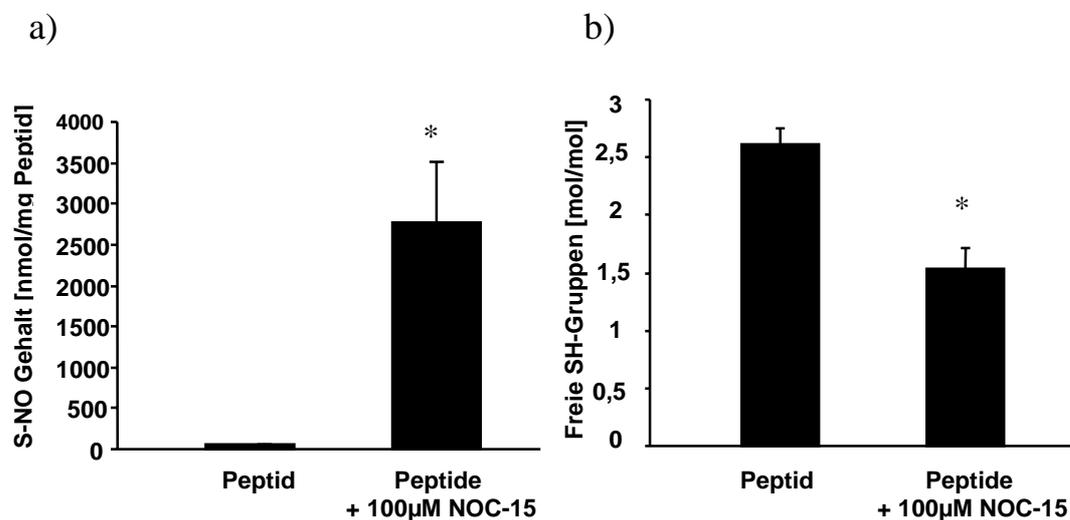


Abbildung 27: In vitro S-Nitrosylierung des Peptides und Bestimmung der freien SH-Gruppen

Das Peptid wurde basal oder mit 100 µM NOC-15 für 1 h bei 37°C inkubiert.

a) Die S-Nitrosylierung des Peptides bzw. des mit NOC-15 behandelten Peptides wurde mittels Saville-Griess Assay bestimmt (2.5.2.). Die Mittelwerte wurden bestimmt \pm S.E.M. * $p < 0,05$ $n=3$ gegen Peptid.

b) Die freien SH-Gruppen wurden mit DTNB bestimmt. Die Mittelwerte wurden bestimmt \pm S.E.M.

* $p < 0,01$ $n=3$ gegen Peptid.

Abbildung 27 zeigt, dass mit Hilfe des Saville-Griess Assays eindeutig eine S-Nitrosylierung des Peptides nachgewiesen werden konnte. Gleichzeitig waren weniger freie SH-Gruppen im Vergleich zu unbehandeltem Peptid zu detektieren. Dies zeigt dass 1 mol / 2,5 mol SH-Gruppen unter den verwendeten Bedingungen S-nitrosyliert werden.

Eine zweite Methode zur Detektion der S-Nitrosylierung des Peptides ist die „reversed phase chromatography“. Abbildung 28 zeigt die charakteristischen Elutionspeaks des Peptides (markiert mit Pfeilen) bei den verwendeten Bedingungen auf einer Source 5RPC ST 4.6/150 Säule. Der Laufpuffer war zusammengesetzt aus 10 mM Ammoniumacetat in 2% Acetonitril und der Elutionspuffer war 70% Acetonitril (Puffer B).

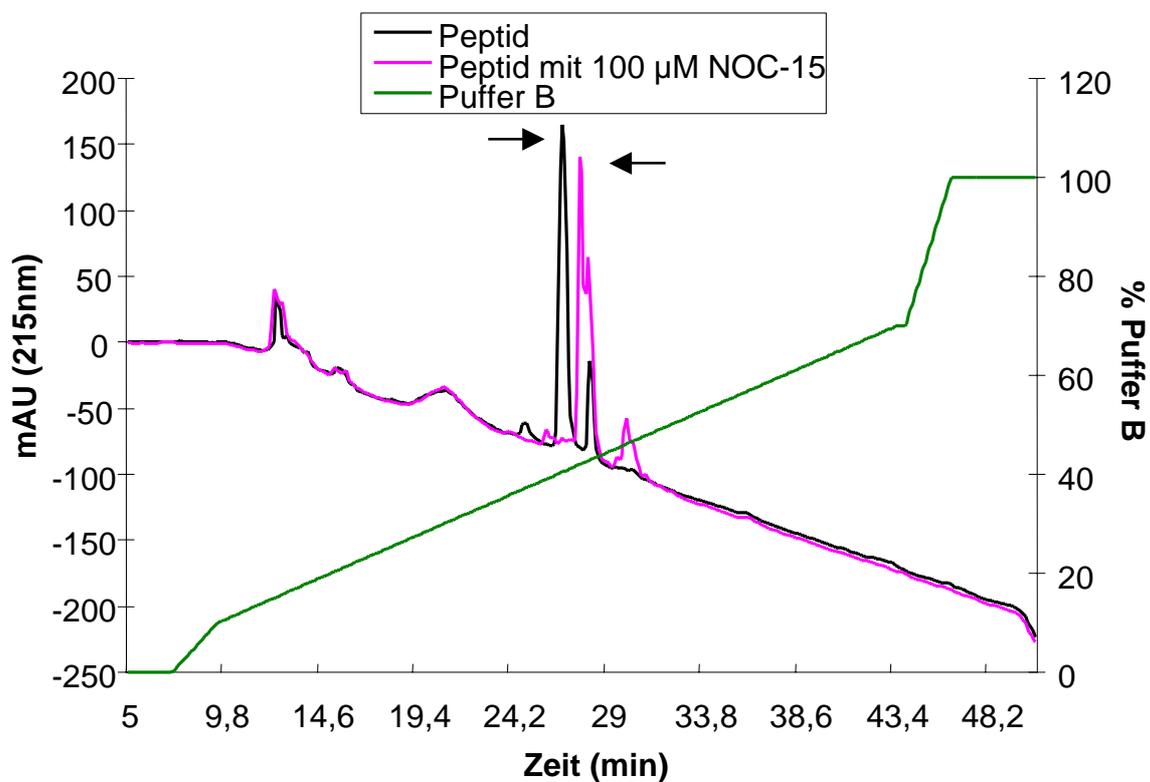


Abbildung 28: Detektion der S-Nitrosylierung des Peptides mittels FPLC

Peptid bzw. mit NOC-15 inkubiertes Peptid wurden auf eine FPLC der Fa. Amersham geladen und die Elutionscharakteristika bei UV 215 nm aufgezeichnet (2.8.). Ein repräsentatives Experiment ist gezeigt. Die Pfeile markieren die spezifischen Elutionspeaks.

Wie in der Abbildung 28 zu erkennen ist, gibt es einen deutlichen Elutionspeak bei 26,87 min, das entspricht 37 % Puffer B. Wird das Peptid mit NOC-15 wie oben beschrieben behandelt, kommt es zu einer deutlichen Verschiebung des Elutionspeaks auf 27,72 min, das entspricht 38,6 % Puffer B. Dies zeigt, dass auch mittels FPLC die S-Nitrosylierung des Peptides nachgewiesen werden kann. Damit sich das Peptid als Substrat für die Identifizierung einer potentiellen Nitrosylase eignet, muss die S-Nitrosylierung reversibel sein. Die Reversibilität

der S-Nitrosylierung wurde durch Zugabe eines Überschuss an reduzierendem DTT getestet. Nach Inkubation mit 100 μM NOC-15 für 1 h bei 37°C wurde 1 mM DTT zugegeben und nach 10 Minuten Inkubation die S-Nitrosylierung mittels FPLC detektiert.

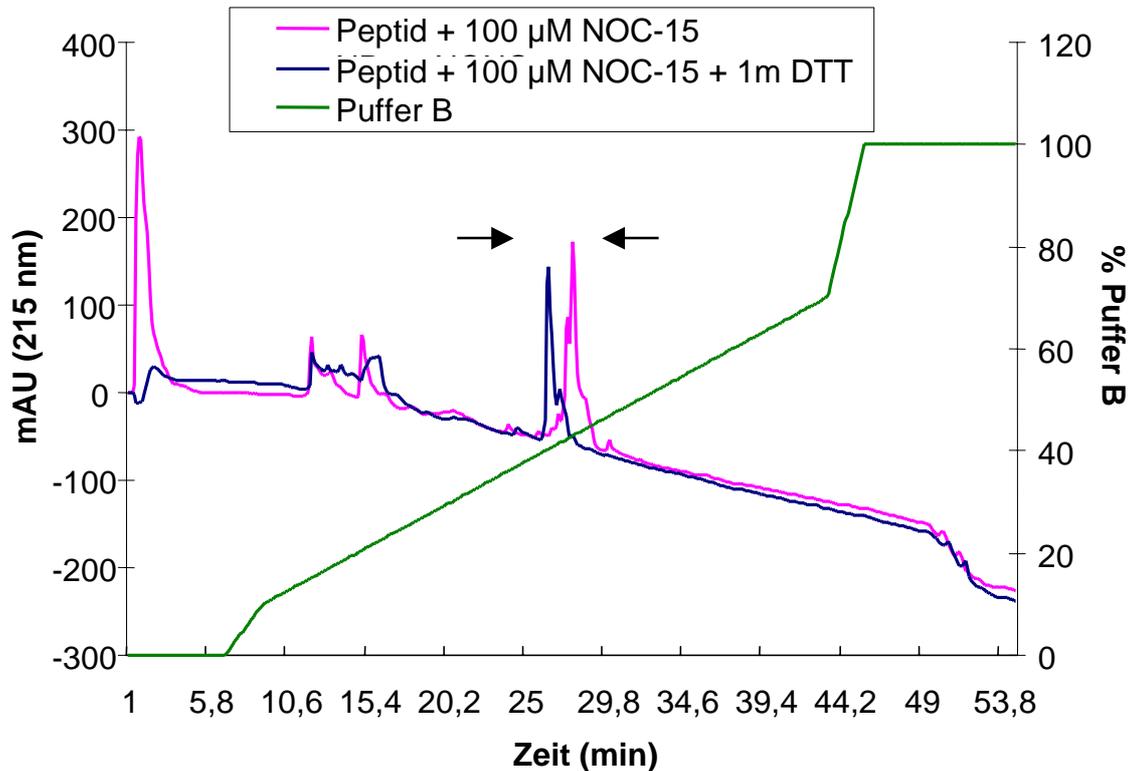


Abbildung 29: Die S-Nitrosylierung des Peptides ist reversibel

Peptid mit 100 μM NOC-15 inkubiert bzw. Peptid mit 100 μM NOC-15 und 1mM DTT inkubiert wurde auf eine FPLC der Fa. Amersham geladen und die Elutionscharakteristika bei UV 215 nm aufgezeichnet (2.8.). Ein repräsentatives Experiment ist gezeigt. Die Pfeile markieren die spezifischen Elutionspeaks.

Abbildung 29 zeigt, dass es nach Inkubation mit 1 mM DTT zu einer Verschiebung des Elutionspeaks von 27,99 min (38,9 % Puffer B) zurück auf 26,5 min (36,6 % Puffer B) kommt. Dies bedeutet, dass die S-Nitrosylierung des Peptides durch Inkubation mit einem Überschuss an DTT wieder aufgehoben werden kann.

3.6. Thioredoxin ein neues Zielprotein für die S-Nitrosylierung

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von neuen Zielproteinen für die S-Nitrosylierung. Zu diesem Zweck wurde eine Datenbankanalyse mit Hilfe des bereits erwähnten Konsensussequenzmotives für die S-Nitrosylierung durchgeführt. Diese Datenbankanalyse ergab, dass es 922 potentielle humane Zielproteine mit einer

Konsensussequenz gibt. Eines dieser Proteine ist das Thioredoxin (TRX). Nikitovic et al., konnten zeigen, dass in vitro GSNO durch das TRX System gespalten wird, wodurch GSH und NO freigesetzt werden (Nikitovic and Holmgren, 1996). Da TRX zudem eine zentrale Rolle für das Redox-Gleichgewicht in verschiedenen Zelltypen spielt (Nordberg and Arner, 2001) und in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass GSH/GSNO keine entscheidende Rolle für den Gehalt an S-Nitrosylierung in Endothelzellen besitzt, sollte im folgenden untersucht werden, ob TRX S-nitrosyliert wird, und welche Effekte eine mögliche S-Nitrosylierung auf seine Funktion besitzt.

3.7.1. Der Gehalt an S-Nitrosylierung ist abhängig von der TRX Expression

Um zu untersuchen, ob TRX S-nitrosyliert wird, wurde zuerst TRX mittels einer Plasmidtransfektion in HUVEC überexprimiert (2.2.1.). Dieses Plasmid codiert für ein Fusionsprotein von TRX mit einem Xpress tag (TRXwt) (siehe 2.1.1.) das eine Identifizierung des überexprimierten Proteins mit Hilfe eines anti-Xpress Antikörpers ermöglicht. In einem ersten Ansatz wurde die S-Nitrosylierung in TRXwt transfizierten Endothelzellen mittels Co- immunfluoreszenzfärbung mit einem anti-S-Nitrosocystein Antiserum und einem anti-Xpress Antikörper nachgewiesen (2.5.1.). Wie in Abbildung 30 zu sehen führt die Überexpression von TRXwt in HUVEC zu einer deutlichen Verstärkung des Fluoreszenzsignales im Vergleich zu den benachbarten untransfizierten Zellen, was für eine Erhöhung des S-NO Gehaltes in diesen Zellen spricht.

Bei gleichzeitiger Blockade der NO-Synthese durch L-NMMA war keine Verstärkung des Fluoreszenzsignales im Vergleich zu untransfizierten Zellen zu beobachten (Abb. 30)

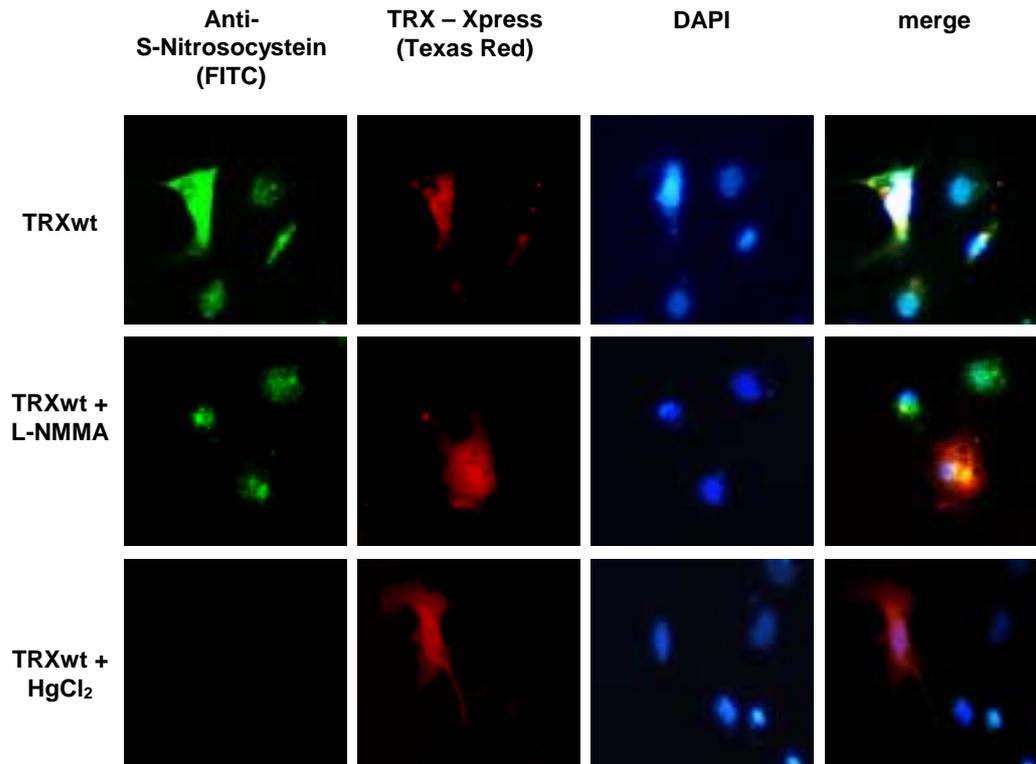


Abbildung 30: Nachweis der S-Nitrosylierung mittels Immunfluoreszenzfärbung

HUVEC wurden mit TRXwt transfiziert und mit 1 mM L-NMMA inkubiert. Nach 18 h wurde die S-Nitrosylierung mittels Immunfluoreszenzfärbung mit einem anti-S-Nitrosocystein Antiserum und die Expression des TRXwt mit einem anti-Xpress Antikörper nachgewiesen (2.5.1.). Die linke Spalte zeigt S-nitrosyliertes Protein visualisiert mit einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper. Die zweite Spalte von links zeigt die Expression des TRXwt visualisiert mit einem Texas-Red-konjugierten Sekundärantikörper. Die dritte Spalte von links zeigt die Färbung der Kerne mittels DAPI. Die rechte Spalte ist der merge aus den drei Fluoreszenzbildern. Als Negativkontrolle wurden fixierte Zellen mit 0,8 % HgCl₂ für 1 h bei 37°C inkubiert. Eine repräsentative Abbildung ist gezeigt.

Zusätzlich konnten die Daten der Immunfluoreszenzfärbung mit Hilfe des Saville-Griess Assays (2.5.2.) quantitativ bestätigt werden. Überexpression von TRXwt führt zu einer signifikanten Erhöhung des S-NO Gehaltes (siehe Abb. 31). Inhibition der NO-Synthese durch Inkubation mit 1 mM L-NMMA hob diesen Effekt vollständig auf. Dies zeigt, dass es sich hierbei um die de novo S-Nitrosylierung des überexprimierten TRXwt handelt. Die Spezifität dieses Effektes, konnte durch gleichzeitige Inkubation mit einem Überschuss an Arginin gezeigt werden, da es hier zu einer stöchiometrischen Verdrängung des Inhibitors durch das eigentliche Substrat kommt. Wie in Abbildung 31 zu sehen, führte Überexpression von TRXwt unter diesen Bedingungen wiederum zu einem signifikanten Anstieg des S-NO Gehaltes auf $24,43 \pm 2,76$ nmol/mg Protein. Der Western Blot zeigt den Nachweis der Expression von TRXwt mit Hilfe des Xpress Antikörpers.

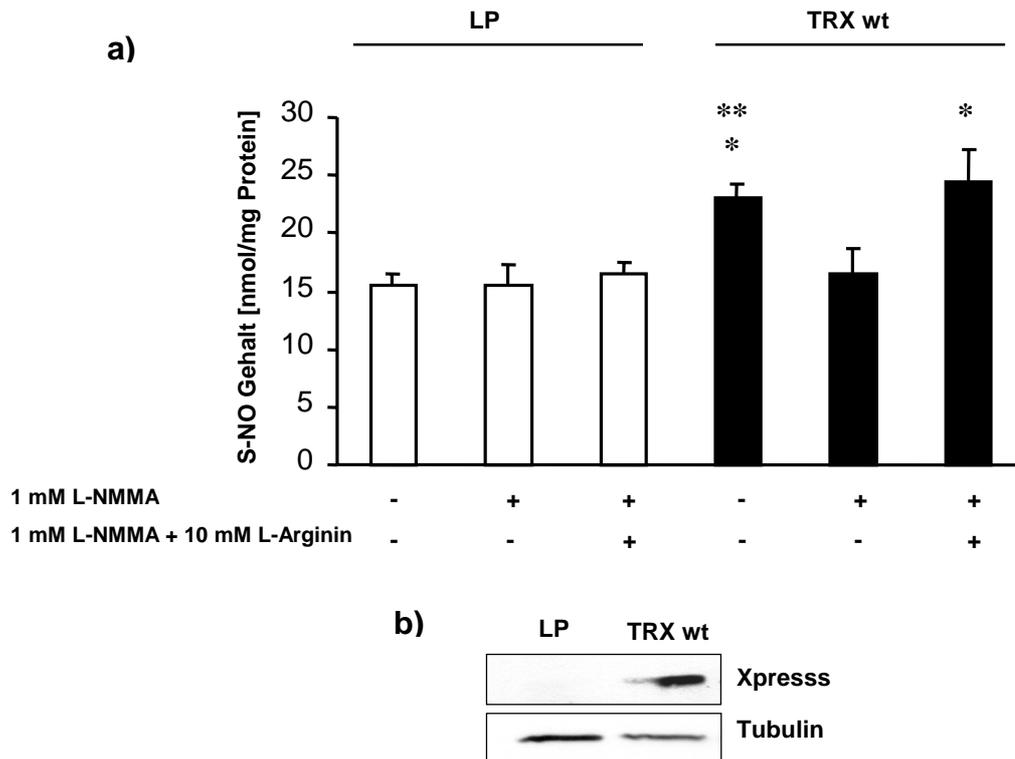


Abbildung 31: Überexpression von TRXwt erhöht den S-NO Gehalt in HUVEC

a) HUVEC wurden mit Leerplasmid (LP) und TRXwt transfiziert und entweder mit 1 mM L-NMMA oder 1 mM L-NMMA und 10 mM Arginin inkubiert. Nach 18 h wurde der S-NO Gehalt mittels Saville-Griess Assay (2.5.2.) quantifiziert. Die Mittelwerte wurden bestimmt \pm S.E.M. * $p < 0,05$, $n=3$ gegen TRXwt + L-NMMA ** $p < 0,01$ gegen LP $n=3$.

b) HUVEC wurden mit LP und TRXwt transfiziert und die Expression 18 h nach Transfektion mit Xpress Antikörper und die Gleichladung mit Tubulin Antikörper nachgewiesen.

Da Überexpression von TRXwt zu einer signifikanten Erhöhung des S-NO Gehaltes führte, wurde im nächsten Ansatz der Effekt einer reduzierten TRX Proteinexpression durch Transfektion von Antisense Oligonukleotiden untersucht. Transfektion von Antisense Oligonukleotiden (2.2.4.) reduzierte drastisch die Proteinexpression von TRX in Endothelzellen (32 b). Gleichzeitig verminderte sich der Gesamtgehalt an S-nitrosylierten Proteinen deutlich von $11,88 \pm 0,17$ nmol/mg Protein auf $3,42 \pm 3,56$ nmol/mg Protein. (Abb. 32a).

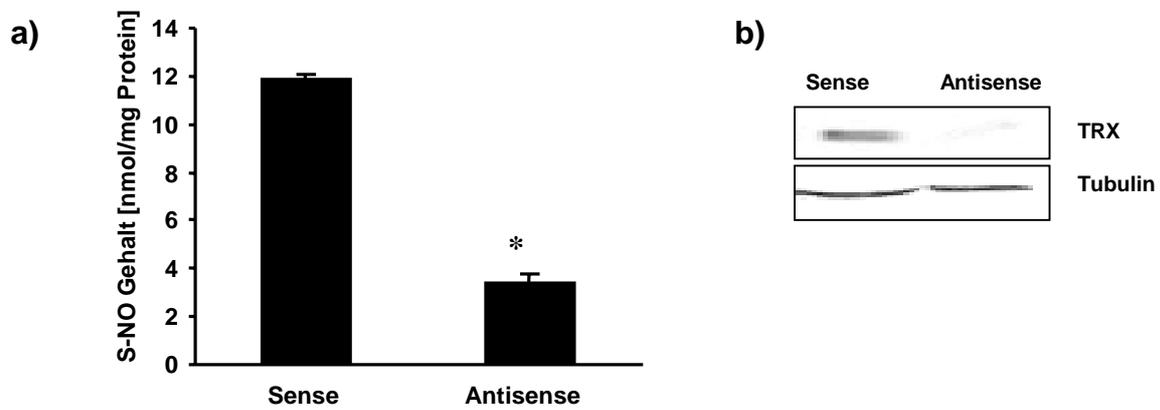


Abbildung 32: Der S-NO Gehalt in HUVEC ist abhängig von der TRX Proteinexpression

a) HUVEC wurden mit TRX sense bzw. antisense Oligonukleotiden transfiziert (2.2.4.) und für 24 h inkubiert. Danach wurde der S-NO Gehalt mittels Saville-Griess Assay (2.5.2.) quantifiziert. Die Mittelwerte wurden bestimmt \pm S.E.M. * $p < 0,01$ $n=3$ gegen sense Oligonukleotide.

b) HUVEC wurden mit TRX sense bzw. antisense Oligonukleotiden transfiziert (2.2.4.) und für 24 h inkubiert. Die Proteinexpression wurde mit anti-TRX Antikörper und die Gleichladung mit Tubulin Antikörper nachgewiesen.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass der Gehalt an S-Nitrosylierung in HUVEC abhängig von der TRX Proteinexpression ist.

3.7.2. TRX wird an Cystein 69 S-nitrosyliert

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der S-NO Gehalt in Endothelzellen von der Proteinexpression von TRX abhängig ist, sollte im Folgenden untersucht werden, ob TRX selber S-nitrosyliert wird. Dazu wurden HUVEC entweder unbehandelt oder nach Inkubation für 48 h mit verschiedenen NO-Synthase Inhibitoren lysiert und die S-Nitrosylierung mittels DAN-Assay gemessen.

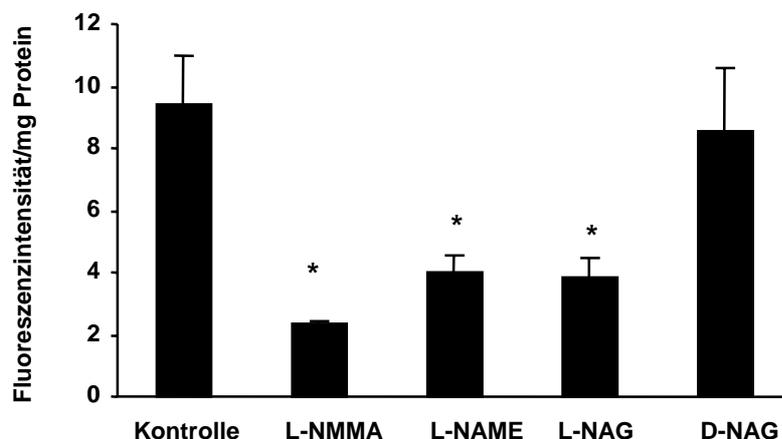


Abbildung 33: NO-Synthase Inhibitoren führen zu einer reduzierten S-Nitrosylierung von TRX

HUVEC wurden mit 1mM L-NMMA, 100 μ M L-NAME, 100 μ M L-NAG oder 100 μ M D-NAG für 48 h inkubiert und die S-Nitrosylierung von TRX nach Immunpräzipitation mittels des DAN-Assays gemessen (2.5.3.). Die Mittelwerte wurden bestimmt \pm S.E.M. * $p < 0,01$, $n = 4-6$ gegen Kontrolle.

Hierzu wurde wie unter 2.5.3. beschrieben endogenes TRX immunpräzipitiert und die S-Nitrosylierung des endogenen immunpräzipitierten Proteins bestimmt (siehe 2.5.3.). In Abbildung 33 ist zu sehen, dass endogenes TRX unter basalen Bedingungen in Endothelzellen S-nitrosyliert wird. Hemmt man nun die NO-Synthese für 48 h kommt es zu einer deutlichen Reduktion des Fluoreszenzsignales bei allen drei Inhibitoren (Abb. 33). Inkubation mit dem inaktiven Isomer von L-Nitroarginin (L-NAG), D-Nitroarginin (D-NAG) besaß hingegen keinen Effekt auf die S-Nitrosylierung von endogenem TRX (Abb. 33). Der nächste Schritt war nun das Cystein zu identifizieren, an dem TRX S-nitrosyliert wird. TRX besitzt ein Cystein an Position 69, welches innerhalb des Konsensus-Sequenzmotivs für S-Nitrosylierung liegt (siehe Abb. 34 Schema). Dieses Cystein an Position 69 wurde zu Serin mutiert (TRX (C69S)), so dass bei diesem Konstrukt TRX nicht mehr an Cystein 69 nitrosyliert werden kann. Desweiteren besitzt TRX auch an Position 32 und 35 je ein Cystein. Diese beiden Cysteine bilden zusammen die redox-regulatorische Domäne, mit der TRX neben seiner Funktion als intrazellulärer Redox-Regulator einige andere bekannte Funktionen ausübt (siehe Abschnitt 1.4.). Die Cysteine 32 und 35 der redox-regulatorischen Domäne sind reaktive Cysteine, die potentiell Ziel für eine S-Nitrosylierung sein könnten. Daher wurde auch ein Konstrukt hergestellt, bei dem die Cysteine 32 und 35 (TRX (C32/35S)) gegen Serin ausgetauscht wurden.

TRXwt, TRX (C32/35S) und TRX (C69S) wurden in HUVEC überexprimiert und die S-Nitrosylierung nach Immunpräzipitation mit Hilfe des DAN-Assays quantifiziert. Abbildung 34 b) zeigt, dass sowohl TRXwt als auch TRX (C32/35S) S-nitrosyliert werden, da sie ein deutliches Fluoreszenzsignal im DAN-Assay zeigen. Hingegen zeigt das Konstrukt TRX (C69S) kein Fluoreszenzsignal im DAN-Assay. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass Cystein 69 die S-Nitrosylierungsstelle in TRX ist. Eine vergleichbare Immunpräzipitation der unterschiedlichen Konstrukte wurde durch Western Blot Analyse nachgewiesen (Abb.34 a).

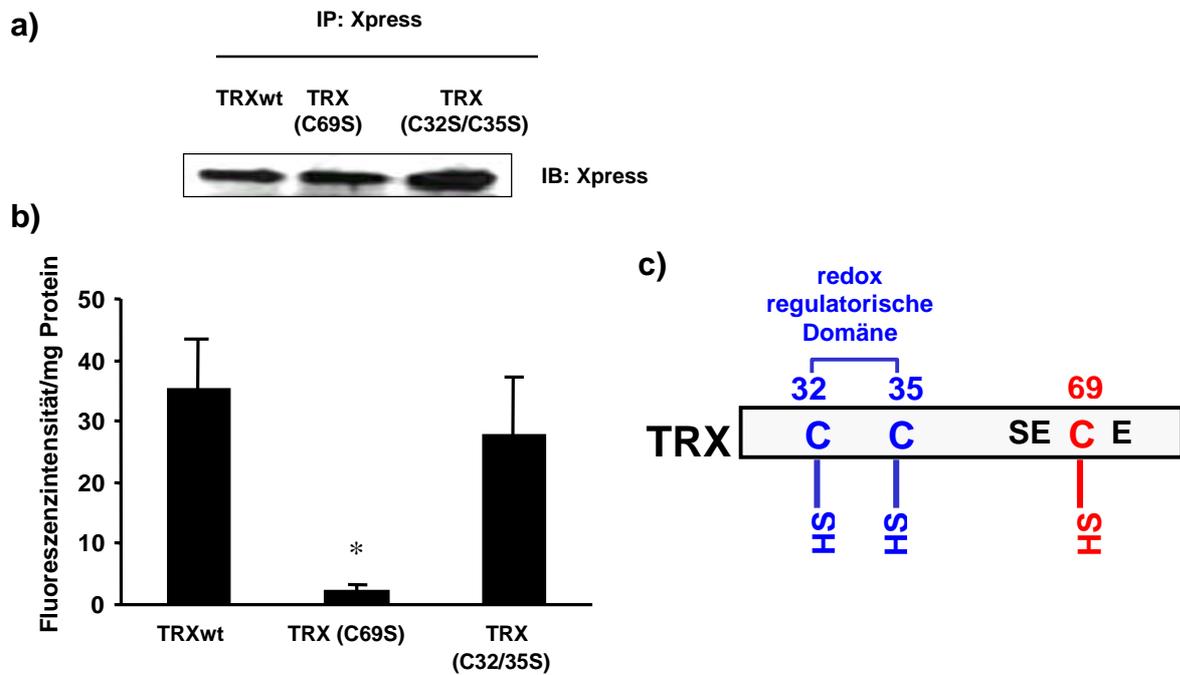


Abbildung 34: TRX wird an Cystein 69 S-nitrosyliert

- a) HUVEC wurden mit TRXwt, TRX (C69S) und TRX (C32/35S) transfiziert, lysiert und mit anti-Xpress Antikörper immunpräzipitiert. Eine vergleichbare Immunpräzipitation wurde mit anti-Xpress Antikörper im Immunoblot nachgewiesen.
- b) HUVEC wurden mit TRXwt, TRX (C69S) und TRX (C32/35S) transfiziert und die S-Nitrosylierung nach Immunpräzipitation mit anti-Xpress Antikörper mittels DAN-Assay (2.5.3.) nachgewiesen. Die Fluoreszenzsignale der Leerplasmid transfizierten Zellen wurden als Background abgezogen und die Mittelwerte wurden bestimmt \pm S.E.M. * $p < 0,01$ $n=4$ gegen TRXwt
- c) Ein Schema des humanen TRX ist gezeigt.

Weiterhin wurden der Gesamtgehalt an S-Nitrosylierung nach Transfektion von TRXwt, TRX(C69S) und TRX(C32/35S) mittels Saville-Griess Assay quantifiziert. Im Gegensatz zum DAN-Assay, bei dem die S-Nitrosylierung eines immunpräzipitierten Proteins gemessen wird, kann mittels Saville-Griess Assay der Einfluß der unterschiedlichen Konstrukte auf den Gesamtgehalt an S-nitrosylierten Verbindungen in Endothelzellen bestimmt werden. Abbildung 35 macht deutlich, dass es nach Transfektion von TRX (C32/35S) oder TRXwt zu einer signifikanten Steigerung des S-NO Gehaltes in Endothelzellen kommt.

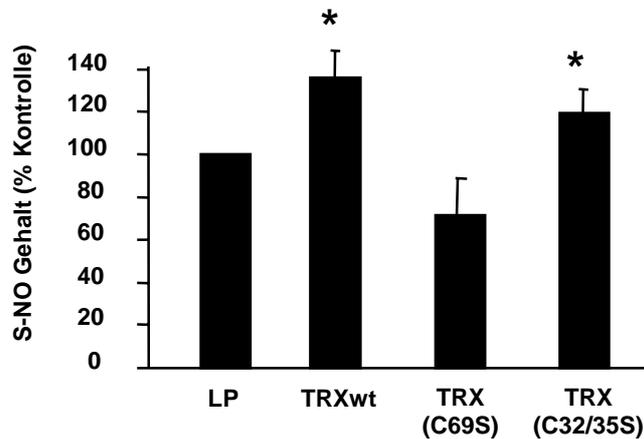


Abbildung 35: Erhöhung des S-NO Gehaltes durch TRX ist abhängig von Cystein 69

HUVEC wurden mit Leerplasmid (LP), TRXwt, TRX (C69S) und TRX (C32/35S) transfiziert und nach 18 h der S-NO Gehalt mittels Saville-Griess Assay quantifiziert (2.5.2.). Die Mittelwerte wurden bestimmt \pm S.E.M. * $p < 0,05$ $n = 3-5$ gegen LP.

Die Erhöhung des S-NO Gehaltes durch TRX ist also unabhängig von seiner redox-regulatorischen Domäne, die bei dem TRX (C32/35S) Konstrukt zerstört ist (Abb. 35) Die Tatsache, dass Überexpression von TRX (C69S) nicht zu einer signifikanten Erhöhung des S-NO Gehaltes in Endothelzellen im Vergleich zu Leerplasmid (LP) transfizierten Zellen führte, untermauert zusätzlich, dass TRX tatsächlich an Cystein 69 S-nitrosyliert wird.

3.7.3. S-Nitrosylierung an Cystein 69 ist wichtig für die Reduktaseaktivität von TRX in Endothelzellen.

Als ein zentraler Redoxregulator und wichtige Oxidoreduktase besitzt TRX eine redox-regulatorische Domäne, die von den Cysteinen an Position 32 und 35 gebildet wird. TRX kann über diese redox-regulatorische Domäne reaktive Sauerstoffspezies (ROS), z.B. $O_2^{\cdot-}$ -Radikale, an den Cysteinen 32 und 35 binden und dadurch inaktivieren. Um nun der Fragestellung nachzugehen, ob die S-Nitrosylierung von TRX an Cystein 69 die redox-regulatorische Kapazität von TRX verstärken kann, wurden Endothelzellen mit LP und den Konstrukten TRXwt, TRX (C69S) und TRC (C32/35S) transfiziert und die Formation von ROS untersucht. Mittels des Fluoreszenzfarbstoffes 2',7'Dichlorodihydrofluorescein-Diacetat (H₂DCF-DA) lassen sich in lebenden Zellen die Mengen an reaktiven Sauerstoffspezies nachweisen. 18 h nach Transfektion von HUVEC mit LP, TRXwt, TRX (C69S) und TRX (C32/35S) wurden die Zellen mit H₂DCF-DA beladen und danach mittels FACS analysiert (siehe 2.7.).

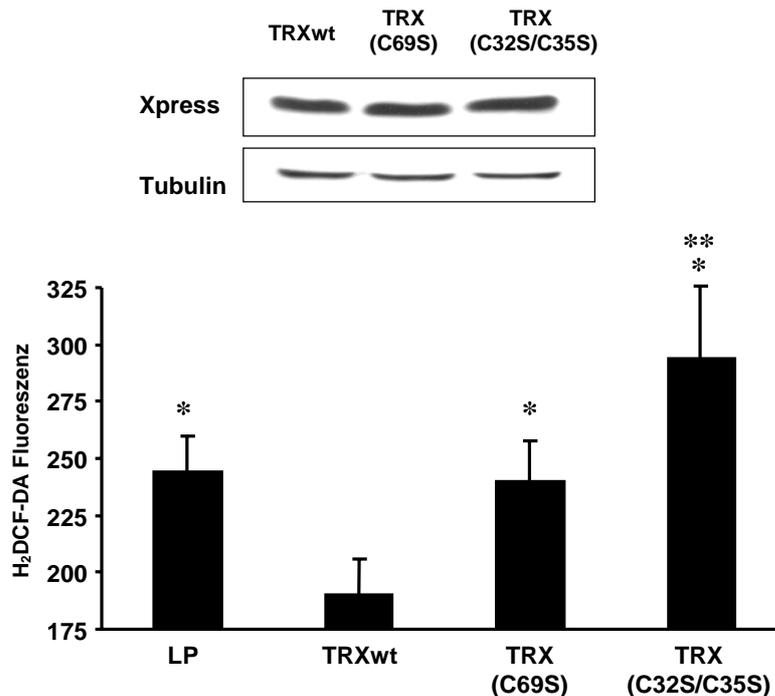


Abbildung 36: Messung der reaktiven Sauerstoffspezies

HUVEC wurden mit Leerplasmid (LP), TRXwt, TRX (C69S) und TRX (C32/35S) transfiziert und nach 18 h die Formation von reaktiven Sauerstoffspezies ermittelt (2.7.1.). Der Mittelwert wurde bestimmt \pm S.E.M. * $p < 0,01$, $n = 4-5$ gegen TRXwt; ** $p < 0,05$, $n = 4-5$ gegen TRX (C69S). Eine vergleichbare Expression der Konstrukte wurde durch einen Western Blot mit anti-Xpress Antikörper und die Gleichladung mit einem Tubulin Antikörper nachgewiesen.

Überexpression von TRXwt führte zu einer deutlichen Reduktion der mittleren Fluoreszenzintensität im Vergleich zu Leerplasmid (LP) transfizierten Zellen (Abb. 36). Dieser inhibitorische Effekt von TRXwt auf die Formation von ROS ist bei TRX (C69S) transfizierten Zellen deutlich reduziert. Diese Daten geben erste Hinweise darauf, dass die S-Nitrosylierung an Cystein 69 wichtig ist für die Aktivität von TRX in Endothelzellen. Überexpression des TRX (C32/35S) Konstruktes zeigte eine erhöhte Formation von ROS sowohl gegenüber TRXwt, als auch gegenüber TRX (C69S) und LP (Abb. 36). Diese Daten bestätigen bereits bekannte Befunde, dass die redox-regulatorische Domäne essentiell für die Funktion des TRX als Oxidoreduktase ist.

Um nun die Reduktaseaktivität von TRX quantifizieren zu können, wurde wie unter 2.6.4. beschrieben eine in vitro- Messung mittels NADPH-Oxidation durchgeführt. Hierzu wurden HUVEC mit den unterschiedlichen Konstrukten transfiziert und die Zellextrakte mit der rekombinanten, aufgereinigten TRX-Reduktase und NADPH inkubiert, um so das TRX – TRX-Reduktase – System in vitro zu rekonstituieren (siehe Abb. 4). Die Aktivität wurde hier

durch die zeitabhängige Oxidation des Reduktionsäquivalentes NADPH bei 340 nm im Photometer gemessen und als $\Delta OD_{340nm}/\Delta \text{min}/\text{mg Protein}$ ermittelt. Abb. 37 zeigt, dass in Zellextrakten von TRXwt transfizierten Zellen eine eindeutige Reduktaseaktivität nachgewiesen werden konnte.

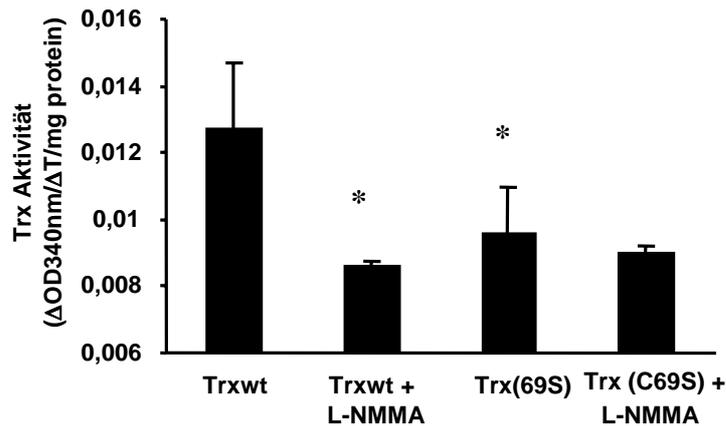


Abbildung 37: Messung der TRX-Aktivität in Zellextrakten

HUVEC wurden mit TRXwt und TRX (C69S) transfiziert und mit 1mM L-NMMA inkubiert und nach 18 h wurde die TRX Aktivität bestimmt (2.6.4.). Die Mittelwerte wurden bestimmt \pm S.E.M. * $p < 0,05$, $n = 3-5$ gegen TRX wt.

Diese Reduktaseaktivität konnte durch Inkubation mit dem NO-Synthase Inhibitor L-NMMA signifikant reduziert werden (Abb. 37). In TRX (C69S) transfizierten Zellen konnte jedoch nur eine Reduktaseaktivität gemessen werden, die auf ein ähnliches Niveau reduziert war, wie die mit L-NMMA TRXwt transfizierten HUVEC. Ausserdem konnte L-NMMA die TRX-Aktivität in TRX (C69S) transfizierten Zellen nicht weiter senken. Diese Daten zeigen, dass die S-Nitrosylierung an Cystein 69 wichtig ist für die Reduktaseaktivität von TRX.

Um nun den Effekt einer S-Nitrosylierung von TRXwt im Vergleich zu dem TRX (C69S) Konstrukt direkt zeigen zu können, wurden HUVEC mit TRXwt und TRX (C69S) transfiziert und die überexprimierten Proteine wie unter 2.6.5. beschrieben aufgereinigt.

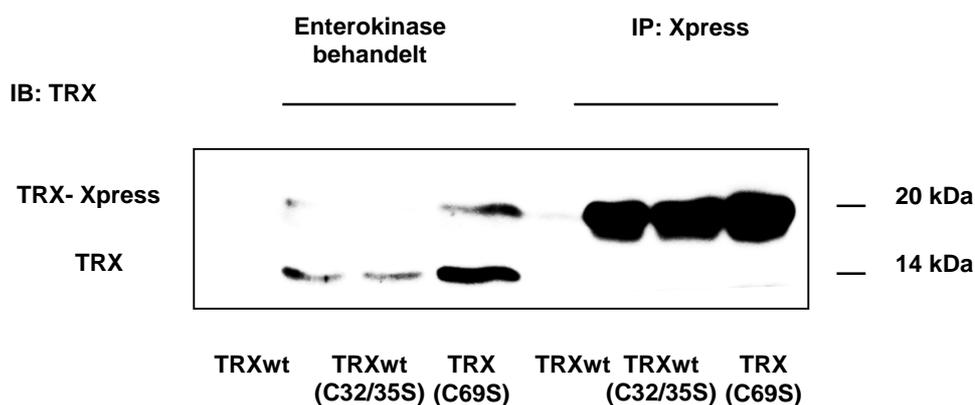


Abbildung 38: Nachweis von aufgereinigtem TRX

HUVEC wurden mit TRXwt und TRX (C69S) transfiziert und die aufgereinigten und Enterokinase behandelten Protein mittels Immunoblot mit anti-TRX Antikörper nachgewiesen. Ein repräsentativer Blot ist gezeigt. Die obere Bande ist TRX mit Xpress tag. Nach Inkubation mit Enterokinase ist das aufgereinigte TRX ohne Xpress bei 14 kDa detektierbar.

Diese aufgereinigten Proteine wurden dann für einen in vitro Assay verwendet, um die Reduktaseaktivität zu bestimmen. Die Abspaltung des Proteins vom Xpress tag mittels Enterokinase wurde durch einen Immunoblot bestätigt (Abb. 38).

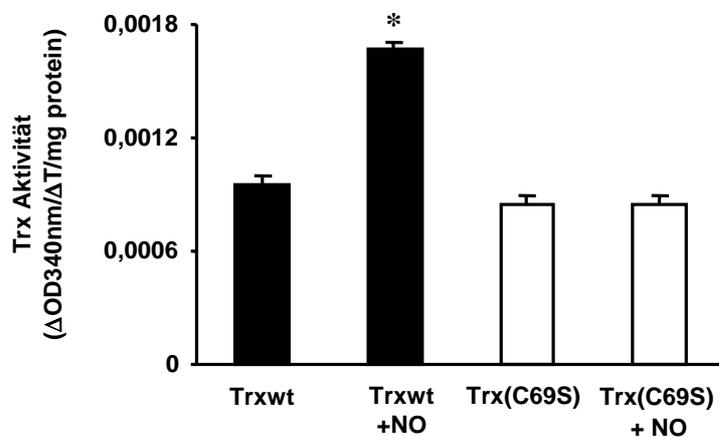


Abbildung 39: Nachweis der TRX-Aktivität mit aufgereinigtem Protein

HUVEC wurden mit TRXwt und TRX (C69S) transfiziert und die aufgereinigten Proteine mit 100 μ M NOC-15 inkubiert und die TRX Aktivität bestimmt (2.6.5.). Die Mittelwerte wurden bestimmt \pm S.E.M. * $p < 0,05$ n=3.

Durch Inkubation von aufgereinigtem TRXwt mit 100 μ M des NO-Donors NOC-15 konnte eine deutliche Steigerung der Reduktaseaktivität von TRXwt erzielt werden. Inkubation von TRX (C69S) mit NOC-15 zeigte im Gegensatz dazu keinen Effekt auf die Reduktaseaktivität (Abb. 39). Diese Daten untermauern zusätzlich, dass die S-Nitrosylierung von TRX an Cystein 69 wichtig für seine Reduktaseaktivität ist. Der Austausch der Aminosäure Cystein

69 gegen Serin könnte jedoch auch die Tertiärstruktur des Proteins so verändern, dass allein dadurch die Reduktaseaktivität reduziert sein könnte. Abb. 39 zeigt, dass die basalen Aktivitäten von TRXwt und TRX (C69S) nahezu identisch sind. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass durch den Austausch des Cysteins 69 gegen Serin keine Veränderung der Tertiärstruktur von TRX erfolgt. Als Kontrolle für die Spezifität dieses Assays wurde aufgereinigtes TRX (C32/35S) eingesetzt, mit dem wie zu erwarten keine Aktivität nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Diese Daten zusammengefasst zeigen, dass die S-Nitrosylierung von TRX an Cystein 69 wichtig ist für die Reduktaseaktivität in Endothelzellen.

3.7.4. S-Nitrosylierung von Cystein 69 und die Reduktase Domäne sind wichtig für die anti-apoptotische Funktion von TRX

TRX besitzt neben seiner Funktion als Redoxregulator auch anti-apoptotische Funktionen in unterschiedlichen Zelltypen (Andoh et al., 2002; Baker et al., 1997; Freemerman and Powis, 2000; Nordberg and Arner, 2001; Saitoh et al., 1998). Für Endothelzellen waren weder anti-apoptotische Effekte beschrieben noch die Rolle von Stickstoffmonoxid für diese anti-apoptotische Funktion von TRX beschrieben. Aus diesem Grunde wurden HUVEC mit Leerplasmid(LP)/LacZ, TRXwt/LacZ, TRX (C69S)/LacZ und TRX (C32/35S)/LacZ cotransfiziert und mit TNF α für 18 h inkubiert oder nach Preinkubation von 1mM L-NMMA mit TNF α für 18h inkubiert. Die Apoptose wurde wie unter 2.3.2. beschrieben bestimmt. TNF α induzierte in LP transfizierten Zellen 14% Apoptose, die in TRXwt transfizierten Zellen komplett inhibiert wurde (Abb. 40).

Dieser anti-apoptotische Effekte von TRX wurden durch gleichzeitige Inhibition der NO-Synthese mittels L-NMMA partiell aufgehoben. In TRX (C69S) transfizierten Zellen war ebenfalls der anti-apoptotische Effekt von TRX partiell aufgehoben, wobei Inhibition der NO-Synthase keine weitere Reduktion aufwies (Abb. 40). Dies zeigt, dass der anti-apoptotische Effekt von TRX partiell abhängig von NO und der S-Nitrosylierung an Cysteine 69 ist. In TRX (C32/35S) transfizierten Zellen wurde die TNF α induzierte Apoptose ebenfalls nur teilweise inhibiert. Im Gegensatz zu TRX (C69S) transfizierten Zellen wurde bei gleichzeitiger Blockade der NO-Synthese der anti-apoptotische Effekt von TRX (C32/35S) komplett aufgehoben. Diese Daten geben erste Hinweise, dass sowohl die S-Nitrosylierung an Cysteine 69 als auch die redox-regulatorische Domäne (C32/C35) partiell für den anti-apoptotischen Effekt von TRX verantwortlich sind.

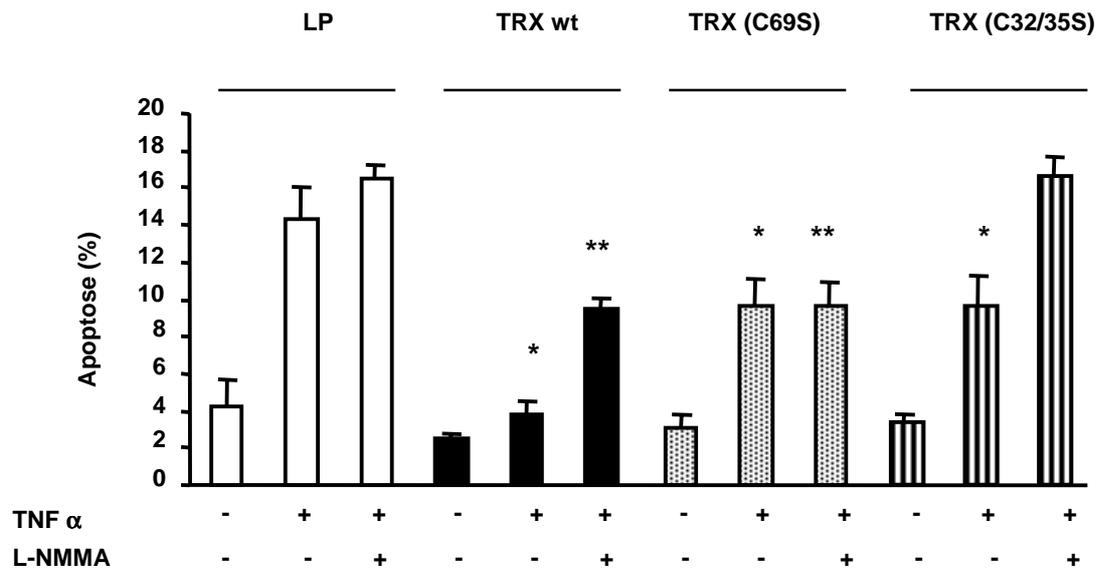


Abbildung 40: Die anti-apoptotische Funktion von TRX ist abhängig von NO und der redox-regulatorischen Domäne
 HUVEC wurden mit LP; TRXwt; TRX (C69S); TRX (C32/35S) und LacZ cotransfiziert und mit 100ng/ml TNF α bzw. 1mM L-NMMA für 18 h inkubiert und die Apoptoserate bestimmt (2.3.2.) Die Mittelwerte wurden bestimmt \pm S.E.M., *p<0,05 gegen LP+TNF α n=7 **p<0,05 gegen LP+TNF α +L-NMMA n=7

Um diese Daten weiter zu untermauern wurden HUVEC mit LP, TRXwt, TRX (C69S) und TRX (C32/35S) transfiziert und H₂O₂ induzierte Apoptose durch Annexin V-PE Bindung im FACS nachgewiesen. H₂O₂ induzierte in LP transfizierten Zellen einen 2,5 fachen Anstieg der Apoptose, der durch Gabe von exogenem NO (10 μ M des NO-Donors SNP) komplett inhibiert werden konnte (Abb. 41). In Analogie zu den Daten in Abb. 40 inhibierte TRXwt die H₂O₂ –induzierte Apoptose vollständig. Zugabe von exogenem NO hatte keinen zusätzlichen protektiven Effekt. Durch Überexpression von TRX C69S konnte die Apoptose nur partiell inhibiert werden und Inkubation mit dem NO-Donor SNP reduzierte nicht zusätzlichen die Apoptose. Bei Überexpression von TRX (C32/35S), das weiterhin S-nitrosyliert werden kann, konnte jedoch durch Gabe von exogenem NO die H₂O₂-induzierte Apoptose wieder vollständig inhibiert werden (Abb. 41).

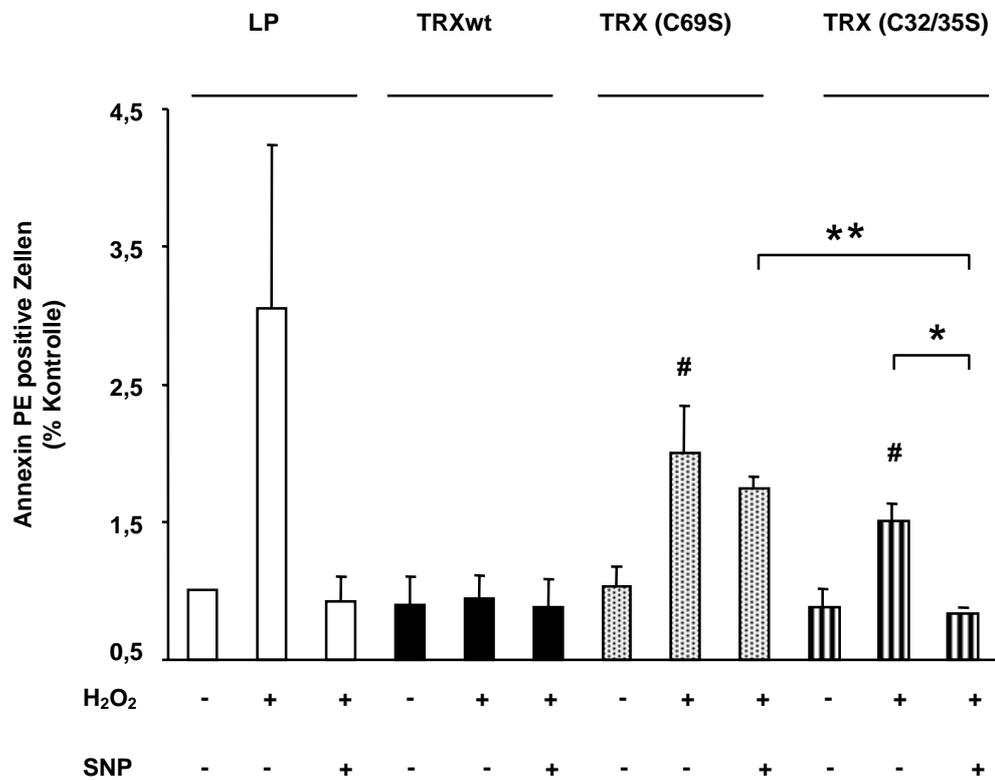


Abbildung 41: Die anti-apoptotische Funktion von TRX ist abhängig von NO und der redox-regulatorischen Domäne.

HUVEC wurden mit TRXwt, TRX (C69S), TRX (C32/35S) transfiziert und mit 200 μ M H₂O₂ und 10 μ M SNP für 18 h inkubiert und die Apoptoserate bestimmt (2.3.3.) Die Mittelwerte wurden bestimmt \pm S.E.M. * p <0,05, $n=6$, ** p <0,05, $n=6$ # p <0,05 gegen LP+H₂O₂ $n=6$

Diese Daten zeigen, dass der anti-apoptotische Effekt von TRX sowohl von der redox-regulatorischen Domäne an Cystein 32/35 als auch von der S-Nitrosylierung an Cystein 69 abhängig ist.

4. Diskussion

In dieser Arbeit konnte mit Hilfe unterschiedlicher Methoden gezeigt werden, dass es Regulationsmechanismen für die S-Nitrosylierung bzw. Denitrosylierung in Endothelzellen gibt. Dabei konnte mittels Immunfluoreszenzfärbung und dem Saville-Griess Assay eine Regulation des Gesamtgehaltes an S-nitrosylierten Molekülen und mittels DAN-Assay und der *biotin switch method* eine Regulation von spezifischen Zielproteinen deutlich gemacht werden. Dass die S-Nitrosylierung nicht nur ein Mechanismus ist, der auf Endothelzellen beschränkt ist, zeigen Befunde von anderen Arbeitsgruppen. So konnte die Relevanz der S-Nitrosylierung sowohl für neuronale Zellen, als auch für eine Vielzahl anderer Gewebe und Zelltypen wie z.B. Macrophagen, T-Zellen und Muskelzellen gezeigt werden (Gow et al., 2002; Jaffrey et al., 2001; Mannick et al., 1999; Stamler et al., 2001; Sun et al., 2001). In dieser Arbeit wurden die Studien jedoch auf Endothelzellen beschränkt.

4.1. Identifizierung der S-nitrosylierten Moleküle in Endothelzellen

Nach Etablierung der verschiedenen Methoden zum Nachweis der S-Nitrosylierung, sollten zuerst die S-nitrosylierten Moleküle in Endothelzellen identifiziert werden. Das Tripeptid Glutathion (GSH) ist Bestandteil eines antioxidativen Systemes, dessen Rolle für die Regulation des Redox-Status kontrovers diskutiert wird. GSH selber kann S-nitrosyliert werden, wodurch GSNO entsteht. Diese Bildung von GSNO wurde lange Zeit als die zentrale Reaktion für die Bioverfügbarkeit von NO angesehen. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zeigen allerdings deutlich, dass in Endothelzellen GSH bzw. GSNO keine große Bedeutung für den S-NO Gehalt und damit für die intrazelluläre Bioverfügbarkeit von NO besitzen. Diese Befunde sind in Übereinstimmung mit Daten von Eu et al. die für Macrophagen zeigen konnten, dass der größte Teil an S-nitrosylierten Molekülen Proteine sind (Eu et al., 2000a). Auf der anderen Seite zeigten Lipton et al. dass GSNO als Vorläufer von S-Nitrosocysteinyl Glycin eine wichtige Rolle für die Kontrolle der Atemfrequenz zu besitzen scheint (Lipton et al., 2001). In deoxygeniertem Blut, wie es z.B. unter Hypoxie Bedingungen vorkommt, reagiert GSH zu GSNO (Lipton et al., 2001). Lipton et al. postulieren, dass dieses GSNO als Signalmolekül lokal am *nucleus tractus solitarius* enzymatisch zu Nitrosocysteinyl Glycin gespalten wird und somit zu einer Erhöhung der Atemfrequenz führt. Diese erhöhte Atemfrequenz wiederum bedingt eine erhöhte Sauerstoffaufnahme und trägt somit zu einer Reduktion der Hypoxie bei (Lipton et al., 2001). Zusammenfassend wird klar, dass zwischen der Funktion und Bedeutung von GSH intrazellulär in Endothelzellen und extrazellulär im

Gefäßsystem deutlich unterschieden werden muss. Die in dieser Arbeit beschriebenen Effekte beziehen sich alle auf intrazelluläre Reaktionen in Endothelzellen, bei denen die S-Nitrosylierung von GSH keine große Bedeutung besitzt.

4.2. Regulation der S-Nitrosylierung durch laminare Schubspannung

Die laminare Schubspannung als physiologisch wichtigster Stimulus zur Bildung von NO durch die eNOS (Busse and Fleming, 1998) besitzt eine wichtige Funktion für die Gefäßbiologie. Es ist bekannt, dass atherosklerotische Läsionen präferentiell an Bifurkationen der Gefäße und in Regionen mit turbulentem Fluss auftreten (Glagov et al., 1988; Ku et al., 1985). Im Gegensatz dazu konnte in zahlreichen Studien der atheroprotektive Effekt der laminaren Schubspannung *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden (zur Übersicht siehe (Traub and Berk, 1998)). Einige dieser Effekte der laminaren Schubspannung werden über NO vermittelt. Die Inhibition der TNF α - oder oxLDL- induzierten Apoptose durch laminare Schubspannung ist z.B. einer dieser Effekte (Dimmeler et al., 1996; Dimmeler et al., 1999b). Das verstärkt gebildete NO könnte über S-Nitrosylierung von Proteinen als möglichen Singaltransduktionsmechanismus wirken. Daher sollte der Effekt der laminaren Schubspannung auf die S-Nitrosylierung in Endothelzellen untersucht werden. Applikation von laminarer Schubspannung für 24 h erhöhte signifikant den Gehalt an S-nitrosylierten Molekülen in Endothelzellen. Dieser Effekt ist abhängig von der NO-Synthese, da durch gleichzeitige Gabe des NO-Synthase Inhibitors L-NMMA die Zunahme vollständig blockiert werden konnte. Zusätzlich dazu konnte auch eine verstärkte S-Nitrosylierung der Caspase-3 Untereinheit p17 nachgewiesen werden. Da S-Nitrosylierung der Caspase-3 am reaktiven Cystein im katalytischen Zentrum zur Inhibition der Enzymaktivität führt (Dimmeler et al., 1997b; Rössig et al., 1999), könnten diese Daten unter anderem den anti-apoptotischen Effekt der laminaren Schubspannung auf biochemischer Basis erklären. Diese Hypothese wird zusätzlich durch Daten unterstützt, bei denen die Caspase-3 ähnliche Aktivität durch Applikation von laminarer Schubspannung unter Kontrollniveau reduziert wird (Dimmeler et al., 1997b). Ein bekanntes Zielprotein, das durch S-Nitrosylierung reguliert wird ist die GTPase p21^{ras}. S-Nitrosylierung von p21^{ras} führt zu einem Austausch von GDP zu GTP und zu einer Aktivierung der Proteine die durch p21^{ras} modifiziert werden. Für Endothelzellen könnte durch eine verstärkte S-Nitrosylierung von p21^{ras} zum Beispiel die Aktivierung des RAF, MEK und ERK 1/2 MAP-kinase Signaltransduktionsweges eine Rolle spielen, da durch ERK 1/2 z.B. Transkriptionsfaktoren wie SP-1 und AP-1 reguliert werden, die für einige Effekte der laminaren Schubspannung wichtig sind.

Neben p21^{ras} könnte auch eine verstärkte S-Nitrosylierung der Tyrosinkinase c-Src von Bedeutung sein, die unter anderem durch S-Nitrosylierung reguliert werden kann. In unterschiedlichen Studien wurde eine Involvierung der c-Src Kinase in die Signaltransduktion von laminarer Schubspannung gezeigt werden (Davis et al., 2001; Okuda et al., 1999; Traub and Berk, 1998). Die von Davis et al., gezeigte Stabilisierung der eNOS mRNA Expression nach Applikation von laminarer Schubspannung über einen c-Src abhängigen Mechanismus lässt Raum zu Spekulationen über ein Feedback von NO über c-Src-Aktivierung und eNOS mRNA Regulation (Davis et al., 2001). Weitere für die Signaltransduktionsweiterleitung der laminaren Schubspannung wichtige Zielproteine sind verschiedene Ionenkanäle, vor allen Dingen der L-type Ca²⁺ - Kanal oder der *store operated* Ca²⁺ - Kanal, die für die Funktion von Endothelzellen von Bedeutung sind (zur Übersicht siehe (Nilius and Droogmans, 2001)). Dies sind nur einige Beispiele, über die ein erhöhter Gehalt an S-nitrosylierten Verbindungen in die Signaltransduktion der laminaren Schubspannung involviert sein könnte. Neben diesem Mechanismus, der über einen Langzeiteffekt die S-Nitrosylierung in Endothelzellen reguliert, war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit, Mechanismen zu identifizieren, die zu einer Reduktion der S-Nitrosylierung in Endothelzellen führen.

4.3. Zellalterung reduziert die S-Nitrosylierung in Endothelzellen

Mit Hilfe eines Zellkulturmodelles, bei dem HUVEC kontinuierlich passagiert wurden, sollten die Effekte des Alterns auf die S-Nitrosylierung untersucht werden. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es während des Alterns von HUVEC zu einer Reduktion der Proteinexpression der eNOS kommt und diese verminderte eNOS Proteinexpression mit einem auf fast 40% reduzierten S-NO Gehalt einhergeht. Diese Reduktion des S-NO Gehaltes führt basal zu keiner Änderung der Apoptoserate in Endothelzellen. Allerdings ist die Sensitivität gegenüber dem pro-apoptotischen Stimulus TNF α und dem pro-atherogenen Stimulus oxLDL nach Reduktion des S-NO Gehaltes drastisch erhöht. Ein möglicher Mechanismus, über den die erhöhte Caspase-3 ähnliche Aktivität und die erhöhte Apoptoserate zu erklären ist, könnte die reduzierte Bioverfügbarkeit von NO sein. Wie schon in den vorherigen Abschnitten beschrieben, inhibiert NO die Caspase-3 Aktivität durch S-Nitrosylierung des aktiven Zentrums (Dimmeler et al., 1997b; Haendeler et al., 1997; Rössig et al., 1999). Daher könnte es sein, dass alternde Endothelzellen nicht mehr in der Lage sind ausreichend NO nach Stimulation mit TNF α bzw. oxLDL für die Inhibition der Caspase-3 zu rekrutieren. In bereits publizierten Arbeiten konnte eine verminderte

Proteinexpression der eNOS auch in alternden Ratten und atherosklerotischen Gefäßen gezeigt werden (Chou et al., 1998; Wilcox et al., 1997). Zusätzlich zu der reduzierten eNOS Proteinexpression könnte ein vermehrtes Auftreten von Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) speziell des Superoxidanions O_2^- für die verringerte Bioverfügbarkeit für NO verantwortlich sein (Kerr et al., 1999; White et al., 1994). Eine Quelle für die Produktion von O_2^- könnte eine entkoppelte eNOS sein (Ozaki et al., 2002). Zusätzlich gibt es immer mehr Hinweise, dass es über eine Entkopplung der Atmungskette der Mitochondrien im Altern zu einer verstärkten Produktion von O_2^- kommt (Finkel and Holbrook, 2000; Kokoszka et al., 2001). Ausserdem konnte kürzlich gezeigt werden, dass es im Alter zu einer verstärkten Bildung von Peroxynitrit ($ONOO^-$) kommt (van der Loo et al., 2000). Da die Reaktionsgeschwindigkeit von $NO\cdot$ und O_2^- zu $ONOO^-$ 1000 fach schneller ist als von $NO\cdot$ mit Proteinen oder Peptiden, könnte natürlich ein Grund für eine reduzierte Bioverfügbarkeit von NO die vermehrte Bildung von $ONOO^-$ sein. Jedoch war es möglich auch in alternden HUVEC die $TNF\alpha$ - und oxLDL-induzierte Apoptose durch exogenes NO zu inhibieren. Dies zeigt, dass in diesem System die Bildung von $ONOO^-$ wenn überhaupt, nur einen geringen Einfluß auf die Reduktion der Bioverfügbarkeit von NO in alternden Endothelzellen hat. Die biologische Relevanz der in dieser Arbeit erhobenen Befunde konnte durch eine *in vivo* Studie an Primaten gezeigt werden. Asai et al., untersuchten 13 junge männliche Makaken und 9 alte männliche Makaken. Interessanterweise stellten sie keine Zunahme der Atherosklerose fest (Asai et al., 2000). Deutlich wurde allerdings, dass die Acetylcholin induzierte endothel-abhängige Gefäßrelaxation bei älteren Primaten verringert war. Zwar konnte keine vermehrte Atherosklerose, wohl aber eine verstärkte Apoptose in den Gefäßen gezeigt werden. Die daraus resultierende erniedrigte Anzahl an Endothelzellen machen die Autoren für die verminderte endothel-abhängige Acetylcholin Antwort verantwortlich (Asai et al., 2000). In den letzten Jahren hat sich mehr und mehr die Hypothese etabliert, dass vor der Entwicklung der Atherosklerose die Entstehung der endothelialen Dysfunktion auftritt (zur Übersicht siehe (Ross, 1999; Rossig et al., 2001)). Im Gefäßsystem zirkulierende Risikofaktoren wie z.B. $TNF\alpha$ und oxLDL könnten durch die reduzierte Bioverfügbarkeit von NO im Alter durch eine erhöhte Apoptosesensitivität zu der höheren Inzidenz der Atherosklerose beitragen.

4.4. $TNF\alpha$ - und oxLDL-induzierte Denitrosylierung in Endothelzellen

In einem *in vitro* Modell für das Altern konnte über einen längeren Zeitraum eine Reduktion der eNOS Proteinexpression und dadurch eine Reduktion des Gesamtgehaltes an S-Nitrosylierung in Endothelzellen gezeigt werden. Die 1999 von Mannick et al., erschienene

Studie konnte jedoch zeigen, dass die S-Nitrosylierung der Caspase-3 nach Stimulation von humanen T-Zellen mit Fas-Liganden akut reduziert ist (Mannick et al., 1999). Durch zahlreiche Studien der letzten Jahre wird immer deutlicher, dass S-Nitrosylierung ein Signaltransduktionsweg mit vergleichbaren Charakteristika wie die Phosphorylierung ist. In dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass innerhalb von 18 h Stunden der Gehalt an S-nitrosylierten Molekülen in Endothelzellen deutlich reduziert ist. Dies konnte sowohl für den Gesamtgehalt an S-nitrosylierten Verbindungen mit Hilfe des Saville-Griess Assays, als auch für spezifische Zielproteine mittels des DAN-Assay und der *biotin switch method* gezeigt werden. Diese Reduktion der S-nitrosylierten Moleküle könnte durch einer reduzierte eNOS Proteinexpression oder NO Bioverfügbarkeit nach Stimulation von HUVEC mit TNF α oder oxLDL begründet sein, da gezeigt werden konnte, dass die eNOS mRNA Stabilität nach TNF α Stimulation reduziert ist (Alonso et al., 1997). Die Daten dieser Arbeit sprechen jedoch gegen einen solchen Mechanismus, da Inhibition der NO-Synthese erst nach 48 h zu einer deutliche Reduktion des S-NO Gehaltes führte. Die Halbwertszeit der S-Nitrosylierung ist also > 24 h. Somit kann ein reduzierter eNOS mRNA-Spiegel innerhalb dieses Zeitraumes nicht für eine Reduktion der S-Nitrosylierung verantwortlich sein. Dies ist in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Mannick et al., die ebenfalls erst nach über 24 h Blockade der NO-Synthase eine reduzierte S-Nitrosylierung der Caspase-3 beobachten konnten (Mannick et al., 1999). Die Beobachtung, dass die Reduktion des S-NO Gehaltes innerhalb von 18 h nach Stimulation mit TNF α oder oxLDL erfolgte, läßt vermuten, dass ein aktiver Prozess der Denitrosylierung vorliegt. Durch die *biotin switch method* konnte eine Denitrosylierung von einer Vielzahl von Zielproteinen in unterschiedlicher Stärke nachgewiesen werden. Es handelt sich also nicht nur um eine quantitative Denitrosylierung, sondern auch um eine qualitative Denitrosylierung. Diese Daten unterstreichen weiter, dass S-Nitrosylierung die Funktion von Proteinen reguliert, da es nicht zu einer generellen Reduktion von allen S-nitrosylierten Proteinen kommt. Wie könnte eine aktive Denitrosylierung induziert werden? Ein möglicher Mechanismus wäre die Induktion eines Enzyms, welches NO aus der S-Nitrosylierung löst. In Bakterien sind Systeme bekannt, die sowohl konstitutiv als auch induzierbar NO aus S-NO Verbindungen lösen (Hausladen et al., 1996). Für Eukaryoten wurde erst kürzlich ein Enzym entdeckt, das NO aus GSNO löst (Liu et al., 2001). Diese NADH abhängige Formaldehyd Dehydrogenase oder auch Alkohol Dehydrogenase Typ I (ADH Typ I) besitzt eine hohe Spezifität für GSNO und nur sehr geringe Aktivität gegenüber Protein-SNO Verbindungen (Liu et al., 2001). Die Aktivität dieser GSNO Reduktase ist NADH abhängig und zwar in einer Stoichiometrie von NADH zu GSNO

von 1:1 (Liu et al., 2001). Neben RAW 264.7 Zellen konnte eine Aktivität auch in anderen Geweben und in SVEC4-10 Endothelzellen der Maus nachgewiesen werden (Liu et al., 2001). Dies lässt die Hypothese zu, dass es einen Mechanismus für die Denitrosylierung gibt. Anhand der Studie von Liu et al. im Vergleich zu den Daten dieser Arbeit kann man vermuten, dass in HUVEC potentiell eine oder mehrere Nitrosylasen vorhanden sein könnten, die durch Stimuli wie z.B. TNF α oder oxLDL -induziert werden können und zu einer Reduktion der S-Nitrosylierung von Proteinen führen.

Neben dieser potentiellen Aktivierung eines enzymatischen Prozesses könnten allerdings auch hohe Mengen an ROS für eine Reduktion der S-Nitrosylierung verantwortlich sein. Für TNF α konnte gezeigt werden, dass die Induktion der Apoptose zum Teil über eine Erhöhung der ROS erfolgt (Goossens et al., 1995; Schulze-Osthoff et al., 1992). Diese erhöhten ROS könnten dann zu einer Oxidation der SH-Gruppe und somit zu einem Verlust der S-Nitrosylierung führen. Diese Hypothese scheint aber eher unwahrscheinlich, da durch Inkubation mit dem Antioxidans N-Acetylcystein keine Inhibition der TNF α -induzierten Reduktion der S-Nitrosylierung erfolgte (unpublizierte Daten der Arbeitsgruppe). Somit scheint die Erhöhung der Mengen an intrazellulären ROS nicht für die Denitrosylierung verantwortlich zu sein. Theoretisch könnten auch zweiwertige Nebengruppenmetalle eine Denitrosylierung bewirken, jedoch gibt es für einen solchen Vorgang in Zellen keine experimentellen Daten, die eine erhöhte Freisetzung solcher reaktiver Nebengruppenmetalle zeigt. Zusammengefasst ist die Aktivierung einer potentiellen Nitrosylase die wahrscheinlichere Hypothese für den Mechanismus einer Denitrosylierung.

4.5. Regulation der S-Nitrosylierung / Denitrosylierung in Endothelzellen

Fasst man die bisher diskutierten Daten dieser Arbeit zusammen, so wird klar, dass es *in vivo* in Endothelzellen eine kontrollierte Regulation der S-Nitrosylierung bzw. Denitrosylierung gibt. Neben der physiologischen Regulation der S-Nitrosylierung über Langzeitmechanismen wie z.B. die Erhöhung durch laminare Schubspannung bzw. die Reduktion durch das Altern von Endothelzellen gibt es auch eine akute Regulation der S-Nitrosylierung mit Stimuli, die für die Pathophysiologie z.B. der endothelialen Dysfunktion von Bedeutung sind (siehe Abbildung 42)

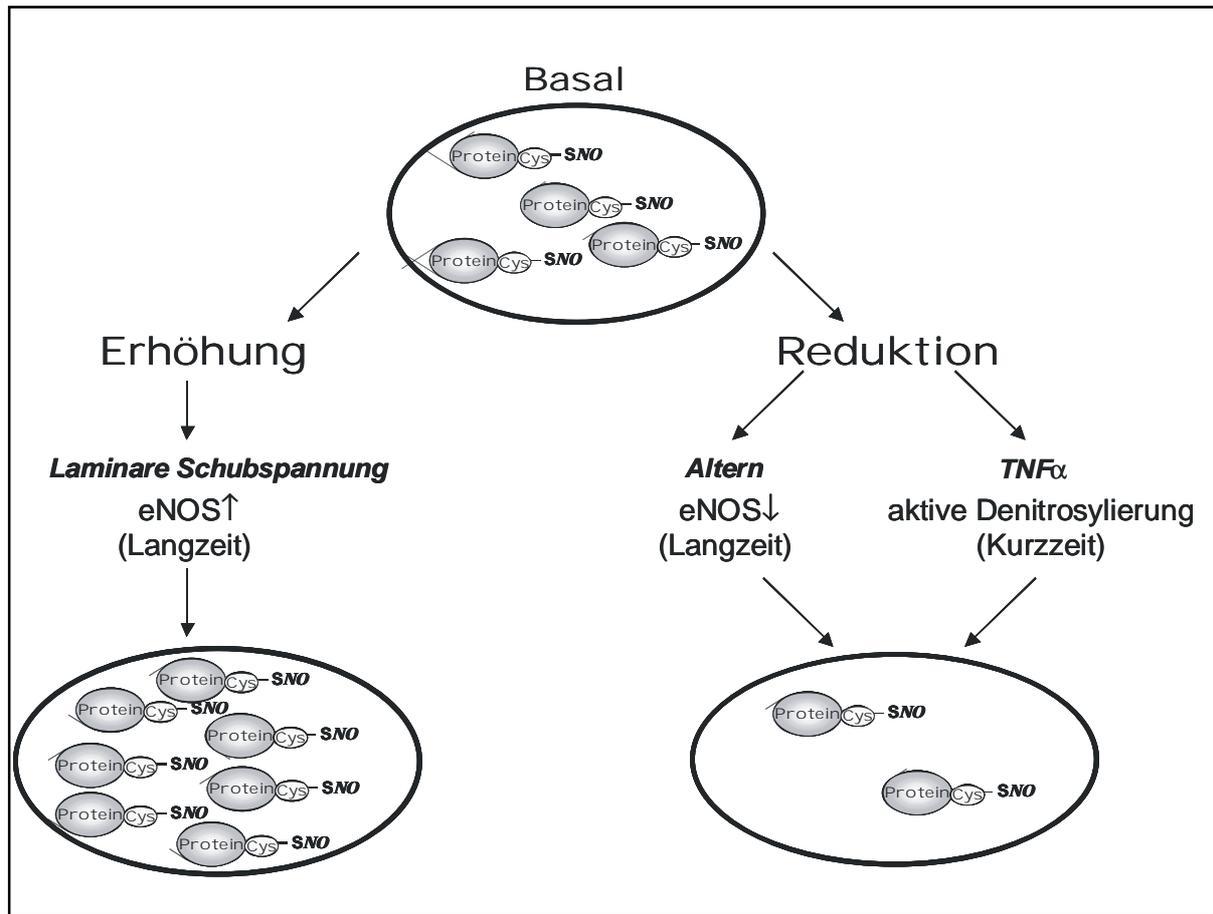


Abbildung 42: Schema zur Regulation der S-Nitrosylierung und Denitrosylierung in Endothelzellen.

Diese Daten geben einen weiteren Einblick in die Regulationsmechanismen für die S-Nitrosylierung bzw. Denitrosylierung und machen deutlich, dass es sich hierbei um einen Signaltransduktionsweg handelt, der spezifisch reguliert wird. Die Identifizierung einer potentiellen Nitrosylase und weiterer Zielproteine würde zu einem genaueren Verständnis des Einflusses für intrazelluläre Vorgänge beitragen.

4.6. Strategie zur Identifizierung einer potentiellen Nitrosylase

Die in Abschnitt 3.6.1. gezeigten Daten zeigen, dass die Alkohol Dehydrogenase Typ I in HUVEC keine entscheidende Rolle für den S-NO Gehalt spielt. Mittels Antisense Transfektion konnten die mRNA Spiegel deutlich reduziert werden. Da es keinen spezifischen Antikörper für die ADH Typ I gibt, konnte die Proteinexpression nicht kontrolliert werden, allerdings sollte bei dem deutlichen Effekt auf die mRNA Spiegel innerhalb von 18 h auch ein Effekt auf die Proteinexpression vorhanden sein. Unter der Hypothese, dass die ADH Typ I einen Einfluss auf den Gehalt an S-nitrosylierten Proteinen besitzt, sollte nach Antisense Transfektion ein deutlicher Effekt auf den S-NO Gehalt zu beobachten sein. Die Experimente

zeigen aber deutlich, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen Sense und Antisense transfizierten Zellen gibt. Da die hohe Spezifität dieses Enzyms bezüglich GSNO bekannt ist (Liu et al., 2001) und in den hier verwendeten HUVEC GSNO nur einen sehr geringen Anteil an dem Gesamtgehalt der S-nitrosylierten Moleküle besitzt, ist eine Beteiligung der ADH Typ I an der Regulation des S-NO Gehaltes sehr unwahrscheinlich. Die Verwendung von Peptiden zur Untersuchung von z.B. Phosphatasen oder anderen Enzymen hat sich in den letzten Jahren als eine sehr reproduzierbare und technisch gute Methode erwiesen. Die Vorteile eines solchen Systems sind die hohe Reinheit des Substrates, und seine gute Detektionsmöglichkeit. In Abschnitt 3.5.2. wurde ausführlich der Aufbau dieses Peptides besprochen und die Experimente zeigen deutlich, dass das verwendete Peptid *in vitro* reproduzierbar S-nitrosyliert werden kann. Diese S-Nitrosylierung ist reversibel und kann mit mehreren Methoden nachgewiesen werden. Der nächste Schritt wäre nun eine Nitrosylaseaktivität mittels des synthetischen, S-nitrosylierten Peptides als Substrat in Zellextrakten von stimulierten HUVEC nachzuweisen. Erste vorläufige Experimente zeigen, dass diese Aktivität detektierbar ist. Somit könnte dann nach Bestätigung dieser ersten Versuche eine Aufreinigung der Zellextrakte mittels unterschiedlicher chromatographischer Schritte erfolgen, an deren Ende die Identifizierung einer potentiellen Nitrosylase stehen könnte. Die Identifizierung einer potentiellen Nitrosylase und die Kenntnis ihrer Struktur bzw. ihrer Regulation würde ein besseres Verständnis der Regulation des Äquilibrium zwischen S-Nitrosylierung und Denitrosylierung zulassen. Desweiteren würde es neue Möglichkeiten für die Entwicklung spezifischer Pharmaka ermöglichen, die die Bioverfügbarkeit von NO erhöhen.

4.7. TRX ein neues durch S-Nitrosylierung reguliertes Protein

Durch verschiedene Methoden konnte in dieser Arbeit die S-Nitrosylierung von Thioredoxin (TRX) an Cystein 69 nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigte sich, dass der S-NO Gehalt in Endothelzellen abhängig ist von der Proteinexpression von TRX. Das Cystein 69 liegt innerhalb einer Konsensus-Sequenz für S-Nitrosylierung und unterstreicht damit die Theorie des acid/base Motives. Eine S-Nitrosylierung der anderen beiden reaktiven Cysteine an Position 32 und 35 konnte in HUVEC nicht nachgewiesen werden. Es ist jedoch nicht auszuschliessen, dass durch sensitivere Methoden, wie z.B. Massenspektrometrie noch weitere Cysteine detektiert werden können, die S-nitrosyliert sind. Eine Limitation der Massenspektrometrie ist allerdings, dass sehr hohe Proteinmengen benötigt werden, da die Massenspektrometrie nur am aufgereinigten, S-nitrosylierten Protein möglich ist. Desweiteren ist es sehr schwierig unter aeroben Bedingungen, die S-Nitrosylierung des Proteins

während der Aufreinigung für die Massenspektrometrie zu erhalten. Daher wird für die Massenspektrometrie meist das Protein zuerst aufgereinigt und dann *in vitro* S-nitrosyliert. Dies hat jedoch wiederum den Nachteil, dass unter diesen nicht physiologischen Bedingungen es zur falschpositiven S-Nitrosylierung von reaktiven Cysteinen kommen kann. Die in dieser Arbeit mittels DAN-Assay erhobenen Daten zeigen hingegen die wichtige Funktion der S-Nitrosylierung von Cystein 69 in Zellen unter physiologischen Bedingungen, da bei dieser Methode *in vivo*, also in Zellen, S-nitrosyliertes Protein immunpräzipitiert und gemessen wird. Zur Entfaltung der vollen antioxidativen Kapazität von TRX in Endothelzellen ist eine S-Nitrosylierung an Cystein 69 notwendig. Sowohl die Messung der reaktiven Sauerstoffspezies, als auch die TRX – Aktivitätsmessungen zeigen, dass der Verlust einer S-Nitrosylierung an Cystein 69 eine Reduktion der TRX-Aktivität bedingt. Ausserdem wurde mittels aufgereinigtem TRX in einem *in vitro* Assay gezeigt, dass NO in einem zellfreien System durch Bindung an Cystein 69 die TRX-Aktivität erhöht, und dass die basale Aktivität von TRX wt und TRX (C69S) keine Unterschiede aufweist. Auch wenn dies kein direkter Beweis ist, dass der Austausch des Cystein 69 gegen Serin keinen Effekt auf die Tertiärstruktur und somit auf die Reduktase-Aktivität besitzt, so sind dies doch starke Hinweise, die gegen eine solche Veränderung sprechen.

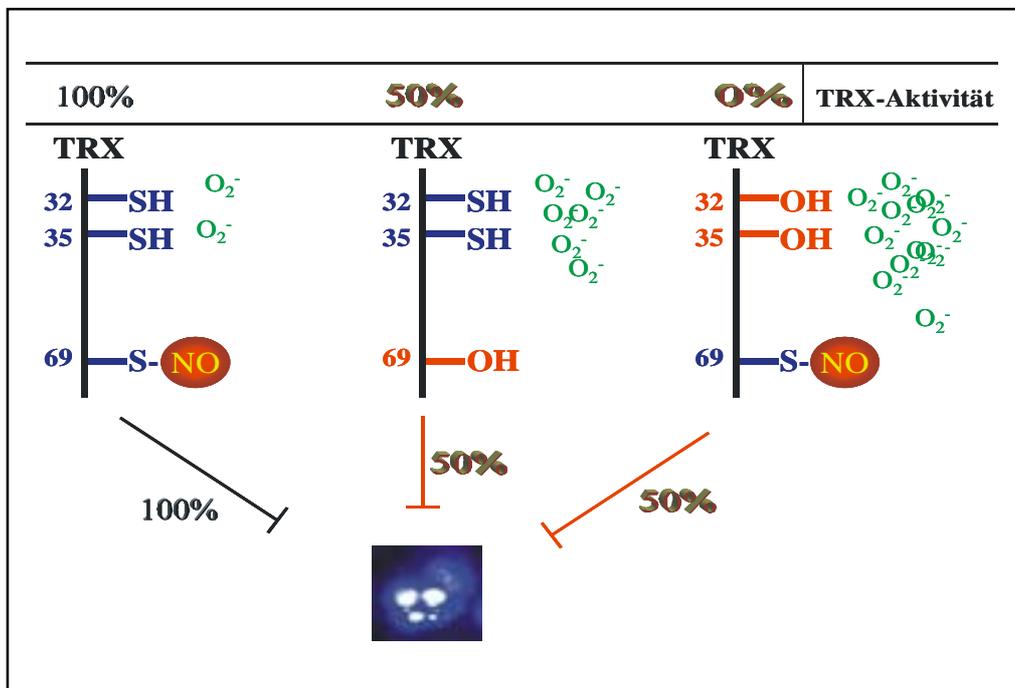


Abbildung 43: Schema zur Regulation der Reduktase-Aktivität von TRX durch S-Nitrosylierung an Cystein 69.

In Abbildung 43 ist der Effekt einer S-Nitrosylierung von TRX auf die Reduktase-Aktivität und den damit verbundenen Effekt auf die Menge an intrazellulären ROS schematisch dargestellt.

Es ist bekannt, dass ROS in Endothelzellen Apoptose induzieren können (Abello et al., 1994; Bayraktutan et al., 2000; Chandra et al., 2000; Dimmeler and Zeiher, 2000). Neben der Funktion als antioxidatives System sind auch anti-apoptotische Funktionen von TRX bekannt (Baker et al., 1997). Die bisher in der Literatur beschriebenen anti-apoptotischen Funktionen von TRX wurden über die redox-regulatorische Domäne vermittelt. Zum einen reduziert TRX über die redox-regulatorische Domäne ROS und inhibiert dadurch Apoptose (Mitsui et al., 1992; Nakamura et al., 1994). Zum anderen bindet Trx über die Cysteine 32 und 35 z.B. die pro-apoptotische Kinase ASK-1 und inhibiert so ihre Aktivität (Saitoh et al., 1998).

Dass die redox-regulatorische Domäne essentiell für eine anti-apoptotische Funktion von TRX ist, konnte in einer Leukämie Zell-Linie nachgewiesen werden, in denen ein redox-inaktives TRX überexprimiert wurde (Freemerman and Powis, 2000).

In Endothelzellen war zu Beginn dieser Arbeit noch keine Funktion von TRX für die Regulation der Apoptose beschrieben. In dieser Arbeit konnte aufgeklärt werden, dass sowohl die redox-regulatorische Domäne als auch die S-Nitrosylierung an Cystein 69 partiell für den anti-apoptotischen Effekt von TRX verantwortlich sind. Die Blockade der NO-Synthese bewirkte keine zusätzliche Reduktion der anti-apoptotischen Kapazität von TRX (C69S). Interessanterweise wurde durch Blockade der NO-Synthese bei Überexpression von TRX (C32/35S) der anti-apoptotische Effekt komplett aufgehoben und vis versa konnte durch Gabe von exogenem NO bei diesem Konstrukt die vollständige anti-apoptotische Kapazität wieder hergestellt werden. Daraus folgt, dass die Inhibition der Apoptose durch TRX in Endothelzellen von seiner redox-regulatorischen Domäne und der S-Nitrosylierung an Cystein 69 abhängig ist. Dass dies ein spezifischer Effekt für NO produzierende Zellen ist, wird deutlich, da in HEK 293 Zellen, die kein endogenes NO produzieren, die TNF α /CHX induzierte Apoptose durch TRX (C69S) genau wie bei TRX wt komplett inhibiert wird (Haendeler et al., 2002). In diesen Zellen wird der anti-apoptotische Effekt also ausschließlich über die redox-regulatorische Domäne vermittelt. Der zugrunde liegende Mechanismus für die Apoptoseinhibition von TRX über die S-Nitrosylierung an Cystein 69 kann über zwei unterschiedliche Phänome erklärt werden. Zum einen könnte die Reduktase-Aktivität abhängig sind von der S-Nitrosylierung an Cystein 69 und zum anderen TRX als Transnitrosylierungsmolekül von Bedeutung sein. Die Tatsache, dass die Transfektion mit Antisense Oligonukleotiden gegen TRX einen so drastischen Effekt auf S-nitrosylierte

Moleküle besitzt, lässt Raum für die Spekulation, dass dieses Protein entscheidend ist für die S-Nitrosylierung von anderen Zielproteinen. Für GSNO wurden Transnitrosierungsreaktionen diskutiert (Chiueh and Rauhala, 1999; Tsikas et al., 1999), d.h. GSNO könnte die Funktion eines Transportmoleküls für NO übernehmen. Da wie beschrieben GSNO in HUVEC jedoch nur eine geringe Rolle für die S-Nitrosylierung spielt, wäre TRX ein Kandidat für diesen Mechanismus. Die S-Nitrosylierung der Caspasen z.B. könnte über TRX vermittelt sein, oder aber TRX stabilisiert die S-Nitrosylierung dieser Proteine über das Cystein 69. Erste Hinweise, dass diese Hypothese zutreffen könnte, wurde durch Co-immunpräzipitation von Caspase-3 mit TRX erhalten (unpublizierte Daten der Arbeitsgruppe). In HUVEC erfolgt also tatsächlich eine Interaktion zwischen Caspase-3 und TRX. Inwiefern diese Bindung einen Einfluss auf die S-Nitrosylierung und damit die Inhibition der Caspase-3 hat muss in weiteren Studien geklärt werden.

Das TRX-System ist eines der wichtigen antioxidativen-Systeme neben dem Glutathion-System zur Regulation des intrazellulären Redox-Status (Nordberg and Arner, 2001). Die Tatsache, dass die Aktivität dieses Systems in Endothelzellen abhängig ist von NO, zeigt einen neuen Mechanismus, wie NO mit der Signaltransduktion von ROS interagiert, zusätzlich zu den bekannten Reaktionen zwischen NO und O_2^- . Dass die Regulation des intrazellulären Redox-Status wichtig sein könnte für die Spezifität der S-Nitrosylierung lassen Experimente anhand des Calcium-Kanal/Ryanodine Rezeptor (RyR1) vermuten. Im Skelettmuskel konnte für diesen Rezeptor gezeigt werden, dass die Regulation seiner Funktion durch S-Nitrosylierung nur unter bestimmtem Sauerstoffpartialdruck (pO_2) stattfindet (Eu et al., 2000b). Physiologischer pO_2 kontrolliert den Redox-Status bei 6-8 von 50 Thiolen einer RyR1 Untereinheit, so dass nur unter diesen Bedingungen ein einzelnes Cystein durch NO S-nitrosyliert werden kann (Eu et al., 2000b). Für Hämoglobin konnte gezeigt werden, dass durch S-Nitrosylierung des Anion-Exchangers 1, der in der Membran von roten Blutzellen lokalisiert ist, es zu einer Konformationsänderung des Hämoglobins in den deoxygenierten Zustand kommt. Dies bedingt den Transfer einer NO-Gruppe durch die Membran und führt somit zur Gefäßrelaxation (Pawloski et al., 2001). In diesen beiden Fällen ist der physiologische Sauerstoffpartialdruck eine Voraussetzung für die S-Nitrosylierung der Zielproteine.

Im Falle des TRX handelt es sich aber um ein neues Konzept, da S-Nitrosylierung an Cystein 69 eine Erhöhung der Reduktase-Aktivität bedingt und somit die Konzentration von reaktiven Sauerstoffspezies reguliert. Das heisst in diesem System ist die S-Nitrosylierung Voraussetzung für die Modulation der ROS-Spiegel. Für die Entfaltung der vollständigen

Reduktaseaktivität in NO-bildenden Zellen ist eine S-Nitrosylierung von TRX an Cystein 69 notwendig. Diese S-Nitrosylierung von TRX an Cystein 69 zusammen mit der redox-regulatorischen Domäne (Cysteine 32 und 35) sind wichtig für die anti-apoptotische Funktion von TRX in Endothelzellen. Dadurch wurden in dieser Arbeit bedeutende Funktionen von TRX für die Biologie der Endothelzelle identifiziert.

4.8. Ausblick

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass in Endothelzellen die S-Nitrosylierung von Proteinen durch unterschiedliche Mechanismen reguliert werden. Auf der einen Seite erfolgt über die laminare Schubspannung eine Erhöhung der eNOS Proteinexpression- und aktivität und somit subsequent durch die vermehrte Freisetzung von NO eine Erhöhung der S-Nitrosylierung über einen langfristigen Zeitraum. Auf der anderen Seite konnten auch Mechanismen identifiziert werden, die zu einer Reduktion der S-Nitrosylierung in Endothelzellen führen, sowohl über einen langfristigen Zeitraum bei dem *in vitro* Modell des Alterns, als auch bei einer akuten Denitrosylierung nach Stimulation mit dem pro-apoptotischen TNF α und dem pro-atherogenen oxLDL. Diese Befunde unterstreichen, dass die Modifikation der Proteinfunktion durch S-Nitrosylierung in Endothelzellen ein spezifisch regulierter Prozess ist. Dass dies nicht nur für Endothelzellen zutrifft, sondern auch in anderen Zelltypen von Bedeutung ist wurde in einer kürzlich publizierten Übersichtsarbeit von Stamler et al. ausführlich beschrieben (Stamler et al., 2001). Die Tatsache, dass der Gesamtgehalt an S-Nitrosylierung nach Applikation von laminarer Schubspannung signifikant erhöht ist, und eine Reihe von Signaltransduktionsmolekülen durch S-Nitrosylierung modifiziert werden, geben Raum zur Spekulation, inwiefern dieser Mechanismus für die Signaltransduktion der laminaren Schubspannung von Bedeutung ist. Weitere Studien sind jedoch notwendig, um dieser Fragestellung nachzugehen und die Zusammenhänge zwischen S-Nitrosylierung und den Effekten der laminaren Schubspannung aufzuklären.

Die reduzierte Proteinexpression der eNOS, sowie die damit einhergehende Reduktion des S-NO Gehaltes in alternden HUVEC zusammen mit Befunden aus tierexperimentellen Studien, zeigt, dass im Altern die Bioverfügbarkeit von NO deutlich reduziert ist. Genauere Untersuchungen sind aber notwendig um die Zusammenhänge der Regulation dieser Bioverfügbarkeit von NO zu verstehen. Jedoch wäre dies ein interessanter Ansatzpunkt für die Verbesserung klinischer Parameter mittels geeigneten, pharmakologischen Substanzen. In diesem Zusammenhang wäre auch die Identifizierung einer oder mehrerer potentieller Nitrosylasen von Interesse, da die Regulation der Aktivität eines solchen Enzymes

entscheidenden Einfluß auf die Bioverfügbarkeit von NO und die Biologie der Endothelzelle haben könnte.

Die Identifizierung von TRX als neues Zielprotein für die S-Nitrosylierung und die damit verbundene wichtige Funktion in Endothelzellen unterstreicht die enge Verknüpfung von NO, ROS und Apoptose für die Biologie dieser Zellen. Da die S-Nitrosylierung von TRX wichtig für die anti-apoptotische Funktion und die vollständige Entfaltung der redox-regulatorischen Kapazität von TRX ist, wäre es interessant zu wissen, welchen Einfluß unterschiedliche Konzentrationen von ROS auf die Regulation von TRX haben. Eine Regulation von TRX durch ROS in Endothelzellen ist anzunehmen, da in Fibroblasten eine Induktion der TRX Expression durch UV-Strahlung gezeigt werden konnte (Didier et al., 2001). Behandlung von Zellen mit UV-Strahlung führt zur Bildung von erhöhten Mengen an ROS, so dass diese Befunde für eine Regulation von TRX durch ROS sprechen.

Alle diese Studien könnten zu einem weiteren Verständnis der Regulation und Funktion der S-Nitrosylierung als Signaltransduktionsmechanismus beitragen.

5. Zusammenfassung

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein kurzlebiges Gas, welches in biologischen Systemen verschiedene Funktionen übernehmen kann. Abhängig von der Konzentration ist NO ein zweischneidiges Schwert bezüglich seiner biologischen Effekte, da es in hohen Dosen proapoptotisch und in physiologischen Dosen anti-apoptotisch wirkt. Das von der eNOS in Endothelzellen gebildete NO ist ein wichtiger Faktor für die Gefäßrelaxation, ein anti-inflammatorisches Molekül, ein zentraler Faktor für die Angiogenese und es inhibiert die Apoptose. Die reversible Modifikationen der Funktion von Zielproteinen durch S-Nitrosylierung ist ein Mechanismus, wie NO seine Effekte mediert. In den letzten Jahren sind eine Vielzahl von Zielproteinen entdeckt worden, deren Funktion durch S-Nitrosylierung modifiziert werden, die deutlich machen, dass S-Nitrosylierung die Funktion eines Signaltransduktionsmechanismus übernimmt. Da in humanen T-Zellen zum erstenmal auch eine Denitrosylierung beobachtet werden konnte, sollten in dieser Arbeit Mechanismen, die der Balance zwischen S-Nitrosylierung und Denitrosylierung zu Grunde liegen, untersucht werden. Dafür wurden zunächst Methoden zum Nachweis der S-Nitrosylierung etabliert. Zum einen zur Quantifizierung der S-Nitrosylierung in Endothelzellen der modifizierte Saville-Griess Assay und der DAN-Assay und zum anderen zur qualitativen Analyse der S-Nitrosylierung die *biotin switch method*. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass durch Stimulation der NO-Freisetzung mittels Applikation von laminarer Schubspannung der Gehalt an S-Nitrosylierung in HUVEC erhöht wird und auch die katalytische Untereinheit der Caspase-3 p17, ein bekanntes Zielprotein, verstärkt S-nitrosyliert wird. In einem *in vitro* Modell des Alterns konnte gezeigt werden, dass einhergehend mit der Reduktion der Proteinexpression der eNOS auch der Gehalt an S-Nitrosylierung, und damit die Bioverfügbarkeit von NO, reduziert ist. Nach Inkubation mit dem pro-apoptotischen TNF α und dem pro-atherogenen oxLDL konnte eine drastische Zunahme der Apoptosesensitivität von alternden HUVEC gegenüber diesen Stimuli beobachtet werden. Diese Ergebnisse unterstreichen die zentrale Rolle der Bioverfügbarkeit von NO für das Überleben der Endothelzelle. Zusätzlich konnte eine Denitrosylierung nach Inkubation von Endothelzellen mit TNF α oder oxLDL nach 18 h nachgewiesen werden. Durch Analyse mittels der *biotin switch method* wurde deutlich, dass dabei nicht nur der Gesamtgehalt an S-nitrosylierten Molekülen reduziert wird, sondern auch spezifische Zielproteine in unterschiedlicher Stärke denitrosyliert werden. Diese Daten machen deutlich, dass es sich bei der S-Nitrosylierung um einen differentiell regulierten Signaltransduktionsmechanismus handelt.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde eine Strategie zur Identifizierung einer potentiellen Nitrosylase entwickelt, bei dem ein synthetisches, *in vitro* S-nitrosyliertes Peptid als Substrat verwendet wird.

Weiterhin sollten neue Zielproteine für die S-Nitrosylierung identifiziert werden. Tatsächlich konnte ein neues Zielprotein für die S-Nitrosylierung, die Oxidoreduktase Thioredoxin identifiziert werden. Thioredoxin wird ubiquitär in Säugetierzellen exprimiert und ist ein essentieller Faktor für die Aufrechterhaltung des intrazellulären Redox-Status. Mit den Cysteinen an Position 32 und 35 besitzt Thioredoxin eine redox-regulatorische Domäne, die essentiell für seine Funktion als Oxidoreduktase ist. Neben seiner Funktion als Redox-Regulator, kann Thioredoxin Transkriptionsfaktoren wie z.B. Nfκ-B aktivieren und über die redox-regulatorische Domäne die pro-apoptotische Kinase ASK-1 binden und inhibieren. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Thioredoxin an Cystein 69 S-nitrosyliert wird und dass der Gehalt an S-nitrosylierten Molekülen von der Proteinexpression des Thioredoxin abhängt. Desweiteren ist die S-Nitrosylierung von Thioredoxin in Endothelzellen wichtig für die Entfaltung seiner vollständigen Reduktaseaktivität. Für die zum erstenmal in Endothelzellen gezeigte anti-apoptotische Funktion von Thioredoxin wird sowohl die S-Nitrosylierung an Cystein 69 als auch die redox-regulatorische Domäne benötigt. Durch diese Experimente konnte eine neue wichtige Funktion von Thioredoxin für NO-produzierende Zellen beschrieben werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die S-Nitrosylierung in Endothelzellen ein Signaltransduktionsmechanismus ist, der sowohl durch protektive, als auch durch pathophysiologische Stimuli spezifisch reguliert wird. Die weitere Charakterisierung dieser Vorgänge könnte einen tieferen Einblick in die Biologie und Funktion der Endothelzelle geben. Zusätzlich konnte durch das neue Zielprotein Thioredoxin die direkte Verknüpfung von NO mit dem Redox-Status der Zelle und die zentrale Rolle von Thioredoxin für den Gehalt an S-Nitrosylierung in Endothelzellen gezeigt werden.

Identifizierung weiterer Regulationsmechanismen für die S-Nitrosylierung könnte ein genaueres Verständnis dieses Wirkmechanismus von NO und somit eine bessere Protektion des Endothelzellmonolayers in den Gefäßen ermöglichen.

Literaturverzeichnis

- Abello, P. A., Fidler, S. A., and Buchman, T. G. (1994). Thiol reducing agents modulate induced apoptosis in porcine endothelial cells. *Shock* 2, 79-83.
- Akhand, A. A., Pu, M., Senga, T., Kato, M., Suzuki, H., Miyata, T., Hamaguchi, M., and Nakashima, I. (1999). Nitric oxide controls src kinase activity through a sulfhydryl group modification-mediated Tyr-527-independent and Tyr-416-linked mechanism. *J Biol Chem* 274, 25821-25826.
- Alonso, J., Sanchez de Miguel, L., Monton, M., Casado, S., and Lopez-Farre, A. (1997). Endothelial cytosolic proteins bind to the 3' untranslated region of endothelial nitric oxide synthase mRNA: regulation by tumor necrosis factor alpha. *Mol Cell Biol* 17, 5719-5726.
- Andoh, T., Chock, P. B., and Chiueh, C. C. (2002). The Roles of Thioredoxin in Protection against Oxidative Stress-induced Apoptosis in SH-SY5Y Cells. *J Biol Chem* 277, 9655-9660.
- Andreoli, S. P., Mallet, C. P., and Bergstein, J. M. (1986). Role of glutathion in protecting endothelial cells against hydrogen peroxide oxidant injury. *J Lab Clin Med* 108, 190-198.
- Änggard, E. (1994). Nitric oxide: mediator, murderer, and medicine. *Lancet* 343, 1199-1206.
- Asai, K., Kudej, R. K., Shen, Y. T., Yang, G. P., Takagi, G., Kudej, A. B., Geng, Y. J., Sato, N., Nazareno, J. B., Vatner, D. E., *et al.* (2000). Peripheral vascular endothelial dysfunction and apoptosis in old monkeys. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 1493-1499.
- Babaei, S., Teichert-Kuliszewska, K., Monge, J. C., Mohamed, F., Bendeck, M. P., and Stewart, D. J. (1998). Role of nitric oxide in the angiogenic response in vitro to basic fibroblast growth factor. *Circ Res* 82, 1007-1015.
- Baker, A., Payne, C. M., Briehl, M. M., and Powis, G. (1997). Thioredoxin, a gene found overexpressed in human cancer, inhibits apoptosis in vitro and in vivo. *Cancer Res* 57, 5162-5167.
- Bayraktutan, U., Blayney, L., and Shah, A. M. (2000). Molecular characterization and localization of the NAD(P)H oxidase components gp91-phox and p22-phox in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 1903-1911.
- Becker, K., Gui, M., and Schirmer, R. H. (1995). Inhibition of human glutathione reductase by S-nitrosoglutathione. *Eur J Biochem* 234, 472-478.
- Bonfoco, E., Krainc, D., Ankarcona, M., Nicotera, P., and Lipton, S. A. (1995). Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7162-7166.
- Busse, R., and Fleming, I. (1996). Endothelial dysfunction in atherosclerosis. *J Vasc Res* 33, 181-194.

- Busse, R., and Fleming, I. (1998). Pulsatile stretch and shear: physiological stimuli determining the production of endothelial-derived relaxing factor. *J Vasc Res* 35, 73-84.
- Chandra, J., Samali, A., and Orrenius, S. (2000). Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 29, 323-333.
- Chiueh, C. C., and Rauhala, P. (1999). The redox pathway of S-nitrosoglutathione, glutathione and nitric oxide in cell to neuron communications. *Free Radic Res* 31, 641-650.
- Chou, T. C., Yen, M. H., Li, C. Y., and Ding, Y. A. (1998). Alterations of nitric oxide synthase expression with aging and hypertension in rats. *Hypertension* 31, 643-648.
- Chung, H. T., Pae, H. O., Choi, B. M., Billiar, T. R., and Kim, Y. M. (2001). Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 282, 1075-1079.
- Clementi, E., Brown, G. C., Feelisch, M., and Moncada, S. (1998). Persistent inhibition of cell respiration by nitric oxide: crucial role of S-nitrosylation of mitochondrial complex I and protective action of glutathione. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7631-7636.
- Davis, M. E., Cai, H., Drummond, G. R., and Harrison, D. G. (2001). Shear stress regulates endothelial nitric oxide synthase expression through c-Src by divergent signaling pathways. *Circ Res* 89, 1073-1080.
- Didier, C., Kerblat, I., Drouet, C., Favier, A., Beani, J. C., and Richard, M. J. (2001). Induction of thioredoxin by ultraviolet-A radiation prevents oxidative-mediated cell death in human skin fibroblasts. *Free Radic Biol Med* 31, 585-598.
- Dimmeler, S., Fisslthaler, B., Fleming, I., Hermann, C., Busse, R., and Zeiher, A. M. (1999a). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells via Akt-dependent phosphorylation. *Nature* 399, 601-605.
- Dimmeler, S., Haendeler, J., Galle, J., and Zeiher, A. M. (1997a). Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis of human endothelial cells by activation of CPP32-like proteases: A mechanistic clue to the response to injury hypothesis. *Circulation* 95, 1760-1763.
- Dimmeler, S., Haendeler, J., Nehls, M., and Zeiher, A. M. (1997b). Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of ICE-like and CPP32-like proteases. *J Exp Med* 185, 601-608.
- Dimmeler, S., Haendeler, J., Rippmann, V., Nehls, M., and Zeiher, A. M. (1996). Shear stress inhibits apoptosis of human endothelial cells. *FEBS Lett* 399, 71-74.
- Dimmeler, S., Hermann, C., Galle, J., and Zeiher, A. M. (1999b). Upregulation of superoxide dismutase and nitric oxide synthase mediates the apoptosis-suppressive effects of shear stress on endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19, 656-664.
- Dimmeler, S., and Zeiher, A. M. (1997). Nitric oxide and apoptosis: another paradigm for the double-edged role of nitric oxide. *Nitric Oxide* 1, 275-281.
- Dimmeler, S., and Zeiher, A. M. (2000). Reactive oxygen species and vascular cell apoptosis in response to angiotensin II and pro-atherosclerotic factors. *Regul Pept* 90, 19-25.

- Duke, R. C., Ojcius, D. M., and Young, J. D. (1997). Die Apoptose-Regeln und Fehler beim Zellselbstmord. *Spektrum der Wissenschaft* 2, 26-35.
- Ellman, G. L. (1959). *Arch Biochem Biophys* 82, 70.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43-50.
- Estrada, C., Gomez, C., Martin-Nieto, J., De Frutos, T., Jimenez, A., and Villalobo, A. (1997). Nitric oxide reversibly inhibits the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Biochem J* 326, 369-376.
- Eu, J. P., Liu, L., Zeng, M., and Stamler, J. S. (2000a). An apoptotic model for nitrosative stress. *Biochemistry* 39, 1040-1047.
- Eu, J. P., Sun, J., Xu, L., Stamler, J. S., and Meissner, G. (2000b). The skeletal muscle calcium release channel: coupled O₂ sensor and NO signaling functions. *Cell* 102, 499-509.
- Fehsel, K., Kröncke, K. D., Meyer, K. L., Huber, H., Wahn, V., and Kolb-Bachofen, V. (1995). Nitric oxide induces apoptosis in mouse thymocytes. *J Immunol* 155, 2858-2865.
- Finkel, T., and Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239-247.
- Freemerman, A. J., and Powis, G. (2000). A redox-inactive thioredoxin reduces growth and enhances apoptosis in WEHI7.2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 274, 136-141.
- Furchgott, R. F., and Vanhoutte, P. M. (1989). Endothelium derived relaxing and contractor factors. *FASEB J* 3, 2007-2018.
- Glagov, S., Zarins, C., Giddens, D. P., and Ku, D. N. (1988). Hemodynamics and atherosclerosis. Insights and perspectives gained from studies of human arteries. *Arch Pathol Lab Med* 112, 1018-1031.
- Goossens, V., Grooten, J., De Vos, K., and Fiers, W. (1995). Direct evidence for tumor necrosis factor-induced mitochondrial reactive oxygen intermediates and their involvement in cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 8115-8119.
- Gow, A. J., Chen, Q., Hess, D. T., Day, B. J., Ischiropoulos, H., and Stamler, J. S. (2002). Basal and stimulated protein S-nitrosylation in multiple cell types and tissues. *J Biol Chem* 277, 9637-9640.
- Griendling, K. K., Sorescu, D., Lassegue, B., and Ushio-Fukai, M. (2000). Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 2175-2183.
- Haendeler, J., Ishida, M., Hunyady, L., and Berk, B. C. (2000). The third cytoplasmic loop of the angiotensin II type 1 receptor exerts differential effects on extracellular signal-regulated kinase (ERK1/ERK2) and apoptosis via Ras- and Rap1-dependent pathways. *Circ Res* 86, 729-736.

- Haendeler, J., Weiland, U., Zeiher, A. M., and Dimmeler, S. (1997). Effects of redox-related congeners on apoptosis and caspase-3 activity. *Nitric Oxide 1*, 282-293.
- Haendeler, J., Hoffmann, J., Tischler, V., Berk, B.C., Zeiher A.M., and Dimmeler, S. (2002). Redox regulatory and anti-apoptotic functions of thioredoxin depend on S-nitrosylation at cysteine 69. *Nat. Cell Biol.* doi 10.1038/ncb851
- Hausladen, A., Privalle, C. T., Keng, T., DeAngelo, J., and Stamler, J. S. (1996). Nitrosative stress: activation of the transcription factor OxyR. *Cell 86*, 719-729.
- Hirota, K., Matsui, M., Iwata, S., Nishiyama, A., Mori, K., and Yodoi, J. (1997). AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *Proc Natl Acad Sci U S A 94*, 3633-3638.
- Holmgren, A. (1989). Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem 264*, 13963-13966.
- Huang, P. L., Huang, Z., Mashimo, H., Bloch, K. D., Moskowitz, M. A., Bevan, J. A., and Fishman, M. C. (1995). Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature 377*, 239-242.
- Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E., and Chaudhuri, G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA 84*, 9265-9269.
- Jacobson, M. D., Weil, M., and Raff, M. C. (1997). Programmed cell death in animal development. *Cell 88*, 347-354.
- Jaffrey, S. R., Erdjument-Bromage, H., Ferris, C. D., Tempst, P., and Snyder, S. H. (2001). Protein S-nitrosylation: a physiological signal for neuronal nitric oxide. *Nat Cell Biol 3*, 193-197.
- Jia, L., Bonaventura, C., Bonaventura, J., and Stamler, J. S. (1996). S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature 380*, 221-226.
- Jun, C. D., Oh, C. D., Kwak, H. J., Pae, H. O., Yoo, J. C., Choi, B. M., Chun, J. S., Park, R. K., and Chung, H. T. (1999). Overexpression of protein kinase C isoforms protects RAW 264.7 macrophages from nitric oxide-induced apoptosis: involvement of c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase, p38 kinase, and CPP-32 protease pathways. *J Immunol 162*, 3395-3401.
- Kashiba, M., Kasahara, E., Chien, K. C., and Inoue, M. (1999). Fates and vascular action of S-nitrosoglutathione and related compounds in the circulation. *Arch Biochem Biophys 363*, 213-218.
- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer 26*, 239-257.
- Kerr, S., Brosnan, M. J., McIntyre, M., Reid, J. L., Dominiczak, A. F., and Hamilton, C. A. (1999). Superoxide anion production is increased in a model of genetic hypertension: role of the endothelium. *Hypertension 33*, 1353-1358.

- Kokoszka, J. E., Coskun, P., Esposito, L. A., and Wallace, D. C. (2001). Increased mitochondrial oxidative stress in the Sod2 (+/-) mouse results in the age-related decline of mitochondrial function culminating in increased apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 2278-2283.
- Kröncke, K.-D., Fehsel, K., Schmidt, T., Zenke, F. T., Dasting, I., Wesener, J. R., Bettermann, H., Breunig, K. D., and Kolb-Bachofen, V. (1994). Nitric oxide destroys zinc-sulfur clusters inducing zinc release from metallothionein and inhibition of the zinc finger-type yeast transcription activator LAC9. *Biochem Biophys Res Commun* 200, 1105-1110.
- Ku, D. N., Giddens, D. P., Zarins, C. K., and Glagov, S. (1985). Pulsatile flow and atherosclerosis in the human carotid bifurcation. Positive correlation between plaque location and low oscillating shear stress. *Arteriosclerosis* 5, 293-302.
- Lander, H. M., Hajjar, D. P., Hempstead, B. L., Mirza, U. A., Chait, B. T., Campbell, S., and Quilliam, L. A. (1997). A molecular redox switch on p21(ras). Structural basis for the nitric oxide-p21(ras) interaction. *J Biol Chem* 272, 4323-4326.
- Li, J., Billiar, T. R., Talanian, R. V., and Kim, Y. M. (1997). Nitric oxide reversibly inhibits seven members of the caspase family via S-nitrosylation. *Biochem Biophys Res Commun* 240, 419-424.
- Lin, K. T., Xue, J. Y., Nomen, M., Spur, B., and Wong, P. Y. (1995). Peroxynitrite-induced apoptosis in HL-60 cells. *J Biol Chem* 270, 16487-16490.
- Lipton, A. J., Johnson, M. A., Macdonald, T., Lieberman, M. W., Gozal, D., and Gaston, B. (2001). S-nitrosothiols signal the ventilatory response to hypoxia. *Nature* 413, 171-174.
- Liu, L., Hausladen, A., Zeng, M., Que, L., Heitman, J., and Stamler, J. S. (2001). A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. *Nature* 410, 490-494.
- Liu, X., Zou, H., Slaughter, C., and Wang, X. (1997). DFF, a heterodimeric protein that functions downstream of caspase-3 to trigger DNA fragmentation during apoptosis. *Cell* 89, 175-184.
- Lüscher, T. F., and Noll, G. (1995). The pathogenesis of cardiovascular disease: role of the endothelium as a target and mediator. *Atherosclerosis* 118 (Suppl), S81-S90.
- Mannick, J. B., Hausladen, A., Liu, L., Hess, D. T., Zeng, M., Miao, Q. X., Kane, L. S., Gow, A. J., and Stamler, J. S. (1999). Fas-induced caspase denitrosylation. *Science* 284, 651-654.
- Matsui, M., Oshima, M., Oshima, H., Takaku, K., Maruyama, T., Yodoi, J., and Taketo, M. M. (1996). Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse thioredoxin gene. *Dev Biol* 178, 179-185.
- Matthews, J. R., Wakasugi, N., Virelizier, J. L., Yodoi, J., and Hay, R. T. (1992). Thioredoxin regulates the DNA binding activity of NF-kappa B by reduction of a disulphide bond involving cysteine 62. *Nucleic Acids Res* 20, 3821-3830.

- Mayer, B., Pfeiffer, S., Schrammel, A., Koesling, D., Schmidt, K., and Brunner, F. (1998). A new pathway of nitric oxide/cyclic GMP signaling involving S-nitrosoglutathione. *J Biol Chem* 273, 3264-3270.
- Melino, G., Bernassola, F., Catani, M. V., Rossi, A., Corazzari, M., Sabatini, S., Vilbois, F., and Green, D. R. (2000). Nitric oxide inhibits apoptosis via AP-1-dependent CD95L transactivation. *Cancer Res* 60, 2377-2383.
- Messmer, U. K., Ankarcrone, M., Nicotera, P., and Brüne, B. (1994). p53 expression in nitric oxide-induced apoptosis. *FEBS Lett* 355, 23-26.
- Miranda-Vizueté, A., Ljung, J., Damdimopoulos, A. E., Gustafsson, J. A., Oko, R., Pelto-Huikko, M., and Spyrou, G. (2001). Characterization of Sptx, a novel member of the thioredoxin family specifically expressed in human spermatozoa. *J Biol Chem* 276, 31567-31574.
- Mitsui, A., Hirakawa, T., and Yodoi, J. (1992). Reactive oxygen-reducing and protein-refolding activities of adult T cell leukemia-derived factor/human thioredoxin. *Biochem Biophys Res Commun* 186, 1220-1226.
- Moncada, S., and Higgs, A. (1993). The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329, 2002-2012.
- Moncada, S., Higgs, A., and Furchgott, R. (1997). International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharmacol Rev* 49, 137-142.
- Moriyoshi, K., Masu, M., Ishii, T., Shigemoto, R., Mizuno, N., and Nakanishi, S. (1991). Molecular cloning and characterization of the rat NMDA receptor. *Nature* 354, 31-37.
- Murad, F. (1994). Regulation of cytosolic guanylyl cyclase by nitric oxide: the NO-cyclic GMP signal transduction system. *Adv Pharmacol* 26, 19-33.
- Murohara, T., Asahara, T., Silver, M., Bauters, C., Masuda, H., Kalka, C., Kearney, M., Chen, D., Symes, J. F., Fishman, M. C., *et al.* (1998). Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J Clin Invest* 101, 2567-2578.
- Nakamura, H., Matsuda, M., Furuke, K., Kitaoka, Y., Iwata, S., Toda, K., Inamoto, T., Yamaoka, Y., Ozawa, K., and Yodoi, J. (1994). Adult T cell leukemia-derived factor/human thioredoxin protects endothelial F-2 cell injury caused by activated neutrophils or hydrogen peroxide. *Immunol Lett* 42, 75-80.
- Nathan, C. (1992). Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6, 3051-3064.
- Nathan, C., and Xie, Q. W. (1994). Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 269, 13725-13728.
- Nicotera, P., Brune, B., and Bagetta, G. (1997). Nitric oxide: inducer or suppressor of apoptosis? *Trends Pharmacol Sci* 18, 189-190.

- Nikitovic, D., and Holmgren, A. (1996). S-Nitrosoglutathione is cleaved by the thioredoxin system with the liberation of glutathione and redox regulating nitric oxide. *J Biol Chem* 271, 19180-19185.
- Nikitovic, D., Holmgren, A., and Spyrou, G. (1998). Inhibition of AP-1 DNA binding by nitric oxide involving conserved cysteine residues in Jun and Fos. *Biochem Biophys Res Commun* 242, 109-112.
- Nilius, B., and Droogmans, G. (2001). Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol Rev* 81, 1415-1459.
- Niu, X.-F., Smith, C. W., and Kubes, P. (1994). Intracellular oxidative stress induced by nitric oxide synthesis inhibition increases endothelial cell adhesion to neutrophils. *Circ Res* 74, 1133-1140.
- Nordberg, J., and Arner, E. S. (2001). Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 31, 1287-1312.
- Okuda, M., Takahashi, M., Suero, J., Murry, C. E., Traub, O., Kawakatsu, H., and Berk, B. C. (1999). Shear stress stimulation of p130(cas) tyrosine phosphorylation requires calcium-dependent c-Src activation. *J Biol Chem* 274, 26803-26809.
- Ozaki, M., Kawashima, S., Yamashita, T., Hirase, T., Namiki, M., Inoue, N., Hirata, K., Yasui, H., Sakurai, H., Yoshida, Y., *et al.* (2002). Overexpression of endothelial nitric oxide synthase accelerates atherosclerotic lesion formation in apoE-deficient mice. *J Clin Invest* 110, 331-340.
- Papapetropoulos, A., Garcia-Cardena, G., Madri, J. A., and Sessa, W. C. (1997). Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J Clin Invest* 100, 3131-3139.
- Park, H. S., Huh, S. H., Kim, M. S., Lee, S. H., and Choi, E. J. (2000). Nitric oxide negatively regulates c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase by means of S-nitrosylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 14022-14024.
- Pawloski, J. R., Hess, D. T., and Stamler, J. S. (2001). Export by red blood cells of nitric oxide bioactivity. *Nature* 409, 622-626.
- Perez-Mato, I., Castro, C., Ruiz, F. A., Corrales, F. J., and Mato, J. M. (1999). Methionine adenosyltransferase S-nitrosylation is regulated by the basic and acidic amino acids surrounding the target thiol. *J Biol Chem* 274, 17075-17079.
- Reichard, P. (1993). From RNA to DNA, why so many ribonucleotide reductases? *Science* 260, 1773-1777.
- Ross, R. (1999). Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340, 115-126.
- Rossig, L., Dimmeler, S., and Zeiher, A. M. (2001). Apoptosis in the vascular wall and atherosclerosis. *Basic Res Cardiol* 96, 11-22.

- Rössig, L., Fichtlscherer, B., Breitschopf, K., Haendeler, J., Zeiher, A. M., Mülsch, A., and Dimmeler, S. (1999). Nitric oxide inhibits caspase-3 by S-nitrosation in vivo. *J Biol Chem* 274, 6823-6826.
- Rudic, R. D., Shesely, E. G., Maeda, N., Smithies, O., Segal, S. S., and Sessa, W. C. (1998). Direct evidence for the importance of endothelium-derived nitric oxide in vascular remodeling. *J Clin Invest* 101, 731-736.
- Saitoh, M., Nishitoh, H., Fujii, M., Takeda, K., Tobiume, K., Sawada, Y., Kawabata, M., Miyazono, K., and Ichijo, H. (1998). Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *Embo J* 17, 2596-2606.
- Salgo, M. G., Squadrito, G. L., and Pryor, W. A. (1995). Peroxynitrite causes apoptosis in rat thymocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 215(3), 1111-1118.
- Sata, M., and Walsh, K. (1998a). Endothelial cell apoptosis induced by oxidized LDL is associated with the down-regulation of the cellular caspase inhibitor FLIP. *J Biol Chem* 273, 33103-33106.
- Sata, M., and Walsh, K. (1998b). Oxidized LDL activates Fas-mediated endothelial cell apoptosis. *J Clin Invest* 102, 1682-1689.
- Schenk, H., Klein, M., Erdbrugger, W., Droge, W., and Schulze-Osthoff, K. (1994). Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF-kappa B and AP-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1672-1676.
- Schulze-Osthoff, K., Bakker, A. C., Vanhaesebroeck, B., Beyaert, R., Jacob, W. A., and Fiers, W. (1992). Cytotoxic activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation. *J Biol Chem* 267, 5317-5323.
- Spyrou, G., Enmark, E., Miranda-Vizueté, A., and Gustafsson, J. (1997). Cloning and expression of a novel mammalian thioredoxin. *J Biol Chem* 272, 2936-2941.
- Stamler, J. S., Lamas, S., and Fang, F. C. (2001). Nitrosylation. the prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* 106, 675-683.
- Stamler, J. S., Singel, D. J., and Loscalzo, J. (1992). Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms [see comments]. *Science* 258, 1898-1902.
- Stamler, J. S., Toone, E. J., Lipton, S. A., and Sucher, N. J. (1997). (S)NO signals: translocation, regulation, and a consensus motif. *Neuron* 18, 691-696.
- Sun, J., Xin, C., Eu, J. P., Stamler, J. S., and Meissner, G. (2001). Cysteine-3635 is responsible for skeletal muscle ryanodine receptor modulation by NO. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 11158-11162.
- Suttorp, N., Kästle, S., and Neuhof, H. (1991). Glutathione redox cycle is an important defense system of endothelial cells against chronic hyperoxia. *Lung* 169, 203-214.

- Tabuchi, A., Sano, K., Oh, E., Tsuchiya, T., and Tsuda, M. (1994). Modulation of AP-1 activity by nitric oxide (NO) in vitro: NO-mediated modulation of AP-1. *FEBS Lett* 351, 123-127.
- Takemura, S., Minamiyama, Y., Imaoka, S., Funae, Y., Hirohashi, K., Inoue, M., and Kinoshita, H. (1999). Hepatic cytochrome P450 is directly inactivated by nitric oxide, not by inflammatory cytokines, in the early phase of endotoxemia. *J Hepatol* 30, 1035-1044.
- Tanaka, T., Nakamura, H., Nishiyama, A., Hosoi, F., Masutani, H., Wada, H., and Yodoi, J. (2001). Redox Regulation by Thioredoxin Superfamily; Protection Against Oxidative Stress and Aging. *Free Radic Res* 33, 851-855.
- Taniguchi, Y., Taniguchi-Ueda, Y., Mori, K., and Yodoi, J. (1996). A novel promoter sequence is involved in the oxidative stress-induced expression of the adult T-cell leukemia-derived factor (ADF)/human thioredoxin (Trx) gene. *Nucleic Acids Res* 24, 2746-2752.
- Tenneti, L., D'Emilia, D. M., and Lipton, S. A. (1997). Suppression of neuronal apoptosis by S-nitrosylation of caspases. *Neurosci Lett* 236, 139-142.
- Traub, O., and Berk, B. C. (1998). Laminar shear stress: mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18, 677-685.
- Tschudi, M. R., Barton, M., Bersinger, N. A., Moreau, P., Cosentino, F., Noll, G., Malinski, T., and Luscher, T. F. (1996). Effect of age on kinetics of nitric oxide release in rat aorta and pulmonary artery. *J Clin Invest* 98, 899-905.
- Tsikas, D., Sandmann, J., Rossa, S., Gutzki, F. M., and Frolich, J. C. (1999). Investigations of S-transnitrosylation reactions between low- and high-molecular-weight S-nitroso compounds and their thiols by high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem* 270, 231-241.
- Uematsu, M., Ohara, Y., Navas, J. P., Nishida, K., Murphy, T. J., Alexander, R. W., Nerem, R. M., and Harrison, D. G. (1995). Regulation of endothelial cell nitric oxide synthase mRNA expression by shear stress. *Am J Physiol* 269, C1371-1375.
- van der Loo, B., Labugger, R., Skepper, J. N., Bachschmid, M., Kilo, J., Powell, J. M., Palacios-Callender, M., Erusalimsky, J. D., Quaschnig, T., Malinski, T., *et al.* (2000). Enhanced peroxynitrite formation is associated with vascular aging. *J Exp Med* 192, 1731-1744.
- Weil, M., Jacobson, M. D., Coles, H. S., Davies, T. J., Gardner, R. L., Raff, K. D., and Raff, M. C. (1996). Constitutive expression of the machinery for programmed cell death. *J Cell Biol* 133, 1053-1059.
- White, C. R., Brock, T. A., Chang, L. Y., Crapo, J., Briscoe, P., Ku, D., Bradley, W. A., Gianturco, S. H., Gore, J., Freeman, B. A., and *al., e.* (1994). Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 1044-1048.
- Wilcox, J. N., Subramanian, R. R., Sundell, C. L., Tracey, W. R., Pollock, J. S., Harrison, D. G., and Marsden, P. A. (1997). Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17, 2479-2488.

Zeiber, A. M. (1996). Endothelial vasodilator dysfunction: pathogenetic link to myocardial ischaemia or epiphenomenon ? *Lancet* 348, S10-S12.

Zeiber, A. M., Drexler, H., Saurbier, B., and Just, H. (1993). Endothelium-mediated coronary blood flow modulation in humans. Effects of age, atherosclerosis, hypercholesterolemia, and hypertension. *J Clin Invest* 92, 652-662.

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

Teilpublikationen

Teile dieser Arbeit sind in folgenden Arbeiten publiziert bzw. zur Publikation eingereicht:

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

Hoffmann, J.*, Haendeler, J*., Zeiher, A. M., and Dimmeler, S. (2001). TNFalpha and oxLDL induce a denitrosylation of proteins in endothelial cells. *J Biol Chem* 276, 41383-41387. (* contributed equally)

Rössig, L., **Hoffmann, J.**, Hugel, B., Mallat, Z., Haase, A., Freyssinet, J.-M., Tedgui, A., Aicher, A., Zeiher, A., and Dimmeler, S. (2001). Vitamin C inhibits endothelial cell apoptosis in congestive heart failure. *Circulation* 104, 2182-2187.

Haendeler, J., **Hoffmann, J.**, Tischler, V., Berk, B.C., Zeiher A.M., and Dimmeler, S. (2002). Redox regulatory and anti-apoptotic functions of thioredoxin depend on S-nitrosylation at cysteine 69. *Nat. Cell Biol.* doi 10.1038/ncb851.

Haendeler, J., Tischler, V., **Hoffmann, J.**, Zeiher, A.M., and Dimmeler S. (2002). Low doses of reactive oxygen species protect endothelial cells from apoptosis by increasing thioredoxin expression, eingereicht

Lebenslauf

Name: Hoffmann
Vorname: Jörg
Geburtstag: 15.05.1973
Geburtsort: Frankfurt

Staatsangehörigkeit: Deutsch
Wohnort: Röderbergweg 108, 60385 Frankfurt

Schulische Ausbildung:

1979 – 1983 Grundsschule Ober - Eschbach

1983 – 1992 Gymnasium Kaiserin Friedrich Schule

1992 Abitur an der Kaiserin Friedrich Schule mit der Gesamtnote 2,1

Hochschulausbildung:

Okt. 1993 – Sept. 1999 Studium der Biologie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main

Oktober 1995 Diplomvorprüfung in Biologie mit der Gesamtnote „befriedigend“

November 1998 Diplomhauptprüfung mit der Gesamtnote „sehr gut“
Hauptfach: Anthropologie und Humangenetik bei Prof. Dr. Starzinski-Powitz und Prof. Dr. Protsch von Zieten
Nebenfach: Zoologie bei Prof. Dr. Fleissner
Nebenfach: Pharmakologie bei Prof. Dr. Schmalzing

Januar 1999	Beginn der Diplomarbeit bei Prof. Dr. Starzinski-Powitz in der Humangenetik zum Thema: Die Rolle des <i>armadillo</i> Proteins β -Catenin während der Differenzierung von Muskelzellen in Kultur.
September 1999	Abschluß des Biologiestudiums als Diplombiologe mit der Gesamtnote „sehr gut“
November 1999	Beginn des Promotionsstudiums unter der Betreuung von Prof. Dr. Starzinski-Powitz. Die Arbeit wurde an der Universitätsklinik in Frankfurt am Main in der Abteilung Molekulare Kardiologie unter der Leitung von Prof. Dr. S. Dimmeler zum Thema:“Identifizierung der Regulationsmechanismen für die S-Nitrosylierung / Denitrosylierung.“
September 2000 - Oktober 2002	Stipendiat des Boehringer Ingelheim Fonds
September 2002	Einreichung der Promotionsarbeit