

Aus dem Fachbereich der Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main
Klinik für Urologie und Kinderurologie
Direktor: Prof. Dr. med. Dietger Jonas

**Einfluß von Apolipoprotein H auf die Endothelmodifikation und
Endothelaktivität**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin des Fachbereiches Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main

vorgelegt von
Eva Maria Ringel
aus
Frankfurt am Main

Frankfurt am Main, 2009

Dekan:	Prof. Dr. J. M. Pfeilschifter
Referent:	Prof. Dr. R. A. Blaheta
Koreferent:	Prof. Dr. H. W. Dörr
Tag der mündlichen Prüfung:	07. Oktober 2009

Für meine Mutter.

Die mein Leben mit ihrer unermüdlichen Liebe und Fürsorge immer wieder zu einem ganz Besonderen macht.

Und für meinen Vater.

Auf dessen wunderbare Unterstützung ich definitiv nicht verzichten möchte.

Danke - für einfach alles.

„Das Leben ist eine fortwährende Ablenkung, die nicht einmal zur
Besinnung darüber kommen lässt, wovon sie ablenkt.“

Franz Kafka (1883-1924)

Inhaltsverzeichnis

1	Verzeichnis der Abkürzungen	V
2	Einleitung	1
2.1	Grundlage	1
2.1.1	ApoH	1
2.1.2	Physiologie	2
2.1.3	Pathologie	4
2.1.4	Angiogenese	5
2.1.5	Annexin II	7
2.2	Fragestellung	7
3	Material und Methode	9
3.1	Material	9
3.1.1	Laborgeräte	9
3.1.2	Materialien	10
3.1.3	Test-Kits	10
3.1.4	Chemikalien und Biochemikalien	11
3.1.5	Antikörper	13
3.1.6	Antikörper für die FACS-Analyse	13
3.1.7	Antikörper für die Western Blot Analyse	14
3.1.8	Kulturmedien und -seren	14
3.1.9	Grundmedium	15
3.1.10	FACS-Puffer	15
3.1.11	HUVEC-Vollmedium	15
3.1.12	Pufferlösungen	16
3.1.13	Gele	17
3.2	Methoden	18
3.2.1	Verwendete Zellen	18
3.2.2	Methoden der Zellkultur	18
3.2.3	Isolierung der humanen Endothelzellen (HUVEC)	18

3.2.4	Kultivierung der Zellen	18
3.2.5	Gewinnung der Peripheral Blood Mononuclear Cells . .	19
3.2.6	Modifikation von ApoH	19
3.2.7	Proliferations-Assay mit Bovinen Kapillarendothelzellen	20
3.2.8	Chromatographie der modifizierten Form von ApoH . .	21
3.2.9	Bestimmung der Kinasenaktivität mittels Durchfluß- zytometrie	21
3.2.10	Probengewinnung für die FACS-Analyse	21
3.2.11	Inkubation der Zellen mit ApoH	21
3.2.12	Fixierung und Perforation der Zellen	22
3.2.13	Antikörperfärbung der Zellen	22
3.2.14	Bestimmung der Zell-Zyklusphasen mittels Durchfluß- zytometrie	23
3.2.15	Vorbereitung der Zellen	23
3.2.16	Inkubation der Zellen mit ApoH	23
3.2.17	Inkubation mit den CycleTest TM Plus-Lösungen und Mes- sung	24
3.2.18	Quantifizierung der Proteinexpression mittels Western Blot	24
3.2.19	Vorbereitung der Zellen	25
3.2.20	Inkubation der Zellen mit ApoH	25
3.2.21	Gewinnung des Zellysats	25
3.2.22	Proteinquantifizierung nach Lowry	26
3.2.23	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Proteinauf- trennung	26
3.2.24	Western Blot	26
3.2.25	Antikörperbindung	27
3.2.26	Chemilumineszenz	28
3.2.27	Statistik	28
4	Ergebnisse	29
4.1	Modifikation von ApoH	29

4.2	Aufreinigung von ApoH und cApoH	29
4.3	Einfluß von ApoH auf die Proliferation	30
4.4	Zell-Zyklus	33
4.5	Western Blot-Untersuchungen zu den Zell-Zyklus-Proteinen . .	35
4.6	Einfluß von ApoH auf die Signaltransduktion	35
4.6.1	Phospho-p 38	36
4.6.2	Phospho-JNK	36
4.6.3	Phospho-ERK 1/2	39
4.7	Analysen zur Expressionskinetik der Signalproteine	39
4.7.1	Phospho-p 38	39
4.7.2	Phospho-JNK	39
4.8	Western Blot	42
4.8.1	Auswirkungen auf die MAP-Kinasen	42
5	Diskussion	43
5.1	ApoH	43
5.2	Angiogenese	44
5.3	Auswirkungen auf die Proliferation	46
5.4	Rolle der MAP-Kinasen	47
5.4.1	Die MAP-Kinase p 38	47
5.4.2	Die MAP-Kinase JNK	47
5.4.3	Die MAP-Kinase ERK	49
5.5	Eigene Ergebnisse	49
5.6	Zell-Zyklus	51
5.7	Ausblick	52
6	Zusammenfassung/Summary	54
6.1	Zusammenfassung	54
6.2	Summary	55
7	Literaturverzeichnis	57
8	Danksagungen	71

Inhaltsverzeichnis	IV
--------------------	----

9 Lebenslauf	73
---------------------	-----------

10 Erklärung	74
---------------------	-----------

1 Verzeichnis der Abkürzungen

μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
AK	Antikörper
APDS	Ammonium Peroxo Disulfat
ApoER2	Apolipoprotein E Rezeptor 2
ApoH	Apolipoprotein H
APS	Anti-Phospholipid-Syndrom
Bax	BCL 2-associated X Protein
BCE	Bovine Kapillarendothelzellen
BCL 2	B-Zell Lymphom 2
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca	Calcium
CD 40	Cluster of Differentiation 40
Cdk 4	Cyclin-dependant Kinase 4
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium
DMSO	Di-Methyl-Sulfoxid
ECGM	Endothelial Cell Growth Medium
ECGS	Endothelial Cell Growth Supplement
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EGF	Endothelial Growth Factor
ERK	Extra-zellulär Signalregulierte Kinase
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
Fas	F7-associated Surface Protein
g	Gramm
<i>g</i>	Gravitation
h	Stunde
Hd	Heidelberg
HRP	Horseradish-Peroxidase
HUVEC	Humane Umbilikalendothelzellen
ICAM-I	Intercellular Adhesion Molecule I

IL-1	Interleukin 1
JNK	C-Jun N-terminale Kinase
kD	Kilodalton
Lp a	Lipoprotein (a)
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MG	Molekulargewicht
Mg	Magnesium
min	Minute
mk	monoklonal
ml	Milliliter
oxLDL	oxidized Low Density Lipoprotein
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphatpuffer
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluorid
pk	polyklonal
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat
SDS-PAGE	SDS-Poly-Acrylamid-Gel-Elektrophorese
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
TCA	Trichloracetic Acid
TEMED	Tetra-Methyl-Ethylen-Diamin
TNF	Tumor-Nekrose Faktor
t-PA	Tissue-Type Plasminogen Activator
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

2 Einleitung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit den Auswirkungen von Apolipoprotein H (ApoH) und zusätzlich der modifizierten Form, „clipped“, ApoH (cApoH), auf die intrazelluläre Signalübertragung von Endothelzellen. Es wird vermutet, dass ApoH und cApoH Einfluß auf die Angiogenese haben. Dieser Einfluß stellt sich im Rahmen von Veränderungen der Endothelzellaktivität dar.

2.1 Grundlage

Zunächst werden die theoretischen Grundlagen definiert. Im Einzelnen sind dies die chemischen und physiologischen Grundlagen von ApoH, die Wirkungsweise von ApoH auf das Gerinnungssystem sowie die Pathomechanismen. Nach der Definierung der Grundlagen bilden Beschreibung und Bedeutung der Angiogenese im Zusammenhang mit ApoH den Abschluß des ersten Kapitels.

2.1.1 ApoH

ApoH ist ein stark glykosiliertes Serumprotein mit einem Molekulargewicht von 54 kDa. Es wurde Anfang der Siebziger Jahre erstmals als eine Komponente der Beta-2-Globulin-Fraktion von Humanserum beschrieben und wird daher in der Literatur auch als Beta-2-Glykoprotein I bezeichnet (Schultze et al., 1961). Das monomere Protein besteht aus 326 Aminosäuren und besitzt vier, sich wiederholende Domänen aus jeweils 60 Aminosäuren, welche durch Disulfidbindungen zu sogenannten Sushi-Domänen bzw. Short Consensus Repeats (SCR) verbunden sind (siehe Abb. 1). An die fünfte Domäne schließt sich ein 20 Aminosäuren langer C-terminaler Schwanz an, der zur Ausbildung einer dritten Disulfidbrücke führt (Day et al., 1992).

Der hohe Lysin-Anteil (Steinkasserer et al., 1992, Hunt et al., 1994) der fünften Domäne scheint für die Ausbildung der positiv geladenen Phospholipid-Binde-Region (siehe Abb. 2) verantwortlich zu sein (Bouma et al., 1999,

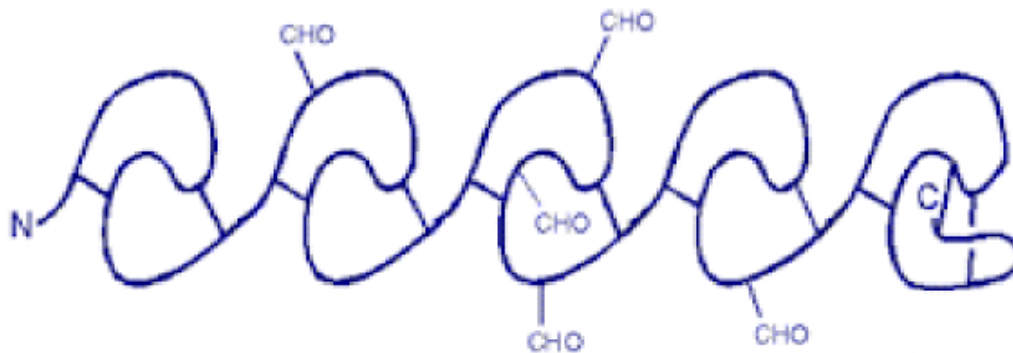


Abbildung 1: Molekül-Struktur von ApoH

Schwarzenbacher et al., 1999). Der C-terminale Schwanz liegt frei vor und kann sowohl durch Plasmin als auch in abgeschwächter Form durch Faktor Xa enzymatisch verändert und zu einer geclippten Form des Proteins (cApoH) umgewandelt werden (Shi et al., 2004, Sheng et al., 1996). Die Produktion von ApoH findet sowohl in der Leber, als auch in der Plazenta, in Neuralzellen, in Nierenzellen und in Endothelzellen statt (Averna et al., 1997, Chamley et al., 1997, Caronti et al., 1999). Ferner zeigte sich in der Milz, dem Herz, dem Magen, dem Dünndarm, der Prostata und im Gehirn von normalen Rattengewebe eine erhöhte Proteinexpression (Ragusa et al., 2000).

2.1.2 Physiologie

Die physiologische Funktion des Proteins ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Da jedoch mehr als 30 % des Proteins im Serum an Lipoproteine gebunden ist, wird ihm eine Rolle im Lipidstoffwechsel zugeschrieben (Polz et al., 1979). Die Bindung von ApoH an Cardiolipin führt zu einer Konformationsänderung des Proteins und einer Bildung von neuen antigenen Epitopen (Palinski et al., 1996, Horkko et al., 1997). In Bezug auf ApoH und dessen Wirkung auf das Gerinnungssystem zeigt sich, dass die Plasmakonzentration von ApoH 150-300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ beträgt und es somit neben Fibrinogen eines der Gerinnungsproteine mit der höchsten Konzentration im Plasma ist (Mehdi et al., 2003).

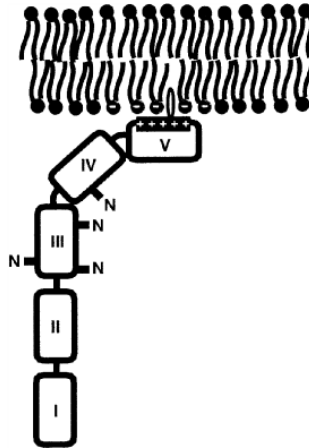


Abbildung 2: ApoH Bindung an Phospholipid-Doppelschicht. (de Groot et al., 2000)

ApoH hemmt die Aktivität der Prothrombinase, ein Enzymkomplex, welcher die inaktive Protease Prothrombin in seine aktive Form Thrombin umwandelt, in humanen Thrombozyten. Gleichzeitig werden die von Faktor X, ein im Blutplasma vorkommender Gerinnungsfaktor, aktivierten Komplexe inhibiert sowie die ADP-induzierte Thrombozytenaggregation verhindert (Nimpf et al., 1986, Shi et al., 1993). Shi beschrieb 2004 den Einfluß von ApoH auf die Koagulationskaskade. In *in vitro* Experimenten kam es zur Bindung von ApoH an Faktor XI, dadurch wurde die Aktivierung von Faktor XI verhindert. Im Gegensatz dazu konnte die geclippte Form die Aktivierung von Faktor XI nicht blockieren (Shi et al., 2004). Desweiteren wird durch ApoH die Kontaktaktivierung des intrinsischen Gerinnungssystems (Schousboe et al., 1985) und die Aktivierung des Hageman Faktors (XII) inhibiert (Henry et al., 1988). Begründet durch diese Erkenntnisse wird ihm eine antikoagulierende Wirkung zugeschrieben.

Neuere Erkenntnisse von Lopez-Lira et al. aus dem Jahr 2006 zeigen, dass IgG Anti-ApoH-Antikörper ApoH an der Endotheloberfläche erkennen und zu einer Erhöhung der Expression von ICAM-I, einem interzellulären Adhisionsmolekül führen. Gleichzeitig kommt es zu einer verminderten Expression von Thrombomodulin auf den Endothelzellen. Diese Veränderungen führen

zur Aktivierung der Endothelzellen und einem pro-thrombotischen Zustand, der im weiteren Verlauf die Entstehung einer Thrombose begünstigen kann.

2.1.3 Pathologie

Bei dem Antiphospholipid Syndrom (APS), einer Autoimmunerkrankung, die mit Thrombosen und habituellen Aborten einhergeht, gilt ApoH neben Prothrombin und Haptoglobin als eines der entscheidenden Targetproteine (Galli et al., 1990, McNeil et al., 1990, Matsuura et al., 1990, Shapiro et al., 1996, Kandiah et al., 1998). Im Zuge dieser Erkrankung kommt es durch den Organismus zur Bildung von Auto-Antikörpern gegen o.g. Targetproteine, im speziellen Anti-ApoH-Antikörper.

Im Rahmen der Pathogenese von APS-assoziierten Thrombosen bindet ApoH an Thrombozyten und Endothelzellen. An das ApoH wiederum assoziieren dann die gebildeten Anti-ApoH-Antikörper, was letzten Endes zu einer Aktivierung der Endothelzellen führt (Wurm, 1984, Polz et al., 1979).

Das Krankheitsbild der Artherosklerose wird definiert als eine variable Kombination von Veränderungen der Gefäßintima, bestehend aus einer herdförmigen Ansammlung von Fettsubstanzen, komplexen Kohlenhydraten und Blutbestandteilen. In den Industrieländern führt die Artherosklerose als Hauptursache für Herzinfarkte und zerebralen Infarkte zu einer großen Anzahl von Todesfällen. Im Frühstadium der Erkrankung spielen die sogenannten „Schaumzellen“, eine große Rolle. Bei den Zellen handelt es sich um Makrophagen, welche in ihrem Zytoplasma zahlreiche Lipidvakuolen gespeichert haben und sich als Lipidflecken an die Intima anlagern. Die Bindung von ApoH und Anti-ApoH-Antikörpern an oxidierte Low Density Lipoproteine (oxLDL) führt zu einer verstärkten Aufnahme der oxLDL durch Makrophagen (Hasunuma et al., 1997). Die Aufnahme von oxLDL führt dann zur Bildung der „Schaumzellen,“. Liegt ApoH durch die enzymatische Veränderung mit Plasmin in der geclippten Version vor, verliert es die Eigenschaft an oxLDL zu binden und somit ist auch eine Bindung von Auto-ApoH-Antikörpern an diese nicht möglich (Matsuura et al., 2000). Kochl et al. fanden 1997 heraus,

dass ApoH mit hoher Affinität an das atherogene Lipoprotein a (Lp a), ein Fett-Eiweiss-Komplex, welcher eine Variante des bekannten LDL darstellt, bindet.

2.1.4 Angiogenese

Neuere Untersuchungen zeigen eine weitere Funktion von ApoH auf. Darin fungiert es als endogener Angiogenese-Inhibitor. Als Angiogenese bezeichnet man einen Vorgang, bei dem Endothelzellen zum Aufbau neuer Blutgefäße aus bereits vorhandenen Kapillaren angeregt werden (Risau et al., 1997). Die Entstehung der neuen Gefäße kann durch zwei unterschiedliche Mechanismen stattfinden (siehe Abb. 3). Einerseits durch Sprossung von Endothelzellen und andererseits durch die sogenannte Intussuszeption, der Teilung eines vorhandenen Gefäßlumens (Patan et al., 2000).

Das Feld der Angiogeneseforschung wurde mit dem im Jahre 1971 erschienenen Artikel von Judah Folkman im „New England Journal of Medicine“, eröffnet. Darin postulierte er, Tumorwachstum sei angiogeneseabhängig und somit durch Angiogeneseinhibitoren beeinflussbar (Folkman, 1971).

Physiologischerweise findet Angiogenese im Organismus insbesondere während der embryonalen Entwicklung, der Wundheilung und der Reifung des Corpus luteum statt (Folkman et al., 1992).

Neben Krebserkrankungen spielt eine Verstärkung der Angiogenese auch bei anderen Erkrankungen wie z.B. der proliferativen Maculadegeneration (Cleary et al, 2008), der Endometriose, der Arthritis und bei Psoriasis eine große Rolle (Folkman, 2003). Daher sind sowohl die Stimulation der Angiogenese zur Ausbildung neuer Blutgefäße in ischämischen Gebieten, als auch ihre Inhibierung im Rahmen der Tumorthherapie von besonderem therapeutischem Interesse (Folkman et al., 1992).

In der Tat steht die Aktivierung der Angiogenese in engem Zusammenhang mit dem Tumorwachstum und seiner Gefäßversorgung. Da die Versorgung eines Tumors mit dem bestehenden Kapillarsystem nur bis zu einer Tumorgöße von 1 mm^3 möglich ist, müssen die Tumorzellen durch Veränderun-

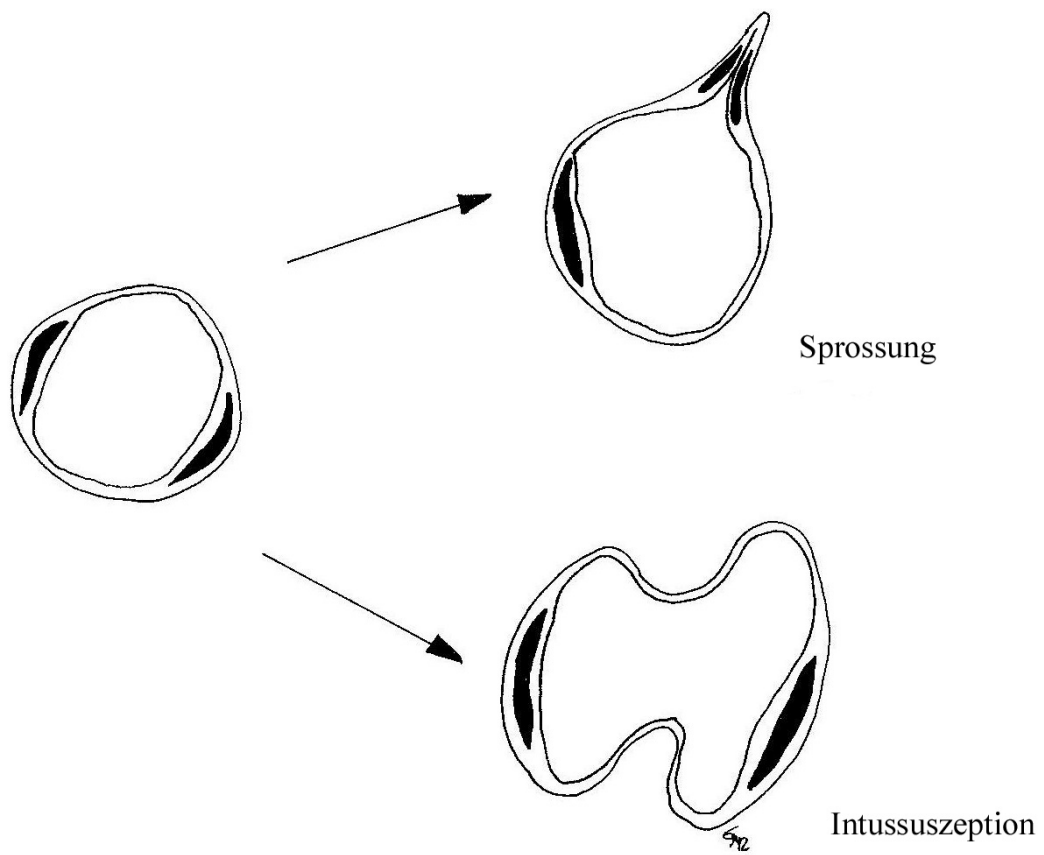


Abbildung 3: Angiogenese-Mechanismen

gen auf molekularer Ebene in der Lage sein, die Endothelzellen zum Wachstum zu stimulieren und somit ihre Nährstoffzufuhr zu sichern (Hanahan et al., 1996). Eine Inhibition der Tumorangiogenese könnte durch unterschiedliche Mechanismen erfolgen. Die Neutralisation von bereits sezernierten proangiogenen Faktoren sowie eine direkte Hemmung der angiogenen Antwort der Endothelzellen sind ebenso vorstellbar wie eine frühzeitige Hemmung der Freisetzung proangiogener Faktoren aus den Tumorzellen (Folkman, 1992).

Interessanterweise konnte kürzlich ein Zusammenhang zwischen ApoH und der Angiogenese demonstriert werden. Offensichtlich führt die geclippte Form des ApoH (cApoH) zu einer Hemmung der endothelialen Proliferation (Beecken et al., 2006).

2.1.5 Annexin II

Da die Bindung von ApoH an Endothelzellen durch den Annexin-II-Rezeptor vermittelt wird (Ma et al., 2000), beschäftigt sich die vorliegende Arbeit im Rahmen der Versuche mit der Annexin-II-Blockade. Der endotheliale Annexin-II-Rezeptor ist der Annexin-Familie zuzuordnen, welche aus mehreren, strukturell verwandten Proteinen besteht. Alle Proteine dieser Familie weisen eine C-terminal gelegene Core-Domäne auf (Rand et al., 1999). Diese Core-Domäne besitzt bei den verschiedenen Annexinen eine Homologie von 40-70 Prozent und besteht aus einer Serie von 70 Aminosäuren Repeats. Im Gegensatz dazu sind die Länge sowie die Aminosäuren-Zusammensetzung des N-terminalen Schwanzes sehr unterschiedlich (Raynal et al., 1994). Annexin II vermittelt die Bindung von Tissue-type Plasminogen Activator (t-PA) an Endothelzellen durch Interaktion mit der LCKLSL-Sequenz in seiner N-terminalen Schwanz-Domäne (Hajjar et al., 1998, Cesarman et al., 1994).

2.2 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist daher, die Wirkung von ApoH und cApoH auf Endothelzellen zu analysieren. Im Zuge dieser Fragestellung wurden die Messungen im

Zellkulturmodell mit humanen Endothelzellen und bovinen Kapillarendothelzellen durchgeführt. Die Schwerpunkte der Untersuchungen waren Proliferation, Zell-Zyklus-Analysen sowie intrazelluläre Signalkaskaden. Bezüglich der intrazellulären Signalkaskaden wurde die Aktivierung der Mitogen-activated-Protein-Kinasen (MAPK) im Zellkulturmodell untersucht.

3 Material und Methode

3.1 Material

3.1.1 Laborgeräte

Gerätebezeichnung	Hersteller
Agarosegeldokumentation Gel Doc 1000	BioRad (München)
Agarosegelkammer Modell PS 250	Hybaid (Ulm)
ÄKTA	Pharmacia (Schweden)
Brutschrank für Zellkulturen	Heraeus (Hanau)
Durchflusszytometer FACScan	BD Biosciences (Heidelberg)
Entwicklermaschine Typ Unix 60	AGFA (Köln)
Flüssigszintillationszähler 1219 Rackbeta	LKB, Wallace (USA)
Heizblock Thermoblock TB1	Biometra (Göttingen)
Isotemp 205	Fisher Scientific (USA)
Lichtmikroskop Photomikroskop III	Zeiss (Jena)
Magnetrührer	Kika Labortechnik (Staufen)
Mini-Schüttler	Ika-Works (Wilmington/USA)
Netzgerät PowerPac 300 Power Supply	Biorad (München)
pH-Meter Typ 632	Metrohm (Herisau/Schweiz)
Pipettierhilfe	Biohit (Helsinki/Finnland)
Protein-Minigel-Apparatur	Biorad (München)
Protein-Transfer-Apparatur	Biorad (München)
SDS-Polyacrylamid Mini Protein II	Biorad (München)
Spektrometer Uvikon 933	Kontron (Groß-Zimmern)
Sterilbank HERA safe	Heraeus (Hanau)
Tischschüttler Polymax 1040	Heidolph (Schwalbach)
Waagen	
Typ 2442	Sartorius (Göttingen)
Typ 3706	Sartorius (Göttingen)
Zentrifugen	
Centrifuge 5402, Rotor F-45-18-11	Eppendorf (Hamburg)
Rotanta/RP, Rotor 5094A1289	Hettich (Kirchlangen)

3.1.2 Materialien

Material	Hersteller
Blotting-Papier Typ GB002	Schleicher und Schüll (Dassel)
Einmalkanülen, steril	BD Biosciences (Heidelberg)
Einmalpipetten, steril	Costar Corning (NY/USA)
FACS-Röhrchen	Falcon (Heidelberg)
Filterpapier	VWR International (Darmstadt)
HiTrap™ Heparin-Säule (1 ml)	Pharmacia (Schweden)
Nitrozellulosemembran	Amersham (Braunschweig)
Neubauer-Zählkammer	W. Schreck (Hofheim/TS)
Pasteurpipetten, steril	BD Biosciences (Heidelberg)
Pipetten MicroOne	Starlab (Ahrensburg)
Pipettenspitzen	Starlab (Ahrensburg)
Polystyrolzellkulturflaschen	Sarstedt (Nümbrecht)
Reaktionsgefäße (1.5 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Röntgenfilm Typ Hyperfilm™ ECTM	Amersham (Braunschweig)
Schwammtücher	Biorad (München)
Steri-Cult 200 Forma	Scientific (Langen)
Sterilfilter (0.22 und 0.44 µm)	Millipore (Schwalbach)
Zellkulturplatten (6-, 24- und 48-Loch)	Sarstedt (Nümbrecht)
Zentrifugenröhrchen (15 und 50 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)

3.1.3 Test-Kits

Kit-Bezeichnung	Hersteller
Chemolumineszenz-Lösung A und B	Amersham-Buchler (Braunschweig)
CycleTest™ Plus	BD Biosciences (Heidelberg)
DC-Protein-Assay	Biorad (München)
Western Blotting Substrate ECL	Pierce (Rockford, USA)

3.1.4 Chemikalien und Biochemikalien

Chemikalien und Biochemikalien	Hersteller
Accutase	PAA Lab. GmbH (Pasching)
Acrylamidlösung (30 %)	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumperoxodisulfat (APDS)	Merck (Darmstadt)
Aqua dest.	Braun (Melsungen)
Biocoll Trennlösung	Biochrom AG (Berlin)
Bisacrylamidlösung (2 %)	Roth (Karlsruhe)
bFGF	Scios Nova (Mountain View, USA)
Beta-2-Glykoprotein I (ApoH)	Cell Systems (St. Katharinen)
Calciumchlorid	AppliChem (Darmstadt)
ChemichromeTN Ultimate	Sigma (Taufkirchen)
Color Marker Wide Range	Sigma (Taufkirchen)
Developer G153 (A+B)	AGFA (Mortsel, Belgien)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck (Darmstadt)
Dispase	Sigma (Taufkirchen)
Dulbecco´s PBS	Invitrogen/Gibco (Karlsruhe)
Dulbecco´s PBS (ohne Ca+Mg)	PAA Lab. GmbH (Pasching)
Elektrophorese Marker ColorBurst™	Sigma (Taufkirchen)
Ethanol (EtOH)	Merck (Darmstadt)
Gentamycin	Bio Whittaker (Verviers, Belgien)
Glutamax	Invitrogen/Gibco (Karlsruhe)
Glycin	AppliChem (Darmstadt)
Heparin-Natrium (5000 I.E)	Ratiopharm (Ulm)
Hepes Buffer 1 M	Bio Whittaker (Verviers, Belgien)
IC Fix™	BioSource Int. Inc. (USA)
IC Perm™	BioSource Int. Inc. (USA)
Isopropanol	Sigma (Taufkirchen)
Laemmli Sample Buffer	Biorad (München)

Chemikalien und Biochemikalien	Hersteller
Loading Dye	Promega (Mannheim)
Magermilchpulver (Naturaflor)	Töpfer (Dietmannsried)
Mercaptoethanol	Merck (Darmstadt)
Methanol	J.T. (Backer, Holland)
Natriumchlorid	AppliChem (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem (Darmstadt)
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma (Taufkirchen)
Penicillin/Streptomycin (5.000 U/ml)	Invitrogen/Gibco (Karlsruhe)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma (Taufkirchen)
Plasmin (humanes)	Cell Systems (St. Katharinen)
Rapid Fixer G354	AGFA (Mortsel, Belgien)
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich (Steinheim)
Szintillationslg. Ultima Gold	Packard (Canberra, USA)
Trichloressigsäure (TCA)	Sigma Aldrich (Steinheim)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Roth (Karlsruhe)
Tris	AppliChem (Darmstadt)
Trypanblau	Gibco (Karlsruhe)
Tween 20	AppliChem (Darmstadt)
Trypsin	PAA Lab. GmbH (Pasching)

3.1.5 Antikörper

Antikörper	Hersteller
anti-Annexin-II, mk.	BD Transduction Lab. (Hd.)
anti-Cdk 4, mk.	BD Biosciences (Hd.)
anti-Cyclin D 1, mk.	BD Biosciences (Hd.)
anti-ERK 1/2 (pT ₂₀₂ /pY ₂₀₄), mk.	BD Biosciences (Hd.)
anti-Kip 1/p 27, mk.	BD Biosciences (Hd.)
anti-MAPK p 49 (JNK), mk.	BD Transduction Lab. (Hd.)
anti-p 38a/SAPK 2a, mk.	BD Transduction Lab. (Hd.)
anti-pan-ERK, mk.	BD Transduction Lab. (Hd.)
anti-β-Aktin, mk.	Sigma (Taufkirchen)
goat anti-mouse IgG-HRP, pk.	Upstate Biotech. Inc. (NY, USA)
PE labeled goat anti-mouse, pk.	BD Biosciences (Hd.)

3.1.6 Antikörper für die FACS-Analyse

Antikörper	Verdünnung
Primär-Antikörper	1:10
Sekundär-Antikörper	
PE labeled goat anti-mouse	1:50

3.1.7 Antikörper für die Western Blot Analyse

Antikörper	Verdünnung
Primär-Antikörper	
anti-ERK 1/2	1:1000
anti-JNK (pT ₁₈₃ /pY ₁₈₅)	1:250
anti-p 38 a/SAPK 2a	1:5000
anti-p 38 (pT ₁₈₀ /pY ₁₈₂)	1:2500
anti-pan-JNK/SAPK 1	1:250
anti-β Aktin	1:1000
anti-Kip 1/p 27	1:500
anti-Cdk 4	1:250
anti-Cyclin D 1	1:250
Sekundär-Antikörper	
goat anti-mouse IgG-HRP	1:5000

3.1.8 Kulturmedien und -seren

Kulturmedien und -seren	Bezugsquelle
ECGM Medium	Promocell (Heidelberg)
ECGS (Wachstumsfaktor)	Promocell (Heidelberg)
Fetales Bovines Serum (FBS)	Invitrogen/Gibco (Karlsruhe)
Humanes Serum	Blutspendedienst (Frankfurt am Main)
Medium 199	Gibco (Karlsruhe)
DMEM Medium	Gibco (Karlsruhe)

3.1.9 Grundmedium

Komponente	Menge [ml]
Medium 199 (M 199)	500
Hepes Buffer 1 M	10
Heparin	0.5
Glutamax	5
Gentamycin	1

3.1.10 FACS-Puffer

Komponente	Menge
PBS ohne Calcium und Magnesium	500 ml
Bovines Serum Albumin	2.5 g

3.1.11 HUVEC-Vollmedium

Komponente	Menge [ml]
Grundmedium	318
Fetales Bovines Serum (FBS)	40
Humanes Serum	40
Endothelialer Wachstumsfaktor (ECGS)	4

3.1.12 Pufferlösungen

Lösung	Zusammensetzung
Lauf-Puffer	0.25 M Tris, pH 8.3 1.92 M Glycin 0.1 % SDS
Lysis-Puffer-Stammlösung	20 mM, pH 7.5 Tris HCl 20 mM NaF 10 mM NaPPi 150 mM NaCl
Lysis-Puffer-Gebrauchslösung	96.4 % Lysis-Puffer-Stammlösung 1.2 % PIM (12 μ l/ml) 1 % Okadic acid (10 mM) 1 % Ortho-Vanadat (Na_3VO_4) 0.4 % PMSF (4 μ l/ml)
Proben-Puffer	Laemmli Proben-Puffer
Antikörper-Puffer	0.5 % BSA 0.9 % NaCl 10 mM Tris (pH 7.4) 0.5 % Tween 20
Blockierlösung	10 % Magermilchpulver 0.9 % NaCl 10 mM Tris (pH 7.4)
Blot-Puffer	0.9 % NaCl 10 mM Tris (pH 7.4) 0.5 % Tween 20
Towbin-Puffer	0.9 % NaCl 10 mM Tris (pH 7.4)
Transfer-Puffer	25 mM Tris (pH 8.3) 192 mM Glycin 20 vol % Methanol

3.1.13 Gele

Sammelgel (4 %)	Zusammensetzung
Acrylamid A	1.3 ml
APDS (10 %)	100 μ l
dH ₂ O	5.4 ml
Bisacrylamid B	0.6 ml
SDS (10 %)	100 μ l
TEMED	20 μ l
Sammelgel-Puffer (1.125 M Tris (pH 6.8))	2.5 ml
Trenngel (7 %)	Zusammensetzung
Acrylamid A	2.3 ml
APDS (10 %)	100 μ l
dH ₂ O	3.9 ml
Bisacrylamid B	1.1 ml
SDS (10 %)	100 μ l
TEMED	10 μ l
Trenngel-Puffer (1.125 M Tris (pH 8.8))	2.5 ml
Trenngel (12 %)	Zusammensetzung
Acrylamid A	3.9 ml
APDS (10 %)	100 μ l
dH ₂ O	1.75 ml
Bisacrylamid B	1.8 ml
SDS (10 %)	100 μ l
TEMED	10 μ l
Trenngel-Puffer (1.125 M Tris (pH 8.8))	2.5 ml

3.2 Methoden

3.2.1 Verwendete Zellen

Im Rahmen der Versuche wurden Humane Endothelzellen (HUVEC) verwendet, die aus der Nabelschnurvene stammen. Es handelt sich bei den Endothelzellen um adhärenzte Zellen. Die Nabelschnüre wurden freundlicherweise von den Mitarbeitern der Klinik für Frauenheilkunde (Frankfurt am Main) zur Verfügung gestellt. Desweiteren wurden im Rahmen der Endothelzellaktivitätsassays Bovine Kapillarendothelzellen (BCE) verwendet, welche freundlicherweise von den Mitarbeitern des Vascular Biology Programs des Childrens Hospital in Boston (Massachusetts, U.S.A.) zur Verfügung gestellt wurden.

3.2.2 Methoden der Zellkultur

Alle Arbeiten mit den Zellen wurden an einer sterilen Werkbank unter Verwendung steriler Glas- und Plastikwaren durchgeführt, um eine Kontamination der Zellkulturen mit Keimen zu vermeiden. Die Inkubation der HUVEC- und BCE-Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre.

3.2.3 Isolierung der humanen Endothelzellen (HUVEC)

Nach dem Spülen der Nabelschnurvene mit 50 ml calciumfreiem PBS wurde sie für 10 Minuten bei 37 °C mit einer Dispaselösung inkubiert. Die durch die enzymatische Behandlung abgelösten Endothelzellen wurden mit 50 ml Medium 199 in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1.200 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in Nährmedium resuspendiert und in kleine Zellkulturflaschen (25 cm²) ausgesät.

3.2.4 Kultivierung der Zellen

Das Nährmedium der Zellen wurde alle zwei bis drei Tage gewechselt. Bei Erreichen 80 - 90 %iger Konfluenz der Zellen wurden diese mit calciumfreiem PBS (37 °C) gewaschen und anschließend für 5 Minuten bei 37 °C mit

Accutase abgelöst. Die Zellen wurden in Nährmedium aufgenommen und im Verhältnis 1:3 auf neue Zellkulturflaschen verteilt oder für Versuche verwendet. In den Experimenten wurden ausschließlich Endothelzellen der Passagen 1-3 verwendet.

3.2.5 Gewinnung der Peripheral Blood Mononuclear Cells

Die Isolierung der PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) erfolgte aus Buffy Coat-Konserven durch Dichte-Gradient-Zentrifugation über Biocoll-Trennlösung (Biochrom AG, Berlin). Die Dichte der Biocoll-Trennlösung entspricht einer Dichte von 1,077 g/ml und somit der Dichte von Lymphozyten. Mittels der Zentrifugation kommt es zu einer Ansammlung der Lymphozyten in der Interphase des Zentrifugationsgemisches. Die Buffy Coat-Konserven wurden freundlicherweise vom Blutspendedienst des Deutschen Roten Kreuzes Frankfurt am Main zur Verfügung gestellt und im Verhältnis 1:2 mit PBS (ohne Calcium und Magnesium) vermischt. Anschließend wurde das Gemisch bei 1700 rpm für 30 Minuten zentrifugiert. Der lymphozytenhaltige weiße Ring in der Interphase der Suspension wurde abgenommen, auf 15 ml Biocoll-Trennlösung überschichtet und erneut zentrifugiert (1500 rpm für 10 Minuten). Dieser Schritt wurde einmal wiederholt um die Konzentration der Lymphozyten zu erhöhen.

3.2.6 Modifikation von ApoH

Humanes Beta-2-Glykoprotein I (ApoH) wurde in PBS solubilisiert und zusammen mit Plasmin in einem molaren Verhältnis von 1:15 gemischt. Um die modifizierte Form des ApoHs herzustellen (Variation der Methode von Okhura et al., 1998), wurde die Lösung bei 37 °C für 120 Minuten inkubiert. Das modifizierte ApoH (cApoH) wurde direkt im Anschluss an die Inkubation in den Experimenten verwendet.

3.2.7 Proliferations-Assay mit Bovinen Kapillarendothelzellen

Bovine Kapillarendothelzellen (BCE) wurden mit Hilfe von Trypsin enzymatisch gelöst und in DMEM-Medium mit 10 % FBS und 1 % Glutamin-Penicillin-Streptomycin aufgenommen. Anschließend wurde die Zellzahl auf 20.000/ml eingestellt und jeweils 0.5 ml der Zellsuspension in eine Vertiefung einer 48-Well-Platte pipettiert. Die Zellen wurden für 72 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Am 3. Tag wurden pro Vertiefung 10 μ l

1. ApoH
2. cApoH
3. Plasmin oder
4. PBS

hinzugegeben. Parallel dazu wurden identische Ansätze gemacht und zusätzlich mit 10 μ l bFGF behandelt um durch die mitogene Wirkung auf die Endothelzellen auch den Einfluß von ApoH auf Zellen in der Wachstumsphase beurteilen zu können. Nach 16 Stunden Inkubation wurden 10 μ l (0.5 μ Ci) 3 H-Thymidin pro Well hinzupipettiert. Das radioaktiv markierte Thymidin wird in die DNA der proliferierenden Zellen eingelagert und kann anschließend detektiert werden. Dabei bestimmt die Rate der DNA-Synthese die Aufnahme von 3 H-Thymidin in die DNA der Zellen. Nach 5 Stunden wurde das radioaktive Medium abgesaugt und die Wells einmal mit PBS gewaschen. Nun erfolgten zuerst zwei 5-minütige Inkubationen mit Methanol und danach zwei 10-minütige Inkubationen mit kaltem (5 °C) 5 % TCA. Anschließend wurde die 48-Well-Platte dreimal mit H₂O gewaschen. Dann wurden 0.2 ml NaOH (0.3 M) pro Well hinzupipettiert und die Proben in Szintillationsgefäße überführt. Nach Hinzugabe von 3 ml Szintillationslösung pro Probe wurden die Proben mit Hilfe eines Fluid Scintillation Counters ausgezählt.

3.2.8 Chromatographie der modifizierten Form von ApoH

Für die Inkubation wurden 20 μg Plasmin und 100 μg ApoH in 1 ml PBS gelöst und bei 37 °C für drei Stunden inkubiert. Um die veränderte Form von ApoH in Reinform zu erhalten, wurde das modifizierte ApoH direkt nach der Inkubation mit Plasmin in Tris-Puffer 10fach verdünnt. Anschließend wurde das verdünnte modifizierte ApoH mit Hilfe einer HiTrapTMHeparin-Säule in einem Äkta-Chromatographen aufgereinigt. Die Elution erfolgte mit einem kontinuierlichen Gradienten von 20 mM bis 1 mM NaCl.

3.2.9 Bestimmung der Kinasenaktivität mittels Durchflußzytometrie

Mit fluoreszenz-markierten Antikörpern wurden die intrazellulären MAP-Kinasen markiert. Anschliessend konnte mit Hilfe des Durchflußzytometers (FACS) die Intensität der Fluoreszenz gemessen und somit die Kinasenaktivität in den Endothelzellen quantitativ bestimmt werden.

3.2.10 Probengewinnung für die FACS-Analyse

Bei einer Konfluenz von mindestens 75 % wurden HUVEC mit calciumfreiem PBS gewaschen und anschließend für 5 Minuten bei 37 °C mit Accutase inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in FACS-Puffer aufgenommen und für 5 Minuten bei 1.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 500 μl des FACS-Puffers resuspendiert und die Zellen in FACS-Röhrchen transferiert.

3.2.11 Inkubation der Zellen mit ApoH

Nach einer weiteren Zentrifugation von 5 Minuten bei 1.000 rpm wurden die Zellpellets mit jeweils 0.5 ml

1. ApoH
2. cApoH

3. Plasmin oder

4. Medium

resuspendiert und für 90 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 1.5 ml FACS-Puffer gewaschen und für 5 Minuten bei 1.000 rpm zentrifugiert.

3.2.12 Fixierung und Perforation der Zellen

Nach dem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml IC FixTM (BioSource) in Suspension gebracht. Nach zehnmütiger Inkubationszeit bei 25 °C wurden die Zellen mit 1.5 ml FACS-Puffer gewaschen und für 5 Minuten zentrifugiert. Danach wurde das Zellpellet in 2.5 ml Permeabilisierungspuffer resuspendiert und für 5 Minuten bei 25 °C inkubiert. Diese Suspension wurde für 5 Minuten mit 1.000 rpm zentrifugiert und der Überstand dekantiert.

3.2.13 Antikörperfärbung der Zellen

Die vorbereiteten Zellpellets wurden mit 50 μ l der Primär-Antikörper für 1 Stunde bei 25 °C inkubiert. Verwendet wurden die Antikörper Anti-ERK 1/2, Anti-p 38 und Anti-JNK (siehe 3.1.5.). Anschließend wurden 2 ml Permeabilisierungspuffer pro Probe hinzupipettiert, 5 Minuten bei 1.000 rpm zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Pro Pellet wurden 20 μ l PE labeled goat anti-mouse IgG-HRP-Antikörper (siehe 3.1.5.) hinzugegeben und für 30 Minuten unter Ausschluss von Licht inkubiert. Danach wurden die Proben zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und schließlich in 500 μ l FACS-Puffer resuspendiert. Die Bestimmung der relativen Fluoreszenzeinheiten erfolgte mit einem FACScan flow Cytometer (Becton Dickinson). Pro Messung wurden 1×10^4 Einzelzellen untersucht.

3.2.14 Bestimmung der Zell-Zyklusphasen mittels Durchflußzytometrie

Um die Auswirkungen von ApoH auf die Zellaktivität beurteilen zu können, wurden die Zellen mit Hilfe des CycleTestTMPlus Reagent Kit (BD Biosciences) am FACScan flow Cytometer (Becton Dickinson) gemessen. Mit Hilfe dieses Testverfahrens können die Zellen den einzelnen Zell-Zyklusphasen zugeordnet werden. Dabei werden die Membran-Lipide mit einem non-ionischen Lösungsmittel aufgelöst, die Zellmembran und das Zytoskelett durch Trypsin und die zelluläre RNA durch Ribonuklease A verdaut. Anschließend wird das nukleäre Chromatin mit Spermin stabilisiert und somit für die Färbung vorbereitet (Vindelov et al., 1983). Nun bindet Propidium-Jodid an die Nuclei und die Fluoreszenz kann mittels FACS detektiert werden (Humason et al., 1979) Als Kontrolle dienten bei jeder Messung Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC), welche freundlicherweise von dem DRK-Blutspendedienst in Frankfurt am Main zur Verfügung gestellt wurden.

3.2.15 Vorbereitung der Zellen

Für die Messung wurden HUVEC mit calciumfreiem PBS gewaschen und anschließend für 5 Minuten bei 37 °C mit Accutase inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in calciumfreiem PBS aufgenommen, auf 4 Röhrchen verteilt und für 5 Minuten bei 1.000 rpm und 4 °C zentrifugiert.

3.2.16 Inkubation der Zellen mit ApoH

Nach dem Zentrifugationsvorgang wurden die Zellpellets mit jeweils 0.5 ml

1. ApoH
2. cApoH
3. Plasmin oder
4. Medium

resuspendiert und für 90 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde jeweils eine Probe in die entsprechende Vertiefung einer 6-Well-Platte gegeben. Nach Zugabe von 2 ml HUVEC-Vollmedium wurden die Zellen über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.2.17 Inkubation mit den CycleTest™Plus-Lösungen und Messung

Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit calciumfreien PBS gewaschen, vorsichtig mit Accutase abgelöst und in FACS-Röhrchen überführt. Darauf folgte ein 5-minütiger Zentrifugationsschritt mit 400 x *g*. Das Zellpellet wurde in 1 ml calciumfreien PBS aufgenommen und mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer die jeweilige Zellzahl bestimmt. Nach der Zelleinstellung auf 1 x 10⁶ Zellen/ml wurden pro Probe 250 µl Lösung A (Trypsin-Puffer) hinzupipettiert und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der gleiche Inkubationsschritt erfolgte nach Zugabe von 200 µl Lösung B (Trypsin-Inhibitor und RNase Puffer). Anschließend wurden 200 µl kalte Lösung C (Propidium Iodid) hinzugegeben und auf Eis unter Ausschluß von Licht für 10 Minuten inkubiert. Zur Vorbereitung auf die FACS-Messung filterte man die Proben durch einen 40 µm Nylon Mesh-Aufsatz. Die Messung wurde innerhalb der nächsten 3 Stunden durchgeführt.

3.2.18 Quantifizierung der Proteinexpression mittels Western Blot

Um ein Expressionsprofil der Signalproteine zu erhalten, wurden nach der Inkubation mit 0.5 ml

1. ApoH
2. cApoH
3. Plasmin oder
4. Medium

die Zellen lysiert. Die Proteinkonzentration der Lysate wurde mit Hilfe des DC-Protein-Assay bestimmt. Nachdem die Proteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt wurden, wurden sie auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die Anfärbung erfolgte durch die Antikörper Anti-ERK 1/2, Anti-p38 und Anti-JNK (siehe 3.1.5.) und die anschließende Detektion mittels einer enzymatischen Reaktion.

3.2.19 Vorbereitung der Zellen

Die Protein-Isolierung erfolgte aus subkonfluent gewachsenen HUVEC-Kulturen. Dafür wurden die Zellkulturen zunächst mit calciumfreiem PBS (37 °C) gewaschen, mit Accutase inkubiert und wieder in PBS (ohne Calcium und Magnesium) aufgenommen. Die abgelösten Zellen wurden in Zentrifugenröhrchen bei 1.000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand anschließend vollständig entfernt.

3.2.20 Inkubation der Zellen mit ApoH

Nach dem Zentrifugationsvorgang wurden die Zellpellets mit jeweils 0.5 ml

1. ApoH
2. cApoH
3. Plasmin oder
4. Medium

resuspendiert und für 90 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 5 Minuten bei 1.000 rpm zentrifugiert und der Überstand dekantiert.

3.2.21 Gewinnung des Zelllysats

Die Zellen wurden in jeweils 750 μ l Lysis-Puffer gelöst, durch 5-maliges Aufziehen mittels einer dünnen Kanüle gründlich homogenisiert und für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach der anschließenden Zentrifugation von 10 Minuten

bei 10.000 rpm und 4 °C wurde der Überstand mit den Proteinen abpipettiert und bis zum weiteren Gebrauch bei - 80 °C gelagert.

3.2.22 Proteinquantifizierung nach Lowry

Um ein exaktes Beladen der Taschen im Western Blot mit einer vergleichbaren Proteinmenge zu gewährleisten, wurde die Gesamtproteinmenge in den Proben bestimmt. Zu Beginn der Bestimmung wurden 10 μl der Messprobe im Verhältnis 1:10 mit ddH₂O verdünnt. Zu jeder Probe wurden 500 μl der Lösung A (DC Protein Assay) und 4 ml der Lösung B (DC Protein Assay) hinzugegeben und sofort gemischt. Nach 15-minütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die Extinktion mit Hilfe des Spektrometers (siehe 3.1.1.) direkt gegen einen Leerwert in Doppelbestimmung bei 750 nm gemessen. Anhand einer Eichgeraden (1 bis 20 μg BSA) konnte über die gemessene optische Dichte die in der Probe enthaltene Proteinmenge berechnet werden.

3.2.23 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Proteinauftrennung

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte durch SDS-PAGE. Zur Auftrennung der Proteine wurden Glycinele mit 12 %igem Trenngel und 4 %igem Sammelgel nach Laemmli (Laemmli, 1970) gegossen. Die Proteinproben (50 μg /Spur) für SDS-PAGE wurden mit Proben-Puffer im Verhältnis 1:1 versetzt und 5 Minuten bei 95 °C im Heizblock denaturiert. Als Größenstandard wurde der ColorBurstTM-Proteinstandard aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei RT in 1x SDS-Laufpuffer, zunächst bei einer Spannung von 80 V und nach dem Eintritt der Proben in das Trenngel bei einer Spannung von 120 V. Anschließend wurden die Gele für einen Western-Transfer eingesetzt.

3.2.24 Western Blot

Die in der Gelelektrophorese der Größe nach aufgetrennten Proteine lassen sich mittels Western-Blotting auf eine Nitrozellulosemembran transferieren

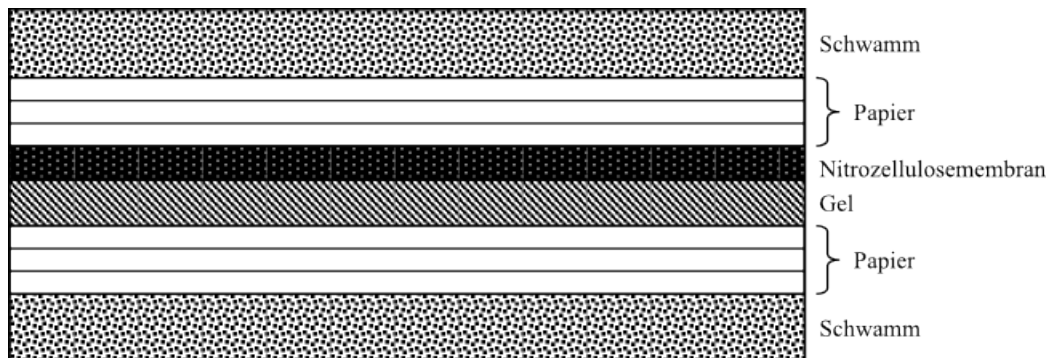


Abbildung 4: Skizzierter Aufbau der Western Blot-Kammer

und anschließend durch Inkubation mit spezifischen Antikörpern detektieren. Zu Beginn des Western-Transfers wurden die Nitrozellulosemembranen, die Blotting-Papiere und zwei Schwammtücher für zehn Minuten zur Aktivierung in Transferpuffer getränkt. Anschließend wurde das nach Abb. 4 eingebettete Proteingel in die Transfereinrichtung einer mit Transferpuffer gefüllten Protein-Transfer-Apparatur eingespannt und zusammen mit einer Kühleinheit auf einen Magnetrührer gestellt. Der Western-Transfer wurde für 60 Minuten bei 100 V durchgeführt.

3.2.25 Antikörperbindung

Um unspezifische Hintergrundbindungen zu verhindern, wurde die Nitrozellulosemembran über Nacht bei 4 °C in Blockierlösung inkubiert. Nach dem Spülen in Towbin-Puffer wurde die Membran mit Primärantikörpern in Antikörperpuffer für 60 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal für jeweils 15 Minuten in Blot-Puffer gewaschen und anschließend für 45 Minuten mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Um ungebundene Antikörper zu entfernen wurde die Membran erneut in Blot-Puffer (3 x 15 Minuten) gewaschen. Als letzter Spülschritt folgte dH₂O für 15 Minuten.

3.2.26 Chemilumineszenz

Die Chemilumineszenz-Färbung zur visuellen Darstellung der Proteinbanden wurde in einer Dunkelkammer durchgeführt. Das Prinzip beruht auf einer Konjugation des Primärantikörpers mit einem mit Horse-radish-Peroxidase-markierten Sekundärantikörper. Bei der Reduktion von H_2O_2 zu H_2O durch horse radish-Peroxidase werden Sauerstoffradikale frei, die ein Chemilumineszenzsubstrat (hier: Luminol) in einen angeregten Zustand versetzen. Beim Übergang des angeregten Luminols in seinen Grundzustand werden Lichtquanten freigesetzt, die mittels eines Röntgenfilms sichtbar gemacht werden können. Die Stärke der Lichtemission ist dabei direkt proportional zur Menge des detektierten Proteins. Zum Anfärben wurden 1 ml ECLTM-Lösung A (Chemilumineszenz-Lösung) mit 1 ml ECLTM-Lösung B vermischt und die Nitrozellulosemembran darin für eine Minute geschwenkt. Nach dem vollständigen Entfernen der Flüssigkeit wurde die Membran in einen Plastikumschlag eingelegt. Die detektierbaren Banden wurden unter Rotlicht in einer Dunkelkammer auf einen Röntgenfilm übertragen. Der Film wurde anschließend entwickelt und mit Röntgen-Fixierlösung fixiert.

3.2.27 Statistik

Die Prüfung auf statistische Signifikanz erfolgte mit Hilfe des Wilcoxon-Mann-Whitney-Tests, auch U-Test genannt. Dabei handelt es sich um ein nichtparametrisches statistisches Prüfverfahren zum Vergleich zweier unabhängiger Variablen. Bei der Ermittlung statistischer Auffälligkeiten zwischen den Kontrollwerten und den jeweiligen Messwerten wurden Werte ab $p < 0,05$ als signifikant angenommen.

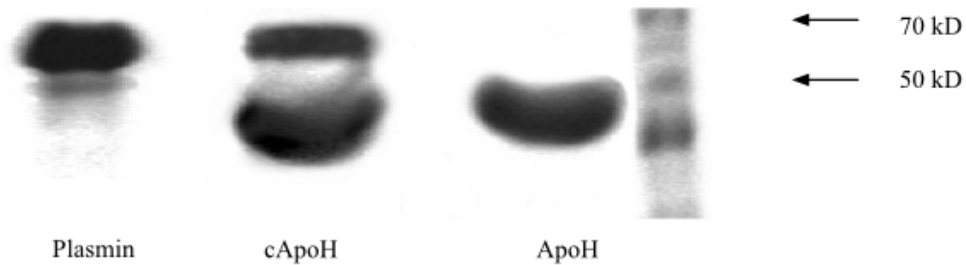


Abbildung 5: SDS PAGE Analyse. SDS-PAGE Analyse unter nicht reduzierenden Bedingungen auf einem 10 % Gradienten-Gel. Das Gel wurde mit einer Coomassie-Blau-Färbung gefärbt. Dargestellt sieht man 1 SDS-PAGE repräsentativ für 3 weitere. Es findet sich durch den Einfluß von Plasmin eine verstärkte Mobilität des cApoH.

4 Ergebnisse

4.1 Modifikation von ApoH

Eine Behandlung von ApoH mit Plasmin verursacht eine Veränderung des ursprünglichen Moleküls. Daher wurde für die vorliegende Arbeit ApoH in lyophilisierter Form vom Hersteller bezogen und für die Behandlung mit Plasmin in PBS gelöst. Plasmin wurde in einem molaren Verhältnis von 1:15 dem gelösten ApoH zugegeben und für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde eine SDS-PAGE-Analyse durchgeführt, um die o.g. Annahme zu bestätigen. Dabei fiel auf, dass es durch den Einfluß von Plasmin zu einer verstärkten Mobilität des ApoH im Gradienten-Gel kam (Abb. 5).

4.2 Aufreinigung von ApoH und cApoH

Um die Veränderungen der chemischen Eigenschaften des Proteins darzustellen, wurde eine Aufreinigung des kommerziellen ApoHs und der durch die Behandlung mit Plasmin geclippten Form an einem Chromatographen durchgeführt. Dabei ging es insbesondere darum, einen Unterschied in den

chemischen Eigenschaften zwischen ApoH und cApoH aufzuzeigen. Es ließe sich so der Beweis erbringen, dass die Inkubation mit Plasmin zu einem Umsetzen des kommerziell erworbenen ApoH zu der geclippten Form führt. Zur Aufreinigung wurden ApoH und cApoH mit Hilfe einer HiTrapTM Heparin-Säule auf einem Äkta Chromatographen eluiert. Die Aufreinigungsprotokolle der beiden Substanzen wurden grafisch übereinander gelegt, um einen Vergleich zu ermöglichen und Unterschiede somit sichtbar zu machen. In Abb. 6 entspricht die blaue Linie der ApoH-Probe und die braune Linie der cApoH-Probe. Bei den beiden Proben ist ein deutlicher Unterschied in dem Auftreten des Peaks zu erkennen. Der erste Peak (braun) bei 22 ml ist cApoH und der zweite (blau) bei 26 ml ApoH zuzuordnen. Dabei liegt besonderes Augenmerk auf dem Leitfähigkeitswert (rote Kurve) zum Zeitpunkt der beiden Peaks. Die unterschiedlichen Werte sprechen dafür, dass es sich bei cApoH um ein Molekül mit eigenen chemischen Eigenschaften handelt.

4.3 Einfluß von ApoH auf die Proliferation

Nachdem Unterschiede zwischen den chemischen Eigenschaften von ApoH und der mit Plasmin vorbehandelten Form nachgewiesen wurden, wurde anschließend evaluiert, welchen Einfluß diese beiden Formen auf proliferierende Endothel-Zellen ausüben. Dazu wurden die Proben

1. ApoH
2. cApoH
3. Plasmin oder
4. PBS

auf BCE-Zellen gegeben. Um die Zellen zu aktivieren, wurde pro Vertiefung 10 μ l des Wachstumsfaktors bFGF hinzugegeben, welcher ein multifunktionaler Wachstumsfaktor ist und zu einer Induktion der Proliferation und Morphogenese führt. Als Kontrolle dienten bFGF-unbehandelte Zellen.

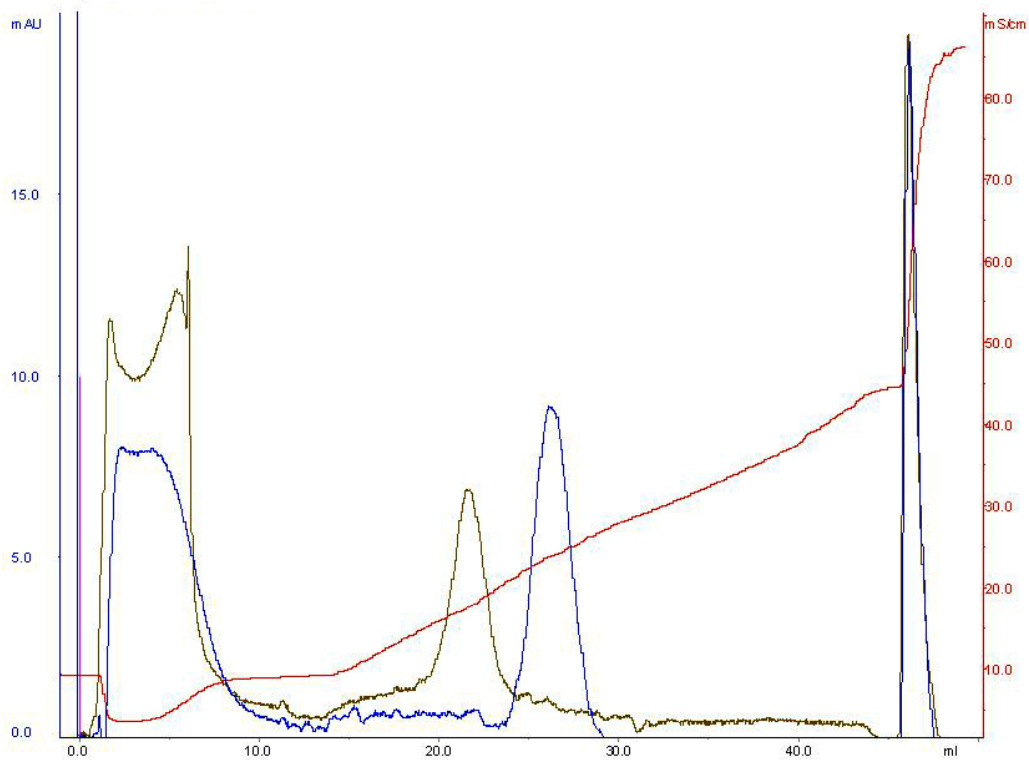


Abbildung 6: Chromatogramm der Heparin-Säule. Nach dem Beladen der Säule mit ApoH (blau) und cApoH (braun) wurde die Elution mit einem kontinuierlichen Gradienten von 20 mM bis 1 mM NaCl durchgeführt.

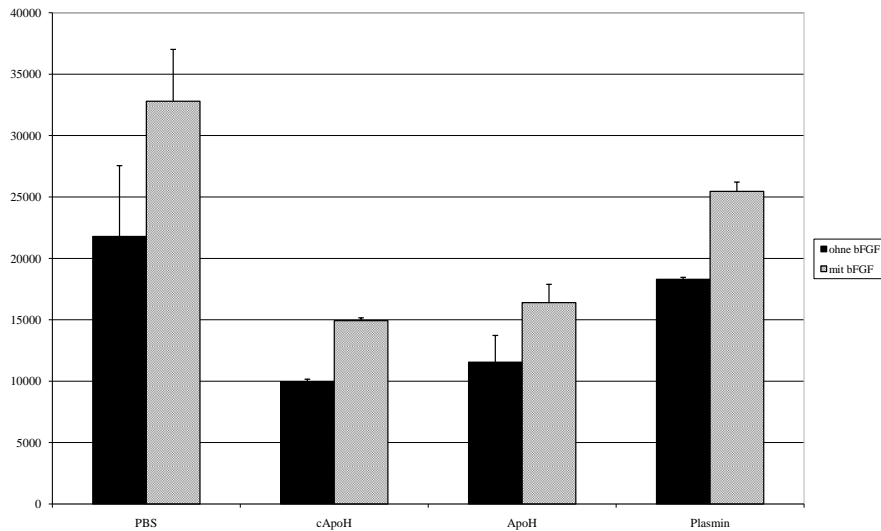


Abbildung 7: Proliferations-Assay der bovinen Kapillarendothelzellen. BCE-Zellen wurden 16 h mit ApoH und cApoH behandelt. Als Kontrolle wurde nur mit Plasmin oder PBS behandelt. Die Quantifizierung erfolgte mittels ^3H -Thymidin-Einbau in die DNA. Auf der Y-Achse ist die Endothelzellzahl aufgetragen. Dargestellt ist 1 Proliferations-Assay repräsentativ für 5.

Die Messungen (siehe Abb. 7) ergaben eine deutliche Reduzierung der Zellzahl bei den mit ApoH- und cApoH-behandelten Proben im Vergleich zu den Plasmin- und PBS-Kontrollen. Bei cApoH war der Effekt ausgeprägter. Die Behandlung mit bFGF führte zu einer Zellzahlvermehrung der Proben im Vergleich zu den nicht mit bFGF-behandelten Proben. Aber auch hier kam es im Gegensatz zu den Kontrollen zu einem deutlichen Abfall der Zellzahl in den ApoH- und cApoH-Proben.

4.4 Zell-Zyklus

Der Einfluß von ApoH und cApoH auf die Proliferation der Endothelzellen konnte durch die vorangegangenen Versuche aufgezeigt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse erfolgte im Anschluß eine Durchführung weiterer Versuche mit Hilfe eines kommerziellen Test-Kits (siehe 3.1.3.), um mögliche Veränderungen in den einzelnen Zell-Zyklus-Phasen darzustellen. Die Zellen befanden sich bei den Medium-Kontrollen (siehe Abb. 8) zu 69 % in den Phasen G 0 und G 1, 4 % der Zellen waren in den Phasen G 2 und M. Über 27 % wurden in der S-Phase detektiert. Ein vorangehender 2-stündiger Serumentzug induzierte bei den Zellen keine auffälligen Unterschiede in den einzelnen Zell-Zyklus-Phasen. Bei den Plasmin-Kontrollen fanden sich 77 % der Zellen in den Phasen G 0 und G 1, 7 % in den Phasen G 2 und M und 16 % in der S-Phase wieder. Die Behandlung der Zellen mit 50 μg ApoH und cApoH führte zu einer Verschiebung der Verteilungszahlen zugunsten der Phasen G 2 und M sowie der S-Phase. Die mit ApoH-inkubierten Proben wiesen eine Verminderung in den Phasen G 0 und G 1 und eine Erhöhung in den Phasen G 2 und M und in der S-Phase im Vergleich zu den Kontroll-Proben auf. Bei den mit cApoH-behandelten Proben erhöhte sich die Menge der Zellen in den Phasen G 2 und M sowie in der S-Phase.

Um einen möglichen Einfluß des Annexin-II-Rezeptors auf die Signalweiterleitung aufzeigen zu können, wurden bei identischer Versuchsanordnung die Annexin-II-Rezeptoren durch Anti-Annexin-II-Antikörper blockiert. Dabei fanden sich durch die Blockade des Annexin-II-Rezeptors bei den ApoH-Proben 67 % der Zellen in den Phasen G 0 und G 1, 12 % in den Phasen G 2 und M sowie 21 % in der S-Phase wieder. Somit verhinderte die Blockierung des Annexin-II-Rezeptors bei den Zellen eine Verschiebung der Phasen zugunsten der G 2, M und S-Phasen.

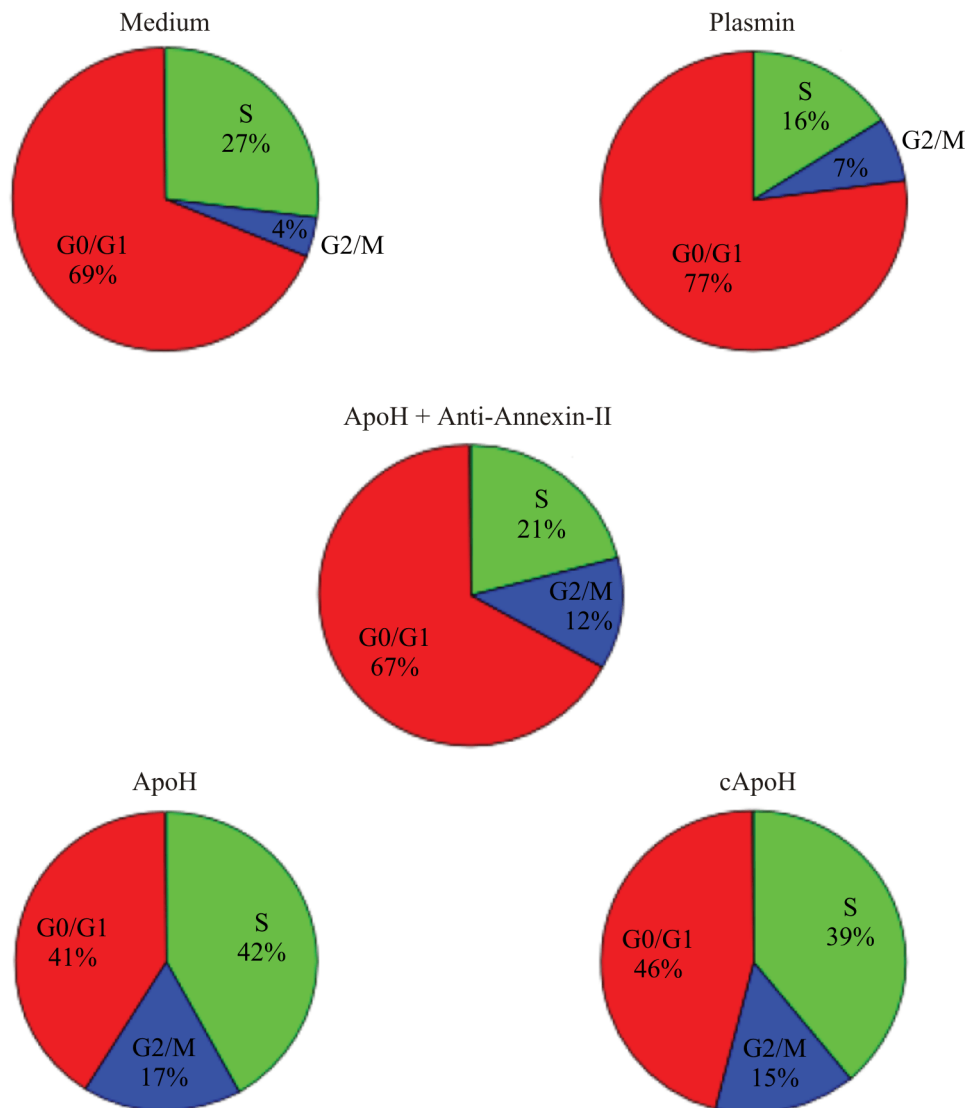


Abbildung 8: Zell-Zyklus. Dargestellt sind die Verteilungswerte der Zellzyklus-Phasen der Mediumkontrollen (oben links), der Plasminkontrollen (oben rechts), der ApoH-Proben (unten links), der cApoH-Proben (unten rechts) und in der Mitte ApoH-Proben nach Inkubation mit dem Anti-Annexin-II-Antikörper. Repräsentativ 1 von 5 Messungen.

4.5 Western Blot-Untersuchungen zu den Zell-Zyklus-Proteinen

Da durch die Zell-Zyklus-Untersuchungen Verschiebungen in den einzelnen Phasen beobachtet werden konnten, sollte anschließend untersucht werden, ob sich das Expressionsmuster zellzyklus-regulierender Proteine verändert. Um die Auswirkungen von ApoH und cApoH auf die Expression der Zell-Zyklus-Proteine beurteilen zu können, wurden die Proteine p 27/Kip 1, CdK 4 und Cyclin D 1 mittels Western Blot untersucht (Tabelle 14).

Tabelle 14

Protein	ApoH	cApoH	Plasmin	Medium
p 27/Kip 1	++	++	+	-
CdK 4	++	++	++	-
Cyclin D 1	++	++	++	-
ß-Aktin	++	++	++	++

Die Western Blots zum Nachweis von p 27/Kip 1 zeigten eine Expressionserhöhung bei ApoH, cApoH sowie Plasmin im Vergleich mit den Medium-Kontrollen auf.

Bei den Untersuchungen von CdK 4 konnten bei ApoH, cApoH und Plasmin vermehrte Protein-Expressionen im direkten Vergleich zu den Medium-Kontrollen nachgewiesen werden.

Der Nachweis von Cyclin D 1 zeigte eine durchgehende Verstärkung der Proteinexpression bei ApoH, cApoH und Plasmin im Vergleich zu den Medium-Kontrollen auf.

4.6 Einfluß von ApoH auf die Signaltransduktion

Die vorangegangenen Experimente haben einen deutlichen Einfluß von ApoH und cApoH auf die Proliferation und den Zell-Zyklus der Endothelzellen nachgewiesen. In weiteren Versuchen sollten mögliche Veränderungen der intrazellulären Signalkaskaden aufgezeigt werden. Konsequenterweise wurde

dabei der Schwerpunkt auf die MAP-Kinasen-Systeme JNK, p 38 und ERK gelegt, welche in der Signaltransduktion der Zelle eine entscheidene Rolle spielen. Mit Hilfe eines FACScan Sorters wurde die intrazelluläre Aktivität der MAP-Kinasen in HUVEC-Zellen nach der Behandlung mit ApoH und cApoH versus Plasmin und Medium gemessen. Dabei wurde die Fluoreszenzintensität der zuvor mit Antikörpern markierten Kinasen ermittelt, die proportional zu ihrer tatsächlichen Menge ist. Dazu wurden die Zellen mit a) ApoH, b) cApoH, und als Kontrollen c) Plasmin und d) Medium versetzt, für 90 Minuten bei 37 °C inkubiert und im FACS analysiert. Nachfolgend werden die Ergebnisse der o.g. MAP-Kinasen im Einzelnen aufgezeigt. Die verwendeten Antikörper waren gegen die entsprechende aktive, also phosphorylierte Form (bspw. Phospho-p 38) gerichtet, um eine Aktivierung der Systeme nachweisen zu können.

4.6.1 Phospho-p 38

Dabei zeigte sich eine Verminderung von Phospho-p 38 bei den ApoH-Proben im Vergleich zu den Kontrollproben (Abb. 9). Eine Behandlung der Zellen mit cApoH führte zu einer Erhöhung von Phospho-p 38. Somit konnte eine entgegengesetzte Wirkung zwischen den beiden Proben ApoH und cApoH aufgezeigt werden. Die Plasmin-Kontrollen wiesen im Vergleich zu den Kontrollproben eine leichte Erhöhung auf.

4.6.2 Phospho-JNK

Bei der Inkubation der Proben mit dem Phospho-JNK-Antikörper wiesen die ApoH-Proben eine Erhöhung im Vergleich zu den Medium-Kontrollen auf (Abb. 10). Die Behandlung mit cApoH führte zu einer deutlichen Erhöhung. In diesem Falle verhielt sich die Veränderung durch eine Inkubation mit ApoH ähnlich wie eine Inkubation mit cApoH. Die Plasminbehandlung der Proben induzierte keine Veränderung.

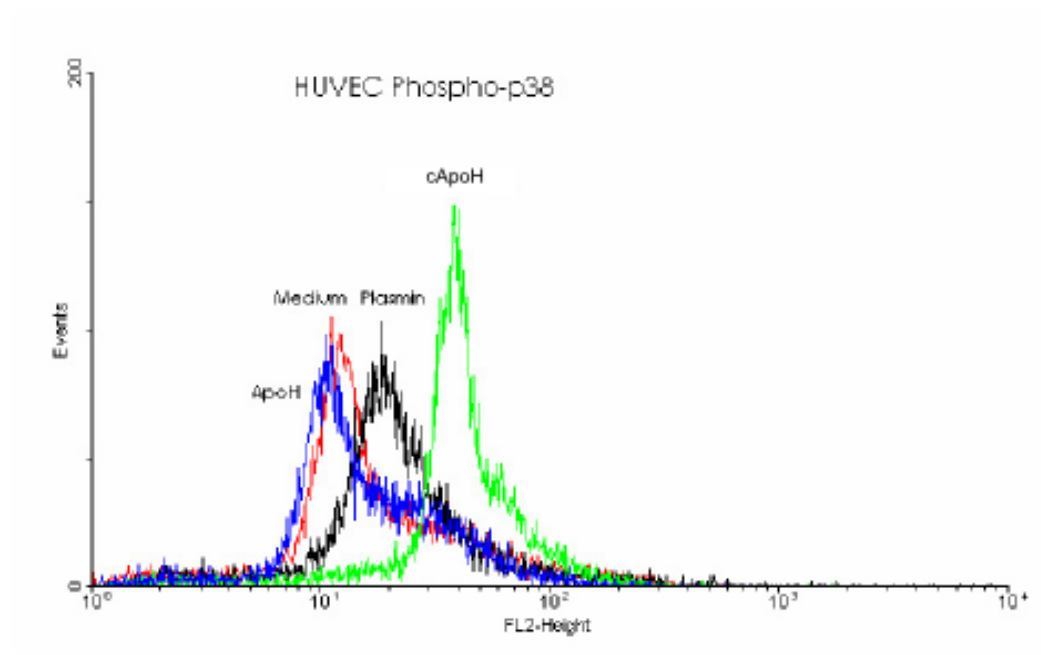


Abbildung 9: FACS-Analyse von Phospho-p 38. HUVEC wurden mit einem Phospho-p 38-Antikörper und einem PE-markierten Sekundärantikörper behandelt und mit dem FACScan gemessen. Pro Messung wurden 1×10^4 Zellen gezählt. Auf der Y-Achse ist die Anzahl der gemessenen Ereignisse (Events) aufgetragen. Dargestellt ist ein repräsentatives Histogramm aus einer von 5 Messungen.

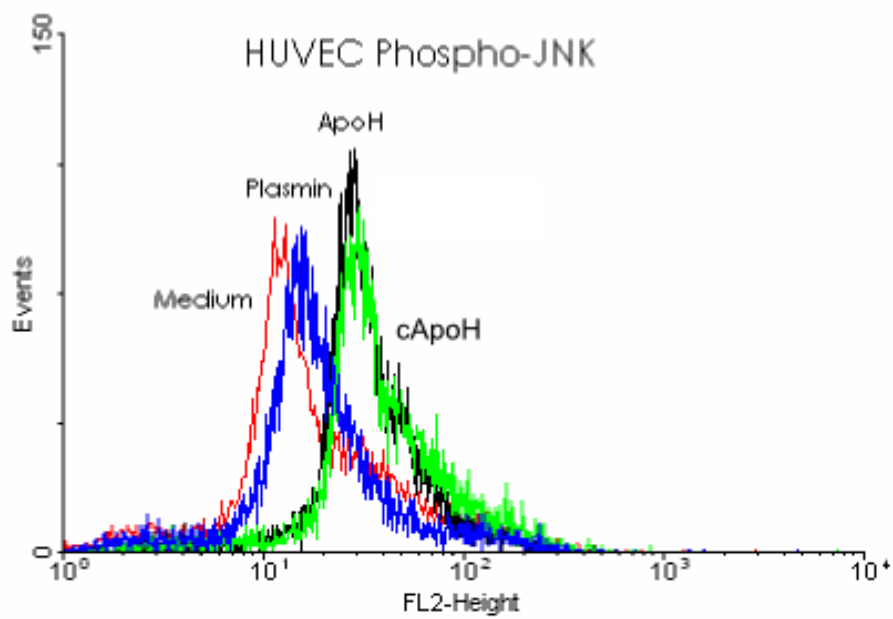


Abbildung 10: FACS-Analyse von Phospho-JNK. HUVEC wurden mit einem Phospho-JNK-Antikörper und einem PE-markierten Sekundärantikörper behandelt und mit dem FACScan gemessen. Pro Messung wurden 1×10^4 Zellen gezählt. Auf der Y-Achse ist die Anzahl der gemessenen Ereignisse (Events) aufgetragen. Dargestellt ist ein repräsentatives Histogramm aus einer von 5 Messungen.

4.6.3 Phospho-ERK 1/2

Die FACS-Analyse mit dem Phospho-ERK 1/2-Antikörper ergab eine Erhöhung bei der Inkubation mit ApoH. Die Behandlung mit cApoH führte ebenfalls zu einer Erhöhung von Phospho-ERK 1/2 und es konnte somit kein Unterschied zwischen den beiden Proben nachgewiesen werden. In den Plasmin-Proben war eine geringe Erhöhung nachweisbar.

4.7 Analysen zur Expressionskinetik der Signalproteine

Um mögliche Veränderungen im zeitlichen Verlauf detektieren zu können, wurde die o.g. Versuchsanordnung dahingehend verändert, dass die Messungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt wurden. Repräsentativ sind im Folgenden die Messungen mit dem Phospho-p 38- sowie dem Phospho-JNK-Antikörper grafisch dargestellt.

4.7.1 Phospho-p 38

Generell lässt sich eine Erhöhung der Werte feststellen (Abb. 11). Im Speziellen ist bei Phospho-p 38 eine Verringerung des zeitlichen sowie des Absolutwertes von ApoH zu verzeichnen. Entgegengesetzte Ergebnisse sind bei cApoH zu erkennen. Diese Kinetikkurven bestätigten die zuvor gemessenen Absolutwerte der beiden Proben ApoH und cApoH.

4.7.2 Phospho-JNK

Bezüglich der Kinetikmessungen mit dem Phospho-JNK-Antikörper konnten bei allen vier untersuchten Proben Erhöhungen des Absolutwertes dargestellt werden (Abb. 12). Insbesondere bei ApoH lag der Absolutwert deutlich über dem Ausgangswert und auch höher als der Absolutwert von cApoH. Bei den Medium-Kontrollen zeigte sich nach 60 Minuten eine Verminderung des zeitlichen Wertes, die sich nach 90 Minuten jedoch wieder in eine Erhöhung des Absolutwertes umwandelte.

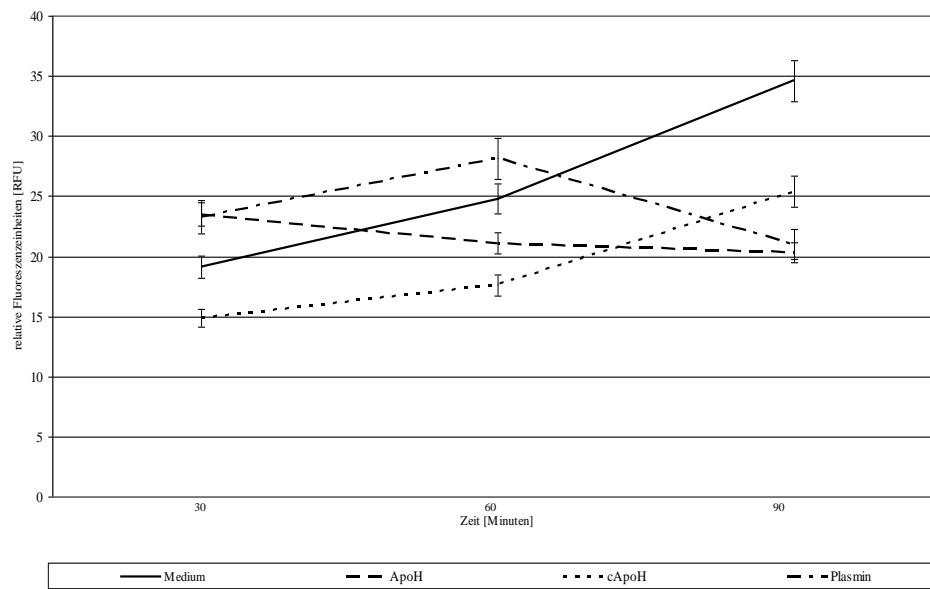


Abbildung 11: Kinetik-Kurven des Phospho-p 38-Antikörpers. HUVEC wurden mit dem Phospho-p 38-Antikörper und anschließend einem PE-Sekundärantikörper inkubiert. Die Zeitpunkte der Messung sind 30 Minuten, 60 Minuten und 90 Minuten nach Beginn der HUVEC-Inkubation mit den Proben a) Medium, b) ApoH, c) cApoH und d) Plasmin. Dargestellt ist eine Messung, repräsentativ für 3.

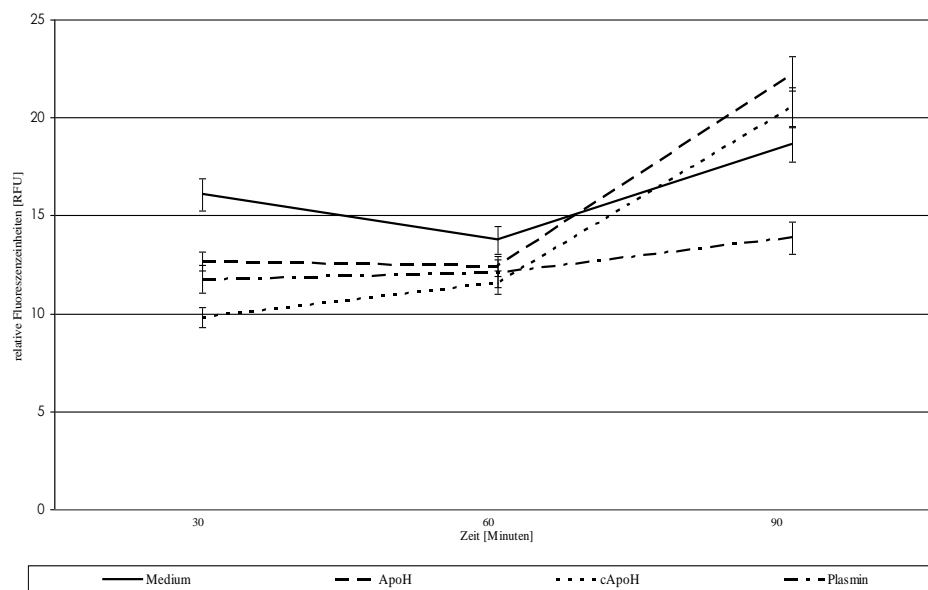


Abbildung 12: Kinetik-Kurven des Phospho-JNK-Antikörpers. HUVEC wurden mit dem Phospho-JNK-Antikörper und anschließend mit dem PE-Sekundärantikörper inkubiert. Zeitpunkte der Messung sind 30 Minuten, 60 Minuten und 90 Minuten nach Beginn der Inkubation mit den Proben a) Medium, b) ApoH, c) cApoH und d) Plasmin. Dargestellt sieht man eine von 4 Messungen.

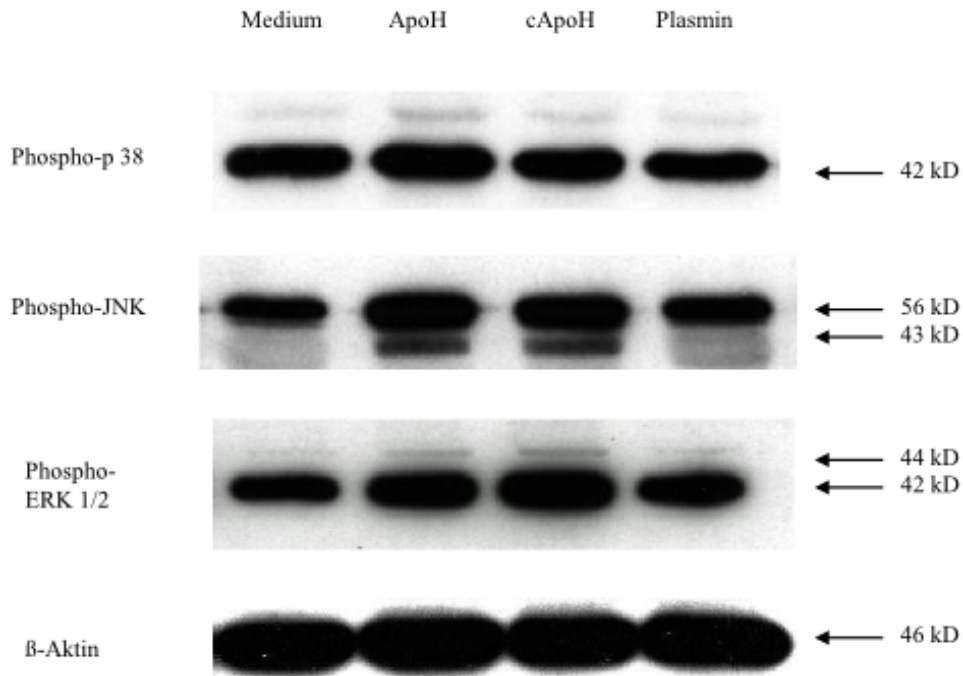


Abbildung 13: Effekte der Inkubation mit den Proben auf HUVEC. Die HUVECs wurden 90 Minuten mit den Proben a) Medium, b) ApoH, c) cApoH und d) Plasmin behandelt. Repräsentativ ist jeweils 1 Western Blot von 3 dargestellt.

4.8 Western Blot

4.8.1 Auswirkungen auf die MAP-Kinasen

Die Banden von ApoH und cApoH (Abb. 13) sind bei Phospho-p 38 etwas stärker ausgeprägt als die der Medium- und Plasmin-Kontrollen. Die Banden von ApoH und cApoH lassen eine erhöhte Expression von Phospho-ERK 1/2 im Vergleich mit den Medium - und Plasmin-Kontrollen erkennen. Der Western Blot zeigt eine unterschiedlich starke Expression von Phospho-JNK. Bei ApoH und cApoH ist eine vermehrte Expression zu erkennen. Die Proteinexpression von β-Aktin dient als Kontrolle. Man überprüft damit die aufgetragenen Proteinmengen auf Gleichmäßigkeit.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß von ApoH im Zellkulturmodell mit Endothelzellen untersucht. Dabei wurden erstmals die Auswirkungen von ApoH und cApoH auf die MAP-Kinasen nachgewiesen sowie Veränderungen in den einzelnen Zellzyklusphasen detektiert.

5.1 ApoH

ApoH wird in der Literatur besonders in Zusammenhang mit Autoimmunerkrankungen wie dem APS und dem SLE genannt. Bei Patienten mit diesen Erkrankungen ist ein erhöhter Serumtitel der Antiphospholipid-Antikörper nachweisbar. ApoH fungiert hier als Target-Protein, d.h. die gebildeten Auto-Antikörper richten sich gegen das körpereigene ApoH (Jones et al., 1992). Das APS ist ein autoimmunes thrombophiles Geschehen, welches sich durch die Anwesenheit von Antikörpern gegen Phospholipid-bindende Proteine auszeichnet. Klinisch manifestiert sich dieses Syndrom durch vaskuläre Thrombosen und Komplikationen während der Schwangerschaft, insbesondere als wiederholtes Auftreten von Spontanaborten (Rand, 2007). Die Ursache des Pathologiemechanismus des APS liegt vermutlich in den Autoimmunantikörpern gegen das körpereigene ApoH. Bilden sich ApoH-Dimere, binden diese an ApoER2' auf den Blutplättchen und führen zu ihrer Aktivierung und Aggregation. Die Bindungsstelle von ApoH für ApoER2' liegt in der fünften Domäne (van Lummel et al., 2005). Aufgrund seiner chemischen Struktur bindet ApoH hervorragend an negativ geladene Oberflächen wie Proteoglykane, Heparinsulfate sowie anionische Phospholipide. Neben seiner unspezifischen Bindung an negativ geladene Oberflächen bindet ApoH spezifisch an Endothelzellen. Die Bindung erfolgt hier mit hoher Affinität an den endothelialen Annexin-II-Rezeptor (Ma et al., 2000). Binden nun Anti-ApoH-Antikörper an ApoH, welches an Annexin II gebunden ist, kommt es zu einer Endothelzellaktivierung (Chung et al., 1994) und die Endothelzellen werden in einen pro-koagulatorischen Zustand versetzt. Desweiteren werden von den Endo-

thelzellen vermehrt Adhensionsmoleküle und IL-6 exprimiert (Del Papa et al., 1997). Wie in 1.2.1. aufgeführt, kann ApoH auch in einer enzymatisch veränderten Form (cApoH) vorliegen. In der Literatur zeigten verschiedene in vivo Studien ein erhöhtes Vorkommen von cApoH bei Patienten mit Leukämie sowie bei Patienten mit Zerebralinfarkt (Itoh et al., 2000, Yasuda et al., 2004). Um nicht nur die Auswirkungen von ApoH, sondern auch von cApoH detektieren zu können, wurden in den Versuchsansätzen stets die folgenden Proben verwendet:

1. ApoH
2. cApoH
3. Plasmin oder
4. Medium.

Durch die Verwendung der Plasmin-Kontrolle konnte in den Experimenten aufgezeigt werden, dass Plasmin an sich keine anti-angiogene Wirkung hat. In gleicher Weise wurde die o.a. Medium-Probe als Negativkontrolle für das verwendete Zellkulturmedium benützt.

Um die Herstellung von cApoH (siehe 3.2.7.) zu überprüfen, wurde mit beiden Proben (ApoH und cApoH) eine Chromatographie unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Nach dem Vergleich der beiden Aufreinigungsprotokolle konnte ein deutlicher Unterschied zwischen dem zeitlichen Auftreten der entsprechenden Fraktionen im Chromatogramm festgestellt werden. Deshalb ist davon auszugehen, dass das verwendete Protokoll zu einer Umsetzung von ApoH zu cApoH führt.

5.2 Angiogenese

Ein Zusammenhang zwischen einer Angiogenesehemmung durch ApoH wurde zum ersten Mal im Jahre 2002 diskutiert (Beecken, 2002). Es wurde offensichtlich, dass ApoH Einfluß auf das Wachstum von Endothelzellen hat.

Beecken et al. führte 2006 Versuche mit Blasenkarzinomzelllinien im Mausmodell durch. Dabei wurden Tumorzellen in beide Flanken der Maus injiziert. Nach kurzer Zeit konnte aufgezeigt werden, dass es nur auf einer Flankenseite zum Wachstum des Tumors gekommen war und die andere Seite offensichtlich durch eine durch den Tumor sezernierte Substanz am Wachstum gehindert wurde. Nachdem der Kulturüberstand der veränderten Zelllinie gepoolt und im Endothelzellmodell auf Aktivität getestet wurde, wurde daraus eine Substanz isoliert, die sich später als blockierend erwies. Eine anschließende N-terminale Sequenzierung und Massenspektrometrie identifizierte diesen Angiogenesehemmer als ApoH und es konnte eine dosisabhängige und spezifische Hemmung der Endothelzellproliferation aufgezeigt werden. In den Experimenten wurde eine deutliche Reduktion der Gefäßdichte in den mit ApoH behandelten Tumoren im Vergleich zu den Kontrollen *in vitro* nachgewiesen. Diese Untersuchungen postulieren eine anti-angiogene Wirkung von ApoH sowie cApoH (Beecken et al., 2006). Für das Wachstum und die Entwicklung eines soliden Tumors ist die Angiogenese obligatorisch. Neben der Metastasierung ist die Angiogenese ein wichtiger Prozeß im Zuge der Krebserkrankung. Eine der wichtigen Schlüsselreaktionen von Endothelzellen auf die Stimulation mit angiogenen Faktoren ist die Signaltransduktion durch Aktivierung von Rezeptor-Protein-Kinasen-Kaskaden. Diese Signalkaskaden führen zum Eintritt der Zellen in den Zellzyklus sowie zu einer Aktivierung der zuvor ruhenden Zellen, damit eine ausreichende Anzahl an Zellen für die wachsenden Kapillaren zur Verfügung steht (Folkman et al., 1992, Bouck et al., 1996). Daher ist die Erforschung von Agentien, die mit den Endothelzellen interagieren und deren Wachstum beeinflussen eine bedeutsame Aufgabe im Zuge der Krebsbekämpfung. Damit vaskuläre Endothelzellen ihre Primärfunktion als Auskleidung der Blutgefäße ungestört ausüben können, muss ihre Signalweiterleitung sich von der der meisten anderen Zellen unterscheiden. Dabei geht es insbesondere um die Zellantwort auf PDGF und EGF, zwei Wachstumsfaktoren, die eine wichtige Rolle bei der Proliferation der Endothelzellen spielen. Diese Spezifität sichert den Ruhezustand der Endothelzellen solan-

ge, bis aufgrund von Wundheilung oder Tumorwachstum eine Angiogenese notwendig geworden ist (Ferrera et al., 2000).

5.3 Auswirkungen auf die Proliferation

Um die Auswirkungen von ApoH auf die Proliferation der Endothelzellen beurteilen zu können, wurde die Hälfte der Zellen im Versuchsansatz (siehe 3.2.6.) zusätzlich mit dem Wachstumsfaktor *Basic Fibroblast Growth Factor* (bFGF) behandelt. bFGF wirkt mitogen auf Endothelzellen und fungiert somit als direkter Angiogenese-Stimulator (Moses et al., 1995). Dabei fiel auf, dass es durch die Behandlung der Zellen mit ApoH und cApoH zu einer deutlichen Reduzierung ihrer Zellzahl kam. cApoH erwies sich in dem Proliferations-Assay gegenüber ApoH als stärkerer Inhibitor. Dieses Ergebnis untermauert die Hypothese, dass cApoH zu einer deutlicheren Angiogenese-Hemmung im Stande ist als ApoH. Cai et al. zeigten 1995, dass ApoH das Überleben von Endothelzellen *in vitro* unterstützt und bezeichneten es daher als Endothelial Cell- Viability Maintaining Factor (EC-VMF). Auf den ersten Blick scheint dies eigenen Untersuchungsergebnissen zu widersprechen, bei welchen ApoH zu einer Zellzahlreduzierung führte. Betrachtet man jedoch die Versuche genauer, stellt sich heraus, dass es sich nicht um eine Induktion der Endothelzellproliferation handelt, sondern lediglich um ein besseres Überleben unter serumfreien *in vitro* Bedingungen. Ferner wies das verwendete Protein ein Molekulargewicht von 65 kDa auf. Da ApoH in der Literatur mit einem Molekulargewicht von 54 kDa zitiert wird, wurde in eigenen Experimenten kommerzielles ApoH verwendet, welches ebenfalls ein Molekulargewicht von 54 kDa besitzt. Die N-terminale Sequenzierung des EC-VMF ergab die N-terminale Sequenz von Kälber ApoH. Daher liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei EC-VMF um ein verändertes oder erweitertes Molekül von ApoH handelt. Somit ließe sich das entgegengesetzte Ergebnis eigener Untersuchungen erklären.

5.4 Rolle der MAP-Kinasen

Die Weiterleitung von extrazellulären Signalen zu ihren intrazellulären Zielen wird durch ein umfangreiches Netzwerk verschiedener interagierender Proteine gewährleistet. Dazu gehören neben membranständigen Molekülen auch die im Zytoplasma vorkommenden Protein-Kinasen, allgemein bekannt unter der Bezeichnung Mitogen-activated Protein-Kinasen (MAP-Kinasen). Die MAP-Kinasen spielen in der Signaltransduktion der Zelle eine entscheidende Rolle (Seger et al., 1995). Sie unterteilen sich in: Extrazellulär-Signal-regulierten Kinasen (ERK), c-jun-N-terminale Kinasen (JNK) und p 38 (Robinson et al., 1997). Die Regulation der MAP-Kinasen erfolgt durch die MAP-Kinasen-Kinasen, welche über eine duale Phosphorylierung und Dephosphorylierung von Threonin und Tyrosin arbeiten. Die MAP-Kinasen-Kinasen ihrerseits werden durch MAP-Kinasen-Kinasen-Kinasen phosphoryliert und somit aktiviert. Die Inaktivierung der Protein-Kinasen erfolgt durch Phosphatasen (Schaeffer et al., 1999).

5.4.1 Die MAP-Kinase p 38

P 38 wird durch Interleukin-1 β (IL-1), TNF-alpha und UV-Strahlung (Abb. 14) aktiviert (Keyse et al., 1995, Ichijo et al., 1997) und hat eine aktive Rolle im Rahmen der Apoptose-Induktion (Xia et al., 1995). Aktiviertes p 38 führt zu einer Translokation von Bax, welches pro-apoptotisch wirkt, aus den Mitochondrien ins Zytoplasma (Yoshino et al., 2001).

5.4.2 Die MAP-Kinase JNK

JNK ist ein Integrationspunkt für zahlreiche biochemische Signale und hat Einfluß auf die Proliferation, Differenzierung und die Regulation der Transkription. Es wird durch den TNF-alpha-Rezeptor, Fas und CD 40 (Abb. 15) sowie im Rahmen der UV-induzierten Apoptose aktiviert (Leppä et al., 1999). Xia et al. beschreiben 1995 eine starke Korrelation zwischen dem hohen Niveau an JNK-Aktivität und dem Einsetzen einer Apoptose (Xia et al., 1995).

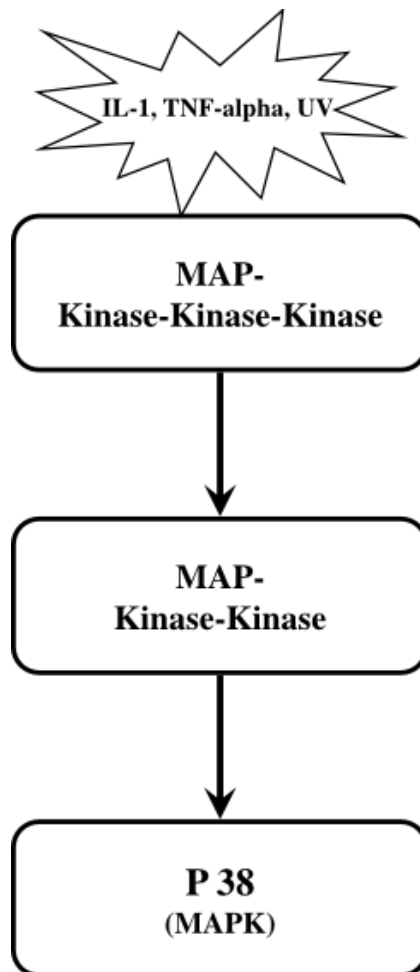


Abbildung 14: Skizzierter Signalübertragungsweg von p 38. (Modifiziert nach Widmann et al. 1999)

Desweiteren führte ein Serumentzug, welcher als Stressfaktor für die Zellen angesehen werden kann, bei Untersuchungen in verschiedenen Zelltypen zu einer JNK-Aktivierung (Johnson et al., 1996).

5.4.3 Die MAP-Kinase ERK

Die mitogene Antwort auf VEGF oder Serum wird bei HUVEC durch den ERK-Signalweg übermittelt (Wu et al., 2000). ERK werden durch extrazelluläre Stimuli, wie z.B. Wachstumsfaktoren und Proonkogene aktiviert. Ausserdem führt zellulärer Stress zu ihrer Aktivierung (Anderson et al., 1990, Widmann et al., 1999, Hill et al., 1995, Whitmarsh et al., 1995, Kyriakis et al., 2001). Unter Apoptosebedingungen der Zellen werden ERK meistens herunterreguliert (Xia et al., 1995).

5.5 Eigene Ergebnisse

Eigene Untersuchungen zeigten eine deutlich erhöhte Menge an Phospho-p 38, Phospho-JNK und Phospho-ERK 1/2, also den phosphorylierten und somit aktiven Formen der drei Kinasen, in den Endothelzellen nach einer 90-minütigen Behandlung mit cApoH. Die ApoH-Proben führten jedoch nur bei Phospho-JNK und Phospho-ERK 1/2 zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität. Bei Phospho-p 38 kam es zu einer Verminderung der Fluoreszenzintensität. ApoH induziert dementsprechend bei Endothelzellen keine Apoptose über den Phospho-p 38-Signalweg. Im Gegensatz dazu führt cApoH bei Endothelzellen zu einer Aktivierung des Phospho-p 38-Signalweges, welcher zum Einsetzen der zelleigenen Apoptose führt.

Der klassische MAPK/ERK Pathway ist für die Weiterleitung der mitogenen Antwort der HUVECs auf VEGF oder Serum verantwortlich (Thakker et al., 1999, Yu et al., 1999). Neben ERK scheint auch der p 38-Signalweg für die Weiterleitung des Motilitäts-stimulierenden Effektes von VEGF verantwortlich zu sein (Wu et al., 2000, Rousseau et al., 1997). In zahlreichen Zelllinien spielen der JNK- sowie der p 38-Signalweg in der Regulation der Apoptose eine Rolle (Leppä et al., 1999). Die Apoptose ist mit erhöhter p

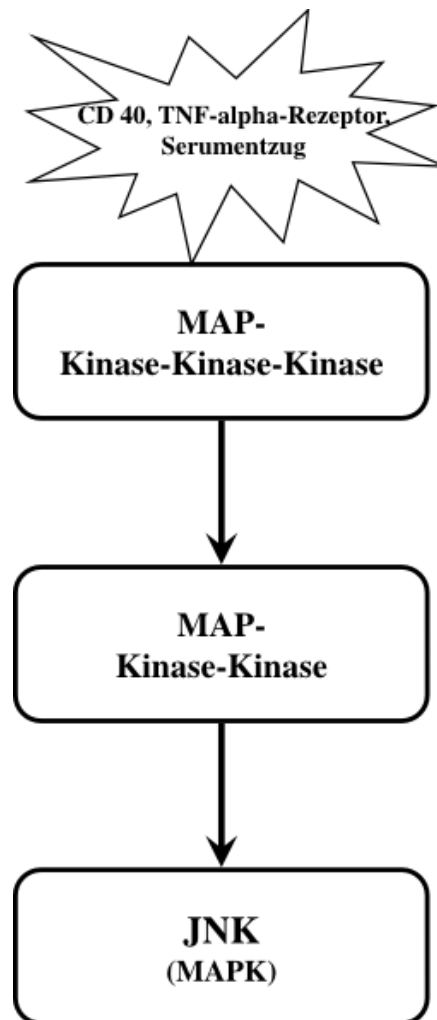


Abbildung 15: Skizzierter Signalübertragungsweg von JNK. (Modifiziert nach Widmann et al. 1999)

38-Phosphorylierung und Dephosphorylierung von ERK 1/2 und JNK verbunden. ERK 1/2 und JNK wurden vermindert exprimiert und es kam zu einem verstärkten G 1-Arrest (Wang et al., 2001). Durch die quantitative Bestimmung der Expressionsprofile von p 38, Phospho-JNK und Phospho-ERK 1/2 mittels Western Blot konnte in der vorliegenden Arbeit der Einfluß von ApoH und cApoH auf die humanen Endothelzellen aufgezeigt werden. Dabei kam es nach einer Inkubationszeit von 90 Minuten mit ApoH und cApoH bei allen drei Proteinen zu einer vermehrten Expression im Vergleich mit den Kontrollen Plasmin und Medium.

5.6 Zell-Zyklus

Um die Konsequenzen einer Inkubation mit ApoH und cApoH beurteilen zu können, wurden die behandelten Zellen den einzelnen Zell-Zyklus-Phasen zugeordnet. Der Zell-Zyklus ist in vier Phasen unterteilt. Die Phasen, in denen DNA synthetisiert wird (S-Phase) und die Mitose stattfindet (M-Phase) sind durch sogenannte „Gap,-Phasen (G 1 und G 2) unterschiedlicher Länge unterbrochen. Verschiedene Kontrollmechanismen sichern einen geregelten Ablauf des Zell-Zyklus. Für den Übergang aus der G 2 in die M-Phase werden sowohl Cyclin A 2 und B 1 benötigt, die zusammen mit Cdk einen Komplex bilden. Cyclin A 2 wird am Übergang der G 1 in die S-Phase und M-Phase des Zell-Zyklus benötigt.

Bei den Untersuchungen kam es jeweils zu einer deutlichen Verschiebung der Zell-Zyklus-Phasen im Vergleich mit den Kontrollen. Sowohl ApoH als auch cApoH führten zu einer Verteilungsverschiebung zugunsten der S-Phase und den G 2/M-Phasen. Um die Rolle des Annexin-II-Rezeptors in der Signalübertragung zu überprüfen, wurde bei einigen Zell-Zyklus-Versuchsansätzen der Rezeptor durch eine vorangehende Inkubation mit einem Anti-Annexin-II-Antikörper blockiert. Dies führte zu einer vollständigen Aufhebung der zuvor beschriebenen Veränderungen.

Wu beschreibt 2007 die Veränderungen auf Proteinebene bei einem Zelltod von HUVECs. Dabei findet sich eine verminderte Expression von Cdk 4,

Cyclin A, Cyclin D 1, dem Retinoblastoma-Gen (RB), dem anti-apoptotischen Bcl-2 und dem VEGF-Rezeptor. Gleichzeitig konnte eine Aktivierung der Cdk-Inhibitoren p 21 und p 27 gemessen werden (Wu et al., 2007). Eigene Untersuchungen (siehe 4.5.) zeigten ein vermehrtes Auftreten des Cdk-Inhibitors p 27 (Kip) nach der Behandlung der Zellen mit ApoH und cApoH. Nimmt man die Ergebnisse von Wu als Grundlage, konnte mit den durchgeführten Versuchen eine anti-angiogene Wirkung von ApoH und cApoH bestätigt werden. Gleichzeitig konnte eine vermehrte Expression von Cdk 4 und Cyclin D 1 in den mit ApoH und cApoH behandelten Endothelzellen festgestellt werden. Eine vermehrte Expression konnte Wu nicht bestätigen. Larrea et al. hingegen stellte eine durch phosphoryliertes p27 induzierte Aktivierung sowie Vermehrung von Cdk 4 und Cyclin D1 fest, was eigene Ergebnisse untermauert.

5.7 Ausblick

Angiogenese spielt eine große Rolle bei der Tumorprogression sowie der Metastasierung. Durch eine Beeinflussung der Angiogenese mittels anti-angiogener Substanzen öffnen sich ansprechende Therapiemöglichkeiten bei malignen Erkrankungen sowie proliferativen Prozessen. Dabei sind zahlreiche Mechanismen denkbar, um entsprechend regulierend in die Angiogenese einzugreifen. Als repräsentatives Beispiel sind hier die bereits bei Kolorektal-Karzinom sowie als Therapie der proliferativen Maculadegeneration eingesetzten monoklonalen Antikörper gegen den VEGF-Rezeptor (z.B. Avastin) zu nennen.

Die vorliegenden Ergebnisse demonstrieren eine deutliche Hemmung der Endothelzellaktivität durch ApoH. Da es sich bei ApoH um ein körpereigenes Protein handelt, sind bei einem möglichen therapeutischen Einsatz des Proteins mit wesentlich geringeren unerwünschten Nebenwirkungen zu rechnen als bei nicht körpereigenen Substanzen. Eine Weiterführung der Experimente, die sich mit dem Auffinden des aktiven Fragmentes von ApoH beschäftigen, könnte beispielsweise durch die Entwicklung eines nur wenige Aminosäuren langen Peptides, welches die anti-angiogene Wirkung von ApoH beinhaltet

würde, zu neuen Therapieoptionen führen.

6 Zusammenfassung/Summary

6.1 Zusammenfassung

ApoH ist ein endogenes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 54 kDa. Es wird sowohl in der Leber als auch in der Plazenta synthetisiert. Das monomere Protein besitzt 4 sich wiederholende Domänen und eine 5. Domäne, an die sich ein C-terminaler Schwanz anschließt. Dieser 20 Aminosäuren lange Schwanz kann durch Plasmin enzymatisch zu einer geclippten Form (cApoH) umgesetzt werden.

Die physiologische Funktion des Proteins ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Vorausgegangene Untersuchungen demonstrierten jedoch, dass ApoH Einfluß auf die Angiogenese und somit Proliferation vaskulärer Endothelzellen ausübt.

Um den Einfluß von ApoH und cApoH auf Endothelzellen untersuchen zu können, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit Proliferationsversuche im Zellkulturmodell mit humanen Endothelzellen und bovinen Kapillarendothelzellen durchgeführt. Des weiteren wurden Auswirkungen von ApoH und cApoH auf einzelne Zellzyklusphasen der Endothelzellen untersucht. Um auch die Auswirkungen von ApoH und cApoH innerhalb der Zelle beurteilen zu können, wurde in darauffolgenden Experimenten das Augenmerk auf die intrazelluläre Signalweiterleitung gelegt. Dabei wurden insbesondere die MAP-Kinasen p 38, JNK, ERK 1/2 untersucht, da es einen Zusammenhang zwischen Apoptose und ihrer Aktivierung gibt. Der intrazelluläre Proteingehalt wurde mittels Western Blot sowie Flow-Cytometrie gemessen.

In den Proliferationsversuchen konnte eine deutliche Wachstumshemmung der Endothelzellen durch ApoH und cApoH festgestellt werden. Bei der Zuordnung der Zellen zu den einzelnen Zellzyklusphasen fiel auf, dass es durch ApoH und cApoH zu einer Verschiebung der Phasen zugunsten der G 2-, M- und S-Phasen kam. Eine 90-minütige Inkubation der Endothelzellen mit ApoH und cApoH bewirkte bei JNK und ERK 1/2 eine deutliche Erhöhung der Aktivität in der Flow-Cytometrie-Untersuchung. Im Falle von p 38 kam

es durch ApoH jedoch zu einer Verminderung der Aktivität. Western Blot Experimente ergaben bei allen drei MAP-Kinasen eine vermehrte Expression im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen bzw. mit Plasmin behandelten Zellen.

Im Rahmen der Arbeit wurde nachgewiesen, dass es unter dem Einfluß von ApoH und cApoH zu einer Hemmung der Angiogenese von Endothelzellen kommt. Es konnten sowohl Auswirkungen auf die Endothelzellmodifikation als auch auf die Endothelzellaktivität belegt werden.

6.2 Summary

ApoH is an endogenous glycoprotein with a molecular weight of 54 kDa. It is synthesised in the liver and in the placenta. Beside 4 recurring domains, the monomere protein ApoH owns a 5th domain to which a C-terminal tail is adopted. Therefore, the whole tail consists of 20 amino acids. By the use of plasmin, it can be transformed enzymatically to a clipped form (cApoH). To date, the physiological function of the protein is not clarified in a definite way. However, earlier research shows that ApoH influences the angiogenesis and that it bears on the proliferation of vascular endothelial cells.

The present work, though, places great emphasis on the influence of ApoH and cApoH on endothelial cells. Therefore, proliferation tests in the cell culture model were carried out with both, human endothelial cells and bovine capillary endothelial cells. One can also find an analysis of the effects of ApoH and cApoH on all cell cycle phases of endothelial cells in this work. Furthermore, different tests served to pay special attention to the intracellular signal forwarding, so that implications of ApoH and cApoH could be described, too. In doing so, attention was directed to the MAP-kinases p 38, JNK, ERK 1/2 as there is a connection between apoptosis and their activation. It should be mentioned that the amount of intracellular protein was measured by the use of western blot and flow-cytometry.

The proliferation test showed that the use of ApoH and cApoH led to a clear

growth inhibition of endothelial cells. By the time the cells were allocated to all cell phases, it was appealing that some cell phases were changed. It can therefore be concluded that ApoH and cApoH help to detect more endothelial cells in G₂-, M- and S-phases. In the flow-cytometry investigation, a 90-minute incubation of the endothelial cells with ApoH and cApoH revealed a clear increase of activity with JNK and ERK 1/2. However, it should be remarked that ApoH caused a decrease of activity with p 38. Western blot tests showed an increased expression with all 3 MAP-kinases when compared to untreated controls and to cells treated with plasmin. One can sum up that tests done for this work emphasise the fact that the angiogenesis of endothelial cells is inhibited when in contact with ApoH and cApoH. In this matter, not only effects on the modification of endothelial cells have been proven but also effects on the activity of endothelial cells.

7 Literaturverzeichnis

1. Anderson, N.G., Maller, J.L., Tonks, N.K. and Sturgill, T.W. Requirements for integration of signal from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase (1990) *Nature* **343**, 651-653
2. Averna, M., Paravizzini, G., Marino, G., Emmanuele, G., Cefalu, A.B., Magro, G., Bartolini, G., Ragusa, M., Noto, D., Barbagallo, C.M., Calleri, D., Mazzarino, M.C., Notarbartolo, A. and Travali, S. Beta-2-glycoprotein I is growth regulated and plays a role as survival factor for hepatocytes (2004) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 1297-1305
3. Averna, M., Paravizzini, G., Marino, G., Lanteri, E., Cavera, G., Barbagallo, C.M. and Petralia, S., Cavallaro, S., Magro, G., Grasso, S., Notarbartolo, A. and Travali, S. Liver is not the unique site of synthesis of beta 2-glycoprotein I (apolipoprotein H): evidence for an intestinal localization (1997) *Int J Clin Lab Res.* **27**, 207-12
4. Balasubramanian, K. and Schroit, A.J. Characterization of phosphatidylserine dependent beta 2-glycoprotein I macrophage interactions (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 29272-29277
5. Beecken, W.D. Angiogenese und Antiangiogenese des Transitionalzellkarzinoms (2002) *Medizinische Habilitationsschrift, Universität Frankfurt am Main*
6. Beecken, W.D., Engl, T., Ringel, E.M., Camphausen, K., Michaelis, M., Jonas, D., Folkman, J., Shing, Y. and Blaheta, R.A. An Endogenous Inhibitor of Angiogenesis derived from a Transitional Cell Carcinoma: Clipped β 2-Glycoprotein I (2006) *Ann.Surg. Oncol.* **13**, 1241-1251
7. Bizarro, N., Tonutti, E., Villalta, D., Tampoia, M. and Tozzoli, R. Prevalence and clinical correlation of anti-phospholipid-binding protein antibodies in anticardiolipin-negative patients with systemic lupus ery-

- thematosis and woman with unexplained recurrent miscarriages (2005) *Arch. Pathol. Lab. Med.* **129** 61-68
8. Bohgaki, M., Atsumi, T., Yamashita, Y., Yasuda, S., Sakai, Y., Furusaki, A., Bohgaki, T., Amengual, O., Amasaki, Y. and Koike, T. The p38 mitogen-activated protein kinase pathway mediates induction of the tissue factor gene in monocytes stimulated with human monoclonal anti-beta2Glycoprotein I antibodies (2004) *Int. Immunol.* **16**, 1633-1641
 9. Bouck, N., Stellmach, V. and Hsu, S.C. How tumors become angiogenic (1996) *Adv. Cancer Res.* **69**, 135-174
 10. Bouma, B., De Groot, P.G., van den Elsen, J.M., Ravelli, R.B., Schouten, A., Simmelink, M.J., Derksen, R.H., Kroon, J. and Gros, P. Adhesion mechanism of human beta(2)-glycoprotein I to phospholipids based on its crystal structure (1999) *EMBO J.* **18**, 5166-5174
 11. Brighton, T.A., Hogg, P.J., Dai, Y.P., Murray, B.H., Chong, B.H. and Chesterman, C.N. β 2glycoprotein I in thrombosis: evidence for a role as a natural anticoagulant (1996) *Br. J. Haematol.* **93**, 185-194
 12. Cai, G., Satoh, T. and Hoshi, H. Purification and characterization of an endothelial cell-viability maintaining factor from fetal bovine serum (1995) *Biochim. Biophys. Acta* **1269**, 13-18
 13. Caronti, B., Calderaro, C., Alessandri, C., Conti, F., Tinghino, R., Palladini, G. and Valesini, G. Beta2-glycoprotein I (beta2-GPI) mRNA is expressed by several cell types involved in anti-phospholipid syndrome-related tissue damage (1999) *Clin Exp Immunol.* **115**, 214-219
 14. Chamley, L.W., Allen, J.L and Johnson, P.M. Synthesis of beta2 glycoprotein 1 by the human placenta (1997) *Placenta* **18**, 403
 15. Chang, F., Steelman, L.S., Shelton, J.G., Lee, J.T., Navolanic, P.M., Blalock, W.L., Franklin, R. and McCubrey, J.A. Regulation of cell cycle

- progression and apoptosis by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway (2003) *Int. J. Oncol.* **22**, 469-480
16. Chuang, S.M., Wang, I.C. and Yang, J.L Roles of JNK, p38 and ERK mitogen-activated protein kinases in the growth inhibition and apoptosis induced by cadmium (2000) *Carcinogenesis* **21**, 1423-1432
 17. Cleary, C.A., Jungkim, S., Ravikumar, K., Kelliher, C., Acheson, R.W. and Hickey-Dwyer, M. Intravitreal bevacizumab in the treatment of neovascular age-related macular degeneration, 6- and 9-month results (2008) *Eye* **22**, 82-86
 18. Creutz, C.E. The annexins and exocytosis (1992) *Science* **258**, 924-931
 19. Crook, M., Chng, S.I., Lumb, P. and Reid, F. Serum apolipoprotein H and its relationship to blood pressure, serum lipids, fasting plasma glucose and insulin in normal individuals (2001) *Ann. Clin. Biochem.* **38**, 494-498
 20. Cvirn, G., Gallistl, S., Koestenberger, M., Kutschera, J., Ferstl, U., Kellner, J., Jurgens, G. and Gries, A. Effects of beta2-glycoprotein-I on platelet aggregation in cord versus adult whole blood (2007) *Platelets* **18**, 24-28
 21. Day, J.R., O'Hara, P.J., Grant, F.J., Lofton-Day, C. Berkaw, M.N., Werner, P. and Arnaud, P. Molecular cloning and sequence analysis of the cDNA encoding human apolipoproteinH (β 2-glycoprotein-1) (1992) *Int. J. Clin. Lab. Res.* **21**, 256-263
 22. De Groot, P., Bouma, B., Lutters, B., Simmelink, M., Derksen, R. and Gros, P. Structure-Function studies on β 2-glycoprotein I (2000) *Journal of Autoimmun.* **15**, 87-89
 23. Del Papa, N., Guidali, L., Sala, A., Buccelatti, C., Khamashta, M.A., Ichikawa, K., Koike, T., Balestrieri, G., Tincani, A., Hughes, G.R., and

- Meroni, P.L. Endothelial cells as target for antiphospholipid antibodies: human polyclonal and monoclonal anti- β 2-glycoprotein I antibodies react in vitro with endothelial cells through adherent β 2-glycoprotein I and induce endothelial activation (1997) *Arthritis Rheum.* **40**, 551-561
24. Evans, T.C. and Nelsestuen, G.L. Calcium and membrane-binding properties of monomeric and multimeric annexin II (1994) *Biochemistry* **33**, 13231-13238
25. Ferrera, N. Vascular endothelial growth factor and the regulation of angiogenesis (2000) *Recent Prog.Horm.Res.* **55**, 15-35
26. Folkman, J. and Shing, Y. Angiogenesis (1992) *J Biol Chem.* **16**, 10931-10934
27. Folkman, J. Fundamental concepts of the angiogenic process (2003) *Curr. Mol. Med.* **3**, 643-651
28. Folkman, J. The role of angiogenesis in tumor growth (1992) *Semin. Cancer Biol.* **3**, 65-71
29. Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications (1971) *N Engl J Med.* **21**, 1182-1186
30. Galli, M., Comfurius, P., Maassen, C., Hemker, H.C., de Baets, M.H., van Breda-Vriesman, P.J., Barbui, T., Zwaal, R.F. and Bevers, E.M. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor (1990) *Lancet* **335**, 1544-1547
31. Genvresse, I., Lüftner, D., Späth-Schwalbe, E. and Buttgereit, F. Prevalence and clinical significance of anticardiolipin and anti-beta2- glycoprotein I antibodies in patients with non-Hodgkin´s lymphoma (2002) *Eur. J. Haematol.* **68**, 84-90

32. Hajjar, K.A., Jacovina, A.T. and Chacko, J. An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator I. Identity with annexin II (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 21191-21197
33. Hanahan, D. and Folkman, J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumor angiogenesis (1996) *Cell* **86**, 353-364
34. Harats, D. and George, J. β 2-glycoprotein I and atherosclerosis (2001) *Curr. Opin. Lipidol.* **12**, 543-546
35. Hasunuma, Y., Matsuura, E., Makita, Z., Katahira, T., Nishi, S. and Koike, T. Involvement of β 2-glycoprotein I and anticardiolipin antibodies in oxidatively modified low-density lipoprotein uptake by macrophages (1997) *Clin. Exp. Immunol.* **107**, 569-573
36. Henry, M.L., Everson, B. and Ratnoff, O.D. Inhibition of the activation of Hageman factor (factor XII) by beta 2-glycoprotein I (1988) *J. Lab. Clin. Med.* **111**, 519-523
37. Holmgren, L., O'Reilly, M.S. and Folkman, J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression (1995) *Nat. Med.* **1**, 149-153
38. Hong, D.P. Hagihara, Y., Kato, H. and Goto, Y. Flexible loop of β 2-glycoprotein I domain V specifically interacts with hydrophobic ligands (2001) *Biochemistry* **40**, 8092-8100
39. Horbach, D.A., van Oort, E.T., Lisman, T., Maijers, J.C., Derksen, R.H. and de Groot, P.G. Apoh is proteolytically cleaved in vivo upon activation of fibrinolysis (1999) *Thromb. Haemostasis* **81**, 87-95
40. Horkko, S., Miller, E., Branch, D.W., Palinski, W. and Witztum, J.L. The epitopes for some antiphospholipid antibodies are adducts of oxidized phospholipid and beta2 glycoprotein 1 (and other proteins) (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 10356-10361

41. Hunt, J. and Krilis, S. The fifth domain of beta 2-glycoprotein I contains a phospholipid binding site (Cys281-Cys288) and a region recognized by anticardiolipin antibodies (1994) *J. Immunol.* **152**, 653-659
42. Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K., tenDijke, P., Saitoh, M., Moriguchi, T., Takagi, M., Matsumoto, K., Miyazono, K. and Gotoh, Y. Induction of apoptosis by ASK 1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways (1997) *Science* **275**, 90-94
43. Itoh, Y., Inuzuka, K., Kohno, I., Wada, H., Shiku, H., Ohkura, N. and Kato, H. Highly increased plasma concentrations of the nicked form of apoh in patients with leukemia and with lupus anticoagulant: measurement with a monoclonal antibody specific for a nicked form of domain V (2000) *J Biochem. (Tokio)* **128**, 1017-1024
44. Jones, D.W., Gallimore, M.J., Harris, S.L. and Winter, M. Antibodies to factor XII associated with lupus anticoagulant (1999) *Thromb. Haemost.* **81**, 387-390
45. Kandiah, D.A., Sali, A., Sheng, Y., Victoria, E.J., Marquis, D.M., Coutts, S.M. and Krilis, S.A. Current insights into the antiphospholipid syndrome: clinical, immunological, and molecular aspects (1998) *Adv. Immunol.* **70**, 507-563
46. Keyse, S.M. An emerging family of dual specificity MAP kinase phosphatases (1995) *Biochem. Biophys. Acta* **1265**, 152-160
47. Kochl, S, Fresser, F., Lobentanz, E., Baier, G. and Utermann, G. Novel interaction of apolipoprotein (a) with beta-2 glycoprotein I mediated by the kringle IV domain (1997) *Blood* **90**, 1482-1489
48. Koike, T., Ichikawa, K., Atsumi, T., Kasahara, H. and Matsuura, E. Beta-2-glycoprotein I-anti-beta 2-glycoprotein I interaction (2000) *J. Autoimmun.* **15**, 97-100

49. Kyriakis, J.M. and Avruch, J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation (2001) *Physiol.Rev.* **81**, 807-870
50. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 (1970) *Nature* **227**, 680-685
51. Larrea, M.D., Liang, J., Da Silva, T., Hong, F., Shao, S.H., Han, K., Dumont, D. and Slingerland, J.M. Phosphorylation of p27Kip1 regulates assembly and activation of cyclin D1-Cdk4 (2008) *Mol.Cell.Biol.* **28**,6462-72
52. Leppä, S. and Bohmann, D. Diverse functions of JNK signaling and c-Jun in stress response and apoptosis (1999) *Oncogene* **18**, 6158-6162
53. Li, Z. and Krilis, S.A. Anti-beta(2)-glycoprotein I antibodies an the antiphospholipid syndrome (2003) *Autoimmunity reviews* **2**, 229-234
54. Liu, W., Ahmad, S.A., Reinmuth, N., Shaheen, R.M., Jung, Y.D., Fan, F. and Ellis, L.M. Endothelial cell survival and apoptosis in the tumor vasculature (2000) *Apoptosis* **5**, 323-328
55. Lopez-Lira, F., Rosales-Leon, L., Martinez, V.M. and Ruiz Ordaz, B.H. The role of beta2-glycoprotein I in the activation of plasminogen (2006) *Biochem. Biophys. Acta* **1764**, 815-823
56. Ma, K., Simantow, R., Zhang, J.C., Silverstein, R., Hajjar, K.A. and McCrae, K.R. High affinity binding of β 2-glycoprotein I to human endothelial cells is mediated by annexin II (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 15541-15548
57. Manfredi, A.A., Rovere, P., Heltai, S., Galati, G., Nebbia, G., Tincani, A., Lestrieri, G. and Sabbadini, M.G. Apoptotic cell clearance in systemic lupus erythematosus. Role of beta2-glycoprotein I (1998) *Arthritis Rheum.* **41**, 215-223

58. Matsuura, E., Igarashi, Y., Fujimoto, M., Ichikawa, K. and Koike, T. Anticardiolipin cofactor(s) and differential diagnosis of autoimmune disease (1990) *Lancet* **336**, 177-178
59. Matsuura, E., Inagaki, J., Kasahara, H., Yamamoto, D., Atsumi, T., Kobayashi, K., Kaihara, K., Zhao, D., Ichikawa, K., Tsutsumi, A., Yasuda, T., Triplett, D.A. and Koike, T. Proteolytic cleavage of β 2-glycoprotein I: reduction of antigenicity and the structural relationship (2000) *Int. Immunol.* **12**, 1183-1192
60. McNeil, H.P., Simpson, R.J., Chesterman, C.N. and Krilis, S.A. Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: beta 2-glycoprotein I (apolipoprotein H) (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 4120-4124
61. Mehdi, H., Manzi, S., Desal, P., Chen, Q., Nestlerode, C. and Bontempo, F. A functional polymorphism at the transcriptional initiation in beta2-glycoprotein I (apolipoprotein H) associated with reduced gene expression and lower plasma levels of beta2-glycoprotein I (2003) *Eur. J. Biochem.* **270**, 230-238
62. Miyakis, S., Giannakopoulos, B. and Krilis, S. Beta2-glycoprotein I-function in health and disease (2004) *Thromb. Research* **114**, 335-346
63. Morgan, R.O. and Fernandez, M.P. Annexin gene structures molecular evolutionary genetics (1994) *Cell Mol. Life Sci.* **53**, 508-515
64. Moses, M.A., Klagsbrun, M. and Shing, Y. The role of growth factors in vascular cell development and differentiation (1995) *Int. Rev. Cyt.* **161**, 1-48
65. Nimpf, J., Bevers, E.M., Bomans, P.H.H., Till, U., Wurm, H., Kostner, G.M. and Zwaal, R.F.A. Prothrombinase activity of human platelets is inhibited by apoh (1986) *Biochim. Biophys. Acta* **884**, 142-149

66. Ohkura, N., Hagihara, Y., Yoshimura, T., Goto, Y. and Kato, H. Plasmin can reduce the function of human beta2-glycoprotein I by cleaving domain V into a nicked form (1998) *Blood* **91**, 4173-4179
67. Palinski, W., Horkko, S., Miller, E., Steinbrecher, U.P., Powell, H.C., Curtiss, L.K. and Witztum, J.L. Cloning of monoclonal autoantibodies to epitopes of oxidized lipoproteins from apolipoprotein E-deficient mice. Demonstration of epitopes of oxidized low density lipoprotein in human plasma (1996) *J. Clin. Invest.* **98**, 800-814
68. Patan, S. Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling (2000) *J.Neurooncol.* **50**, 1-15
69. Patan, S., Munn, L.L., Tanda, S., Rodberge, S., Jain, R.K. and Jones, R.C. Vascular morphogenesis and remodeling in a model of tissue repair: blood vessel formation and growth in the ovarian pedicle after ovariectomy (2001) *Circulation Research* **89**, 723-731
70. Pennings, M.T., Derksen, R.H., van Lummel, M., Adelmeijer, J., Vanhoorelbeke, K., Urbanus, R.T., Lisman, T. and de Groot, P.G. Platelet adhesion to dimeric beta-glycoprotein I under conditions of flow is mediated by at least two receptors: glycoprotein I α and apolipoprotein E receptor 2' (2007) *J. Thromb. Haemost.* **5**, 369-377
71. Polz, E. and Kostner, G.M. Binding of beta 2-glycoprotein-I to intralipid: determination of the dissociation constant (1979) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **90**, 1305-1312
72. Polz, E. and Kostner, G.M. The binding of beta 2-glycoprotein-I to human serum lipoproteins: distribution among density fractions (1979) *FEBS Lett.* **102**, 183-186
73. Ragusa, M.A., Costa, S., Cefalu, A.B., Noto, D., Fayer, F., Travali, S., Averna, M.R. and Gianguzza, F. RT-PCR and in situ hybridization of

- β₂-Glykoprotein I expression in rat normal tissues (2006) *Int. J. Mol. Med.* **18**, 449-455
74. Rand, J.H. The Antiphospholipid Syndrome (2007) *Hematology* **1**, 136
75. Robinson, M.J. and Coob, M.H. Mitogen-activated protein kinase pathways (1997), *Curr. Opin. Cell. Biol.* **9**, 180-186
76. Roubey, R.A., Eisenberg, R.A., Harper, M.F. and Winfield, J.B. Anti-cardiolipin autoantibodies recognize β₂-glycoprotein I in the absence of phospholipids. Importance of Ag density and bivalent binding (1995) *J. Immunol.* **154**, 954-960
77. Rousseau, S., Houle, F., Landry, J. and Huot, J. p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells (1997) *Oncogene* **15**, 2169-2177
78. Schaeffer, H.J. and Weber, M.J. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 2435-2444.
79. Schousboe, I. beta 2-Glycoprotein I: a plasma inhibitor of the contact activation of the intrinsic blood coagulation pathway (1985) *Blood* **66**, 1086-1091
80. Schultze, H.E., Heide, K. and Haupt, H. Über ein bisher unbekanntes niedermolekulares β₂-Globulin des Humanserums (1961) *Naturwissenschaften* **48**, 719-724
81. Schwarzenbacher, R., Zeth, K., Diederichs, K., Gries, A., Kostner, G.M., Laggner, P. and Prassl, R. Crystal structure of human beta₂-glycoprotein I: implications for phospholipid binding and the antiphospholipid syndrome (1999) *EMBO J.* **18**, 6228-6239

82. Sebolt-Leopold, J.S. and Herrera, R. Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer (2004) *Nat.Rev.Cancer* **4**, 937-947
83. Seger, R. and Krebs, E.G. The MAPK signaling cascade (1995) *FASEB J.* **9**, 726-735
84. Shapiro, S.S. The lupus anticoagulant/antiphospholipid syndrome (1996) *Annu. Rev. Med.* **47**, 533-553
85. Sheng, Y., Sali, A., Herzog, H., Lahnstein, J and Krilis, S.A. Site-directed mutagenesis of recombinant human apoh identifies a cluster of lysine residues that are critical for phospholipids binding and anti-cardiolipin antibody activity (1996) *Immunol.* **157**, 744-751
86. Shi, T., Iverson, G.M., Qi, J.C., Cockerill, K.A., Linnik, M.D., Konecny, P. and Krilis, S. β 2-glycoprotein I binds factor XI and inhibits its activation by thrombin and factor XIIa: Loss of inhibition by clipped β 2-glycoprotein I (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 3939-3943
87. Shi, W., Chong, B.H., Hogg, P.J. and Chesterman, C.N. Anticardiolipin antibodies block the inhibition by beta 2-glycoprotein I of the factor Xa generating activity of platelets (1993) *Thromb. Haemost.* **70**, 342-345
88. Steinkasserer, A., Barlow, P.N., Willis, A.C., Kertesz, Z., Campbell, I.D., Sim, R.B. and Norman, D.G. Activity, disulphide mapping and structural modeling of the fifth domain of human beta 2-glycoprotein I (1992) *FEBS Lett.* **313**, 193-197
89. Thakker, G.D., Hajjar, D.P., Muller, W.A. and Rosengart, T.K. The role of phosphatidylinositol 3-kinase in vascular endothelial growth factor signaling (1999) *J.Biol.Chem.* **274**, 10002-10007
90. Van Lummel, M., Pennings, M.T., Derksen, R.H., Urbanus, R.T., Lutters, B.C., Kaldenhoven, N. and de Groot, P.G. The binding site in

- beta2-glycoprotein I for ApoER2' on platelets is located in domain V (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 36729-36736
91. Vindelov, L.L., Christensen, I.J. and Nissen, N.I. A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis (1983) *Cytometry* **3**, 323-327
92. Vindelov, L.L., Christensen, I.J., Jensen, G. and Nissen, N.I. Limits of detection of nuclear DNA abnormalities by flow cytometric DNA analysis. Results obtained by a set of methods for sample-storage, storage, staining, and internal standardization (1983) *Cytometry* **3**, 332-339
93. Wang, Z., Jiang, C., Ganther, H. and Lü, J. Antimitogenic and proapoptotic activities of methylselenic acid in vascular endothelial cells and associated effects on PI3K-AKT, ERK, JNK and p38 MAPK signaling (2001) *Cancer Res.* **61**, 7171-7178
94. Whitmarsh, A.J., Shore, P., Sharrocks, A.D. and Davis, R.J. Integration of MAP kinase signal transduction pathways at the serum response element (1995) *Science* **269**, 403-407
95. Widmann, C., Gibson, S., Jarpe, M.B. and Johnson, G.L. Mitogen-activated Protein-kinase: Conservation of a three-kinase module from yeast to human (1999) *Physiol. Rev.* **79**, 143-180
96. Wu, L.W., Chiang, Y.M., Chuang, H.C., Lo, C.P., Yang, K.Y., Wang, S.Y. and Shyur, L.F. A novel Polyacetylene Significantly Inhibits Angiogenesis and Promotes Apoptosis in Human Endothelial Cells through Activation of the CDK Inhibitors and Caspase-7 (2007) *Planta Med.* **73**, 655-661
97. Wu, L.W., Mayo, L.D., Dunbar, J.D., Kessler, K.M., Baerwald, M.R., Jaffe, E.A., Wang, D., Warren, R.S. and Donner, D.B. Utilization of distinct signaling pathways by receptors for vascular endothelial growth

- factor and other mitogens in the induction of endothelial cell proliferation (2000) *J.Biol.Chem.* **275**, 5096-5103
98. Wurm, H. beta 2-Glycoprotein-I (apolipoprotein H) interactions with phospholipid vesicles (1984) *Int. J. Biochem.* **16**, 511-515
99. Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R.J. and Greenberg, M.E. Opposing effects of Erk and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis (1995) *Science* **270**, 1326-1331
100. Yang, Y. and Yu, X. Regulation of apoptosis: the ubiquitous way (2003) *FASEB J.* **17**, 790-799
101. Yasuda, S, Atsumi, T., Ieko, M., Matsuura, E., Kobayashi, K., Inagaki, J., Kato, H., Tanaka, H., Yamakado, M., Akino, M., Saitou, H., Amasaki, Y., Yodo, S., Amengual, O. and Koike, T. Nicked β 2-Glycoprotein I: a marker of cerebral infarct and a novel role in the negative feedback pathway of extrinsic fibrinolysis (2004) *Blood* **103**, 3766-3772
102. Yasuda, S., Bohgaki, M., Atsumi, T. and Koike, T. Pathogenesis of antiphospholipid antibodies: impairment of fibrinolysis and monocyte activation via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway (2005) *Immunobiology* **10**, 775-780
103. Yoshino, T., Kishi, H., Nagata, T., Tsukada, K., Saito, S. and Muraguchi, A. Different involvement of p38 MAP kinase pathway and Bax-translocation in the mitochondria-mediated cell death in TCR- and dexamethasone-stimulated thymocytes (2001) *Eur.J.Immunol.* **9**, 2702-2708
104. Yu, Y. and Sato, J.D. MAP kinases, phosphatidylinositol 3-kinase and p70 S6 kinase mediate the mitogenic response of human endothelial cells to vascular endothelial growth factor (1999) *J.Cell.Physiol.* **178**, 235-246

-
105. Zhang, J. and McCrae, K.R. Annexin A2 mediates endothelial cell activation by antiphospholipid/anti- β 2 glycoprotein I antibodies (2005)
Blood **105**, 1964-1969

8 Danksagungen

Herrn Professor Dr. Dietger Jonas möchte ich recht herzlich für die Überlassung des interessanten Themas danken.

Außerordentlich danken möchte ich Herrn Professor Dr. Roman A. Blaheta für seine hervorragende Betreuung, Hilfsbereitschaft und Geduld während meiner Arbeit.

Besonders danken möchte ich Herrn Professor Dr. Wolf-Dietrich C. Becken, dessen umfangreiche Arbeiten an ApoH dieses Thema überhaupt erst entstehen ließen.

Herrn Professor Judah Folkman danke ich für die einmalige Möglichkeit, im Sommer 2006 in seinen Laboratorien des Vascular Biology Programs im Childrens Hospital Boston, Harvard Medical School mitarbeiten zu können. Sein unerwarteter Tod im Januar 2008 bedeutete einen großen Verlust für die Angiogenese-Forschung.

Gleichzeitig gilt mein besonderer Dank Herrn Associate Professor Yuen Shing, der mich während meiner Zeit in Boston betreute und mir in zahlreichen Gesprächen hilfreich als Ratgeber zur Seite stand.

Für die finanzielle Unterstützung im Rahmen eines Travel Allowances-Stipendium und dem damit verbundenen Aufenthalt in Boston möchte ich mich recht herzlich bei Boehringer Ingelheim Fonds bedanken.

Frau MTA Christa Blumenberg möchte ich ganz herzlich für ihre Hilfe rund um meine Versuche danken. Ohne sie als so liebenswerte Kollegin wäre das Labor einfach nicht unser Labor gewesen.

Frau MTA Iris Müller danke ich für ihre große Hilfsbereitschaft bei allen „Alltagsfragen“, im Labor.

Frau MTA Elsie Oppermann danke ich sehr für ihren wertvollen Rat und ihre Hilfe.

Außerdem möchte ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Forschungslabore des Zentrums der Chirurgie für die ständige Hilfsbereitschaft und gute Zusammenarbeit danken.

Für die Unterstützung bei biochemischen Fragen möchte ich mich ganz

herzlich bei Jan Babica bedanken.

Frau MTA Marie-Luise Hennes danke ich sehr für die angenehme und interessante Ausbildung in Freiburg. Sie hat bei mir den Grundstein für Laborarbeiten und Versuchsplanungen gelegt und ist somit nicht ganz unbeteiligt an meiner Begeisterung für experimentelles Arbeiten und der Wahl meines Dissertationsthemas.

Ein vielleicht etwas ungewöhnlicher Dank geht an Coldplay und Keane, die mir nicht nur in den zahlreichen Stunden im Labor, sondern insbesondere in der Zeit des Zusammenschreibens „im Ohr lagen“, und mich dadurch ständig motivierten.

Rafael Reuter danke ich sehr dafür, dass er meine Begeisterung für eine neue und zum Glück auch endgültige Formatierung der Dissertation mit mir teilte und mir immer wieder mit zahlreichen Ratschlägen zur Seite stand.

Bei Meli möchte ich mich besonders für die Tatsache bedanken, dass sie sich während der gesamten Zeit die kleinen Erfolge und Mißerfolge geduldig angehört, mir Tipps gegeben hat und mich dadurch sehr unterstützte. Ich bin sehr froh, dass sie mich seit unserer gemeinsamen Zeit in Freiburg nie wirklich losgeworden ist.

Meiner Schwester Line danke ich dafür, dass sie meine Schwester ist und wir gerade in den letzten Monaten noch viel enger zusammengewachsen sind. Sie hat mit ihrem Satz „Familie ist eben doch Familie“, absolut Recht behalten und für ihre ausgesprochen liebe Unterstützung im November bin ich ihr einfach so sehr dankbar.

9 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Eva-Maria Ringel
Geburtsdatum: 30. März 1979
Geburtsort: Frankfurt am Main
Eltern: Wolfgang Karl Ringel
Regina Ringel, geb. Pfaff
Nationalität: Deutsch

Schulbildung

1985- 1989 Grundschule Gedern
1989- 1998 Gymnasium Nidda

Berufsausbildung

1998- 2001 Ausbildung zur Veterinär-Medizinisch
Technischen Assistentin am Chemischen
und Veterinär-Untersuchungsamt
in Freiburg im Breisgau

Studium

2001- 2008 Studium der Humanmedizin an der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main
2007- 2008 Praktisches Jahr im St.Marien-Krankenhaus
in Frankfurt am Main
2008 Approbation: November 2008
seit 2008 Assistenzärztin in der Augenklinik Herzog Carl Theodor
in München

Frankfurt am Main, den 29.05.2009

10 Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin zur Promotion eingereichte Arbeit mit dem Titel:

**Einfluß von Apolipoprotein H auf die Endothelmodifikation und
die Endothelaktivität**

in der Klinik für Urologie und Kinderurologie im Zentrum der Chirurgie des Klinikums der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main unter der Leitung von Professor Dr. Roman A. Blaheta ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keiner in- und ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt am Main, den 29.05.2009