

**Einfluss von Vitamin E
auf Genexpression und Signaltransduktion bei
entzündlichen Prozessen**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Stefanie Spitzmann
(Diplom-Biologin)

Kiel 2006

Referentin: Prof. Dr. Karin Krupinska
Korreferent/in: Prof. Dr. Stefan Schreiber

Tag der mündlichen Prüfung: 3. Mai 2006
Zum Druck genehmigt: 10. Mai 2006

gez. Prof. J. Grotemeyer (Dekan)

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Die Biologie der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)	1
1.2	ROS und zelluläre Prozesse	1
1.3	Vitamin E	4
1.3.1	Aufnahme, Transport und Verteilung von Vitamin E	6
1.3.2	Vitamin E als Antioxidans	6
1.3.3	Weitere Eigenschaften des Vitamin E	8
1.3.4	Genregulation durch Vitamin E	9
1.4	α -Tocopherol-assoziiertes Protein (TAP)	11
1.5	Zelluläre Entzündungsmechanismen	13
1.6	Interleukin-1	14
1.7	Der NF κ B-Signalweg	18
1.8	Einfluss von ROS auf den IL-1-Signalweg	19
1.9	Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	22
2	METHODEN	23
2.1	Zellkultur	23
2.1.1	Standardzellkultur	23
2.1.2	Anlegen und Auftauen von Zellstocks	23
2.1.3	Bestimmung der Zellkonzentration und Aussaat	24
2.1.4	Inkubation mit Vitamin E	24
2.1.5	Transfektion humaner Zelllinien	25
2.1.6	Ernte	25

2.2	Molekularbiologische Arbeitsmethoden	26
2.2.1	Isolierung von genomischer DNA	26
2.2.2	Isolierung von Gesamt-RNA	26
2.2.3	RNA-Fällung	27
2.2.4	Überprüfung der Konzentration und Qualität von RNA	27
2.2.5	Reverse Transkription	27
2.2.6	RT-PCR	28
2.2.7	Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	29
2.2.8	Konstruktion von Expressionsvektoren	29
2.2.9	Ortsgerichtete Mutagenese	36
2.3	Biochemische Arbeitsmethoden	37
2.3.1	Herstellung denaturierter Proteinlysate	37
2.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	38
2.3.3	Elektrotransfer von Proteinen (Westernblot)	39
2.3.4	Immundetektion von Proteinen	39
2.3.5	Herstellung von Lysaten für HPLC-Analyse	40
2.4	FACS	40
2.5	ELISA	40
2.6	Reportergeren-Assays	41
2.7	Detektion von Zelltod	43
2.7.1	Quantitative Messung der Zellviabilität	43
2.7.2	Detektion von Apoptose	43
2.8	Detektion von reaktiven Sauerstoffspezies	44
2.8.1	Quantifizierung von Lipidperoxidation	44
2.8.2	Nachweis von intrazellulären ROS	45
2.9	Statistische Auswertung	45

3	ERGEBNISSE	46
3.1	Herstellung und Charakterisierung des TAP-Expressionsvektors	46
3.1.1	Klonierung des TAP-Expressionsplasmids	46
3.1.2	Funktionelle Charakterisierung des TAP-Expressionsvektors	48
3.2	Reaktive Sauerstoffspezies und zelluläre Signalprozesse	48
3.2.1	Aktivierung von Signaltransduktion durch oxidativen Stress	48
3.2.2	Quantifizierung der NFκB-Aktivität	49
3.2.3	Produktion von ROS nach Zytokinstimulation	50
3.3	Vitamin E in der Zellkultur	51
3.3.1	α-Tocopherolaufnahme	51
3.3.2	Analyse der antioxidativen Funktion von α-Tocopherol	52
3.4	Systematische Untersuchung der Vitamin E-modulierten Genexpression	57
3.3.1	Microarray	57
3.3.2	Validierung der Array-Ergebnisse mittels RT- und <i>Real-time</i> -PCR	59
3.3.3	Analyse der Proteinexpression von TGF-β1, MCP-1 und ITGB1	59
3.4	Funktionelle Untersuchung von TAP	62
3.4.1	Nachweis der mRNA-Expression von TAP	62
3.4.2	Einfluss von Vitamin E und TAP auf zelluläre Mechanismen entzündlicher Prozesse	65
3.4.3	Charakterisierung des Einflusses von TAP auf die ITGB2-Expression	69
3.4.4	Identifizierung der von TAP und α-Tocopherol beeinflussten Transkriptionsfaktoren in unstimulierten Zellen.	71
3.4.5	Einfluss der GTPase-Domänen von TAP auf Vitamin E-vermittelte Effekte	75
4	DISKUSSION	78
4.1	Zur Fragestellung	78
4.2	Der Einsatz von Vitamin E im Zellkulturmodell	79
4.3	Die Bedeutung von ROS im Entzündungsgeschehen	79

4.4	Genregulation durch Vitamin E	80
4.5	Funktionelle Analyse des α-Tocopherol-assoziierten Proteins	82
4.5.1	Analyse des Expressionsprofils von TAP	82
4.5.2	TAP vermittelt den inhibitorischen Einfluss von Vitamin E auf Signaltransduktionsprozesse	83
4.5.3	TAP verändert die Genexpression unabhängig von α -Tocopherol	85
4.5.4	Die GTPase-Domänen sind essentiell für die Funktionalität von TAP	85
4.6	Die Vitamin E-vermittelte Regulation entzündlicher Prozesse	86
4.7	Ausblick	88
5	ZUSAMMENFASSUNG	89
6	SUMMARY (engl.)	91
7	LITERATUR	93
8	ANHANG	102
8.1	Abkürzungsverzeichnis	102
8.2	Englische Fachtermini	105
8.3	Abbildungsverzeichnis	106
8.4	Tabellenverzeichniss	108
8.5	Verwendete Materialien	109
9	Lebenslauf	116
10	Erklärung	117
11	Danksagung	118

1 EINLEITUNG

1.1 Die Biologie der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

Reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygen species*, ROS) werden unter normalen physiologischen Bedingungen laufend im tierischen Organismus gebildet. Unter dem Terminus ROS werden sowohl freie Radikale wie Superoxidradikal ($O_2^{\cdot-}$), Hydroxylradikal (OH^{\cdot}) und Hydroperoxidradikal (OOH^{\cdot}), als auch nicht-radikalische Moleküle wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zusammengefasst. Eine der wichtigsten Quellen für ROS ist die Atmungskette in den Mitochondrien, wobei die NADPH-Ubiquinon-Reduktase des Komplex I und die Ubiquinol-Cytochrom-C-Reduktase des Komplex III einen Großteil der ROS produzieren (Canedas, 1977; Halliwell & Gutteridge, 1986). Viele Enzyme wie Oxidasen, Oxygenasen, Peroxidasen und Cytochrom P450 erzeugen ebenfalls ROS (Halliwell & Cross, 1994). Die Produktion von ROS unterliegt einer strengen Kontrolle. Zellen schützen sich vor einer Überproduktion, die als oxidativer Stress bezeichnet wird, mit einem Netzwerk verschiedener Antioxidantien. Einerseits werden permanent vorhandene antioxidative Schutzmechanismen für die Produktion von ROS im *steady-state* des normalen Zellstoffwechsels benötigt, andererseits braucht die Zelle auch induzierbare Schutzmechanismen für akute oxidative Veränderungen.

Die im Cytosol vorherrschenden reduzierenden Bedingungen werden durch Redoxsysteme aufrechterhalten. Wichtige Redoxpuffer sind Thioredoxin (TRX) und das Tripeptid Glutathion (GSH). Sie werden durch die TRX-Reduktase und GSH-Reduktase reduziert. Weitere Bestandteile des antioxidativen Netzwerkes sind Vitamine (C und E) sowie β -Carotinoide und verschiedene antioxidative Enzyme wie Superoxiddismutase, Glutathionperoxidase und Katalase.

Eine Dysregulation dieses physiologischen Systems kann zu einer Überproduktion von ROS führen und den Redoxzustand der Zelle verändern. Dieser oxidative Stress verursacht eine Vielzahl zellulärer Schäden wie z.B. Proteinoxidation, DNA-Strangbrüche (Ames, 1989) oder Lipidperoxidation (Rice-Evans & Burdon, 1993). ROS und oxidativer Stress werden mit der Entstehung und Progression verschiedener degenerativer und chronischer Erkrankungen im menschlichen Organismus in Verbindung gebracht z.B. Arteriosklerose, Asthma, rheumatoide Arthritis oder Morbus Alzheimer (Mates *et al.*, 1999).

1.2 ROS und zelluläre Prozesse

Während hohe Konzentrationen von ROS toxisch wirken, haben geringe Mengen eine physiologische Bedeutung. In Abhängigkeit von Signaldauer und -intensität steuern ROS Adaptations- und Überlebensprozesse oder sie initiieren Abläufe, die zu Zellschäden oder zum Zelltod führen.

ROS spielen auch eine wichtige Rolle bei Zellproliferation und Differenzierung sowie bei der Induktion von Nekrose und Apoptose. Die Hauptaufgabe von ROS unter physiologischen Bedingungen ist die Beteiligung an Signaltransduktionsprozessen (Finkel, 1998; Rhee, 1999).

ROS können auf verschiedenen Ebenen in die Signalkaskaden eingreifen. Sie können Signalketten anschalten oder als *second messenger* Signalprozesse modifizieren und verändern dadurch die

Aktivität von Transkriptionsfaktoren bzw. die Genexpression. Es gibt eine Vielfalt von redox-sensitiven Signalwegen. Neben dem NFκB-(*nuclear factor κB*)-Signalweg und den MAP-Kinasen (*mitogen activated protein kinases*) ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinases*), JNK (*c-Jun N-terminal kinases*) und p38 zählen hierzu auch PLC-γ1 (*phospholipase C-γ1*) und PKC (*protein kinase C*) sowie p53, JAK (*Janus kinases*)/STAT (*signal transducers and activators of transcription*) und PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*)/AKT (Abbildung 1.1).

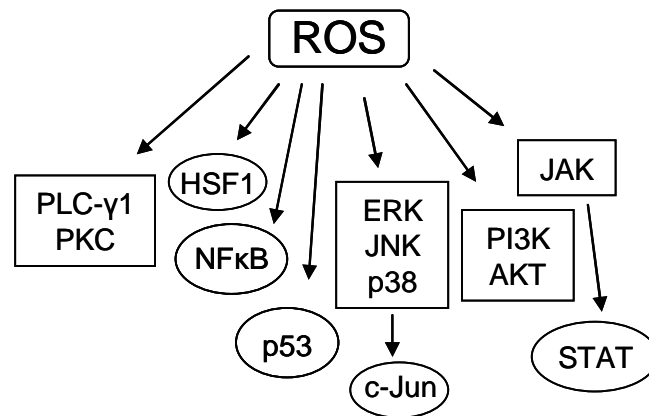


Abbildung 1.1: Überblick über ROS-sensitive Signalwege.

ROS aktivieren eine Vielzahl von Signalkaskaden und verändern die Genexpression. Durch ihre hohe Reaktivität modifizieren ROS direkt oder indirekt die Funktion von Enzymen (Rechtecke) oder Transkriptionsfaktoren (Ovale), wobei die Dauer und die Intensität für die Wirkung entscheidend sind. Moderate Signale steuern Adaptions- und Überlebensprozesse, sowie Zellproliferation und Differenzierung. Hohe ROS-Konzentrationen führen zu Zellschädigungen und Zelltod. ERK, *extracellular signal-regulated kinases*; HSF-1, *heat shock factor-1*; JAK, *Janus protein kinase*; JNK, *c-Jun N-terminal kinases*; NFκB, *nuclear factor κB*; PI3K, *phosphoinositide 3-kinase*; PKC, *protein kinase C*; PLC-γ1, *phospholipase C- γ1*; STAT, *signal transducers and activators of transcription*. (Bild verändert nach Martindale & Holbrook, 2002)

Bei den Signalwegen der Wachstumsfaktoren und Zytokine spielen ROS eine wichtige Rolle. Diese Aussage stützt sich auf folgende Beobachtungen:

- Die Bindung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen an ihre Rezeptoren führt zur Bildung von ROS in der Zelle.
- Zugabe von Antioxidantien und Inhibition von Enzymen, die ROS produzieren, blockieren spezifische Signalwege bzw. physiologische Effekte von Wachstumsfaktoren und Zytokinen.
- Zugabe von Oxidantien im Zellkulturmodell kann z.T. die gleichen Signalwege wie die Zytokine und Wachstumsfaktoren aktivieren und die gleichen physiologischen Effekte hervorrufen.

Zu den Wachstumsfaktoren, die eine Produktion von ROS stimulieren, gehören z.B. PDGF (*platelet-derived growth factor*) und EGF (*epidermal growth factor*), zu den Zytokinen u.a. Interleukin (IL)-1β, *tumor necrosis factor* (TNF)-α und *transforming growth factor* (TGF)-β1 (Finkel, 1999).

Welcher Typ von ROS in die regulatorischen Prozesse involviert ist, ist nicht immer bekannt. Es ist zu erwarten, dass OH[•] und andere Sauerstoffradikale nicht als Mediatoren dienen, da diese Moleküle

nicht die erforderliche Spezifität besitzen. Sie sind sehr kurzlebig und hoch reaktiv, und sie neigen dazu, irreversible Modifikationen zu erzeugen. Reversible Modifikationen, wie sie für Signaltransduktionsprozesse nötig sind (z.B. Phosphorylierung), können durch die Reaktion mit H_2O_2 und anderen Hydroperoxiden (ROOH) entstehen.

Die Quellen für die Liganden-stimulierte Produktion von ROS sind unter anderem NAD(P)H-Oxidasen (H_2O_2 -Produktion via O_2^\bullet), Lipoxygenasen und Cyclooxygenasen. NAD(P)H-Oxidasen sind im Zusammenhang des *oxidative burst* bei der Pathogenabwehr von phagozytierenden Zellen wie Neutrophilen und Makrophagen ausführlich beschrieben worden. Der Nachweis von NAD(P)H-Oxidasen in nicht-phagozytierenden Zellen steht noch aus. Verschiedene Arbeitsgruppen haben die Expression unterschiedlicher Untereinheiten einer NAD(P)H-Oxidase in nicht-phagozytierenden Zellen beschrieben; die Quartärstruktur des Multiproteinkomplexes und dessen Aktivitätsmuster sind aber unbekannt. Ein erheblicher Unterschied zwischen den beiden NAD(P)H-Oxidasen ist auf jeden Fall heute schon ersichtlich: Die ROS-Produktion der NAD(P)H-Oxidase phagozytierender Zellen erfolgt extrazellulär, die der nicht-phagozytierenden Zellen intrazellulär.

Für Signalwege von ROS werden zwei generelle Mechanismen angenommen: Zum einen spielen Veränderungen des intrazellulären Redox-Status eine Rolle, zum anderen werden Zielproteine direkt oxidativ modifiziert. Als Sensoren des Redox-Status dienen TRX und GSH. Bei den redox-sensitiven Signaltransduktionsereignissen der Proliferation von Endothelzellen und Fibroblasten wurde der Gehalt von GSH, aber auch das Verhältnis von GSH(reduziert):GSSG(oxidiert) als Redoxsensor beschrieben. Des Weiteren sind die Autophosphorylierung des PDGF-Rezeptors und die DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors SP-1 GSH-sensitiv (Knoepfel *et al.*, 1994).

Für TRX ist eine Bindung an Zielproteine und damit verbundene Modifikationen der Proteinfunktion beschrieben. Ein Beispiel ist die *apoptosis signal-regulated kinase 1* (ASK-1). ASK-1 ist in die Aktivierung von p38 und JNK involviert und liegt gebunden an TRX vor. Diese Komplexbildung mit TRX hemmt die ASK-1-Aktivität. Veränderungen im Redox-Status wie eine erhöhte ROS-Produktion nach TNF- α -Stimulation führen zur Ablösung von TRX und zur Aktivierung von ASK-1 (Saitoh *et al.*, 1998). Weitere Bindungspartner für TRX sind der Glucocorticoidrezeptor, der Östrogenrezeptor und der *redox factor-1* (Ref-1) (Makino *et al.*, 1996; Hayashi *et al.*, 1997; Hirota *et al.*, 1997; Makino *et al.*, 1999). TRX kann unter oxidativen Stressbedingungen in den Zellkern wandern, dort an Ref-1 binden und dadurch die Expression bestimmter Gene regulieren. Diese Bindung führt zu einer Aktivierung von Ref-1 und vereinfacht die DNA-Bindung des Jun-Fos-Komplexes an den AP-1-response-Elementen (Hirota *et al.*, 1997). Ein ähnlicher Effekt wurde für NF κ B beschrieben (Hirota *et al.*, 1999). Weitere durch TRX beeinflusste Transkriptionsfaktoren sind p53 und *polyomavirus enhancer binding protein-2/core binding factor* (PEBP2/CBF) (Akamatsu *et al.*, 1997; Pearson & Merrill, 1998).

Ein anderer Mechanismus, über den ROS die Signaltransduktion beeinflussen, ist die direkte oxidative Modifikation von Zielproteinen, die zu einer veränderten Struktur und damit veränderter Funktion führen kann. Besonders geeignet für die oxidative Modifikation sind reaktive Schwefelgruppen (SH) der Aminosäure Cystein. Die SH-Gruppe des Cysteins kann zu -SOH, -SO₂H, -SO₃H oder mit

Glutathion bzw. Glutathiondisulfid zu -SSG oxidieren. Die Oxidationen der Schwefelgruppe des Cysteins zu -SOH und -SSG sind reversibel und können mittels GSH über ein Protein-Disulfid reduziert werden. Die Oxidation einer SH-Gruppe kann die Enzymaktivität oder die DNA-Bindungsaktivität verändern, wenn der Cysteinrest in der katalytischen Domäne eines Enzyms bzw. im DNA-Bindemotiv eines Transkriptionsfaktors liegt. Für die Familie der Tyrosinphosphatasen sind reaktive Cysteinreste in ihren aktiven Zentren beschrieben worden, und oxidativer Stress kann Tyrosinphosphatasen reversibel inaktivieren. Reaktive Cysteine sind für den Transkriptionsfaktor p53 (Rainwater *et al.*, 1995), für PKC (Gopalakrishna *et al.*, 1997) und für die Redoxregulation von c-Jun (Klatt *et al.*, 1999) beschrieben worden.

1.3 Vitamin E

Vitamin E wurde 1922 von Evans und Bishop als ein essentieller Mikronährstoff beschrieben, dessen Mangel im Tierversuch zur Unfruchtbarkeit führt (Evans & Bishop, 1922). Der Ausdruck „Tocopherol“ leitet sich aus diesem Zusammenhang ab („τόκος/tókos“, Entbindung/Geburt und „φέρειν/phérein“, tragen/hervorbringen). Erst später wurde Vitamin E mit dem antioxidativen System der Zelle in Zusammenhang gebracht (Tappel, 1962). Heute gilt es als die Hauptkomponente der lipophilen Antioxidantien im Organismus.

Der Begriff Vitamin E steht für eine Gruppe von acht verschiedenen Molekülen, die sich strukturell stark ähneln. Das Grundgerüst besteht aus einem aromatischen Ringsystem (Chromanolring) und einer aliphatischen Seitenkette aus 16 Kohlenstoffatomen (Phytolkette). Die Unterteilung in Tocopherol und Tocotrienol erfolgt durch die Seitenkette, die bei den Tocopherolen gesättigt und bei den Tocotrienolen dreifach ungesättigt vorliegt. Die Einteilung in α -, β -, γ - und δ -Tocopherol bzw. Tocotrienol hängt von der Position und Anzahl der Methylgruppen am Chromanolringsystem ab (Abbildung 1.2). Tocopherole haben drei Isomeriezentren, die bei den in der Natur vorkommenden Formen alle in der R-Konfiguration vorliegen. Alle Vitamin E-Formen besitzen ein antioxidatives Potential. Entscheidend für die antioxidative Aktivität ist die Hydroxylgruppe am C-6 des Chromanolringes, die im Zuge einer radikalischen Reaktion ein Wasserstoffatom abgibt. Das antioxidative Potential wird durch die Anzahl und Position der Methylgruppen beeinflusst. Vergleicht man *in vitro* die antioxidativen Aktivitäten verschiedener Vitamin E-Formen mit der von α -Tocopherol (100%), so besitzt β -Tocopherol ein relatives antioxidatives Potential von 71%, γ -Tocopherol eines von 68% und δ -Tocopherol 28%.

Von den verschiedenen Vitamin E-Formen weist das R,R,R- α -Tocopherol die größte biologische Aktivität auf. Dies liegt nicht nur an seiner großen antioxidativen Aktivität, sondern auch an seiner biologischen Verfügbarkeit, da es als einzige Form im Körper zurückgehalten wird. Ein Vergleich von α - und γ -Tocopherol verdeutlicht dies: Nicht nur die Serumkonzentrationen mit 25 μ M für α -Tocopherol und 1,5-3 μ M für γ -Tocopherol sind sehr unterschiedlich, sondern auch die Plasmahalbwertszeiten, die für α -Tocopherol bei 48 h liegt, während es für γ -Tocopherol lediglich 4 h sind (Schneider, 2005). Ein weiterer wichtiger Aspekt für die biologische Bedeutung ist die Stereoisomerie, denn auch die

synthetischen Formen von α -Tocopherol, die nicht in der R,R,R-Konfiguration vorliegen, werden nicht im Körper zurückgehalten.

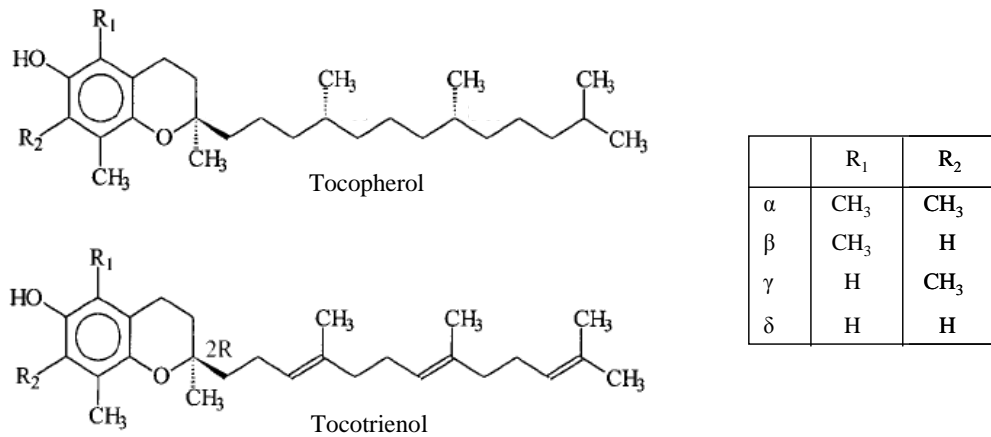


Abbildung 1.2: Struktur von Tocopherolen und Tocotrienolen.

Vitamin E ist der Überbegriff für acht verwandte Moleküle. Sie bestehen aus einem aromatischen Ringsystem (Chromanolring) und einer aliphatischen Seitenkette (Phytolkette). Die Unterteilung in Tocopherol und Tocotrienol erfolgt durch die Seitenkette, die bei den Tocopherolen gesättigt und bei den Tocotrienolen dreifach ungesättigt vorliegt. Die Einteilung in α -, β -, γ - und δ -Tocopherol bzw. Tocotrienol wird nach der Position und Anzahl der Methylgruppen am Chromanolringsystem vorgenommen. Entscheidend für die antioxidative Aktivität der Vitamin E-Formen ist die Hydroxylgruppe (OH) an der Position C-6 des Chromanolringes. (Bild verändert nach Ricciarelli *et al.*, 2001)

Hauptquelle des natürlichen Vitamin E sind verschiedene Pflanzenöle. Die Vitamin E-Zusammensetzung variiert je nach Ölsorte. In Weizenkeim-, Sonnenblumen-, und Olivenöl stellt das R,R,R- α -Tocopherol mit 50-100% den Hauptanteil, während in Soja-, Maiskeim-, und Palmöl das γ -Tocopherol die vorherrschende Komponente ist. Andere Nahrungsmittel wie Gemüse, Obst und Getreide sind relativ arm an Vitamin E.

1.3.1 Aufnahme, Transport und Verteilung von Vitamin E

Das Vitamin E wird ohne Unterscheidung der verschiedenen Formen aus der Nahrung zusammen mit anderen Fetten aufgenommen. Der größte Teil wird in Chylomikronen inkorporiert und zur Leber transportiert. Dort kommt es zur Diskriminierung, und nur das R,R,R- α -Tocopherol wird im Körper zurückgehalten. Bei diesem Prozess spielt das in der Leber exprimierte 31 kDa große α -Tocopheroltransferprotein (α -TTP) eine entscheidende Rolle. Es bindet α -Tocopherol sehr selektiv (Hosomi *et al.*, 1997) und katalysiert den Einbau des α -Tocopherols in VLDL (Herrera & Barbas, 2001). Die Inkorporation erfolgt über einen vom Golgi-Apparat unabhängigen Transport, an dem der *ATP-binding cassette transporter* (ABCA1) beteiligt ist (Arita *et al.*, 1997; Oram *et al.*, 2001). Es wird angenommen, dass α -TTP das α -Tocopherol aus den späten Endosomen zur Plasmamembran transportiert. Dort wird α -Tocopherol über den ABCA1-Transporter exocytiert (Horiguchi *et al.*, 2003). In den VLDL verpackt wird das α -Tocopherol in die peripheren Gewebe transportiert. Durch den Metabolismus von VLDL wird das α -Tocopherol weiter an LDL und an HDL gegeben. Das *plasma phospholipid transfer protein* bindet ebenfalls an α -Tocopherol und erleichtert den Austausch von α -Tocopherol zwischen LDL und HDL (Kostner *et al.*, 1995). Die HDL-assoziierte Aufnahme von α -Tocopherol in die Zellen wird über den *scavenger receptor* SR-B1 kontrolliert (Goti *et al.*, 1998; Kollack *et al.*, 1999; Goti *et al.*, 2001).

Eine Vitamin E-Mangelernährung kommt beim Menschen nur extrem selten vor. Durch verschiedene Erkrankungen kann es jedoch zu einem Vitamin E-Mangel kommen. So sind Fettresorptionsstörungen (Sokol *et al.*, 1988) und *Ataxia with isolated Vitamin E deficiency* (AVED) mit einem Vitamin E-Mangel verbunden. AVED ist eine autosomal, rezessive Erkrankung, die durch Mutationen im α -TTP-Gen ausgelöst wird. Vitamin E-Mangel führt zu schweren neuromuskulären Störungen (Ben Hamida *et al.*, 1993). Massive Ansammlungen von Lipofusin führen zum Absterben von Neuronen. Die AVED-Patienten leiden an Retinitis pigmentosa und Symptomen von retinaler Atrophie (Yokota *et al.*, 2000). Die bei diesen Patienten extrem niedrigen Vitamin E-Plasmaspiegel können durch hohe Vitamin E-Gaben erhöht werden, was die neurologischen Funktionen stabilisiert (Sokol *et al.*, 1988; Labauge *et al.*, 1998; Benomar *et al.*, 1999; Schuelke *et al.*, 1999).

1.3.2 Vitamin E als Antioxidans

Vitamin E ist Bestandteil aller biologischer Membranen im tierischen Organismus. Eine seiner biologischen Funktionen als Antioxidans besteht darin, Membranlipide, Lipoproteine und Depotfette vor Lipidperoxidation zu schützen und dadurch deren Abbau zu verhindern (Ingold *et al.*, 1987; Kaiser *et al.*, 1990; Kagan *et al.*, 1992; Packer *et al.*, 2001).

Der generelle Reaktionsmechanismus der Lipidperoxidation ist in Abbildung 1.3 dargestellt. Die Lipidperoxidation kann durch verschiedene Substanzen wie Metallionen (Cu^{2+} , Fe^{2+}), UV- und γ -Strahlung sowie Superoxid und andere ROS oder synthetische Radikalstarter ausgelöst werden. Dabei entsteht ein Fettsäureradikal, das mit dem molekularen Sauerstoff der Umgebung reagiert. Das entstehende Peroxylradikal zieht ein Wasserstoffatom einer anderen Fettsäure ab und vermittelt so

das Fortschreiten der radikalischen Kettenreaktion (Propagation). Das Peroxylradikal ist relativ langlebig und daher das primäre Ziel der antioxidativen Reaktion. α -Tocopherol gibt im Zuge der radikalischen Kettenreaktionabbruchsreaktion ein Wasserstoffatom der OH-Gruppe am C-6 des Chromanolringes ab. Dadurch entsteht ein stabiles Hydroperoxid und ein α -Tocopheryloxyradikal. Das α -Tocopheryloxyradikal ist reaktionsträger und kann durch seine Lage in der Membran keine weitere Lipidperoxidation verursachen.

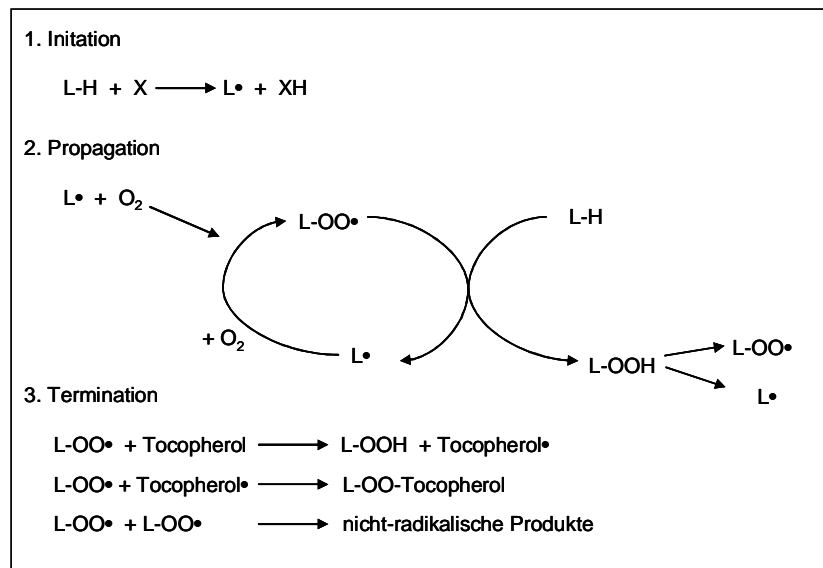


Abbildung 1.3: Reaktionsmechanismus der Lipidperoxidation.

Aus einer Fettsäure (L-H) kann durch verschiedene Substanzen (X) wie Metallionen (Cu^{2+} , Fe^{2+}), UV- und γ -Strahlung, ROS oder synthetische Radikalstarter ein Fettsäureradikal ($\text{L}\cdot$) entstehen (Initiation). Das Fettsäureradikal reagiert mit dem molekularen Sauerstoff der Umgebung zum Peroxylradikal ($\text{L-OO}\cdot$). Dieses zieht ein Wasserstoffatom einer anderen Fettsäure ab und vermittelt so das Fortschreiten der radikalischen Kettenreaktion (Propagation). Das Peroxylradikal ist relativ langlebig und daher das primäre Ziel der antioxidativen Reaktion. α -Tocopherol gibt im Zuge der radikalischen Kettenreaktionabbruchsreaktion ein Wasserstoffatom der OH-Gruppe an der Position C-6 des Chromanolringes ab. Es entsteht ein stabiles Hydroperoxid (L-OOH) und ein α -Tocopheryloxyradikal ($\text{Tocopherol}\cdot$) (Termination). (Bild verändert nach Schneider, 2005)

Das Vitamin E ist in ein antioxidatives Netzwerk eingebunden und wird über einen *redox-antioxidant cycle* regeneriert (Constantinescu *et al.*, 1993). Die Regeneration erfolgt direkt über Vitamin C oder indirekt über SH-Gruppen enthaltende Antioxidantien wie Glutathion unter Vermittlung von Vitamin C. Dadurch wird die Konzentration von Vitamin E-Radikalen gering gehalten und ein Verbrauch oder Verlust verhindert (Packer *et al.*, 2001). Dieser Regenerationsmechanismus ist auch für α -Tocopherol in humanen LDL beschrieben (Kagan *et al.*, 1992).

1.3.3 Weitere Eigenschaften des Vitamin E

Neben seiner Funktion als Terminator von Lipidperoxidation wurden für das Vitamin E weitere wichtige Eigenschaften beschrieben. Vitamin E wirkt antiinflammatorisch; es hemmt die Monozyten-Endotheladhäsion, die Blutplättchenadhäsion und -aggregation (Freedman *et al.*, 1996; Williams *et al.*, 1997; Mabile *et al.*, 1999; Saldeen *et al.*, 1999). Vitamin E verhindert die Bildung von entzündungsfördernden Botenstoffen wie Prostaglandin E₂ oder Leukotrien B₄ durch Hemmung der Cyclooxygenase-2 (COX-2) (Jiang *et al.*, 2000) bzw. 5-Lipoxygenase (5-LOX) (Devaraj & Jialal, 1999) sowie die ROS-Produktion beim *oxidative burst* (Cachia *et al.*, 1998). Außerdem inhibiert Vitamin E das Wachstum verschiedener Tumorzellen (Prasad & Edwards-Prasad, 1982; Kline *et al.*, 2001), und zwar entweder durch Induktion von Apoptose über PKC-Inhibition (Neuzil *et al.*, 2001) oder durch Hemmung der Zellproliferation über Herunterregulierung der Expression von Cyclin D1 und Cyclin E (Gysin *et al.*, 2002). Vitamin E beeinflusst zahlreiche Enzyme der Signaltransduktion z.B. Protein-Kinase C (PKC), Protein-Kinase B (PKB) (Kempna *et al.*, 2004), verschiedene Tyrosinkinase (Sen *et al.*, 2000; Maziere *et al.*, 2001; Venugopal *et al.*, 2004), Phospholipase A₂ (Douglas *et al.*, 1986; Pentland *et al.*, 1992), NAD(P)H-Oxidase, (Cachia *et al.*, 1998) Cyclooxygenase-2 (Jiang *et al.*, 2000) und 5-Lipoxygenase (Devaraj & Jialal, 1999).

Trotz ähnlicher antioxidativer Kapazitäten haben die eng verwandten Formen des Vitamin E nicht die gleichen modulatorischen Fähigkeiten. Im Jahr 1991 beschrieben Azzi *et al.*, dass α -Tocopherol die PKC inhibiert und damit das Wachstum glatter Muskelzellen stoppt (Boscoboinik *et al.*, 1991). Die für diese Inhibierung nötige Konzentration liegt in physiologischen Bereichen von 25 μ M (Tasinato *et al.*, 1995). Diese Eigenschaft lässt sich nicht auf ein antioxidatives Potential zurückführen, da die anderen Formen des Vitamin E, wie z.B. β -Tocopherol, PKC nicht oder nur in einem erheblich geringeren Maß inhibieren. Ein Einfluss von α -Tocopherol auf die PKC konnte in weiteren Zelltypen wie Monozyten, Makrophagen, Neutrophilen, Fibroblasten und mesangialen Zellen bestätigt werden (Devaraj *et al.*, 1996; Freedman *et al.*, 1996; Devaraj *et al.*, 1997; Tada *et al.*, 1997). Das α -Tocopherol interagiert nicht direkt mit der PKC, sondern aktiviert die Protein-Phosphatase 2A (PP2A), die eine Dephosphorylierung der PKC katalysiert und diese dadurch inaktiviert (Ricciarelli *et al.*, 1998). Durch den inhibitorischen Einfluss von α -Tocopherol auf die PKC lassen sich viele seiner Effekte auf die Signaltransduktion und die Genexpression erklären, z.B. die Hemmung der NAD(P)H-Oxidase (Cachia *et al.*, 1998) und die Modulation der AP-1-vermittelten Genexpression nach 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat-(TPA)-Stimulation (Stauble *et al.*, 1994).

Die Hemmung der 5-Lipoxygenase durch α -Tocopherol verhindert die Freisetzung von IL-1 β in aktivierten Monozyten, während β -Tocopherol keine inhibitorischen Effekte zeigt. Ein posttranskriptioneller Mechanismus für die Wirkung von α -Tocopherol wird angenommen, da weder die mRNA-Level noch mRNA-Stabilität von IL-1 β beeinflusst werden (Devaraj & Jialal, 1999).

Im Gegensatz zur PKC wird die Aktivität der COX-2 durch γ -Tocopherol und sein Oxidationsprodukt 2,7,8-trimethyl-2(β -carboxyethyl)-6-hydroxylchroman (γ -CEHC) inhibiert, während α -Tocopherol hier keinen Effekt zeigt. COX-2 katalysiert die Synthese von Prostaglandinen, die eine wichtige Rolle in

entzündlichen Prozessen spielen. Die COX-2-Hemmung erfolgt direkt ohne Änderungen der Proteinexpression oder Substratverfügbarkeit (Jiang *et al.*, 2000; Jiang & Ames, 2003).

1.3.4 Genregulation durch Vitamin E

Vitamin E beeinflusst verschiedene Transkriptionsfaktoren. Eine Inkubation humaner T-Zellen mit α -Tocopherol-Succinat und α -Tocopherol-Acetat führt zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung von NF κ B (Suzuki & Packer, 1993). Der Mechanismus der NF κ B-Inhibition ist noch nicht identifiziert. α -Tocopherol kann durch Beeinflussung des Redox-Status oder durch direkte Interaktion mit Komponenten des Signalweges Einfluss ausüben. Andere Transkriptionsfaktoren, die durch Vitamin E moduliert werden, sind AP-1 (Stauble *et al.*, 1994) und PPAR γ (Poynter & Daynes, 1998). Die Genexpression wird auch durch den Einfluss auf den nukleären Rezeptor *pregnane X receptor* (PXR) verändert (Landes *et al.*, 2003). Zu den beeinflussten *response elements* (RE) zählen das *antioxidant response element* (ARE) sowie das TGF- β -RE (Villacorta *et al.*, 2003).

Gene, deren Expression durch Vitamin E moduliert wird, können in fünf Gruppen eingeteilt werden (Azzi *et al.*, 2004). Zur Gruppe 1 gehören Gene, die Aufnahme und Degradation von Vitamin E kontrollieren, zur Gruppe 2 Gene, die mit Lipidaufnahme und Arteriosklerose assoziiert sind. Die Gruppe 3 umfasst Gene, welche die Expression von extrazellulären Proteinen modulieren, und Gruppe 4 enthält Gene, die in entzündlichen Prozessen, Zelladhäsion und Thrombozytenaggregation involviert sind. In der Gruppe 5 werden schließlich Gene zusammengefasst, die in der Signaltransduktion und Zellzyklusregulation eine Rolle spielen.

Zur Gruppe 4, die in der vorliegenden Arbeit näher untersucht wird, zählen extrazelluläre Proteine ebenso wie Chemo- und Zytokine. Die Adhäsion von Monozyten und Leukozyten an das Endothel ist ein Schlüsselereignis bei der Entstehung von Entzündungen und ist auch bei der Pathogenese von chronisch-entzündlichen Krankheiten wichtig. Zu den in die Zelladhäsion involvierten Matrixproteinen, die durch Vitamin E beeinflusst werden, gehören E-Selektin, L-Selektin, ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*), VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule- 1*) und verschiedene Integrine (Breyer & Azzi, 2001). Zytokine, die in ihrer Expression durch Vitamin E moduliert werden, sind unter anderem TGF- β , IL-1 β , IL-8, MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*), IL-4 und IL-2 (Akeson *et al.*, 1991; Wu *et al.*, 1999). Eine Übersicht der durch Vitamin E regulierten Gene ist in Tabelle 1.1 zusammengestellt.

Gen		Referenzen
Gruppe 1: α-Tocopherol Aufnahme und Degradation		
CYP3A	Cytochrome P450 3A	(Traber <i>et al.</i> , 2005)
CYP3A4	Cytochrome P450 3A4	(Landes <i>et al.</i> , 2003)
CYP3A5	Cytochrome P450 3A5	(Landes <i>et al.</i> , 2003)
α -TTP	<i>α-Tocopherol transfer protein</i>	(Fechner <i>et al.</i> , 1998)
Gruppe 2: Lipidaufnahme und Arteriosklerose		
CD36	<i>CD 36 antigen; Glycoprotein IIIb</i>	(Ricciarelli <i>et al.</i> , 2000; Barella <i>et al.</i> , 2004)
DHCR7	<i>7-dehydrocholesterol reductase</i>	(Barella <i>et al.</i> , 2004; Rota <i>et al.</i> , 2004)
LDLR	<i>Low density lipoprotein receptor</i>	(Pal <i>et al.</i> , 2003; Barella <i>et al.</i> , 2004)
SR-AI/II	<i>Scavenger receptor AI/II</i>	(Teupser <i>et al.</i> , 1999)
SR-BI	<i>Scavenger receptor BI</i>	(Kolleck <i>et al.</i> , 1999)
Gruppe 3: extrazellulärer Proteine		
COL 1A1	Collagen 1A1	(Chojkier <i>et al.</i> , 1998; Ricciarelli <i>et al.</i> , 1999)
CTGF	<i>Connective tissue growth factor</i>	(Villacorta <i>et al.</i> , 2003)
MMP-1	Matrix metalloproteinase-1	(Ricciarelli <i>et al.</i> , 1999)
MMP-19	Matrix metalloproteinase-19	(Mauch <i>et al.</i> , 2002)
TPM3	Tropomyosin	(Azzi <i>et al.</i> , 1998; Aratri <i>et al.</i> , 1999)
Gruppe 4: inflammatorischer Prozesse, Zelladhäsion und Blutplättchenaggregation		
HEMB	<i>Hemophila B, coagulation factor IX</i>	(Barella <i>et al.</i> , 2004; Rimbach <i>et al.</i> , 2004)
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule-1</i>	(Yoshikawa <i>et al.</i> , 1998; Wu <i>et al.</i> , 1999; Yoshida <i>et al.</i> , 2000)
IL-1 β	Interleukin 1 beta	(Akeson <i>et al.</i> , 1991)
IL-2	Interleukin 2	(Adolfsson <i>et al.</i> , 2001)
IL-4	Interleukin 4	(Li-Weber <i>et al.</i> , 2002)
ITG	Integrine: Integrin α 1-6, Integrin α v, Integrin β 1	(Breyer & Azzi, 2001)
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>	(Wu <i>et al.</i> , 1999; Lin <i>et al.</i> , 2002; Peluzio <i>et al.</i> , 2003)
SELE	E-Selektin	(Wu <i>et al.</i> , 1999)
SELL	L-Selektin	(Islam <i>et al.</i> , 1998)
SELP	P-Selektin	(Devaraj <i>et al.</i> , 2002)
TGF- β	<i>Transforming growth factor β1</i>	(Parola <i>et al.</i> , 1992)
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule-1</i>	(Yoshikawa <i>et al.</i> , 1998; Yoshida <i>et al.</i> , 2000; Noguchi <i>et al.</i> , 2003)
Gruppe 5: Signaltransduktion und Zellzykluskontrolle		
Bcl2-L1	<i>B-cell lymphoma 2- like 2</i>	(Fischer <i>et al.</i> , 2001)
CCND1	Cyclin D1	(Fischer <i>et al.</i> , 2001; Gysin <i>et al.</i> , 2002)
CCND3	Cyclin D3	(Rota <i>et al.</i> , 2004)
CCNE	Cyclin E	(Gysin <i>et al.</i> , 2002)
CD95L	<i>CD95 ligand</i>	(Li-Weber <i>et al.</i> , 2002)
DAD1	<i>Defender against cell death 1 protein</i>	(Fischer <i>et al.</i> , 2001)
GATA4	<i>GATA-binding protein 4</i>	(Rota <i>et al.</i> , 2004)
P27	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B</i>	(Venkateswaran <i>et al.</i> , 2002)
PPAR γ	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor-γ</i>	(Campbell <i>et al.</i> , 2003)

Tabelle 1.1: Übersicht der Vitamin E-sensitiven Gene.

Die Übersicht zeigt eine Auswahl von Genen, die in ihrer Expression durch Vitamin E verändert werden. Die Expression der Gene Bcl2-L2 und DAD1 wird durch Vitamin E-Mangel in die Kombination mit Selenmangel reduziert.

Der Wirkmechanismus von Vitamin E ist nicht in allen Fällen aufgeklärt. Viele Experimente wurden ohne Vergleich mit anderen Vitamin E-Formen nur mit α -Tocopherol durchgeführt. Für die Vitamin E-abhängige Regulation entzündlicher Prozesse kommen zwei Mechanismen in Frage. Eine Möglichkeit besteht darin, Vitamin E als Antioxidans zu betrachten. Unter der Annahme, dass verschiedene Zellfunktionen durch die Produktion bzw. Elimination lipidlöslicher freier Radikale reguliert werden, kann Vitamin E als *radical scavenger* zu einem Kettenabbruch führen. In diesem Fall sollten andere Antioxidantien mit ähnlichen antioxidativen Kapazitäten und besonders die eng verwandten Vitamin E-Formen eine ähnliche Wirkung zeigen. Wie bereits erläutert, trifft dies nicht für alle Eigenschaften zu. Moleküle mit antioxidativen Eigenschaften können in komplexen biologischen Systemen Funktionen ausüben, die nichts mit ihren antioxidativen Eigenschaften zu tun haben. Ein Beispiel hierfür ist das Retinol: Retinol ist ein Antioxidans, aber im Organismus dient es nicht primär als Antioxidans, sondern als Sehpigment des Auges. Auch für Vitamin E können entsprechend andere Eigenschaften angenommen werden.

1.4 α -Tocopherol-assoziiertes Protein (TAP)

Neben α -TTP wurden weitere Proteine, die an α -Tocopherol binden, beschrieben. Das 14,2 kDa große *α -Tocopherol binding protein* bindet vorrangig α -Tocopherol und ist eventuell verantwortlich für die intrazelluläre Verteilung von α -Tocopherol (Dutta-Roy *et al.*, 1993). Auch das 75 kDa große *plasma phospholipid transfer protein* bindet α -Tocopherol und erleichtert dessen Austausch zwischen HDL und LDL (Kostner *et al.*, 1995).

Das α -Tocopherol-assoziierte Protein (TAP) wurde erstmals 1999 aus Rinderleber isoliert (Stocker *et al.*, 1999). Ein Jahr später erfolgte die Identifizierung des humanen TAP durch Sequenzhomologiestudien und anschließende Klonierung (Zimmer *et al.*, 2000). Weitere Untersuchungen führten zur Entdeckung zwei weiterer homologer Gene (TAP-2 und TAP-3), die sich in räumlicher Nähe zum TAP-Gen auf dem Chromosom 22 in der Region 22q12.1 befinden (Kempna *et al.*, 2003).

Das 46 kDa große TAP ist intrazellulär lokalisiert und wird ubiquitär exprimiert, hauptsächlich aber in Leber und Gehirn sowie Haut, Lunge und Prostata (Zimmer *et al.*, 2000; Shibata *et al.*, 2001). Kompetitionsbindungsassays ergaben, dass TAP eine hohe Ligandenaffinität (K_d) zu Phosphatidylinositol ($K_d = 216$ nM) und γ -Tocopherol ($K_d = 268$ nM) zeigt, während α -Tocopherol ($K_d = 615$ nM) signifikant schlechter gebunden wird (Panagabko *et al.*, 2003).

TAP gehört zur Familie der *Sec14-like proteins* (Stocker *et al.*, 1999; Anantharaman & Aravind, 2002). Die Mitglieder dieser Proteinfamilie besitzen alle eine konservierte lipidbindende Domäne, das CRAL-TRIO-Strukturmotiv. Eine Hauptaufgabe der *Sec14-like proteins* ist der selektive Transport verschiedener lipophiler Komponenten zwischen den Membrankompartimenten eukaryotischer Zellen (Stocker & Baumann, 2003). Sie erkennen und binden ihre lipophilen Liganden mit hoher Affinität und entlassen sie in eine Akzeptormembran. Die CRAL-TRIO-Domäne ermöglicht es diesen Proteinen zwischen einem membrangebundenen Zustand und einem freien Zustand zu wechseln und ihre

lipophilen Liganden aufzunehmen bzw. abzugeben (Aravind *et al.*, 1999). Weitere Mitglieder dieser Familie sind neben dem α -TTP das *phosphatidylinositol/ phosphatidylcholine transfer protein* (SEC14) aus *Saccharomyces cerevisiae* sowie das *retinaldehyde-binding protein* (CRALBP).

Zusätzlich zur CRAL-TRIO-Domäne weist TAP ein weiteres Strukturelement auf. Über die C-terminale GOLD-Domäne könnte das Protein mit anderen Proteinen interagieren (Anantharaman & Aravind, 2002). Dieses Strukturmerkmal ist im Gegensatz zu TAP nicht im α -TTP vertreten.

Im Jahr 2004 konnten Habermehl *et al.* zeigen, dass alle drei TAP eine GTPase-Aktivität besitzen. Diese Aktivität liegt in der gleichen Größenordnung wie die Aktivität kleiner unstimulierter GTP-bindender Proteine aus der Rab-Familie. Sequenzanalysen erbrachten Hinweise auf GTPase-Strukturelemente, wie sie in der Untereinheit G_α heterotrimerer G-Proteine vorkommen. Das Walker-A-Motiv dient als Bindungsstelle für β - und γ -Phosphat. Das Walker-B-Motiv mit der Aminosäuresequenz DxxG (wobei „x“ für eine beliebige Aminosäure steht) ist verantwortlich für die Bindung des katalytischen Mg^{2+} und GTP-Hydrolyse. In Gegensatz zu G-Proteinen liegt das Walker-B-Motiv als dreifache Kopie vor. Ein Einfluss der GTPase-Aktivität auf die Ligandenbindung wurde nicht nachgewiesen (Habermehl *et al.*, 2005), ihre physiologische Rolle ist unklar.

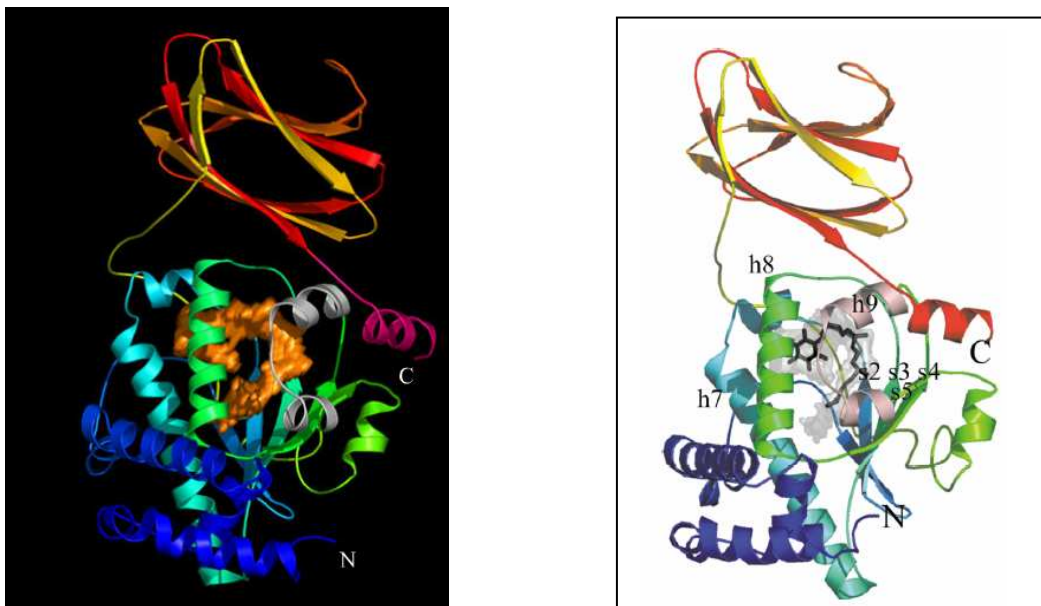


Abbildung 1.4: Proteinstruktur des humanen TAP.

Die Kristallstruktur von TAP konnte mit R,R,R- α -Tocopherylquinon, dem vorherrschenden Oxidationsprodukt des R,R,R- α -Tocopherols, als Ligand ermittelt werden. Die *Sec14-like*-Domäne des TAP umfasst zwei hochkonservierte Strukturelemente: am N-terminalen Ende ein Komplex aus drei Helices (blau), gefolgt von der CRAL-TRIO-Domäne (grün). Die CRAL-TRIO-Domäne besteht aus einem zentralen β -Faltblatt auf der einen Seite und aus fünf Helices auf der anderen Seite, die zusammen die hydrophobe Bindungstasche formen. Der Eingang der Bindungstasche ist durch 2 Helices und ihre Verbindungsschleife blockiert. Diese Situation liegt auch beim Komplex bestehend aus α -TTP und α -Tocopherol vor. Dort entspricht diese Struktur einem beweglichen Deckel, wie durch vergleichende Kristallanalysen des α -TTP mit und ohne Ligand gezeigt werden konnte. C-terminal besitzt TAP eine GOLD-Domäne (rot), über die das Protein mit anderen Proteinen interagieren könnte. (Bild aus Stocker & Baumann, 2003)

In Analogie zur Transkriptionsregulation durch Retinol ist auch für TAP ein durch α -Tocopherol vermittelter transkriptioneller Einfluss beschrieben worden. Yamauchi *et al.* (2001) zeigten in Gegenwart von α -Tocopherol eine Kerntranslokation von TAP sowie einen regulatorischen Einfluss auf die Genexpression über ein Gal4-TAP-Fusionsprotein (Yamauchi *et al.*, 2001). TAP transportiert möglicherweise α -Tocopherol zu einem nukleären Rezeptor oder kann selbst als Transkriptionsfaktor wirken. Dieser Umstand könnte vielleicht einige der genregulatorischen Effekte des α -Tocopherols erklären, wobei die Aufklärung des molekularen Mechanismus noch aussteht.

Neben der möglichen Aufgabe beim Transport von α -Tocopherol zwischen verschiedenen Membrankompartimenten agiert das TAP eventuell als ein molekulares Chaperon, das α -Tocopherol vor α -Tocopherol-abbauenden Enzymen schützt (Brigelius-Flohe *et al.*, 2002). Eine Vermittlerfunktion bei der von α -Tocopherol abhängigen Signaltransduktion ist ebenfalls denkbar.

1.5 Zelluläre Entzündungsmechanismen

Ein lebender vielzelliger Organismus bietet ein ideales Habitat für Mikroorganismen, daher spielt die Erkennung und Abwehr eingedrungener Pathogene durch das Immunsystem für das Überleben eine entscheidende Rolle. Für die Induktion einer Immunantwort ist die Erkennung von Pathogenitätsfaktoren bzw. die Unterscheidung von Selbst und Nicht-Selbst Voraussetzung. Bei der angeborenen Immunantwort, dem phylogenetisch älteren Teil des humanen Immunsystems, spielen die *pattern recognition receptors* (PRR) eine entscheidende Rolle. Sie erkennen konservierte Strukturelemente von Pathogenen, sogenannte *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs). Zu den PAMPs gehören bakterielle Zellwandbestandteile wie Lipopolysaccharid (LPS), Peptidoglycan und Lipoproteine, sowie intrazelluläre Moleküle, z.B. unmethylierte DNA-Motive (CpG-DNA) oder virale RNA (dsRNA).

Die PRR werden in zwei Klassen unterteilt: die *Toll-like-Rezeptoren* (TLR) und die *nucleotide-binding and oligomerization domains* (NOD), wobei den induzierten Reaktionen ähnliche zelluläre Mechanismen zugrunde liegen. Nach Ligandenbindung am PRR werden proinflammatorische Signalwege aktiviert, insbesondere der Transkriptionsfaktor NF κ B. Durch ihn werden wichtige Effektormoleküle reguliert, u.a. die Gene der beiden proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-1 β . TNF- α und IL-1 β werden sezerniert, binden an ihre Rezeptoren auf verschiedenen Zielzellen und aktivieren proinflammatorische Signalwege, darunter auch NF κ B. Durch diese positive Rückkopplung wird die Immunantwort amplifiziert, wobei der NF κ B-Signalweg eine zentrale Rolle im Entzündungsgeschehen übernimmt. Eine negative Regulation erfolgt durch antiinflammatorische Zytokine und einsetzende Toleranzen (Beutler, 2003). Der generelle Mechanismus ist in Abbildung 1.5 anhand des Beispiels von LPS als Pathogenitätsfaktor dargestellt.

Die wichtigste Aufgabe des Immunsystems ist die Wahrung des Gleichgewichts zwischen persistierender bakterieller Besiedlung und der Pathogenabwehr, um einen normalen entzündungsfreien Zustand aufrechtzuerhalten. Durch Störungen dieses Gleichgewichts können chronische Entzündungskrankheiten wie atopisches Ekzem, Asthma, Psoriasis, Paradontitis,

Sarcoidose, rheumatoide Arthritis, Arteriosklerose und chronisch-entzündliche Darmerkrankungen entstehen. Bei chronisch-entzündlichen Krankheiten ist das Gleichgewicht durch die Transkription und Sekretion proinflammatorischer Zytokine und die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden bei gleichzeitiger verminderter Verfügbarkeit antiinflammatorischer Zytokine gestört.

Verschiedene chronisch-entzündliche Krankheiten sind mit oxidativem Stress assoziiert. Dieser entsteht bei einer Überproduktion bzw. einer unzureichenden Eliminierung von ROS. Da einige der molekularen Prozesse bei Entzündung durch den Redox-Zustand der Zelle moduliert werden, kann oxidativer Stress die Entstehung und Progression entzündlicher Vorgänge beeinflussen.

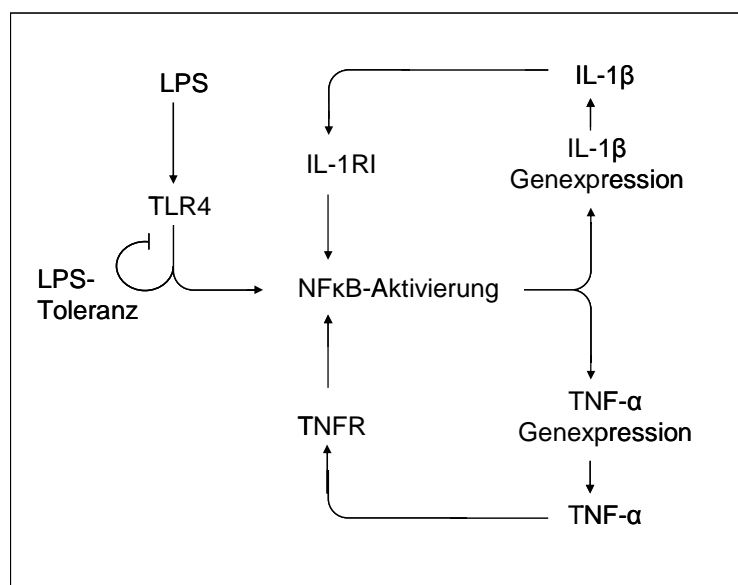


Abbildung 1.5: Zusammenhang von *Toll-like receptor 4* (TLR4) und den proinflammatorischen Zytokinen TNF- α und IL-1 β .

Der Transkriptionsfaktor NF κ B wird durch die Bindung von Lipopolysaccharid (LPS) an den TLR4 aktiviert und initiiert die Transkription der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF- α . Diese wiederum stimulieren nach Rezeptorbindung verschiedene Signalwege, darunter auch den zentralen NF κ B-Weg (positive Rückkopplung). Negative Regulation erfolgt über die Expression verschiedener antiinflammatorischer Zytokine (nicht gezeigt) und einsetzende LPS-Toleranz. (Bild verändert nach Beutler, 2003)

1.6 Interleukin-1

Interleukin-1 (IL-1) ist ein proinflammatorisches Zytokin mit multiplen Funktionen und spielt in der lokalen und systemischen Immunantwort eine zentrale Rolle. IL-1 wurde zum ersten Mal 1974 als endogenes Pyrogen beschrieben, das in Antwort auf exogene Pyrogene (bakterielle Bestandteile) von phagozytierenden Zellen freigesetzt wird und Fieber induziert (Dinarello *et al.*, 1974). Beim Menschen ist IL-1 β die vorherrschende Form. IL-1 β wird hauptsächlich von aktivierten Monozyten und Makrophagen gebildet, aber auch eine Reihe weiterer Zelltypen wie neutrophile Granulozyten,

Endothelzellen, Fibroblasten, glatte Muskelzellen, Keratinozyten sowie T- und B-Zellen produzieren IL-1 β (Daun & Fenton, 2000). Die Synthese von IL-1 β kann durch verschiedene Zytokine wie TNF- α , Interferone, Viren, Mitogene und Antigene sowie durch Moleküle bakteriellen Ursprungs wie z.B. LPS oder Peptidoglycan induziert werden. In Kombination mit anderen Zytokinen ist IL-1 β ein wichtiger Mediator entzündlicher Vorgänge. Es ist ein starkes Chemoattraktans für Leukozyten und aktiviert den oxidativen Metabolismus in Neutrophilen. IL-1 β reguliert die Expression einer Vielzahl von Genen, die in inflammatorische Prozesse involviert sind. So fördert IL-1 β die Adhäsion von Neutrophilen, Monozyten, T- und B-Zellen durch verstärkte Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und VCAM-1.

IL-1 β stimuliert die Proliferation und Aktivierung einer Vielzahl verschiedener Zelltypen wie z.B. B-Zellen, NK-Zellen und Fibroblasten. Auf der anderen Seite wirkt IL-1 β durch Unterstützung der monozytär-vermittelten Zytotoxizität antiproliferativ auf bestimmte Tumorzelltypen und induziert Tumorregression. Es verhindert das Wachstum epithelialer Zellen und verursacht Veränderungen in den endothelialen Funktionen.

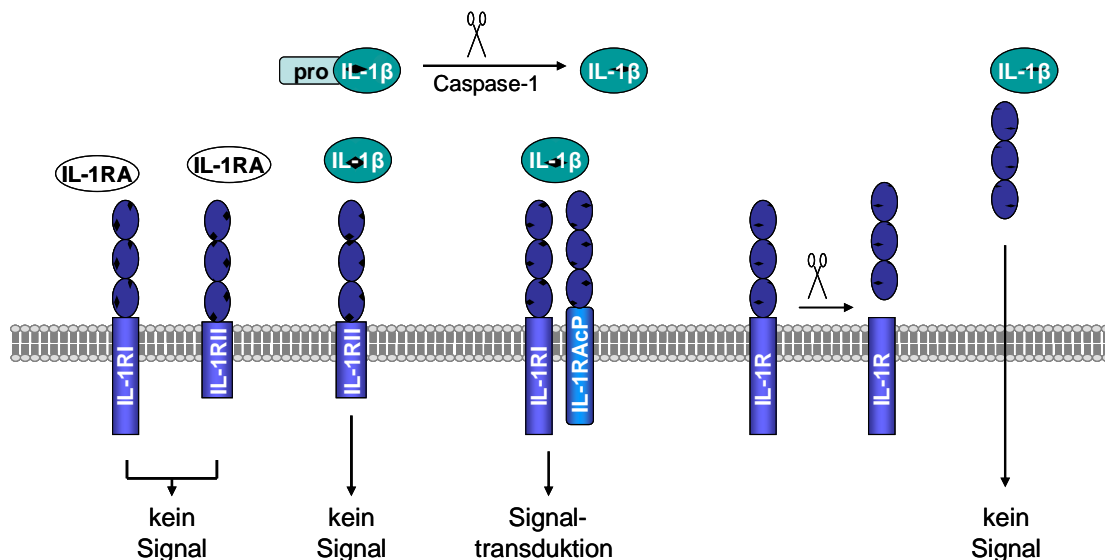


Abbildung 1.6: Signaltransduktion durch Interleukin-1.

Das als Vorläuferprotein gebildete pro-IL-1 β wird durch die Protease Caspase-1 zur aktiven Form prozessiert. IL-1 β konkurriert mit dem *IL-1 receptor antagonist* (IL-1RA) um die Bindung an IL-1-Rezeptoren. Während die Bindung von IL-1RA nicht zu einer Aktivierung von Signalkaskaden führt, kann durch die Ligandenbindung von IL-1 β der IL-1-Rezeptor I (IL-1RI) mit *interleukin-1 receptor associated protein* (IL-1 RI-AcP) heterodimerisieren. Diese Komplexbildung führt zur Aktivierung nachgeschalteter Signalwege. Die Bindung von IL-1 β an den IL-1-Rezeptor II (IL-1RII) kann keine Signalwege initiieren, da dem Rezeptor die essentielle TIR-Domäne fehlt. Auch die Bindung an löslichen IL-1-Rezeptoren löst kein Signal aus.

Insgesamt umfasst die IL-1-Familie drei Liganden: die Agonisten IL-1 α und IL-1 β sowie den *IL-1 receptor antagonist* (IL-1RA). Die Liganden weisen trotz geringer Homologie in der Aminosäuresequenz (ca. 27%) eine ähnliche dreidimensionale Struktur auf und können mit hoher Affinität den IL-1-Rezeptor binden. Der IL-1RA wird als 17 kDa großes Protein synthetisiert und konkurriert als kompetitiver Antagonist mit IL-1 α und IL-1 β um die Bindung an den IL-1-Rezeptor

(Arend *et al.*, 1998). Die beiden biologisch aktiven Isoformen IL-1 α und IL-1 β werden als 31 kDa große Vorläuferproteine gebildet und durch proteolytische Spaltung mittels spezifischer Proteasen wie z.B. *IL-1 converting enzyme* (ICE, Caspase-1) in die aktive 17-kDa-Form prozessiert. Während pro-IL-1 α biologisch aktiv sein kann, ist die proteolytische Spaltung von IL-1 β für dessen Aktivität essentiell (Cerretti *et al.*, 1992). IL-1 α ist intrazellulär oder an der Zelloberfläche lokalisiert, und man nimmt an, dass es als autokriner Faktor wirkt. IL-1 β wird von den Zellen freigesetzt und wirkt parakrin auf seine Zielzellen (Hallegua & Weisman, 2002). Funktionell sind die beiden Isoformen fast identisch, da durch ihre Bindung an den IL-1-Rezeptor ähnliche Signalkaskaden aktiviert werden.

Der IL-1-Rezeptor gehört in die Superfamilie der Toll-like/IL-1-Rezeptoren, die neben dem IL-1-Rezeptor die Rezeptorfamilie der Toll-like-Rezeptoren und den IL-18-Rezeptor umfasst (Daun & Fenton, 2000). Die Mitglieder dieser Familie weisen homologe Bereiche in ihren zytoplasmatischen Domänen auf. Diese Region wird als Toll/IL-1R-Domäne, kurz TIR, bezeichnet. Die TIR-Domäne ist entscheidend für die Signaltransduktion dieser Rezeptorfamilie, da sie eine Komplexbildung von Proteinen mit TIR-Domänen ermöglicht und eine Schlüsselfunktion bei der Assoziation des Rezeptorkomplexes hat. Die Ligandenbindung an die verschiedenen Toll-like/IL-1-Rezeptoren führt zur Aktivierung ähnlicher Signalkaskaden, z.B. des NF κ B-Signalwegs. Es existieren zwei Typen von IL-1-Rezeptoren, IL-1RI und IL-1RII, die von zwei unterschiedlichen Genen codiert werden. Die beiden Rezeptoren binden die zwei IL-1-Isoformen mit gleicher Affinität. Dem IL-1RII fehlt die intrazelluläre TIR-Domäne, und kann dementsprechend keine Signaltransduktion initiieren (*Decoy-Rezeptor*) (Colotta *et al.*, 1994). Die IL-1-Rezeptoren können proteolytisch von der Zellmembran getrennt werden und binden als lösliche Rezeptoren an zirkulierenden IL-1. Ein weiteres Mitglied des IL-1-Systems ist das *interleukin-1 receptor associated protein* (IL-1RAcP) (Greenfeder *et al.*, 1995). Das IL-1RAcP bindet keine der IL-1-Isoformen spezifisch, aber erhöht die Ligandenbindungsaffinitäten des IL-1RI für IL-1 β und IL-1 α (Abbildung 1.6).

Nach Ligandenbindung am Heterodimer aus IL-1RI und IL-1RAcP binden weitere Faktoren wie das Adaptermolekül MyD88, die IL-1RI-assoziierten Kinasen (IRAK)-1, -2, -3 und -4 sowie Tollip und Mortalin am Rezeptorkomplex (Abbildung 1.7). MyD88 besitzt eine TIR-Domäne und eine N-terminale Todesdomäne (Bonnert *et al.*, 1997). Die IRAKs assoziieren mit TRAF-6 (*TNF receptor-associated factor-6*). Die von IL-1 vermittelte Signalantwort bewirkt in den Zielzellen die Aktivierung verschiedener Signalwege. Zelltypabhängig kann IL-1 drei Typen der *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs) aktivieren: die *extracellular signal-regulated kinases* (ERKs), p38 und die *c-jun N-terminal* oder *stress-activated protein kinases* (JNKs/SAPKs). Weiterhin wird auch der NF κ B-Signalweg durch IL-1-Stimulation aktiviert (Dunne & O'Neill, 2003).

In der Homöostase wird die Aktivität des IL-1-Signals durch das Gleichgewicht zwischen der Bindung der beiden biologischen IL-1-Isoformen IL-1 α und IL-1 β an den IL-1RI mit den natürlichen Inhibitoren IL-1RA, IL-1RII und den löslichen Rezeptoren IL-1RI und IL-1RII sowie durch Signale aus anderen Zytokinnetzwerken bestimmt. Eine gesteigerte Produktion von IL-1 ist mit der Pathogenese verschiedener chronisch-entzündlicher Krankheiten assoziiert. So spielt IL-1 bei Autoimmunkrankheiten wie rheumatoider Arthritis, Arteriosklerose, Morbus Alzheimer, Asthma und

Morbus Crohn eine Rolle (Hallegua & Weisman, 2002). Aus diesem Grund wird versucht, die biologische Aktivität von IL-1 durch verschiedene Therapien zu beeinflussen z.B. durch löslichen IL-1RI (Preas *et al.*, 1996), rekombinanten IL-1RA (Anakinra) (Bresnihan *et al.*, 1998) oder anti-IL-1-Antikörper.

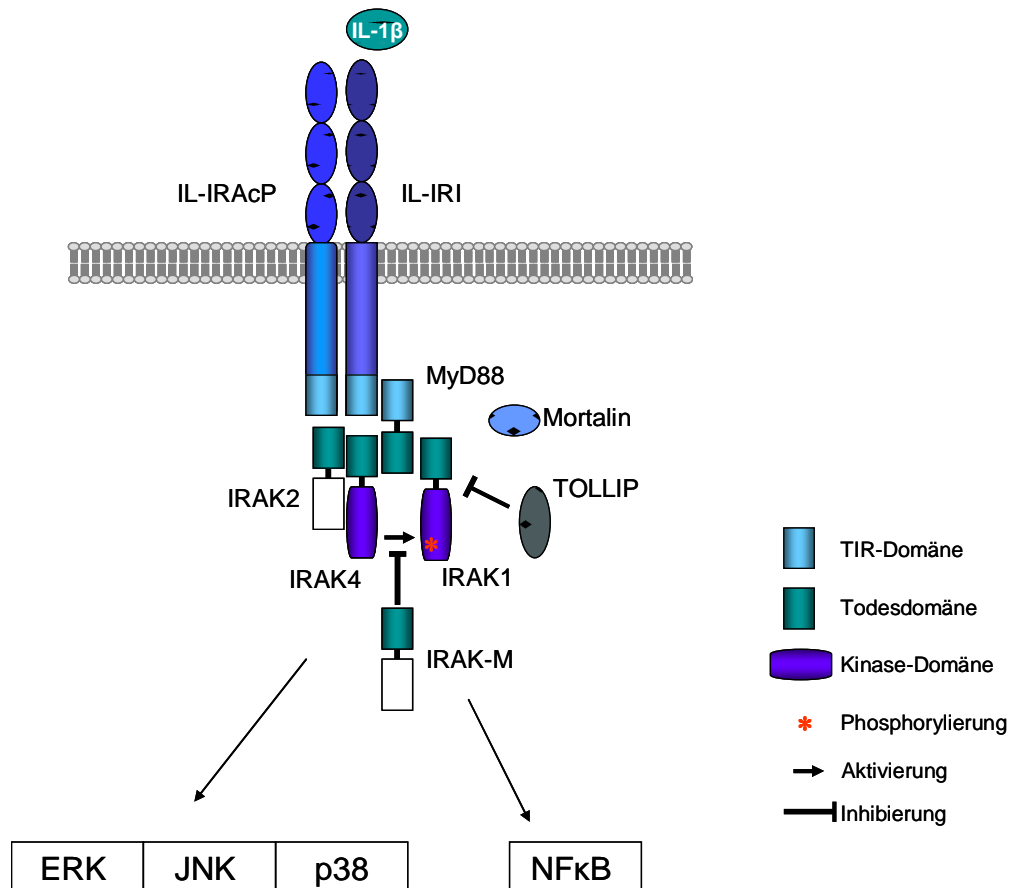


Abbildung 1.7: Aufbau des Rezeptorkomplexes und Übersicht der Hauptsignalwege von IL-1β. Nach Ligandenbindung am Heterodimer aus IL-1RI und IL-1AcP binden weitere Faktoren wie das Adaptermolekül MyD88, die IL-1RI-assoziierten Kinasen (IRAK)-1, -2, -3 und -4 sowie Tollip und Mortalin am Rezeptorkomplex. MyD88 besitzt eine TIR-Domäne und eine N-terminale Todesdomäne. Die IRAKs assoziieren mit TRAF-6 (*TNF receptor-associated factor-6*). Die Bindung von IL-1β an den IL-1RI aktiviert in den Zielzellen die Aktivierung verschiedener zentraler Signalwege. In Abhängigkeit vom Zelltyp aktiviert IL-1β die MAP-Kinasen ERK (*extracellular signal-regulated kinases*), p38 und JNK (*c-jun N-terminal protein kinases*). Weiterhin wird auch der NFκB-Signalweg durch IL-1β-Stimulation aktiviert.

1.7 Der NFκB-Signalweg

Ursprünglich wurde NFκB im Zusammenhang mit der Genregulation der κ-Kette der Immunglobuline in B-Lymphozyten beschrieben (Sen, 1986). Aus diesem Zusammenhang leitet sich auch der Name der Proteinfamilie ab. NFκB steht für *nuclear factor κB*. NFκB ist ein evolutionär konservierter

Transkriptionsfaktor, der in vielen zentralen biologischen Prozessen eine Rolle spielt. Der NFκB-Signalweg kann neben PAMP und den proinflammatorischen Zytokinen IL-1β und TNF-α durch eine Reihe weiterer Zytokine und anderer Stressoren wie UV-Strahlung, Chemikalien, Hitzeschock, Hypoxie und auch durch oxidativen Stress induziert werden (Li & Stark, 2002). Er integriert die Signale der verschiedenen Stimuli und erzeugt eine Gesamtantwort auf die veränderten Umweltbedingungen. Zur Familie der Rel/NFκB-Transkriptionsfaktoren gehören die fünf Mitglieder RelA/p65, RelB, c-Rel, NFκB1/p105/p50 und NFκB2/p100/p52. Die Mitglieder der Rel/NFκB-Familie sind charakterisiert durch ihre N-terminale RH-(*rel-homology*)-Domäne (Hoffmann *et al.*, 1999). Diese Domäne trägt die nukleäre Lokalisationssequenz und ist an der Dimerisierung, der sequenzspezifischen DNA-Bindung und der Interaktion von NFκB mit den IκB-Proteinen beteiligt (Karin, 1999; Karin & Ben-Neriah, 2000). NFκB1 und NFκB2 werden als lange Vorläufermoleküle p105 und p100 synthetisiert und post-translational zu den DNA-bindenden Untereinheiten p50 und p52 prozessiert. Diesen Untereinheiten fehlt eine transkriptionsaktivierende Domäne, wie sie in RelA, RelB und c-Rel vorhanden ist. Da die NFκB-Proteine verschiedene Homo- und Heterodimere bilden können, haben sie die Fähigkeit, Transkription differentiell zu regulieren. So funktioniert das Homodimer aus p50 oder p52 als Repressoren, während Dimere mit RelA oder c-Rel als transkriptionelle Aktivatoren dienen. RelB zeigt eine höhere regulative Flexibilität und kann als Aktivator (Ryseck *et al.*, 1992) oder auch als Repressor fungieren (Marienfeld *et al.*, 2003).

Der NFκB-Transkriptionsfaktor wird ubiquitär exprimiert. In unstimulierten Zellen liegt er als Dimer gebunden an inhibitorische Proteine der Familie IκB (*inhibitor of NFκB*) im Zytoplasma vor. IκB maskiert die Kernlokalisationssequenz des NFκB und dient somit als negativer Regulator (Baeuerle & Baltimore, 1996; Chen *et al.*, 1998; Ghosh *et al.*, 1998). Die IκB-Proteine enthalten 6 bis 7 Ankyrin-Domänen (*ankyrin-repeats*), welche die Bindung mit der RH-Domäne vermitteln. Diese Wiederholungen sind auch im C-terminalen Teil der Vorläuferproteine NFκB1/p105 und NFκB2/p100 enthalten, die somit ebenfalls als Inhibitoren fungieren und ihre Bindungspartner im Cytosol halten (Mercurio *et al.*, 1993).

Es existieren zwei alternative Aktivierungsmechanismen für die NFκB-Translokation vom Zytoplasma in den Zellkern. Durch die Aktivierung des NFκB-Signalwegs kommt es zur Aktivierung des IκB-Kinase-Komplexes (IKK). Im klassischen NFκB-Weg wird durch einen IKK-Komplex aus IKKα, IKKβ und IKKγ = NEMO (*NFκB essential modulator*) die Phosphorylierung des IκBs an zwei Serinresten (Ser32 und Ser36) katalysiert und IκB dann nach Ubiquitinierung durch das Proteasomsystem abgebaut (Bonizzi & Karin, 2004). In einem alternativen Weg wird durch einen IKK-Komplex aus einem IKKα-Homodimer NFκB2 am C-Terminus zweifach phosphoryliert (Senftleben *et al.*, 2001). Diese Phosphorylierung führt zur Prozessierung des NFκB2 zum p52 (Xiao *et al.*, 2001). Der Abbau des IκB bzw. die Prozessierung des NFκB2 legt die Kernlokalisationssequenz des NFκB-Dimers offen. NFκB wird nun in den Zellkern transportiert, bindet an spezifische DNA-Sequenzen in Promotoren oder Enhancer-Regionen von Zielgenen und aktiviert deren Gentranskription. Eine weitere wichtige Kontrolle der NFκB-vermittelten Transkription ist die Phosphorylierung der Untereinheit p65 und die Interaktion mit Coaktivatoren wie CBP/p300 (Zhong *et al.*, 1998; Silverman & Maniatis, 2001).

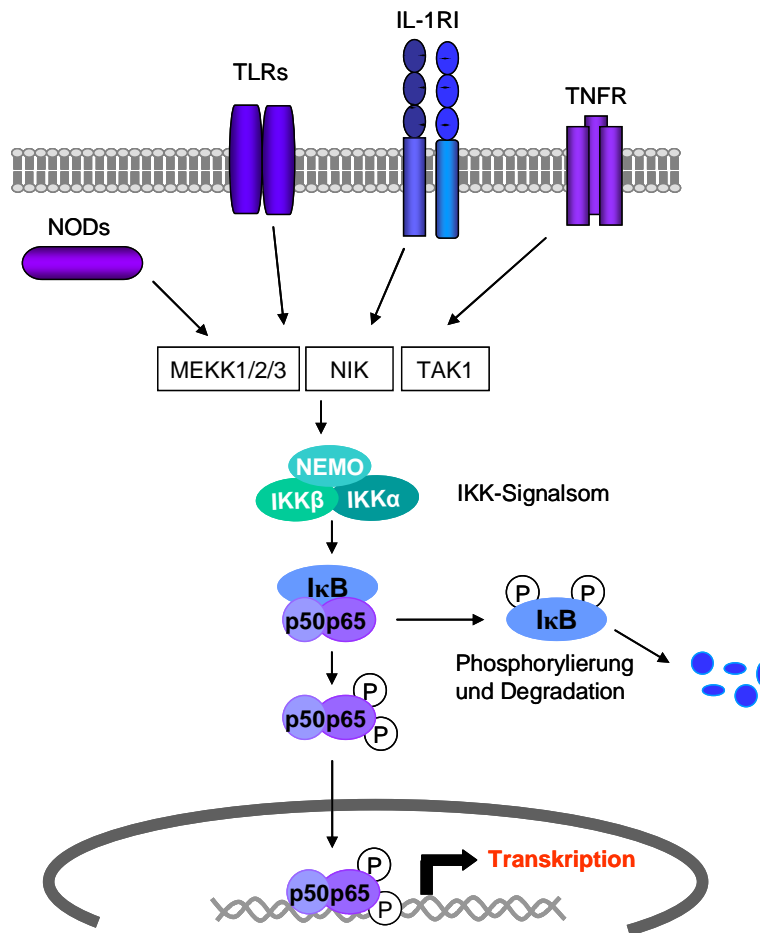


Abbildung 1.8: Der klassische NFκB-Signalweg.

Die Aktivierung des NFκB-Signalweges wird durch Bindung der proinflammatorischen Zytokine IL-1β und TNF-α an ihre Rezeptoren (IL-1RI, TNFR) oder durch Bindung von molekularen Bestandteilen von Bakterien und Viren an die Toll-like-Rezeptoren (TLRs) bzw. an die Rezeptoren der NOD-Familie initiiert. Durch diese vier Rezeptorklassen wird im klassischen NFκB-Signalweg das IKK-Signalsom aktiviert. Als upstream-Aktivatoren von IKK konnten bisher mehrere Proteinkinasen, darunter die MAP3-Kinasen MEKK1, MEKK2 und MEKK3 sowie TAK1 und NIK identifiziert werden. Nach Aktivierung des IKK-Signalsom wird IκB phosphoryliert, ubiquitiniert und über Proteasom abgebaut. Dies führt zur Freisetzung von NFκB (p50/p65), wobei die Untereinheit p65 durch verschiedene Proteinkinasen phosphoryliert werden kann. Nach Translokation in den Zellkern kann die Genexpression initiiert werden.

NFκB kann eine Vielfalt von Zielgenen aktivieren, die an der Stress- bzw. Immunantwort, dem programmierten Zelltod sowie an Entwicklungs- und Differenzierungsprozessen beteiligt sind. Der alternative NFκB-Signalweg spielt eine Rolle bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung sekundärer lymphoider Organe, während der klassische NFκB-Signalweg essentiell für die angeborene und die adaptive Immunantwort ist. Die Aktivierung des für den klassischen Signalweg typischen NFκB-Dimers p50/p65 führt zu einer gesteigerten Transkription proinflammatorischer Gene. Zu den regulierten Genen gehören Zytokine (IL-1, TNF), Chemokine (MCP-1) sowie Enzyme, die sekundäre

inflammatorische Mediatoren oder Apoptoseinhibitoren produzieren, und verschiedene Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, VCAM-1 und Integrine) (Ghosh *et al.*, 1998).

1.8 Einfluss von ROS auf den IL-1 β -Signalweg

Der IL-1 β -Signalweg wird auf verschiedenen Ebenen durch ROS beeinflusst. Auf der einen Seite wird eine Produktion von ROS durch IL-1 β induziert, auf der anderen Seite ist die Aktivität vieler Proteine der Signalkaskade durch reaktive Schwefelgruppen redox-sensitiv. In phagozytierenden Zellen wie Neutrophilen und Makrophagen initiiert IL-1 β den *oxidative burst*. Durch die Aktivierung des NAD(P)H-Oxidase-Systems kommt es zu einer massiven Produktion von Superoxidanionen ($O_2^{\bullet-}$) für die Pathogenabwehr. Weiterhin stimuliert die Bindung von IL-1 β am IL-1RI eine intrazelluläre Produktion von ROS, die auch für andere Zytokin-Liganden beschrieben ist. Diese Produktion von $O_2^{\bullet-}$ wurde auch in nicht-phagozytierenden Zellen wie Endothelzellen, Fibroblasten, glatten Muskelzellen und Chondrozyten beobachtet (Matsubara & Ziff, 1986; Meier *et al.*, 1989; Carman-Krzan & Wise, 1993; Boota *et al.*, 1996). Die ROS-Quelle ist bei diesen Zellen höchstwahrscheinlich eine weitere NAD(P)H-Oxidase unter der Beteiligung von Rac-1 (Sundaresan *et al.*, 1996). In lymphoiden Zellen und in Astroglia-Zellkulturen ist die Quelle der IL-1 β -stimulierten Produktion von ROS als 5-Lipoxygenase identifiziert worden (Carman-Krzan & Wise, 1993; Bonizzi *et al.*, 1999). Als Funktion dieser ROS-Produktion wird angenommen, dass die entstehenden ROS wie $O_2^{\bullet-}$ und H_2O_2 im IL-1 β -Signalweg involviert sind (Brigelius-Flohe *et al.*, 2004), indem sie redox-sensitive Wirkgruppen von Proteinen modifizieren.

Die Tatsache, dass Substanzen, die mit reaktiven Schwefelgruppen (SH-Gruppe) von Proteinen reagieren, die Assemblierung des Rezeptorkomplexes und damit die IL-1 β -Signalkaskade blockieren, spricht dafür, dass einige der involvierten Proteine redox-sensitiv sind. Die Rekrutierung von IRAK zum Rezeptorkomplex und die nachfolgenden Phosphorylierungen werden durch SH-Gruppen-modifizierende Substanzen wie Menadion, Diamid oder Pyrrolidindithiocarbamat (PDTC) in der humanen epithelialen Zelllinie ECV304 inhibiert (Bol *et al.*, 1999). Ein weiteres Protein des IL-1-Rezeptorkomplexes, Mortalin, wurde auch als redox-sensitiv beschrieben (Sacht *et al.*, 1999). Mortalin liegt unter oxidativen Stressbedingungen an Glutathion gebunden vor (Fratelli *et al.*, 2002). Die nachgeschalteten Signaltransduktionsereignisse wie die Aktivierung von NF κ B und die MAPK-Aktivierung sind ebenfalls redox-sensitiv.

Bei der NF κ B-Aktivierung sind die I κ B-Kinasen (IKK) Ziele von thiolmodifizierenden Substanzen (darunter auch H_2O_2). Die TNF- α - und IL-1 β -induzierte Aktivierung von IKK kann durch H_2O_2 inhibiert werden. Dabei oxidiert H_2O_2 direkt Cysteinreste des IKK-Komplexes (Korn *et al.*, 2001).

Weiterhin wird die DNA-Bindung von NF κ B und die Transaktivierung durch Modifikationen essentieller Cysteinreste reguliert. Die Glutathionylierung von Cysteinrest 62 in der DNA-bindenden Domäne der p50-Untereinheit führt zu einem Verlust der DNA-Bindungseigenschaft (Pineda-Molina *et al.*, 2001), und die Modifikation des Cysteinrestes 26 von c-Rel verhindert eine Phosphorylierung und somit die DNA-Bindung (Glineur *et al.*, 2000).

Nicht allein die Aktivierung von NFκB durch IL-1β ist redox-sensitiv, sondern auch die Aktivierung der MAP-Kinasen. Wilmer und *et al.* (1997) konnten in humanen mesangialen Zellen zeigen, dass die durch IL-1β induzierte Tyrosinphosphorylierung und die damit verbundene Aktivierung von ERK und JNK durch Vorinkubation mit antioxidativen Substanzen wie N-Acetyl-Cystein (NAC) oder Dithiothreitol (DTT) blockiert wird (Wilmer *et al.*, 1997). In vaskulären glatten Muskelzellen wird die von IL-1β abhängige ERK-Aktivierung über Superoxide vermittelt und kann durch NAC oder Überexpression von Magan-abhängiger Superoxiddismutase (MnSOD) inhibiert werden (Gurjar *et al.*, 2001).

1.9 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit ist es, die Bedeutung von Vitamin E im Zusammenhang mit Genregulation und Signaltransduktion bei entzündlichen Prozessen zu charakterisieren. Zu diesem Zweck werden die Untersuchungen in zwei Teile gegliedert:

Zunächst soll eine systematische Untersuchung differenzieller Genexpression durch Vitamin E im Zellkulturmodell durchgeführt werden. Da es Hinweise auf eine Beteiligung von ROS an entzündlichen Prozessen gibt, stellt sich die Frage, ob Vitamin E als ein Antioxidans durch Eliminierung von ROS Einfluss nimmt oder ob Vitamin E unabhängig von seinem antioxidativen Potential in das Entzündungsgeschehen eingreift. Dazu sollen im Einzelnen sollten folgende Fragestellungen untersucht werden:

- Kann Vitamin E die Expression von entzündungsassoziierten Genen beeinflussen?
- Lässt sich die differentielle mRNA-Expression auch auf Proteinebene nachweisen?
- Gibt es Unterschiede in der Genregulation durch verschiedene Vitamin E-Formen?
- Kann man auf den zugrunde liegenden molekularen Mechanismus zurückschließen?

Der zweite Teil der Arbeit umfasst die Charakterisierung des humanen α -Tocopherol-assoziierten Proteins (TAP). TAP wurde zuvor als ein intrazelluläres Tocopherol-bindendes Protein identifiziert. Da die molekulare Wirkungsweise von Vitamin E auf die Genexpression und die zelluläre Funktion von TAP weitgehend unbekannt sind, stellt sich die Frage, ob TAP für die Vermittlung der Vitamin E-abhängigen Effekte verantwortlich ist. Als Grundlage für die Untersuchungen im Zellkulturmodell ist ein Konstrukt für die transiente Überexpression herzustellen. Folgende Fragestellungen sollen bearbeitet werden:

- Lässt sich eine Genexpression von TAP in verschiedenen Geweben und Zelllinien nachweisen?
- Unter welchen Bedingungen ist die Expression induzierbar?
- Welche Signalwege lassen sich im verwendeten Zellkulturmodell durch Vitamin E beeinflussen? Ist TAP als Vermittler involviert?
- Finden sich Unterschiede in der Aktivierung von Signalwegen durch TAP und einer Mutante mit zerstörten GTPase-Domänen?

2 METHODEN

2.1 Zellkultur

2.1.1 Standardzellkultur

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen Zelllinien stammten von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig). Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert und zwei- bis dreimal pro Woche passagiert. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt (Herasafe-HS12-Sterilbank, Heraeus, Osterode). Die Zellen wurden routinemäßig mittels Lichtmikroskopie auf Veränderungen und Kontaminationen überprüft. Zusätzlich fanden in regelmäßigen Abständen Untersuchungen auf Mycoplasmen-Infektion statt. Hierfür wurde das Kit VerorGeM *mycoplasma detection* PCR (Minerva Biolabs, Berlin) verwendet.

Für das Passagieren wurden adhärent wachsenden Zellen trypsiniert. Dafür wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit auf 37°C temperiertem PBS (PAA Laboratories) gewaschen, mit 4 ml Trypsin/EDTA (Invitrogen, Karlsruhe) überschichtet und im Brutschrank für 4 min inkubiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von FCS-haltigem Medium gestoppt. Die Zellsuspension wurde anschließend in ein 50-ml-Röhrchen überführt und für 5 min bei 1.800 x g zentrifugiert. Bei in Suspension wachsenden Zellen wurde das komplette Kulturvolumen in 50-ml-Röhrchen überführt und die Zellen mittels Zentrifugation sedimentiert. Im Anschluss wurde das Zellpellet vorsichtig in 10 ml Medium resuspendiert und die Zellen für Versuche ausgesät bzw. für die Expansion der Zellkultur verwendet. Die für die weiterführende Zellkultur eingesetzten Zellzahlen variierten je nach Verdopplungszeit. Nach Erreichen der 25. Passage wurden die Zellen verworfen und eine neue Charge aufgetaut.

2.1.2 Anlegen und Auftauen von Zellstocks

Von den Zellchargen, die von der DSMZ stammten, wurden Zellstocks angelegt, die bei -80°C gelagert wurden. Für die Stocks wurden die Zellen expandiert, geerntet und in 1 ml Medium aufgenommen. Die Zellzahl wurde in der Neubauer-Kammer bestimmt (siehe unten) und mit Dimethylsulfoxid (DMSO)-haltigem Einfriermedium (Cell Culture Freezing Medium-DMSO, Invitrogen) auf eine Dichte von 5×10^6 Zellen/ml eingestellt. DMSO wirkt kryoprotektiv, ist aber bei höheren Temperaturen toxisch. Die Zellsuspension wurde daher möglichst schnell für das Einfrieren aliquotiert. Ein mit Isopropanol gefüllter Kryokontainer sorgte für ein langsames und kontinuierliches Abkühlen der Zellen bei -80°C.

Zur Inkulturnahme wurden die Zellstocks in einem Wasserbad bei 37°C zügig aufgetaut, im Anschluss rasch in ein mit warmem Medium + 10% FCS gefülltes 50-ml-Röhrchen überführt und bei 1.800 x g abzentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet im Zellkulturmedium aufgenommen und die Zellen expandiert.

2.1.3 Bestimmung der Zellkonzentration und Aussaat

Zum Bestimmen der Zellzahl für die Aussaat wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Dabei wurde ein 10 µl-Aliquot der Zellsuspension mit 90 µl 0,4% Trypan-Blau (Sigma, München) versetzt und von dieser Verdünnung 10 µl in die Zählkammer eingebracht. Anschließend wurden die Zellen unter einem Lichtmikroskop ausgezählt. Die Zellzahl pro ml wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Zellzahl/ml} = \frac{\text{Anzahl der ausgezählten Zellen}}{\text{Anzahl der ausgezählten Quadranten}} \times 10.000$$

Die Zellzahl pro *well* und das Mediumvolumen variierte je nach Zellkulturformat und Experiment. Die für die verschiedenen Experimente eingesetzten Zellzahlen und Zellkulturplattenformate sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst.

Experiment	Zellkulturformat	Zellzahl/ <i>well</i>	Mediumvolumen
HPLC	10-cm-Schale	1,5 x 10 ⁶	10 ml
RNA (Microarray)	10-cm-Schale	1,5 x 10 ⁶	10 ml
FACS	6- <i>well</i> -Platte	2-3 x 10 ⁵	2 ml
RNA	6- <i>well</i> -Platte	2-3 x 10 ⁵	2 ml
Protein	6- <i>well</i> -Platte	2-3 x 10 ⁵	2 ml
ROS-Detektion	6- <i>well</i> -Platte	2-3 x 10 ⁵	2 ml
Dual Luciferase Assay (DLA)	96- <i>well</i> -Platte	15.000	100 µl
ELISA	96- <i>well</i> -Platte	15.000	100 µl
Zelltod-Messungen	96- <i>well</i> -Platte	7.000	100 µl

Tabelle 2.1: Zusammenstellung der eingesetzten Zellzahlen und Formate für die verschiedenen Experimente.

2.1.4 Inkubation mit Vitamin E

Das in der Standardzellkultur eingesetzte Kulturmedium sowie das fetale Rinderserum (FCS) enthielten kein Vitamin E. Für die exogene Zugabe von Vitamin E zur Zellkultur wurde Vitamin E (D,L- α -Tocopherol, D,L- β -Tocopherol, Calbiochem, Darmstadt) mit Ethanol vorverdünnt. Zum Lösen dieser Vitamin E-Stammlösung im Zellkulturmedium wurde die entsprechende Menge zuerst im benötigten FCS-Volumen aufgenommen und anschließend mit Medium auf das Endvolumen aufgefüllt. Um eventuelle Nebeneffekte des Lösungsmittels auszuschließen, enthielt das Medium in allen Versuchsansätzen 0,1% (v/v) Ethanol. Die eingesetzten Tocopherol-Konzentrationen lagen im

Rahmen physiologischer Plasmaspiegel des Menschen zwischen 6 und 60 μM . Die Inkubationszeit mit Tocopherol betrug 16 h.

2.1.5 Transfektion humaner Zelllinien

Die Transfektion der HeLa-Zellen erfolgte mittels Lipofektion durch die Zugabe von FuGENE 6 (Roche, Mannheim) oder Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Bei der Lipofektion wird die einzuschleusende DNA in Liposomen komplexiert, die mit der Zellmembran fusionieren und ihren DNA-haltigen Inhalt ins Cytoplasma entleeren.

Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion ausgesät, so dass die Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion 60-80% konfluent waren. Die eingesetzten DNA- und Mediummengen sowie das Transfektionsreagenz variierten je nach Experiment und sind der Tabelle 2.2 zu entnehmen. Die Transfektionsansätze wurden nach den Angaben des jeweiligen Herstellers angesetzt. Nach der Transfektion wurden die Zellen 6-24 h kultiviert und im Anschluss entsprechend des Experimentes weiterbehandelt.

Experiment	Zellkulturformat	Zellzahl/well	Medium	Transfektion	DNA/ well
HPLC	10-cm-Schale	1.500.000	100 μl	6,0 μl FuGENE	4 μg
FACS	6-well-Platte	200.000	100 μl	3,0 μl FuGENE	1 μg
RNA	6-well-Platte	200.000	100 μl	3,0 μl FuGENE	1 μg
Protein	6-well-Platte	200.000	100 μl	3,0 μl FuGENE	1 μg
Bodipy	6-well-Platte	200.000	100 μl	3,0 μl FuGENE	1 μg
DLA	96-well-Platte	10.000	50 μl	0,4 μl Lipofectamine	100-130 ng

Tabelle 2.2: Zusammenstellung der in den Transfektionsexperimenten verwendeten Parameter.

2.1.6 Ernte

Nach Ende der Stimulation wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 1 ml PBS überschichtet. Mit einem trockenen, desinfizierten Gummizellschaber wurden die Zellen abgelöst und die Suspension in ein Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden bei 1.800 x g für 5 min sedimentiert. Für die Ernte von Suspensionszellen wurde das komplette Kulturvolumen in Reaktionsgefäße überführt und die Zellen durch Zentrifugation pelletiert. Der Überstand wurde entfernt und das Pellet je nach Experiment in verschiedenen Puffern aufgenommen oder direkt bei -20°C eingefroren.

2.2 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

2.2.1 Isolierung von genomischer DNA

HeLa-Zellen wurden mit $1,5 \times 10^6$ Zellen auf einer 10-cm-Schale ausgesät und über Nacht kultiviert. Nach der Ernte wurde das Pellet in DNA-Isolierungspuffer mit 0,2 mg/ml Proteinase K aufgenommen und die Proteine durch eine 4-stündige Inkubation bei 37°C vollständig verdaut. Die DNA wurde durch Zugabe von einem Volumen eiskaltem Isopropanol und Inkubation bei -20°C über Nacht und anschließender Zentrifugation (16.000 x g, 20 min, 4°C) gefällt. Die genomische DNA wurde zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, für 1h bei RT getrocknet und anschließend in TE-Puffer (pH 7,6) aufgenommen. Die Konzentration wurde photometrisch über die Extinktion bei 260 nm mittels UV-Photometrie (BioPhotometer, Eppendorf, Hamburg) bestimmt.

2.2.2 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus eukaryotischen Zellen erfolgte nach einem optimierten Protokoll mit Hilfe des RNeasy Mini Kit, des QIAshredder Homogenizer Kit und des RNase-Free DNase Set der Firma Qiagen (Hilden). Das Prinzip des RNeasy Mini Kit beruht darauf, dass Nukleinsäuren in Gegenwart von hohen Konzentrationen chaotropher Salze an eine Silicagel-Membran spezifisch binden und verunreinigende Komponenten so ausgewaschen werden können. Das frische oder zuvor bei -80°C eingefrorene Zellpellet wurde in 700 µl RLT-Puffer + 1% (v/v) β-Mercaptoethanol aufgenommen und durch Zentrifugation (2-3 min bei 13.000 x g) über eine QIAshredder-Säule homogenisiert. Der Durchfluss wurde erneut bei 13.000 x g für 3 min zentrifugiert, um verbleibende Verunreinigungen zu entfernen. Der klare Überstand wurde mit einem Volumen 70% Ethanol versetzt und auf eine RNA-bindende RNeasy-Mini-Säule aufgetragen. Zum Waschen wurden 350 µl RLT-Puffer auf die Säule gegeben, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend durch Zentrifugation (8.000 x g, 15 s) entfernt. Um genomische DNA zu entfernen, wurde ein DNase-Verdau auf der Säule durchgeführt. Dazu wurden 80 µl DNase-I-Lösung (10 µl DNase I in 70 µl RDD-Puffer, Qiagen) auf die Säule pipettiert und für 15 min bei RT inkubiert. Es folgten drei Waschschritte mit 700 µl RW1-Puffer und 2 x 500 µl RPE-Puffer mit anschließender Zentrifugation. Im Anschluss wurde die Membran durch zweiminütige Zentrifugation bei 13.000 x g getrocknet. Für die Elution wurde die Säule in ein neues RNase-freies Reaktionsgefäß platziert und 50 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Membran pipettiert. Nach 10 min Inkubation bei RT wurde die RNA durch Zentrifugation (1 min bei 13.000 x g) eluiert. Um die isolierte RNA-Menge zu erhöhen, wurde der Elutionsschritt mit weiteren 50 µl RNase-freiem Wasser wiederholt. Die isolierte RNA wurde bei -80°C gelagert.

Die Isolierung der für Microarray- bzw. TaqMan-Analysen eingesetzten RNA erfolgte nach einem erweiterten Protokoll mit zusätzlicher Aufreinigung und zwei weiteren DNase-Verdauen auf einer zweiten Säule. Die Elution erfolgte in 100 µl RNase-freiem Wasser.

2.2.3 RNA-Fällung

Da für den Microarray eine RNA-Menge von 50 ng in einem maximalen Volumen von 10 µl benötigt wurde, musste eine anschließende RNA-Fällung durchgeführt werden. Zu 100 µl RNA-Probe wurden 250 µl 98% (v/v) eiskaltes Ethanol, 10 µl eiskaltes 3 M Natriumacetat sowie 3 µl Glycogen zugegeben und für die Präzipitatbildung über Nacht bei -80°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Probe bei 4°C für 20 min bei 16.000 x g zentrifugiert, das Pellet mit 400 µl Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert. Nach Entfernen des Überstandes wurde die RNA für 10 min bei RT getrocknet, anschließend in 10 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen und 2-3 min auf Eis gelöst.

2.2.4 Überprüfung der Konzentration und Qualität von RNA

Die Konzentration und der Reinheitsgrades der RNA wurden durch Messung der Extinktion bei 260 nm und 280 nm mittels UV-Photometrie (BioPhotometer, Eppendorf) bestimmt. Die Konzentration der Probe kann durch Messung der Absorption bei 260 nm gegen einen Leerwert ermittelt werden. Dabei entspricht eine optische Einheit 40 ng RNA/µl. Der Verhältniswert der Absorption von 260 nm/280 nm ist ein Maß für die Reinheit der RNA bezogen auf Proteinverunreinigungen, die bei 280 nm absorbieren. Der Wert sollte zwischen 1,6 und 2 liegen.

Die RNA-Qualität wurde mittels Agarosegelelektrophorese (2.2.7) anhand der ribosomalen RNA-Banden (rRNA) überprüft. Bei intakter RNA können nach elektrophoretischer Auftrennung zwei distinkte rRNA-Banden (18S- und 28S-Banden) detektiert werden. Für die Analyse wurde je 1 µg RNA auf einem 1% (w/v) Agarosegel mit 6 µl Ethidiumbromid/100 ml aufgetragen und das Gel anschließend unter UV-Beleuchtung analysiert.

Um Kontaminationen mit genomischer DNA auszuschließen, wurden die Proben als *template* für eine Kontroll-RT-PCR (2.2.6) eingesetzt. Die verwendeten Primer waren spezifisch für das Exon 6 des *Housekeeping*-Gens β -Actin. Für weitere Experimente wurden nur RNA-Proben verwendet, die keine Bande beruhend auf Amplifikation genomischer DNA zeigten.

2.2.5 Reverse Transkription

Um die RNA für weitere Analysen wie RT-PCR zugänglich zu machen, wurde mit Hilfe reverser Transkription komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert. Das verwendete Advantage RT-for-PCR-Kit (Clontech, Heidelberg) enthält eine RNA-abhängige DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase) aus dem Retrovirus MMLV (*moloney-murine leukemia virus*) sowie Oligo-(dT)₁₈-Primer, die an die 3'-Poly(A)-Enden der mRNA-Moleküle binden.

Für die Synthesereaktion wurden 500 ng Gesamt-RNA eingesetzt, die mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 12,5 µl eingestellt wurden. Nach der Zugabe von 1 µl Oligo-(dT)₁₈-Primern wurde der Ansatz für 2 min bei 70°C vorinkubiert. Danach wurden 6,5 µl Mastermix, (bestehend aus 5 x Reaktionspuffer, dNTPs, einem RNase-Inhibitor sowie der reversen Transkriptase) zum Reaktionsansatz gegeben. Nach einstündiger Inkubation bei 42°C wurde die reverse Transkriptase

durch Erhitzen für 5 min bei 92°C denaturiert. Für die weitere Verwendung wurde die synthetisierte cDNA 1:5 mit PCR-Wasser verdünnt und bei -20°C gelagert.

Komponente	Volumen
Gesamt-RNA (500 ng)	1-12,5 µl
Oligo-(dT) ₁₈ -Primer	1,0 µl
5 x Reaction Buffer	4,0 µl
dNTP-Mix (je 10 mM)	0,4 µl
RNase-Inhibitor	0,5 µl
MMLV-RT	1,0 µl
A.bidest.	ad 20 µl

Tabelle 2.3: Zusammensetzung des Ansatzes für die Reverse Transkription.

2.2.6 RT-PCR

Die PCR (*polymerase chain reaction*) wird für die Amplifikation von DNA-Fragmenten eingesetzt (Mullis & Faloona 1987). Sie besteht aus einem mehrfach wiederholten Zyklus aus DNA-Denaturierung, Primer-Hybridisierung (*annealing*) und Elongation. Das System AmpliTaq DNA Polymerase (Perkin Elmer) verwendet eine *Taq*-DNA-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*.

Die Primer wurden anhand von publizierten Sequenzen des jeweiligen Gens sowie der mRNA aus der öffentlichen Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (Bethesda, USA; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) erstellt. Die für die RT-PCR eingesetzten Primer wurden so entworfen, dass die *annealing*-Temperaturen zwischen 54°C und 62°C lagen (Optimum: 60°C), wobei sich die *annealing*-Temperaturen eines Primerpaares nicht mehr als 2°C unterschieden. Um auszuschließen, dass eventuell vorhandene genomische Verunreinigungen das Ergebnis der RT-PCR beeinträchtigen, wurden Exon-überspannende Primer verwendet. Die Zyklenzahl für jedes Gen wurde so gewählt, dass die Reaktion sich noch im linearen Bereich der Amplifikationskinetik befand, damit eine semiquantitative Auswertung möglich war. Die folgende Tabelle gibt ein typisches Pipettierschema wieder. Die Anzahl der Zyklen lag zwischen 25 und 35.

Komponente	Volumen
10 x PCR Buffer II	2,0 µl
MgCl ₂	1,2 µl
dNTP (je 10 mM)	0,4 µl
Primer (je 10 µM)	0,4 µl
AmpliTaq DNA-Polymerase	0,2 µl
<i>template</i> -DNA (ca. 10 ng)	2,0 µl
A.bidest.	ad 20 µl

Tabelle 2.4: Standardansatz für RT-PCR.

Die verwendeten Primerpaare mit den entsprechenden *annealing*-Temperaturen sind im Anhang aufgelistet.

2.2.7 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

DNA-Fragmenten und RNA wurden mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. DNA- oder RNA-Moleküle wandern aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatreste im elektrischen Feld zur Anode, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit durch die Agarosematrix von der Fragmentgröße bestimmt wird. Die Prozentigkeit der verwendeten Agarosegele war abhängig von der erwarteten Fragmentlänge und lag zwischen 0,5 und 2% (w/v) Agarose in 0,5 x TAE-Puffer. Für die Visualisierung der DNA-Fragmente unter UV-Anregung wurde das in DNA-Doppelstränge interkalierende Ethidiumbromid eingesetzt (Endkonzentration 0,6 µg/ml). Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 100 mV für 30 min (Power Pack Basic, BIORAD, München). Durch die Verwendung eines Markers (Smart Ladder, Eurogentic) konnte die Größe sowie die Konzentration von DNA-Banden mittels UV-Licht im BioDocAnalyse-Transilluminator (Biometra, Göttingen) ermittelt werden.

2.2.8 Konstruktion von Expressionsvektoren

Im Folgenden wird die Herstellung von Konstrukten für die Überexpression und Reportergerassays methodisch dargestellt.

2.2.8.1 Amplifikation der Zielsequenzen mittels PCR

Für die Konstruktion von Plasmiden wurden DNA-Fragmente aus genomischer DNA bzw. cDNA mittels PCR vervielfältigt. Da für die Konstruktion eine fehlerfreie Amplifikation des *templates* essentiell ist, wurde als DNA-Polymerase die AccuPrime Pfx DNA Polymerase (Invitrogen) eingesetzt, die im Gegensatz zur Taq-Polymerase eine 3'-5' *Proofreading*-Exonucleaseaktivität aufweist. Die verwendeten Primer bestanden aus 16-29 *template*-spezifischen Nucleotiden sowie aus Sequenzen, die Restriktionsschnittstellen oder Rekombinationsstellen enthielten. Die Benutzung von zwei unterschiedlichen Restriktionsschnittstellen bzw. Rekombinationsstellen ermöglichte eine gerichtete Insertion des DNA-Fragmentes in den Vektor.

Der Reaktionsansatz wurde gemäß der Tabelle 2.5 Tabelle 2.5 angesetzt. Die Reaktion wurde im Thermocycler mit einer initialen Denaturierung (2 min bei 95°C) gestartet und durchlief 10-15 mal den folgenden Zyklus: Denaturierung bei 95°C für 15 s, *annealing* bei 60°C für 30 s und Elongation bei 68°C für 90 s (1 min für 1 kb).

Komponente	Volumen
10 x AccuPrime <i>Pfx</i> Puffer	5,0 µl
Primer Mix (10 µM je Primer)	1,5 µl
AccuPrime <i>Pfx</i> DNA Polymerase	1,0 µl
<i>template</i> -DNA (ca. 100 ng)	5,0 µl
A.bidest.	ad 20 µl

Tabelle 2.5: PCR-Ansatz zur Amplifikation von DNA-Fragmenten.

Die Tabelle zeigt einen typischen PCR-Ansatz für die AccuPrime *Pfx* DNA Polymerase. Die eingesetzten Primer wurden so konstruiert, dass die *annealing*-Temperatur 60°C betrug. Als *template* wurde genomische DNA aus HeLa-Zellen, sowie cDNA eingesetzt.

Nach Beendigung der PCR wurde der Reaktionsansatz bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert. Zur Überprüfung und Aufreinigung wurde der PCR-Ansatz auf ein 1% Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.8.2 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA-Banden aus einem Agarosegel erfolgte mit dem MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen). Für die Isolation wurde die entsprechende Bande unter UV-Beleuchtung detektiert und mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Das Agarosestück wurde in ein 2-ml-Reaktionsgefäß überführt und 300 µl QG-Puffer pro 100 mg Gel hinzugefügt. Der Ansatz wurde ca. 10 min bei 50°C bis zum vollständigen Schmelzen der Agarose inkubiert und anschließend mit einem Volumen Isopropanol versetzt. Nach mehrmaligem Invertieren des Reaktionsgefäßes wurde die Probe auf die Säule aufgetragen und zentrifugiert (10.000 x *g* für 1 min). Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit 500 µl QG-Puffer sowie mit 750 µl PE-Puffer gewaschen. Danach wurde der Puffer durch zweimalige Zentrifugation (10.000 x *g* für 3 min) restlos entfernt. Die DNA-Elution erfolgte mit 10 µl TE-Puffer nach 1 min Inkubation bei Raumtemperatur und anschließender Zentrifugation (10.000 x *g* für 1 min).

2.2.8.3 Verdau von PCR-Produkten und Plasmiden mit Restriktionsendonucleasen

Restriktionsendonucleasen des Typs II erkennen und schneiden eine für das Enzym spezifische palindrome Basensequenz. Für die Plasmidkonstruktion wurden Restriktionsenzyme (NEB, Bad Schwalbach) verwendet, die kohäsive (*sticky*) und nicht glatte (*blunt*) Enden erzeugen, da dieses die

nachfolgende Ligation erleichtert. Der Restriktionsverdau wurde entsprechend Tabelle 2.6 auf Eis angesetzt und für 2 h bei 37°C im Heizblock inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Erhitzen auf 65°C für 5 min gestoppt.

Komponente	Volumen
10 x Reaktionspuffer	2,0 µl
BSA (Stock 100 ng/µl)	2,0 µl
DNA	1-2 µl
pro Restriktionsenzym	1,0 µl
A.bidest.	ad 20 µl

Tabelle 2.6: Allgemeine Zusammensetzung einer Restriktion.

Für die Restriktionsenzyme wurden spezielle Reaktionspuffer mitgeliefert. Bei einer Doppelrestriktion wurden aufeinander abgestimmte Enzyme verwendet, die entweder im gleichen Reaktionspuffer oder ohne nennenswerten Aktivitätsverlust im anderen Puffersystem aktiv waren.

Die für die Plasmidkonstruktion geschnittenen DNA-Fragmente wurden wie unter 2.2.8.4 beschrieben aufgereinigt. Für die Überprüfung von Expressionsvektoren wurden die Proben mit 2 µl 10 x DNA Ladepuffer versetzt und auf ein 1% (w/v) Agarosegel zusammen mit einem entsprechenden Größenmarker aufgetragen.

2.2.8.4 Aufreinigung von DNA nach Restriktionsverdau

Für die DNA-Aufreinigung aus einem Restriktionsverdau wurde das MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers verwendet. Der Reaktionsansatz wurde mit 5 Volumen PB-Puffer versetzt und auf eine QIAquick-Säule aufgetragen. Nach Zentrifugation (10.000 x g für 1 min) wurde der Durchfluss verworfen. Die weitere Aufreinigung mit den erforderlichen Waschschritten und der Elution erfolgte wie unter 2.2.8.2 beschrieben.

2.2.8.5 Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase

Im Ligationansatz können sich die kompatiblen Enden der einzelnen geschnittenen Fragmente durch sequenzspezifische Basenpaarung zusammenlagern. Die Ligation des Zucker-Phosphatrückgrades erfolgt durch T4-DNA-Ligase in einer ATP-abhängigen Reaktion. Für die Ligation wurden ca. 50 ng Vektor-DNA eingesetzt und eine Gesamt-DNA-Menge von ca. 100 ng DNA nicht überschritten. Die DNA-Fragmente *insert* und Vektor wurden in einem molaren Verhältnis von 5:1 eingesetzt. Um dies zu gewährleisten, wurde eine semiquantitative DNA-Konzentrationsbestimmung der Eluate durchgeführt. Bei bekannter DNA-Fragmentlänge und Konzentration ließ sich die molare Konzentration [fmol/µl] wie folgt berechnen:

$$\text{Molare Konzentration [fmol/}\mu\text{l]} = \frac{\text{Konzentration [ng/}\mu\text{l]} \times 10^6}{\text{Länge [bp]} \times 649 \text{ [pg/ fmol bp]}}$$

Für die Ligation wurde die Reaktion wie der Tabelle 2.7 zu entnehmen angesetzt und für 10 min bei RT inkubiert. Nach Beendigung wurden 5-8 μl des Ligationsansatzes direkt für eine Transformation von *E. coli* DH5 α eingesetzt.

Komponente	Volumen
10 x T4-DNA-Ligase-Puffer	2,0 μl
T4-DNA-Ligase	1,0 μl
Vektor-DNA (50 ng)	1-2 μl
<i>insert</i> -DNA	2-4 μl
A.bidest.	ad 20 μl

Tabelle 2.7: Zusammensetzung eines Ligationsansatzes.

2.2.8.6 Gateway-Klonierung vom α -Tocopherol-assoziierten Protein (TAP)

Die Gateway-Technologie (Invitrogen) basiert auf dem Rekombinationssystem des Bakteriophagen Lambda. Es ermöglicht die sequenzspezifische Integration des Phagengenoms in das bakterielle Wirtsgenom und deren erneute Separation (lytische und lysogene Phase). Die Integration beruht auf zwei homologen DNA-Bereichen auf dem Phagengenom (attP-Stelle) und auf dem Bakteriengenom (attB-Stelle). Die Reaktion erfordert eine phagencodierte Integrase und den vom Bakterium codierten *Integration-Host-Factor* (IHF). Es entstehen die attR und attL-Sequenzen, die das Phagengenom flankieren. Der Integrationsmechanismus wird bei der Gateway-Klonierung genutzt, um ein PCR-Produkt in einen Ausgangsvektor (z.B. pDONR221) einzufügen. In der BP-Reaktion rekombinieren die attP-Stellen des Vektors mit den in der PCR-angefügten attB-Stellen des *inserts*. Durch die Verwendung zweier leicht modifizierter attP- und attB-Stellen wird die richtige Orientierung des *inserts* sichergestellt. Bei der Rekombination entstehen aus den attP/attB- die attL-Sequenzen.

Außerdem wird durch die Rekombination das *ccdB*-Gen des Vektors durch das PCR-*insert* ersetzt. Das *ccdB*-Gen codiert eine Helikase, die bei Überexpression zum Absterben des Bakteriums führt, d.h. Bakterien, die mit dem nicht rekombinierten Ursprungsvektor transformiert werden, sind nicht lebensfähig. Die Selektion der rekombinierten Konstrukte erfolgt durch Kanamycin.

Bei der Exzision des Phagengenoms aus Bakterien rekombinieren die attL und attR-Stellen mit Hilfe von Integrase, IHF und einer Excisionase miteinander und setzen so das Phagengenom frei. Dieser Prozess wird in der Gateway-Klonierung genutzt, um verschiedene Expressionsvektoren herzustellen. In der LR-Reaktion rekombinieren die attL-Stellen des Donorkonstruktes mit den attR-Stellen der Expressionsvektoren, wobei wiederum das *ccdB*-Gen des Expressionsvektors z.B. pcDNA-DEST40 durch das *insert* vertauscht wird. Durch die Verwendung von zwei verschiedenen attL- und attR-Stellen bleibt auch in diesem Fall die richtige Orientierung des *inserts* erhalten. Die Selektion positiver Klone erfolgt hier über Ampicillin.

5`-3`	Gateway Klonierungsprimer für TAP
forward	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT TCGAAGGAGATAGAACC <u>ATGAGCGGCAGAGTCGGCGATC</u>
reverse	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT CTTT CGGGGTGCCTGCC

Tabelle 2.8: Primerdesign für die Gateway-Klonierung von TAP.

Die fett hervorgehobenen Nukleotide entsprechen empfohlenen Sequenzen für eine verstärkte Translation bzw. werden für die Einhaltung des Leserahmens benötigt. Die kursiv unterlegten Sequenzen enthalten die attB-Rekombinationsstellen. Die anderen Nukleotide sind TAP-spezifischen Basen, das Startcodon ist unterstrichen.

Nach Amplifikation des *inserts* mittels PCR und Aufreinigung über Agarosegelelektrophorese wurde eine BP-Reaktion durchgeführt.

Komponente	Volumen
Eluat aus PCR-Gelaufreinigung	9,0 µl
pDONR221-Vektor (150 ng/µl)	2,0 µl
5 x BP Clonase Reaction Buffer	4,0 µl
TE-Puffer (pH 8)	ad 16 µl

Tabelle 2.9: Zusammensetzung einer BP-Reaktion.

Der Reaktionsansatz wurde entsprechend der Tabelle 2.9 zusammenpipettiert und für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 µl Proteinase K und Inkubation bei 37°C für 10 min gestoppt. Die Hitzeschocktransformation erfolgte wie unter 2.2.8.8 beschrieben durch Zugabe von 13 µl des BP-Reaktionsmixes zu kompetenten Bakterien. Nach der Identifizierung positiver Klone durch Restriktion (2.2.8.9) wurde eine LR-Reaktion durchgeführt.

Komponente	Volumen
pDONR221-TAP (150 ng)	1-10 µl
pcDNA-DEST40-Vektor (300 ng)	2,0 µl
5 x LR Clonase Reaction Buffer	4,0 µl
TE-Puffer (pH 8)	ad 16 µl

Tabelle 2.10: Zusammensetzung einer LR-Reaktion.

Dafür wurden 150 ng des Ausgangsvektors pDONR221-TAP und 300 ng des Zielvektors pcDNA-DEST40 eingesetzt. Nach Zugabe des Enzymmixes wurden die Proben für 1 h bei RT inkubiert und anschließend die Reaktion durch Hinzufügen von 2 µl Proteinase K und Inkubation für 10 min bei 37°C beendet.

2.2.8.7 Herstellung kompetenter Bakterien

Wenn Bakterien mit bivalenten Kationen und Kälte vorbehandelt werden, nehmen sie leichter aus der Umgebung freie DNA auf (CaCl₂-Methode (Inoue *et al.* 1990)). Zur Herstellung kompetenter Zellen wurde aus einem Zellvorrat *Escherichia coli* DH5 α ein Verdünnungsausstrich auf einer Agarplatte ohne Antibiotika angelegt und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurde eine Kolonie gepickt und in 2 ml antibiotikafreies LB-Medium überführt. Nach erneuter Übernachtskultur wurde die Kultur 1:100 verdünnt (Endvolumen 100 ml) und bis zu einer OD_{600nm} von 0,375 inkubiert. Die Suspension wurde auf 50-ml-Röhrchen aufgeteilt und für 10 min auf Eis gestellt. Danach wurden die Zellen abzentrifugiert (7 min, 3.000 x g, 4°C) und die Pellets in je 2 ml 100 mM CaCl₂ resuspendiert. Die Proben wurden gepoolt und im Kühlschrank bei 4°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Suspension mit Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 15% (v/v) versetzt und aliquotiert. Die 150- μ l-Aliquots wurden schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.8.8 Hitzeschock-Transformation

Für die Transformation der Ligationsansätze wurden kompetente *E. coli* DH5 α Zellen auf Eis aufgetaut. Dann wurden 1-13 μ l des Ligations- bzw. Rekombinationsansatzes oder bei einer Retransformation die Zugabe von 50 ng Plasmid-DNA zugegeben. Die Zellen wurden mit der DNA für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend einer Hitzeschockbehandlung bei 42°C für 60 s unterzogen. Danach wurden die Bakterien für 1 min auf Eis abgekühlt und im Anschluss in 450 μ l vorgewärmtem SOCS-Medium ohne Antibiotikum aufgenommen. Das Reaktionsgefäß mit den Bakterien wurde in horizontaler Lage für eine Stunde bei 37°C im Inkubator geschüttelt. 20 μ l bzw. 100 μ l des Ansatzes wurden auf LB-Agarplatten mit Antibiotikum (dem Selektionsmarker entsprechend) ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

2.2.8.9 Identifizierung positiver Klone

Zur Analyse der Konstrukte in den unter Selektionsbedingungen gewachsenen Bakterienkolonien wurden Plasmide isoliert, die mittels Restriktion auf Anwesenheit des *inserts* getestet wurden. Die Plasmidisolierung wurde mit Hilfe des QIAPrep Miniprep Kits (Qiagen) durchgeführt. Das Prinzip beruht auf alkalischer Lyse, wobei die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen durch den stark alkalischen pH-Wert gelöst werden. Bei der genomischen DNA lösen sich dabei die Einzelstränge voneinander und die DNA wird vollständig denaturiert. Die supercoiled-Konformation der Plasmid-DNA bewirkt, dass sich die Einzelstränge nach Lösen in räumlicher Nähe befinden. Nach Neutralisation können die Plasmid-DNA-Einzelstränge korrekt renaturieren, während die genomischen DNA-Einzelstränge nicht sequenzkonform hybridisieren. Durch einen Zentrifugationsschritt kann die genomische DNA zusammen mit den Zelltrümmern pelletiert und aus der Lösung entfernt werden.

Von den Transformationsplatten wurden Klone mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt und 2-ml-Kulturen mit antibiotikahaltigem LB-Medium angelegt. Am nächsten Morgen wurden 1,5 ml der Kultur

abgenommen und die Bakterien abzentrifugiert (5 min bei 10.000 x g). Das Pellet wurde in 250 µl RNase-A-haltigem Lysepuffer P1 resuspendiert und durch Zugabe von 250 µl P2-Puffer lysiert. Die Neutralisierung erfolgte durch Hinzufügen von 350 µl N3-Puffer und mehrfaches Invertieren des Reaktionsgefäßes. Danach wurden die Zelltrümmer mit der genomischen DNA abzentrifugiert (10 min bei 10.000 x g). Der plasmidhaltige Überstand wurde auf eine QIAprep-Säule aufgetragen und zweimal durch Zentrifugation (1 min bei 10.000 x g) mit 750 µl PE-Puffer gewaschen. Um die Membran von Pufferresten zu befreien und anschließend zu trocknen, folgten zwei weitere Zentrifugationsschritte 1 min bei 10.000 x g). Zur Elution wurden 30 µl EB-Puffer auf die Säule gegeben und die Plasmid-DNA nach 5 min Inkubation durch Zentrifugation eluiert. Anschließend wurden die isolierten Plasmide mittels Restriktionsverdau auf die Anwesenheit des *inserts* überprüft und von ausgesuchten Klonen die Sequenz verifiziert. Die Sequenzierung erfolgte mittels „*Taq-Cycle-Sequencing*“, einer Modifikation der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger et al., 1977). Hierfür wurde das ABI PRISM Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin Elmer, Weiterstadt) benutzt. Die Analyse wurde auf einem ABI PRISM 3730 Kapillarsequenzierer (Perkin Elmer) durchgeführt.

2.2.8.10 Anlegen von Glycerol-Stocks

Von Vektoren mit korrektem *insert* wurden zum Anlegen von Glycerol-Stocks Retransformationen durchgeführt (2.2.8.8). Von der Transformationsplatte wurde mit einer sterilen Pipettenspitze ein Klon gepickt und in 2 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurde die Kultur 1:100 verdünnt (Endvolumen: 5 ml) und bei 37°C bis zu einer OD_{600nm} von 1,0 expandiert. Von dieser Zellsuspension wurden 4 ml der Kultur mit 1 ml Glycerol vermischt, anschließend aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

2.2.8.11 Präparative Isolierung von Plasmid-DNA

Für Anwendungen, die größere Plasmidmengen benötigen, wurden Plasmide mit dem QIAfilter Maxiprep Kit (Qiagen) isoliert. Das Prinzip und die Durchführung entsprechen der Plasmidaufreinigung mittels Plasmid Mini Kit wie unter 2.2.8.9 beschrieben, nur wurden entsprechend größere Puffervolumina und einige modifizierte Puffer eingesetzt. Für die präparative Aufreinigung wurde eine 200-ml-LB-Kultur mit dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft und über Nacht expandiert. Die Bakterien wurden abzentrifugiert (15 min, 6.000 x g, 4°C) und das Zellpellet für die Plasmidisolierung eingesetzt.

Das Zellpellet wurde in 10 ml Puffer P1 resuspendiert und die Zellen durch Zugabe von 10 ml Puffer P2 lysiert. Nach Neutralisierung durch 10 ml Puffer P3 folgte eine Präzipitation der DNA für 20 min auf Eis. Nach Reinigung des Präzipitats durch Zentrifugation (15 min, 6.000 x g bei 4°C) und Filtrierung durch eine QIA-Maxi-Cartridge wurde der Durchfluss auf eine mit QBT-Puffer äquilibrierte QIAGEN-tip-500-Säule pipettiert und durchlief die Säule aufgrund der Gravitation. Die Plasmid-DNA wurde dabei an die Säulenmembran gebunden und anschließend zweimal mit je 30 ml QC gewaschen. Die DNA

wurde mit 15 ml QF-Puffer eluiert. Die DNA wurde anschließend durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol bei RT gefällt und durch Zentrifugation (15.000 x g, 30 min, 4°C) pelletiert. Das Pellet wurde in 5 ml 70% (v/v) Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 200 µl TE (pH 8,0) resuspendiert.

2.2.9 Ortsgerichtete Mutagenese

Das Konstrukt pDEST40-TAP^(ΔGTPase) wurde durch ortsgerechte Mutagenese des Wildtyp-Konstruktes pDEST40-TAP hergestellt. Das QuikChange Multi System II Kit (Stratagene, Heidelberg) ermöglicht mittels PCR und sequenzspezifischer Primer die Einführung von mehreren Mutationen in einem Arbeitsgang. Die verwendeten Primer binden alle am selben Strang des *template*-Konstruktes und sind 5'-phosphoryliert. Sie überspannen mit einer Länge von 29-33 bp die zu mutierende Region, wobei das zu mutierende Codon sich in der Mitte des Primers befindet und zu beiden Seiten durch sequenztreue Abschnitte flankiert wird. Die *pfuTurbo* DNA-Polymerase synthetisiert die Stränge zwischen den Primern, die verbleibenden Lücken im DNA-Phosphatrückgrad zwischen den einzelnen Abschnitten werden durch im Reaktionspuffer vorhandene Enzyme geschlossen. Am Ende der PCR liegen verschiedene Produkte vor: ein mutierter Einzelstrang, ein nicht mutierter Doppelstrang und ein Hybrid-Doppelstrang aus einem mutierten und einem Ursprungsstrang. In einem zweiten Schritt werden die methylierten und hemimethylierten Plasmide durch einen Restriktionsverdau mit *Dpn* I aus dem Ansatz entfernt, so dass nur der mutierte, nicht-methylierte Einzelstrang in Reaktionsansatz verbleibt. Dieser Einzelstrang wird mittels Hitzeschock in *E. coli* XL10-Gold ultrakompetente Zellen transformiert.

Primer	Sequenz 5`-3`
TAP_SDM_D92A	①-GTATGTGTGGCTAT <u>GCC</u> CTGGATGGCTGC
TAP_SDM_D101A	①-CCCAGTCTGGTAC <u>GCC</u> CATAATTGGACCTCTG
TAP_SDM_D154A	①-CCATCACCATAATTTAT <u>GCC</u> TGCGAGGGGCTTG

Tabelle 2.11: Primerdesign für die ortsgerechte Mutagenese.

Die Lage der zu mutierenden Codons ist markiert, der hervorgehobene Buchstabe entspricht dem ausgetauschten Nukleotid. Für das Konstrukt pDEST40-TAP^(ΔGTPase) wurden drei Mutationen eingeführt. Die Asparaginsäure an den Positionen 92, 101 und 154 wurde durch Alanin ersetzt.

Komponente	Volumen	Temperatur	Dauer	
10 x QuikChange Multi Reaction Buffer	2,5 µl	95°C	1 min	
QuikSolution	0,75 µl	95°C	1 min	30 x Zyklen
pcDNA-DEST40-TAP (100 ng)	1,0 µl	55°C	1 min	
Mutagenese-Primer (je 100 ng)	1,0 µl	65°C	14 min	
dNTP-Mix	1,0 µl	10°C	∞	
QuikChange Multi Enzyme Blend	1,0 µl			
A.bidest.	ad 25 µl			

Tabelle 2.12: Reaktionsansatz für die Mutagenese.
Die linke Tabelle zeigt die Zusammensetzung der PCR-Reaktion. Rechts ist das PCR-Programm dargestellt. Die Elongationszeit betrug 2 min pro Kilobase.

Für die Durchführung der PCR wurde der Reaktionsansatz wie in Tabelle 2.12 beschrieben zusammenpipettiert. Nach Beendigung der Reaktion wurden die Proben auf 10°C abgekühlt. Die methylierten bzw. hemimethylierten DNA-Stränge wurden durch Zugabe von 1 µl *Dpn I* (10 U/µl) und Inkubation bei 37°C für 1 h verdaut. Für die Transformation der im Kit enthaltenen ultrakompetenten Bakterien (*E. coli* XL10 Gold) wurden die Zellen auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe von 2 µl XL10-Gold β-Mercaptoethanol-Mix auf 45 µl Zellsuspension wurden die Zellen für 10 min auf Eis inkubiert, wobei der Ansatz alle 2 min vorsichtig gemischt wurde. Anschließend wurden die Zellen mit 1,5 µl der *Dpn I*-behandelten Mutagenese-Ansätze mittels Hitzeschock (2.2.8.8) transformiert.

2.3 Biochemische Arbeitsmethoden

2.3.1 Herstellung denaturierter Proteinlysate

Für die Herstellung denaturierter Proteinlysate wurde ein SDS-haltiger Lysepuffer mit 1% Phosphatase Inhibitor Cocktail II (Sigma) verwendet. HeLa-Zellen wurden mit einer Zelldichte von $2-3 \times 10^5$ Zellen/well in 6-well-Platten ausgesät und über Nacht kultiviert. Darauf folgten die vorgesehenen Behandlungen (Transfektion und/oder Stimulation). Nach der Ernte wurde das Zellpellet in Abhängigkeit von der Größe in 50-100 µl denaturierenden Lysepuffer aufgenommen. Danach wurden die Proben durch 5 min bei 100°C und eine Ultraschallbehandlung von zweimal 5 s (Sonopuls, Bandelin) weiter aufgearbeitet. Die Proben wurden permanent auf Eis gehalten. Anschließend wurden die unlöslichen Zelltrümmer abzentrifugiert (15 min, 16.000 x g bei 4°C) und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Abnahme eines Aliquots für die Proteinkonzentrationsbestimmung wurden die denaturierten Proteinlysate bis zur weiteren Verwendung bei -20°C für längere Lagerung bei -80°C eingefroren.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Bradford-Methode (Bradford, 1976) mittels DC (Detergent Compatible) Protein Assay (BIORAD). Für die Standardreihe wurde eine serielle Verdünnung aus einer 10 mg/ml BSA-Lösung hergestellt, als Leerwert diente A.bidest. Für die

Bestimmung wurden die Proben 1:2 verdünnt und in Duplikaten im 96-well Format ELISA-Readers (Opsys MR, Dynex) gemessen.

2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mittels SDS-PAGE (Laemmli et al., 1970) werden Proteine nach ihrer Größe unabhängig von ihrer ursprünglichen Ladung aufgetrennt. Das anionische Detergenz Natrium-dodecyl-sulfat (SDS) bindet an die Proteine und überlagert durch seine starke negative Ladung die native Ladung, so dass die Proteine nur in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht durch das Polyacrylamidgel wandern.

Durch Verwendung eines pH-Gradienten zwischen Trenn- und Sammelgel werden die Proteinproben fokussiert und laufen synchron in das Trenngel ein, in dem die Auftrennung nach dem Molekulargewicht erfolgt.

Die Herstellung eines Polyacrylamidgeles erfolgt über Kopolymerisation von Acrylamidmonomeren mit vernetzendem Bisacrylamid in einem Verhältnis von 30:0,8 (w/v). Die verwendete Acrylamid-Konzentration bestimmt die Porengröße und richtet sich nach dem Größenbereich der aufzutrennenden Proteine. Die Zugabe des Radikalstarters Ammoniumpersulfat (APS) und des Katalysators TEMED löst die Polymerisation des Gels aus.

A					B	
Proteingröße des Zielproteins [kDa]	10-60	20-100	30-120	50-200	Sammelgel: 3% Acrylamid	
Acrylamid	15%	12%	10%	7,5%	(Bis)Acrylamid	0,3 ml
(Bis)Acrylamid	5 ml	4,15 ml	3,5 ml	2,5 ml	4 x Sammelgelpuffer	0,75 ml
4 x Trenngelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	A.bidest.	1,95 ml
A.bidest.	2,5 ml	3,5 ml	4,15 ml	5 ml	TEMED	3 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10% (v/w) APS	30 µl
10% (v/w) APS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl		

Tabelle 2.13: Zusammensetzung des Trenn- (A) und des Sammelgels (B).

Die Acrylamidkonzentration des Trenngels richtete sich nach der Proteingröße des Zielproteins, während die Konzentration des Sammelgels immer 3% (w/v) betrug.

Die denaturierten Proteinlysate wurden mit A.bidest. auf die gleiche Proteinkonzentration eingestellt und mit 0,2 Volumen 5 x SDS sample buffer versetzt und anschließend für 3 min bei 95°C erhitzt und bis zum Auftragen auf das Gel auf Eis gekühlt. Pro Spur wurden 10-15 µg Protein aufgetragen und zusammen mit 5 µl eines Proteinstandards (Prestained SDS-PAGE Standard Broad Range, BIORAD) elektrophoretisch aufgetrennt. Nach einem 30-minütigen Sammellauf bei 15 mA pro Gel schloss sich der Trennlauf bei 30 mA an (Spannungsquelle: Power Pac 1000, BIORAD). Die Dauer des Trennlaufes betrug je nach der Acrylamidkonzentration des Gels und nach der Größe des zu detektierenden Proteins zwischen 45 min und 2 h.

2.3.3 Elektrotransfer von Proteinen (Westernblot)

Beim Westernblot werden die Proteine aus dem Acrylamidgel elektrophoretisch auf eine Kunststoffmembran z.B. Polyvinylidendifluorid (PVDF) transferiert und sind so für anschließende Immundetektion durch Antikörper zugänglich (Towin et al., 1979). Der Semi-dry-Blot wurde unter Verwendung von drei verschiedenen Puffern (Kathodenpuffer, Anodenpuffer I und Anodenpuffer II) durchgeführt. Die PVDF-Membran (Immun-Blot PVDF Membrane, BIORAD) wurde 10 s in Methanol aktiviert, anschließend 5 min in A.bidest. gespült und danach 5 min in Anodenpuffer 1 äquilibriert. Jeweils ein Filterpapier (Extra Thick Filter Paper, BIORAD) wurde in einem der drei Blotpuffer getränkt. Nach Ende des Gellaufs wurde das Sammelgel verworfen. Das Trenngel wurde luftblasenfrei mit dem Kathodenpuffer-getränkten Filterpapier bedeckt. Das „Blot-Sandwich“ wurde nach Umdrehen des Gels durch blasenfreies Auflegen der PVDF-Membran und der Filterpapiere vervollständigt, die mit den beiden Anodenpuffern I und II getränkt waren. Der Transfer der Proteine auf die PVDF-Membran erfolgte bei 300 W und 11 mA/cm^2 (Power Pac 1000, BIORAD) je nach Größe des Zielproteins für 1-2 h mit Hilfe einer Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (BIORAD).

2.3.4 Immundetektion von Proteinen

Der Nachweis von immobilisierten Proteine erfolgt über spezifische primäre Antikörper. Die Bindung des primären Antikörpers an das Epitop wird über einen enzym-gekoppelten sekundären Antikörper nachgewiesen. Das in dieser Arbeit verwendete Enzym HRP (*horseradish peroxidase*) katalysiert bei entsprechenden Substraten eine chemilumineszente Reaktion.

Die PVDF-Membran wurde einmal mit TTBS gewaschen und anschließend in 3-5% (w/v) Magermilchpulver (MMP) bzw. BSA in TTBS für eine Stunde bei RT inkubiert, um die nicht mit Protein aus dem Gel bedeckten Bereichen der Membran mit Protein zu bedecken. Dadurch wird eine unspezifische Bindung der Antikörper an der Membran verringert. Im Anschluss wurde der Blot über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Membran 3 x 15 min in TTBS gewaschen und danach für 30 min mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Die Verdünnung der Antikörper erfolgte in 3-5 % (w/v) MMP bzw. BSA in TTBS mit einer Verdünnung von 1:500 bis 1:10.000. Nach 3 x Waschen in TTBS wurde der Blot mit frisch angesetztem ECL-Reagenz (ECL PLUS, Amersham Biosciences, Freiburg) überschichtet und 3 min bei RT inkubiert. Vor dem Belichten des Röntgenfilms (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences) wurde die Membran für ca. 4 min getrocknet. Die Belichtungszeit betrug zwischen 10 s und 10 min. Die Filme wurden maschinell entwickelt (Curix 60, GFA, Leverkusen).

Für die Weiterverwendung der Membran wurden die gebundenen Antikörper durch „Strippen“ von der Membran entfernt. So konnte die Membran mehrfach für verschiedene Immundetektionen benutzt werden und z.B. Auftragsmengen kontrolliert werden. Das Strippen erfolgte durch Inkubation der PVDF-Membran für 45 min bei 55°C in Stripping-Puffer, gefolgt von mehrmaligem Waschen in TTBS und Wiederholung des Inkubationsprozesses mit Antikörpern, die entweder gegen die

unphosphorylierte Form des Zielproteins oder gegen das *Housekeeping*-Gen β -Actin gerichtet waren. Eine vollständige Liste der hier benutzten Antikörper mit Angaben zu Verdünnung, Ursprungsspezies und Bezugsfirmen findet sich im Anhang.

2.3.5 Herstellung von Lysaten für HPLC-Analyse

Für die Messung des Vitamin E-Gehaltes mittels HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) wurden HeLa-Zellen mit einer Zelldichte von $1,5 \times 10^6$ Zellen/*well* in 10-cm-Schalen ausgesät und im Brutschrank über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen entweder für 24 h mit $25 \mu\text{M}$ oder $50 \mu\text{M}$ α -Tocopherol inkubiert oder mit TAP bzw. dem leeren Vektor transfiziert und nach 6 h mit Vitamin E supplementiert und für 16 h weiterkultiviert.

Nach der Ernte wurde das Zellpellet in $400 \mu\text{l}$ HPLC-Lysepuffer aufgenommen und die Proben bei -80°C gelagert. Die Aufbereitung der Lysate erfolgte durch Zugabe von $300 \mu\text{l}$ n-Heptan und Inkubation bei -20°C für 24 h. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (15 min, $16.000 \times g$, 4°C) und der Überstand für die Analyse (RF-10XL Fluorescence Detector, Shimadzu) eingesetzt.

2.4 FACS

Die Integrin-Oberflächenexpression wurde im FACS (*Fluorescence activated cell sorter*) analysiert. Das FACS gestattet die gleichzeitige Messung von mehreren Zellparametern. Durch Kombination von Laser und Photodetektoren für Streulicht und Fluoreszenz können Aussagen über Morphologie und immunologische Eigenschaften von Zellen gemacht werden. Die zu untersuchenden Zellen werden durch eine Kapillare angesogen und durch eine relativ hohe Beschleunigung vereinzelt, so dass fast jede Zelle einzeln morphologisch erfasst wird. Das senkrecht zur Flussebene einfallende Laserlicht (488 nm) wird zunächst durch die Zelle gestreut und von Photodetektoren gemessen. Das Vorwärtsstreulicht (*forward light scatter* = FSC) gibt Auskunft über Zellgröße, das Seitwärtsstreulicht (*side light scatter* = SSC) ist ein Maß für die intrazelluläre Beschaffenheit (Granularität, Dichte, Größe). Außerdem regt der Laserstrahl Fluoreszenzfarbstoffe, in dieser Arbeit das grün fluoreszierende *green fluorescence protein* (GFP) bzw. das orange fluoreszierende Phycoerythrin (PE) zur Emission von Photonen an, wobei die Fluoreszenzintensität ein Maß für die Menge an gebundenen fluoreszenzmarkierten Antikörpern ist. Die optischen Signale werden für jede Zelle quantifiziert und proportional zur Lichtintensität in elektrische Impulse umgewandelt.

Für die Analyse der Oberflächenexpression verschiedener Integrine wurden HeLa-Zellen oder THP-1 Zellen mit einer Zelldichte von 300.000 Zellen/*well* in 6-*well*-Platten ausgesät und mit verschiedenen Vitamin E-Formen inkubiert. Nach 16 h Kultur wurden die Zellen für 24 h mit 20 ng/ml Interleukin- 1β (IL- 1β , Invitrogen) stimuliert.

Bei Transfektionsexperimenten erfolgte die Aussaat mit einer Zelldichte von 200.000 Zellen/*well*. Die Zellen wurden über Nacht kultiviert, am nächsten Tag mit Vitamin E supplementiert und transfiziert. Nach 16-stündiger Inkubationszeit wurden die Zellen für 24 h mit IL- 1β stimuliert.

Nach der Ernte wurden die Zellen in 250 µl FACS-Puffer (PBS und 0.1% (w/v) Natriumazid) mit 5 µg polyklonalem Primärantikörper aufgenommen und für 15 min bei RT inkubiert. Nach einem Waschschrift, bestehend aus Verdünnen der Zellsuspension mit 1 ml FACS-Puffer, Zentrifugation (1.800 x g, 5 min) und vorsichtigem Abheben des Überstandes, wurden die Zellen mit 250 µl fluoreszenzmarkiertem Sekundärantikörper gefärbt. Um das Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes zu vermeiden, wurde die 15-minütige Inkubation im Dunkeln durchgeführt. Es folgte ein weiterer Waschschrift (s.o.). Für die FACS-Messung wurden die Zellen in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen. Jedes Experiment wurde als Doppelansatz durchgeführt. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die nur mit dem Sekundärantikörper behandelt worden waren. Bei den FACS-Messungen (FACScalibur, Becton Dickinson) wurden die ersten 5.000 Zellen verworfen, und dann 10.000 Zellen bei einer Fließgeschwindigkeit von 200-300 Zellen/Sekunde analysiert. Die Auswertung erfolgte mit der Software CellQuest pro. Der ermittelte geometrische Mittelwert (*geo mean*) entspricht hierbei der Oberflächenexpression.

2.5 ELISA

Zur Detektion der löslichen Proteine MCP-1 und TGF-β1 im Zellkulturüberstand wurden ELISAs (*enzyme linked immunosorbent assay*) mit Hilfe von ELISA Kits (Invitogen) durchgeführt. Das Prinzip des ELISA beruht auf der Immobilisierung des Antigens durch einen an eine Oberfläche gebundenen spezifischen Antikörper und einem Antigennachweis durch weitere Antikörperbindung. Dafür wird ein weiterer spezifischer Primärantikörper eingesetzt, der ein anderes Epitop des Antigens erkennt, und der seinerseits von einem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper erkannt wird. Die Peroxidase setzt eine Farbstoffvorstufe zu einem kolorimetrisch messbaren Farbstoff um.

Die HeLa-Zellen wurden mit einer Dichte von 200.000/*well* in einer 6-*well*-Platte ausgesät und über Nacht kultiviert. Am nächsten Morgen erfolgte ein Mediumwechsel für die Inkubation mit verschiedenen Vitamin E-Formen. Nach 24 h wurden die Zellen mit 20 ng/ml IL-1β für weitere 24 h stimuliert. Jedes Experiment wurde als Doppelansatz durchgeführt. Nach Ablauf der Stimulationszeit wurde der Zellkulturüberstand abgehoben und durch Zentrifugation (16.000 x g, 15 min, 4°C) von Zelltrümmern gereinigt. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Der ELISA wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Bestimmung der optischen Dichte (OD) wurde bei 450 nm mit Hilfe eines *ELISA-Readers* (Opsys MR, Dynex) ermittelt und die Messwerte in Prozent der unstimulierten Kontrollen wiedergegeben.

2.6 Reporter-Gen-Assays

Für die Quantifizierung der Aktivierung verschiedener Signalwege sowie der proximalen Promotoraktivität von ICAM-1 und ITGB2 wurden Reporter-Gen-Assays durchgeführt. Das Prinzip der Reporter-Gen-Assays beruht auf der Co-Transfektion von zwei Reporter-Luziferasegenen, die von verschiedenen Promotoren kontrolliert werden. Die *Firefly*-Luziferase stammt aus dem Glühwürmchen

(*Photinus pyralis*) und ist unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors. Der Kontrollvektor pHRL-TK codiert für die *Renilla*-Luziferase aus dem marinen Cnidarier *Renilla reniformis* unter einem moderat konstitutiven Promoter (Thymidinkinase-Promoter) und wird zur Normalisierung der Transfektionseffizienz eingesetzt. Da die *Firefly*-Luziferase und die *Renilla*-Luziferase unterschiedliche Substrate für die Lumineszenzreaktion benötigen, kann in einem Ansatz die Expression der beiden Luziferasen hintereinander gemessen werden. Für die Messungen wurde der *Dual-Luciferase-Assay* (Promega, München) eingesetzt, der nach den Angaben des Herstellers durchgeführt wurde.

Um den Einfluss von verschiedenen Vitamin E-Derivaten und von TAP-Überexpression auf den NFκB-Signalweg, auf Hitzeschock-Signalwege sowie auf die proximalen Promotoren von ICAM-1 und ITGB2 zu untersuchen, wurde ein cis-Reportergen-Assay verwendet. Die eingesetzten p-Luc-Vektoren pNFκB-Luc und pHSE-Luc (Clontech) codieren für die *Firefly*-Luziferase unter einem Minimalpromoter mit vier Tandemkopien des NFκB-*consensus-enhancer*-Elements bzw. mit Bindungsstellen für *heat-shock factor* (HSF). Die Aktivierung der Signalwege initiiert die Transkription der *Firefly*-Luziferase, dabei ist die Luziferaseaktivität proportional zur Aktivität des Signalweges. Für die Analyse der proximalen Promotorenaktivität von ICAM-1 und ITGB2 wurde statt der pLuc-Konstrukte die entsprechende DNA-Menge pGL3-ICAM1 bzw. pGL3-ITGB2 verwendet.

Zur Analyse der Aktivierung von Elk-1 wurde ein trans-Reportergen-Assay mit Vektoren des *PathDetekt* (Stratagene) eingesetzt. Für das trans-Reportergensystem werden zwei verschiedene Vektoren für die Detektion der Signalwegsaktivierung benötigt. Der Vektor pFA-Elk1 codiert unter dem konstitutiven CMV-Promotor ein Fusionsprotein aus der Aktivierungsdomäne von Elk-1 und der DNA-bindenden Domäne des aus der Hefe stammenden Transkriptionsfaktors GAL4. Der zweite benötigte Vektor pFR-Luc codiert das *Firefly*-Luziferasegen unter der Kontrolle eines synthetischen Promotors mit einer 5-fachen Wiederholung der GAL4-Bindungsstelle. Phosphorylierung der Aktivierungsdomäne Elk-1 initiiert die Transkription des *Firefly*-Luziferasegens.

Für die Assays wurden HeLa-Zellen mit einer Zellzahl von 15.000 Zellen/*well* in 90 µl RPMI-Medium ohne FCS in einer 96-*well*-Platte ausgesät. Die FCS-Gabe wurde mit der Inkubation von Vitamin E verbunden. Die Zellen wurden über Nacht mit Vitamin E inkubiert und am nächsten Morgen mit Lipofectamine 2000 transfiziert. Die verwendeten DNA-Mengen pro Vektor sind aus der Tabelle 2.14 zu entnehmen. Sechs Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen stimuliert, mit MAPK-Inhibitoren inkubiert oder verblieben unbehandelt. Alle experimentellen Ansätze wurden in Dreifachansätzen durchgeführt.

Vektoren	DNA-Menge [ng/well]	
	cis-Reportergenassay	trans-Reportergenassay
pcDNA-DEST-40 Konstrukte	100	50
pLuc-, pGL3B-Vektoren	24	-
pFA2-Elk1	-	16
pFR-Luc	-	30
pRL-TK	3	4
Gesamtmenge	127	100

Tabelle 2.14: Zusammenstellung der eingesetzten DNA-Mengen für die Transfektion von Reportergenassays.

Nach 18h wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und in 25 μ l *Passive Lysis Buffer* (Promega) lysiert. Die Messung wurde im Luminometer VICTOR light (Perkin Elmer) durchgeführt. Durch automatisierte Zugabe von 50 μ l des Puffers LARII (Promega) wurde die *Firefly*-Luziferaseaktivität nach einer Verzögerung von 2 s für einen Messzeitraum von 10 s gemessen. Durch Zugabe von 50 μ l Stop & Glo-Lösung (Promega) wurde die Substratreaktion gestoppt und die *Renilla*-Luziferaseaktivität bestimmt. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit dem *Firefly*-Vektor ohne Promotor bzw. ohne Aktivierungsdomäne (pFA2-Elk-1) transfiziert waren. Die relative Luziferaseaktivität (RLU) wurde als Quotient aus den Luziferaseaktivitäten von *Firefly* und *Renilla* errechnet.

2.7 Detektion von Zelltod

2.7.1 Quantitative Messung der Zellviabilität

Die Messung der Zellviabilität erfolgte mit Hilfe des CellTiter 96 AQ_{ueous} Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega). Bei diesem nicht-radioaktiven Zellproliferationsassay wird MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-Tetrazolium) durch Dehydrogenaseaktivität zu dem blauen Farbstoff Formazan metabolisiert. Die Formazan-Produktion ist proportional zur Anzahl der lebenden Zellen und kann kolorimetrisch bei 490 nm nachgewiesen werden.

HeLa-Zellen wurden mit einer Zelldichte von 7.000 Zellen/well in einer 96-well-Platte in 90 μ l RPMI ausgesät und durch FCS-Gabe mit 25 μ M bzw. 50 μ M α -Tocopherol supplementiert oder verblieben Vitamin E-defizient. Nach 16-stündiger Inkubation wurden durch Zugabe von 250 μ M H₂O₂ oxidative Stressbedingungen simuliert. Der Zusatz von 0,1% (v/v) des Detergenz Tween-20 diente als Positivkontrolle für Zelltodinduktion. Der MTS-Assay wurde nach 48 h Inkubation durchgeführt. Dafür wurden 20 μ l des frisch hergestellten MTS-Reagenz pro well hinzugefügt und die Zellen für eine weitere Stunde lichtgeschützt im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Mit Hilfe eines *ELISA-Readers* (Opsys MR, Dynex) wurde die OD bei 490 nm bestimmt. Der Anteil überlebender Zellen wurde als Prozentsatz der unbehandelten Zellen berechnet.

2.7.2 Detektion von Apoptose

Zur Detektion von apoptotischem Zelltod wurde die Aktivität der Caspasen 3 und 7 mit Hilfe des Caspase-Glo 3/7 Assays (Promega) ermittelt. Die Reaktionslösung ist ein Lysepuffer zum Zellaufschluss und enthält darüber hinaus ein prolumineszentes Substrat (Pro-Luciferin) sowie eine Luziferase. Bei Anwesenheit von aktiven Caspasen 3 und 7 in der Zelle wird das Pro-Luciferin durch die freigesetzten Caspasen im Lysat gespalten und von der Luziferase umgesetzt. Die resultierende Lumineszenz ist dabei proportional zur Caspaseaktivität.

HeLa-Zellen wurden mit einer Zelldichte von 7.000 Zellen/*well* in einer 96-*well*-Platte ausgesät und über Nacht kultiviert. Die Zugabe von steigenden Wasserstoffperoxid-Konzentrationen induzierte Zelltod durch oxidativen Stress. Nach 4-stündiger Inkubationszeit wurden 50 µl des Zellkulturmediums entfernt und 100 µl Caspase-Glo-Reagenz pro *well* zugegeben. Die folgende 30-minütige Inkubation erfolgte bei RT auf einem Plattenschüttler (Titramax, Heidolph Instruments). Alle experimentellen Ansätze wurden in Dreifachansätzen durchgeführt. Die Messung der Lumineszenz wurde im Luminometer VICTOR light (Perkin Elmer) durchgeführt.

2.8 Detektion von reaktiven Sauerstoffspezies

2.8.1 Quantifizierung von Lipidperoxidation

Zur Bestimmung der Lipidperoxidation wurde Bodipy-C11 (Molecular Probes, Göttingen), ein membraninterkalierender Farbstoff mit oxidationssensitiven Eigenschaften, eingesetzt. Die reduzierte und oxidierte Form des Indikators besitzen unterschiedliche Fluoreszenzeigenschaften. Die reduzierte Form weist eine rote Fluoreszenz auf, die bei 488 nm angeregt und bei 520 nm detektiert wird. Die grüne Fluoreszenz der oxidierten Form wird bei 543 nm angeregt und bei 595 nm gemessen. Eine Quantifizierung des Oxidationsgrades erfolgt über das Verhältnis der Fluoreszenzintensität aus den zwei Wellenlängenbereichen. Dabei führt eine Lipidperoxidation zu einer Erhöhung des Quotienten oxidiert/reduziert.

HeLa-Zellen wurden für die Fluoreszenzmikroskopie auf sterilen Deckgläschen angezogen, die auf den Boden einer 6-*well*-Platte platziert wurden. Die Aussaat erfolgte mit einer Zelldichte von 100.000 Zellen/*well*. Zur Quantifizierung mittels eines Fluoreszenzspektrometers wurden HeLa-Zellen mit 300.000 Zellen/*well* in 6-*well*-Platten ausgesät. Die Zellen wurden über Nacht kultiviert und anschließend für 16 h mit α -Tocopherol inkubiert. Bei TAP-Überexpression wurden die Zellen mit einer Zelldichte von 200.000 Zellen/*well* in 6-*well*-Platten ausgesät und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag folgte die Transfektion mit TAP-Expressionsvektor oder dem leeren Vektor. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und die Zellen mit Vitamin E supplementiert.

Für die Bodipy-Färbung wurden die Zellen mit 1 µM Bodipy im Zellkulturmedium für 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und die Lipidperoxidation durch Zugabe von 80 µM Cuminperoxid (CumOOH) und 80 nM Hämin (als Katalysator) initiiert. Nach einer einstündigen Inkubation wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und die Lipidperoxidation

mittels CLSM (Leica) sowie Fluoreszenzspektrometer (F-4500 Fluorescence Spectrophotometer, Hitachi) detektiert.

2.8.2 Nachweis von intrazellulären ROS

Der Farbstoff DCFH-DA (2',7'-Dichlorofluoreszin-Diazetat, Molecular Probes) wurde zur Detektion von intrazellulären reaktiven Sauerstoff-Spezies (ROS) eingesetzt. DCFH-DA passiert als ungeladenes Molekül die Zellmembran und wird im Zellinneren durch unspezifische, endogene Esterasen zum Fluoreszenz-Farbstoff DCFH (Dichlorofluoreszin) umgesetzt. Die oxidierte Form des Farbstoffes weist eine Fluoreszenz auf, die bei 485 nm angeregt und bei 535 nm detektiert wird. Diese dient zum Nachweis in der Zelle vorhandener ROS, wobei die Fluoreszenzintensität direkt proportional zu der in der Zelle gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies ist. Mit Hilfe dieses Systems lassen sich sowohl die zeitliche und räumliche Bildung von ROS in der Zelle als auch deren Menge zumindest semiquantitativ bestimmen.

HeLa-Zellen wurden mit einer Dichte von 15.000/well in 96-well-Platten ausgesät, entweder in 90 µl Medium mit anschließender FCS-Gabe (10 µl) und Vitamin E-Inkubation oder in 100 µl Medium mit 10% FCS. Am nächsten Tag wurden die Zellen für 30 min mit 25 µM DCFH-DA inkubiert, mit PBS gewaschen und für 30 min in PBS dem Experiment entsprechend stimuliert. Die Vitamin E-supplementierten Zellen wurden mit 250 µM H₂O₂ stimuliert, die Zellen ohne Vitamin E mit verschiedenen Zytokinen oder H₂O₂. Die Fluoreszenzmessung wurde im SpectraFluorPlus (Tecan) durchgeführt.

2.9 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der Daten wurde das Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel verwendet. Die Berechnung der Signifikanzen erfolgte mit Hilfe des doppelseitigen t-Tests für Gauss'sche Normalverteilung. Ein Signifikanzniveau mit einem p -Wert von $p < 0,05$ wurde hierbei als signifikant, $p < 0,01$ als hochsignifikant definiert.

3 ERGEBNISSE

3.1 Herstellung und Charakterisierung des TAP-Expressionsvektors

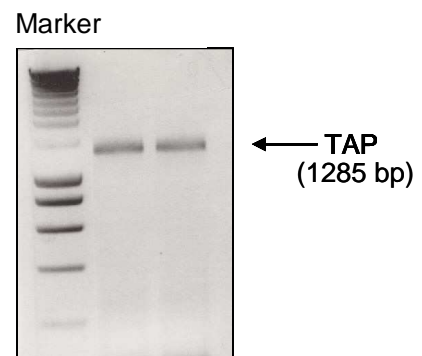
3.1.1 Klonierung des TAP-Expressionplasmids

Für die funktionelle Untersuchung der Rolle des α -Tocopherol-assoziierten Proteins (TAP) in HeLa-Zellen wurde ein Expressionskonstrukt hergestellt. Im Folgenden wird die Herstellung des pcDNA-DEST40-TAP exemplarisch für andere Konstrukte dargestellt. Die Klonierung wurde mit dem Gateway-System (Invitrogen) durchgeführt. Der Unterschied zu anderen Klonierungen liegt darin, dass der Einbau des Inserts über homologe Rekombination erfolgt. Entsprechend entfallen Restriktion und anschließende Ligation.

Als *template* für die Amplifikation der codierenden Sequenz von TAP diente cDNA aus Lebergewebe einer cDNA-Bank (*tissue panel*). Wie aus der Abbildung 3.1 hervorgeht, resultierte aus der PCR ein Amplikon mit der zu erwartenden Länge von 1.285 bp.

Abbildung 3.1: Amplifikation der codierenden Sequenz des TAP.

Mittels PCR wurde die codierende Sequenz von TAP mit einer zu erwartenden Länge von 1.285 bp amplifiziert. Als *template* wurde aus Lebergewebe stammende cDNA eingesetzt.



In der anschließenden BP-Reaktion wurde das PCR-Fragment in den Donorvektor pDONR221 integriert. Für die Reaktion wurden 300 ng aufgereinigtes PCR-Produkt und 150 ng pDONR221 eingesetzt. Im Anschluss der BP-Reaktion wurde eine Hitzeschock-Transformation durchgeführt und der Ansatz ausplattiert. Von den 16 insgesamt entstandenen Kolonien wurde eine Plasmid-DNA-Präparation gemacht. Die Plasmide wurden zur Überprüfung des Inserts einer Restriktion mit *A*/*W**N*I unterworfen. Abbildung 3.2 zeigt das Ergebnis der Restriktion. Die Klone 1, 3, 4, 5 sowie 8, 9 und 10 zeigten die zu erwartenden Banden.

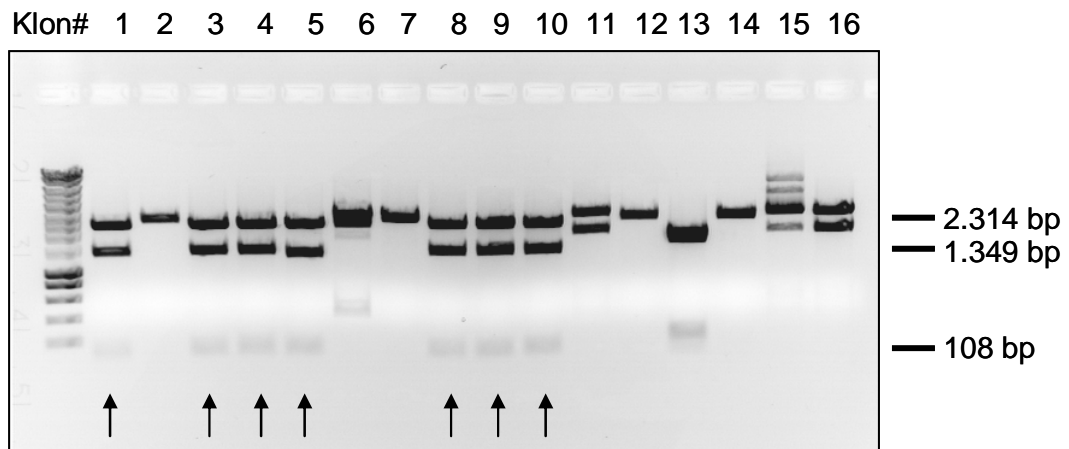


Abbildung 3.2: Restriktion der in der BP-Reaktion entstandenen Klone.

Für die Identifizierung positiver Klone wurde eine Restriktion mit dem Enzym *A/*w*NI* durchgeführt. Insgesamt wurden 3 Fragmente mit folgenden Längen erwartet: 108 bp, 1.349 bp und 2.314 bp. Die positiven Klone sind mit einem Pfeil markiert.

Die Klone 1, 3 und 4 wurden sequenzverifiziert. Die Sequenzierung ergab für den Klon 1 zwei Mutationen, dementsprechend wurde dieser verworfen. Mit dem fehlerfreien Klon 3 wurde eine LR-Reaktion durchgeführt, um das Insert in den Zielvektor pcDNA-DEST40 zu integrieren. Der pcDNA-DEST40-Vektor ermöglicht eine starke Proteinexpression in Säugerzellen unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Von den entstandenen Kolonien wurden acht isoliert und eine Übernachtskultur für eine DNA-Aufreinigung angelegt. Eine Restriktion mit *A/*w*NI* zeigte, dass alle Klone bis auf Klon 4 das gewünschte Insert enthielten (Abbildung 3.3). Aus einer Übernachtskultur des ersten Klons wurde eine präparative DNA-Isolierung durchgeführt.

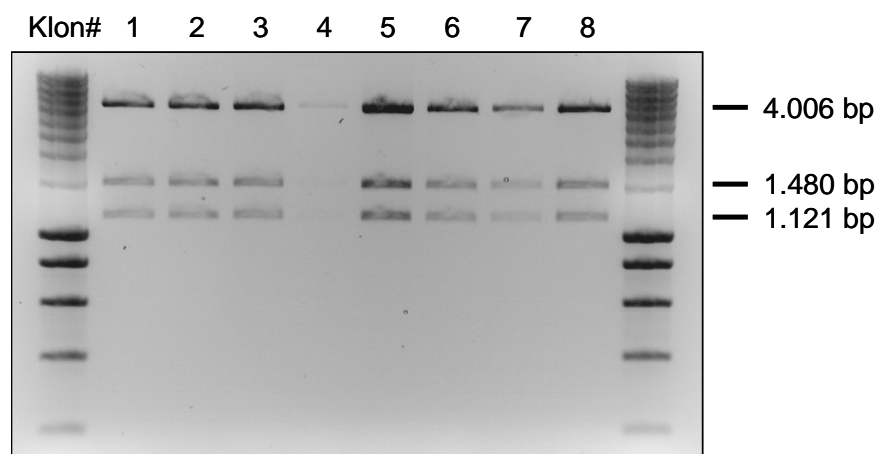


Abbildung 3.3: Restriktion der in der LR-Reaktion entstandenen Klone.

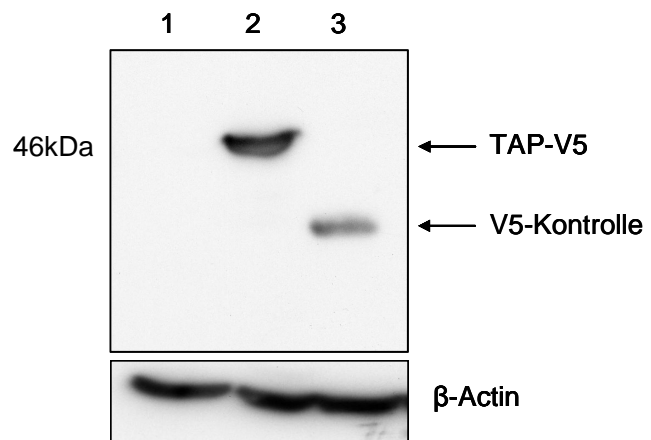
Aus der Restriktion positiver Klone mit *A/*w*NI* resultieren drei Fragmente mit 4.006 bp, 1.480 bp und 1.121 bp Länge.

3.1.2 Funktionelle Charakterisierung des TAP-Expressionsvektors

Da spezifische Antikörper gegen das humane TAP nicht zur Verfügung standen, konnte die Funktionalität des Konstruktes in transfizierten Zellen nur über zusätzliche Markierungspeptide, sogenannte Tags, nachgewiesen werden. Der pcDNA-DEST40-Vektor enthält vor dem Stop-Codon zwei dieser Peptide, das V5-Epitop und ein 6xHis-Epitop, die aufgrund ihrer geringen Größe die biologische Aktivität des Zielproteins nicht beeinflussen und gleichzeitig die Detektierbarkeit durch monoklonale Antikörper ermöglichen. Die Abbildung 3.4 zeigt den Nachweis der TAP-Überexpression in der humanen Zellkultur mittels Westernblot-Detektion des V5-Epitops.

Abbildung 3.4: Nachweis der Überexpression von TAP.

HeLa-Zellen wurden mit den Vektoren pcDNA-DEST40 (Vektorkontrolle, Spur 1), pcDNA-DEST40-TAP (2) und einem pcDNA-DEST40 mit Insert (Positivkontrolle, Spur 3) transfiziert und nach 24 h lysiert. Der Nachweis der Überexpression erfolgte durch Westernblot mit Hilfe eines V5-Epitop-spezifischen Antikörpers. Im Lysat der TAP-transfizierten Zellen wurde ein Signal mit der erwarteten Größe von 46 kDa detektiert (2). Die Färbung mit β -Actin diente als Auftragskontrolle.



3.2 Reaktive Sauerstoffspezies und zelluläre Signalprozesse

3.2.1 Aktivierung von Signaltransduktion durch oxidativen Stress

Oxidativer Stress wurde durch Zugabe von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) zum Zellkulturmedium simuliert. H_2O_2 diffundiert als ungeladenes Molekül durch die Zellmembran und führt zu einem massiven Anstieg der intrazellulären Konzentration von ROS. Um zu überprüfen, ob oxidativer Stress im gewählten Zellkulturmodell Signaltransduktionsprozesse aktivieren konnte, wurden HeLa-Zellen für unterschiedliche Zeitpunkte und mit verschiedenen Konzentrationen von H_2O_2 stimuliert und die Phosphorylierung der MAPK p38 sowie der NF κ B-Untereinheit p65 im Westernblot analysiert.

Abbildung 3.5 zeigt einen Westernblot gegen die phosphorylierte und unphosphorylierte Form von p38. Die Stimulierung mit H_2O_2 erzeugte dosis- und zeitabhängig eine Phosphorylierung von p38 im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

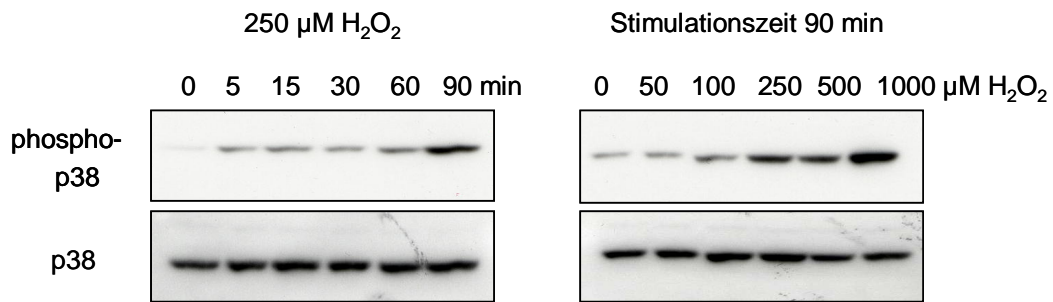


Abbildung 3.5: Nachweis der Phosphorylierung von p38 durch H_2O_2 -Stimulation in HeLa-Zellen. Die Phosphorylierung von p38 wurde durch Westernblot nachgewiesen. Die unphosphorylierte Form von p38 diente als Kontrolle für die aufgetragene Proteinmenge.

Abbildung 3.6 zeigt die Phosphorylierung der NF κ B-Untereinheit p65 im Westernblot. H_2O_2 -Stimulation führte zu einer dosis- und zeitabhängigen Phosphorylierung von p65. Der zeitliche Verlauf der Phosphorylierung verlief biphasisch mit einer Aktivierung nach 5-15 min Stimulation und einer weiteren Aktivierung nach 90 min.

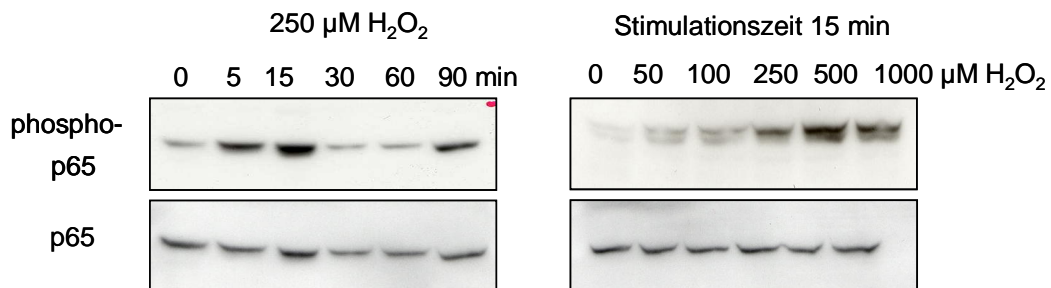


Abbildung 3.6: Nachweis der Phosphorylierung von p65 durch oxidativen Stress in HeLa-Zellen. Im Westernblot wurde die Phosphorylierung von p65 detektiert. Die unphosphorylierte Form des p65 diente als Kontrolle für die aufgetragene Proteinmenge.

3.2.2 Quantifizierung der NF κ B-Aktivität

Die Phosphorylierung der NF κ B-Untereinheit p65 führt nicht automatisch zu einer transkriptionellen Aktivität von NF κ B. Um den Einfluss von oxidativem Stress auf die transkriptionelle NF κ B-Aktivität zu analysieren, wurden NF κ B-Reportergen-Assays durchgeführt. Ein Vergleich mit verschiedenen Zytokinen sollte zeigen, inwieweit die Intensität der NF κ B-Aktivität nach oxidativem Stress sich von den klassischen NF κ B-Aktivatoren unterscheidet.

Wie aus der Abbildung 3.7 hervorgeht, zeigte sich eine ca. achtfache Steigerung der NF κ B-abhängigen Reporteraktivität nach Stimulation mit IL-1 β oder TNF- α . Stimulation mit 100 μM H_2O_2

erhöhte die Aktivität um den Faktor 3 und ergab eine ähnliche Aktivitätssteigerung wie IFN- γ , während eine Stimulation mit IL-6 lediglich zu einer Verdopplung der Reporteraktivität im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle führte.

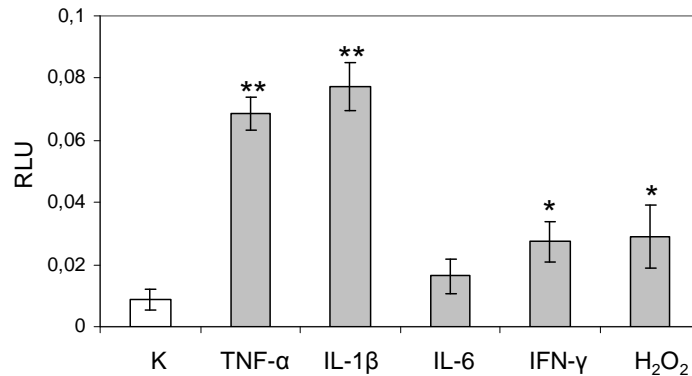


Abbildung 3.7: NF κ B-Aktivität nach oxidativem Stress bzw. Zytokinstimulation.

Die NF κ B-Aktivität wurde mittels *Dual Luciferase Assay* gemessen. Die Zellen wurden transient mit einem NF κ B-induzierbaren und einem konstitutiv exprimierten Luziferasegen co-transfiziert. 6 h nach Transfektion wurden die Zellen mit den unterschiedlichen Zytokinen IL-1 β (20 ng/ml), TNF- α (20 ng/ml), IL-6 (20 ng/ml) oder IFN- γ (100 ng/ml) bzw. oxidativem Stress in Form von 100 μ M H₂O₂ stimuliert und die Luziferaseaktivität 16 h nach Stimulation ermittelt. K = Kontrolle; RLU = *relative light units*; (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$.

3.2.3 Produktion von ROS nach Zytokinstimulation

Wachstumsfaktoren und Zytokine erzeugen nach Ligandenbindung intrazelluläre ROS als *second messenger*. Um den Einfluss verschiedener Zytokinen auf die intrazelluläre Produktion von ROS in HeLa-Zellen zu analysieren, wurde die Zellen mit dem ROS-sensitiven Farbstoff DCFH-DA gefärbt und die Fluoreszenz nach Stimulation mit IL-1 β (20 ng/ml), TNF- α (10 ng/ml) oder IFN- γ (100 ng/ml) im Fluoreszenzspektrometer gemessen. Wie in der Abbildung 3.8 dargestellt ist, wurde eine erhöhte Menge an Peroxiden nach 30-minütiger Zytokinstimulation in Zellen, die mit IL-1 β oder IFN- γ stimuliert waren, detektiert.

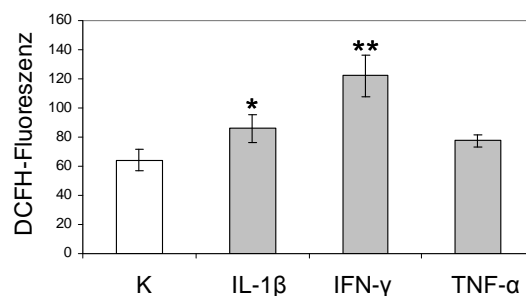


Abbildung 3.8: Messung der intrazellulären Konzentration von ROS nach Zytokinstimulation.

HeLa-Zellen wurden auf einer 96-well-Platte ausgesät und für 30 min mit DCFH-DA inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit verschiedenen Zytokinen für 30 min stimuliert und die Fluoreszenz im Fluoreszenzspektrometer gemessen. K = Kontrolle; (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass ROS im untersuchten Zellsystem als *second messenger* nach Stimulation mit Zytokinen produziert werden und Signaltransduktionswege aktivieren.

3.3 Vitamin E in der Zellkultur

3.3.1 α -Tocopherolaufnahme

Die in der Standardzellkultur eingesetzten Kulturmedien und das FCS enthielten kein Vitamin E. Die in den Experimenten als Kontrollen eingesetzten Zellen waren dementsprechend Vitamin E defizient. Um festzustellen, ob nach einer 16-stündigen Inkubation die Zellen das exogen angebotene α -Tocopherol aufgenommen hatten, wurde der zelluläre Gehalt von α -Tocopherol mittels HPLC-Analysen untersucht (Zusammenarbeit mit Gaby Andersen, Institut für Botanik der CAU, Kiel). Hierfür wurden die Zellen ohne oder mit 25 μ M bzw. 50 μ M α -Tocopherol inkubiert und der α -Tocopherol-Gehalt in den Zelllysaten ermittelt. Die Abbildung 3.9 stellt die HPLC-Chromatogramme dreier Ansätze exemplarisch dar. Es zeigte sich, dass eine Inkubation mit α -Tocopherol zu einer konzentrationsabhängigen Akkumulation von α -Tocopherol in den Zellen führte.

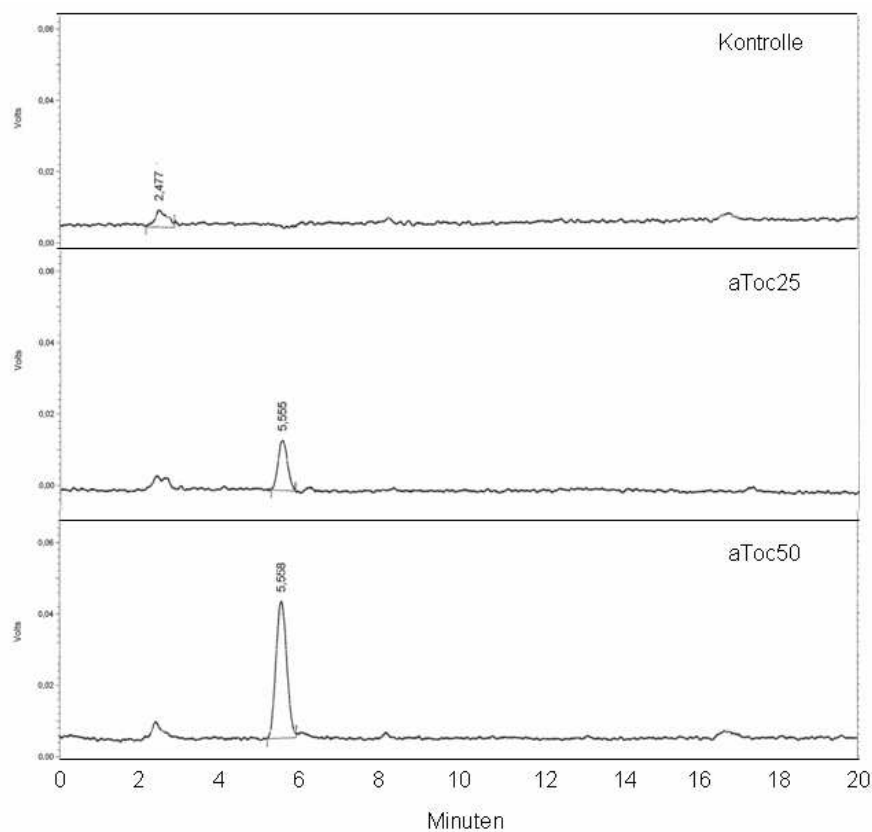


Abbildung 3.9: Aufnahme von α -Tocopherol in HeLa-Zellen.

Die Zellen wurden ohne Vitamin E oder mit 25 μ M bzw. 50 μ M α -Tocopherol für 16 h inkubiert und der Tocopherolgehalt in Zelllysaten mittels HPLC analysiert. Der Peak mit der Retentionszeit von ca. 2,5 min entspricht dem Einspritzpeak. Der Peak mit der Retentionszeit von 5,5 min wurde durch den Vergleich mit den Retentionszeiten von Standardsubstanzen der einzelnen Vitamin E-Formen als α -Tocopherol identifiziert. aToc25 = 25 μ M α -Tocopherol; aToc50 = 50 μ M α -Tocopherol.

3.3.2 Analyse der antioxidativen Funktion von α -Tocopherol

Um die antioxidativen Eigenschaften des α -Tocopherols in der Zellkultur näher zu charakterisieren, wurden verschiedene experimentelle Ansätze gewählt.

3.3.2.1 Analyse der Zytotoxizität durch oxidativen Stress

Oxidativer Stress kann konzentrationsabhängig zu vielseitigen Schäden bis hin zu Apoptose und Nekrose der Zelle führen. In den programmierten Zelltod sind häufig proteolytische Caspase-Kaskaden involviert. Im *Caspase Glo* Assay wird durch aktivierte Caspase-3 und Caspase-7 ein prolumineszentes Substrat gespalten, das anschließend durch Luziferasen umgesetzt wird. In Abbildung 3.10 ist die Aktivierung der Caspase-3 und Caspase-7 in Abhängigkeit von der H_2O_2 -Konzentration abgebildet. Es konnte eine dosisabhängige Aktivierung der Caspasen nachgewiesen werden. Eine moderate H_2O_2 -Konzentration von 50-500 μM führte zu einem signifikanten Anstieg der Caspaseaktivität, während die fehlende Induktion bei einer Inkubation mit 1000 μM H_2O_2 auf nekrotischen Zelltod hindeutet.

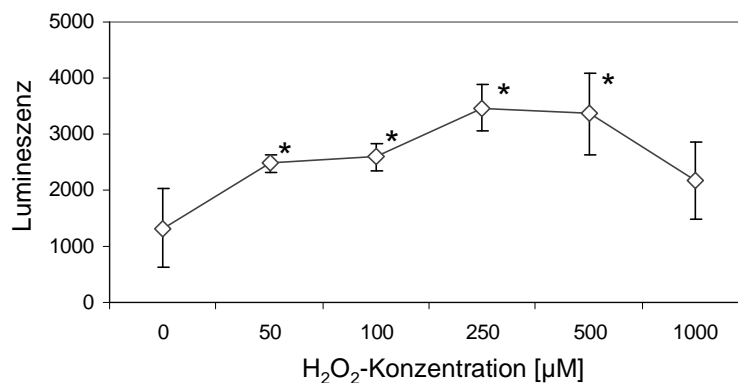


Abbildung 3.10: Caspaseaktivität nach H_2O_2 -Stimulation.

HeLa-Zellen wurden in einer Zelldichte von 7000 Zellen pro *well* in einer 96-*well*-Platte ausgesät und über Nacht kultiviert. Es folgte eine Stimulation mit steigenden Konzentrationen von H_2O_2 für 4 h. Die Aktivierung der Caspasen-3 und Caspase-7 wurde über einen *Caspase Glo* Assay ermittelt. (*) $p < 0,05$.

Wie Abbildung 3.11 zeigt, war der zytotoxische Effekt von H_2O_2 in einem großen Maße von der Zelldichte abhängig. In einer Zellkultur mit einer Konfluenz von 50% führte die Stimulation mit 250 μM H_2O_2 zu einem Zellverlust von ca. 60%, während die gleiche Menge H_2O_2 in einer 80% konfluenten Zellkultur einen sehr geringen Einfluss hatte.

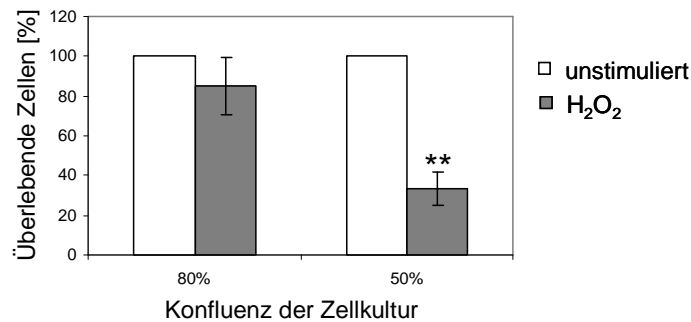


Abbildung 3.11: Zytotoxischer Einfluss von H₂O₂ in Abhängigkeit von der Zelldichte. HeLa-Zellen wurden mit unterschiedlichen Zelldichten ausgesät und bei einer Konfluenz von 50% bzw. 80% mit 250 µM H₂O₂ stimuliert. Nach 24 h wurde die Zellviabilität mittels MTS-Assays gemessen. Dargestellt ist die Anzahl überlebender Zellen in Prozent der unstimulierten Kontrolle. (**) $p < 0,01$.

In einem folgenden experimentellen Ansatz wurde der Einfluss von Vitamin E auf die Zytotoxizität durch oxidativen Stress ermittelt. HeLa-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen α -Tocopherol inkubiert oder blieben Vitamin E-defizient. Bei einer Konfluenz von ca. 60% erfolgte die Stimulation mit 250 µM H₂O₂. Wie in Abbildung 3.12 dargestellt, führte eine Stimulation mit 250 µM H₂O₂ in den Vitamin E-defizienten Zellen zu einer Reduktion der Zellzahl um ca. 50%. Eine Vorbehandlung der Zellen mit α -Tocopherol verringerte die H₂O₂-induzierte Zytotoxizität signifikant.

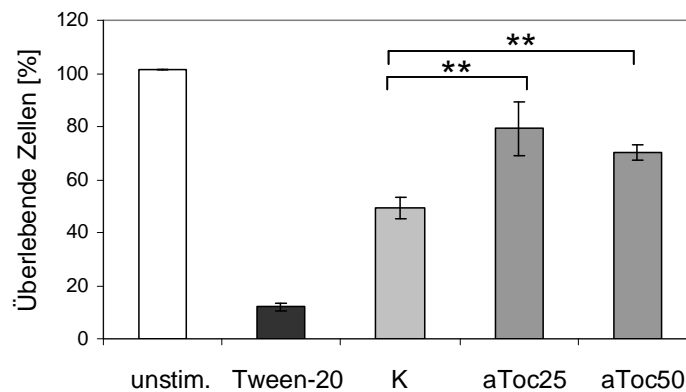


Abbildung 3.12: Zytotoxizität von H₂O₂ in Anwesenheit von α -Tocopherol. Nach Inkubation mit 0,1% (v/v) Ethanol (K = Kontrolle), 25 µM bzw. 50 µM α -Tocopherol für 16 h wurden in den Zellen durch Zugabe von 250 µM H₂O₂ oxidative Stressbedingungen induziert. Die Zytotoxizität wurde nach 48 h mittels MTS-Assays quantifiziert. Die Inkubation mit 0,1% Tween-20 diente als Positivkontrolle für Zelltod. aToc25 = 25µM α -Tocopherol; aToc50 = 50µM α -Tocopherol; unstim. = unstimuliert; (**) $p < 0,01$.

3.3.2.2 Quantifizierung der intrazellulären ROS-Konzentration

Um zu überprüfen, ob die Reduktion der Zytotoxizität durch Vitamin E auf eine erniedrigte intrazelluläre Konzentration von ROS nach H_2O_2 -Stimulation zurückging, wurde der Gehalt von ROS mittels DCFH-DA-Färbung ermittelt. Wie die Abbildung 3.13 zeigt, stieg die ROS-Konzentration in den Zellen nach Inkubation mit H_2O_2 stark an. Eine Vorbehandlung der Zellen mit Vitamin E führte zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der intrazellulären Peroxidbildung.

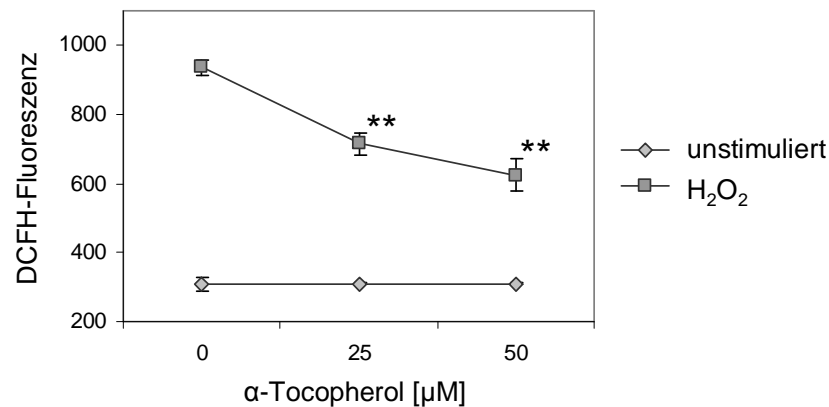


Abbildung 3.13: Einfluss von α -Tocopherol auf die Bildung von intrazellulären ROS. HeLa-Zellen wurden für 16 h mit 25 μM bzw. 50 μM α -Tocopherol inkubiert oder blieben Vitamin E-defizient. Durch Zugabe von 250 μM H_2O_2 wurde die intrazelluläre Peroxidbildung induziert und nach 30-minütiger Stimulation mittels DCFH-Fluoreszenz detektiert. (**) $p < 0,01$.

3.3.2.3 Reduktion der Lipidperoxidation durch Vitamin E

Ein häufiges Ereignis bei oxidativem Stress ist die Lipidperoxidation in Zellmembranen. Vitamin E als Antioxidans kann diese radikalische Kettenreaktion beenden, indem es mit dem Lipidperoxyradikal reagiert (siehe 1.3.2). Zur Detektion von Lipidperoxidation wurde der Redox-sensitive Farbstoff Bodipy-C11 eingesetzt. Seine reduzierte und oxidierte Form haben unterschiedliche Fluoreszenzmaxima, und der Quotient aus oxidierte und reduzierte Form lässt Rückschlüsse auf den Oxidationsgrad zu. Der oxidative Stress wurde in diesem Fall durch Inkubation mit Cuminperoxid und Hämin ausgelöst. Die Auswertung erfolgte am *confocal laser scanning microscope* (CLSM) und am Fluoreszenzspektrometer.

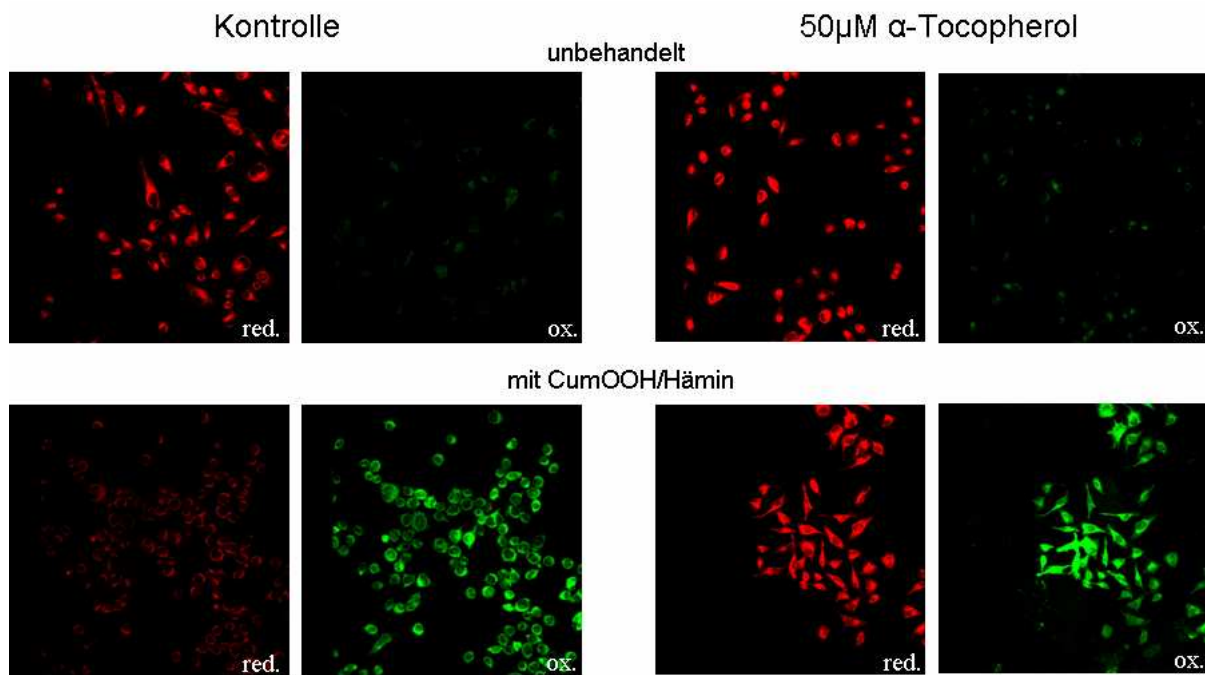


Abbildung 3.14: Analyse der Lipidperoxidation mittels Bodipy-C11-Färbung am CLSM. HeLa-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und mit 50 µM α -Tocopherol inkubiert bzw. Vitamin E defizient belassen. Anschließend wurde eine Bodipy-C11-Färbung durchgeführt und die Zellen für 1 h durch Inkubation mit der Kombination aus 80 µM Cuminperoxid (CumOOH) und 80 nM Hämin oxidativen Stressbedingungen ausgesetzt. Die Detektion von Lipidperoxidation erfolgte durch die Messung von Fluoreszenzen zweier Wellenlängenbereiche. Dargestellt sind die Aufnahmen der Zellen für beide Fluoreszenzbereiche. Das rote Signal entspricht der reduzierten Form des Bodipy-C11, die grüne Fluoreszenz stellt die oxidierte Form dar. ox. = oxidiert; red. = reduziert.

Die mikroskopische Analyse der Bodipy-C11-Fluoreszenzmarkierung durch CLSM ist in Abbildung 3.14 dargestellt. In unstimulierten Zellen zeigten sich die gleichen Fluoreszenzintensitäten ohne erkennbaren Einfluss der Vorinkubation mit Vitamin E. In beiden Ansätzen wurde nur die reduzierte Form (rot) des Indikators in den Zellen nachgewiesen, während die oxidierte Form (grün) nicht detektierbar war. Nach einstündiger Stimulation mit Cuminperoxid/Hämin nahm die Fluoreszenzintensität der oxidierten Form in beiden Ansätzen zu, wobei gleichzeitig die Fluoreszenz der reduzierten Form abnahm. Die Abnahme der Fluoreszenzintensität war in den Vitamin E-defizienten Zellen stärker. Entsprechend war der Quotient (oxidierte/reduzierte Form) bei diesen Zellen größer als bei den Vitamin E vorbehandelten Zellen.

Für die Quantifizierung des Oxidationsgrades des Bodipy-C11 wurden die Zellen mit unterschiedlichen α -Tocopherol-Konzentrationen inkubiert, mit CumOOH/Hämin stimuliert und der Ansatz im Fluoreszenzspektrometer gemessen. Wie aus der Abbildung 3.15 hervorgeht, führte die Inkubation mit α -Tocopherol zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion des Quotienten aus oxidierte/reduzierte Form.

Dies weist darauf hin, dass Vitamin E einen antioxidativen Effekt bei HeLa-Zellen ausübt, indem es Lipidperoxidation verhindert.

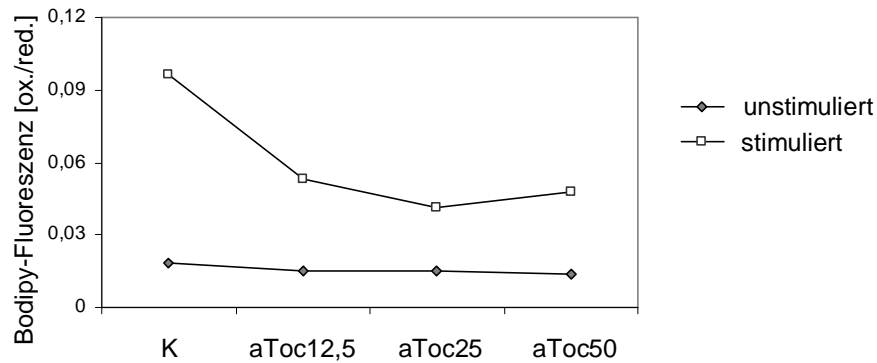


Abbildung 3.15: Quantifizierung der Lipidperoxidation.

HeLa-Zellen wurden für 16 h mit verschiedenen Konzentrationen von α -Tocopherol inkubiert oder blieben Vitamin E-defizient. Es folgte eine Bodipy-C11-Färbung. Im Anschluss wurden die Zellen oxidativem Stress in Form einer einstündigen Inkubation mit Cuminperoxid und Hämin ausgesetzt und die Lipidperoxidation mittels eines Fluoreszenzspektrometers quantifiziert. aToc12,5 = 12,5 μ M α -Tocopherol; aToc25 = 25 μ M α -Tocopherol; aToc50 = 50 μ M α -Tocopherol; K = Kontrolle.

Die Ergebnisse zeigen, dass exogenes Vitamin E von den Zellen aufgenommen wird und in den Zellen seine biologische Aktivität entfalten kann. Inkubation mit H_2O_2 führt zu einem Anstieg der intrazellulären ROS-Konzentration und löste abhängig von der Konzentration programmierten Zelltod aus. Vorbehandlung mit α -Tocopherol vermindert die Gesamtmenge von intrazellulär entstehenden ROS und vermindert entsprechend den zytotoxischen Effekt des oxidativen Stresses. Weiterhin zeigt sich, dass eine durch Cuminperoxid/Hämin vermittelte Lipidperoxidation durch Vitamin E wirkungsvoll verhindert werden konnte. Dabei entsprechen die in den Versuchen eingesetzten Vitamin E-Konzentrationen physiologischen Plasmaspiegeln.

3.4 Systematische Untersuchung der Vitamin E-modulierten Genexpression

3.4.1 Microarray

Microarray-Analysen ermöglichen den Vergleich von mRNA-Profilen in einem experimentellen Ansatz. Der in dieser Arbeit verwendete Chip (Scienion) umfasste ca. 400 entzündungsassoziierte Gene. Der Vergleich verschiedener Chipexperimente miteinander gab Auskunft über veränderte Expressionsspiegel durch Vitamin E (50 μ M α -Tocopherol) in unstimulierten und IL-1 β -stimulierten HeLa-Zellen. Auf den Chips wurden je zwei mRNA-Proben hybridisiert. Auf jeden Chip wurde eine unstimulierte Kontrolle ohne Vitamin E aufgetragen in Kombination mit 1. Vitamin E-behandelter, 2. IL-1 β stimulierter oder 3. Vitamin E-behandelter und IL-1 β -stimulierter Probe.

Die Tabelle 3.1 fasst die durch α -Tocopherol in ihrer Expression veränderten Gene in unstimulierten Zellen zusammen. Ein Gen wurde als reguliert definiert, wenn in drei Replikaten die Expression um den Faktor 1,2 gegenüber der unbehandelten Kontrolle verändert war. Insgesamt wurden vier Gene durch α -Tocopherol in ihrer Expression negativ reguliert: die beiden Entzündungsmediatoren TGF- β 1 (\downarrow 2,2x) und MCP-1 (\downarrow 1,4x) sowie die beiden Adhäsionsmoleküle ITGB1 (\downarrow 1,6x) und L1CAM (\downarrow 1,4x). Kein Gen wurde durch Vitamin E in der Expression verstärkt.

Symbol	Name	Kurzbeschreibung	Regulation
TGF- β 1	<i>transforming growth factor β1</i>	Zytokin	\downarrow 2,2
ITGB1	<i>integrin β1</i>	Adhäsionsmolekül	\downarrow 1,6
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>	Chemokin	\downarrow 1,4
L1CAM	<i>L1 cellular adhesion protein</i>	Adhäsionsmolekül	\downarrow 1,4

Tabelle 3.1: Expressionsregulation durch Vitamin E in unstimulierten Zellen.

Die Zellen wurden für 16 h mit 50 μ M α -Tocopherol inkubiert, anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert. Ein Gen wurde als reguliert definiert, wenn eine minimale Regulation um den Faktor 1,2 über drei Replikate konstant war.

Die Tabelle 3.2 fasst die durch Vitamin E modulierten Gene nach IL-1 β -Stimulation zusammen. Es wurden diejenigen Gene berücksichtigt, deren Expression durch die Stimulation in einem der Ansätze mindestens um den Faktor 1,3 verändert wurden, während die andere Probe in ihrer Expression unverändert blieb. Vergleiche mit der Literatur sollten zeigen, inwieweit diese Liste bekannte durch Vitamin E beeinflusste Gene enthielt. Wie der untenstehenden Tabelle zu entnehmen ist, wurden verschiedene Gene teils auf mRNA-, teils auf Proteinebene bereits in der Literatur als Vitamin E reguliert beschrieben. Dazu gehörten die induzierbare NO-Synthase (iNOS), Interleukin 2 (IL-2), sowie die beiden Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und Integrin β 2 (ITGB2).

Symbol	Name	<i>fold change</i>		In der Literatur als Vitamin E regulierbar beschrieben
		IL-1 β stimulierte Kontrolle versus unstimulierte Kontrolle	aToc50 behandelt +IL-1 β stimuliert versus unstimulierte Kontrolle	
CCL26	Chemokine ligand 26	1,37	1,01	
CD19	CD19 antigen	1,35	1,01	
CYP27A1	Cytochrom P450 family, subfamily A polypeptide 1	1,34	1,01	
DDIT3	DNA-damage-inducible transcript 3	1,33	1,01	
DEFA5	Defensin alpha 5	1,36	1,01	
DUSP2	Dual specificity phosphatase 2	1,34	1,01	
FOS	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogen homolog	1,31	1,01	
H1FO	H1 Histone family, member 0	1,33	1,01	
HLA-DPA1	major histocompatibility complex, class II, DP alpha1	1,35	1,00	
IL-10	interleukin 10	1,33	1,00	
IL12RB1	interleukin 12 receptor β 1	1,34	1,01	
IL-1RN	interleukin 1 receptor antagonist	1,36	1,01	
IL-2	interleukin 2	1,37	1,01	+
ITGB2	integrin β 2, antigen CD18	1,37	1,01	+
LTA	lymphotoxin alpha TNF- β	1,33	1,00	
MAP3K13	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 13	1,30	1,02	
MAPKAPK2	mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2	1,34	1,00	
MUC2	mucin 2	1,35	1,00	
NOS2A	nitric oxide synthase 2A, iNOS	1,34	1,00	+
PAK1	p21/Cdc42/Rac1-activated kinase 1	1,33	1,01	
PDGFRB	platelet-derived growth factor receptor β	1,35	1,01	
PTGS1	prostaglandin-endoperoxide synthase 1, COX-1	1,37	1,01	
SPRR1B	Small proline-rich protein 1B	1,36	1,00	
SOS1	son of sevenless homolog 1	1,35	1,01	
STAT2	signal transducer and activator of transcription 2	1,33	1,01	
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1	1,35	1,01	+

Tabelle 3.2: Expressionsregulation durch Vitamin E in IL-1 β -stimulierten Zellen.

3.4.2 Validierung der Array-Ergebnisse mittels RT- und *Real-time*-PCR

Zur Bestätigung der Expressionsdaten wurden für die Gene, die in den unstimulierten Zellen reguliert wurden, die Expressionslevel mit Hilfe von RT-PCR und mit *Real-time*-PCR (TaqMan) ermittelt. Für die Analyse wurden HeLa-Zellen in Abwesenheit oder Anwesenheit von 50 μ M α -Tocopherol für 20 h kultiviert.

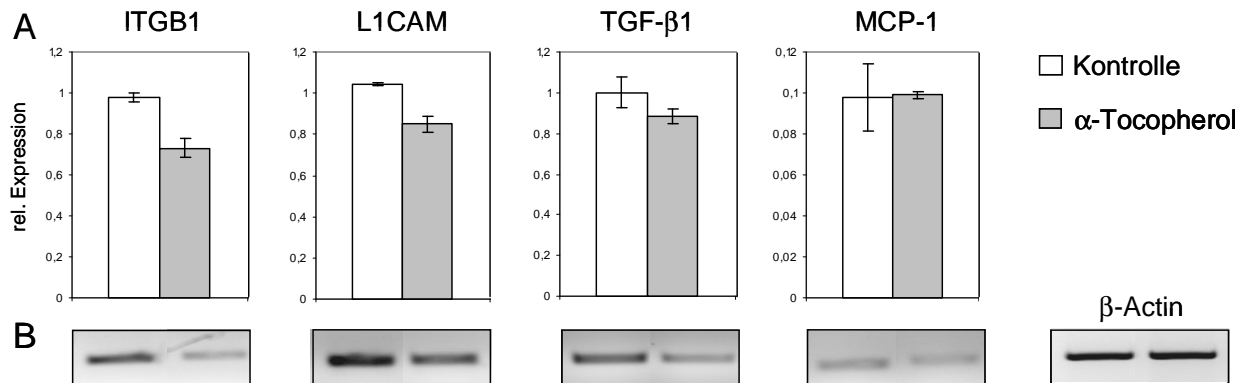


Abbildung 3.16: mRNA-Expressionsanalyse mittels RT-PCR und *Real-time*-PCR.

(A) Darstellung der *real-time* Ergebnisse. Mit TaqMan-Assays wurde die mRNA-Expression von ITGB1, TGF- β 1, L1CAM, MCP-1 und β -Actin ermittelt. Für die Darstellung wurde die Expression der regulierten Gene ITGB1, TGF- β 1, L1CAM, MCP-1 auf die β -Actin-Expression normalisiert. (B) Agarosegele der RT-PCR.

Wie aus der Abbildung 3.16 hervorgeht, wurden die Microarrayergebnisse für ITGB1, L1CAM und TGF- β 1 mit Hilfe von RT- und *Real-time*-PCR bestätigt. Die mRNA-Expression der drei Gene wurde durch Inkubation mit 50 μ M α -Tocopherol reduziert. Die Expression von MCP-1 war im Microarray-Experiment durch Vorinkubation mit α -Tocopherol um den Faktor 1,4 herabreguliert. Dieser Befund konnte nicht durch RT- oder *Real-time*-PCR bestätigt werden.

3.4.3 Analyse der Proteinexpression von TGF- β 1, MCP-1 und ITGB1

Um zu überprüfen, ob die auf mRNA-Level gefundene α -Tocopherol-abhängige Reduktion von TGF- β 1 und ITGB1 auch auf Proteinebene nachzuweisen waren, wurde die Proteinexpression untersucht. Die im Microarray gefundene Reduktion der mRNA-Expression von MCP-1 konnte nicht durch andere Methoden bestätigt werden. Da MCP-1 in der Literatur als Vitamin E modulierbar beschrieben worden ist, wurde die Proteinexpression ebenfalls ermittelt. Die Expression der sezernierten Zytokine TGF- β 1 und MCP-1 wurde mittels ELISA, die Oberflächenexpression von ITGB1 mittels FACS untersucht.

3.4.3.1 Regulation von TGF- β 1 und MCP-1 durch Vitamin E

Für die Analyse der Proteinexpression von TGF- β 1 und MCP-1 wurden HeLa-Zellen für 20 h ohne bzw. mit verschiedenen Vitamin E-Isomeren, α - und β -Tocopherol, kultiviert und die sezernierten Proteine im Kulturüberstand mit Hilfe von ELISA detektiert. α - und β -Tocopherol weisen ähnliche antioxidative Eigenschaften auf, und ein Vergleich der beiden lässt Rückschlüsse auf den zugrundeliegenden Mechanismus zu. Wie die Abbildung 3.17 zeigt, wurde durch Inkubation mit α - und β -Tocopherol die Menge von sezerniertem TGF- β 1 und MCP-1 signifikant reduziert. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Tocopherol über Beeinflussung des Redox-Status die Genexpression verändert.

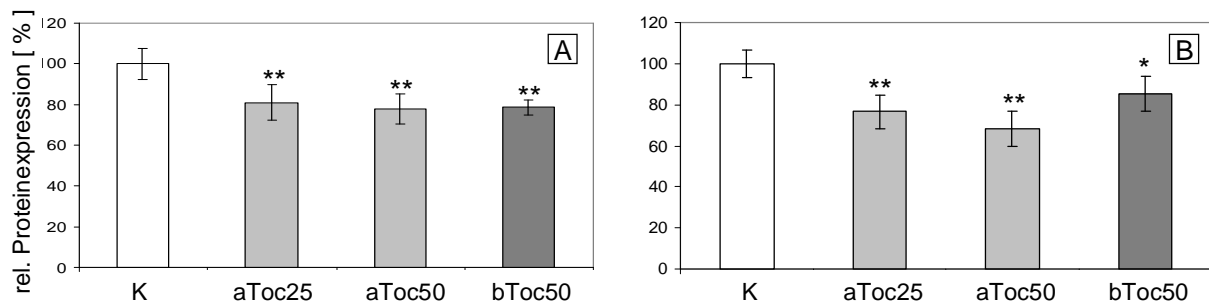


Abbildung 3.17: Proteinexpression von TGF- β 1 und MCP-1 nach Inkubation mit verschiedenen Vitamin E-Isomeren.

HeLa-Zellen wurden für 20 h in Anwesenheit von 25 μ M oder 50 μ M α -Tocopherol bzw. 50 μ M β -Tocopherol oder ohne Vitamin E kultiviert und anschließend die Menge von TGF- β 1 (A) und MCP-1 (B) im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Für die Darstellung wurde der Durchschnitt der Messwerte auf die Vitamin E-defiziente Kontrolle (100%) normalisiert. aToc25 = 25 μ M α -Tocopherol; aToc50 = 50 μ M α -Tocopherol; bToc50 = 50 μ M β -Tocopherol; K = Kontrolle; (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$.

3.4.3.2 FACS-Analyse der ITGB1-Expression

Um die auf mRNA-Ebene gefundene Reduktion von ITGB1 durch α -Tocopherol auf Proteinebene zu untersuchen, wurden FACS-Analysen durchgeführt. HeLa-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen α -Tocopherol (25 μ M oder 50 μ M) bzw. 50 μ M β -Tocopherol inkubiert oder verblieben Vitamin E-defizient. Nach 48 h Inkubation wurde die ITGB1-Oberflächenexpression mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

Wie aus Abbildung 3.18 hervorgeht, wurde die Oberflächenexpression von ITGB1 durch Tocopherol beeinflusst. Ein Vergleich zwischen den Kontrollzellen und den Tocopherol-behandelten Zellen zeigte, dass in den Tocopherol-behandelten Zellen ITGB1 schwächer als in den Vitamin E-defizienten Zellen auf der Zelloberfläche nachzuweisen war. Die verschiedenen Vitamin E-Formen, α -Tocopherol und β -Tocopherol, zeigten vergleichbare Effekte. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass der verminderten Expression von ITGB1 ebenso wie der von MCP-1 und TGF- β 1 ein antioxidativer Mechanismus zugrundelag.

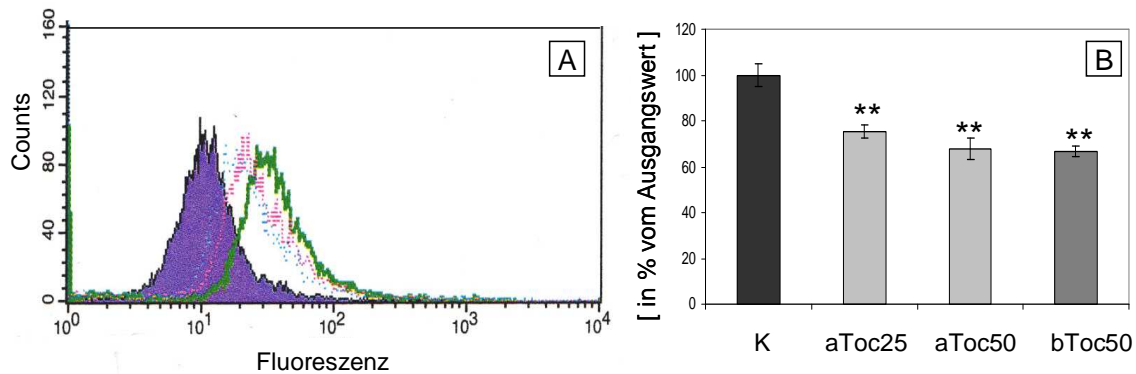


Abbildung 3.18: Expression von ITGB1 nach Inkubation mit verschiedenen Vitamin E-Formen. HeLa-Zellen wurden 48 h mit α - oder β -Tocopherol inkubiert bzw. blieben Vitamin E-defizient. Das oberflächenständige ITGB1 wurde mittels Antikörperfärbung fluoreszenzmarkiert und je 10.000 Zellen im FACS analysiert. (A) Darstellung der Fluoreszenz-Verteilung von Vitamin E-defizienten Zellen (grün) und nach Inkubation mit 50 μ M α -Tocopherol (pink) bzw. 50 μ M β -Tocopherol (blau). Für die Färbekontrolle wurde der sekundäre Antikörper (unterlegte Fläche) eingesetzt. (B) Darstellung der errechneten geometrischen Mittel der Intensitätsverteilung. aToc25 = 25 μ M α -Tocopherol; aToc50 = 50 μ M α -Tocopherol, bToc50 = 50 μ M β -Tocopherol; K = Kontrolle; (**) $p < 0,01$.

In einem folgenden experimentellen Ansatz wurden die Zellen mit den beiden Vitamin E-Formen α - und β -Tocopherol für 24 h inkubiert und 16 h mit 20 ng/ml IL-1 β stimuliert. Durch IL-1 β -Stimulation wurde die Oberflächenexpression von ITGB1 hochreguliert (Abbildung 3.19). Durch Inkubation mit Vitamin E konnte die Oberflächenexpression von ITGB1 nach IL-1 β reduziert werden.

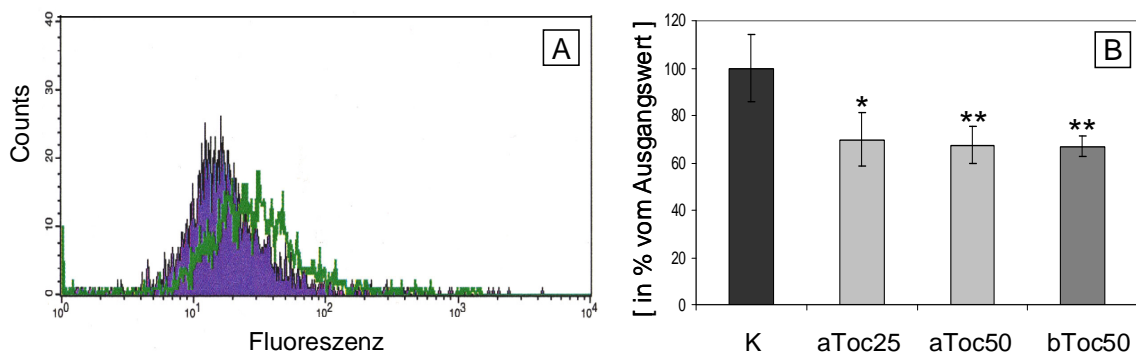


Abbildung 3.19: Expression von ITGB1 nach IL-1 β -Stimulation. HeLa-Zellen wurden 16 h mit α - oder β -Tocopherol inkubiert bzw. blieben Vitamin E-defizient. Es folgte eine Stimulation mit 20ng/ml IL-1 β für 16 h. (A) Darstellung der Fluoreszenz-Verteilung von unstimulierten (unterlegte Fläche) und IL-1 β -stimulierten (grün) HeLa-Zellen. (B) Zur Quantifizierung der ITGB1-Reduktion durch verschiedene Tocopherolformen wurde das geometrische Mittel der Vitamin E-defizienten Kontrolle als 100% definiert und die Vitamin E-behandelten Zellen in Relation zu den Vitamin E-defizienten gesetzt. aToc25 = 25 μ M α -Tocopherol; aToc50 = 50 μ M α -Tocopherol, bToc50 = 50 μ M β -Tocopherol; K = Kontrolle; (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die ELISA- und FACS-Messungen die Resultate der mRNA-basierten Expressionsuntersuchungen bestätigen. Die Expression der mRNA und des

Proteins von TGF- β 1 und ITGB1 wird durch Inkubation mit Vitamin E reduziert. Der Microarraybefund von MCP-1 wurde nicht durch *Real-time*-PCR bestätigt, aber wie die ELISA-Daten zeigen, wird die sezernierte Proteinmenge durch Vitamin E-Inkubation verringert. Die unterschiedlichen Vitamin E-Formen, α -Tocopherol und β -Tocopherol, weisen vergleichbare Effekte auf, was dafür spricht, dass hier die antioxidativen Eigenschaften von Vitamin E entscheidend sind.

3.5 Funktionelle Untersuchung von TAP

3.5.1 Nachweis der mRNA-Expression von TAP

3.5.1.1 Differenzielle Gewebsverteilung der TAP-Expression

Die Gewebsverteilung von TAP-mRNA wurde mittels RT-PCR untersucht. Als Template wurde kommerziell erworbene cDNA aus unterschiedlichen humanen Geweben eingesetzt. Das 261 bp lange Amplicon wurde in verschiedenen Geweben detektiert. Eine relativ starke Expression wurde in Dünndarm und Thymus sowie in Lungengewebe nachgewiesen. Eine schwächere Expression wurde in Herz und Kolon ermittelt, während in Skelettmuskulatur kein Transkript nachgewiesen wurde (Abbildung 3.20).



Abbildung 3.20: Gewebsverteilung der mRNA von TAP.

Die TAP-Expression wurde durch RT-PCR (35 Zyklen) mit sequenzspezifischen Primern in unterschiedlichen Geweben nachgewiesen. Das *Housekeeping*-Gen β -Actin diente als Kontrolle der eingesetzten cDNA-Mengen.

3.5.1.2 TAP-Expression in der Zellkultur

Verschiedene Zelllinien wurden mittels RT-PCR auf Expression von TAP untersucht. Dafür wurde mRNA aus unstimulierten sowie für 6 h mit TNF- α (20 ng/ml) stimulierten Zellen isoliert. Da eine TAP-Expression in Dünndarm und Kolon detektiert worden war (Abbildung 3.20), wurde ein Schwerpunkt auf intestinale epitheliale Zelllinien (CaCo-2, SW948, HT-29) gelegt. Wie aus der Abbildung 3.21 hervorgeht, wurde in allen Zelllinien bis auf THP-1-Zellen eine TAP-Expression nachgewiesen. Eine

Stimulation mit TNF- α führte zu einem deutlichen Anstieg der TAP-Expression in HEK-293-, HeLa-, CaCo-2- und SW948-Zellen. Die für die Amplifikation nötige Zyklenzahl (35 Zyklen) wies darauf hin, dass TAP in einem geringen Umfang exprimiert wurde.

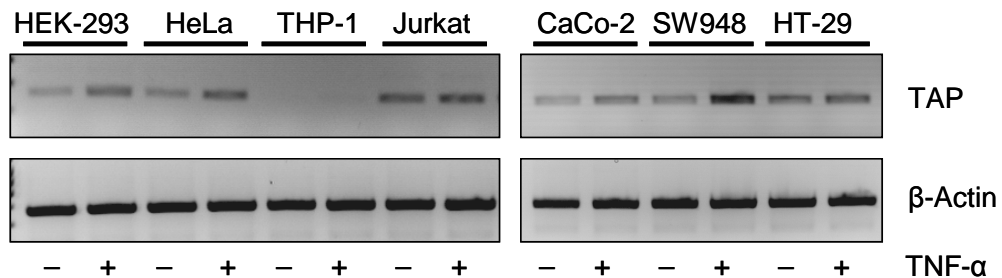


Abbildung 3.21: mRNA-Expression von TAP in verschiedenen Zelllinien.

Die TAP-Expression wurde in verschiedenen Krebszelllinien untersucht. Die Zellen waren unstimuliert oder für 6 h mit 20 ng/ml TNF- α stimuliert. Die Amplicons von β -Actin dienen als Kontrolle der eingesetzten cDNA-Mengen.

Um die Induzierbarkeit der mRNA-Expression von TAP zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen mit verschiedenen Zytokinen bzw. H₂O₂ stimuliert. In unstimulierten Zellen wurde ein geringes Expressionsniveau nachgewiesen, das durch Zytokinstimulation oder oxidativen Stress erhöht wurde. Die Kinetik mit IL-1 β -Stimulation zeigte, dass nach einstündiger Stimulation die mRNA-Expression von TAP deutlich anstieg, wobei die Induktion bei 4-6 h ihr Maximum erreichte.

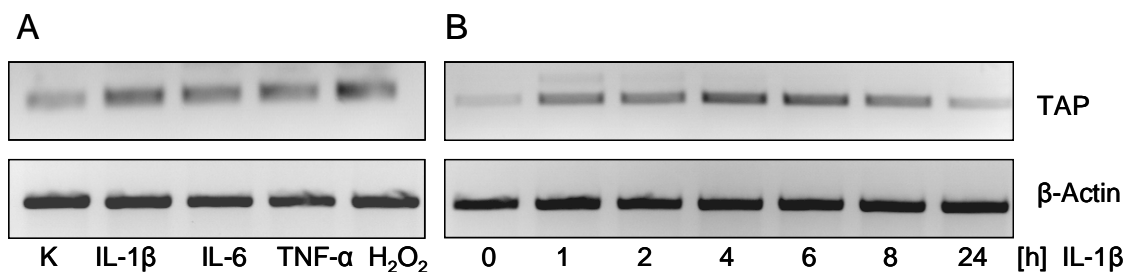


Abbildung 3.22: Expressionsanalyse von TAP nach Stimulation durch RT-PCR.

(A) HeLa-Zellen wurden für 4 h mit den Zytokinen IL-1 β (20 ng/ml), IL-6 (20 ng/ml) und TNF- α (20 ng/ml) oder durch oxidativen Stress in Form von 250 μ M H₂O₂ stimuliert. K = Kontrolle. (B) Kinetik der TAP-mRNA-Induktion durch IL-1 β -Stimulation nach 0, 1, 2, 4, 6, 8 und 24 h. Die Amplicons von β -Actin dienen zur Kontrolle der eingesetzten cDNA-Menge. Die PCR durchlief 35 Zyklen.

Um zu untersuchen, ob TAP durch Inkubation mit Vitamin E induzierbar ist, wurden Zellen mit verschiedenen α -Tocopherol-Konzentrationen inkubiert und mit IL-1 β für 4 h stimuliert. Wie der Abbildung 3.23 zu entnehmen ist, wurde die mRNA-Expression von TAP durch Inkubation mit 50 μ M α -Tocopherol gesteigert. Ein Vergleich mit IL-1 β -Stimulation zeigte ein ähnliches Expressionsniveau.

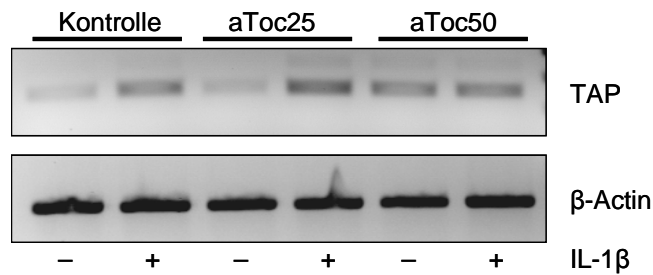


Abbildung 3.23: Analyse der endogenen TAP-Expression in HeLa-Zellen.

Die Zellen wurden mit 25 μM oder 50 μM α -Tocopherol für 16h inkubiert oder blieben Vitamin E-defizient. Anschließend erfolgte eine Stimulation mit IL-1 β (20ng/ml) für 4 h. Das *Housekeeping*-Gen β -Actin diente als Kontrolle der eingesetzten cDNA-Mengen. Die Zyklenzahl der PCR-Reaktion betrug 35. aToc25 = 25 μM α -Tocopherol, aToc50 = 50 μM α -Tocopherol.

3.5.1.3 Transfektion mit einem TAP-Konstrukt

Die Transfektion wurde wie in 2.1.5 beschrieben durchgeführt. Mittels semiquantitativer PCR wurde das Expressionsniveau von TAP in den mock- und TAP-transfizierten Zellen ermittelt. Eine deutliche Steigerung der mRNA-Level nach Transfektion mit dem TAP-Konstrukt wurde nachgewiesen, die auch durch eine Vorinkubation mit α -Tocopherol in den mock-transfizierten Zellen nicht erreicht wurde (Abbildung 3.24).

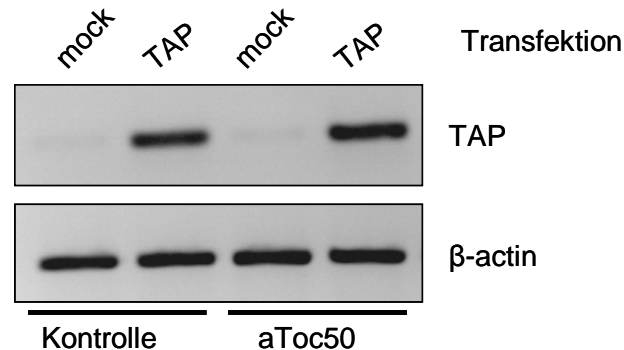


Abbildung 3.24: mRNA-Expression von TAP in mock- und TAP-transfizierten Zellen.

Die Zellen wurden mit α -Tocopherol inkubiert oder blieben Vitamin E-defizient. Nach der Übernachtskultur (16 h) erfolgte die Transfektion mit dem leeren Vektor (mock) oder mit dem TAP-Konstrukt pcDNA-DEST40-TAP. Die TAP-Expression wurde über semiquantitative RT-PCR mit 30 Zyklen untersucht. aToc50 = 50 μM α -Tocopherol.

3.5.1.4 Auswirkungen von TAP-Überexpression auf den intrazellulären Tocopherolgehalt

In der Literatur wird TAP als intrazelluläres Vitamin E-transportierendes Protein diskutiert. Um festzustellen, ob Überexpression von TAP zu einer verbesserten zellulären Aufnahme von Vitamin E führt, wurden HPLC-Analysen mit mock- und TAP-transfizierten Zellen durchgeführt.

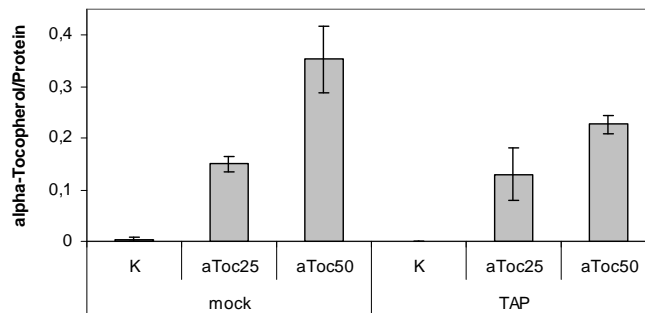


Abbildung 3.25: Einfluss von TAP auf den Tocopherolgehalt.

Die Zellen wurden mit dem leeren Vektor (mock) oder mit pcDNA-DEST40-TAP transfiziert und für 16 h mit verschiedenen Konzentrationen von α -Tocopherol inkubiert. Mittels HPLC wurde der Tocopherolgehalt im Zelllysate gemessen und auf die Proteinkonzentration bezogen. aToc25 = 25 μ M α -Tocopherol; aToc50 = 50 μ M α -Tocopherol; K = Kontrolle.

Die Überexpression von TAP führte nicht zu einem gesteigerten Tocopherolgehalt im Zelllysate, sondern erniedrigte den Tocopherolgehalt nach Inkubation mit 50 μ M α -Tocopherol um ca. 30 % (Abbildung 3.25).

3.5.2 Einfluss von Vitamin E und TAP auf zelluläre Mechanismen entzündlicher Prozesse

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass die mRNA-Expression von TAP durch α -Tocopherol und verschiedene proinflammatorische Zytokine hochreguliert wird. In den folgenden Untersuchungen sollte ermittelt werden, ob TAP in Kombination mit Vitamin E Einfluss auf Zytokin-induzierte Signalwege und zelluläre Mechanismen im Zusammenhang mit dem Entzündungsgeschehen nimmt. Dabei stand in dieser Arbeit die Regulation der Adhäsion an Epithelzellen im Vordergrund.

3.5.2.1 Einfluss auf den Promotor von ICAM-1

Ein in der Literatur häufig diskutiertes Zielgen von Vitamin E ist das Adhäsionsmolekül ICAM-1, das unter dem Einfluss von Vitamin E negativ reguliert wird (Yoshikawa *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1999; Yoshida *et al.*, 2000). ICAM-1 ist ein NF κ B-abhängiges Gen, und seine Expression wird durch Zytokinstimulation (z.B. durch IL-1 β und TNF- α) induziert. Um den Einfluss von Vitamin E und TAP auf den Promotor von ICAM-1 zu untersuchen, wurden Reporteragen-Assays durchgeführt. Das verwendete Vektorkonstrukt enthielt das Firefly-Luziferasegen unter der Kontrolle des proximalen Promotors von ICAM-1. Für die Experimente wurden HeLa-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen

α -Tocopherol inkubiert oder blieben Vitamin E-defizient. Nach 16-stündiger Kultur erfolgte die Transfektion mit TAP oder dem leeren Kontrollvektor und den für die Detektion der ICAM-1-Promotoraktivität nötigen Reporterplasmiden. Anschließend wurden die Zellen für weitere 16 h stimuliert und die Reporterogenaktivität mittels Luziferase-Assay gemessen. Interessanterweise wurde die Reporterogenaktivität durch Stimulation mit TNF- α , jedoch nicht durch IL-1 β gesteigert (Daten nicht gezeigt). Wie in Abbildung 3.26 zu sehen ist, reduzierte Vitamin E dosisabhängig in den TAP-transfizierten Zellen die Reporteraktivität in unstimulierten und in TNF- α -stimulierten Zellen, während dieser Effekt in den mock-transfizierten Zellen nicht nachweisbar war. Der weitere Vergleich zwischen den beiden Ansätzen zeigte einen Vitamin E-unabhängigen Einfluss der Überexpression von TAP. So konnte eine gesteigerte Aktivität des Promotors von ICAM-1 nach TNF- α -Stimulation in den TAP-transfizierten Zellen detektiert werden.

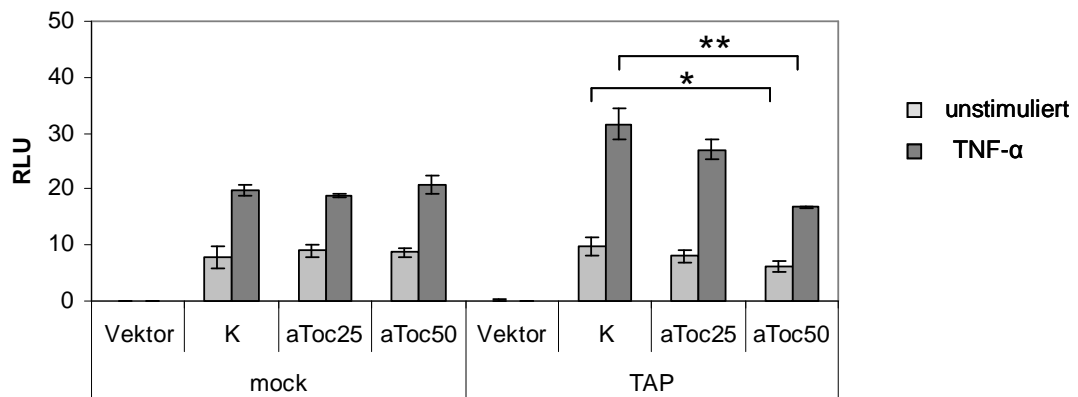


Abbildung 3.26: Einfluss von TAP und Vitamin E auf die Promotoraktivität von ICAM-1.

HeLa-Zellen wurden mit dem TAP-Konstrukt oder mit dem leeren Vektor und für die Detektion der proximalen ICAM-1-Promotoraktivität mit dem Vektor pGL3B-ICAM-1 transfiziert. Im Anschluss wurde der Einfluss von TAP-Überexpression in Anwesenheit von α -Tocopherol analysiert. aToc25 = 25 μ M α -Tocopherol; aToc50 = 50 μ M α -Tocopherol; K = Kontrolle; RLU = *relative light units*; (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$.

Um die Beteiligung von NF κ B-*response*-Elementen in der TNF- α -induzierten Promotoraktivität von ICAM-1 nachzuweisen, wurden Reporterassays in Anwesenheit von Inhibitoren des NF κ B-Signalweges durchgeführt. Der pharmakologische Inhibitor MG132 sowie die Co-Transfektion des pCMV-I κ B α -Vektors, eines NF κ B-Superrepressors, verhindern die NF κ B-Aktivierung über Hemmung der Degradation von I κ B α . Durch beide Inhibitionsansätze wurde die TNF- α -induzierte Promotoraktivität vermindert (Abbildung 3.27). Dieses Ergebnis lässt auf eine Beteiligung von NF κ B an der Regulation des Promotors von ICAM-1 bei TNF- α -Stimulation schließen. Die basale, konstitutive Promotoraktivität zeigte keinen NF κ B-Einfluss.

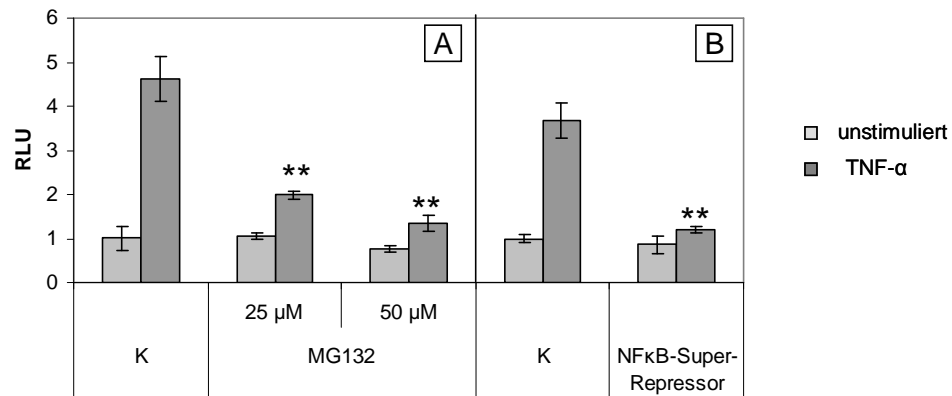


Abbildung 3.27: Einfluss verschiedener NFκB-Inhibitoren auf die TNF-α-induzierte Promotoraktivität von ICAM-1.

HeLa-Zellen wurden 1 h vor Stimulation mit dem pharmakologischen Inhibitor MG132 behandelt (A) oder mit dem NFκB-Superrepressors (pCMV-IκBαM) co-transfiziert (B) und die ICAM-1-Promotoraktivität mittels Reporterassay gemessen. Gleiche DNA-Mengen bei der Transfektion wurden durch Zusatz des Leervektors pcDNA-DEST40 gewährleistet. K = Kontrolle; RLU = *relative light units*, (**) $p < 0,01$ versus TNF-α-stimulierte Kontrolle.

3.5.2.2 Einfluss von TAP auf den NFκB-Signalweg

Um zu untersuchen, ob die Vitamin E-abhängige Reduktion der Promotoraktivität von ICAM-1 in den TAP-transfizierten Zellen auf Beeinflussung des NFκB-Signalweges beruht, wurden NFκB-Reporterassays durchgeführt.

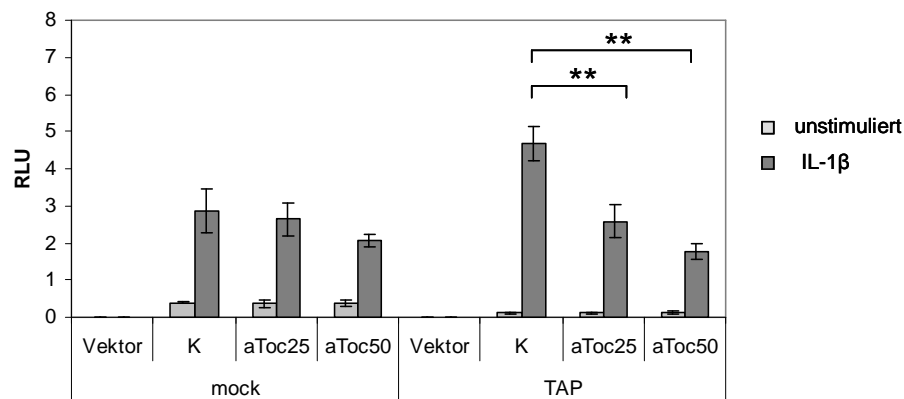


Abbildung 3.28: Einfluss von α-Tocopherol und TAP-Überexpression auf den NFκB-Signalweg.

HeLa-Zellen wurden mit 25 μM oder 50 μM α-Tocopherol inkubiert oder verblieben Vitamin E-defizient. Nach 16-stündiger Kultivierung wurden die Zellen mit dem leeren Vektor (mock) oder mit dem TAP-Konstrukt und den Vektoren zur Detektion der NFκB-Aktivierung transfiziert. Anschließend erfolgte eine Stimulation mit IL-1β (20 ng/ml) für 16 h. RLU = *relative light units*; aToc25 = 25 μM α-Tocopherol; aToc50 = 50 μM α-Tocopherol; K = Kontrolle; n.s. = nicht signifikant; (**) $p < 0,01$.

Der Vergleich der beiden Transfektionsansätze ergab, dass α-Tocopherol keinen signifikanten Unterschied in der NFκB-Aktivität der mock-transfizierten Zellen bewirkt. Im Gegensatz dazu wurde eine signifikante konzentrationsabhängige Reduktion der NFκB-Aktivität durch α-Tocopherol in TAP-

transfizierten Zellen nach Stimulation mit IL-1 β nachgewiesen. Die basale Aktivität wurde durch Vitamin E-Supplementierung nicht beeinflusst.

Wie die Abbildung 3.28 zeigt, bestand ein Vitamin E-unabhängiger Einfluss von TAP auf die NF κ B-abhängige Reporterogenaktivität. Überexpression von TAP führte in unstimulierten HeLa-Zellen im Vergleich zu den mock-transfizierten zu einer deutlich erniedrigten NF κ B-Aktivität. Auffällig war außerdem, dass die IL-1 β -induzierte NF κ B-Aktivierung in den TAP-transfizierten Zellen verglichen mit der mock-Kontrolle um ca. 50% erhöht war.

3.5.2.3 Vitamin E-unabhängiger Einfluss von TAP auf den IL-1 β -Signalweg

Um den oben beschriebenen Vitamin E-unabhängigen Einfluss der Überexpression von TAP auf die NF κ B-Aktivität näher zu charakterisieren, wurde die mRNA-Expression verschiedener Komponenten des IL-1 β -Signalweges, die in die Aktivierung von NF κ B involviert sind, mittels RT-PCR untersucht.

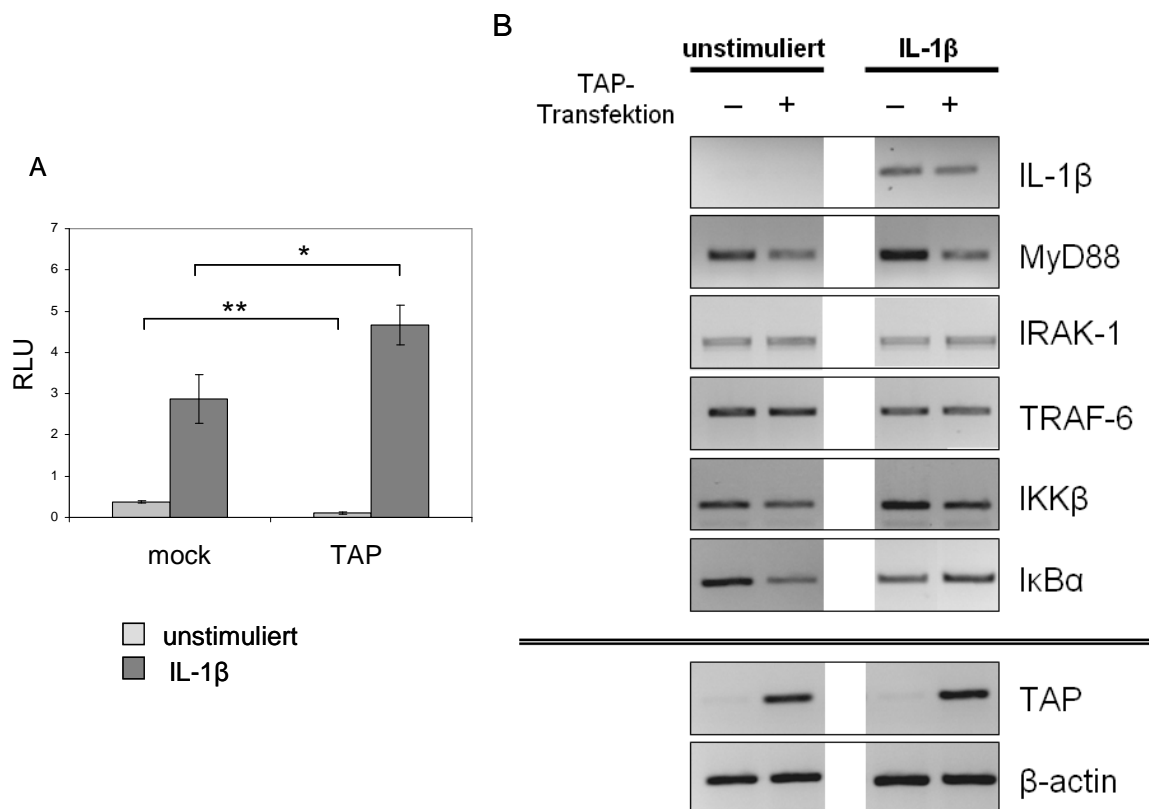


Abbildung 3.29: Vitamin E-unabhängiger Einfluss der TAP-Überexpression auf den IL-1 β -Signalweg. (A) Darstellung der veränderten NF κ B-Aktivierung in unstimulierten und IL-1 β -behandelten Zellen. TAP-Überexpression führt zu einer reduzierten basalen Aktivität und zu einer gesteigerten Aktivierung nach IL-1 β -Stimulation (20ng/ml) im Vergleich zur Mock-Kontrolle. (B) Analyse der mRNA-Expression von Komponenten des IL-1-Signalweges. HeLa-Zellen wurden mit dem leeren Vektor (mock) bzw. mit TAP transfiziert und für 6 h mit IL-1 β stimuliert. Die Expression ausgewählter Gene des IL-1 β -Rezeptorkomplexes und des NF κ B-Signalweges wurden mittels RT-PCR analysiert. Die Zyklenzahl der RT-PCR wurde dem mRNA-Expressionslevel in unstimulierten bzw. IL-1 β -stimulierten Zellen angepasst und lag zwischen 27-31 Zyklen.

Dafür wurden spezifische Primer für MyD88, IRAK-1 und TRAF-6 als Komponenten des IL-1-Rezeptorkomplexes, sowie IKK β und I κ B β (zwei Komponenten des NF κ B-Signalweges), und schließlich IL-1 β verwendet. Als Kontrollen für die eingesetzten cDNA-Mengen bzw. für die Transfektion dienten Primer für β -Actin bzw. TAP.

Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.29 zusammengefasst. Die Expression von TRAF-6 und IRAK-1 erwies sich als unverändert. Dagegen zeigten sich deutliche Unterschiede in der mRNA-Expression von MyD88, IKK β und I κ B. Eine negative Regulation wurde durch TAP-Überexpression für MyD88 und IKK β in unstimulierten sowie IL-1 β -stimulierten Zellen detektiert. Für I κ B zeigte sich ebenfalls eine erniedrigte Expression in unstimulierten Zellen nach TAP-Transfektion im Vergleich mit den mock-transfizierten Zellen. Nach IL-1 β -Stimulation wurde eine positive Regulation für I κ B α durch TAP-Überexpression festgestellt.

Fazit: In den mock-transfizierten Zellen kann keine α -Tocopherol-abhängige Reduktion der Promotoraktivität von ICAM-1 detektiert werden. In den TAP-transfizierten Zellen ist die Promotoraktivität bei unstimulierten und TNF- α -stimulierten Zellen durch Inkubation mit Vitamin E verringert. Diese Abnahme kann zumindest in TNF- α -stimulierten Zellen auf eine Beeinflussung des NF κ B-Signalweges zurückgeführt werden. Die basale Aktivität des ICAM-1-Promotors ist nicht durch NF κ B-Inhibitoren und die basale NF κ B-Aktivität nicht durch α -Tocopherol reduziert, was darauf hindeutet, dass bei der Vitamin E-abhängigen Reduktion der ICAM-1-Promotoraktivität in unstimulierten Zellen weitere von NF κ B verschiedene *Response*-Elemente involviert sind. Des Weiteren zeigt sich für die NF κ B-Aktivität ein Vitamin E-unabhängiger Einfluss von TAP, der zu einer erniedrigten basalen Aktivität und zu einer gesteigerten Aktivierung nach Zytokinstimulation führt, die sich auch auf die ICAM-1-Promotoraktivität auswirkt. Zusammenfassend zeigen RT-PCR-Analysen, dass verschiedene Signalkomponenten durch TAP-Überexpression in ihrer Expression verändert werden.

3.5.3 Charakterisierung des Einflusses von TAP auf die ITGB2-Expression

ICAM-1 vermittelt über heterophile Proteininteraktion mit Integrinen die zelluläre Adhäsion von Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten an das Endothel. Liganden von ICAM-1 sind β 2-Integrine wie z.B. LFA-1 (*lymphocyte function-associated antigen-1*), das Heterdimer aus Integrin α L und β 2. ITGB2 wurde im Microarrayexperiment als α -Tocopherol-reguliertes Gen identifiziert (Tabelle 3.2). Um den Microarraybefund zu überprüfen, wurde die Oberflächenexpression von ITGB2 mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dafür wurden HeLa-Zellen und die monozytäre Zelllinie THP-1 für 16 h mit α -Tocopherol inkubiert und im Anschluss für weitere 16 h mit IL-1 β stimuliert. In beiden Zelllinien ließ sich eine ITGB2-Expression nachweisen, die nach Stimulation hochreguliert wurde (Abbildung 3.30). Inkubation mit α -Tocopherol führte zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der Oberflächenexpression in den stimulierten Zellen, während die basale Expression unverändert blieb.

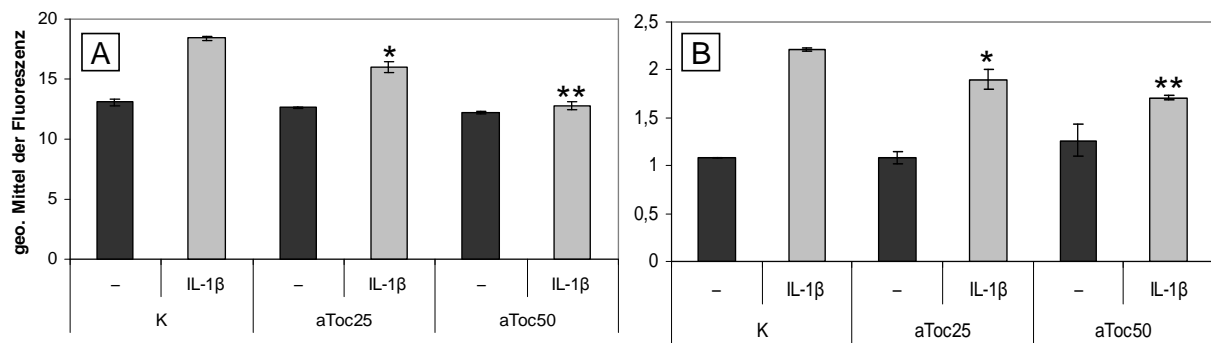


Abbildung 3.30: FACS-Analyse der Expression von ITGB2 in HeLa- und THP-1-Zellen. Zellen der monozytären Zelllinie THP-1 und HeLa-Zellen wurden mit α -Tocopherol vorinkubiert und für 24 h mit IL-1 β (20 ng/ml) stimuliert. Mittels FACS-Analyse wurde die ITGB2-Oberflächenexpression ermittelt. (A) HeLa-Zellen (B) THP-1-Zellen. aToc25 = 25 μ M α -Tocopherol; aToc50 = 50 μ M α -Tocopherol; geo. = geometrisch; K = Kontrolle; (*) $p < 0,05$ für Kontrolle gegen 25 μ M α -Tocopherol nach IL-1 β -Stimulation; (**) $p < 0,01$ für Kontrolle gegen 50 μ M α -Tocopherol nach IL-1 β -Stimulation.

Um den Einfluss von TAP auf die α -Tocopherol-modulierte Expression von ITGB2 näher zu untersuchen, wurden in einem folgenden experimentellen Ansatz weitere FACS-Messungen mit mock- und TAP-transfizierten Zellen durchgeführt.

Die Untersuchung der Oberflächenexpression zeigte einen deutlich stärkeren α -Tocopherol-abhängigen Einfluss durch TAP-Überexpression (Abbildung 3.31). Im Gegensatz zu den mock-transfizierten Zellen hatte α -Tocopherol in den TAP-transfizierten Zellen nicht nur einen Einfluss auf die Integrinexpression nach IL-1 β -Stimulation, sondern verringerte auch in unstimulierten Zellen die ITGB2-Expression.

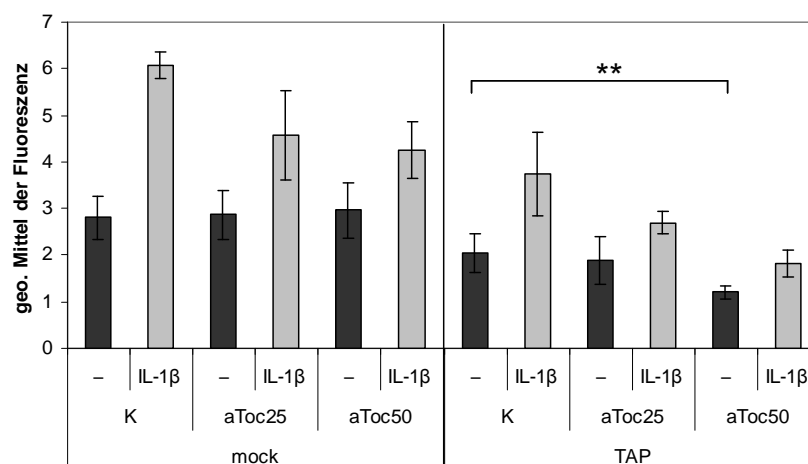


Abbildung 3.31: Einfluss der TAP-Überexpression auf die Expression von ITGB2. Die Zellen wurden mit pcDNA-DEST40-TAP oder dem leeren Vektor transfiziert, für 16 h mit α -Tocopherol (25 μ M oder 50 μ M) inkubiert und für 24 h mit IL-1 β (20 ng/ml) stimuliert. Anschließend wurde die ITGB2-Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie untersucht. aToc25 = 25 μ M α Tocopherol; aToc50 = 50 μ M α -Tocopherol; geo. = geometrisch; K = Kontrolle; (**) $p < 0,01$.

Um diesen Effekt näher zu charakterisieren, wurden zwei unterschiedlich lange Reporter-genkonstrukte des proximalen ITGB2-Promotors hergestellt und die Promotoraktivität mittels Luziferaseassay ermittelt. Für beide Konstrukte zeigte sich ein ähnliches Bild (Abbildung 3.32). Die Expression der *Firefly*-Luziferase wurde durch die Insertion der beiden Promotorkonstrukte im Vergleich zum leeren Vektor gesteigert. Die Promotoraktivität ließ sich in beiden Konstrukten nicht durch Stimulation mit verschiedenen Zytokinen induzieren (nicht gezeigt). Durch Inkubation mit α -Tocopherol wurde in den TAP-transfizierten Zellen eine Reduktion der basalen Promotoraktivität erreicht. In den mock-transfizierten Zellen zeigte sich kein Einfluss von Vitamin E. Die Aktivität des proximalen Promotors entspricht dem Oberflächenexpressionsmuster von ITGB2. Somit lässt sich der Effekt von TAP in Kombination mit Vitamin E auf eine differentielle Aktivität des proximalen Promotors zurückführen.

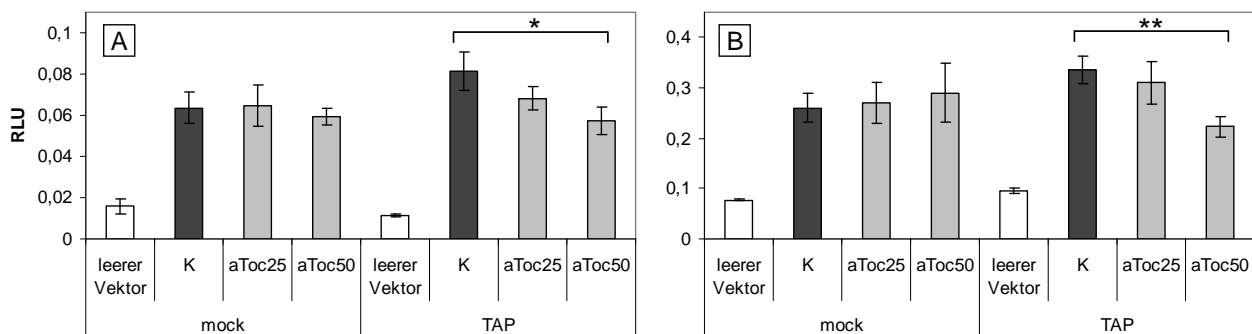


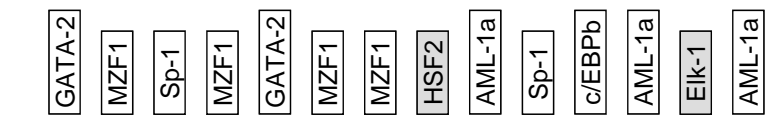
Abbildung 3.32: Einfluss von TAP und Vitamin E auf den proximalen Promotor von ITGB2. HeLa-Zellen wurden mit zwei unterschiedlichen Konstrukten, die für das Luziferasegen *Firefly* unter der Kontrolle des proximalen ITGB2-Promotors kodieren, transfiziert. Die Vektoren unterschieden sich in der Länge der verwendeten Promotorfragmente. Während das erste Fragment eine Größe von 1.138 bp besaß (A), war das zweite Fragment mit 593 bp erheblich kürzer (B). Für beide Konstrukte wurde der Einfluss von α -Tocopherol bei TAP-Überexpression untersucht. RLU = *relative light units*; aToc25 = 25 μ M α -Tocopherol; aToc50 = 50 μ M α -Tocopherol; K = Kontrolle; (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$.

3.5.4 Identifizierung der von TAP und α -Tocopherol beeinflussten Transkriptionsfaktoren in unstimulierten Zellen.

Die bisherigen Ergebnisse zeigten für die proximalen Promotoren von ITGB2 und ICAM-1 ein ähnliches Bild: In unstimulierten Zellen wurde nach TAP-Überexpression eine Vitamin E-abhängige Verminderung der basalen Promotoraktivität gemessen. Diese Reduktion ließ sich nicht auf einen Einfluss des NF κ B-Signalwegs zurückführen, da die basale NF κ B-Aktivität durch α -Tocopherol nicht verändert wurde und der proximale ITGB2-Promotor keine NF κ B-*response*-Elemente enthielt. Um den Einfluss von α -Tocopherol nach TAP-Transfektion auf die beiden proximalen Promotoren näher zu charakterisieren und beteiligte Transkriptionsfaktoren bzw. *Response*-Elemente zu identifizieren, wurden die möglichen Transkriptionsfaktorbindestellen auf den beiden Promotorfragmenten der

Vektoren pGL3B-ICAM-1 und pGL3B-ITGB2 mit dem Softwareprogramm TFSEARCH (www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH) ermittelt und die auf beiden Abschnitten vorkommenden Bindestellen herausgefiltert. Der Vergleich zeigte, dass verschiedene Transkriptionsfaktorbindestellen auf beiden Abschnitten vertreten waren (Abbildung 3.33). Auffällig waren die beiden Transkriptionsfaktoren Elk-1 und c/EBPb, die durch MAP-Kinasen aktiviert werden, sowie der Transkriptionsfaktor *heat-shock factor-2* (HSF-2). Um eine Beteiligung der Transkriptionsfaktoren Elk-1 und HSF-2 zu untersuchen, wurden Reporteragenassays durchgeführt.

ITGB2



ICAM-1



Abbildung 3.33: Schematische Darstellung der auf den Promotorfragmenten potentiellen Transkriptionsfaktorbindestellen.

Der Vergleich der beiden Promotorfragmente von ITGB2 und ICAM-1 ergab, dass mehrere potentielle Transkriptionsfaktorbindestellen auf beiden Fragmenten vorkommen. Neben den Konsensussequenzen für die MAPK-abhängigen Transkriptionsfaktoren Elk-1 und c/EBPb war die Konsensussequenz für HSF-2 besonders interessant. In der Darstellung wurden *Response*-Elemente, die nur auf einem der Abschnitte vorkommen, nicht berücksichtigt. Die grau unterlegten *Response*-Elemente wurden in der vorliegenden Arbeit weiter untersucht.

3.5.4.1 Einfluss von α -Tocopherol auf den Elk-1-Signalweg

Eine Beteiligung von Elk-1 an der α -Tocopherol-abhängigen Reduktion der basalen Promotoraktivität von ICAM-1 und ITGB2 nach TAP-Transfektion sollte über einen Trans-Reporteragenassay analysiert werden. Dafür wurden HeLa-Zellen mit α -Tocopherol für 16 h vorinkubiert und anschließend mit TAP oder dem leeren Vektor und den Reporteragenplasmiden transfiziert. Nach 24-stündiger Kultur wurde die Luziferaseaktivität ermittelt. In den mock-transfizierten Zellen war kein Effekt von α -Tocopherol auf die Aktivität des Elk-1-abhängigen Reporterpromotors nachweisbar (Abbildung 3.34). Im Gegensatz dazu wurde in den TAP-transfizierten Zellen eine Verminderung der Luziferaseaktivität durch Inkubation mit α -Tocopherol im Vergleich zur Vitamin E-defizienten Kontrolle detektiert.

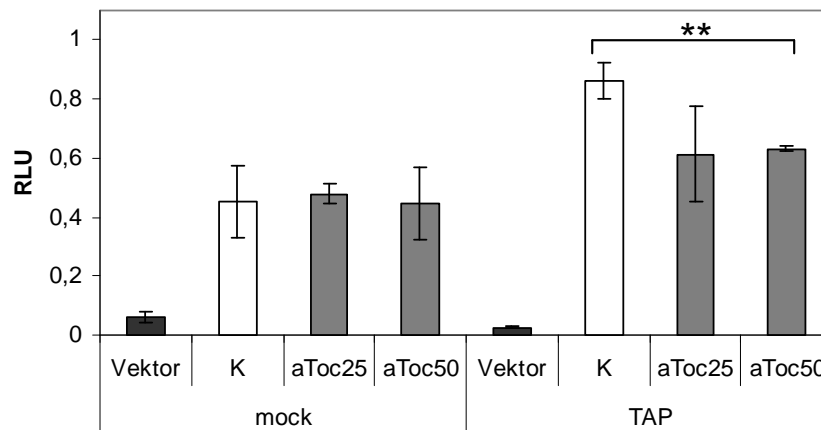


Abbildung 3.34: Einfluss von α -Tocopherol auf den Elk-1-Signalweg.

HeLa-Zellen wurden mit 25 μ M bzw. 50 μ M α -Tocopherol vorinkubiert und mit TAP bzw. dem leeren Kontrollvektor (mock) sowie den Reportergenvektoren (pFA-Elk-1, pFA-Luc, pRL-TK) transfiziert und für 24 h kultiviert. Anschließend wurde die Luziferaseaktivität gemessen. aToc25 = 25 μ M α -Tocopherol; aToc50 = 50 μ M α -Tocopherol; K = Kontrolle; RLU = *relative light units*; (**) $p < 0,01$.

Da der Transkriptionsfaktor Elk-1 durch die MAPKs p38, ERK1/2 und JNK1/2 aktiviert werden kann, wurde die basale Promotoraktivität in Anwesenheit verschiedener pharmakologischer Inhibitoren untersucht. Der Inhibitor U0126 hemmt MEK1/2, die für die Aktivierung von ERKs nötig sind. Der JNK-Inhibitor II inhibiert spezifisch JNKs, und der Inhibitor SB203580 hemmt die Aktivierung von p38.

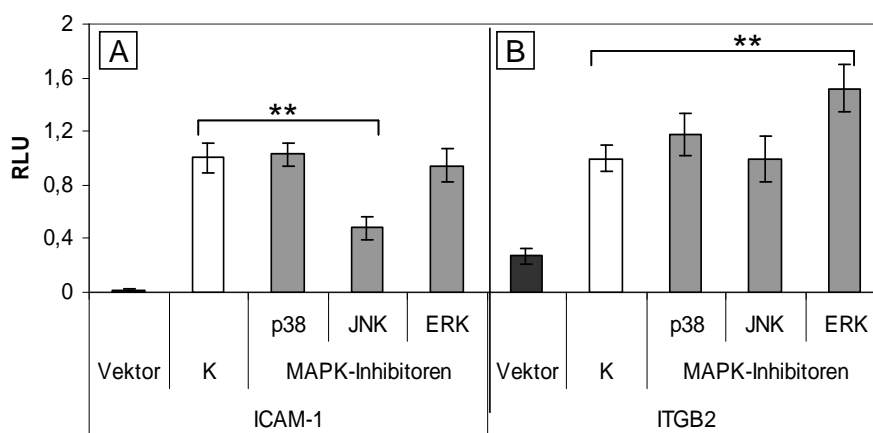


Abbildung 3.35: Einfluss von MAPK-Inhibitoren auf die basale Promotoraktivität von ICAM-1 und ITGB2.

HeLa-Zellen wurden mit TAP und den Reportergenvektoren für die Detektion der Promotoraktivität von ICAM-1 (A) und ITGB2 (B) transfiziert und 6 h kultiviert. Es folgte die Inkubation mit den verschiedenen pharmakologischen Inhibitoren für 18 h. Die Aktivierung von p38 wurde durch den Inhibitor SB203580, die von JNK1/2 durch den JNK-Inhibitor II und die von ERK1/2 durch den Inhibitor U0126 spezifisch gehemmt. K = Kontrolle; RLU = *relative light units*.

Eine Inhibition von MAPKs bewirkte keine gemeinsam veränderte Promotoraktivität von pGL3B-ICAM-1 und pGL3B-ITGB2 (Abbildung 3.35). Auffallend war, dass die Inhibierung der MEK1/2 durch

U0126 zu einer gesteigerten basalen Expression von ITGB2 führte und dass die Hemmung der JNKs durch den JNK-Inhibitor II eine reduzierte basale ICAM-1-Promotoraktivität bewirkt. Das zweite Ergebnis lässt auf eine Beteiligung von JNKs an der basalen Expression von ICAM-1 schließen, während diese bei der Expression von ITGB2 nicht involviert sind. Dieses Phänomen könnte auf eine AP-1-Konsensus-Sequenz im Promotor von ICAM-1 zurückzuführen sein.

3.5.4.2 Einfluss von α -Tocopherol auf *heat-shock-factor*-vermittelte Signalwege

Ein weiterer Transkriptionsfaktor, der in der Reduktion der basalen Promotoraktivität involviert sein könnte, ist HSF-2. HSF-2 bindet wie auch HSF-1 an *Heat-shock-factor-response*-Elemente. Um einen möglichen Einfluss von HSF-2 zu ermitteln, wurden Reporterassays für *heat-shock-factor*-vermittelte Signalwege durchgeführt. Hierfür wurden HeLa-Zellen mit α -Tocopherol inkubiert, mit TAP oder dem Leervektor transfiziert und nach 18-stündiger Kultur die Luziferaseaktivität ermittelt.

In den mock-transfizierten Zellen ergab sich kein Unterschied in der Luziferaseaktivität zwischen den Vitamin E-defizienten und α -Tocopherol-behandelten Zellen. Nach TAP-Transfektion wurde eine signifikante Abnahme der Aktivität *heat-shock-factor*-vermittelter Signalwege nach Inkubation mit 50 μ M α -Tocopherol im Vergleich zu den Vitamin E-defizienten Zellen nachgewiesen (Abbildung 3.36).

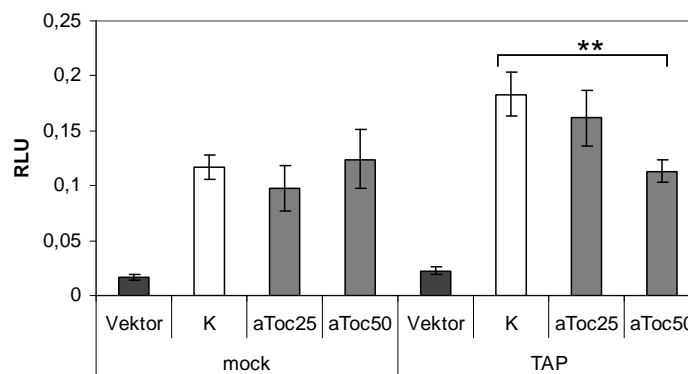


Abbildung 3.36: Einfluss von α -Tocopherol auf die *heat-shock-factor*-vermittelten Signalwege. HeLa-Zellen wurden mit 25 μ M oder 50 μ M α -Tocopherol inkubiert oder Vitamin E-defizient belassen und nach 16 h Kultur mit TAP bzw. dem Kontrollvektor sowie den entsprechenden Reporter-genvektoren transfiziert und für weitere 18 h kultiviert. Anschließend wurde die Luziferaseaktivität detektiert. RLU = *relative light units*; aToc25 = 25 μ M α -Tocopherol; aToc50 = 50 μ M α -Tocopherol; (**) $p < 0,01$.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Überexpression von TAP zu einer Sensibilisierung der Zellen für α -Tocopherol führt. So wird in den beiden Promotorkonstrukten für ICAM-1 und ITGB2 eine α -Tocopherol-abhängige Reduktion der Aktivität gemessen. Zwei mögliche Transkriptionsfaktoren, auf die dieser Effekt zurückgeführt werden könnte, sind Elk-1 und HSF-2. Für beide kann eine α -Tocopherol-vermittelte Aktivitätsverminderung nach TAP-Transfektion gezeigt werden. Durch Verwendung von Inhibitoren wird jedoch eine gemeinsame Regulation durch MAPK bei der basalen Expression ausgeschlossen. Ein verbleibender möglicher Kandidat ist HSF-2 und die *heat-shock-factor*-vermittelten Signalwege.

3.5.5 Einfluss der GTPase-Funktionsdomänen von TAP auf Vitamin E-vermittelte Effekte

Das TAP-Protein zeigt eine schwache GTPase-Aktivität (Habermehl *et al.*, 2005). Um eine mögliche Beteiligung der GTPase-Aktivität an der TAP-vermittelten α -Tocopherol-Sensitivierung nachzuweisen, wurde die Sequenz von TAP durch ortsgerichtete Mutagenese verändert. Das Strukturelement Walker-B-Box mit der Konsensussequenz DxxG („x“ steht für eine beliebige Aminosäure) ist in dreifacher Kopie in der TAP-Sequenz vorhanden. Die invariante Aminosäure Asparaginsäure ist für die Bindung des katalytischen Mg^{2+} nötig und so für eine funktionelle GTPase-Aktivität essentiell (Walker *et al.*, 1982). Die GTPase-Aktivität kann durch Mutagenese, bei der in der Walker-B-Domäne die polare, geladene Asparaginsäure durch die unpolare Aminosäure Alanin ersetzt wird, inaktiviert werden (Lu *et al.*, 2001; Tanabe *et al.*, 2004). In der TAP-Sequenz wurde die Aminosäure Asparaginsäure an den Positionen 92, 101 und 154 durch die Aminosäure Alanin ausgetauscht. Das entstandene Konstrukt pcDNA-DEST40-TAP^{(D→A)₃} wird im Folgenden als TAP^(Δ GTPase) bezeichnet.

3.5.5.1 Einfluss der GTPase-Domänen von TAP auf die Aktivität des ICAM-1-Promotors

Wie bereits gezeigt, kann die Aktivität des ICAM-1-Promotors nach TAP-Transfektion durch α -Tocopherol reduziert werden (Abbildung 3.26). Der Vergleich von Wildtyp-TAP mit der mutierten Form TAP^(Δ GTPase) sollte zeigen, inwieweit eine GTPase-Aktivität für dieses Phänomen verantwortlich ist.

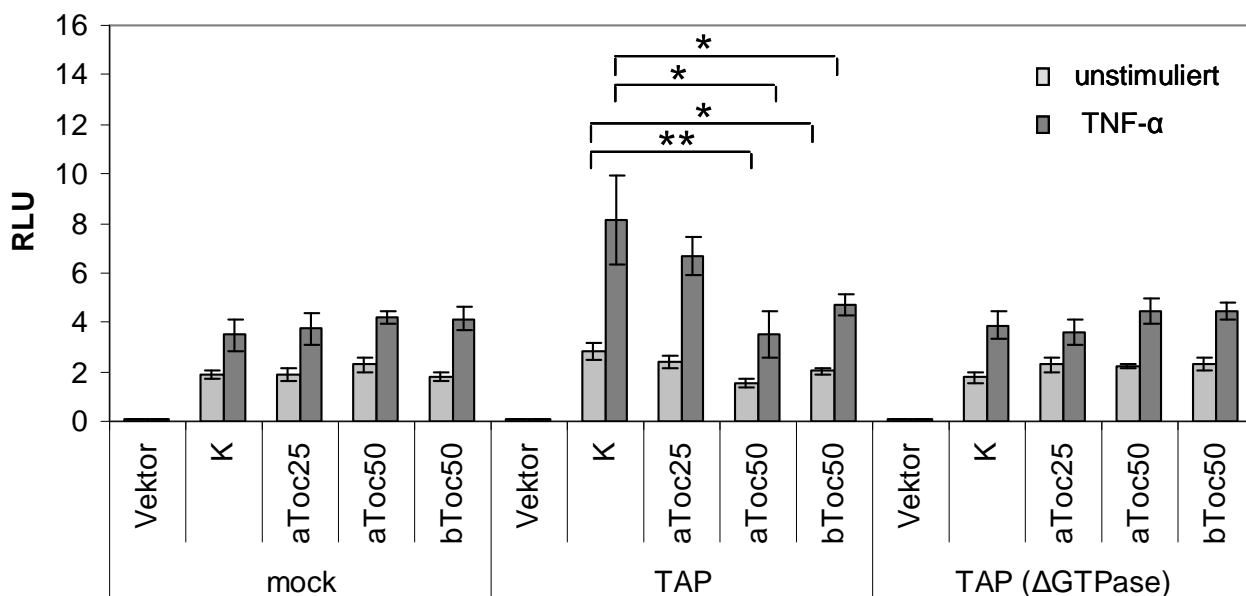


Abbildung 3.37: Einfluss von TAP und Vitamin E auf die Promotoraktivität von ICAM-1.

HeLa-Zellen wurden mit dem Vektor pGL3B-ICAM-1, der für das Luziferasegen *Firefly* unter der Kontrolle des proximalen ICAM-1-Promotors kodiert, transfiziert. Der Einfluss von TAP-Überexpression wurde in Anwesenheit verschiedener Vitamin E-Formen untersucht. aToc25 = 25 μ M α -Tocopherol; aToc50 = 50 μ M α -Tocopherol; bToc50 = 50 μ M β -Tocopherol; K = Kontrolle; RLU = *relative light units*; (*) $p < 0,05$; (**) $p < 0,01$.

Für diese Experimente wurden HeLa-Zellen mit 25 μM oder 50 μM α -Tocopherol bzw. 50 μM β -Tocopherol inkubiert oder Vitamin E-defizient belassen. Nach 16-stündiger Kultivierung wurden die Zellen mit dem leeren Vektor pcDNA-DEST40, dem TAP-Konstrukt oder mit dem mutierten TAP-Konstrukt sowie den für die Detektion nötigen Reporter-genvektoren transfiziert und nach 8 h mit TNF- α stimuliert. Wie aus Abbildung 3.37 hervorgeht, wurde nach TAP-Transfektion eine Reduktion der Promotoraktivität durch Inkubation mit Vitamin E nachgewiesen. Ein Vergleich zwischen den beiden Vitamin E-Formen ergab, dass der Effekt durch Inkubation sowohl mit α -Tocopherol als auch mit β -Tocopherol beobachtet werden konnte. In HeLa-Zellen, die mit dem mutierten TAP transfiziert wurden, fand keine Vitamin E-abhängige Modulation der ICAM-1 Promotoraktivität statt. Auffällig war außerdem, dass die durch TAP erhöhte TNF- α -induzierte Reporter-genaktivität in den TAP^(Δ GTPase)-transfizierten Zellen zurückging. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die GTPase-Domänen einen entscheidenden Anteil an der TAP-Funktionalität haben.

3.5.5.2 Einfluss der GTPase-Domänen von TAP auf Signaltransduktionswege

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass nach Überexpression von TAP verschiedene Signalwege, darunter NF κ B- und *heat-shock-factor*-vermittelte Signalwege durch Vitamin E in ihrer Aktivität reduziert wurden. Um eine mögliche Bedeutung der GTPase-Domänen von TAP für die Beeinflussung dieser Signalwege zu ermitteln, wurden Reporter-genassays mit dem Wildtyp-TAP und der mutierten Form TAP^(Δ GTPase) durchgeführt.

HeLa-Zellen wurden mit 50 μM α -Tocopherol inkubiert und mit den entsprechenden Vektoren transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit 20 ng/ml IL-1 β für 16 h stimuliert und anschließend die Luziferaseaktivität gemessen.

Wie aus Abbildung 3.38 hervorgeht, wurde in TAP-transfizierten Zellen die NF κ B-Aktivität nach Stimulation mit IL-1 β durch eine Inkubation mit 50 μM α -Tocopherol vermindert. Dieser Effekt war in den Zellen, die mit der TAP-Mutante transfiziert wurden, nicht detektierbar. Für die *heat-shock-factor*-vermittelten Signalwege zeigte sich ein ähnliches Bild. Während Stimulation mit IL-1 β zu einer kaum veränderten Signalstärke führte, konnte durch Inkubation mit 50 μM α -Tocopherol nach TAP-Transfektion die Aktivität des Reporter-gens signifikant reduziert werden. Der Vergleich mit den TAP^(Δ GTPase)-Konstrukt ergab, dass die eingeführten Mutationen zu einem Verlust dieses Effektes führen und so die Aktivität der *heat-shock-factor*-vermittelten Signalwege nicht durch Vitamin E beeinflussbar war.

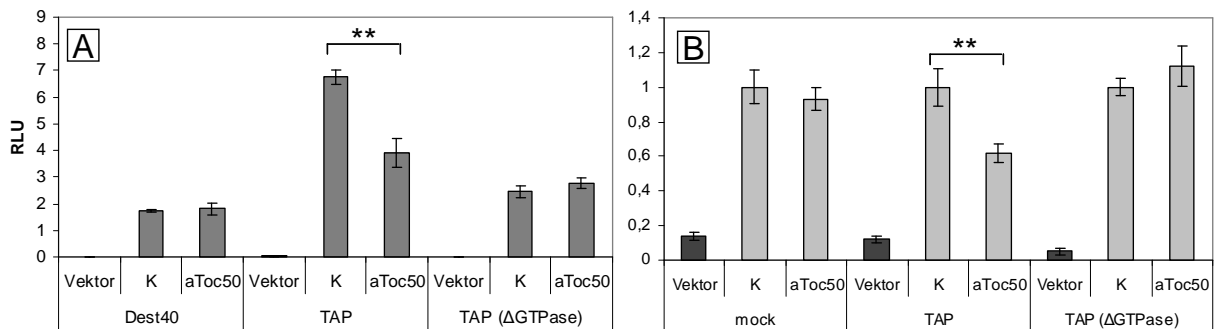


Abbildung 3.38: Einfluss der GTPase-Domänen von TAP auf die Signalwege von NF κ B und HSF. HeLa-Zellen wurden mit 50 μ M α -Tocopherol inkubiert oder blieben Vitamin E-defizient. Nach 16-stündiger Kultivierung folgte eine Transfektion entweder mit dem leeren Vektor (mock), dem Wildtyp-TAP oder mit dem mutierten TAP (TAP(Δ GTPase)). (A) Anschließend wurden die Zellen mit 20 ng/ml IL-1 β für 18 h stimuliert. Die Aktivierung von NF κ B wurde mittels Reportergen-Assay ermittelt. (B) Hier wurden die Zellen unstimuliert belassen, weitere 18 h kultiviert und die Aktivierung von *heat-shock-factor*-vermittelten Signalwegen mittels Reportergen-Assay ermittelt. K = Kontrolle; RLU = *relative light units*; aToc25 = 25 μ M α -Tocopherol; aToc50 = 50 μ M α -Tocopherol; (**) $p < 0,01$.

Fazit: Der Vergleich zwischen TAP-Wildtyp und der Mutante zeigt einen deutlichen Einfluss der GTPase-Domänen auf die Vermittlung von Vitamin E-spezifischen Effekten. Die Zerstörung der GTPase-Domänen resultiert im Verlust der TAP-vermittelten transkriptionellen Regulation durch Vitamin E. Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die GTPase einen entscheidenden Anteil an der Funktionalität von TAP hat.

4 Diskussion

4.1 Zur Fragestellung

Verschiedene degenerative und chronische Erkrankungen sind mit oxidativem Stress assoziiert (Mates *et al.*, 1999). Die Dysregulation der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) durch verminderten Abbau oder durch eine gesteigerte Produktion führt zu einer Vielzahl unterschiedlicher zellulärer Schädigungen wie Proteinoxidation, DNA-Strangbruch und Lipidperoxidation. Da ROS eine wichtige Rolle bei der Vermittlung entzündungsassoziierter Signalwege spielen, greift eine Dysregulation von ROS ebenfalls in entzündliche Prozesse ein. Die Zelle schützt sich vor oxidativem Stress durch eine Vielzahl antioxidativer Mechanismen. Die Hauptkomponente der lipophilen Antioxidantien ist das Vitamin E. Durch Unterbrechung radikalischer Kettenreaktionen schützt es Membranen und Lipoproteine vor Lipidperoxidation und kann dadurch Erkrankungen wie z.B. Arteriosklerose entgegenwirken. Allerdings sind für unterschiedliche individuelle Vitamin E-Formen verschiedene physiologische Aktivitäten beschrieben worden, die nicht immer durch ihre biologische Rolle als Antioxidantien erklärbar sind (Ricciarelli *et al.*, 2001). Vitamin E beeinflusst Signaltransduktionsprozesse, Enzymaktivität und Genexpression. Außerdem sind antiinflammatorische Effekte wie z.B. Inhibition der Monozyten-Endotheladhäsion beschrieben worden (Devaraj *et al.*, 1996). Die Identifizierung des α -Tocopherol-assoziierten Proteins (TAP), eines Vitamin E-bindenden Proteins mit intrazellulärer Lokalisation, führte zu der Vermutung, dass TAP möglicherweise die nicht-antioxidativen Eigenschaften von Vitamin E vermittelt.

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, folgende Fragen zu beantworten:

- Kann Vitamin E im Zellkulturmodell die Expression entzündungsassoziierter Gene beeinflussen, und können sich durch Verwendung verschiedener Vitamin E-Formen Rückschlüsse auf den zugrundeliegenden Mechanismus ergeben?
- Kann das Tocopherol-bindende Protein TAP den Einfluss von Vitamin E modifizieren?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurde eine systematische Untersuchung der Genexpression nach Gabe von α -Tocopherol mittels Microarraytechnik durchgeführt. An ausgewählten Genen wurde auf Ebene der Proteinexpression die Wirksamkeit der beiden Vitamin E-Formen α -Tocopherol und β -Tocopherol verglichen. Die funktionelle Charakterisierung von TAP umfasste Expressionsanalysen, Analysen zur Aufnahme von Vitamin E, Signaltransduktions- und Promotorstudien sowie Untersuchungen an einer TAP-Mutante mit fehlenden GTPase-Domänen.

4.2 Der Einsatz von Vitamin E im Zellkulturmodell

Da die in der Zellkultur eingesetzten Medien und das FCS kein Vitamin E enthielten, entsprachen die primären Versuchsbedingungen einer Vitamin E-Defizienz. Beim Menschen tritt Vitamin E-Mangel nur sehr selten auf. Für die experimentellen Arbeiten hat dieser Umstand den Vorteil, dass die möglichen Effekte von Vitamin E deutlicher zum Vorschein treten. Weiterhin ermöglicht das Zellkulturmodell den Vergleich verschiedener Vitamin E-Formen, da für α -Tocopherol und β -Tocopherol gleiche Konzentrationen innerhalb der Zellen erreicht werden konnten.

In dieser Arbeit wurden keine Vitamin E-Derivate wie α -Tocopherol-Succinat oder α -Tocopherol-Acetat verwendet. Diese werden bevorzugt in Vitamin E-Supplementen eingesetzt, da sie eine erhöhte Stabilität gegenüber Oxidation aufweisen. Für die Zellkultur ist ihre bessere Löslichkeit in wässrigen Lösungen im Vergleich zum α -Tocopherol von Vorteil. Allerdings weisen sie einerseits durch die Veresterung am Kohlenwasserstoffgerüst (C6) keine antioxidativen Eigenschaften auf, und andererseits spielen sie im menschlichen Organismus keine Rolle, da die Esterbindungen bei der Aufnahme im Darm durch intestinale Esterasen gespalten werden. Des Weiteren wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen festgestellt, dass die Vitamin E-Derivate in der Zellkultur Eigenschaften zeigen, die von denen des α -Tocopherol abweichen (Suzuki & Packer, 1993; Nakamura *et al.*, 1998). Das exogen zugeführte Vitamin E ist in der Lage, in die Zellen zu gelangen und den intrazellulären Tocopherolgehalt konzentrationsabhängig zu steigern. Wie durch Experimente belegt werden konnte, war es auch als Antioxidans wirksam. So konnte eine Cuminperoxid/Hämin-vermittelte Lipidperoxidation durch Vitamin E-Inkubation wirksam verhindert werden (Abbildung 3.14). Weiterhin reduzierte eine Inkubation mit α -Tocopherol die intrazellulären Konzentrationen von ROS nach Stimulation mit H_2O_2 (Abbildung 3.13) und verminderte den durch oxidativen Stress vermittelten Zelltod (Abbildung 3.12).

Bei der Auswahl des Zellsystems mussten verschiedene Gesichtspunkte beachtet werden. Für die funktionelle Untersuchung von TAP ist es einerseits von Vorteil, auf Zelllinien zurückzugreifen, die kein endogenes TAP exprimieren. Andererseits ist es wichtig, eine Zelllinie zu verwenden, die eine gute Transfektionseffizienz für transiente Transfektionen aufweist. Der transienten Transfektion wurde der Vorzug gegeben, um immer eine statistisch ähnliche Zellpopulation als Grundlage einzusetzen. Die RT-PCR-Analyse ergab, dass die monozytäre Zelllinie THP-1 kein TAP exprimiert (Abbildung 3.21). Allerdings lassen sich THP-1-Zellen im Gegensatz zu anderen Zellen relativ schlecht transfizieren. Aus diesem Grund wurden HeLa-Zellen, eine humane epitheliale Cervixkarzinom-Zelllinie, eingesetzt. Sie zeigen zwar eine geringe Expression von TAP, sind aber bekannt für ihre effiziente Transfizierbarkeit.

4.3 Die Bedeutung von ROS im Entzündungsgeschehen

ROS spielen bei verschiedenen entzündlichen Vorgängen eine Rolle, z.B. beim *oxidative burst* im Rahmen der Pathogenabwehr durch Makrophagen und Neutrophile. Außerdem beteiligen sich ROS an Signaltransduktionsprozessen (Thannickal & Fanburg, 2000). In Übereinstimmung mit Daten aus

anderen Arbeitsgruppen zeigten die nicht-phagozytierenden HeLa-Zellen eine intrazelluläre Produktion von ROS nach Stimulation mit Zytokinen wie IL-1 β oder IFN γ . Die ROS dienen hier als *second messenger* und aktivieren Signalwege. Die Aktivierung von NF κ B, eines zentralen Signamoleküls für entzündliche Prozesse, ist redox-sensitiv. So kann die NF κ B-Untereinheit p65 nach exogener Gabe von Wasserstoffperoxid konzentrations- und zeitabhängig phosphoryliert werden (Abbildung 3.6), und NF κ B weist nach H₂O₂-Stimulation eine transkriptionelle Aktivität auf (Abbildung 3.7). Ein weiterer Signalweg, der in dieser Arbeit als redox-sensitiv identifiziert wurde, ist p38-Signalweg. Auch diese MAPK ist in entzündliche Vorgänge involviert. Das antioxidative Vitamin E reduziert die intrazelluläre Konzentration von ROS und kann somit Einfluss auf ROS-vermittelte Ereignisse im Entzündungsgeschehen nehmen.

4.4 Genregulation durch Vitamin E

Die Microarraytechnik ist eine innovative Analysemethode für die Untersuchung differentieller Genexpression. Sie ermöglicht es, in einem einzigen experimentellen Ansatz eine große Anzahl potentieller Zielgene der Vitamin E-Regulation zu betrachten und so ein Genexpressionsprofil zu erhalten. Der verwendete Microarray umfasste ca. 400 Gene, die im Zusammenhang mit Entzündungsreaktionen stehen. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass α -Tocopherol in der physiologischen Konzentration von 50 μ M die Expression entzündungsassoziierter Gene beeinflusst. Vorinkubation von HeLa-Zellen mit α -Tocopherol reduzierte die Expression von MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*), TGF- β 1 (*transforming growth factor beta-1*), L1CAM (*L1 cell adhesion molecule*) sowie ITGB1 (*integrin beta 1*) und ITGB2 (*integrin beta 2*). Damit nimmt Vitamin E Einfluss auf verschiedene Schlüsselereignisse im Entzündungsgeschehen wie Chemokin- und Zytokinproduktion sowie Adhäsion von Leukozyten.

MCP-1 ist ein potentes Chemokin, das Monozyten zum Ort des Entzündungsgeschehens rekrutiert. Im Microarrayexperiment wurde MCP-1 als ein α -Tocopherol-reguliertes Gen identifiziert. Dieser Befund ließ sich auf mRNA-Ebene nicht durch andere Techniken bestätigen, allerdings konnte auf Proteinebene eine negative Regulation festgestellt werden. Eine von α -Tocopherol abhängige Reduktion wird durch verschiedene Studien bestätigt. So zeigten Peluzio *et al.* (2003) einen Einfluss von α -Tocopherol auf mRNA- und Proteinexpression von MCP-1 in ApoE^{-/-}-*knockout*-Mäusen (Peluzio *et al.*, 2003). Zudem konnte in humanen Aortaendothelzellen (HEAC) eine Inhibition der IL-1 β -induzierten Produktion von MCP-1 und IL-8 durch α -Tocopherol demonstriert werden (Wu *et al.*, 1999).

TGF- β 1 ist ein multifunktionales Zytokin und vermittelt verschiedene Effekte im Immunsystem. Eine Langzeitstudie mit Vitamin E-Supplementation in Ratten zeigte, dass durch α -Tocopherol das basale Expressionsniveau von TGF- β 1 reduziert wird (Parola *et al.*, 1992). Weiterhin konnte durch Mutationsanalysen an der proximalen Promotorregion von CTGF (*connective tissue growth factor*) gezeigt werden, dass ein TGF- β 1-*response*-Element für die von α -Tocopherol abhängige Aktivierung der CTGF-Expression verantwortlich ist (Villacorta *et al.*, 2003). TGF- β 1 stimuliert die Synthese

verschiedener Matrixproteine wie Kollagen und Integrine. Von den entsprechenden Genen ist bekannt, dass sie durch α -Tocopherol modulierbar sind (Azzi *et al.*, 2004). TGF- β 1 ist möglicherweise für den pleiotrophen Effekt von Vitamin E verantwortlich.

Die anderen durch Vitamin E negativ regulierten Gene kodieren für die Adhäsionsmoleküle L1CAM, ITGB1 und ITGB2. Die Modulation von Adhäsionsmolekülen durch Vitamin E ist in früheren Untersuchungen bereits beschrieben worden (Heppner *et al.*, 1998; Islam *et al.*, 1998; Yoshikawa *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1999; Terasawa *et al.*, 2000; Yoshida *et al.*, 2000; Breyer & Azzi, 2001; Mine *et al.*, 2002; Noguchi *et al.*, 2003). Diese Befunde werden durch funktionale Studien unterstützt, in denen gezeigt wurde, dass die adhäsiven Eigenschaften verschiedener Zelltypen nach Stimulation durch α -Tocopherol reduziert werden (Azzi *et al.*, 2004). Die mRNA von L1CAM war im Microarrayexperiment um den Faktor 1,4 reduziert. L1CAM ist ein Adhäsionsmolekül, das hauptsächlich im Nervensystem exprimiert wird und in neuronale Migration, Synaptogenese und antiapoptotische Prozesse involviert ist (Kenwrick *et al.*, 2000). Die Expression von L1CAM wurde auch in nicht-neuronalen Geweben beschrieben, so etwa im intestinalen Kryptenepithel. Die Bedeutung einer Reduktion von L1CAM mit ihren möglichen Konsequenzen für das Entzündungsgeschehen bedarf weiterer Klärung.

Integrine sind Heterodimere aus einer Alpha- und Beta-Untereinheit und spielen als Rezeptoren für extrazelluläre Matrixproteine eine wichtige Rolle. Im Gegensatz zu klassischen Rezeptoren haben sie nicht nur die Fähigkeit, ein Signal von der Zelloberfläche ins Zellinnere zu leiten (*outside-in-signaling*), sondern sie lösen auch extrazelluläre Effektorantworten aus (*inside-out-signaling*) (Shattil & Ginsberg, 1997). Viele Integrine werden konstitutiv an der Zelloberfläche exprimiert und durch ihre Agonisten aktiviert (Sanchez-Mateos *et al.*, 1996). Integrine vermitteln teilweise interzelluläre Adhäsion, z.B. als Liganden von Adhäsionsmolekülen der Immunglobulinsuperfamilie wie ICAM-1 und VCAM-1. Das *very late antigen-1* (VLA-1), ein Heterodimer aus Integrin α 4 und Integrin β 1, ist der Ligand für VCAM-1, während das *leucocyte function antigen-1* (LFA-1), Heterodimer aus Integrin α L und Integrin β 2, an ICAM-1 bindet. So sind Integrine in die Adhäsion von Immunzellen an das Endothel involviert und vermitteln deren Extravasation. Für verschiedene Integrine konnte eine von Vitamin E abhängige Reduktion der Oberflächenexpression gezeigt werden. In Mikrogliazellen wurde nach Gabe von α -Tocopherol die Induktion einiger Adhäsionsmoleküle, darunter LFA-1 und VLA-1, beschrieben (Heppner *et al.*, 1998). Andere Arbeitsgruppen bestätigten die Reduktion von LFA-1 in Monozyten (Terasawa *et al.*, 2000; Mine *et al.*, 2002). Breyer und Azzi (2001) identifizierten die α -Integrine ITGA1-6 und ITGAV sowie das ITGB1 als Vitamin E-sensitiv (Breyer & Azzi, 2001).

ROS wurden mehrfach als Immunmodulatoren beschrieben. Da Vitamin E ein Antioxidans ist, könnte es die Genexpression über Verminderung der intrazellulären ROS verändern. Allerdings wurden für α -Tocopherol weitere intrazelluläre Effekte neben den antioxidativen Eigenschaften wie Inhibition der Protein Kinase C (PKC) (Boscoboinik *et al.*, 1991) oder 5-Lipoxygenase (Devaraj & Jialal, 1999) beschrieben, welche die Veränderungen in der Genexpression hervorrufen könnten. Ein Weg, um zwischen diesen möglichen Wirkmechanismen zu unterscheiden, ist die Verwendung anderer

Vitamin E-Isoformen wie z.B. β -Tocopherol, die strukturell eng mit α -Tocopherol verwandt sind und ähnliche antioxidative Potentiale aufweisen, aber die spezifischen Eigenschaften von α -Tocopherol wie die Inhibition der PKC nicht aufweisen. Breyer und Azzi (2001) beschrieben für die Reduktion der Oberflächenexpression verschiedener Integrine, darunter auch ITGB1, einen schwächeren Effekt für β -Tocopherol im Vergleich zu α -Tocopherol (Breyer & Azzi, 2001). Dieser Befund konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Der Vergleich zwischen den beiden Vitamin E-Formen α - und β -Tocopherol bezüglich der Proteinexpression von ITGB1, MCP-1 und TGF- β 1 zeigte, dass beide Tocopherole ähnliche Effekte hatten. Dieser Befund legt die Vermutung nahe, dass der Einfluss von Vitamin E über den Redox-Status der Zelle vermittelt wird und nicht über einen α -Tocopherol-spezifischen Mechanismus. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass Weber *et al.* (1996) eine Reduktion von Integrin α M durch Inkubation mit Vitamin C demonstrieren konnten (Weber *et al.*, 1996).

4.5 Funktionelle Analyse des α -Tocopherol-assoziierten Proteins

Im Jahre 2000 wurde ein neues α -Tocopherol-bindendes Protein, das α -Tocopherol-assoziierte Protein (TAP) identifiziert (Zimmer *et al.*, 2000). Es wurde der CRAL-TRIO Proteinfamilie zugeordnet, zu der auch das α -Tocopherol-Transfer-Protein (α -TTP) gehört. Während die Funktion von α -TTP gut charakterisiert ist, konnte für TAP bis heute keine eindeutige Funktion gefunden werden. Es wird angenommen, dass TAP möglicherweise in der Regulation der intrazellulären Konzentration von α -Tocopherol, im α -Tocopherol-Transport oder in der α -Tocopherol-vermittelten Signaltransduktion involviert sein könnte (Azzi *et al.*, 2002). Weitere mögliche Funktionen sind die Vermittlung der nicht-antioxidativen Eigenschaften von α -Tocopherol oder der Schutz von α -Tocopherol vor Vitamin E-metabolisierenden Enzymen.

4.5.1 Analyse des Expressionsprofils von TAP

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten zeigten eine gewebeabhängige Expression von TAP mit Schwerpunkten in Leber, Dünndarm, Thymus und Lunge (Abbildung 3.1 und 3.20). Dieses Ergebnis ist in guter Übereinstimmung mit Daten aus anderen Arbeitsgruppen. Shibata *et al.* (2001) zeigten in Rattengewebe eine Expression von TAP in Leber, Dünndarm, Hirn sowie Lunge und Haut. Zimmer *et al.* (2000) detektierten für humane Gewebe eine weit verbreitete Expression von TAP mit Schwerpunkten in Leber, Hirn und Prostata. Damit deutet sich für TAP eine relativ weite Verbreitung an, die auf eine ubiquitäre Funktion schließen lässt. Es ist nicht auszuschließen, dass TAP neben dem α -TTP als ein weiteres Transportprotein für Vitamin E dient, da es an Stellen der Aufnahme (Dünndarm) und der Weiterverbreitung (Leber) stark exprimiert wird. Allerdings wird es auch in anderen Geweben exprimiert, die nicht im Zusammenhang mit dem Transport von Vitamin E stehen. Interessanterweise zeigt sich, dass TAP in Geweben exprimiert wird, in denen für Vitamin E besondere Eigenschaften beschrieben wurden. So führt Vitamin E-Mangel z.B. durch Mutation des

α -TTP-Gens (AVED) oder Absorptionsstörungen zu neurologischen Störungen (Ataxie), wobei *Cerebellum* und *Medulla oblongata* betroffen sind. Zimmer *et al.* (2000) konnten in diesen beiden neuronalen Geweben eine starke Expression von TAP beschreiben. In humanem Prostatagewebe wurde ebenfalls eine starke TAP-Expression detektiert. Gleichzeitig wurde durch verschiedene klinische Studien festgestellt, dass Vitamin E-Supplementation einen positiven Effekt auf die Inzidenz und Mortalität bei Prostatakrebs hat (Heinonen *et al.*, 1998) und dass hohe Plasmakonzentrationen von Vitamin E mit niedrigeren Prostatakrebsrisiken verbunden sind (Gann *et al.*, 1999; Helzlsouer *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2000; Goodman *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2003). Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass TAP nicht nur an Vitamin E bindet, sondern wahrscheinlich auch in die Vermittlung der beobachteten Vitamin E-Effekte involviert ist. Wichtige Eigenschaften von Vitamin E sind seine antiinflammatorischen Effekte. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass TAP, wie die Daten der vorliegenden Arbeit zeigten, durch proinflammatorische Zytokine über NF κ B positiv reguliert wird und dass eine starke Expression von TAP im Thymus detektiert wurde. Diese Resultate könnten darauf hinweisen, dass TAP in entzündliche Vorgänge involviert ist und die antiinflammatorischen Eigenschaften von Vitamin E vermittelt.

In der vorliegenden Arbeit wurde TAP als ein Gen identifiziert, dessen Expression durch α -Tocopherol regulierbar ist (Abbildung 3.23). Im Gegensatz zu den Genen ITGB1, MCP-1, TGF- β 1 und L1CAM wurde es durch Inkubation mit α -Tocopherol in seiner Expression verstärkt. Eine solche Induktion wurde auch für das α -TTP beschrieben (Fechner *et al.*, 1998). Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass α -Tocopherol in seine eigene Prozessierung eingreift und seine Verteilung bzw. seine Verfügbarkeit über einen positiven Feedback-Mechanismus reguliert.

4.5.2 TAP vermittelt den inhibitorischen Einfluss von Vitamin E auf Signaltransduktionsprozesse

Der NF κ B-Signalweg ist redox-sensitiv, da verschiedene Antioxidantien und antioxidative Enzyme seine Aktivierung hemmen (Schreck *et al.*, 1992; Staal *et al.*, 1995; Manna *et al.*, 1998). In dieser Arbeit wurde ebenfalls eine Verbindung zwischen ROS-Entstehung und NF κ B-Aktivierung hergestellt. So zeigten sich nach Stimulation mit verschiedenen Zytokinen gesteigerte intrazelluläre Konzentrationen von ROS (Abbildung 3.8), und durch Inkubation mit H₂O₂ wurde der NF κ B-Signalweg aktiviert (Abbildung 3.7). Wie bereits erwähnt, hat NF κ B einen entscheidenden Einfluss auf entzündliche Vorgänge. Verschiedene Beobachtungen der antiinflammatorischen Eigenschaften von Vitamin E wie z.B. Reduktion der NF κ B-abhängigen Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 lassen vermuten, dass Vitamin E die NF κ B-Aktivität entweder direkt über Beeinflussung der Signalkomponenten oder über seinen Einfluss auf den Redox-Status der Zelle verändert.

Suzuki und Packer (1993) untersuchten den Effekt von α -Tocopherol und dem Vitamin E-Derivat α -Tocopherol-Succinat auf die TNF- α -induzierte NF κ B-Aktivität in Jurkat-Zellen und konnten eine NF κ B-Inhibition durch das α -Tocopherol-Derivat detektieren. In THP-1-Zellen, die mit Vitamin E-Succinat vorbehandelt waren, zeigte sich ebenfalls eine Inhibition der LPS-induzierten NF κ B-Aktivität,

während für α -Tocopherol kein Effekt nachweisbar war (Nakamura *et al.*, 1998). Diese Beobachtung stimmt mit den hier vorliegenden Resultaten überein. Im Reporterassay war die Aktivität des Transkriptionsfaktors NF κ B bei Vitamin E-Applikation in den mock-transfizierten Zellen nicht signifikant verändert. Vielmehr scheint der reduzierende Einfluss von Vitamin E auf den NF κ B-Signalweg in dem verwendeten Zellkulturmodell auf die Anwesenheit von TAP angewiesen zu sein. So ließ sich durch Steigerung des TAP-Expressionsniveaus mittels Überexpression ein deutlicher Effekt von Vitamin E nach Zytokinstimulation auf die NF κ B-Aktivität detektieren. In HeLa-Zellen wurde eine schwache endogene TAP-Expression nachgewiesen, deshalb ist es auch nicht überraschend, dass z.B. bei der NF κ B-Aktivierung in mock-transfizierten Zellen ein geringer Einfluss von α -Tocopherol detektierbar war. Allerdings deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die endogene Menge von TAP zu gering war, um signifikante Unterschiede zu erzeugen. Interessanterweise ist die Wirkung von α -Tocopherol-Succinat auf den NF κ B-Signalweg offenbar nicht durch TAP vermittelt, da in THP-1-Zellen, die - wie bereits erwähnt - kein TAP exprimieren, durch das Vitamin E-Derivat eine Hemmung der NF κ B-Aktivierung detektiert wurde.

Das Gen des Adhäsionsmolekül ICAM-1 wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen als ein Vitamin E-reguliertes Gen identifiziert, dessen Expression nach Stimulation mit IL-1 β reduziert war (Yoshikawa *et al.*, 1998; Wu *et al.*, 1999; Yoshida *et al.*, 2000). Auffälligerweise ist eine solche Regulation nur in verschiedenen primären Zellkulturen, z.B. in Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen (HUVEC) (Yoshikawa *et al.*, 1998; Yoshida *et al.*, 2000) oder in HAEC (Wu *et al.*, 1999) nicht aber in Krebszelllinien beschrieben worden. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte ein unterschiedliches Expressionsniveau von TAP in primären Kulturen und Krebszelllinien sein. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass in mock-transfizierten Zellen keine verminderte Promotoraktivität von ICAM-1 durch Inkubation mit Vitamin E nachgewiesen werden konnte. Eine Überexpression von TAP führte jedoch zu einer Tocopherol-vermittelten Reduktion. Ni *et al.* (2005) berichteten von einer reduzierten TAP-Expression in Prostatakrebszelllinien (LNCaP, DU-145, CWR22R) im Vergleich zu nicht-malignen Prostataepithelzellen (RWPE-1 und HPr-1). Zudem konnten die Autoren demonstrieren, dass eine Überexpression von TAP zu einem gesteigerten Effekt von Vitamin E in Hinblick auf Proliferationsinhibition führt (Ni *et al.*, 2005).

Die Effekte von Vitamin E auf die Aktivität des Transkriptionsfaktor Elk-1 und auf die Aktivierung von HSF-vermittelten Signalwegen scheinen ebenfalls auf die Anwesenheit von TAP angewiesen zu sein. Nach den hier vorliegenden Daten hatte Vitamin E allein keinen Einfluss auf die beiden Signalwege. Deren Aktivitäten sind in den mock-transfizierten Zellen bei Vitamin E-Applikation unverändert. Erst nach Überexpression von TAP war eine von Tocopherol abhängige Reduktion der Aktivierung belegbar.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (Ni *et al.*, 2005) führte die Überexpression von TAP nicht zu einem gesteigerten intrazellulären Tocopherolgehalt, wie HPLC-Analysen zeigten. Entsprechend lässt sich der reduzierende Einfluss von Tocopherol auf die Signaltransduktionswege nach Überexpression von TAP nicht auf den zellulären Tocopherolgehalt zurückführen. Das lässt

vermuten, dass nicht die Menge von Vitamin E sondern möglicherweise die Tocopherolverfügbarkeit im Zytoplasma oder TAP-vermittelte Interaktionen der Grund für die reduzierenden Eigenschaften von Tocopherol nach Überexpression von TAP sind.

Für die Vermittlung von Vitamin E-Effekten ist eine Vielzahl intrazellulärer Mediatoren beschrieben. Nach derzeitigen Modellvorstellungen wird zur Erklärung dieser Heterogenität die Existenz eines gemeinsamen Elementes in Form eines Rezeptors oder Co-Rezeptors postuliert, der mit Tocopherol und Transkriptionsfaktoren interagieren kann (Azzi *et al.*, 2004). Die hier vorgestellten Ergebnisse deuten darauf hin, dass TAP eine solche Rolle bei der Vermittlung von α -Tocopherol-abhängigen Effekten übernehmen könnte. Verstärkt wird diese Annahme durch die Anwesenheit spezifischer Strukturmerkmale, die TAP im Gegensatz zum α -TTP ausweist, wie die C-terminale GOLD-Domäne, über die TAP mit anderen Proteinen interagieren könnte, und die Existenz einer GTPase-Aktivität. Für TAP wurde außerdem eine Translokation in den Kern sowie eine transkriptionelle Aktivierung über ein TAP-Gal4-Fusionsprotein beschrieben, die von α -Tocopherol abhängig sind (Yamauchi *et al.*, 2001). Zusammenfassend deuten die hier vorgelegten Daten auf eine essentielle Bedeutung von TAP für Vitamin E-modulierte Prozesse hin.

4.5.3 TAP verändert die Genexpression unabhängig von α -Tocopherol

In Übereinstimmung mit Daten aus anderen Arbeitsgruppen konnten für TAP Effekte gezeigt werden, die von α -Tocopherol unabhängig waren. Ni *et al.* (2005) detektierten nach Überexpression von TAP eine von Vitamin E unabhängige Reduktion der Proliferation von Prostatakrebszellen. Diese Abnahme ist auf eine verminderte Phosphorylierung von AKT durch eine reduzierte Interaktion der beiden Untereinheiten p100 und p85 der Phosphoinositol-3-Kinase zurückzuführen. In der vorliegenden Arbeit wurden signifikante Unterschiede zwischen mock- und TAP-transfizierten Zellen in Hinblick auf die NF κ B-Aktivität gezeigt. Nach Überexpression von TAP ist die basale NF κ B-Aktivität verringert, während sie nach Stimulation mit IL-1 β erhöht ist. Diese Veränderungen können auf einen Einfluss von TAP auf die Genexpression verschiedener Signalkomponenten des IL-1-Signalwegs, die zur NF κ B-Aktivierung führen, zurückgeführt werden. Die Regulationsmechanismen des IL-1 β -Signalwegs zur Aktivierung von NF κ B sind komplex und umfassen multifunktionelle Signalkaskaden und positive wie negative Feedback-Mechanismen. Entsprechend ist es derzeit noch nicht möglich, die beobachteten Phänomene auf die differenzielle Genexpression einzelner Signalkomponenten zurückzuführen.

4.5.4 Die GTPase-Domänen sind essentiell für die Funktionalität von TAP

Im Jahre 2004 konnte gezeigt werden, dass TAP eine GTPase-Aktivität besitzt (Habermehl *et al.*, 2005). Sequenzanalysen erbrachten Hinweise auf Strukturelemente, die in G_{α} -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine vorkommen. Das vorhandene Walker-A-Motiv (auch als *P-Loop* bezeichnet) ist charakteristisch für eine Gruppe von NTPasen. Zusätzlich enthält TAP zwei Strukturelemente, die für Bindung und Hydrolyse von GTP spezifisch sind. Das Walker-B-Motiv (DxxG) kommt bei allen

GTPasen vor (Bourne *et al.*, 1991). Die konservierte Aminosäure Asparaginsäure bindet das katalytische Mg^{2+} , und Glycin bindet über eine Wasserstoffbrückenbindung das γ -Phosphat von GTP. Im Gegensatz zu den beschriebenen Konsensus-G-Domänen ist im TAP der *P-Loop* am C-terminalen Ende lokalisiert und das Walker-B-Motiv in dreifacher Kopie vorhanden (Habermehl *et al.*, 2005).

Im Allgemeinen dienen GTP-bindende Proteine als molekulare Schalter, die eine Vielfalt physiologischer Prozesse kontrollieren, darunter Zellwachstum, Differenzierung, vesikulärer und nukleärer Transport. Habermehl *et al.* vermuten, dass die GTPase-Aktivität möglicherweise für die Funktion von TAP entscheidend ist (Habermehl *et al.*, 2005). Interessanterweise wurde die Bindung von α -Tocopherol an TAP nicht durch die GTPase-Aktivität beeinflusst (Panagabko *et al.*, 2003). Zudem beeinflussten verschiedene Liganden, darunter α -Tocopherol, α -Tocopherolquinon, δ -Tocopherol, Phosphatidylinositol, Phosphatidylcholin nicht die GTPase-Aktivität von TAP (Habermehl *et al.*, 2005).

Die hier vorliegenden Daten zeigen erstmals, dass die GTPase-Domänen von TAP einen erheblichen Einfluss auf dessen Funktionalität haben. Die ortsgerichteten Mutationen, welche die Aminosäure Asparaginsäure in den Walker-B-Domänen durch ein Alanin ersetzen, verursachen den Verlust der Bindung des katalytischen Mg^{2+} und der GTP-Hydrolyse (Lu *et al.*, 2001; Tanabe *et al.*, 2004). Mit den eingefügten Mutationen geht einher, dass TAP seine Fähigkeit verliert, die spezifischen Eigenschaften von Vitamin E zu vermitteln. Durch Inkubation mit Vitamin E kann die durch IL-1 β induzierte NF κ B-Aktivität nicht mehr reduziert werden (Abbildung 3.38). Der Funktionsverlust von TAP zeigt sich deutlich an der Promotoraktivität von ICAM-1: Nur in Zellen mit Wildtyp-TAP, nicht aber in Zellen mit dem mutierten TAP, reduziert Vitamin E die Expression von ICAM-1. Zudem sind auch die Vitamin E-unabhängigen Eigenschaften von den GTPase-Domänen abhängig, da die TAP-vermittelte Steigerung der Promotoraktivität von ICAM-1 nach Stimulation mit TNF- α in Zellen, die die TAP-Mutante exprimieren, nicht nachweisbar war (Abbildung 3.37).

Die Strukturelemente der GTPase-Aktivität liegen in der Kristallstruktur des TAP-Proteins in räumlicher Nähe. Dieser Bereich verbindet die beiden Hauptdomänen, das CRAL-TRIO-Motiv und die GOLD-Domäne, miteinander. Es wird vermutet, dass diese Domänen unterschiedliche relative Konformationen einnehmen können (Habermehl *et al.*, 2005). Durch die Bindung von GDP bzw. GTP unterliegen GTPasen erheblichen Konformationsänderungen. Solche strukturellen Veränderungen im TAP-Protein könnten die Interaktion mit anderen Proteinen oder die Ligandenbindung maßgeblich beeinflussen.

4.6 Die Vitamin E-vermittelte Regulation entzündlicher Prozesse

Nach den hier vorgestellten Daten zeigt sich insgesamt eine komplexe Regulation verschiedener zellulärer Prozesse durch Vitamin E. Die im Microarrayexperiment identifizierten Gene TGF- β 1, MCP-1 und ITGB1 wurden durch α -Tocopherol und β -Tocopherol in ihrer Expression reduziert, was darauf hindeutet, dass Vitamin E in diesem Fall als Antioxidans über die Beeinflussung des Redox-Status wirkt. Für die Integrine ITGB1 und ITGB2 zeigte sich bei Inkubation mit α -Tocopherol

außerdem eine verminderte Oberflächenexpression nach IL-1 β -Stimulation. Diese Reaktion konnte nicht auf den redox-sensitiven Transkriptionsfaktor NF κ B zurückgeführt werden, wie in Reporterassays demonstriert wurde. Die Vermutung daher liegt nahe, dass diese Expressionsregulationen von endogenem TAP unabhängig waren, da HeLa-Zellen TAP nur in geringen Mengen exprimierten und THP-1-Zellen, in denen ebenfalls eine verminderte Expression von ITGB2 detektiert wurde, keine TAP-Expression zeigten. Andere Effekte wie die Tocopherol-spezifische Reduktion der Promotoraktivität von ICAM-1 und die Beeinflussung der Transkriptionsfaktoren NF κ B und Elk-1 sowie der HSF-vermittelten Signalwege wurden durch TAP vermittelt. Diese TAP-vermittelten Effekte werden nicht ausschließlich durch α -Tocopherol, sondern auch durch β -Tocopherol beeinflusst. Da TAP unterschiedliche Vitamin E-Formen binden kann, liegt es nahe, dass es auch die Effekte verschiedener Tocopherolformen vermittelt. Über den möglichen Mechanismus von TAP kann aufgrund der vorliegenden Daten nur spekuliert werden. Interessant ist in diesem Zusammenhang die endogene GTPase-Aktivität von TAP, die stark auf eine regulatorische und integrierende Funktion in der Signalkaskade hindeutet.

4.7 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit liefern Hinweise auf die Regulationsmechanismen durch Vitamin E und auf die Funktion von TAP als Vermittler Tocopherol-spezifischer Signaleffekte. Sie bieten eine Grundlage für weitere Fragestellungen. Ein Schwerpunkt sollte auf der weiteren Charakterisierung von TAP im Zellkulturmodell liegen, die Anhaltspunkte über den Funktionsmechanismus liefern kann.

- TAP weist das Strukturmotiv der GOLD-Domäne auf. Diese ist im Zusammenhang mit Protein-Proteininteraktionen beschrieben worden. Entsprechend sollte die Identifizierung von TAP-Interaktionspartnern erfolgen. Solche mit TAP interagierende Proteine könnten über die Screening-Methode des *Two-Hybrid-Systems* und *GST-pulldown* bzw. mit Ko-Immunitäzitation isoliert werden.
- Ein weitverbreiteter Regulationsmechanismus von Proteinaktivitäten sind Phosphorylierungen bzw. Dephosphorylierungen. Die TAP-Sequenz enthält verschiedene potentielle Phosphorylierungsstellen, deren Bedeutung für die Aktivität von TAP mittels ortsgerichteter Mutagenese zu untersuchen wäre.

Ein weiterer Schwerpunkt könnten auch Untersuchungen sein, die eindeutige Hinweise zur Funktion von TAP *in vivo* liefern. In diesem Kontext ergeben sich interessante genetische Befunde:

- Mutationen in Proteinen der CRAL-TRIO-Familie sind mit verschiedenen Erkrankungen assoziiert. Die Identifizierung eines TAP-assoziierten Krankheitsbildes könnte Aufklärung über die funktionelle Rolle von TAP *in vivo* geben.

Ein zusätzlicher Ansatz für zukünftige Untersuchungen sollte auf der Charakterisierung von weiteren Partnern im Vitamin E-System liegen.

- Im Zusammenhang mit Vitamin E wurde ein neues für den Organismus relevantes Vitamin E-Derivat, das Tocopherolphosphat, beschrieben.
- Für TAP wurden zwei homologe Proteine publiziert. Durch *In-vitro*-Studien könnte eine funktionelle Charakterisierung durchgeführt und dabei überprüft werden, ob die Homologe ähnliche Aufgaben wie TAP bei der Vermittlung Tocopherol-spezifischer Effekte haben.

Die Beantwortung dieser Fragen könnte einen Beitrag zum Verständnis der molekularen Grundlagen des Wirkmechanismus von Vitamin E leisten und Anhaltspunkte für den Nutzen von Vitamin E in der Prävention oder Therapie chronischer und degenerativer Krankheiten liefern.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Zytokine spielen eine wichtige Rolle bei der Koordination von Immunantworten. Nach Stimulation mit proinflammatorischen Zytokinen, z.B. *interleukin-(IL)-1 β* und *tumor necrosis factor- α* , kommt es intrazellulär zu einer Liganden-stimulierten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Die ROS beteiligen sich z.B. als *second messenger* an Vorgängen der Signaltransduktion. Eine Dysregulation der ROS-Produktion führt zu einem veränderten Redox-Status der Zelle, und dieser oxidative Stress wird mit der Entstehung und Progression verschiedener degenerativer und chronischer Erkrankungen im menschlichen Organismus in Verbindung gebracht. Vitamin E als Hauptkomponente der lipophilen Antioxidantien nimmt Einfluss auf den Redox-Status, indem es die intrazelluläre ROS-Konzentration verringert. Unter dem Begriff „Vitamin E“ werden acht verschiedene, strukturell eng verwandte Moleküle (α -, β -, γ - und δ -Tocopherole/Tocotrienole) zusammengefasst, von denen das α -Tocopherol die wichtigste Form für den menschlichen Organismus ist. Für verschiedene Vitamin E-Formen sind weitere Eigenschaften bekannt, die nicht mit dem antioxidativen Potential zusammenhängen. Für die Vermittlung von Effekten, die spezifisch für Vitamin E sind, ist eine Vielzahl intrazellulärer Mediatoren beschrieben. Nach derzeitigen Modellvorstellungen wird zur Erklärung dieser Heterogenität die Existenz eines gemeinsamen Elementes in Form eines Rezeptors oder Co-Rezeptors postuliert, der mit Tocopherol und Transkriptionsfaktoren interagieren kann. Ein Kandidat für dieses integrative Element ist das α -Tocopherol-assoziierte Protein (TAP), das intrazellulär lokalisiert ist, verschiedene Tocopherole binden kann und möglicherweise dabei Tocopherol-Signale umsetzt und vermittelt.

Die Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, zum einen, mit Hilfe entzündungsspezifischer Microarrays den Einfluss von Vitamin E auf die Expression entzündungsassoziierter Gene in der humanen Zellkultur näher zu charakterisieren. Zum anderen sollte die Rolle von TAP als möglicher Vermittler Vitamin E-abhängiger Effekte auf Genexpression und Signaltransduktion analysiert werden. Die Auswertung der differentiellen Genexpression, die durch Microarrayanalysen detektiert wurde, ergab, dass eine Inkubation mit 50 μ M D,L, α -Tocopherol zu einer erniedrigten Genexpression von *transforming growth factor- β 1* (TGF β 1), *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1), *integrin β 1* (ITGB1) und *L1 cellular adhesion molecule* (L1CAM) in unstimulierten Zellen führte. Diese Veränderungen konnten auf Proteinebene für TGF- β 1, MCP-1 und ITGB1 bestätigt werden. Da beide Vitamin E-Formen, α -Tocopherol und β -Tocopherol, gleiche Wirkung hatten, wirkt Vitamin E diesem Fall als Antioxidans über die Beeinflussung des zellulären Redox-Status. Als ein weiteres Vitamin E-reguliertes Gen wurde TAP identifiziert. Im Gegensatz zu den oben genannten Genen wird seine Expression durch α -Tocopherol verstärkt. Es konnte weiter gezeigt werden, dass TAP Vitamin E-abhängige Effekte auf Genexpression und Signaltransduktion vermittelt. Reporterassays mit dem proximalen Promotor von ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) zeigten, dass nach Überexpression von TAP Vitamin E die Promotoraktivität in unstimulierten und in mit IL-1 β stimulierten Zellen konzentrationsabhängig reduzieren konnte. In IL-1 β -stimulierten Zellen ließ sich dieser Effekt auf eine Tocopherol-vermittelte Inhibition des Signalwegs von *nuclear factor κ B* (NF κ B) zurückführen. Die basale Oberflächenexpression von *integrin β 2* (ITGB2) wurde über Beeinflussung des proximalen

Promotors bei Überexpression von TAP ebenfalls durch α -Tocopherol reduziert. Ein Vergleich der proximalen Promotoren von ICAM-1 und ITGB2 gab Hinweise auf weitere Signalwege, deren Aktivität nach Überexpression von TAP durch Vitamin E verändert werden konnten. Zu den beeinflussbaren Signalwegen gehören der Elk-1-Signalweg und die *heat-shock-factor*-vermittelten Signalwege, wie durch Reporterassays gezeigt werden konnte. Da die Überexpression von TAP im verwendeten Zellkulturmodell nicht zu einem gesteigerten zellulären Tocopherolgehalt führte, liegt es nahe zu vermuten, dass nicht die Menge von Vitamin E, sondern möglicherweise die Tocopherolverfügbarkeit im Zytoplasma oder TAP-vermittelte Interaktionen der Grund für die genrepressorischen Effekte von Tocopherol unter Überexpression von TAP sind. Untersuchungen mit einer TAP-Mutante, deren GTPase-Domänen deletiert waren, zeigten, dass die GTPase-Domänen von TAP einen entscheidenden Einfluss auf die Vermittlung Vitamin E-abhängiger Effekte haben. Dies ist der erste Beleg für eine Funktion von TAP in der Signaltransduktion.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass Vitamin E durch verschiedene Mechanismen in entzündliche Prozesse eingreift. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann für TAP eine wichtige Rolle als Vermittler der spezifischen Effekte von Vitamin E postuliert werden.

6 Summary

Cytokines play an important role in the coordination of immune responses. Stimulation with proinflammatory cytokines, e.g. interleukin-(IL)-1 β or tumour necrosis factor- α , leads to a ligand-stimulated intracellular production of reactive oxygen species (ROS). ROS participate in signal transduction processes e.g. as second messengers. Dysregulation of ROS production induces changes of the cellular redox status, and the resulting oxidative stress is involved in the development and progression of various degenerative and chronic human diseases. Vitamin E, the main component of the lipophilic antioxidants, influences the redox status by reducing the intracellular ROS concentration. The term "vitamin E" is used for a family of eight molecules of related structure (α -, β -, γ -, and δ -tocopherol/ tocotrienol), with α -tocopherol being the most important variant in human. Several vitamin E isoforms have physiological activities beyond their action as biological chain-breaking antioxidants. A variety of intracellular mediators of vitamin E-specific effects has been described. This heterogeneity of mediators of tocopherol action suggests the need of a common element that could be a receptor or a co-receptor able to interact both with tocopherol and transcription factors. One candidate for such an integrative element is α -tocopherol-associated protein (TAP) which is localized in the cytoplasm, binds to different tocopherols and may mediate tocopherol-dependent signals.

The aims of this thesis were to characterize the influence of vitamin E on the mRNA expression of inflammatory genes in a cell culture model using microarray techniques, and to analyse the role of TAP as a potential mediator of the vitamin E-dependent effects on gene expression and signal transduction.

The evaluation of the differential gene expression detected in microarray experiments showed that incubation with 50 μ M D,L- α -tocopherol reduced the gene expression of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), integrin β 1 (ITGB1) and L1 cellular adhesion molecule (L1CAM) in unstimulated cells. These changes were confirmed for TGF- β 1, MCP-1 and ITGB1 on the protein level. A comparison between α -tocopherol and β -tocopherol showed no differences suggesting that, in this context, vitamin E acts as an antioxidant by affecting the cellular redox status. The gene expression of TAP was found to be regulated by α -tocopherol as well. In contrast to the other regulated genes, the expression of TAP was upregulated by α -tocopherol. In addition, the results of the present study show that TAP mediates vitamin E-dependent effects on gene expression and signal transduction. The proximal promoter activity of intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) was reduced by α -tocopherol after TAP over-expression in unstimulated and IL-1 β -stimulated cells. In IL-1 β -treated cells, the effect was based on an α -tocopherol-mediated inhibition of the nuclear factor κ B (NF κ B) pathway. Similarly, the basal expression of integrin β 2 (ITGB2) was reduced by tocopherol-dependent effects on the proximal promoter after TAP overexpression. A comparison between the proximal promoters of ITGB2 and ICAM-1 provided information on additional signalling pathways that might be affected by vitamin E after TAP overexpression. The Elk-1 and heat shock factor pathways were shown to be regulated by tocopherol after

TAP overexpression. As TAP-overexpression did not increase cellular tocopherol content, it can be hypothesized that not the tocopherol amount, but the tocopherol availability in the cytoplasm or TAP-mediated interactions may be crucial for the effects of vitamin E on gene expression. Experiments with a GTPase-deleted TAP mutant revealed that GTPase domains of TAP are essential for mediating tocopherol-dependent effects.

To summarize, it was shown that vitamin E can regulate in inflammatory processes by different mechanisms. The results of this thesis work suggest an important role of TAP as a mediator of vitamin E-dependent effects.

7 LITERATUR

- Adolfsson O, Huber BT, Meydani SN (2001): Vitamin E-enhanced IL-2 production in old mice: naive but not memory T cells show increased cell division cycling and IL-2-producing capacity. *J. Immunol.* **167**: 3809-17.
- Akamatsu Y, Ohno T, Hirota K, Kagoshima H, Yodoi J, Shigesada K (1997): Redox regulation of the DNA binding activity in transcription factor PEBP2. The roles of two conserved cysteine residues. *J. Biol. Chem.* **272**: 14497-500.
- Akeson AL, Woods CW, Mosher LB, Thomas CE, Jackson RL (1991): Inhibition of IL-1 beta expression in THP-1 cells by probucol and tocopherol. *Atherosclerosis* **86**: 261-70.
- Ames BN (1989): Endogenous oxidative DNA damage, aging, and cancer. *Free Radic. Res. Commun.* **7**: 121-8.
- Anantharaman V, Aravind L (2002): The GOLD domain, a novel protein module involved in Golgi function and secretion. *Genome Biol.* **3**: research0023.
- Aratri E, Spycher SE, Breyer I, Azzi A (1999): Modulation of alpha-tropomyosin expression by alpha-tocopherol in rat vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* **447**: 91-4.
- Aravind L, Neuwald AF, Ponting CP (1999): Sec14p-like domains in NF1 and Dbl-like proteins indicate lipid regulation of Ras and Rho signaling. *Curr. Biol.* **9**: R195-7.
- Arend WP, Malyak M, Guthridge CJ, Gabay C (1998): Interleukin-1 receptor antagonist: role in biology. *Annu. Rev. Immunol.* **16**: 27-55.
- Arita M, Nomura K, Arai H, Inoue K (1997): alpha-tocopherol transfer protein stimulates the secretion of alpha-tocopherol from a cultured liver cell line through a brefeldin A-insensitive pathway. *Proc Natl. Acad. Sci. U S A* **94**: 12437-41.
- Azzi A, Aratri E, Boscoboinik D, Clement S, Ozer NK, Ricciarelli R, Spycher S (1998): Molecular basis of alpha-tocopherol control of smooth muscle cell proliferation. *Biofactors* **7**: 3-14.
- Azzi A, Ricciarelli R, Zingg JM (2002): Non-antioxidant molecular functions of alpha-tocopherol (vitamin E). *FEBS Lett.* **519**: 8-10.
- Azzi A, Gysin R, Kempna P, Munteanu A, Villacorta L, Visarius T, Zingg JM (2004): Regulation of gene expression by alpha-tocopherol. *Biol. Chem.* **385**: 585-91.
- Baeuerle PA, Baltimore D (1996): NF-kappa B: ten years after. *Cell* **87**: 13-20.
- Barella L, Muller PY, Schlachter M, Hunziker W, Stocklin E, Spitzer V, Meier N, de Pascual-Teresa S, Minihane AM, Rimbach G (2004): Identification of hepatic molecular mechanisms of action of alpha-tocopherol using global gene expression profile analysis in rats. *Biochim. Biophys. Acta.* **1689**: 66-74.
- Barella L, Rota C, Stocklin E, Rimbach G (2004): Alpha-tocopherol affects androgen metabolism in male rat. *Ann. N Y Acad. Sci.* **1031**: 334-6.
- Ben Hamida C, Doerflinger N, Belal S, Linder C, Reutenauer L, Dib C, Gyapay G, Vignal A, Le Paslier D, Cohen D, et al. (1993): Localization of Friedreich ataxia phenotype with selective vitamin E deficiency to chromosome 8q by homozygosity mapping. *Nat. Genet.* **5**: 195-200.
- Benomar A, Yahyaoui M, Marzouki N, Birouk N, Bouslam N, Belaidi H, Amarti A, Ouazzani R, Chkili T (1999): Vitamin E deficiency ataxia associated with adenoma. *J. Neurol. Sci.* **162**: 97-101.
- Beutler B (2003): Science review: key inflammatory and stress pathways in critical illness - the central role of the Toll-like receptors. *Crit. Care* **7**: 39-46.
- Bol GF, Tewes F, Brigelius-Flohe R (1999): Interleukin-1 signaling is dependent on free thiols. *Biofactors* **10**: 175-8.

- Bonizzi G, Piette J, Schoonbroodt S, Greimers R, Havard L, Merville MP, Bours V (1999): Reactive oxygen intermediate-dependent NF-kappaB activation by interleukin-1beta requires 5-lipoxygenase or NADPH oxidase activity. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 1950-60.
- Bonizzi G, Karin M (2004): The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* **25**: 280-8.
- Bonnert TP, Garka KE, Parnet P, Sonoda G, Testa JR, Sims JE (1997): The cloning and characterization of human MyD88: a member of an IL-1 receptor related family. *FEBS Lett.* **402**: 81-4.
- Boota A, Zar H, Kim YM, Johnson B, Pitt B, Davies P (1996): IL-1 beta stimulates superoxide and delayed peroxynitrite production by pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* **271**: L932-8.
- Boscoboinik D, Szewczyk A, Azzi A (1991): Alpha-tocopherol (vitamin E) regulates vascular smooth muscle cell proliferation and protein kinase C activity. *Arch. Biochem. Biophys.* **286**: 264-9.
- Boscoboinik D, Szewczyk A, Hensey C, Azzi A (1991): Inhibition of cell proliferation by alpha-tocopherol. Role of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **266**: 6188-94.
- Bourne HR, Sanders DA, McCormick F (1991): The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* **349**: 117-27.
- Bresnihan B, Alvaro-Gracia JM, Cobby M, Doherty M, Domljan Z, Emery P, Nuki G, Pavelka K, Rau R, Rozman B, Watt I, Williams B, Aitchison R, McCabe D, Musikic P (1998): Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Rheum.* **41**: 2196-204.
- Breyer I, Azzi A (2001): Differential inhibition by alpha- and beta-tocopherol of human erythroleukemia cell adhesion: role of integrins. *Free Radic. Biol. Med.* **30**: 1381-9.
- Brigelius-Flohe R, Kelly FJ, Salonen JT, Neuzil J, Zingg JM, Azzi A (2002): The European perspective on vitamin E: current knowledge and future research. *Am. J. Clin. Nutr.* **76**: 703-16.
- Brigelius-Flohe R, Banning A, Kny M, Bol GF (2004): Redox events in interleukin-1 signaling. *Arch Biochem. Biophys.* **423**: 66-73.
- Cachia O, Benna JE, Pedruzzi E, Descomps B, Gougerot-Pocidal MA, Leger CL (1998): alpha-tocopherol inhibits the respiratory burst in human monocytes. Attenuation of p47(phox) membrane translocation and phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **273**: 32801-5.
- Campbell SE, Stone WL, Whaley SG, Qui M, Krishnan K (2003): Gamma (gamma) tocopherol upregulates peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) gamma (gamma) expression in SW 480 human colon cancer cell lines. *BMC Cancer* **3**: 25.
- Canedas E, Boveris, A., Regan, Cl., et al. (1977): Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrom c reductase from beef-heart mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.*
- Carman-Krzan M, Wise BC (1993): Arachidonic acid lipoxygenation may mediate interleukin-1 stimulation of nerve growth factor secretion in astroglial cultures. *J. Neurosci. Res.* **34**: 225-32.
- Cerretti DP, Kozlosky CJ, Mosley B, Nelson N, Van Ness K, Greenstreet TA, March CJ, Kronheim SR, Druck T, Cannizzaro LA, et al. (1992): Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* **256**: 97-100.
- Chen FE, Huang DB, Chen YQ, Ghosh G (1998): Crystal structure of p50/p65 heterodimer of transcription factor NF-kappaB bound to DNA. *Nature* **391**: 410-3.
- Chojkier M, Houglum K, Lee KS, Buck M (1998): Long- and short-term D-alpha-tocopherol supplementation inhibits liver collagen alpha1(I) gene expression. *Am. J. Physiol.* **275**: G1480-5.
- Colotta F, Dower SK, Sims JE, Mantovani A (1994): The type II 'decoy' receptor: a novel regulatory pathway for interleukin 1. *Immunol. Today* **15**: 562-6.

- Constantinescu A, Han D, Packer L (1993): Vitamin E recycling in human erythrocyte membranes. *J Biol. Chem.* **268**: 10906-13.
- Daun JM, Fenton MJ (2000): Interleukin-1/Toll receptor family members: receptor structure and signal transduction pathways. *J. Interferon. Cytokine Res.* **20**: 843-55.
- Devaraj S, Li D, Jialal I (1996): The effects of alpha tocopherol supplementation on monocyte function. Decreased lipid oxidation, interleukin 1 beta secretion, and monocyte adhesion to endothelium. *J. Clin. Invest.* **98**: 756-63.
- Devaraj S, Adams-Huet B, Fuller CJ, Jialal I (1997): Dose-response comparison of RRR-alpha-tocopherol and all-racemic alpha-tocopherol on LDL oxidation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**: 2273-9.
- Devaraj S, Jialal I (1999): Alpha-tocopherol decreases interleukin-1 beta release from activated human monocytes by inhibition of 5-lipoxygenase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **19**: 1125-33.
- Devaraj S, Chan AV, Jr., Jialal I (2002): alpha-Tocopherol supplementation decreases plasminogen activator inhibitor-1 and P-selectin levels in type 2 diabetic patients. *Diabetes Care* **25**: 524-9.
- Dinareello CA, Goldin NP, Wolff SM (1974): Demonstration and characterization of two distinct human leukocytic pyrogens. *J. Exp. Med.* **139**: 1369-81.
- Douglas CE, Chan AC, Choy PC (1986): Vitamin E inhibits platelet phospholipase A2. *Biochim Biophys. Acta* **876**: 639-45.
- Dunne A, O'Neill LA (2003): The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal transduction during inflammation and host defense. *Sci. STKE* **2003**: re3.
- Dutta-Roy AK, Leishman DJ, Gordon MJ, Campbell FM, Duthie GG (1993): Identification of a low molecular mass (14.2 kDa) alpha-tocopherol-binding protein in the cytosol of rat liver and heart. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **196**: 1108-12.
- Evans HM, Bishop KS (1922): On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. *Science* **56**: 650-651.
- Fechner H, Schlame M, Guthmann F, Stevens PA, Rustow B (1998): alpha- and delta-tocopherol induce expression of hepatic alpha-tocopherol-transfer-protein mRNA. *Biochem. J.* **331 (Pt 2)**: 577-81.
- Finkel T (1998): Oxygen radicals and signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**: 248-53.
- Finkel T (1999): Signal transduction by reactive oxygen species in non-phagocytic cells. *J. Leukoc. Biol.* **65**: 337-40.
- Fischer A, Pallauf J, Gohil K, Weber SU, Packer L, Rimbach G (2001): Effect of selenium and vitamin E deficiency on differential gene expression in rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **285**: 470-5.
- Fratelli M, Demol H, Puype M, Casagrande S, Eberini I, Salmons M, Bonetto V, Mengozzi M, Duffieux F, Miclet E, Bachi A, Vandekerckhove J, Gianazza E, Ghezzi P (2002): Identification by redox proteomics of glutathionylated proteins in oxidatively stressed human T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **99**: 3505-10.
- Freedman JE, Farhat JH, Loscalzo J, Keane JF, Jr. (1996): alpha-tocopherol inhibits aggregation of human platelets by a protein kinase C-dependent mechanism. *Circulation* **94**: 2434-40.
- Gann PH, Ma J, Giovannucci E, Willett W, Sacks FM, Hennekens CH, Stampfer MJ (1999): Lower prostate cancer risk in men with elevated plasma lycopene levels: results of a prospective analysis. *Cancer Res.* **59**: 1225-30.
- Ghosh S, May MJ, Kopp EB (1998): NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* **16**: 225-60.
- Glineur C, Davioud-Charvet E, Vandebunder B (2000): The conserved redox-sensitive cysteine residue of the DNA-binding region in the c-Rel protein is involved in the regulation of the phosphorylation of the protein. *Biochem. J.* **352 Pt 2**: 583-91.

- Goodman GE, Schaffer S, Omenn GS, Chen C, King I (2003): The association between lung and prostate cancer risk, and serum micronutrients: results and lessons learned from beta-carotene and retinol efficacy trial. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Pre.* **12**: 518-26.
- Gopalakrishna R, Chen ZH, Gundimeda U (1997): Selenocompounds induce a redox modulation of protein kinase C in the cell, compartmentally independent from cytosolic glutathione: its role in inhibition of tumor promotion. *Arch. Biochem. Biophys.* **348**: 37-48.
- Goti D, Reicher H, Malle E, Kostner GM, Panzenboeck U, Sattler W (1998): High-density lipoprotein (HDL3)-associated alpha-tocopherol is taken up by HepG2 cells via the selective uptake pathway and resecreted with endogenously synthesized apo-lipoprotein B-rich lipoprotein particles. *Biochem. J.* **332 (Pt 1)**: 57-65.
- Goti D, Hrzenjak A, Levak-Frank S, Frank S, van der Westhuyzen DR, Malle E, Sattler W (2001): Scavenger receptor class B, type I is expressed in porcine brain capillary endothelial cells and contributes to selective uptake of HDL-associated vitamin E. *J. Neurochem.* **76**: 498-508.
- Greenfeder SA, Nunes P, Kwee L, Labow M, Chizzonite RA, Ju G (1995): Molecular cloning and characterization of a second subunit of the interleukin 1 receptor complex. *J. Biol. Chem.* **270**: 13757-65.
- Gurjar MV, Deleon J, Sharma RV, Bhalla RC (2001): Role of reactive oxygen species in IL-1 beta-stimulated sustained ERK activation and MMP-9 induction. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **281**: H2568-74.
- Gysin R, Azzi A, Visarius T (2002): Gamma-tocopherol inhibits human cancer cell cycle progression and cell proliferation by down-regulation of cyclins. *FASEB J.* **16**: 1952-4.
- Habermehl D, Kempna P, Azzi A, Zingg JM (2005): Recombinant SEC14-like proteins (TAP) possess GTPase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **326**: 254-9.
- Hallegua DS, Weisman MH (2002): Potential therapeutic uses of interleukin 1 receptor antagonists in human diseases. *Ann. Rheum. Dis.* **61**: 960-7.
- Halliwell B, Gutteridge JM (1986): Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch. Biochem. Biophys.* **246**: 501-14.
- Halliwell B, Cross CE (1994): Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. *Environ. Health Perspect* **102** Suppl **10**: 5-12.
- Hayashi S, Hajiro-Nakanishi K, Makino Y, Eguchi H, Yodoi J, Tanaka H (1997): Functional modulation of estrogen receptor by redox state with reference to thioredoxin as a mediator. *Nucleic Acids Res.* **25**: 4035-40.
- Heinonen OP, Albanes D, Virtamo J, Taylor PR, Huttunen JK, Hartman AM, Haapakoski J, Malila N, Rautalahti M, Ripatti S, Maenpaa H, Teerenhovi L, Koss L, Virolainen M, Edwards BK (1998): Prostate cancer and supplementation with alpha-tocopherol and beta-carotene: incidence and mortality in a controlled trial. *J. Natl. Cancer Inst.* **90**: 440-6.
- Helzlsouer KJ, Huang HY, Alberg AJ, Hoffman S, Burke A, Norkus EP, Morris JS, Comstock GW (2000): Association between alpha-tocopherol, gamma-tocopherol, selenium, and subsequent prostate cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **92**: 2018-23.
- Heppner FL, Roth K, Nitsch R, Hailer NP (1998): Vitamin E induces ramification and downregulation of adhesion molecules in cultured microglial cells. *Glia* **22**: 180-8.
- Herrera E, Barbas C (2001): Vitamin E: action, metabolism and perspectives. *J. Physiol. Biochem.* **57**: 43-56.
- Hirota K, Matsui M, Iwata S, Nishiyama A, Mori K, Yodoi J (1997): AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **94**: 3633-8.
- Hirota K, Murata M, Sachi Y, Nakamura H, Takeuchi J, Mori K, Yodoi J (1999): Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus. A two-step mechanism of redox regulation of transcription factor NF-kappaB. *J. Biol. Chem.* **274**: 27891-7.

- Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, Ezekowitz RA (1999): Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* **284**: 1313-8.
- Horiguchi M, Arita M, Kaempf-Rotzoll DE, Tsujimoto M, Inoue K, Arai H (2003): pH-dependent translocation of alpha-tocopherol transfer protein (alpha-TTP) between hepatic cytosol and late endosomes. *Genes Cells* **8**: 789-800.
- Hosomi A, Arita M, Sato Y, Kiyose C, Ueda T, Igarashi O, Arai H, Inoue K (1997): Affinity for alpha-tocopherol transfer protein as a determinant of the biological activities of vitamin E analogs. *FEBS Lett.* **409**: 105-8.
- Huang HY, Helzlsouer KJ, Appel LJ (2000): The effects of vitamin C and vitamin E on oxidative DNA damage: results from a randomized controlled trial. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **9**: 647-52.
- Huang HY, Alberg AJ, Norkus EP, Hoffman SC, Comstock GW, Helzlsouer KJ (2003): Prospective study of antioxidant micronutrients in the blood and the risk of developing prostate cancer. *Am J. Epidemiol.* **157**: 335-44.
- Ingold KU, Webb AC, Witter D, Burton GW, Metcalfe TA, Muller DP (1987): Vitamin E remains the major lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human plasma even in individuals suffering severe vitamin E deficiency. *Arch. Biochem. Biophys.* **259**: 224-5.
- Islam KN, Devaraj S, Jialal I (1998): alpha-Tocopherol enrichment of monocytes decreases agonist-induced adhesion to human endothelial cells. *Circulation* **98**: 2255-61.
- Jiang Q, Elson-Schwab I, Courtemanche C, Ames BN (2000): gamma-tocopherol and its major metabolite, in contrast to alpha-tocopherol, inhibit cyclooxygenase activity in macrophages and epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **97**: 11494-9.
- Jiang Q, Ames BN (2003): Gamma-tocopherol, but not alpha-tocopherol, decreases proinflammatory eicosanoids and inflammation damage in rats. *FASEB J.* **17**: 816-22.
- Kagan VE, Serbinova EA, Forte T, Scita G, Packer L (1992): Recycling of vitamin E in human low density lipoproteins. *J. Lipid Res.* **33**: 385-97.
- Kaiser S, Di Mascio P, Murphy ME, Sies H (1990): Quenching of singlet molecular oxygen by tocopherols. *Adv. Exp. Med. Biol.* **264**: 117-24.
- Karin M (1999): The beginning of the end: I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B activation. *J. Biol. Chem.* **274**: 27339-42.
- Karin M, Ben-Neriah Y (2000): Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu. Rev. Immunol.* **18**: 621-63.
- Kempna P, Zingg JM, Ricciarelli R, Hierl M, Saxena S, Azzi A (2003): Cloning of novel human SEC14p-like proteins: ligand binding and functional properties. *Free Radic. Biol. Med.* **34**: 1458-72.
- Kempna P, Reiter E, Arock M, Azzi A, Zingg JM (2004): Inhibition of HMC-1 mast cell proliferation by vitamin E: involvement of the protein kinase B pathway. *J. Biol. Chem.* **279**: 50700-9.
- Kenwrick S, Watkins A, De Angelis E (2000): Neural cell recognition molecule L1: relating biological complexity to human disease mutations. *Hum. Mol. Genet.* **9**: 879-86.
- Klatt P, Molina EP, De Lacoba MG, Padilla CA, Martinez-Galesteo E, Barcena JA, Lamas S (1999): Redox regulation of c-Jun DNA binding by reversible S-glutathiolation. *FASEB J.* **13**: 1481-90.
- Kline K, Yu W, Sanders BG (2001): Vitamin E: mechanisms of action as tumor cell growth inhibitors. *J. Nutr.* **131**: 161S-163S.
- Knoepfel L, Steinkuhler C, Carri MT, Rotilio G (1994): Role of zinc-coordination and of the glutathione redox couple in the redox susceptibility of human transcription factor Sp1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **201**: 871-7.
- Kolleck I, Schlame M, Fechner H, Looman AC, Wissel H, Rustow B (1999): HDL is the major source of vitamin E for type II pneumocytes. *Free Radic. Biol. Med.* **27**: 882-90.

- Korn SH, Wouters EF, Vos N, Janssen-Heininger YM (2001): Cytokine-induced activation of nuclear factor-kappa B is inhibited by hydrogen peroxide through oxidative inactivation of I kappa B kinase. *J. Biol. Chem.* **276**: 35693-700.
- Kostner GM, Oettl K, Jauhainen M, Ehnholm C, Esterbauer H, Dieplinger H (1995): Human plasma phospholipid transfer protein accelerates exchange/transfer of alpha-tocopherol between lipoproteins and cells. *Biochem. J.* **305 (Pt 2)**: 659-67.
- Labauge P, Cavalier L, Ichalalene L, Castelnovo G (1998): [Friedreich's ataxia and hereditary vitamin E deficiency. Case study]. *Rev. Neurol. (Paris)* **154**: 339-41.
- Landes N, Pfluger P, Kluth D, Birringer M, Ruhl R, Bol GF, Glatt H, Brigelius-Flohe R (2003): Vitamin E activates gene expression via the pregnane X receptor. *Biochem. Pharmacol.* **65**: 269-73.
- Li X, Stark GR (2002): NFkappaB-dependent signaling pathways. *Exp. Hematol.* **30**: 285-96.
- Lin Y, Huang R, Santanam N, Liu YG, Parthasarathy S, Huang RP (2002): Profiling of human cytokines in healthy individuals with vitamin E supplementation by antibody array. *Cancer Lett.* **187**: 17-24.
- Li-Weber M, Weigand MA, Giaisi M, Suss D, Treiber MK, Baumann S, Ritsou E, Breitkreutz R, Krammer PH (2002): Vitamin E inhibits CD95 ligand expression and protects T cells from activation-induced cell death. *J. Clin. Invest.* **110**: 681-90.
- Lu C, Stricker J, Erickson HP (2001): Site-specific mutations of FtsZ--effects on GTPase and in vitro assembly. *BMC Microbiol.* **1**: 7.
- Mabile L, Bruckdorfer KR, Rice-Evans C (1999): Moderate supplementation with natural alpha-tocopherol decreases platelet aggregation and low-density lipoprotein oxidation. *Atherosclerosis* **147**: 177-85.
- Makino Y, Okamoto K, Yoshikawa N, Aoshima M, Hirota K, Yodoi J, Umesono K, Makino I, Tanaka H (1996): Thioredoxin: a redox-regulating cellular cofactor for glucocorticoid hormone action. Cross talk between endocrine control of stress response and cellular antioxidant defense system. *J. Clin. Invest.* **98**: 2469-77.
- Makino Y, Yoshikawa N, Okamoto K, Hirota K, Yodoi J, Makino I, Tanaka H (1999): Direct association with thioredoxin allows redox regulation of glucocorticoid receptor function. *J. Biol. Chem.* **274**: 3182-8.
- Manna SK, Zhang HJ, Yan T, Oberley LW, Aggarwal BB (1998): Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses tumor necrosis factor-induced apoptosis and activation of nuclear transcription factor-kappaB and activated protein-1. *J. Biol. Chem.* **273**: 13245-54.
- Marienfeld R, May MJ, Berberich I, Serfling E, Ghosh S, Neumann M (2003): RelB forms transcriptionally inactive complexes with RelA/p65. *J. Biol. Chem.* **278**: 19852-60.
- Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de Castro I (1999): Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin. Biochem.* **32**: 595-603.
- Matsubara T, Ziff M (1986): Increased superoxide anion release from human endothelial cells in response to cytokines. *J. Immunol.* **137**: 3295-8.
- Mauch S, Kolb C, Kolb B, Sadowski T, Sedlacek R (2002): Matrix metalloproteinase-19 is expressed in myeloid cells in an adhesion-dependent manner and associates with the cell surface. *J. Immunol.* **168**: 1244-51.
- Maziere C, Conte MA, Maziere JC (2001): Activation of JAK2 by the oxidative stress generated with oxidized low-density lipoprotein. *Free Radic. Biol. Med.* **31**: 1334-40.
- Meier B, Radeke HH, Selle S, Younes M, Sies H, Resch K, Habermehl GG (1989): Human fibroblasts release reactive oxygen species in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor-alpha. *Biochem. J.* **263**: 539-45.
- Mercurio F, DiDonato JA, Rosette C, Karin M (1993): p105 and p98 precursor proteins play an active role in NF-kappa B-mediated signal transduction. *Genes Dev.* **7**: 705-18.

- Mine S, Tabata T, Wada Y, Fujisaki T, Iida T, Noguchi N, Niki E, Kodama T, Tanaka Y (2002): Oxidized low density lipoprotein-induced LFA-1-dependent adhesion and transendothelial migration of monocytes via the protein kinase C pathway. *Atherosclerosis* **160**: 281-8.
- Nakamura T, Goto M, Matsumoto A, Tanaka I (1998): Inhibition of NF-kappa B transcriptional activity by alpha-tocopheryl succinate. *Biofactors* **7**: 21-30.
- Neuzil J, Weber T, Schroder A, Lu M, Ostermann G, Gellert N, Mayne GC, Olejnicka B, Negre-Salvayre A, Sticha M, Coffey RJ, Weber C (2001): Induction of cancer cell apoptosis by alpha-tocopheryl succinate: molecular pathways and structural requirements. *FASEB J.* **15**: 403-15.
- Ni J, Wen X, Yao J, Chang HC, Yin Y, Zhang M, Xie S, Chen M, Simons B, Chang P, di Sant'Agnese A, Messing EM, Yeh S (2005): Tocopherol-associated protein suppresses prostate cancer cell growth by inhibition of the phosphoinositide 3-kinase pathway. *Cancer Res.* **65**: 9807-16.
- Noguchi N, Hanyu R, Nonaka A, Okimoto Y, Kodama T (2003): Inhibition of THP-1 cell adhesion to endothelial cells by alpha-tocopherol and alpha-tocotrienol is dependent on intracellular concentration of the antioxidants. *Free Radic. Biol. Med.* **34**: 1614-20.
- Oram JF, Vaughan AM, Stocker R (2001): ATP-binding cassette transporter A1 mediates cellular secretion of alpha-tocopherol. *J. Biol. Chem.* **276**: 39898-902.
- Packer L, Weber SU, Rimbach G (2001): Molecular aspects of alpha-tocotrienol antioxidant action and cell signalling. *J. Nutr.* **131**: 369S-73S.
- Pal S, Thomson AM, Bottema CD, Roach PD (2003): Alpha-tocopherol modulates the low density lipoprotein receptor of human HepG2 cells. *Nutr. J.* **2**: 3.
- Panagabko C, Morley S, Hernandez M, Cassolato P, Gordon H, Parsons R, Manor D, Atkinson J (2003): Ligand specificity in the CRAL-TRIO protein family. *Biochemistry* **42**: 6467-74.
- Parola M, Muraca R, Dianzani I, Barrera G, Leonarduzzi G, Bendinelli P, Piccoletti R, Poli G (1992): Vitamin E dietary supplementation inhibits transforming growth factor beta 1 gene expression in the rat liver. *FEBS Lett.* **308**: 267-70.
- Pearson GD, Merrill GF (1998): Deletion of the *Saccharomyces cerevisiae* TRR1 gene encoding thioredoxin reductase inhibits p53-dependent reporter gene expression. *J. Biol. Chem.* **273**: 5431-4.
- Peluzio MC, Miguel E, Jr., Drumond TC, Cesar GC, Santiago HC, Teixeira MM, Vieira EC, Arantes RM, Alvarez-Leite JI (2003): Monocyte chemoattractant protein-1 involvement in the alpha-tocopherol-induced reduction of atherosclerotic lesions in apolipoprotein E knockout mice. *Br. J. Nutr.* **90**: 3-11.
- Pentland AP, Morrison AR, Jacobs SC, Hruza LL, Hebert JS, Packer L (1992): Tocopherol analogs suppress arachidonic acid metabolism via phospholipase inhibition. *J. Biol. Chem.* **267**: 15578-84.
- Pineda-Molina E, Klatt P, Vazquez J, Marina A, Garcia de Lacoba M, Perez-Sala D, Lamas S (2001): Glutathionylation of the p50 subunit of NF-kappaB: a mechanism for redox-induced inhibition of DNA binding. *Biochemistry* **40**: 14134-42.
- Poynter ME, Daynes RA (1998): Peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation modulates cellular redox status, represses nuclear factor-kappaB signaling, and reduces inflammatory cytokine production in aging. *J. Biol. Chem.* **273**: 32833-41.
- Prasad KN, Edwards-Prasad J (1982): Effects of tocopherol (vitamin E) acid succinate on morphological alterations and growth inhibition in melanoma cells in culture. *Cancer Res.* **42**: 550-5.
- Preas HL, 2nd, Reda D, Tropea M, Vandivier RW, Banks SM, Agosti JM, Suffredini AF (1996): Effects of recombinant soluble type I interleukin-1 receptor on human inflammatory responses to endotoxin. *Blood* **88**: 2465-72.
- Rainwater R, Parks D, Anderson ME, Tegtmeyer P, Mann K (1995): Role of cysteine residues in regulation of p53 function. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 3892-903.

- Rhee SG (1999): Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp. Mol. Med.* **31**: 53-9.
- Ricciarelli R, Tasinato A, Clement S, Ozer NK, Boscoboinik D, Azzi A (1998): alpha-Tocopherol specifically inactivates cellular protein kinase C alpha by changing its phosphorylation state. *Biochem. J.* **334** (Pt 1): 243-9.
- Ricciarelli R, Maroni P, Ozer N, Zingg JM, Azzi A (1999): Age-dependent increase of collagenase expression can be reduced by alpha-tocopherol via protein kinase C inhibition. *Free Radic. Biol. Med.* **27**: 729-37.
- Ricciarelli R, Zingg JM, Azzi A (2000): Vitamin E reduces the uptake of oxidized LDL by inhibiting CD36 scavenger receptor expression in cultured aortic smooth muscle cells. *Circulation* **102**: 82-7.
- Ricciarelli R, Zingg JM, Azzi A (2001): Vitamin E: protective role of a Janus molecule. *FASEB J.* **15**: 2314-25.
- Rice-Evans C, Burdon R (1993): Free radical-lipid interactions and their pathological consequences. *Prog. Lipid. Res.* **32**: 71-110.
- Rimbach G, Fischer A, Stoecklin E, Barella L (2004): Modulation of hepatic gene expression by alpha-tocopherol in cultured cells and in vivo. *Ann. N Y Acad. Sci.* **1031**: 102-8.
- Rota C, Barella L, Minihane AM, Stocklin E, Rimbach G (2004): Dietary alpha-tocopherol affects differential gene expression in rat testes. *IUBMB Life* **56**: 277-80.
- Ryseck RP, Bull P, Takamiya M, Bours V, Siebenlist U, Dobrzanski P, Bravo R (1992): RelB, a new Rel family transcription activator that can interact with p50-NF-kappa B. *Mol. Cell. Biol.* **12**: 674-84.
- Sacht G, Brigelius-Flohe R, Kiess M, Sztajer H, Flohe L (1999): ATP-sensitive association of mortalin with the IL-1 receptor type I. *Biofactors* **9**: 49-60.
- Saitoh M, Nishitoh H, Fujii M, Takeda K, Tobiume K, Sawada Y, Kawabata M, Miyazono K, Ichijo H (1998): Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *EMBO J.* **17**: 2596-606.
- Saldeen T, Li D, Mehta JL (1999): Differential effects of alpha- and gamma-tocopherol on low-density lipoprotein oxidation, superoxide activity, platelet aggregation and arterial thrombogenesis. *J. Am. Coll. Cardiol.* **34**: 1208-15.
- Sanchez-Mateos P, Cabanas C, Sanchez-Madrid F (1996): Regulation of integrin function. *Semin. Cancer Biol.* **7**: 99-109.
- Schneider C (2005): Chemistry and biology of vitamin E. *Mol. Nutr. Food Res.* **49**: 7-30.
- Schreck R, Meier B, Mannel DN, Droge W, Baeuerle PA (1992): Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor kappa B activation in intact cells. *J. Exp. Med.* **175**: 1181-94.
- Schuelke M, Mayatepek E, Inter M, Becker M, Pfeiffer E, Speer A, Hubner C, Finckh B (1999): Treatment of ataxia in isolated vitamin E deficiency caused by alpha-tocopherol transfer protein deficiency. *J. Pediatr.* **134**: 240-4.
- Sen CK, Khanna S, Roy S, Packer L (2000): Molecular basis of vitamin E action. Tocotrienol potently inhibits glutamate-induced pp60(c-Src) kinase activation and death of HT4 neuronal cells. *J. Biol. Chem.* **275**: 13049-55.
- Sen R, Baltimore, D. (1986): Inducibility of kappa immunoglobulin enhancer-binding protein Nf-kappa B by a posttranslational mechanism. *Cell* **47**: 921-8.
- Senftleben U, Cao Y, Xiao G, Greten FR, Krahn G, Bonizzi G, Chen Y, Hu Y, Fong A, Sun SC, Karin M (2001): Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* **293**: 1495-9.
- Shattil SJ, Ginsberg MH (1997): Integrin signaling in vascular biology. *J. Clin. Invest.* **100**: S91-5.

- Shibata N, Arita M, Misaki Y, Dohmae N, Takio K, Ono T, Inoue K, Arai H (2001): Supernatant protein factor, which stimulates the conversion of squalene to lanosterol, is a cytosolic squalene transfer protein and enhances cholesterol biosynthesis. *Proc Natl. Acad. Sci. U S A* **98**: 2244-9.
- Silverman N, Maniatis T (2001): NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev.* **15**: 2321-42.
- Sokol RJ, Kayden HJ, Bettis DB, Traber MG, Neville H, Ringel S, Wilson WB, Stumpf DA (1988): Isolated vitamin E deficiency in the absence of fat malabsorption--familial and sporadic cases: characterization and investigation of causes. *J. Lab. Clin. Med.* **111**: 548-59.
- Staal FJ, Anderson MT, Herzenberg LA (1995): Redox regulation of activation of NF-kappa B transcription factor complex: effects of N-acetylcysteine. *Methods Enzymol.* **252**: 168-74.
- Stauble B, Boscoboinik D, Tasinato A, Azzi A (1994): Modulation of activator protein-1 (AP-1) transcription factor and protein kinase C by hydrogen peroxide and D-alpha-tocopherol in vascular smooth muscle cells. *Eur. J. Biochem.* **226**: 393-402.
- Stocker A, Zimmer S, Spycher SE, Azzi A (1999): Identification of a novel cytosolic tocopherol-binding protein: structure, specificity, and tissue distribution. *IUBMB Life* **48**: 49-55.
- Stocker A, Baumann U (2003): Supernatant protein factor in complex with RRR-alpha-tocopherylquinone: a link between oxidized Vitamin E and cholesterol biosynthesis. *J. Mol. Biol.* **332**: 759-65.
- Sundaresan M, Yu ZX, Ferrans VJ, Sulciner DJ, Gutkind JS, Irani K, Goldschmidt-Clermont PJ, Finkel T (1996): Regulation of reactive-oxygen-species generation in fibroblasts by Rac1. *Biochem. J.* **318** (Pt 2): 379-82.
- Suzuki YJ, Packer L (1993): Inhibition of NF-kappa B DNA binding activity by alpha-tocopheryl succinate. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **31**: 693-700.
- Suzuki YJ, Packer L (1993): Inhibition of NF-kappa B activation by vitamin E derivatives. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **193**: 277-83.
- Tada H, Ishii H, Isogai S (1997): Protective effect of D-alpha-tocopherol on the function of human mesangial cells exposed to high glucose concentrations. *Metabolism* **46**: 779-84.
- Tanabe T, Chamailard M, Ogura Y, Zhu L, Qiu S, Masumoto J, Ghosh P, Moran A, Predergast MM, Tromp G, Williams CJ, Inohara N, Nunez G (2004): Regulatory regions and critical residues of NOD2 involved in muramyl dipeptide recognition. *EMBO J* **23**: 1587-97.
- Tappel AL (1962): Vitamin E as the biological lipid antioxidant. *Vitam.. Horm..* **20**: 493-510.
- Tasinato A, Boscoboinik D, Bartoli GM, Maroni P, Azzi A (1995): d-alpha-tocopherol inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation occurs at physiological concentrations, correlates with protein kinase C inhibition, and is independent of its antioxidant properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **92**: 12190-4.
- Terasawa Y, Manabe H, Yoshida N, Uemura M, Sugimoto N, Naito Y, Yoshikawa T, Kondo M (2000): Alpha-tocopherol protects against monocyte Mac-1 (CD11b/CD18) expression and Mac-1-dependent adhesion to endothelial cells induced by oxidized low-density lipoprotein. *Biofactors* **11**: 221-33.
- Teupser D, Thiery J, Seidel D (1999): Alpha-tocopherol down-regulates scavenger receptor activity in macrophages. *Atherosclerosis* **144**: 109-15.
- Thannickal VJ, Fanburg BL (2000): Reactive oxygen species in cell signaling. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol* **279**: L1005-28.
- Traber MG, Siddens LK, Leonard SW, Schock B, Gohil K, Krueger SK, Cross CE, Williams DE (2005): Alpha-tocopherol modulates Cyp3a expression, increases gamma-CEHC production, and limits tissue gamma-tocopherol accumulation in mice fed high gamma-tocopherol diets. *Free Radic. Biol. Med.* **38**: 773-85.

- Venkateswaran V, Fleshner NE, Klotz LH (2002): Modulation of cell proliferation and cell cycle regulators by vitamin E in human prostate carcinoma cell lines. *J. Urol.* **168**: 1578-82.
- Venugopal SK, Devaraj S, Jialal I (2004): RRR-alpha-tocopherol decreases the expression of the major scavenger receptor, CD36, in human macrophages via inhibition of tyrosine kinase (Tyk2). *Atherosclerosis* **175**: 213-20.
- Villacorta L, Graca-Souza AV, Ricciarelli R, Zingg JM, Azzi A (2003): Alpha-tocopherol induces expression of connective tissue growth factor and antagonizes tumor necrosis factor-alpha-mediated downregulation in human smooth muscle cells. *Circ. Res.* **92**: 104-10.
- Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ (1982): Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* **1**: 945-51.
- Weber C, Erl W, Weber K, Weber PC (1996): Increased adhesiveness of isolated monocytes to endothelium is prevented by vitamin C intake in smokers. *Circulation* **93**: 1488-92.
- Williams JC, Forster LA, Tull SP, Wong M, Bevan RJ, Ferns GA (1997): Dietary vitamin E supplementation inhibits thrombin-induced platelet aggregation, but not monocyte adhesiveness, in patients with hypercholesterolaemia. *Int. J. Exp. Pathol.* **78**: 259-66.
- Wilmer WA, Tan LC, Dickerson JA, Danne M, Rovin BH (1997): Interleukin-1beta induction of mitogen-activated protein kinases in human mesangial cells. Role of oxidation. *J. Biol. Chem.* **272**: 10877-81.
- Wu D, Koga T, Martin KR, Meydani M (1999): Effect of vitamin E on human aortic endothelial cell production of chemokines and adhesion to monocytes. *Atherosclerosis* **147**: 297-307.
- Xiao G, Harhaj EW, Sun SC (2001): NF-kappaB-inducing kinase regulates the processing of NF-kappaB2 p100. *Mol. Cell.* **7**: 401-9.
- Yamauchi J, Iwamoto T, Kida S, Masushige S, Yamada K, Esashi T (2001): Tocopherol-associated protein is a ligand-dependent transcriptional activator. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **285**: 295-9.
- Yokota T, Uchihara T, Kumagai J, Shiojiri T, Pang JJ, Arita M, Arai H, Hayashi M, Kiyosawa M, Okeda R, Mizusawa H (2000): Postmortem study of ataxia with retinitis pigmentosa by mutation of the alpha-tocopherol transfer protein gene. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **68**: 521-5.
- Yoshida N, Manabe H, Terasawa Y, Nishimura H, Enjo F, Nishino H, Yoshikawa T (2000): Inhibitory effects of vitamin E on endothelial-dependent adhesive interactions with leukocytes induced by oxidized low density lipoprotein. *Biofactors* **13**: 279-88.
- Yoshikawa T, Yoshida N, Manabe H, Terasawa Y, Takemura T, Kondo M (1998): alpha-Tocopherol protects against expression of adhesion molecules on neutrophils and endothelial cells. *Biofactors* **7**: 15-9.
- Zhong H, Voll RE, Ghosh S (1998): Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol. Cell.* **1**: 661-71.
- Zimmer S, Stocker A, Sarbolouki MN, Spycher SE, Sassoon J, Azzi A (2000): A novel human tocopherol-associated protein: cloning, in vitro expression, and characterization. *J. Biol. Chem.* **275**: 25672-80.

8 ANHANG

8.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A. dest	Aqua (destilliert)
<i>A</i> <i>l</i> <i>u</i> <i>I</i>	Restriktionsendonuclease von <i>Acinetobacter lwoffii</i> NI
Amp	Ampicillin
AP-1	<i>activator protein-1</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ASK-1	<i>apoptosis signal-regulating kinase-1</i>
aToc	α -Tocopherol
α -TTP	<i>α-Tocopherol transfer protein</i>
<i>Bam</i> HI	Restriktionsendonuclease von <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> HI
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bToc	β -Tocopherol
C	Cytosin
C-	Carboxy-
CAM	<i>cellular adhesion molecule</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
c-Jun	<i>v-jun avian sarcoma virus 17 oncogene homologue</i>
CLSM	<i>confocal laser-scanning microscope</i>
CMV	Cytomegalievirus
COX-2	<i>cyclooxygenase-2</i>
CumOOH	Cuminperoxid
D	Asparaginsäure
Da	Dalton
DCFH-DA	Dichlorfluoreszin-Diacetat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DLA	<i>Dual Luciferase Assay</i>
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
Dnase I	Desoxyribonuclease I
<i>Dpn</i> I	Restriktionsendonuclease von <i>Diplococcus pneumoniae</i> G41
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Eco</i> RI	Restriktionsendonuclease von <i>Escherichia coli</i> RI
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immuno-sorbent assay</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinases</i>
ELK-1	<i>Ets like gene 1</i>
ETS	<i>avian erythroblastosis E26 oncogene homologue-1</i>
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FACS	<i>fluorescence assisted cell sorting</i>
G	Glycin
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	<i>green fluorescent protein</i>

GSH	Glutathion
gt	<i>goat</i> ; Ziege (Antikörperherkunft)
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	GTP-Phosphatase
γ -CEHC	2,7,8 trimethyl-2(β -carboxyethyl)-6-hydroxylchroman
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HDL	<i>high density lipoproteins</i>
<i>Hind</i> III	Restrictionsendonuclease von <i>Heamophilus influenzae</i> Rd III
His	Histidin
HSF	<i>heat shock factor</i>
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule-1</i>
ICE	<i>IL-1 converting enzyme</i>
I κ B	<i>inhibitor of nuclear factor κB</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IKK	<i>IκB kinase</i>
IL	Interleukin
IL-1RA	<i>IL-1 receptor antagonist</i>
IL-1R	<i>Interleukin-1 receptor</i>
IL-1RI-AcP	<i>Interleukin-1 receptor associated protein</i>
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthases</i>
IRAK	IL-1RI-assozierte Kinasen
ITGB	Integrin β
JAK	<i>Janus-activated kinase</i>
JNK	<i>c-jun N-terminal kinase</i>
Kana	Kanamycin
kb	kilobases (103bp)
kDa	kilodalton
5-LOX	5-Lipoxygenase
LB	Luria Broth; Bakterienmedium
LDL	<i>low density lipoproteins</i>
LFA	<i>lymphocyte function-associated antigen-1</i>
LPS	Lipopolysaccharid
Lsg	Lösung
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MMLV	<i>moloney murine leukemia virus</i>
MMP	Magermilchpulver
MnSOD	Mangan-abhängige Superoxiddismutase
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
ms	<i>mouse</i> ; Maus (Antikörperherkunft)
NEMO	<i>NFκB essential modulator</i>
NF κ B	<i>nuclear factor κB</i>
NOD	<i>nucleotide-binding and oligomerization domain</i>
O ₂ ^{•-}	Superoxidradikal
OD	Optische Dichte
OH [•]	Hydroxylradikal
Oligo-dT	<i>Oligo-desoxythymidin</i>
OOH [•]	Hydroperoxylradikal

PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphatpuffer
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
Pfx	Polymerase von <i>Thermococcus spec.</i>
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PI3K	<i>phosphoinositide 3-kinase</i>
PKB	Protein-Kinase B
PKC	Protein-Kinase C
PLC- γ 1	Phospholipase C- γ 1
PP2A	Protein-Phosphatase 2A
PPR	<i>pattern recognition receptor</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PXR	<i>pregnane X receptor</i>
rb	<i>rabbit</i> , Kaninchen (Antikörperherkunft)
RE	<i>response element</i>
Ref-1	<i>redox factor-1</i>
RH	<i>rel-homology</i>
RLU	<i>relative light units</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonuklease
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
rpm	<i>rotations per minute</i>
RPMI	Roswell park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	PCR mit cDNA als Template
SDS	Natrium-dodecyl-sulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SOD	Superoxiddismutase
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
T	Thymin
TAP	α -Tocopherol-assoziertes Protein
Taq	<i>Thermophilus auqaticus</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TGF- β	<i>transforming growth factor</i>
TIR	<i>Toll/IL-1 repeats</i>
TLR	<i>toll like receptor</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor-alpha</i>
TPA	<i>12-O-Tetradecanoylporbol-13-acetat</i>
TRAF	<i>TNF receptor-associated factor</i>
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
TRX	Thioredoxin
U	<i>units</i>
UV	Ultraviolette Strahlung
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule- 1</i>
VLDL	<i>very light-density lipoproteins</i>
v/v	<i>volume/volume</i>
w/v	<i>weight/volume</i>
WB	Westernblot
wt	Wildtyp
XhoI	Restriktionsendonuklease von <i>Xanthomonas holcicola</i> I

8.2 Englische Fachtermini

Es wurden folgende Fachtermini aus dem englischen Sprachgebrauch verwendet, deren Übersetzung ins Deutsche schwierig und in der molekularbiologischen Literatur auch nicht üblich ist:

<i>annealing</i>	Anlagerung von <i>Primer</i> an einzelsträngige DNA aufgrund komplementärer Basenpaarung
<i>blot</i>	Experimenteller Aufbau zur Übertragung von DNA, RNA oder Proteinen auf eine Nitrozellulose- oder Nylonmembran
<i>housekeeping gene</i>	Gen mit konstitutiver und zeitlich konstanter Expression, das zur Kontrolle bei Expressionsanalysen benutzt wird
<i>insert</i>	engl. „eingesetztes“ „eingefügtes“, Bezeichnung für das klonierte Genprodukt innerhalb eines Vektors
<i>kit</i>	kommerziell erhältliche Zusammenstellung aller Komponenten, die für eine Versuchsdurchführung benötigt werden
<i>knock-out</i>	ausschalten eines Gens durch gentechnische Methoden
<i>mock</i>	engl. „nachgemacht“ „zum Schein“, im Zusammenhang mit Transfektionen: Benutzung des Transfektionsplasmides ohne <i>Insert</i> als Leer-Kontrolle
<i>screening</i>	Selektion-, Ausleseverfahren
<i>plate</i>	Zellkulturschale
<i>primer</i>	kurzes Oligonukleotid, komplementär zu DNA-oder RNA-bereichen, dient zur gerichteten enzymatischen Amplifikation spezifischer DNA- oder RNA-Abschnitte
<i>stripping</i>	Entfernen der gebundenen Antikörper nach Detektion von Proteinen
<i>tag</i>	Aminosäuremotiv zur Markierung eines rekombinanten Proteins
<i>template</i>	DNA oder RNA, die als Ausgangssubstanz für die Amplifikation spezifischer Bereiche durch PCR benutzt wird
<i>well</i>	Reaktionstasche, -schale oder -napf

8.3 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Überblick über ROS-sensitive Signalwege.	2
Abbildung 1.2: Struktur von Tocopherolen und Tocotrienolen.	5
Abbildung 1.3: Reaktionsmechanismus der Lipidperoxidation.	7
Abbildung 1.4: Proteinstruktur des humanen TAP.	12
Abbildung 1.5: Zusammenhang von Toll-like receptor 4 (TLR4) und den proinflammatorischen Zytokinen TNF- α und IL-1 β .	14
Abbildung 1.6: Signaltransduktion durch Interleukin-1.	15
Abbildung 1.7: Aufbau des Rezeptorkomplexes und Übersicht der Hauptsignalwege von IL-1 β .	17
Abbildung 1.8: Der klassische NF κ B-Signalweg.	19
Abbildung 3.1: Amplifikation der codierenden Sequenz des TAP.	45
Abbildung 3.2: Restriktion der in der BP-Reaktion entstandenen Klone.	46
Abbildung 3.3: Restriktion der in der LR-Reaktion entstandenen Klone.	46
Abbildung 3.4: Nachweis der Überexpression von TAP.	47
Abbildung 3.5: Nachweis der Phosphorylierung von p38 durch H ₂ O ₂ -Stimulation in HeLa-Zellen.	48
Abbildung 3.6: Nachweis der Phosphorylierung von p65 durch oxidativen Stress in HeLa-Zellen.	48
Abbildung 3.7: NF κ B-Aktivität nach oxidativem Stress bzw. Zytokinstimulation.	49
Abbildung 3.8: Messung der intrazellulären Konzentration von ROS nach Zytokinstimulation.	49
Abbildung 3.9: Aufnahme von α -Tocopherol in HeLa-Zellen.	50
Abbildung 3.10: Caspaseaktivität nach H ₂ O ₂ -Stimulation.	51
Abbildung 3.11: Zytotoxischer Einfluss von H ₂ O ₂ in Abhängigkeit von der Zelldichte.	52
Abbildung 3.12: Zytotoxizität von H ₂ O ₂ in Anwesenheit von α -Tocopherol.	52
Abbildung 3.13: Einfluss von α -Tocopherol auf die Bildung von intrazellulären ROS.	53
Abbildung 3.14: Analyse der Lipidperoxidation mittels Bodipy-C11-Färbung am CLSM.	54
Abbildung 3.15: Quantifizierung der Lipidperoxidation.	55
Abbildung 3.16: mRNA-Expressionsanalyse mittels RT-PCR und Real-time-PCR.	58
Abbildung 3.17: Proteinexpression von TGF- β 1 und MCP-1 nach Inkubation mit verschiedenen Vitamin E-Isomeren.	59
Abbildung 3.18: Expression von ITGB1 nach Inkubation mit verschiedenen Vitamin E-Formen.	60
Abbildung 3.19: Expression von ITGB1 nach IL-1 β -Stimulation.	60
Abbildung 3.20: Gewebsverteilung der mRNA von TAP.	61
Abbildung 3.21: mRNA-Expression von TAP in verschiedenen Zelllinien.	62
Abbildung 3.22: Expressionsanalyse von TAP nach Stimulation durch RT-PCR.	62
Abbildung 3.23: Analyse der endogenen TAP-Expression in HeLa-Zellen.	63
Abbildung 3.24: mRNA-Expression von TAP in mock- und TAP-transfizierten Zellen.	63

Abbildung 3.25: Einfluss von TAP auf den Tocopherolgehalt.	64
Abbildung 3.26: Einfluss von TAP und Vitamin E auf die Promotoraktivität von ICAM-1.	65
Abbildung 3.27: Einfluss verschiedener NFκB-Inhibitoren auf die TNF-α-induzierte Promotoraktivität von ICAM-1.	66
Abbildung 3.28: Einfluss von α-Tocopherol und TAP-Überexpression auf den NFκB-Signalweg.	66
Abbildung 3.29: Vitamin E-unabhängiger Einfluss der TAP-Überexpression auf den IL 1β-Signalweg.	67
Abbildung 3.30: FACS-Analyse der Expression von ITGB2 in HeLa- und THP-1-Zellen.	69
Abbildung 3.31: Einfluss der TAP-Überexpression auf die Expression von ITGB2.	69
Abbildung 3.32: Einfluss von TAP und Vitamin E auf den proximalen Promotor von ITGB2.	70
Abbildung 3.33: Schematische Darstellung der auf den Promotorfragmenten potentiellen Transkriptionsfaktorbindestellen.	71
Abbildung 3.34: Einfluss von α-Tocopherol auf den Elk-1 Signalweg.	72
Abbildung 3.35: Einfluss von MAPK-Inhibitoren auf die basale Promotoraktivität von ICAM-1 und ITGB2.	72
Abbildung 3.36: Einfluss von α-Tocopherol auf die heat-shock-factor-vermittelten Signalwege.	73
Abbildung 3.37: Einfluss von TAP und Vitamin E auf die Promotoraktivität von ICAM-1.	74
Abbildung 3.38: Einfluss der GTPase-Domänen von TAP auf die Signalwege von NFκB und HSF.	76

8.4 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Übersicht der Vitamin E-sensitiven Gene.	10
Tabelle 2.1: Zusammenstellung der eingesetzten Zellzahlen und Formate für die verschiedenen Experimente.	23
Tabelle 2.2: Zusammenstellung der in den Transfektionsexperimenten verwendeten Parameter.	24
Tabelle 2.3: Zusammensetzung des Ansatzes für die Reverse Transkription.	27
Tabelle 2.4: Standardansatz für RT-PCR.	28
Tabelle 2.5: PCR-Ansatz zur Amplifikation von DNA-Fragmenten.	29
Tabelle 2.6: Allgemeine Zusammensetzung einer Restriktion.	30
Tabelle 2.7: Zusammensetzung eines Ligationsansatzes.	31
Tabelle 2.8: Primerdesign für die Gateway-Klonierung von TAP.	32
Tabelle 2.9: Zusammensetzung einer BP-Reaktion.	32
Tabelle 2.10: Zusammensetzung einer LR-Reaktion.	32
Tabelle 2.11: Primerdesign für die ortsgerichtete Mutagenese.	35
Tabelle 2.12: Reaktionsansatz für die Mutagenese.	36
Tabelle 2.13: Zusammensetzung des Trenn- (A) und des Sammelgels (B).	37
Tabelle 2.14: Zusammenstellung der eingesetzten DNA-Mengen für die Transfektion von Reporterassays.	42
Tabelle 3.1: Expressionsregulation durch Vitamin E in unstimulierten Zellen.	56
Tabelle 3.2: Expressionsregulation durch Vitamin E in IL-1 β -stimulierten Zellen.	57

8.5 Verwendete Materialien

Chemikalien/Zusätze/ Kits und Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
6-Amino-Caprinsäure	Merck, Darmstadt
Accue Prime <i>Pfu</i> -DNA-Polymerase Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (30:0,8)	BioRad, München
Advantage RT-for-PCR	Clontech, Heidelberg
Agar Noble	BD Biosciences, Heidelberg
Agarose	Eurogentec, Köln
Ammoniumpersulfat	Merck
Ampicillin	Sigma, München
AmpliTaq DNA Polymerase	Roche, Mannheim
Bacillol	Bode Chemie, Hamburg
Bacto-Trypton	BD Biosciences, Heidelberg
Bacto-Yeast Extract	BD Biosciences
Big Dye Terminator Reaction Kit	Perkin Elmer, Weiterstadt
Bodipy-C11	Molecular Probes, Göttingen
Bromphenolblau	Merck
BSA-Lösung (10mg/ml)	NEB, Bad Schwalbach
β -Mercaptoethanol	Sigma
CaCl ₂	Merck
Caspase-Glo 3/7 Assay	Promega, München
Cell Culture Freezing Medium-DMSO	Invitrogen
CellTiter 96 AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay	Promega
Cuminperoxid	Sigma
DCFH-DA	Molecular Probes
DC Protein Assay	BioRad, München
DEPC	Sigma
Dual-Luciferase-Assay	Promega
D,L- α -Tocopherol	Calbiochem, Darmstadt
D,L- β -Tocopherol	Calbiochem
<i>Dpn</i> I	NEB
DMSO	Sigma
dNTP Set (100 mM-Lösung)	Invitrogen
ECL-PLUS	Amersham Biosciences, Freiburg
EDTA	Calbiochem
Essigsäure	Merck
Ethanol (p.a.)	Merck
Ethidiumbromid-Lösung (10mg/ml)	Merck
FCS	Biochrom KG, Berlin
FuGENE	Roche
Gateway BP-Clonase	Invitrogen
Gateway LR-Clonase	Invitrogen
GeneAmp PCR buffer system	Roche
Glycerol	Merck
Glycogen	Invitrogen
HCl	Merck
Hämin	Sigma
Hepes	Sigma
IFN- γ , rekombinant, human	R&D-Systems, Wiesbaden
Lipofectamine 2000	Invitrogen
IL-1 β , rekombinant, human	Invitrogen
IL-6	R&D-Systems

Isopropanol (2-Propanol)	Merck
JNK-Inhibitor II	Calbiochem
Kanamycin	Sigma
KCl	Merck
KH ₂ PO ₄	Merck
Magermilchpulver (MMP)	BioRad
MCP-1 ELISA Kit	Biosource
Methanol	Merck
MgCl ₂	Merck
MgSO ₄	Merck
MiniElute Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
MiniElute PCR Purification Kit	Qiagen
MTC Multiple Tissue cDNA Panels human I/II	BD Biosciences
Na ₂ HPO ₄	Merck
Natriumacetat	Sigma
NaCl	Merck
Natriumazid	Sigma
<i>Nhe</i> I	NEB
1x PBS	PAA Laboratories, Linz
PD98059	Calbiochem
Phosphatase Inhibitor Cocktail II	Sigma
Proteinmarker prestained broad range	Bio-Rad
QIAfilter Maxi Kit	Qiagen
QIAprep Miniprep Kit	Qiagen
QIAShredder Homogenizer Kit	Qiagen
QuickChange site-directed-mutagenesis II Kit	Stratagene, Heideleberg
RNase-Free DNase I Set	Qiagen
RNeasy Mini Kit	Qiagen
RPMI-1640 Medium	PAA Laboratories, Linz
SB203580	Calbiochem
SDS	Calbiochem
SDS-PAGE standards, prestained, broad range	Bio-Rad
SmartLadder DNA Markers	Eurogentec
T4 Ligase	Invitrogen
50x TAE Buffer	Invitrogen
TEMED	Sigma
TGF-β1 ELISA Kit	Biosource
TGS protein electrophoresis buffer 10x	Bio-Rad
Tris/Glycin/SDS	
TNFα, rekombinant, human	Invitrogen
Tris	Merck
TritonX-100	Merck
Trypan-Blau-Lösung	Sigma
Trypsin/EDTA (1X)	Invitrogen
Tween20	Merck
U0126	Calbiochem
VerorGeM <i>mycoplasma detection</i> PCR Kit	Minerva Biolabs, Berlin
Wasserstoffperoxid (30% Lösung)	Sigma
<i>Xho</i> I	NEB
Xylencyanol	Merck

Primärantikörper

Zielprotein	Bezeichnung	Spezies/Verdünnung	Hersteller
β-Actin	anti-β-Actin	ms; 1:10.000 (4%MMP)	Sigma
Integrin beta 1	anti-Integrin β1	gt; 1:200 (0,5%BSA)	Santa Cruz, Heidelberg
Integrin beta 2	anti-Integrin β2	gt; 1:200 (0,5%BSA)	Santa Cruz
(phospho)-p38	phospho p38 MAP Kinase	rb; 1:1.000 (3%MMP)	CST, Frankfurt
(phospho)-p65	phospho-NF-κB p65	rb; 1:1.000 (3%MMP)	CST
p38	p38 MAP Kinase	rb; 1:1.000 (3%MMP)	CST
p65	NF-κB p65	rb; 1:1.000 (3%MMP)	CST
V5	anti-V5	ms; 1:5.000 (5% MMP)	Invitrogen

Die Spezies der IgG werden wie folgt bezeichnet: Maus= ms, Ziege= gt, Kaninchen= rt. Die Prozentangabe (w/v) bezieht sich auf die Blocking-Substanz (MMP= Magermilchpulver; BSA= *bovine serum albumine*)

Sekundärantikörper

Bezeichnung	Hersteller
anti-Mouse-HPR	Amersham Biosciences
anti-Rabbit-HPR	Amersham Biosciences
anti-Goat-IgG-PE	Dianova, Hamburg
anti-Goat-IgG-FITC	Dianova

Zelllinien

Bezeichnung	Herkunft	ACC.-Nr/ DMSZ
HeLa	Cervix-Adenokarzinom	ACC161
CaCo-2	kolorektales Adenokarzinom	ACC169
HEK 293	<i>human embryonal kidney</i>	ACC305
HT-29	kolorektales Adenokarzinom	ACC299
Jurkat	<i>human T cell leukemia</i>	ACC282
THP-1	<i>human acute monocytic leukemia</i>	ACC16
SW948	kolorektales Doppelpunkt- Adenokarzinom	ACC326

Oligonukleotide

Folgende Oligonukleotide (Primer) wurden zur Genexpressionsanalyse mittels RT-PCR benutzt:

Primername		Sequenz (5' → 3')	<i>annealing</i> - Temperatur [°C]	Amplikon [bp]
β-Actin	s	GATGGTGGGCATGGGTCAG	58	581
	a	CTTAATGTCACGCACGATTTCC		
IKKβ	s	GAAAGAGCGCCTTGGGACAGG	60	343
	a	CAGAGGCAATGTCACCTCAGCAAGG		
IκBα	s	TCGTCCGCGCCATGTTCCAG	60	415
	a	ACAGCCAGCTCCCAGAAGTGCCTC		
IL-1β	s	CAGTGGCAATGAGGATGACTTG	60	305
	a	CATCGTGACATAAGCCTCGT		
IRAK-1	s	CTTCTACTGCCTGGTGTACGGC	60	720
	a	GCAGCTTCTCTAGCCTCTCGTACA		
ITGB1	s	GCTAAGCTCAGGAACCCTTGCA	58	208
	a	CATTCCTCCAGCCAATCAGTGA		
L1CAM	s	ACTCAAGTGCCGTGCTGGTC	58	158
	a	CAAGCCACTGAGGATGACACTG		
MCP-1	s	TCAGCCAGATGCAATCAATGC	58	223
	a	CGGAGTTTGGGTTTGCTTGTC		
MyD88	s	CTTCCACAGTGATGCCTACTGA	57	303
	a	AGGATCCCTTCTCATGCCA		
TAP	s	GTTTCCTGTGGCCTATAACCTC	58	261
	a	ATCTGCACGCTGTGTTTCATAC		
TGF-β	s	AGAAGAAGCTGCTGCGTGCG	58	287
	a	CGCACGATCATGTTGGACA		
TRAF-6	s	TTCATAGTTTGAGCGTAATACCCGAC	60	590
	a	CAGACTGATCAAGAATTGTAAGGCGTA		

Folgende Oligonukleotide wurden für die Klonierung der ITGB2-Promotorkonstrukte oder für die Sequenzierung des TAP-Konstruktes bzw. der ITGB2-Promotorkonstrukte verwendet:

Primername	Sequenz (5' → 3')
ITGB2_(-1100)_NheI	CTAGCTAGCTAGGAGCCGGGAGCCATG
ITGB2_(-500)_NheI	CTAGCTAGCGTGGCCTCGCAATCCACG
ITGB2_(1)_XhoI	CCGCTCGAGGGTCACGTCTAGAAACCTCAGCTG
ITGB2_Seq_f1(+100)	CTGAGGCAGGAGAATTGCTTGA
ITGB2_Seq_f2(+300)	CAGAGAATGGAGCGGAGGAAC
ITGB2_Seq_f3(+500)	TGTTTCAGTGGCCTCGCAATC
ITGB2_Seq_f4(+700)	GTTCCCTCCGCTCCATTCTCTG
ITGB2_Seq_f5(+900)	AGGGGCCGCTCTCTGACA
ITGB2_Seq_r1(-1000)	GGAGGAAGTGGTGGGTTGC
ITGB2_Seq_r2(-900)	GAGAAGGACCTGCTTCCATCAG
ITGB2_Seq_r3(-600)	GCGTGCACGCATTGACATC
ITGB2_Seq_r4(-500)	CCCAGGGATGGATGGATGA
ITGB2_Seq_r5(-200)	GGAGTGCAGTGGCGTGATC
M13_60C_f	GACGGCCAGTCTTAAGCTCG
M13_60C_r	CCAGAGCTGCCAGGAAACAG
pGL3B_Seq_f	GTACCGAGCTCTTACGCGTGC
pGL3B_Seq_r	CTGCGATCTAAGTAAGCTTGGCA
TAP_Seq_f1(+250)	GGTATGTGTGGCTATGACCTGGA
TAP_Seq_f2(+500)	TGGCCTCAAGCATCTCTGGA
TAP_Seq_f3(+750)	GGCACCATGACTGACCCTGA
TAP_Seq_f4(+1000)	GTGCTGCCCAACCAGAGGTAC
TAP_Seq_r1(-150)	GCATGGCCTCCGACTTCTG
TAP_Seq_r2(-400)	CAGCTCACACTCCCGCATC
TAP_Seq_r3(-650)	GTCCTCACTCAGGAAGGTTTGA
TAP_Seq_r4(-900)	CAGCCAGGGAAGAGGATCTCA

Vektoren

Bezeichnung	Hersteller
pcDNA-DEST40	Invitrogen
pCMV-IkB- α -M	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. P. Rosenstiel
pDONR221	Invitrogen
pFA-EIk-1	Stratagene
pFR-Luc	Stratagene
pGL3B	Promega
pGL3B-ICAM-1	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. P. Rosenstiel
pHSE-Luc	Clontech
pNFkB-Luc	Clontech
pRL-TK	Promega

Puffer, Lösungen und Medien

Alle Puffer, Lösungen und Medien wurden mit A.bidest. angesetzt, Medien für die Bakterienkultur wurden nach Ansetzen autoklaviert und bis zur Benutzung gekühlt und unter Luftabschluss gelagert.

Bezeichnung	Zusammensetzung
25X TAE	1 M Tris/HCl (pH 8,0), 25 mM EDTA, 500 mM Essigsäure
4X Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl (pH 8,8), 0,4% (w/v) SDS
4X Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl (pH 8,8), 0,4% (w/v) SDS
10X DNA-Ladepuffer	50% (v/v) Glycerol, 0,1% (w/v) Bromphenolblau, 0,1% (w/v) Xylencyanol
2XDLB	20 mM Tris/HCl (pH 7,4), 2 % (w/v) SDS
5X SDS-Ladepuffer	312,5 mM Tris/HCl (pH 6,8), 10% (w/v) SDS, 50%(v/v) Glycerol, 10%(v/v) β -Mercaptoethanol, 0,05% (w/v) Bromphenolblau
Anodenpuffer 1	30 mM Tris-Base, 20%(v/v) Methanol
Anodenpuffer 2	300 mM Tris-Base, 20%(v/v) Methanol
DNA-Isolierungspuffer	10 mM Tris/HCl (pH 8,5), 5 mM EDTA, 0,2 M NaCl, 0,2% (w/v) SDS
HPLC-Lysepuffer	20 mM Hepes (pH 7,5), 0,1mM EDTA, 1%(v/v) TritonX-100
Kathodenpuffer	25 mM Tris-Base, 20 % (v/v) Methanol, 40 mM 6-Amino-Caprinsäure
LB-Agarplatten	1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Yeast Extract, 86mM NaCl, 1, 5% (w/v) Agar
LB-Medium	1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Yeast Extract, 86mM NaCl
NZY ⁺ -Medium	1% (w/v) N-Z-Amine, 0,5% (w/v) Yeast Extract, 86mM NaCl, 12,5 mM MgCl ₂ , 12,5mM MgSO ₄ , 0,4% (v/v) Glycerol
SOCS-Medium	2% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Yeast Extract, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄
Stripping-Puffer	62,5 mM Tris/HCl (pH 6,8), 2% (w/v) SDS, 0,7% (v/v) β -Mercaptoethanol
TE (pH 7,6; pH 8,0)	10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA
TTBS	20 mM Tris, 137 mM NaCl, 0,1% (v/v) Tween20

9 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Stefanie Spitzmann

Geburtsdatum: 31.05.1976

Geburtsort: Berlin

Eltern: Dr. rer. nat. Kurt Spitzmann, Erika Spitzmann (geb. Arndt)

Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulische Ausbildung / Studium

- | | |
|-------------------|---|
| 06/1996 | Abitur am Max-Planck-Gymnasium, Kiel |
| 10/1998 | Vordiplom (Fächer: Zoologie, Botanik, Physik, Chemie),
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel |
| 8/2002 | Diplom (Fächer: Zoologie, Zellbiologie, Biochemie), CAU
Diplomarbeit am Forschungszentrum Borstel in der Abteilung
„Zelluläre Immunologie“ Thema: „Rezeptoren des nicht-adaptiven
Immunsystems und ihre Bedeutung für kardiale Zellen“ |
| ab 10/2002- | Doktorandin in der Forschungsgruppe Mucosaimmunologie der
Klinik für Allgemeine Innere Medizin (ab 01.01.2005 Institut für
Klinische Molekularbiologie) des Universitätsklinikums S-H,
Campus Kiel, unter der Leitung von Prof. Dr. Stefan Schreiber |
| 10/2002 - 10/2005 | Stipendiatin des Graduiertenkollegs 820 |

Beiträge auf Tagungen / Kongressen

Spitzmann S (2005) Influence of α -tocopherol on IL-1 β -induced transcriptional profiles in HeLa cells. Young Physiologist Symposium & Free Radical School, Birmingham, UK (Vortrag)

Spitzmann S, Rosenstiel P, Seegert D, Schreiber S (2005) Influence of α -tocopherol on IL-1 β -induced transcriptional profiles in HeLa cells. Annual Meeting, Society for Free Radical Research (Europa), Leicester, UK (Poster)
“Young investigator award” der Society for Free Radical Research- Europe (2005)

Spitzmann S, Rosenstiel P, Seegert D, Schreiber S (2005) Influence of α -tocopherol on IL-1 β -induced transcriptional profiles in HeLa cells. Expert meeting of the research training programme on “Natural antioxidants – effects in plants, food, animals and humans”, “Occurrence, metabolism and function of vitamin E in plants, man and animals”, Salzac, Deutschland (Poster)

Veröffentlichung

Spitzmann S, Rosenstiel P, Till A, Desel C, Wätzig G, Seegert D, Schreiber S: The GTPase function of α -Tocopherol associated protein (TAP) mediates the effects of vitamin E on signal transduction. (in Vorbereitung)

10 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit - abgesehen von den Beratungen durch meine akademischen Lehrer - nach Inhalt und Form meine eigene Arbeit ist. Die Arbeit wurde bis jetzt weder vollständig noch in Teilen einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegt. Ferner erkläre ich, dass ich noch keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.

Kiel, den

(Stefanie Spitzmann)

11 Danksagung

Diese Arbeit wurde in der Zeit vom November 2002 bis März 2006 im Rahmen des Graduiertenkollegs 820 in der Forschungsgruppe Mucosaimmunologie der Klinik für Allgemeine Innere Medizin (ab 01.01.2005 Institut für Klinische Molekularbiologie) des Universitätsklinikums S-H, Campus Kiel, die von Prof. Dr. Stefan Schreiber geleitet wird, durchgeführt.

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Stefan Schreiber für die interessante Themenstellung und das entgegengebrachte Vertrauen sowie für die Freiheit, eigenständig Ideen und Vorstellungen entwickeln und einbringen zu können, bedanken.

Mein aufrichtiger Dank gebührt Frau Prof. Dr. Karin Krupinska als Leiterin des Graduiertenkollegs 820 für die Betreuung dieser Arbeit, für ihr Interesse und die konstruktive Kritik.

Auch möchte ich Herrn Dr. Philip Rosenstiel und Herrn Dr. Dirk Seegert als fachlichen Betreuern dieser Arbeit aufrichtig danken. Bei Herrn Dr. Philip Rosenstiel möchte ich mich an dieser Stelle für seine wertvollen Anregungen, die sorgfältige Beratung und seine Diskussionsbereitschaft bedanken. Herrn Dr. Dirk Seegert danke ich besonders für die Möglichkeit, diese Arbeit in den Laborräumen der Conaris AG durchzuführen.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. Gerald Rimbach für die kritischen Diskussionen, die mir stets wertvolle Anregungen gaben.

Herr Dr. Andreas Till und Herr Dr. Georg Wätzig standen mir fachlich und menschlich in den letzten drei Jahren immer zur Seite, und dafür möchte ich ihnen ganz herzlich danken.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern der Conaris AG bedanken, die durch ihre Unterstützung und die angenehme Atmosphäre im Labor zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Hervorheben möchte ich dabei Frau Lorena Vallés Uriarte für die in den letzten Jahren entstandene Freundschaft und die tolle Zeit im Labor.

Daran anschließen möchte ich den Dank an alle Mitglieder des Instituts für Klinische Molekularbiologie der CAU Kiel. Insbesondere den Mitarbeitern der Zellbiologie möchte ich meinen herzlichen Dank für ihre stets in jeder Weise entgegengebrachte Hilfsbereitschaft sowie für das angenehme Arbeitsklima aussprechen. Bei Herrn Dr. Gunnar Jacobs bedanke ich mich für die kritische Durchsicht des Manuskriptes. Herrn Dr. Robert Häsler und Frau Dorina Oelsner danke ich für die Unterstützung bei den Microarrayexperimenten.

Bei allen Mitgliedern des Graduiertenkollegs 820 möchte ich mich für die sehr gute Kooperation, die Hilfsbereitschaft und die vielen persönlichen Gespräche sowie Diskussionen während der letzten drei Jahre bedanken. Ein großer Dank gilt Frau Jun.-Prof. Dr. Christine Desel für die Hilfestellungen bei den Messungen der reaktiven Sauerstoffspezies, für die persönlichen und fachlichen Gespräche sowie für die wertvollen Anregungen. Bei Frau Dr. Gaby Andersen bedanke ich mich für ihre Hilfe bei den HPLC-Messungen.

Nicht zuletzt möchte ich mich von ganzen Herzen bei meiner Familie für ihren mir in jeder Hinsicht erwiesenen unschätzbaren Beistand bedanken und schließlich danke ich Hans für seine liebevolle Unterstützung.