

Aus der Abteilung für Experimentelle Chirurgie/Molekularbiologie
der Klinik für Allgemein-, Visceral-, Gefäß- und Thoraxchirurgie
Campus Charité Mitte
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

Der Einfluss von HIV-1-Tat Peptiden auf die Angiogene-
nese und ihre mögliche Anwendung in der Therapie

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Mahmoud Ismail

aus Ghazieh-Libanon

*Entzug des Doktorgrades,
bestandskräftig seit:*

06.03.2023

CHARITE

UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN

CAMPUS VIRCHOW-KLINIKUM

Medizinische Bibliothek

Hochschulschriftenstelle

Augustenburger Platz 1 | D-13353 Berlin

19.2.24

Gutachter/in: 1. Priv.-Doz. Dr. med. R.I. Rückert
 2. Prof. Dr. W. Dubiel
 3. Prof. Dr. med. H. Bektas

Datum der Promotion: 03.06.2012

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	3
2 Abkürzungsverzeichnis.....	6
3 Einleitung	9
3.1 Angiogenese	9
3.2 Periphere arterielle Verschlusskrankheit	10
3.3 Angiogeneese und Therapie von vaskulären Erkrankungen	12
3.4 Gefäßwachstum	12
3.5 Das Tat-Protein.....	13
3.6 Das Ubiquitin-Proteasom-System	15
3.7 c-Jun und Angiogenese.....	16
3.8 Specificity protein 1 (SP1) und Angiogenese.....	16
3.9 Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) und Angiogenese.....	17
3.10 Der angiogene Wachstumsfaktor Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF).....	18
3.11 Rolle von Plasminogen-Activator-Inhibitor-1 (PAI-1) in der Angiogenese	19
3.12 Fragestellung und Ziele	19
4 Material und Methodik.....	21
4.1 Material.....	21
4.1.1 Kits	21
4.1.2 Zellen	21
4.1.3 Enzyme.....	21
4.1.4 Geräte.....	21
4.1.5 Sonstiges	23
4.2 Methoden	24
4.2.1 Synthese von Tat-Protein und Tat-Peptiden	24
4.2.2 Durchführung von Proteaseassays mit fluorogenen Substraten, kinetische Untersuchungen mit dem 20S Proteasom	25

Inhaltsverzeichnis

4.2.3 Zellen und Zellkulturen.....	27
4.2.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen	28
4.2.5 Inkubation der Tat-Peptide und des Tat-Proteins mit HUVEC	28
4.2.6 Lyse der Zellen.....	29
4.2.7 Nicht-denaturierende Gelelektrophorese	30
4.2.8 Dichtegradientenzentrifugation.....	30
4.2.9 SDS-PAGE Gelelektrophorese	30
4.2.10 Western Blot	30
4.2.11 Immunpräzipitation (IP).....	31
4.2.12 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	31
4.2.13 bFGF-ELISA-Assay.....	32
4.2.14 VEGF-ELISA-Assay	32
4.2.15 PAI-1-ELISA-Assay	32
4.2.16 MTT-Zellwachstumsassay	33
4.2.17 Matrigel Invasion Assay	33
4.2.18 Matrigel Assay für Tubulogenese	35
4.2.19 Statistik.....	36
5 Ergebnisse	37
5.1 Die basische Domäne des Tat-Proteins	37
5.2 Synthetisierte Tat-Peptide mit Mutationen in der basischen Domäne.....	39
5.3 Einfluss der Tat-Peptide auf die Aktivität des 20S Proteasoms	40
5.4 Einfluss der Tat-Peptide auf die Expression von c-Jun und SP1 im Western-Blot.....	42
5.5 Einfluss der Tat-Peptide auf das Zellwachstum der HUVEC (MTT- Zellwachstumsassay)	43
5.6 Stimulierung der Produktion von bFGF durch HUVEC	44
5.7 Nachweis der VEGF-Produktion mittels ELISA.....	46
5.8 Stimulierung der PAI-1 Produktion/Sekretion durch HUVEC	47
5.9 Tatpep5 und Tatpep15 stimulieren die Migration und Invasion im Matrigel-Invasionsassay	48
5.10 Gefäßneubildung (Tubulogenese): qualitativer Assay	49
5.11 Gefäßneubildung (Tubulogenese): quantitativer Assay	50

6 Diskussion	52
6.1 Ischämische Gefäßerkrankungen.....	52
6.2 Therapeutische Angiogeneese	52
6.3 Das HIV-1 Tat-Protein und Angiogeneese.....	54
6.4 Mechanismus der Angiogeneese und Arteriogeneese.....	55
6.5 Testung der Effekte von Tat-Protein und von Tat-Peptiden auf das Proteasomsystem	56
6.6 Einfluss der Tat-Peptide auf die Transkriptionsfaktoren c-Jun und SP1 ...	57
6.7 Einfluss der Tat-Peptide auf die Produktion von bFGF und VEGF	58
6.8 Tatpep5, Tatpep15 und Tatpep16 stimulieren die Produktion von PAI-1 in HUVEC	59
6.9 Tatpep5, Tatpep15 und Tatpep16 unterstützen die Invasion/Migration sowie die Gefäßneubildung in HUVEC	59
7 Zusammenfassung	61
8 Summary	62
9 Literaturverzeichnis.....	63
Anhang	75
Danksagung	75
Lebenslauf.....	76
Publikationen	79
Eidesstattliche Erklärung	82

2 Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin (Ala)
Å	Angström
AA	Aminosäure (amino acid)
Abb.	Abbildung
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
AMC	7-Amido-Methylcumarin
AP-1	Activating Protein 1
bFGF	basic fibroblast growth factor
C	Cystein
CSN	COP9 Signalosom
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäue (deoxyribonucleic acid)
DTT	Dithiothreitol
ECM	extrazellulären Matrix
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ECL	enhanced chemiluminescence
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermal growth factor
EGFR	EGF receptor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
et al.	et alii (und andere)
FCS	fötales Kälberserum (fetal calf serum)
FMOC	9H-(f)luoren-9-yl(m)eth(o)xy(c)arbonyl
GST	Glutathionyl-S-Transferase
h	Stunde (n)
HB-EGF	heparin-binding epidermal growth factor
HIV-1	Humanes Immundefizienzvirus-1
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells

Abkürzungsverzeichnis

I	Isoleucin
K	Lysin
LTR	Long Terminal Sequence Repeat
L	Leucin
M	Methionin (Met)
MAP	Mitogen-activated protein
min	Minute (n)
mM	millimolar
MHC Klasse I	Major Histocompatibility Complex
MMP1	matrix metalloproteinase 1
mRNA	messenger RNA
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
N	Asparagin
NLS	nuclear localization signal
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAI-1	plasminogen-activator-inhibitor-1
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
p53	Protein 53 kDa
Ras	(rat sarcoma) Protoonkogen
Raf	Protoonkogen
rpm	revolutions per minute, „Umdrehungen pro Minute“
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumlaurylsulfat (sodium dodecyl sulphate)
SP1	Specificity protein 1
TAR-Element	Transacting Responsive Element
Tat	trans-acting transcriptional activator
TCE	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylendiamin
t-PA	tissue-plasminogen activator
uPA	urokinase plasminogen activator

Abkürzungsverzeichnis

uPAR	uPA receptor
VEGF	vascular endothelial growth factor
Y	Tyrosin

3 Einleitung

3.1 Angiogenese

Die Angiogenese wurde 1935 von Hertig als ein Prozess der Bildung von neuen Blutgefäßen in der Plazenta beschrieben (*Hertig et al., 1935; Risau et al., 1997*). Später, 1971, verwendete Folkman den Begriff auch für das Gefäßwachstum in soliden Tumoren (*Folkman et al., 1971*). Prinzipiell steht die Angiogenese für das Wachstum von Kapillaren aus einem bereits vorgebildeten Kapillarsystem (*Risau et al., 1997*). Eine komplexe Wechselwirkung zwischen Zellen, löslichen Faktoren und der extrazellulären Matrix bildet die Voraussetzung für den koordinierten Ablauf einer solchen Gefäßneubildung (*Zhang et al., 2004*). Hierbei unterscheidet man zwischen einer sprossenden und einer nicht sprossenden Form (*Risau et al., 1997*): Die sprossende Angiogenese beginnt mit der Proliferation von Endothelzellen aus präexistierenden Kapillaren. Nach proteolytischer Degradation der Extrazellulärmatrix kommt es infolge chemotaktischer Endothelzellmigration zur Bildung kapillärer Sprossen ins umliegende Gewebe (*Folkman et al., 1995*). Bei der nicht-sprossenden Angiogenese dagegen zerteilen transkapilläre Matrixstege präexistierende Gefäße, was zuerst für die embryonale Lunge beschrieben wurde (*Folkman et al., 1971; Patan et al., 1996*). Welche der beiden synchron stattfindenden Angiogeneseformen während der Entwicklung von Organen vorzufinden ist, hängt wahrscheinlich von der Anzahl bereits vorhandener Gefäße bei Organwachstumsbeginn ab (*Risau et al., 1997*). Es entstehen jeweils kapilläre Netzwerke zur lebensnotwendigen Nähr- und Sauerstoffversorgung von Geweben (*Hertig et al., 1935*).

Die Angiogenese spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Aufrechterhaltung der Homöostase, z. B. bei der Menstruation und der Wundheilung, und bei verschiedenen pathologischen Zuständen wie der diabetischen Retinopathie und dem Wachstum von soliden Tumoren (*Hanahan et al., 1996; Torry et al., 1997; Smith et al., 1998; Gargett et al., 1999*). Der Prozess der Angiogenese verläuft in vier unterscheidbaren Phasen: 1. Abbau der extrazellulären Matrix (ECM), 2. Zell-Migration, 3. Zell-Proliferation und 4. Strukturelle Reorganisation (*Kumar et al., 1998*). In den letzten Jahren hat die Angiogenese-Forschung exponentiell zugenommen, und es wurden einige Faktoren identifiziert, welche die Angiogenese stimulieren. Dazu gehören der basic fibroblast growth factor (bFGF), welcher die Proliferation einer Reihe von Zellen induziert und die Migration von Endothelzellen stimuliert (*Folkman et al., 1987; Yang et al., 1996*) oder der vascular endothelial growth

factor (VEGF), der das Wachstum und die Vermehrung von Endothelzellen induziert (*Leung et al., 1989*). Das Wachstum und die Metastasierung von soliden Tumoren sind von der Neovaskularisierung abhängig. Ohne Angiogenese kann ein solider Tumor nur bis zu einem Durchmesser von 1-2 mm wachsen. Daher bekam die Erforschung der Tumorangiogenese einen hohen Stellenwert bei der Suche nach neuen Tumorthapieformen. Es konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen große Mengen von VEGF produzieren können und damit die Angiogenese von Endothelzellen anregen. Die erhöhte VEGF-Produktion in Tumorzellen wird durch den COP9 Signalosom (CSN)-abhängigen c-Jun-Signalweg gesteuert, welcher vollständig durch Curcumin hemmbar ist (*Pollmann et al., 2001*).

Die therapeutische Angiogenese bezeichnet die Induktion der Gefäßneubildung und verbesserte Kollateralgefäßbildung durch das lokale Einbringen angiogenetischer Wachstumsfaktoren und Zytokine (*Rissanen et al., 2001*) bzw. durch die Transplantation (*Kalka et al., 2000*) oder Mobilisation (*Takahashi et al., 1999*) autologer endothelialer Progenitorzellen (*Asahara et al., 1997; Sprengers et al., 2008*). Die klinische Voraussetzung für diese bislang experimentelle Form der Revaskularisationstherapie ist die peripherarterielle Verschlusskrankheit im klinischen Stadium III und IV nach Fontaine ohne weitere chirurgische oder interventionelle Option (*Sprengers et al., 2010*). Davon betroffen sind in erster Linie Patienten mit fortgeschrittener Makro- und Mikroangiopathie.

3.2 Periphere arterielle Verschlusskrankheit

Unter der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) versteht man eine Durchblutungsstörung der Beine oder der Arme. Diese wird durch Verengungen oder Verschlüsse von Arterien verursacht. In 95% der Fälle ist die pAVK auf eine Arteriosklerose zurückzuführen. Die Erkrankung entwickelt sich meist langsam, teilweise über mehrere Jahre hinweg. Entdeckt wird sie häufig erst, wenn Beschwerden erscheinen. Oft wird die Krankheit durch ungesunde Lebensgewohnheiten in ihrem Verlauf beschleunigt. Fünf bis zehn Prozent der Erwachsenen in Deutschland leiden an peripheren arteriellen Durchblutungsstörungen der unteren Gliedmaßen. Die Erkrankungshäufigkeit nimmt mit dem Alter zu. Bei den über 65-Jährigen sind es bereits zirka 20 Prozent der Bevölkerung, die arterielle Gefäßengpässe aufweisen. Die pAVK ist demnach sehr häufig und weit verbreitet. Männer sind häufiger betroffen als Frauen (*Diehm et al., 2011*).

Periphere arterielle Durchblutungsstörungen lassen sich, je nach Ausmaß der durch sie verursachten Beschwerden in den Beinen, in vier Stadien einteilen (*Fontaine et al., 1954*).

Einleitung

Zentrales Ziel in der Therapie der pAVK ist in allen vier Stadien die konsequente Behandlung der Risikofaktoren. Darüber hinaus unterscheiden sich die jeweiligen Behandlungsziele für die einzelnen Stadien der pAVK (Abb. 1).

Im Stadium I der Erkrankung ist der Patient noch beschwerdefrei. Hier gilt es, ein Fortschreiten der Krankheit durch die Behandlung der Risikofaktoren zu verhindern. Patienten im Stadium II der Krankheit leiden unter belastungsabhängigen Schmerzen in den Beinen. Das Ziel der Behandlung ist es, die schmerzfreie Gehstrecke sowie die Gesamtgehstrecke des Patienten zu verlängern. Im Stadium III und IV kommt es zu Schmerzen in Ruhe sowie zusätzlichen Geschwüren und absterbendem Gewebe (*Ouriel et al., 2001*). Behandlungsziele sind die Erleichterung der Schmerzen, die Abheilung von Geschwüren und die Vermeidung von Amputationen (*Luther et al., 1996*).

pAVK-Stadium	Beschwerden	Therapiemöglichkeiten
I	Keine, pAVK nur apparativ nachweisbar	Beeinflussung der Risikofaktoren
IIa	Belastungsabhängige Muskelschmerzen, schmerzfreie Gehstrecke > 200m	Gehtraining, Medikamente, Endovaskuläre Therapie
IIb	Schmerzfreie Gehstrecke < 200m	Gehtraining, Medikamente, Endovaskuläre Therapie, Gefäßchirurgie
III	Ruheschmerzen	Medikamente, Endovaskuläre Therapie, Gefäßchirurgie
IV	Gangrän, Nekrose	Lokale Maßnahmen, Medikamente, Endovaskuläre Therapie, Gefäßchirurgie, Amputation

Abb. 1: Stadieneinteilung nach Fontaine (*Fontaine et al., 1954*) und Therapiemöglichkeiten der pAVK.

3.3 Angiogenese und Therapie von vaskulären Erkrankungen

In jüngster Zeit rückt die Angiogenese-Forschung in den Mittelpunkt des Interesses bei der Suche nach neuen Therapieformen der pAVK. Das Ziel der klinischen Forschung besteht in der Identifizierung von geeigneten Stimulatoren der Angiogenese. Die Induktion der Angiogenese durch VEGF₁₆₅ konnte experimentell und klinisch gezeigt werden (*Baumgartner et al., 2001; Baumgartner et al., 1998; Folkman et al., 1998; Isner et al., 1998; Isner et al., 1996; Takeshita et al., 1994; Vale et al., 2001*). VEGF gehört zu den potentesten Stimulatoren der Angiogenese. Die klinische Applikation ist allerdings nicht unbedenklich, da eine Wachstumsstimulation sowohl physiologischer als auch maligner Gewebe erfolgen kann. Die positiven Effekte einer Vaskularisierung bei Gefäßerkrankungen konnten tierexperimentell nachgewiesen werden (*Baumgartner et al., 1998*). Daneben wurde jedoch auch die Aktivierung atherosklerotischer Plaques beobachtet (*Celletti et al., 2001*). Die Suche nach weiteren pro-angiogenen Substanzen hat für die klinische Anwendung bei peripheren arteriellen Gefäßerkrankungen, insbesondere der pAVK, eine hohe Priorität. Bei nicht mehr gegebener Revaskularisationsmöglichkeit durch endovaskuläre oder konventionell gefäßchirurgische Therapieformen stellt die Angiogenese eine verbleibende Option zur Behandlung der chronischen kritischen Ischämie in den Stadien III und IV der pAVK nach Fontaine dar.

3.4 Gefäßwachstum

Das Wachstum von Gefäßen wird in Vaskulogenese, Angiogenese und Arteriogenese unterteilt (*Risau et al., 1997*). Vaskulogenese beschreibt die Neuentstehung von Gefäßstrukturen aus einzelnen Zellen (*Luttun et al., 2003*). Diese Form des Gefäßwachstums ist der Hauptmechanismus während der embryonalen Entwicklung sowohl von Arterien, Arteriolen und Kapillaren, als auch von Venolen und Venen (*Demir et al., 2010*). Weitere Formen des Gefäßwachstums beziehen sich auf die postnatale Gefäßentwicklung. Postnatal unterscheidet man die Angiogenese von der Arteriogenese. Die Angiogenese betrifft die Neubildung von Gefäßkanälen, typischerweise Kapillaren, durch Aussprossung sich neu bildender Endothelzellen aus bestehenden funktionsfähigen Gefäßen (*Folkman et al., 1995*). Diese präexistenten Gefäße sind in der Lage, zu proliferieren. Dabei entstehen funktionell wichtige Kollateralkreisläufe zur Gewebeversorgung. Es gibt zwei unterschiedliche Formen der Angiogenese. Die Zellen der präexistenten Gefäße können sich teilen und damit verdoppeln, oder durch Aussprossung eine Tochterkapillare bilden. Der entscheidende

Einleitung

Vorgang der Angiogenese ist die Endothelzellproliferation und -migration. Dabei sind viele Faktoren, wie z.B. VEGF, plasminogen-activator-inhibitor-1 (PAI-1) und bFGF, am Ablauf dieses komplexen Prozesses beteiligt (*Heil et al., 2006*). Die Angiogenese stellt einen wichtigen Bestandteil sowohl physiologischer als auch pathologischer Vorgänge dar. Die Angiogenese spielt eine sehr wichtige positive Rolle bei der Wundheilung. Zugleich wurde erkannt, dass der Vorgang der Angiogenese unerwünschterweise auch das Tumorwachstum fördert, indem sich der Tumor die Blutversorgung der Zellen des ihn umgebenden gesunden Gewebes durch Neubildung von Gefäßkapillaren zu Nutze macht. Ein wesentlicher Trigger für die Angiogenese ist eine Verminderung des Sauerstoffgehalts des Gewebes, entweder durch einen vermehrten Sauerstoffverbrauch oder durch ein vermindertes Angebot im Sinne einer Minderdurchblutung des Gewebes. Beim Vorgang der Arteriogenese steht, im Gegensatz zur Angiogenese, nicht die Gefäßneubildung im Vordergrund. Das Substrat der Arteriogenese sind bereits vorbestehende Arteriolen (*Schaper et al., 2003; Arras et al., 1998*). Diese zeichnen sich dadurch aus, dass sie neben Endothelzellen bereits glatte Muskelzellen in ihren Gefäßwänden enthalten. Die Arteriolen werden als präexistent bezeichnet, da sie bereits im Organismus angelegt, aber noch nicht voll durchblutet sind. Arteriogenese ist somit der Mechanismus, der verantwortlich ist für die Erweiterung und das Wachstum von Kollateralkreisläufen aus vorbestehenden unreifen Arteriolen zu voll funktionsfähigen blutführenden Kanälen.

3.5 Das Tat-Protein

Die pro-angiogene Kapazität des durch HIV-1 (Humanes Immundefizienzvirus-1) exprimierten multifunktionellen Proteins Tat (trans-acting transcriptional activator) ist bekannt (*Rubartelli et al., 1998*). Das Tat-Protein induziert Angiogenese (*Albini et al., 1995*), wodurch die Ausbildung des Kaposi-Sarkoms (*Barillari et al., 2002*) während der AIDS-Erkrankung (Acquired Immune Deficiency Syndrome) erklärbar ist. Das Tat-Gen entsteht durch das Spleißen von zwei Regionen des Virus-Genoms (Transaktivierung und Transkription). Das Tat-Protein ist wesentlich für die virale Replikation und in allen Lentiviren von Primaten konserviert (*Jeang et al., 1994; Gallo et al., 1999*). Im HIV-1-infizierten Patienten wird ein Tat-Protein gefunden, das aus 101 Aminosäuren besteht. Das sogenannte vollständige Tat-Protein, bestehend aus 86 Aminosäuren, wurde durch die Zellkultur im Labor hergestellt und existiert nicht in der Natur (*Rana et al., 1999*). Es wurde

Einleitung

jedoch von vielen Forschern bestätigt, dass das 86-Aminosäuren-Tat-Protein genau wie das 101-Aminosäuren-Tat-Protein funktioniert.

Das 86-Aminosäuren-Tat-Protein wird von zwei Exons kodiert. Die ersten 72 Aminosäuren werden von dem ersten Exon kodiert, die übrigen 14 C-terminalen Aminosäuren vom zweiten Exon. Das Tat-Protein besteht aus 5 Domänen; einer N-terminalen, einer Cystein-reichen, einer Kern-, einer basischen und einer C-terminalen Region (Abb. 2). Die basische Region enthält die RNA-Bindungsdomäne und ein NLS (Nuclear Localization Signal). Außerdem ist sie zuständig für den freien Durchgang durch die zelluläre Membran. Im Gegensatz dazu bindet die Cystein-reiche Region unspezifisch an viele Komplexe und ist für die Oligomerisierung des Tat-Proteins zuständig (*Rana et al., 1999*).

1	22	37
MEPVDPRLPEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQVCFITKGL		
49	58	86
GISYGRKKRRRQRRRPSQGGQTHQDPIPKQPTSQSRGDPTGPKE		

Abb. 2: Die Sequenz und die Domänen des HIV-1 Tat-Proteins. AA 1-21: N-terminale Domäne; AA 22-36: Cystein-reiche Domäne; AA 37-48: Kerndomäne; AA 49-57 Basische Domäne; AA 58-86 C-terminale Domäne.

Das Tat-Protein bewirkt eine Erhöhung der Ablesung des HIV-Genoms (*Berkhout et al., 1990*). Auf einer frühen Stufe wird das Tat-Protein im Zellplasma synthetisiert, geht danach in den Zellkern und bindet an das sogenannte TAR-Element (Transacting Responsive Element). Das TAR-RNA-Element befindet sich in der 5'-LTR (Long Terminal Sequence Repeat) – Sequenz. Die Struktur von + 19 bis + 42 in der HIV-mRNA ist Voraussetzung für die Tat-Bindung (*Jakobovits et al., 1988*).

Das Tat-Protein erhöht durch eine verstärkte Initiation und Prolongation der Transkription die Konzentration viraler RNAs (*Frankel et al., 1992*). Es stimuliert die Expression von HIV-Genen um mehr als das Tausendfache. Darüber hinaus wird auch die Expression von Wirtszellproteinen unspezifisch erhöht (*Huang et al., 1994*).

3.6 Das Ubiquitin-Proteasom-System

Das Proteasom-System ist für die Abwehr viraler Infektionen von großer Bedeutung (*Kloetzel et al., 2001*). Der proteolytische Kern des Proteasom-Systems ist das 20S Proteasom, eine multikatalytische Protease, die in allen Organismen von Archaeobakterien bis zu Mammaliazellen nachgewiesen wurde (*Baumeister et al., 1998*). Es ist im Zytoplasma, am Endoplasmatischen Retikulum (ER) und im Zellkern lokalisiert. Als zentraler Bestandteil des Ubiquitin-abhängigen Proteinabbauweges ist es am Abbau vieler zellulärer Proteine beteiligt (*Rock et al., 1994*). Die Substrate des Ubiquitin-Proteasom-Systems sind am meisten Proteine, die als Regulatoren in verschiedensten zellulären Prozessen, wie z.B. im Metabolismus, bei der Transkription und bei der Zellzykluskontrolle fungieren. Das Proteasom ist an der Generierung der Epitope beteiligt, die durch Major Histocompatibility Complex (MHC) Klasse I Moleküle präsentiert werden (*Kloetzel et al., 2004; Momburg et al., 1998*). In eukaryotischen Zellen besteht das 20S Proteasom aus 7 verschiedenen α - und 7 verschiedenen β -Untereinheiten. Der Komplex ist aus vier heptameren Ringen (α 1-7, β 1-7, β 1-7, α 1-7) aufgebaut. Die beiden äußeren Ringe des Enzymkomplexes werden aus den 7 α -Untereinheiten gebildet und die zwei inneren Ringe sind aus den 7 β -Untereinheiten (*Kopp et al., 1993*) zusammengesetzt. Auf den β -Untereinheiten befinden sich die katalytischen Zentren, die in das Innere des proteasomalen Kompartiments gerichtet sind. Die α -Untereinheiten formen an den beiden Enden eine zentrale Öffnung, die mit einem Durchmesser von 13 Å vermutlich nur den Zugang von entfalteten Polypeptidketten zulässt (*Lupas et al., 1993*). Das Proteasom besitzt mindestens fünf verschiedene peptidspaltende Aktivitäten. Künstliche Peptidsubstrate werden an der Carboxylseite von hydrophoben (Chymotrypsin-ähnliche Aktivität), von basischen (Trypsin-ähnliche Aktivität) und von sauren (Peptidyl-Glutamyl-Peptid-spaltende Aktivität) Aminosäuren gespalten (*Rivett et al., 1989; Orłowski et al., 1990*). Darüber hinaus ist die BrAAP-Aktivität (Spaltung nach verzweigten Aminosäuren) und die SNAAP-Aktivität (Spaltung nach kleinen neutralen Aminosäuren) beschrieben (*Orłowski et al., 1993*). Es gibt eine Reihe von Inhibitoren, die die hydrolytische Aktivität des 20S Proteasoms in vivo wie auch in-vitro hemmen. Sehr spezifisch wirkt Lactacystin. Die in wässriger Lösung als Lacton vorliegende Substanz modifiziert die katalytisch aktiven Threoninreste der entsprechenden Untereinheiten (*Cerundolo et al., 1997; Craiu et al., 1997*).

3.7 c-Jun und Angiogenese

Das c-Jun ist ein Mitglied der Activating Protein 1 (AP-1) Familie (*Karin et al., 1997*). Die Proteine der AP-1-Familie sind in der Lage, die Transkription bestimmter Gene durch die Bindung an spezielle DNA-responsive elements zu induzieren. Während die Expression von c-Jun durch verschiedene extrazelluläre Stimuli erhöht wird, ist dessen intrazelluläre Stabilität durch das Proteasom-System Ubiquitin-abhängig reguliert (*Jariel-Encontre et al., 1995*).

Beachtet man die Bedeutung von c-Jun für die Proliferation, Transformation und Apoptose von Zellen, erklärt sich auch sein Einfluss auf die Initiation, Progression und Angiogenese maligner Tumoren. Obwohl, c-Jun in der Lage ist, Zellen zu transformieren, entwickeln transgene, c-Jun überexprimierende Mäuse keine Tumoren. Dagegen geht die verstärkte Expression von c-Fos, Fra1 oder Fra2 mit einer hohen Inzidenz von Osteosarkomen, Lungen- bzw. epithelialen Tumoren einher. Wahrscheinlich spielt aber auch in diesen Fällen c-Jun eine entscheidende Rolle, da Fos-Proteine untereinander keine stabilen Dimere bilden (*Shaulian et al., 2001*). Insbesondere hängt die Entstehung von Lebertumoren und chemisch induzierten Papillomen von einer intakten c-Jun-Funktion ab.

Die Wichtigkeit von c-Jun und anderen AP-1-Proteinen für die Tumor- und Angiogenese lassen auch die von ihnen kontrollierten Gene erkennen. Neben den oben bereits beschriebenen kontrolliert c-Jun auch die Gene von HB-EGF (heparin-binding epidermal growth factor) und EGFR (EGF receptor), die Gene der die Tumordinvasion regulierenden Proteine MMP1 (matrix metalloproteinase 1), MMP3 und CD44 sowie die Gene der proangiogenen Faktoren VEGF, uPA (urokinase plasminogen activator), uPAR (uPA receptor) und Proliferin. Dabei scheint c-Jun vorrangig für die Steuerung der Proliferation und Apoptose verantwortlich zu sein, indes die Fos-Proteine eher für die Tumordinvasion und Angiogenese erforderlich sind, allerdings wiederum im dimeren Verbund mit c-Jun (*Eferl et al., 2003*).

3.8 Specificity protein 1 (SP1) und Angiogenese

Der humane Transkriptionsfaktor SP1 wird in fast allen humanen Zellen exprimiert, wobei die Expressionsstärke, abhängig vom Zelltyp, variiert und sich mit dem Entwicklungszustand der Zelle ändert. SP1 bindet an Methyl-CG-Sequenzen verschiedener Promotoren sowohl gewebsspezifischer als auch ubiquitärer Gene über eine Zink-Finger-Domäne. Die verschiedenen Domänen des 95/105 KDa (nicht glycosylierte/glycosylierte Form) Proteins wurden sowohl biochemisch, als auch strukturell charakterisiert (*Kadonaga et al., 1987*). N-

Einleitung

terminale Deletionsmutanten zeigten, dass die 168 C-terminalen Aminosäuren des Proteins die DNA-Bindungsdomäne enthalten. In diesem Bereich liegen die 3 Zink Finger Motive. Die transkriptionelle Aktivität dieses Deletionsproteins nimmt eindeutig ab.

Der ubiquitäre Transkriptionsfaktor SP1 wurde Anfang der 1980er Jahre isoliert und begründete die Familie der SP1/Krüppel-ähnlichen Transkriptionsfaktoren (*Dynan et al., 1983*). Mitglieder der SP1-Familie binden über drei tandemartige Cys2His2 Zinkfinger Motive an die DNA Konsensussequenzen 5'-GGCGGG-3' bzw. 5'-CACCC-3'. Inzwischen umfasst die Familie über 20 Mitglieder. Strukturell sind die sechs SP-Proteine und 15 Krüppel-Proteine im hochkonservierten C-Terminus homolog. Dennoch binden die SP-Proteine vor allem an 5'-GGCGGG-3' während die Krüppel-Proteine die Sequenz 5'-CACCC-3' favorisieren. Der Aminoterminus der SP-Krüppel-Proteine ist sehr variabel und kann transkriptionelle Aktivator- oder Repressordomänen enthalten. Das NLS (nuclear localization signal), bisher nur in den Krüppel-Proteinen identifiziert, ist in deren Zink-Finger-Domäne bzw. direkt daran anliegend lokalisiert (*Shields et al., 1997; Song et al., 2002*). Der Transkriptionsfaktor SP1 ist ein starker transkriptioneller Aktivator, der an seine glutaminreichen Aktivatoromänen Koaktivatoren wie z.B. TAFII130 (*Hoey et al., 1993*) und CRSP rekrutieren kann (*Ryu et al., 1999*). Der Koaktivator p300 interagiert dagegen mit dem C-Terminus von SP1 und verstärkt dadurch die Affinität der SP1-DNA-Bindungsdomäne zum Zielpromotor (*Suzuki et al., 2000*). Aktivität und Stabilität von SP1 werden außerdem durch Phosphorylierung, Glycosilierung und Acetylierung beeinflusst. So regulieren eine Reihe von Kinasen und Phosphatasen wie CamKII, PKC, PKA, CyclinA/cdk2, und PP2A, meist über die Modifikation der DNA-Bindung, die transkriptionelle Aktivität von SP1 (*Armstrong et al., 1997; Rohlf et al., 1997; Pal et al., 1998; Garcia et al., 2000; Fojas et al., 2001*).

3.9 Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) und Angiogenese

Bei bFGF handelt es sich um einen Heparin bindenden Wachstumsfaktor, der von einer Vielzahl verschiedener Zelltypen sezerniert wird. Das Molekulargewicht beträgt 16-18 kDa. Eine entscheidende Rolle spielt der Wachstumsfaktor sowohl bei der Regeneration geschädigter Gefäßabschnitte als auch bei der Ausbildung von Kollateralen in ischämischen Bezirken (*Yang et al., 1996*). Durch bFGF wird sowohl die Replikation als auch die Migration der Endothelzellen gefördert. In einer Arbeit von Sato und Rifkin (*Sato et al., 1988*) wurden konfluente einlagige Zellschichten von Endothelzellen auf Glasplatten kultiviert. In der Folge wurde ein Teil des Endothels mit einer Rasierklinge weggeschabt. Es kam zur Transmigration

der Endothelzellen in den denudierten Bereich. Diese Transmigration konnte durch die Kultur mit spezifisch gegen bFGF gerichteten Antikörpern verhindert werden. Der Wachstumsfaktor wirkt offenbar auch autokrin ohne Externalisation auf die Endothelzellen. An der Oberfläche der Endothelzellen befinden sich niedrig- und hochaffine bFGF-Rezeptoren. Die niedrig-affinen Rezeptoren führen zu einer Konformationsänderung des Wachstumsfaktors, der daraufhin an den hochaffinen Rezeptor binden kann. Der hochaffine Rezeptor führt zu einer Aktivierung der Tyrosin-Kinase (*Brindle et al., 1993*). Eine wichtige Enzymkaskade geht offenbar über die Aktivierung von Ras-Protoonkogen, Raf-Protoonkogen und Mitogen-activated protein (MAP), so dass es zur Transkription von Wachstumsgenen kommt und letztendlich zur mitogenen Antwort der Zelle. bFGF hat auch Einfluß auf die Elektrophysiologie der Endothelzellen. Der Wachstumsfaktor induziert eine Steigerung der Inositol-1,4,5-triphosphat-Konzentration. Diese führt zu einer Freisetzung von Calcium aus dem ER, welches den Calcium-aktivierten Kaliumkanal aktiviert (*Tang et al., 1999*).

3.10 Der angiogene Wachstumsfaktor Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

VEGF ist ein endothelial sezerniertes, endothelspezifisches Mitogen mit angiogenen Eigenschaften, das eine parakrine Steuerung der Angiogenese möglich erscheinen lässt (*Carmeliet et al., 1998*). Seine Gen-Expression wird durch Bindung des infolge Hypoxie vermehrt exprimierten Transkriptionsfaktors HIF-1 an den Promotor hochreguliert (*Ikeda et al., 1995; Shweiki et al., 1992*). VEGF ist einer der wichtigsten Faktoren in der tumorinduzierten Angiogenese. Er fördert nach Bindung an seine spezifischen Rezeptoren KDR und Flt-1 auf Endothelzellen deren Proliferation und Migration. Neben seiner mitogenen Eigenschaft funktioniert VEGF auch als Überlebensfaktor für serumfrei kultivierte Endothelzellen. Über den Phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt Signaltransduktionsweg bewirkt es im menschlichen Endothel die Expression der anti-apoptotischen Proteine Bcl-2 und Al (*Gerber et al., 1998*). Außerdem veranlasst es die endotheliale Expression einiger Proteasen, wie tissue-Plasminogen-Activator (t-PA) und dessen Inhibitor (PAI-1) (*Pepper et al., 1991; Ouriel et al., 1991*). VEGF stimuliert die Gefäßneubildung, indem es die Migration und Proliferation der Endothelzellen aktiviert und gleichzeitig als Überlebensfaktor für diese Zellen in den neu formierten Gefäßen agiert (*Ferrara et al., 2003*).

3.11 Rolle von Plasminogen-Activator-Inhibitor-1 (PAI-1) in der Angiogenese

Ein wichtiger Regulator der Angiogenese ist der PAI-1. PAI-1 ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 48 kDa und gehört zur Familie der Serinprotease-Inhibitoren. Seine physiologische Funktion besteht hauptsächlich in der Inhibition der Plasminogen-Aktivatoren (t-PA und u-PA) (*Loskutoff et al., 1999; Ossowski et al., 2000; Preissner et al., 2000*). Er nimmt damit eine zentrale, regulatorische Funktion in der Ausbildung stabiler Thromben ein. PAI-1 wird im Plasma durch Bindung an Vitronectin in seiner aktiven Konformation stabilisiert. Darüber hinaus spielt die Expression von PAI-1 eine wichtige Rolle in der Regulation der Zellmigration und Angiogenese. Für den notwendigen Abbau der ECM in der ersten Phase der Angiogenese müssen die Matrix-Metalloproteasen durch Plasmin aktiviert werden. Die Umwandlung von Plasminogen in Plasmin wird durch Plasminogen-Aktivatoren stimuliert, die durch PAI-1 gehemmt werden können (*McMahon et al., 2001*). Interessanterweise ist die Überexpression von PAI-1 mit einer schlechten Prognose bei einer Reihe von Tumoren verbunden, und Mäuse mit PAI-1 Defizit haben ein reduziertes Tumorstadium und eine reduzierte Angiogenese (*Gutierrez et al., 2000*). Offensichtlich hemmt PAI-1 die Angiogenese in bestimmten Phasen, wahrscheinlich den Abbau der ECM, während es in anderen Phasen die Angiogenese stimuliert. Der exakte Wirkmechanismus von PAI-1 ist bisher unbekannt. Die Transkriptionsfaktoren c-Jun und SP1 sind für die Induktion von PAI-1 zuständig (*Arts et al., 1999; Chen et al., 1998*), und VEGF ist einer der wichtigsten Induktoren von PAI-1 in Endothelzellen (*Pepper et al., 2001*).

3.12 Fragestellung und Ziele

Die pro-angiogene Kapazität des durch HIV-1 exprimierten multifunktionellen Proteins Tat ist bekannt. Über die Induktion der Angiogenese kommt es zum Beispiel zur Ausbildung des Kaposi-Sarkoms während der AIDS-Erkrankung. Andererseits hemmt das Tat-Protein die Antigenpräsentation mittels MHC Klasse I Molekülen. Es konnte gezeigt werden, dass das HIV-1 Tat-Protein einen führenden Einfluss auf das COP9 Signalosom/26S Proteasom System hat. Tat konkurriert hierbei mit dem 11S Regulator um die Bindungsstelle des 20S Proteasoms. Dadurch wird die Antigenprozessierung vermindert und eine Präsentation antigener Peptide über MHC Klasse I Moleküle verhindert. Dieser Tat-Effekt führt zur Unterwanderung des Immunsystems durch das HIV-1.

Einleitung

Das Anliegen des Projektes bestand in der Identifizierung von Tat-Peptiden, die Angiogenese induzieren, aber keinen Effekt auf das Immunsystem haben. Somit sollte der Effekt des Tat-Proteins auf die Angiogenese von dem Effekt auf das Immunsystem getrennt werden.

Es sollten Tat-Peptide hinsichtlich ihrer angiogenen Kapazität getestet und deren Effekt auf die Produktion pro-angiogenetischer Faktoren analysiert werden. Solche Peptide könnten für die Therapie schwer heilbarer vaskulärer Erkrankungen dienen. Sie könnten die Therapie mit VEGF ersetzen, durch die eine Reihe unerwünschter Nebenwirkungen hervorgerufen wird.

Als Modell-Zelllinie dienten normale Endothelzellen (HUVEC, Human umbilical vein endothelial cells) die mit Tat-Peptiden behandelt wurden. Kriterien für die Auswahl potenzieller pro-angiogener Tat-Peptide waren die Induktion von c-Jun, SP1 und PAI-1 in HUVEC. Drei potentiell pro-angiogene Tat-Peptide wurden identifiziert. Selektierte Tat-Peptide wurden in einem Matrigel-System auf ihre Fähigkeit, die Invasion/Mobilität von Endothelzellen zu stimulieren, untersucht.

4 Material und Methodik

4.1 Material

4.1.1 Kits

Biorad protein assay	Biorad
BM chemiluminescence western blotting reagent	Boehringer Mannheim
Endofree Maxi Plasmidkit	Qiagen
Endothelial Cell Growth Medium Kit	PromoCell
Human VEGF Elisa Kit (C-64406)	PromoCell
Human bFGF EIA Kit (C-60207)	PromoCell
Mini Plasmidkit	Qiagen
MTT Kit	Sigma-Aldrich
PAI-1 ELISA Kit (821)	American Diagnostica
Perfect™ Transfection Kit	Invitrogen
Qiaquick Gelreinigungskit	Qiagen
Site-directed Mutagenesis Kit	Stratagene
Thrombin-Cleavage-Capture-Kit	Novagen

4.1.2 Zellen

HUVEC	Cell-Lining
-------	-------------

4.1.3 Enzyme

Restriktionsenzyme	Biolabs
T4 Bakteriophage DNA Polymerase	Biolabs
T4 DNA-Ligase	Roche
Taq-Polymerase	Roche

4.1.4 Geräte

Agarosegelkammer Geltray	Renner
CK40 inverted lab. Syst. Microscope	Olympus
C2020Z Digital Camera	Olympus
Eismaschine AF-10	Scotsman

Material und Methodik

Elektroporationsgerät	Peqlab
Feinwaage MC1	Satorius
Fluorimeter Fluostar Reader	SLT
French Press	SIM-AMINCO
Geltrockner Drystar	Hölzel
Heizblock	Eppendorf
Inverses Mikroskop DMI	Leica
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf
Kühlzentrifuge Avanti J-25	Beckman
Kühlzentrifuge RC24	Sorvall
Magnetrührer	Heidolph
Medifuge	Heraeus
Membranvakuumpumpe	Vacuumbrand
Mikrowelle	Moulinex
MilliQ-Anlage	Millipore
Mixer 5432	Eppendorf
PCR Thermocycler UNO Block	Biometra
Phast Gel System	Pharmacia
Photometer	Shimadzu
Pipetten	Gilson
Pipettus-Akku	Hirschmann
Röntgenfilmentwickler Hyperprocessor	Amersham
Rotor SS34	Sorvall
Rotor SW40	Beckman
Schüttlerwasserbad	GFL
Schüttler	Infos
Sterilbank	Baker
Stickstofftank	Taylor-Wharton
Tischultrazentrifuge Optima TLX	Beckman
Ultrazentrifuge Ultra Pro 80	Sorvall
Vakuumtrockner	Labcono
Mischer Vortex VF2	Janke & Kunkel
Waage BP2100S	Sartorius
Wasserbad U3	Julabo

Zellkultur-Inkubator BB4220CV

Heraeus

4.1.5 Sonstiges

3MM Papier

Whatman

Acrylamid 30 %, 29:1

Roth

Aprotinin

Appllichem

Bacto-Agar

DIFCO

Bacto-Trypton

DIFCO

BD BioCoat Matrigel Invasion Chambers

Becton Dickinson

Cell Culture Cluster

Corning Lifesciences

Centricon

Amicon/Millipore

DMSO

Fluka

Elektroporationsküvetten

Peqlab

Endothel-Zellkultur-Medien

PromoCell

Endothelial Cell Basal Medium

PromoCell

Endothelial Cell Growth Medium

PromoCell

FCS

Seromed

Fluorogene Proteasom Substrate

Bachem Biochemica

Hefe-Extrakt

DIFCO

IgG-Standard

Biolab

Glutatathion-Agarose

Sigma

L-Glutamin

Seromed

Lactacystin

Affiniti

Mehrfachkulturschalen

Corning Lifesciences

Matrigel Growth Factor reduced

Becton Dickinson

Mikroliterspritze

Hamilton

Molekulargewichtsstandard, DNA

GibcoBRL

Molekulargewichtsstandard, Protein

Amersham

Nitrocellulose Membran

Schleicher&Schuell

Penicillin/Streptomycin

Seromed

Phast-System, Nativ-Gel-Pufferstreifen

Pharmacia

PMSF

Sigma

pcDNA3.1 Vektor

Invitrogen

PS-Microplatte

Greiner bio-one

Röntgenfilme

Kodak

Material und Methodik

Schwarze Mikrotiter-Platten	Dynatec
Sekundärantikörper	Seramun
Steriles Plastikmaterial für die Zellkultur	Falcon
Sterilfilter	Microgen
TEMED	Serva
Transwell Membraneinsätze	Corning Lifesciences
Trypanblau-Lösung	Sigma
Trypsin-EDTA	Gibco BRL
Zellheber	Corning Lifesciences
Zellkultur-Medien	Seromed
Zephiranchlorid, 17 %	ICN
β-Mercaptoethanol	Serva

4.2 Methoden

4.2.1 Synthese von Tat-Protein und Tat-Peptiden

Das HIV-Tat Protein und die davon abgeleiteten Tat-Peptide wurden durch Fmoc (9H-fluoren-9-yl methoxycarbonyl) Strategy in einem 433A Peptidsynthesizer (ABI) hergestellt. Das GST-Tat (Glutathion-S-Transferase) Konstrukt wurde vom NIH AIDS Reagent Program (USA) zur Verfügung gestellt (contributor Dr. J. Brady).

Primer für 86-AA Tat und Tat-Fragment DNA-Konstrukte (5' → 3')

Primer A: ACG TGG ATC CTG ATG GAG CCA GTA GAT CCT AGA

Primer B: TCG CTC GAG CTA TTC CTT CGG GCC TGT CGG

Primer C: ACG TAC GTT ACC TTG GCA ATG AAA GCA ACA

Primer D: ACG TGG TAC CCC ACC TCC CAA TCC CGA GGG

PCR-Ansatz (100 µl):
2 µl DNA (10 ng/µl)
Je 2 µl Primer (0,1 µg/ml)
10 µl 10 x PCR-Puffer
8 µl MgCl₂ (25 mM)

Material und Methodik

je 2 µl dNTP (0,2 mM)
0,5 µl Taq-Polymerase (2,5 U)
aqua dest. ad 100 µl

Die Template-DNA und die Oligonukleotide wurden vor der PCR 3 min bei 95°C denaturiert. Es wurden folgende PCR-Bedingungen gewählt: 1 min, 95°C; 45 sec, 52°C; 45 sec, 72°C; 33 Zyklen; 5 min, 72°C. Um die gewünschten amplifizierten Fragmente von sonstiger DNA im PCR-Ansatz zu trennen, wurde der gesamte Reaktionsansatz auf ein präparatives 1%iges TAE-Agarosegel aufgetragen. Die entsprechenden DNA-Fragmente wurden ausgeschnitten und mit einem Gel-Extraktions-Kit von QIAGEN isoliert.

4.2.2 Durchführung von Proteaseassays mit fluorogenen Substraten, kinetische Untersuchungen mit dem 20S Proteasom

Substratpuffer:	50 mM	Tris pH 7,5
	25 mM	KCl
	10 mM	NaCl
	1 mM	MgCl ₂
	0,1 mM	EDTA
	1 mM	DTT, frisch zugesetzt

Stammlösung des Peptidsubstrats: 4 mM Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC in DMF gelöst

Die Assays wurden in der Regel in 100 µl Substratpuffer mit 0,1 µg 20S Proteasom und 100 µM Peptidsubstrat (Endkonzentration) durchgeführt. Es wurden schwarze 96-Lochplatten verwendet. Die Fluoreszenz der vom Substrat abgespaltenen Gruppe (AMC: 7-Amido-Methylcumarin) wurde mit dem „Fluostar STL“ oder „Fluoroscan II“ (Labsystems) bei einer Exzitation von 390 nm und einer Emission von 460 nm bei Raumtemperatur (RT) oder bei 37°C gemessen. Der „Gain“ betrug 20, die Anzahl der „Blitze“ 10. Die Fluoreszenz wurde in ΔF/min angegeben.

1. Titration ansteigender Mengen von Tat-Peptiden gegen eine konstante Menge des 20S Proteasoms.

Material und Methodik

0,1 µg 20S Proteasom wurden mit je 0, 0,15625, 0,3125, 0,625, 1,25, 2,5, 5, und 10 µg/ml der Tat-Peptide 30 min bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurde das Peptidsubstrat zugegeben und die Fluoreszenz mit dem „Fluoroscans II“ (Labsystems) bei 37°C gemessen.

2. Titration ansteigender Mengen von Tat-Peptiden gegen eine konstante Menge des nativen 11S Regulators und des 20S Proteasoms.

0,1 µg 20S Proteasom und 0,16 µg nativer 11S Regulator wurden mit 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 und 0 µg/ml der Tat-Peptide 30 min bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurde das Peptidsubstrat zugegeben und die Fluoreszenz mit dem „Fluoroscans II“ (Labsystem) bei 37°C gemessen.

3. Titration ansteigender Mengen von REG α wt oder REG α m gegen eine konstante Menge des 20S Proteasoms.

0,1 µg 20S Proteasom wurden mit 120, 60, 30, 15, 7,5, 3,75, 1,8725 und 0 µg/ml REG α wt oder REG α m 30 min bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurde das Peptidsubstrat zugegeben und die Fluoreszenz mit dem „Fluostar STL“ bei RT gemessen.

4. Titration ansteigender Mengen von REG α wt/REG β oder REG α m/REG β gegen eine konstante Menge des 20S Proteasoms.

0,1 µg 20S Proteasom wurden mit 20, 10, 05, 2,5, 1,25, 0,625, 0,3125 und 0 µg/ml REG α wt und REG β oder REG α m und REG β 60 min bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurde das Peptidsubstrat zugegeben und die Fluoreszenz mit dem „Fluostar STL“ bei RT gemessen.

5. Titration ansteigender Mengen von REG α wt gegen eine konstante Menge der REG α wt/REG β und des 20S Proteasoms.

0,1 µg 20S Proteasom und 0,3 µg REG α wt, 0,3 µg REG β wurden mit 30, 20, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5 und 0 µg/ml REG α wt 60 min bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurde das Peptidsubstrat zugegeben und die Fluoreszenz mit dem „Fluostar STL“ bei RT gemessen.

6. Titration ansteigender Mengen von REG α m gegen eine konstante Menge der REG α wt/REG β und des 20S Proteasoms.

0,1 µg 20S Proteasom und 0,3 µg REG α wt, 0,3 µg REG β wurden mit 30, 20, 16, 8, 4, 2, 1, 0,5 und 0 µg/ml REG α m 60 min bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurde das Peptidsubstrat zugegeben und die Fluoreszenz mit dem „Fluostar STL“ bei RT gemessen.

7. Titration ansteigender Mengen der Tat-Peptide gegen eine konstante Menge des 20S Proteasoms.

0,1 µg 20S Proteasom wurden mit 10, 5, 2,5, 1,25, 0,625, 0,3125, 0,15625 und 0 µM/ml Tatpeptide 1, 2 und 5 30 min bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wurde das Peptidsubstrat zugegeben und die Fluoreszenz mit dem „Fluostar STL“ bei RT gemessen.

Die Daten wurden nach folgender Formel analysiert:

$$V = \frac{V_{\max 1} + V_{\max 2}[\text{Tat}]}{(K_1 + [\text{Tat}]) (K_2 + [\text{Tat}])}$$

Dabei wurden für das Tat-Protein und den 11S Regulator zwei Bindungsstellen am 20S Proteasom angenommen. Die Bedeutungen der kinetischen Konstanten $V_{\max 1}$, $V_{\max 2}$, K_1 und K_2 sind durch folgende Gleichungen erklärt:

$$\begin{aligned} V_{\max 1} &= (K_1^{\text{Tat}} K_2^{\text{Tat}} / K_1^{\text{REG}} + K_2^{\text{REG}}) [\text{REG}]^2 \\ V_{\max 2} &= V_{\max} (K_1^{\text{Tat}} / K_1^{\text{REG}} + K_2^{\text{Tat}} / K_2^{\text{REG}}) [\text{REG}] \\ K_1 &= K_1^{\text{Tat}} (1 + [\text{REG}] / K_1^{\text{REG}}) \\ K_2 &= K_2^{\text{Tat}} (1 + [\text{REG}] / K_2^{\text{REG}}) \end{aligned}$$

4.2.3 Zellen und Zellkulturen

Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC)
Endothel Zellkultur Medium
Endothel Zellkultur serumfreies Medium
Trypsin/EDTA-Lösung

HUVEC sind Zellen aus dem Endothel der Nabelschnurvenen von Neugeborenen. Sie wurden bei der Firma Cell-Lining, Germany bestellt und auf Trockeneis gelagert und verschickt. HUVEC wurden im Endothel Zellkultur Medium (PromoCell, Germany) bei 37 °C unter 5% CO₂ kultiviert. Jegliche Behandlung der Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen. Waren die Zellen konfluent, wurden sie nach einmaligem Waschen mit 1 x PBS mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst und neu ausplattiert. Die Zentrifugationsschritte erfolgten bei 200 x g für 5 min bei 4°C. Die Zellen wurden zwischen den Passagen 4 und 9 benutzt.

4.2.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen wurden in einer Konzentration von 3×10^6 pro ml eingefroren. Dazu wurden die Zellen für 5 min trypsinisiert und in Kulturmedium überführt um das Trypsin zu inaktivieren. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (3 min, bei 12000 rpm) und der Überstand abgesaugt. Das Zellpellett wurde in eiskaltem Kryomedium (90% FCS und 10% DMSO) resuspendiert und die Suspension auf Kryoröhrchen aliquotiert. Das Einfrieren erfolgte langsam in speziellen Behältnissen, diese enthielten Isopropanol. Die Zellen wurden nach einigen Tagen in flüssigem Stickstoff gelagert. Das Auftauen erfolgte möglichst schnell, die Kryoröhrchen wurden auf Eis zum Zellabor transportiert. Der aufgetaute Inhalt (bei 37°C im Wasserbad) wurde in 10 ml Medium aufgenommen und für 3 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen wurden in frischem Medium resuspendiert und zur Kultivierung ausgesät.

4.2.5 Inkubation der Tat-Peptide und des Tat-Proteins mit HUVEC

Zwischen Passage 4 und 9 wurden die HUVEC auf 6-well-Platten (je ca. $0,5 \times 10^6$ Zellen pro Well) verteilt. Am zweiten Tag wurden Tat-Peptide (je 2 µg/ml oder 10µg/ml, Endkonzentration) und das rekombinante Tat-Protein (2 µg/ml oder 10µg/ml, Endkonzentration) sowie Curcumin (10µM) zu den HUVEC zugesetzt (Abb. 3). Das Endothelmedium war Serumfrei und enthielt keine weiteren Wachstumsfaktoren. Nach 24 h wurde 1 ml zellfreier Überstand abgenommen und für 5 Minuten zentrifugiert (15000 g, 4°C) und der Überstand bei -70 °C gelagert. Dann wurden die behandelten und die unbehandelten HUVEC (Kontrolle) geerntet.

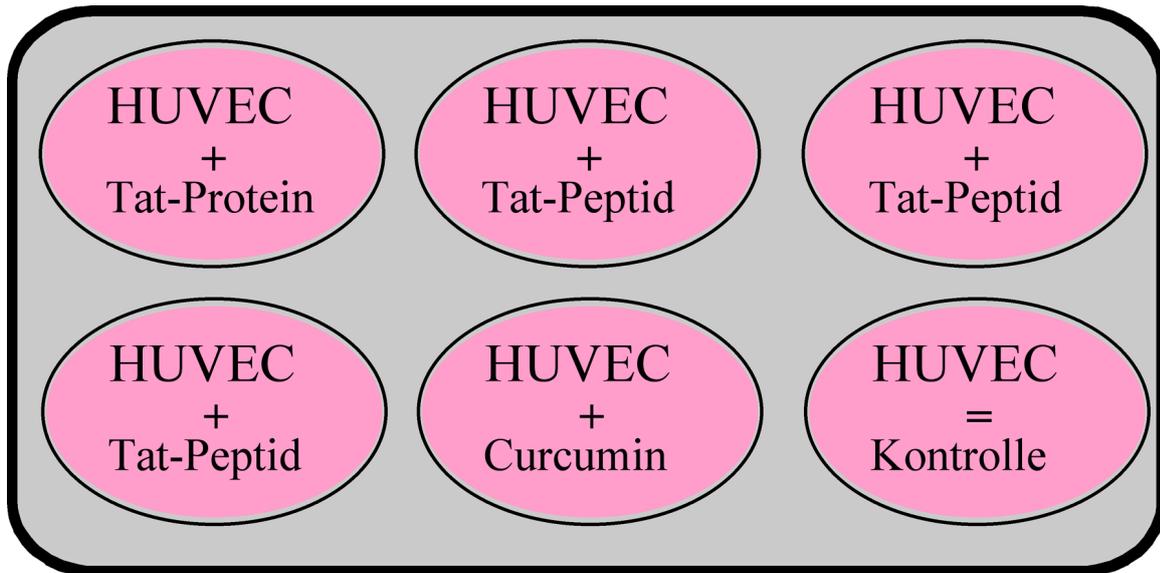


Abb. 3: 6-well-Platte: Inkubation von HUVEC mit Tat-Protein, Tat-Peptiden und Curcumin.

4.2.6 Lyse der Zellen

Lysepuffer:	50 mM	Tris-HCl (pH 8,5)
	150 mM	NaCl
	0,02%	Natriumazid
	0,1%	SDS
	1%	NP-40
	0,5%	Natriumdesoxycholat
	1 mM PMSF und 7 μ M Aprotinin wurden frisch zugegeben	

Das Medium wurde zunächst entfernt und die Zellen mit 1 x PBS gewaschen und 10 min auf Eis inkubiert. Der eisgekühlte Lysepuffer wurde zugegeben, und mit einem Schaber wurden die Zellen gesammelt. Auf Eis wurden die Zelllysate mit einer 21-gauge Spritze 6-mal angesaugt und 10 min bei 17 000 x g und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden mit 4 x Proben-Puffer 5 min lang gekocht. Die Proben wurden entweder bei 4°C gelagert oder sofort auf das SDS-Gel aufgeladen. Die gleichen Überstände wurden auch für die nicht-denaturierende Gelelektrophorese oder die Immunopräzipitation verwendet.

4.2.7 Nicht-denaturierende Gelelektrophorese

Die nicht-denaturierende Gelelektrophorese wurde mit dem Phast-System von Pharmacia durchgeführt. Es wurden Gradientengele von 4-15% Acrylamid genutzt. Folgende Laufbedingungen wurden gewählt: 300 Vh bei 10 V, 0,1 mA, 1 W, 4°C.

4.2.8 Dichtegradientenzentrifugation

Mit einem Gradientenmischer wurde ein kontinuierlicher Gradient von 10-40% Glycerin in Beckman SW40-Zentrifugenröhrchen gegossen. 0,3-0,5 ml Proben wurden auf den Gradienten geschichtet und bei 40 000 rpm im Beckman SW40-Rotor für 16 h bei 4°C zentrifugiert. Der Gradient wurde von oben nach unten in 600-800 µl Fraktionen aliquotiert. Die Proteine der Fraktionen wurden mit TCE präzipitiert.

4.2.9 SDS-PAGE Gelelektrophorese

Lösungen:

4 x Sammelgelpuffer: 250 mM Tris HCl pH 6,8, 0,8% SDS

4 x Trenngelpuffer: 150 mM Tris HCl, pH 8,8, 0,4% SDS

Elektrophoresepuffer: 25 mM Tris, 190 mM Glycerin, 0,1% SDS

Die Proben wurden in 4 x SDS-PAGE-Probenpuffer aufgenommen, 5 min bei 95°C im Heizblock erhitzt und anschließend 3 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Um die Proteinmengen auszugleichen, erfolgte zuvor über die photometrische Absorptionsmessung bei 280 nm die Bestimmung der Proteinkonzentrationen. Für den Lauf durch das Sammelgel wurde eine Spannung von 70V angelegt und beim Übergang der Proteine ins Trenngel wurde die Spannung auf 140V erhöht. Die gesamte Elektrophorese dauerte, in Abhängigkeit der Gelkonzentration, 1-1,5 h.

4.2.10 Western Blot

Blotpuffer: 14,4 g Glycerin, 3,04 g Tris, auf 1 Liter H₂O

Waschpuffer (PBS-T): 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,3 und 0,1% Tween-20

Nach der SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine elektrophoretisch (120 mA bei 4°C über Nacht oder 200mA bei Raumtemperatur 2h) auf Nitrocellulose-Membranen überführt und immunochemisch getestet. Die Membran wurde zuerst mit Ponceau S gefärbt und dann mit 5% Milch (in PBS-T) 1-2 h blockiert. Danach erfolgte die Inkubation mit dem geeigneten Antikörper (anti-c-Jun oder anti-SP1). Die Detektion der Proteine erfolgte mit dem BM-Chemiluminescence ECL-Kit nach der Vorschrift von Boehringer. Die Röntgenfilme (XDS, XAR von KODAK) wurden in dem Entwicklerautomat „Hyperprocessor“ (Amersham) entwickelt.

4.2.11 Immunpräzipitation (IP)

IP-Puffer:	50 mM	Tris/HCl pH 8,5
	150 mM	NaCl
	0,02%	Natriumazid
	0,1%	SDS
	1%	NP-40
	0,5%	Natriumdesoxycholat

Um unspezifische Bindungen zu beseitigen, wurden die Überstände (ca. 300 µl) der Zellysate zunächst mit Protein A-Agarose (30 µl) vorinkubiert (1 h, 4°C, auf dem Schüttler). Nach dem Zentrifugieren (1 min 14000 rpm) wurden die Antikörper (1-3 µg anti-C2 oder anti-S4) zu den Überständen zugegeben und inkubiert (1 h, 4°C, auf dem Schüttler). Danach wurden zu dem Gemisch 60 µl Protein A-Agarose zugegeben und über Nacht bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Nachdem Zentrifugieren (1 min 14000 rpm) wurden die Überstände vorsichtig mit einer Absaugpumpe entfernt. Anschließend wurde 1 ml IP-Puffer zugesetzt und 5 min bei 4°C geschüttelt. Dieser Schritt wurde 5-mal wiederholt. Anschließend wurden 20 µl Proben-Puffer zugegeben und 5 min gekocht. Nach dem Zentrifugieren wurden die Proben auf die SDS-Gele aufgetragen und dann der Western Blot mit dem anti-Flag Antikörper durchgeführt.

4.2.12 Bestimmung der Proteinkonzentration

Der Protein-Assay ist eine Modifikation der Proteinbestimmung nach Bradford (*Bradford et al., 1976*). Zu 200 µl Probe wurden 800 µl Bio-Rad-Lösung zugegeben und gut durchmischt. Für die Erstellung einer Eichkurve wurden BSA-Lösungen mit Konzentrationen von 2, 5, 10,

20 und 50 µg/ml vermessen. Die Messungen wurden in Einweg-Acryl-Küvetten bei einer Wellenlänge von 590 nm gegen Wasser durchführt. Die Differenz aus dem Messwert bei 590 nm wurde gegen die eingesetzte Proteinmenge der entsprechenden Eichlösung aufgetragen und die Proteinmenge der Probe anhand der Eichgeraden ermittelt.

4.2.13 bFGF-ELISA-Assay

Von den Medien der mit Tat-Protein, Tat-Peptiden und Curcumin behandeltem HUVEC wurde nach 24 h Inkubation 1ml zellfreier Überstand abgenommen und bei -70°C gelagert. Insgesamt wurden von fünf solcher Versuchsserien Zellüberstände gewonnen. Mit einem bFGF-ELISA-KIT wurde gemäß der Vorschrift des Herstellers die bFGF-Konzentration bestimmt.

4.2.14 VEGF-ELISA-Assay

Zum Nachweis von VEGF im Überstand wurde ein VEGF-ELISA-KIT gemäß der Vorschrift des Herstellers verwendet. Zuerst wurden 50 µl Verdünnungspuffer und dann 200 µl Standard und Zellkulturüberstand hinzugefügt und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurde der ELISA für 2 h mit 200 µl Konjugat inkubiert. Anschließend wurde wieder dreimal gewaschen. Zuletzt wurden 200 µl der Entwicklerlösung dazugegeben und nach einer ca. 20 minütigen Inkubationszeit wurde die Entwicklung mit 50 µl Stopplösung beendet. Die Zytokin-Konzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm mit einer Referenzwellenlänge von 570 nm im ELISA-Photometer bestimmt.

4.2.15 PAI-1-ELISA-Assay

Von den Medien der mit dem Tat-Protein, Tat-Peptiden und Curcumin behandelten HUVEC (s. Abschnitt 3.2.5) wurde nach 24 h Inkubationszeit 1 ml zellfreier Überstand abgenommen und für 5 min zentrifugiert (15000 rpm, 4°C) und der Überstand bei -70 °C gelagert. Insgesamt wurden von acht solcher Versuchsserien Zellüberstände gewonnen. Mit einem PAI-1-ELISA-Kit wurde in diesen Zellüberständen gemäß der Firmenvorschrift die PAI-1 Konzentration bestimmt. Die basale Sekretion von PAI-1 betrug 993.8 ± 11.6 ng/mL und wurde abgezogen. Die in den Überständen der unbehandelten Zellen gemessenen PAI-1-Konzentrationen wurden jeweils als 100% normiert. Dazu wurden die PAI-1-Konzentrationen

in den Überständen der mit den jeweiligen Tat-Peptiden inkubierten Zellen in Relation gesetzt.

4.2.16 MTT-Zellwachstumsassay

Zunächst kam der sogenannte MTT-Zellwachstumsassay zum Einsatz, welcher auf kolorimetrischer Grundlage Aussagen über die zelluläre Lebensfähigkeit und die Zytotoxizität gibt. Die zu messenden Zellen werden einer Substanz ausgesetzt (MTT-Reagens (3-(4,5-dimethyl-thiazoyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)), einem gelben Tetrazoliumsalz, das bei Spaltung wasserunlösliche, blaue Formazankristalle bildet. Diese Umwandlung findet nur in lebenden, stoffwechselaktiven Zellen statt, indem MTT durch ein mitochondriales Enzym, die Succinat-Dehydrogenase, umgewandelt wird, womit durch diesen Assay die Stoffwechselaktivität von Zellen bestimmt wird. Die Absorption des gebildeten Formazans wird photometrisch bestimmt und ist direkt proportional zur Zahl der stoffwechselaktiven, vitalen Zellen.

MTT wurde in einer Pufferlösung (PBS) gelöst (5mg/ml). Dann erfolgte die sterile Filtration mit einem 0,2 µm Filter und die Lagerung bei -20°C. HUVEC wurden mit Tat-Protein, Tat-Peptiden, bFGF und Curcumin inkubiert. Nach 24 h wurde das alte Medium aus den Platten abgesaugt und die Zellen vorsichtig mit Pufferlösung gewaschen. Anschließend wurde die Kultur mit MTT-Lösung (1:10 Verdünnung der originalen Konzentration des Mediums) für 4 h behandelt. Nach Entfernung des MTT-Mediums wurde 100µl DMSO hinzugegeben um die Formazankristalle zu lösen. Danach wurde der Absorptionsgrad des Farbstoffs Formazan unter dem Spektrometer bei 570 nm (Background-Subtraction 620 nm) mit dem ELISA-Reader gemessen.

4.2.17 Matrigel Invasion Assay

Growth Factor Reduced Matrigel Basement Membrane Matrix (Becton Dickinson, Germany)

6-Well-Boyden-Kammern

Polykarbonat Membran-Einsätze der Porengröße 8

Tat-Protein, Tat-Peptide, bFGF, Curcumin

MTT-Lösung

HUVEC

Endothel Serumarmes Medium

Material und Methodik

Die in-vitro Methode zur Quantifizierung des Invasionspotenzials der Zellen mittels des sogenannten "Boyden chamber assay" wurde erstmals von Albini beschrieben (*Albini et al., 1987*). Dieses Modell ermöglicht Untersuchungen zur Adhäsion der Zellen an die ECM, ihrer lokalen Degradation und der direkten Lokomotion der Zellen in die ECM. Die Versuchsanordnung besteht aus zwei Kammern, die durch eine beschichtete poröse Membran voneinander getrennt sind. In unserer Arbeit verwendeten wir als künstliche Basalmembran eine Growth Factor Reduced Matrigel-Beschichtung. Bei Matrigel handelt es sich um einen löslichen Basalmembran-Extrakt des Englebreth-Holm-Swarm-Maus-Sarkoms, das bei Temperaturen um 37 °C geliert und dabei die Zusammensetzung, Struktur und physikalischen Eigenschaften einer Basalmembran einnimmt.

Es wurden 6-Well-Boyden-Kammern mit Polykarbonat Membran-Einsätzen der Porengröße 8 µm verwendet (Abb. 4). Die Membraneinsätze wurden unter sterilen Bedingungen gleichmäßig mit 675 µl verdünntem Matrigel (1mg/ml Verdünnung mit dem serumfreiem Medium) bedeckt und für 2 h bei 37 °C im Brutschrank belassen (wie vom Hersteller empfohlen). Nach 2 h wurde nicht festgewordenes Matrigel abgesaugt und einmal mit DMEM gespült. Das untere Kompartiment der 6-Well-Boyden-Kammern wurde mit 2,5 ml serumfreiem Medium gefüllt.

Die Vorbereitung der HUVEC erfolgte gemäß dem Standard-Protokoll (vgl. Kapitel 3.2.3 und 3.2.4). Die Transwell-Inserts (oberes Kompartiment der 6-Well-Boyden-Kammern) wurden mit einer Konzentration von 300 000 Zellen/ml (insgesamt 1,5 ml) besiedelt. Jeweils erfolgte die Zugabe von Tat-Protein, Tat-Peptiden, bFGF und Curcumin ins obere und untere Kompartiment der 6-Well-Boyden-Kammern, so dass kein Konzentrationsgradient entstand. Nach 24 h wurden die Zellen mit 0,5 mg/ml MTT (s. Kapitel 3.2.16) für 4 h inkubiert (*Imamura et al., 1994*). Danach wurde das Medium abgesaugt und die invasiven Zellen auf der Unterseite des Inserts mit einem Zellscraper vorsichtig und vollständig entnommen und mit 200 µl DMSO vom Zellscraper in eine neue, schräggestellte 6-well-Platte gespült (die Membran darf nicht beschädigt werden, damit sich keine Zellen von der Oberseite ablösen können). Die nicht-invasiven Zellen im Inneren des Inserts wurden in 200 µl DMSO gelöst (in einer neuen 6-Well Platte). Die Proben wurden in eine 96-Well Platte überführt. Danach wurde der Absorptionsgrad des Farbstoff Formazan unter dem Spektrometer bei 570 nm (Background-Subtraction 620 nm) mit dem ELISA-Reader gemessen.

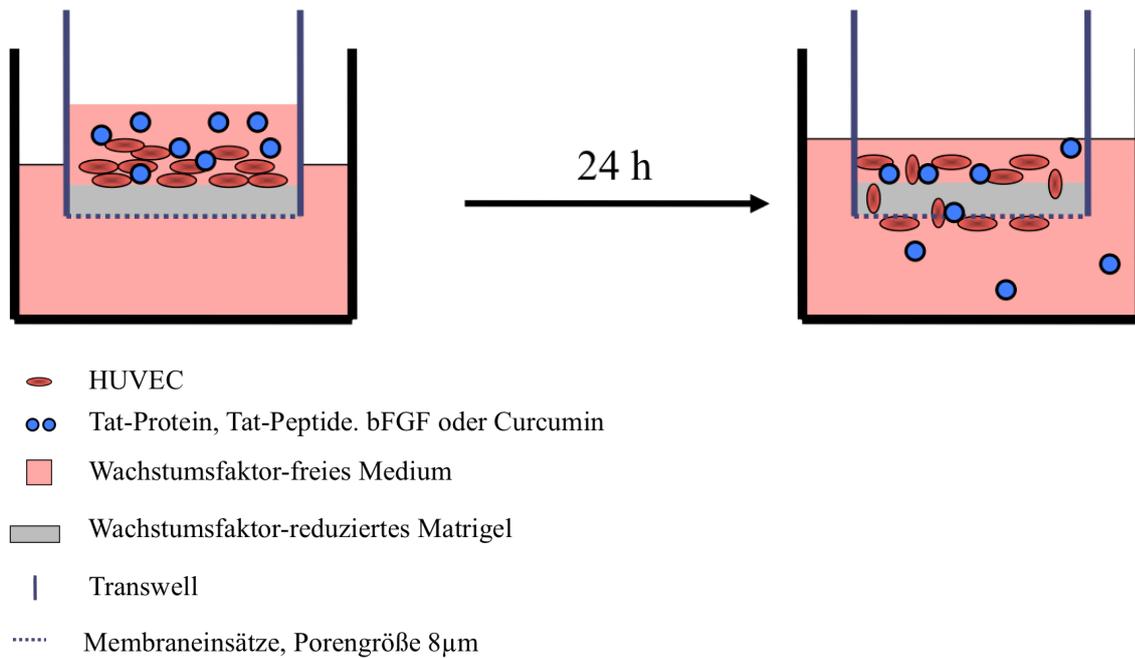


Abb. 4: 6-Well-Boyden-Kammern mit Polykarbonat Membran-Einsätzen.

4.2.18 Matrigel Assay für Tubulogenese

Growth Factor Reduced Matrigel Basement Membrane Matrix (Becton Dickinson, Germany)

24-Well Platten

Tat-Protein, Tat-Peptide, bFGF, Curcumin

Trypsin, PBS

HUVEC

Endothel Serumarmes Medium

Der Matrigel Assay für die Tubulogenese wurde nach Morales et al. mit geringen Modifikationen durchgeführt (*Morales et al., 1995*) (Abb. 5).

Die Growth Factor Reduced Matrigel Basement Membrane Matrix wurde über Nacht auf Eis aufgetaut. Dann wurde der Boden der 24-Well Platte mit 50 µl Matrigel (11.7 mg/ml, Verdünnung mit serumfreiem Medium) auf Eis beschichtet und bei 37°C für 30 Minuten ausgehärtet. Inzwischen wurden HUVEC vorbereitet (siehe Kapitel 3.2.3 und 3.2.4). Die Verdünnung der Zellen erfolgte in serumfreiem Medium. HUVEC wurden in einer Konzentration von 25 000 Zellen/cm² in der 24-Well Platte in Basal-Medium besiedelt. Jeweils erfolgte die Zugabe von Tat-Peptiden (2 µg/ml), bFGF (2 ng/ml) und Curcumin (10 µM). Nach 24 h wurde die Tubulogenese unter dem Mikroskop (Olympus CK40 Inverted Laboratory System Mikroskop, Vergrößerung ×10) bewertet und mittels Digitalkamera

(Olympus Digitalkamera C2020Z) dokumentiert. Es wurden mindestens drei dreifache unabhängige Experimente durchgeführt. Für die quantitative Analyse wurde die Anzahl der Branch-Points gezählt (Abb. 5). Zur quantitativen Bewertung wurden die Branch-Points jeweils aus 6 verschiedenen Sichtfeldern ausgezählt, wie bei Kok et al. beschrieben (Kok et al., 2005).

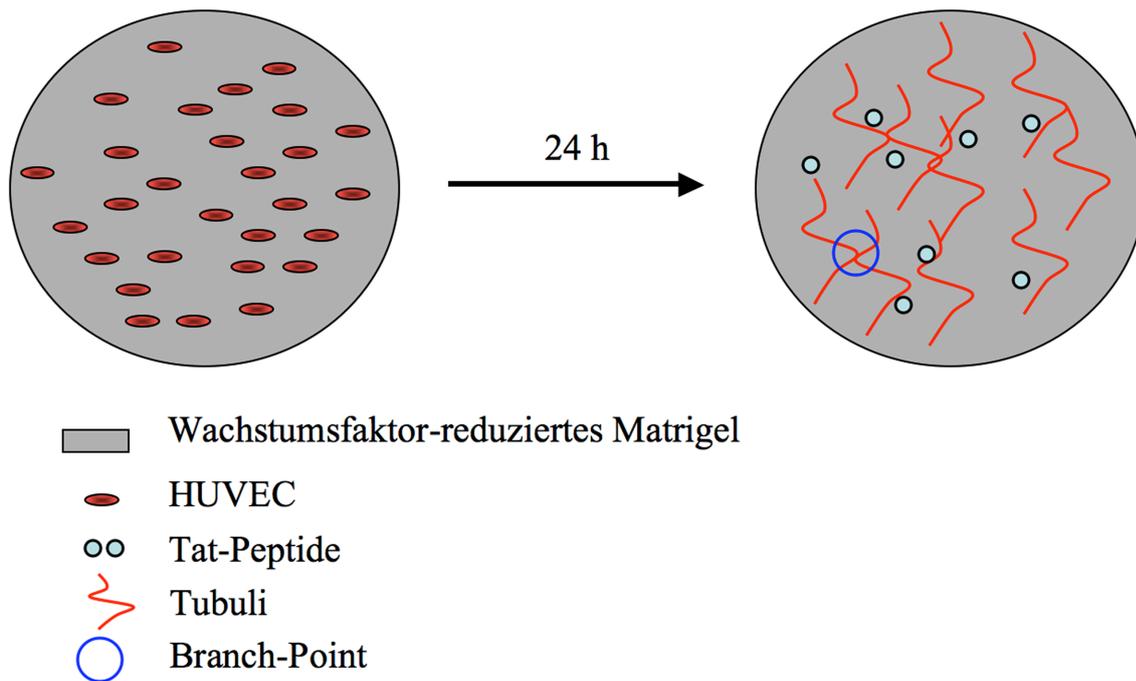


Abb. 5: Modifizierter Matrigel-Assay zur Bestimmung der Tubulogenese.

4.2.19 Statistik

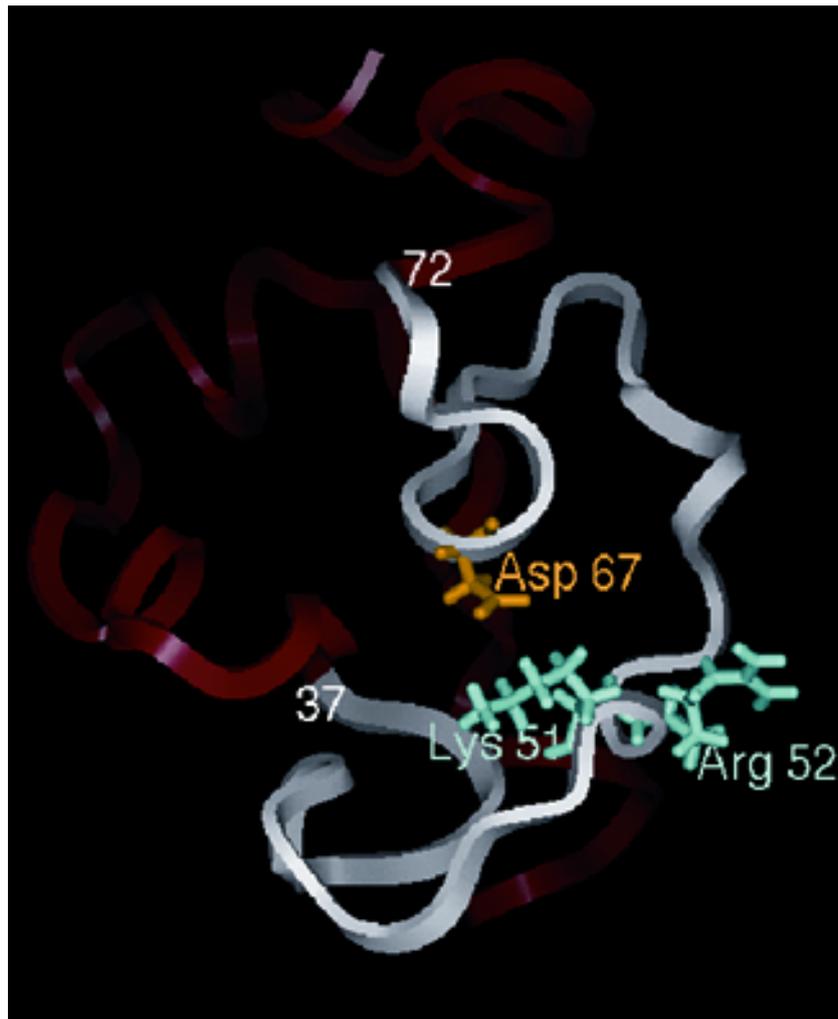
Die Ergebnisse wurden als Resultate von mindestens drei jeweils dreifach durchgeführten und voneinander unabhängigen Experimenten als Mittelwert \pm Standardfehler (SE) angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Student-t-Tests zum Vergleich der Mittelwerte. Ein Wert von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

5 Ergebnisse

5.1 Die basische Domäne des Tat-Proteins

Das 86-Aminosäuren-Tat-Protein wird von zwei Exons kodiert (*Neuveut et al., 1996*). Die ersten 72 Aminosäuren werden von dem ersten Exon kodiert, die übrigen 14 C-terminalen Aminosäuren von einem weiteren Exon. Das Tat-Protein besteht aus 5 funktionellen Domänen (Abb. 6) (*Huang et al., 2002*): einer N-terminalen, einer Cystein-reichen, einer Kern-, einer basischen und einer C-terminalen Region.

Um die Wirkung der Tat-Region 37-72 auf das Proteasom besser untersuchen zu können, wurde ein Tat-Peptid 37-72 synthetisiert (Tatpep1). Außerdem wurden veränderte Versionen von Tatpep1 synthetisiert und ihre Wirkung getestet. In Tatpep2 wurde die basische Domäne (AA 49-57) deletiert. Tatpep3 hat eine Deletion des C-terminalen Bereichs von Tatpep1. In Tatpep4 wurde die Kern-Region deletiert (Abb. 7). Die Tat-Peptide 1-4 wurden mit isoliertem 20S Proteasom getestet. 0,1 µg 20S Proteasom wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen der vier Tat-Peptide 30 min bei 37°C vorinkubiert. Mit Hilfe von fluorogenen Substraten lässt sich die Inhibition des 20S Proteasoms durch die Tat-Peptide im in vitro-System untersuchen. Die Freisetzung der fluoreszierenden Substanz AMC ist Maß für die Aktivität des 20S Proteasoms. Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC ist ein Substrat der Chymotrypsin-ähnlichen Aktivität des Proteasoms. Das vollständige Tat-Protein wurde als positive Kontrolle benutzt. Zur Berechnung der kinetischen Parameter wurde ein Modell verwendet, das von zwei Bindungsstellen des Tat-Proteins am 20S Proteasom ausgeht. Aus den Hemm-Kurven und den kinetischen Parametern (Abb. 7) ist ersichtlich, dass der Hemmeffekt des Tatpep1 auf das 20S Proteasom sehr ähnlich des vollständigen Tat-Proteins ist. Durch die Deletion der basischen Domäne ging die Hemmung verloren, während die Deletion des C-terminalen und des Kern-Bereichs wenig Einfluß hatten (Abb. 7).



1	22	37
M EPVDPRLEPWKHPGSQPKTACTNCYCKKCCFHCQV C FITKGL		
49	58	86
GISYGR R KKRRQRRR P SQGGQTHQDPIPKQPTSQSRGDPTGP K E		

Abb. 6: Die Sequenz und die Domänen des HIV-1 Tat-Proteins: AA 1-21: N-terminale Domäne; AA 22-36: Cystein-reiche Domäne; AA 37-48: Kerndomäne; AA 49-57 basische Domäne; AA 58-86 C-terminale Domäne (Huang et al., 2002).

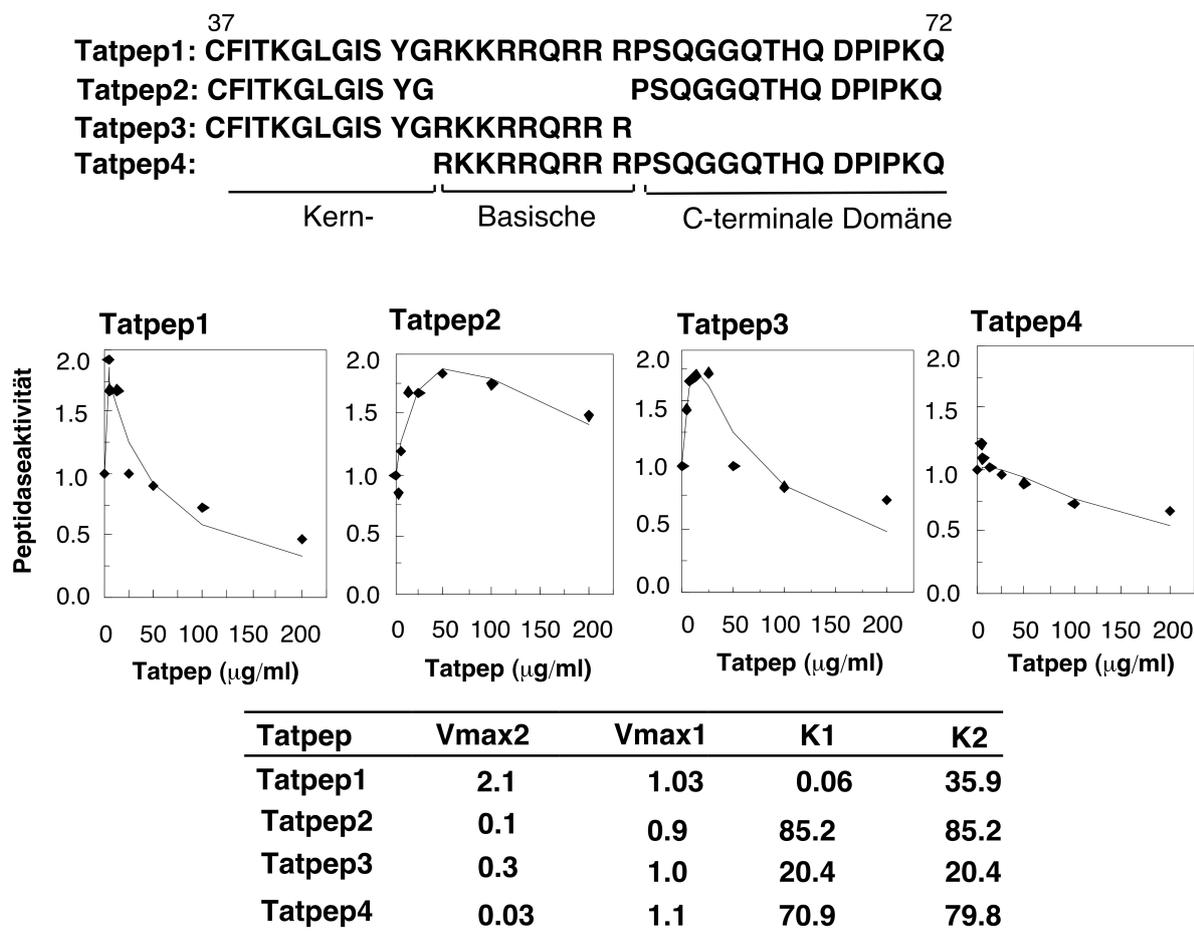


Abb. 7: Der basische Bereich des Tat-Proteins spielt bei der Inhibition des 20S Proteasoms eine entscheidende Rolle. Das Tat-Peptid 37-72 konkurriert mit dem 11S Regulator um die Bindungsstelle am 20S Proteasom. (Huang *et al.*, 2002).

5.2 Synthetisierte Tat-Peptide mit Mutationen in der basischen Domäne

Es wurden insgesamt 15 Tat-Peptide synthetisiert (Abb. 8). Alle Tat-Peptide enthalten die basische Domäne des Tat-Proteins. Die Mutation der Tat-Aminosäuren Lys51, Arg52 und Asp67 führt zum vollständigen Verlust des Tat-Effekts auf das Proteasomsystem und auf die Antigenpräsentation (Huang *et al.*, 2002). Daraus resultierte die Synthese des Tat-Peptides Tatpep5. Darüber hinaus wurden die Tat-Peptide Tatpep6 bis Tatpep18 synthetisiert. Tatpep6 resultiert aus einem Literaturvergleich. Es stellt die Minimalregion des Tat-Proteins dar, die in allen Tat-Peptiden mit pro-angiogener Wirksamkeit enthalten ist.

	37	72
Tatpep1	CFITKGLGIS YGRK KRR QRR RPSQGGQTHQ D PIPKQ	
Tatpep5	CFITKGLGIS YGRK AA RQRR RPSQGGQTHQ A PIPKQ	
Tatpep6	RR RPSQ	
Tatpep7	GRKKRRQRR RPSQG	
Tatpep8	G AA KRRQRR RPSQG	
Tatpep9	GR AA RRQRR RPSQG	
Tatpep10	GRK AA RQRR RPSQG	
Tatpep11	GRKK AA QRR RPSQG	
Tatpep12	GRKKR AA RR RPSQG	
Tatpep13	GRKKRR AA R RPSQG	
Tatpep14	GRKKRRQ AA RPSQG	
Tatpep15	GRKKRRQR A A PSQG	
Tatpep16	GRKKRRQRR AA SQG	
Tatpep17	GRKKRRQRR R AA QG	
Tatpep18	GRKKRRQRR RP AA G	

Abb. 8: Sequenzen der Tat-Peptide. Tatpep1 und 5 bestehen aus den Aminosäuren 37 bis 72. Im Tatpep5 wurden Aminosäuren Lys51, Arg52 und Asp67 durch Ala substituiert. Tatpep6 ist eine kurze Sequenz der basischen Domäne, wobei Tatpep7 die gesamte basische Domäne enthält. In Tatpep8 bis 18 wurden je 2 Aminosäuren durch Ala in unterschiedlichen Positionen substituiert.

5.3 Einfluss der Tat-Peptide auf die Aktivität des 20S Proteasoms

Um Tat-Peptide für eine Therapie von vaskulären Erkrankungen nutzbar zu machen, wurden die Effekte einer Vielzahl von synthetisierten Tat-Peptiden auf das Proteasomsystem getestet (Abb. 9). Die Peptide Tatpep1 bis Tatpep18 wurden zunächst mit dem 20S Proteasom inkubiert und ihr Effekt auf die Peptidaseaktivität des Proteasoms getestet. Mit Tatpep5 wurde kein Hemmeffekt auf das 20S Proteasom gemessen. Ebenfalls zeigten Tatpep15 und Tatpep16 keinen Hemmeffekt auf das 20S Proteasom (Abb. 9). Alle anderen Peptide hatten einen Effekt auf das Proteasom und sind demzufolge für eine potenzielle Anwendung in der Therapie ungeeignet. Es wurde gezeigt, dass vollständiges Tat-Protein das 20S Proteasom

Ergebnisse

hemmt und den Proteasom-Aktivator PA28 vom Proteasom verdrängt. Außerdem führt die Tat-Bindung an den 19S Regulator zur Stimulierung des 26S Proteasoms (*Seeger et al., 1997*). Darüber hinaus wurde demonstriert, dass das Tatpep1 den gleichen Effekt auf das Proteasomsystem ausübt wie das vollständige Tat-Protein. Sowohl Tatpep1 als auch vollständiges Tat-Protein hemmen die Antigenpräsentation via MHC Klasse I (*Huang et al., 2002*). Diese Eigenschaften des Tat-Proteins wären für die pro-angiogene klinische Anwendung des Proteins völlig ungeeignet. Tatpep5, Tatpep15 und Tatpep16 zeigten im Vergleich mit dem Tatpep1 keinen Hemmeffekt auf das 20S Proteasom (Abb. 9, 10).

<u>Tat-Peptide</u>	<u>20S Inhibition</u>	<u>Tat-Peptide</u>	<u>20S Inhibition</u>
Tatpep1	+	Tatpep12	+
Tatpep5	-	Tatpep13	+
Tatpep6	+	Tatpep14	+
Tatpep7	+	Tatpep15	-
Tatpep8	+	Tatpep16	-
Tatpep9	+	Tatpep17	+
Tatpep10	+	Tatpep18	+
Tatpep11	+		

Abb. 9: Der Einfluss von Tat-Peptiden auf die Peptidaseaktivität des Proteasoms (20S). Der Effekt ist mit Plus und Minus gezeichnet.

Ergebnisse

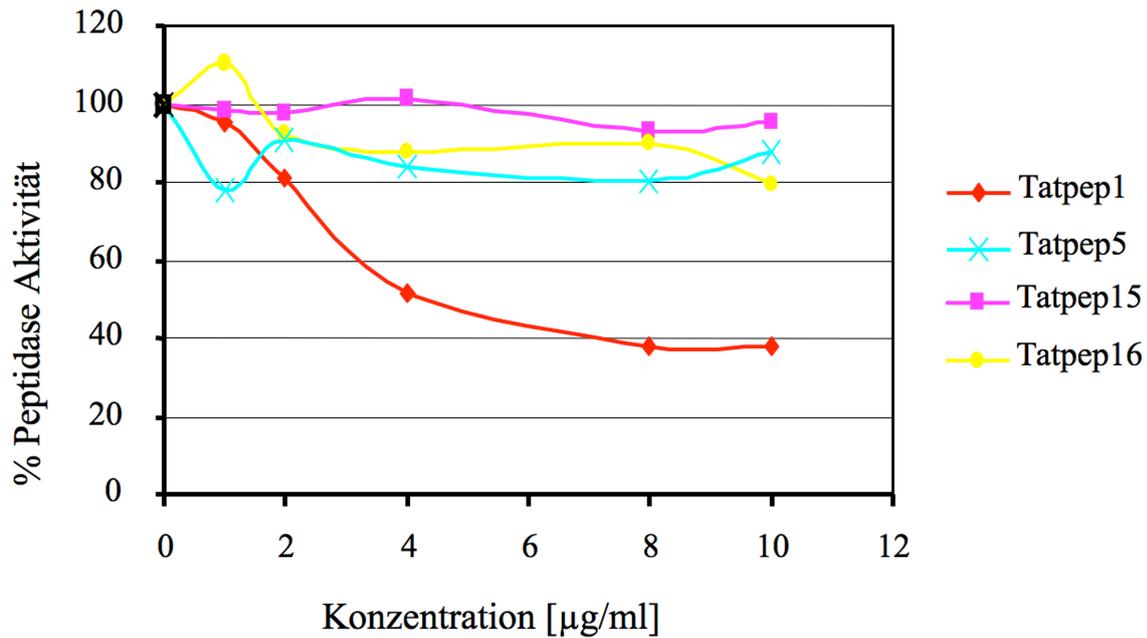


Abb. 10: Einfluss von Tat-Peptiden (Tatpep1, Tatpep5, Tatpep15 und Tatpep16) auf die Peptidaseaktivität des Proteasoms (20S). Die Peptidaseaktivität wurde als ΔF (F: Fluorescence) pro Minute gemessen und als relative Peptidaseaktivität (100% = 20 ΔF /min per μg 20S Proteasom) mit Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC als Substrat aus je vier Experimenten berechnet.

5.4 Einfluss der Tat-Peptide auf die Expression von c-Jun und SP1 im Western-Blot

Mittels Western-Blot wurde der Einfluss der Tat-Peptide auf die intrazellulären Konzentrationen der Transkriptionsfaktoren c-Jun und SP1 getestet. c-Jun und SP1 sind wesentliche Regulatoren der Angiogenese. In Abb. 11 sind ausgewählte Daten dargestellt. Als positive Kontrolle wurden HUVEC mit vollständigem Tat-Protein inkubiert. Als negative Kontrolle wurden die Zellen mit Curcumin behandelt. Als optimale Behandlungszeit hat sich ein Zeitraum von 24 h erwiesen. Die Behandlung von HUVEC mit vollständigem Tat-Protein führte zum Anstieg des endogenen c-Jun und SP1. Beim Einsatz von Curcumin resultierte eine Senkung der Konzentrationen der Transkriptionsfaktoren. In Abb. 11 sind die Effekte ausgewählter Tat-Peptide auf die c-Jun und SP1 Spiegel in HUVEC gezeigt. Tatpep15 und Tatpep16 zeigten einen signifikanten konzentrationsabhängigen Anstieg des endogenen c-Jun und SP1.

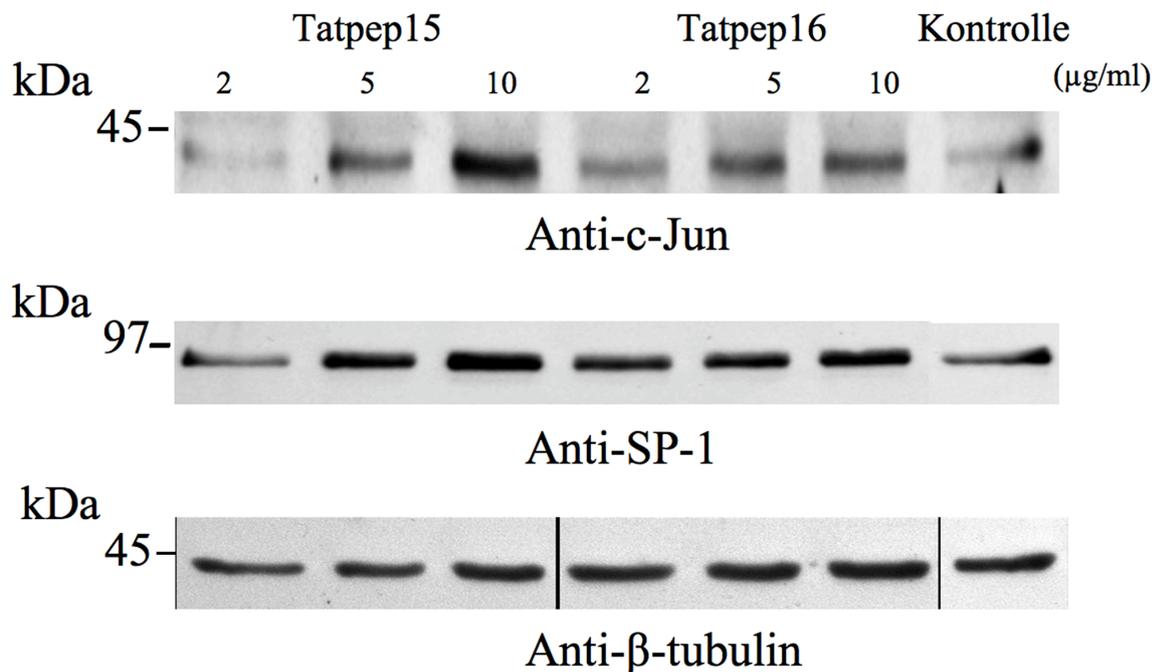


Abb. 11: Western Blots mit Lysaten von HUVEC nach Behandlung der Zellen mit ausgewählten Tat-Peptiden. Die Zellen wurden mit jeweils 2, 5 und 10 µg/ml Tat-Peptid für 24 h behandelt. Die Blots wurden mit einem anti-c-Jun (c-Jun) und einem anti-SP1 (SP1) Antikörper getestet. Als Loading Kontrolle wurde β-tubulin verwendet.

5.5 Einfluss der Tat-Peptide auf das Zellwachstum der HUVEC (MTT-Zellwachstumsassay)

In einem weiteren Versuch wurden HUVEC mit Tatpep5, Tatpep15 und Tatpep16 sowie Curcumin (10 µM) für 24 h inkubiert. Der Kinase-Inhibitor Curcumin (*Bech-Otschir et al., 2002*) führt zur Zellapoptose (*Liontas et al., 2004*). Als ein Inhibitor der Angiogenese (*Arbiser et al., 1998*) wurde Curcumin als negative Kontrolle in unseren Experimenten verwendet. Tatpep5, Tatpep15 und Tatpep16 zeigten keinen inhibitorischen Effekt auf das Zellwachstum der HUVEC (Abb. 12). Im Gegensatz dazu zeigte Curcumin eine signifikante Reduktion des Zellwachstums. Daher haben Tatpep5, Tatpep15 und Tatpep16 weder einen toxischen noch apoptotischen Effekt unter den Bedingungen in diesem Experiment.

Ergebnisse

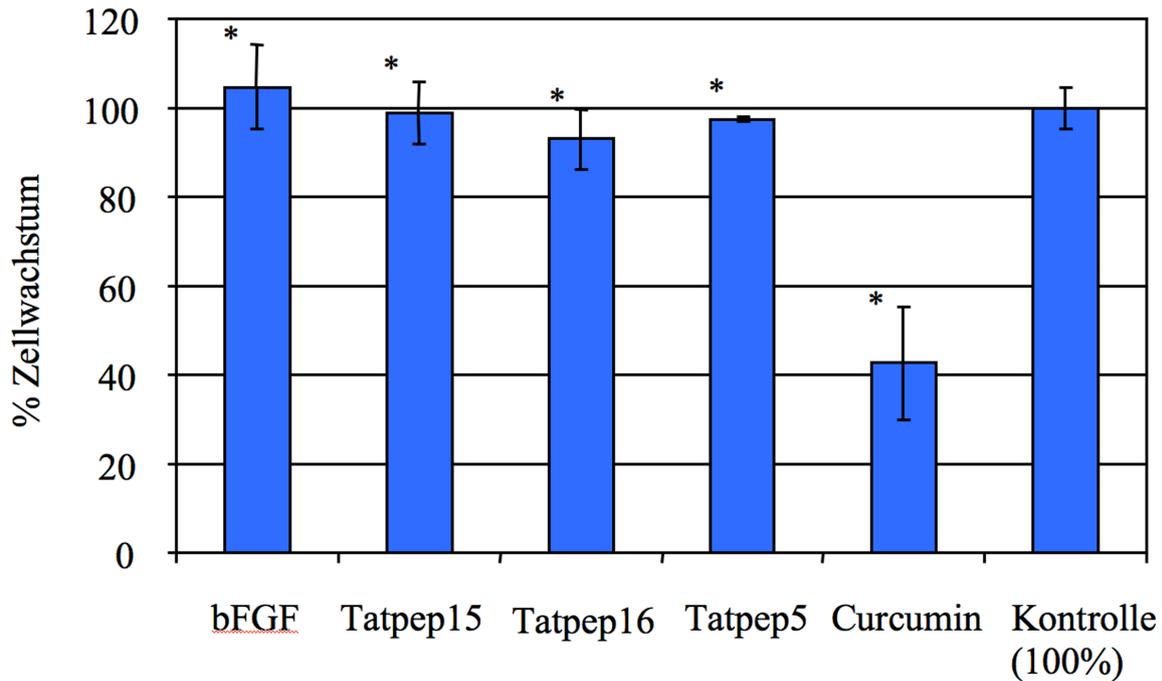


Abb. 12: Effekt von Tatpep5, Tatpep15 und Tatpep16 sowie Curcumin auf das Wachstum der HUVEC. Zwischen Passage 4 und 9 wurden die HUVEC auf 6-well-Platten (je ca. $0,2 \times 10^6$ Zellen pro Well) verteilt. Am zweiten Tag wurden Tat-Peptide (je $2 \mu\text{g/ml}$ Endkonzentration) und Curcumin ($10\mu\text{M}$) zu den HUVEC zugesetzt. Das Endothelmedium war serumfrei und enthielt keine weiteren Wachstumsfaktoren. Nach 24 h wurde der MTT-Assay durchgeführt. Das Zellwachstum wurde in % dargestellt (unbehandelte Zellen = 100%). Mittelwert \pm SE. * $P < 0,05$ versus Kontrolle.

5.6 Stimulierung der Produktion von bFGF durch HUVEC

HUVEC wurden mit den Tat-Peptiden in unterschiedlichen Konzentrationen für 24 h inkubiert. Die bFGF-Sekretion wurde mittels ELISA gemessen (Abb. 13, Abb. 14). Tatpep13-18 ($2 \mu\text{g/ml}$) bzw. Tatpep14 bis Tatpep18 ($2 \mu\text{g/ml}$) zeigten eine Stimulation der bFGF Produktion im Vergleich zur Basissekretion (Kontrolle). Diese Sekretion wurde von Curcumin gehemmt.

Ergebnisse

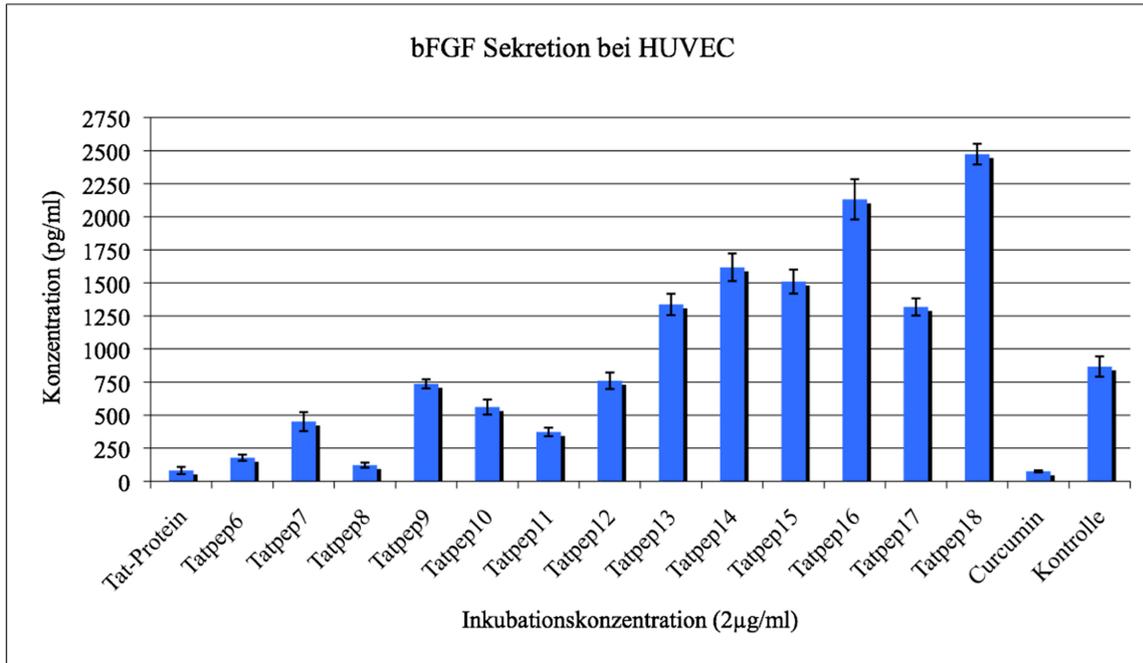


Abb. 13: Darstellung der Freisetzung von bFGF in HUVEC unter der Stimulation mit Tat-Peptiden (2 µg/ml Endkonzentration) nach 24 h Inkubationszeit. Mittelwert +/- SE. $P < 0,05$ versus Kontrolle.

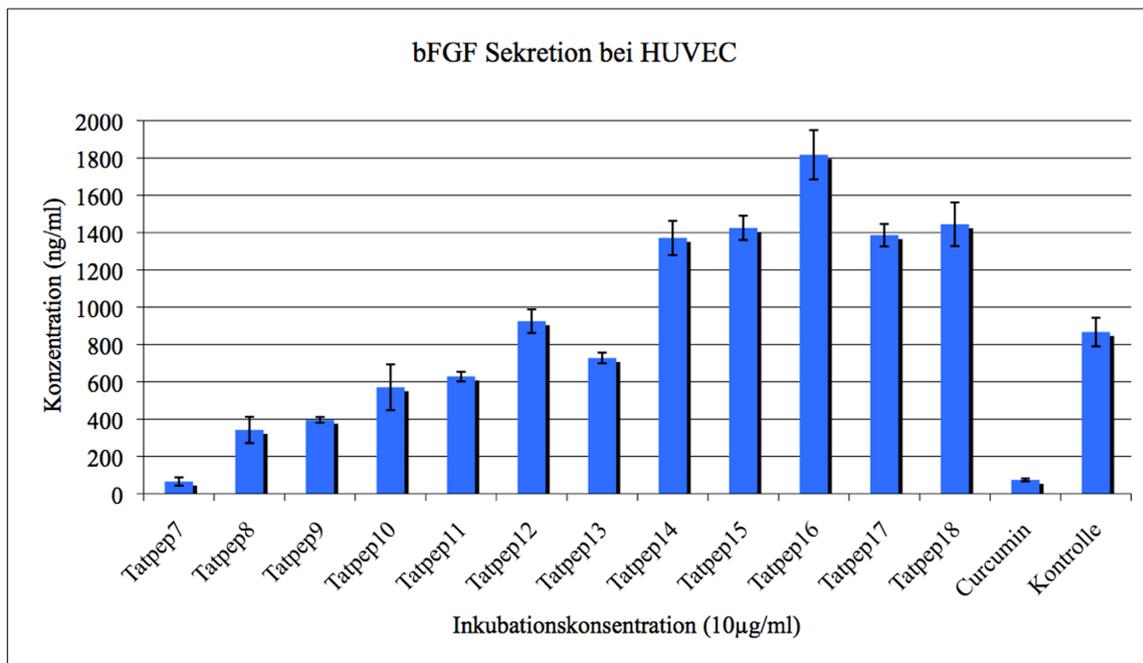


Abb. 14: Darstellung der Freisetzung von bFGF in HUVEC unter der Stimulation von Tat-Peptiden (10 µg/ml Endkonzentration) nach 24 h Inkubationszeit. Mittelwert +/- SE. $P < 0,05$ versus Kontrolle.

5.7 Nachweis der VEGF-Produktion mittels ELISA

Es gab keinen relevanten Anstieg der VEGF-Produktion in Abhängigkeit von der Inkubationszeit zwischen 12 und 24 h (Abb. 15, Abb. 16). Obwohl die Höhe der im ELISA gemessenen VEGF-Spiegel insgesamt während der einzelnen Versuche variierte, lag der zwischen Negativkontrolle und behandelten Zellen erreichte Anstieg immer bei einem Faktor von 2-4, in einigen Fällen wurde sogar die VEGF-Produktion der Positivkontrollen überschritten.

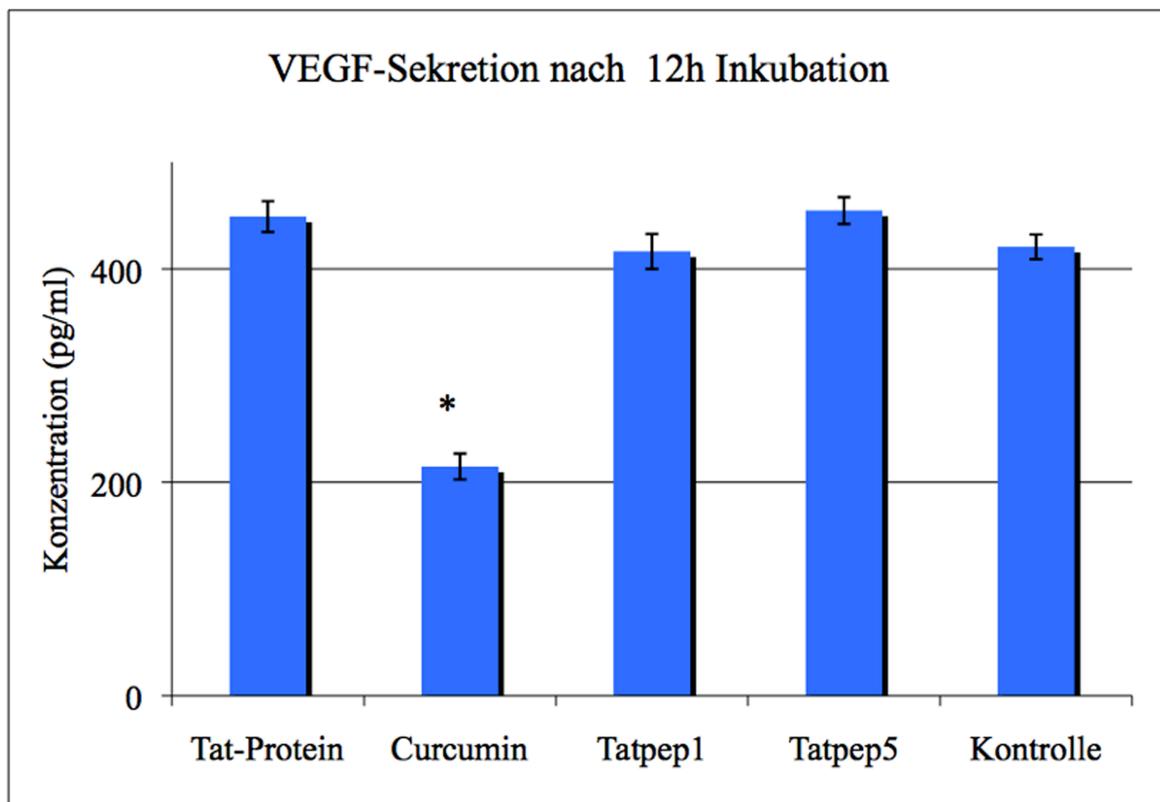


Abb. 15: Es zeigte sich kein Anstieg der VEGF-Produktion nach 12 h Inkubation von HUVEC mit unterschiedlichen Tat-Peptiden in Vergleich zu den unbehandelten Zellen (=Kontrolle). Mittelwert +/- SE. * $P < 0,05$ versus Kontrolle.

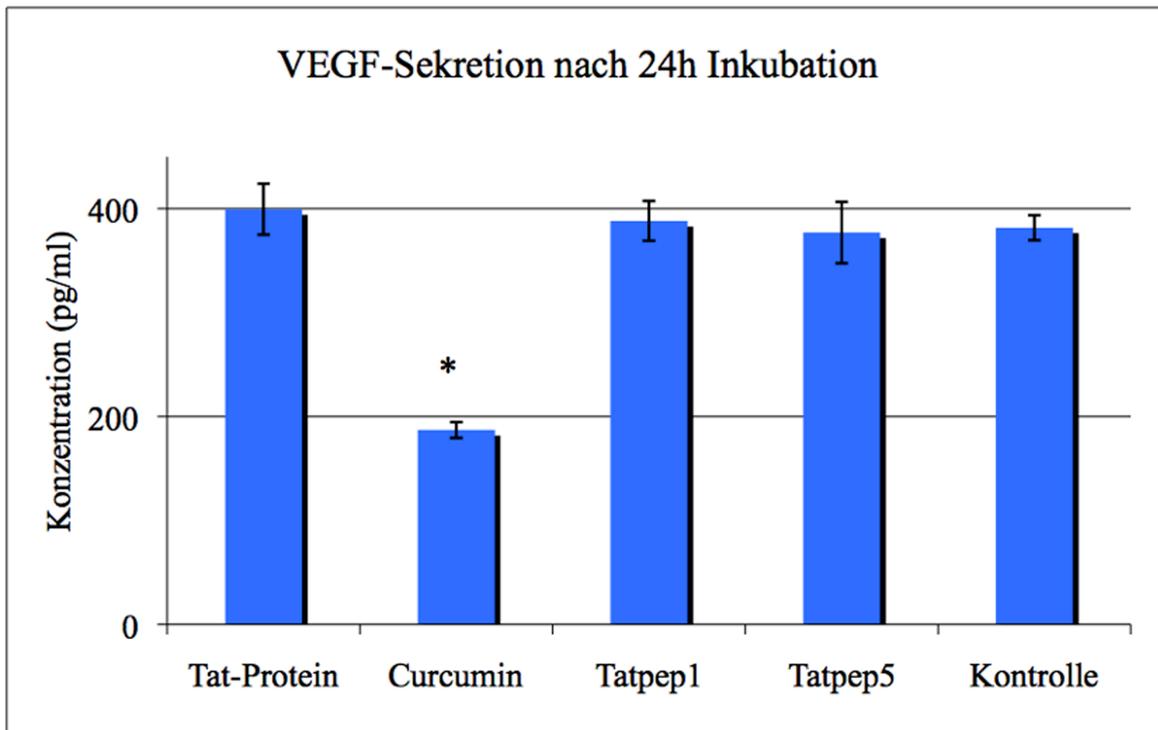


Abb. 16: Auch nach 24 h Inkubation wurde kein Anstieg der VEGF-Produktion erreicht. Weiterhin zeigte Curcumin einen inhibitorischen Effekt. Mittelwert \pm SE. * $P < 0,05$ versus Kontrolle.

5.8 Stimulierung der PAI-1 Produktion/Sekretion durch HUVEC

Ziel dieses Experimentes war die Untersuchung des Einflusses von Tat-Protein sowie Tat-Peptiden auf die Sekretion von PAI-1 aus humanen Endothelzellkulturen. Hierzu wurden HUVEC mit unterschiedlichen Konzentrationen von Tat-Peptiden für 24 h inkubiert. Als positive Kontrolle diente das Tat-Protein. Anschließend erfolgte die Bestimmung von PAI-1 mittels ELISA im Überstand der Endothelzellkulturen. Tatpep5 und Tatpep15 stimulierten die Produktion von PAI-1 in HUVEC etwa zweifach im Vergleich zu Tatpep16 und dem Tat-Protein (Abb. 17). Dadurch konnte gezeigt werden, dass Tatpep5 und Tatpep15 als mögliche Kandidaten für eine proangiogene Therapie in Betracht zu ziehen sind.

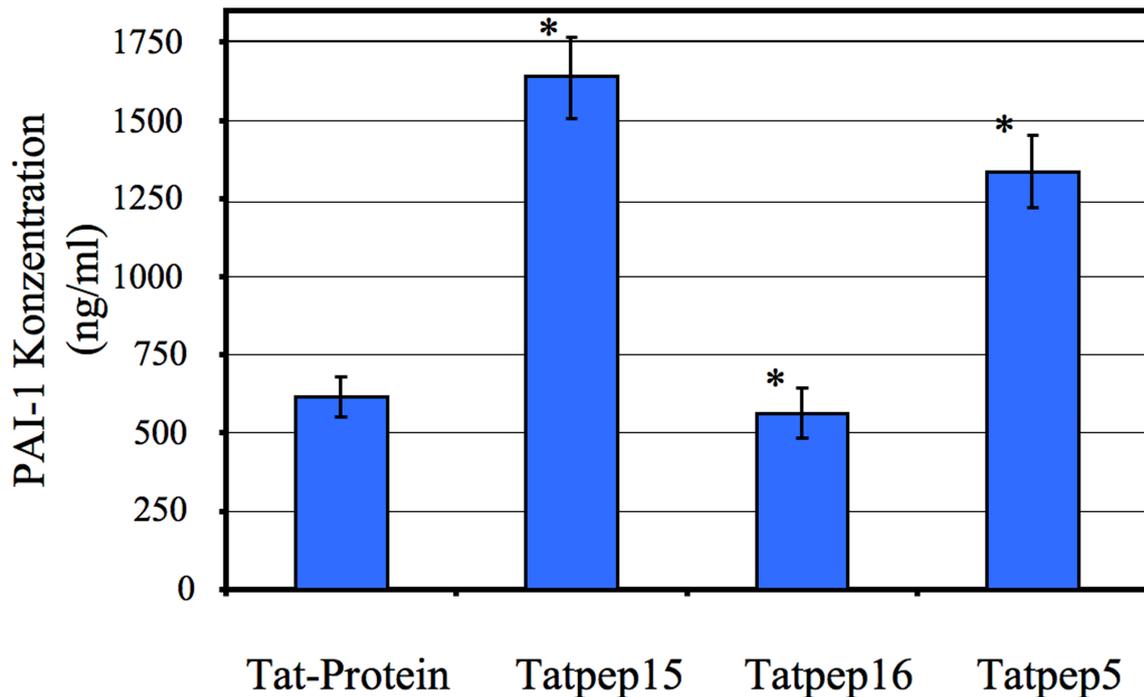


Abb. 17: Einfluß von Tat-Peptiden auf die Produktion von PAI-1 in HUVEC im Vergleich mit dem Tat-Protein. Die PAI-1-Konzentration wurde nach 24 h Inkubationszeit mit Tat-Protein (2 µg/ml Endkonzentration) oder Tat-Peptiden (2 µg/ml Endkonzentration) in den Überständen von HUVEC mittels ELISA gemessen. Die basale Sekretion wurde abgezogen. Mittelwert +/- SE. * P < 0,05 versus Tat-Protein.

5.9 Tatpep5 und Tatpep15 stimulieren die Migration und Invasion im Matrigel-Invasionsassay

Tatpep5, Tatpep15 und Tatpep16 stimulierten die Migration und Invasion von HUVEC im Matrigel-Invasionsassay in ähnlicher Weise wie bFGF. Curcumin als bekannter Inhibitor der Angiogenese zeigte eine Hemmung der Invasion und Migration von HUVEC (Abb. 18).

Ergebnisse

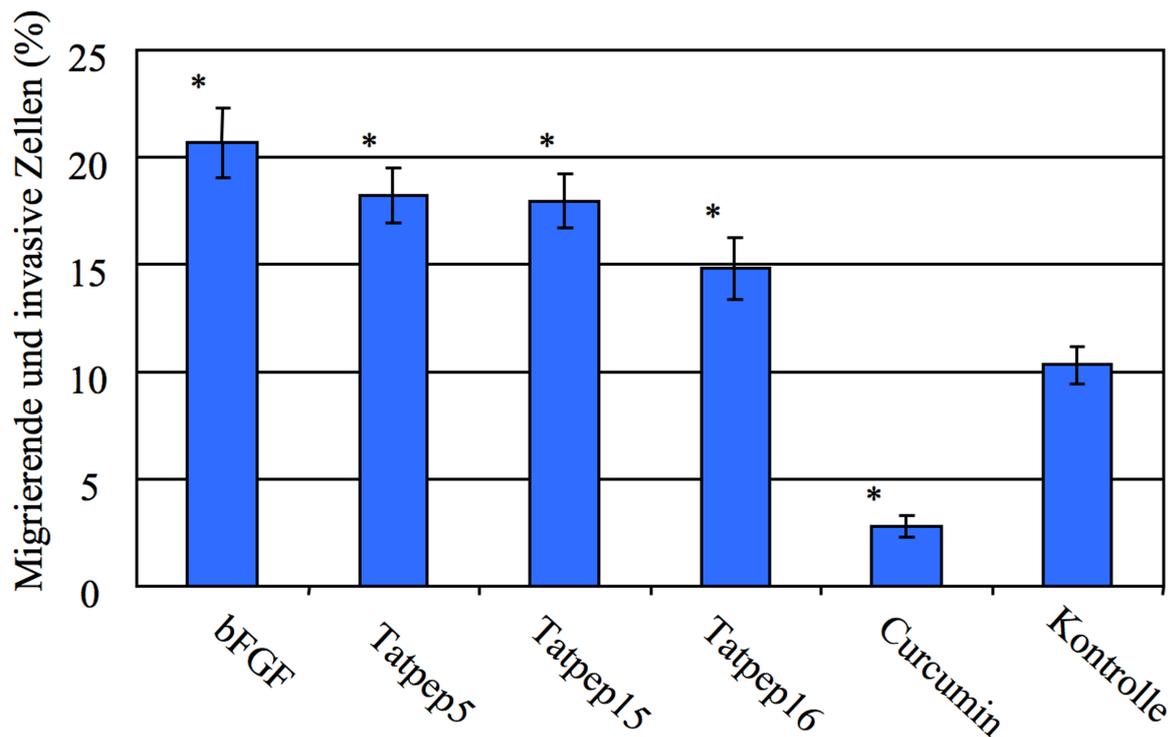


Abb. 18: Einfluss von bFGF, Tat-Peptiden und Curcumin auf die Migration und Invasion von HUVEC. Es ist zu erkennen, dass Tatpep5, Tatpep15 und Tatpep16 die Migration von HUVEC ähnlich stimulierten wie der proangiogene Faktor bFGF. Die negative Kontrolle mit Curcumin zeigte einen signifikanten inhibitorischen Effekt. Mittelwert +/- SE. * P < 0,05 versus Kontrolle.

5.10 Gefäßneubildung (Tubulogenese): qualitativer Assay

Der Effekt von Tat-Peptiden auf die Gefäßneubildung wurde im modifizierten Matrigel-Assay zur Messung der Tubulogenese nach Morales et al. 1995 geprüft. Die Growth Factor Reduced Matrigel Basalmembran-Matrix wurde verwendet und mit serumfreiem Medium verdünnt. Nach der Inkubation von HUVEC mit Tat-Peptiden in der 24-Well Platte wurden kapillarähnliche Strukturen ausgebildet, die im Lichtmikroskop sichtbar waren. Tatpep5, Tatpep15 und Tatpep16 (Abb. 19 C-E) stimulierten die Tubulogenese von HUVEC ähnlich wie bFGF (Abb. 19 A). Wie erwartet, wurde die Gefäßneubildung durch Curcumin gehemmt (Abb. 19 B).

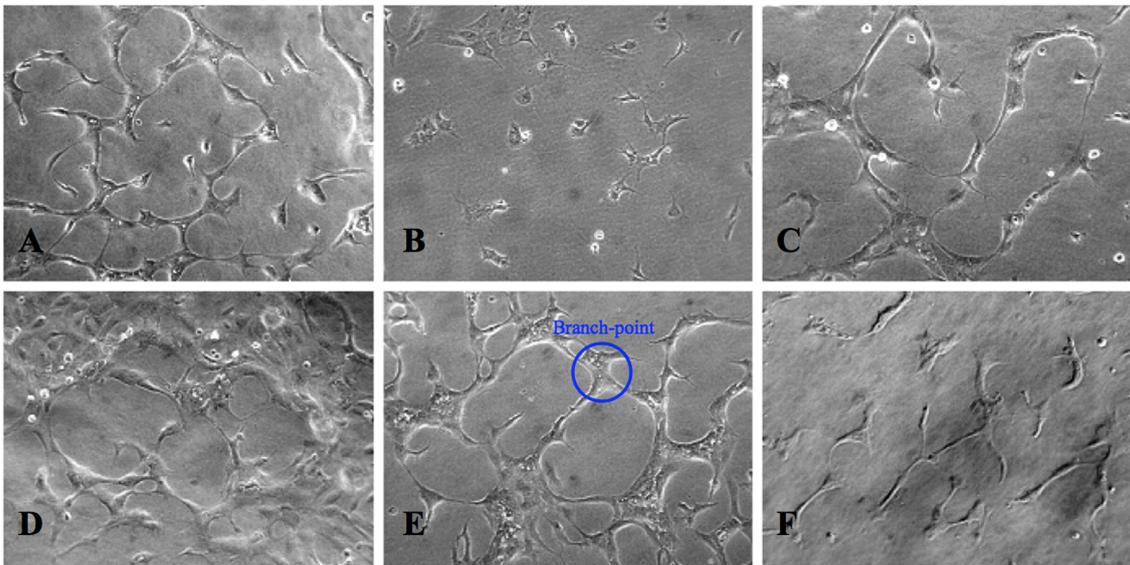


Abb. 19: Formationen von Kapillar-ähnlichen Strukturen (Tubuli), die die HUVEC auf der Grundlage der Growth Factor Reduced Matrigel Basalmembran-Matrix ausbildeten. Die Tubuli wurden 24 h nach der Zugabe von bFGF, Tat-Peptiden oder Curcumin zu HUVEC auf dem Matrigel fotografiert. HUVEC (25×10^3 Zellen/cm²) wurden für 24 h mit (A) bFGF, (B) Curcumin, (C) Tatpep5, (D) Tatpep15, (E) Tatpep16 und (F) ohne Zugabe inkubiert. Kennzeichnung eines sogenannten Branch-Point in E.

5.11 Gefäßneubildung (Tubulogenese): quantitativer Assay

Zur quantitativen Bewertung wurden die Branch-Points, wie in Abb. 19 E exemplarisch dargestellt, jeweils ausgezählt, wie bei Kok et al. beschrieben (*Kok et al., 2005*). bFGF, Tatpep5, Tatpep15 und Tatpep16 stimulierten die Tubulogenese von HUVEC. Es wurden 3-mal mehr Branch-Points durch HUVEC nach Inkubation mit Tatpep15 gebildet, als im Kontrollvergleich (Abb. 20).

Ergebnisse

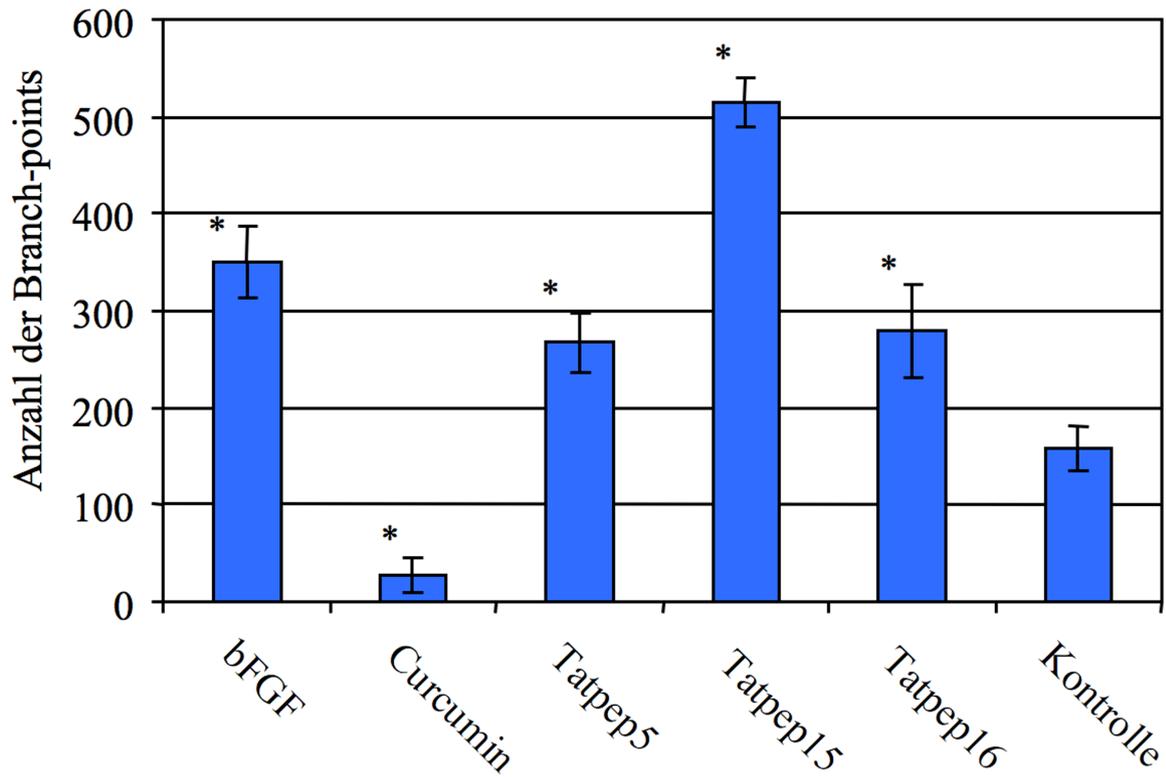


Abb. 20: Stimulation der Tubulogenese im Matrigel. Die Anzahl der Branch-Points sind Ausdruck für die Tubulogenese. Sie wurden jeweils aus 6 verschiedenen Sichtfeldern ausgezählt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen von Branch-Points aus 6 unabhängigen Experimenten sind dargestellt. * $P < 0,05$ versus Kontrolle.

6 Diskussion

6.1 Ischämische Gefäßerkrankungen

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines neuartigen angiogenetischen Faktors. Klinischer Hintergrund ist das Fehlen einer effektiven medikamentösen Therapieoption für die periphere arterielle Verschlusskrankheit im fortgeschrittenen Stadium. Ischämische Gefäßerkrankungen stellen die häufigste Todesursache in der westlichen Welt dar. Pro Jahr kommt es zu über 1,1 Millionen Myokardinfarkten und mehr als 400 000 neuen Fällen von stenosebedingtem Herzversagen (*Orlic et al., 2002*). Im peripheren Gefäßsystem stellt die pAVK das Korrelat zur koronaren Herzkrankheit dar. Bei dieser Erkrankung kommt es infolge arteriosklerotischer Veränderungen zu einer Degeneration der Gefäßwände und in der Folge zu Stenose- und Verschlussprozessen der Becken- und Beinarterien, die zum Perfusionsdefizit der unteren Extremität führen (*Gottsäter et al., 2006*). Die pAVK wird leider auch heute noch zu selten diagnostiziert und in ihrer prognostischen Bedeutung als Markerkrankheit für eine hohe Mortalität der betroffenen Patienten unterschätzt (*Diehm et al., 2011*). Therapeutisch stehen neben der Einstellung von Risikofaktoren endovaskuläre (z.B. PTA mit oder ohne Stent-Implantation oder Katheter-Atherektomie) und konventionell chirurgische (z.B. offene Atherektomie oder Bypass) Revaskularisierungsverfahren zur Verfügung. Da diese Therapieverfahren jedoch nicht bei allen Patienten durchführbar oder ausreichend erfolgreich sind, kommt es in den meisten Fällen bei weiterem Fortschreiten der Erkrankung zur Bedrohung der Extremität (*Sprengers et al., 2010*). Bei Patienten mit pAVK im Stadium IV, bei denen eine konservative oder gefäßchirurgische Therapie nicht mehr möglich oder sinnvoll ist, besteht als einzige Therapieoption die Amputation. Eine potenzielle alternative Therapieoption für diese Patienten stellt die therapeutische Angiogeneese dar.

6.2 Therapeutische Angiogeneese

Als therapeutische Angiogeneese wird die Applikation von angiogenetischen Wachstumsfaktoren bei Ischämie von Geweben bezeichnet mit dem Ziel, die natürliche, reaktive Arteriogeneese und Angiogeneese zu stimulieren, und somit den Blutfluss in minderperfundierte Gewebe, also im Falle der pAVK in ischämischen Muskelarealen zu verbessern. Hierbei werden entweder rekombinante Wachstumsfaktoren oder für Wachstumsfaktoren kodierende Gene appliziert (*Losordo et al., 1998; Schumacher et al.,*

1998). Die therapeutische Angiogenese stellt eine potenzielle alternative Therapieoption für Patienten mit einer kritischen Beinischämie auf dem Boden einer Kapillaraussprossung und der Neubildung von Kollateralgefäßen dar. Zwar konnten in den letzten Jahrzehnten innovative Techniken zur Revaskularisation, wie die Rekanalisation okkludierter Gefäße durch endovaskuläre Verfahren oder die intraarterielle Lysetherapie oder auch operative Bypassverfahren, erfolgreich etabliert werden, jedoch stellen diese invasiven Methoden für viele Patienten nur bedingt eine optimale Therapie dar oder sind gar nicht mehr möglich. Neben dem Risiko des Eingriffes ist auch die Wahrscheinlichkeit einer Wiedereinengung des Gefäßlumens nicht unerheblich, auch wenn in den letzten Jahren, etwa durch mit Medikamenten beschichtete Ballons oder Stents, die Restenoserate deutlich reduziert werden konnte (*Scheller et al., 2006; Tepe et al., 2008*). Die zum Teil begrenzte Funktionsdauer von Bypass-Rekonstruktionen kann erneute Interventionen erforderlich machen. Die Betroffenen gehören somit zur wachsenden Patientengruppe mit chronischer pAVK. Die Entwicklung neuer Therapiestrategien ist unter diesem Aspekt von großer Bedeutung. In jüngster Zeit rückt die Angiogenese-Forschung in den Mittelpunkt des Interesses bei der Suche nach neuen Therapieformen für die Heilung von peripheren vaskulären Erkrankungen. Das Ziel der klinischen Forschung besteht in der Identifizierung von geeigneten Stimulatoren der Angiogenese für die Therapie dieser Erkrankungen. Die Gentherapie für kardiovaskuläre Systemerkrankungen hat nach Nabel's Publikation einen deutlichen Aufschwung in den letzten Jahren erfahren (*Nabel et al., 1990*). Die Gentherapie mit angiogenen Wachstumsfaktoren wie HGF, FGF-1, FGF-4, VEGF 121, VEGF-175 und VEGF-10 konnte im Tierversuchsmodell durch einen intramuskulären Gentransfer in den Hintergliedmaßen oder bei Myokardischämien eine Angiogenese induzieren. Die Induktion der Angiogenese durch VEGF₁₆₅ konnte experimentell und klinisch gezeigt werden (*Baumgartner et al., 1998; Baumgartner et al., 2001; Isner et al., 1996; Isner et al., 1998; Folkman et al., 1998; Takeshita et al., 1994*). VEGF gehört zu den potentesten Stimulatoren der Angiogenese. Jedoch ist die klinische Applikation nicht unbedenklich, da eine Wachstumsstimulation sowohl physiologischer als auch maligner Gewebe erfolgen kann. Daneben wurde auch die Aktivierung atherosklerotischer Plaques beobachtet (*Celletti et al., 2001*). Potenzielle Nebenwirkungen der Gentherapie können in Form von Tumoren oder einer diabetischen Retinopathie auftreten (*Caldwell et al., 2003*). Der Mechanismus der Wirkung und Nebenwirkungen nach angiogener Gentherapie ist noch nicht in toto verstanden. Die Angiogenese wurde bereits mit niedrigen Konzentrationen adenoviraler VEGF induziert, während höhere Konzentrationen nötig waren, um effizient eine kapillare Ausprossung und

eine Erhöhung der Zielmuskelperfusion zu erreichen. Interessanterweise korrelierten metabolische Vorteile wie ein verbesserter Sauerstoffumsatz nach adenoviraler VEGF Applikation im höheren Maße mit der Kapillarlumenvergrößerung als mit der Neuaussprossung von Gefäßen (*Korpisalo et al., 2011*). Unter der Gentherapie mit VEGF wurden mehrere systemische dosisabhängige Nebenwirkungen beobachtet, die durch charakteristische Veränderungen von Indexparametern des hepato-pankreatischen und renalen Systems begleitet wurden. Außerdem wurden kardiale Funktionsparameter verändert (*Korpisalo et al., 2011*).

Phase I und Phase II Studien wurden mit den Wachstumsfaktoren FGF und VEGF zur therapeutischen Angiogenese bei Patienten mit peripherer oder koronarer Ischämie nach verschiedenen Tierversuchen initiiert und teilweise abgeschlossen (*Lederman et al., 2002; Henry et al., 2003; Grines et al., 2002*). Zwar erbrachten die initial durchgeführten, nicht kontrollierten Studien zunächst vielversprechende Ergebnisse (*Henry et al., 2003*), die inzwischen vorliegenden Ergebnisse von mehreren kontrollierten, randomisierten Doppelblindstudien ergaben jedoch ein gemischtes Bild (*Henry et al., 2007*). So wurde in einigen Studien ein prädefiniertes primäres Endpunkt erreicht, weitere primäre Endpunkte jedoch verfehlt (*Henry et al., 2007*).

Die Anwendung von Stammzellen zur Induktion von Neoangiogenese stellt eine vielversprechende Alternative zu konventionellen Therapieverfahren der kardiovaskulären Medizin dar (*Sprengers et al., 2008*). Zurzeit sind mehrere placebo-kontrollierte Studien zur Feststellung der Rolle von autologen Knochenmarkstammzellen initiiert (*Amann et al., 2008*). Stammzellen aus dem Knochenmark können die Angiogenese induzieren und die kollaterale Durchblutung verbessern. Diese Hypothese wurde in einer randomisierten Placebo-kontrollierten multizentrischen Studie in Deutschland (BONMOT-CLI) mit 90 Patienten mit kritischer Extremitätenischämie überprüft. Die ersten Ergebnisse zeigten, dass die Injektion autologer Stammzellen bei kritischer Ischämie der unteren Extremität ohne Möglichkeit einer Revaskularisation effektiv im Sinne einer verbesserten Wundheilung ist sowie mit einer verminderten Majoramputationrate einherzugehen scheint (*Amann et al., 2009*). Allerdings ist nicht vor Ende Sommer 2011 mit abschließenden Ergebnissen der BONMOT-CLI-Studie zu rechnen (*Lüdemann et al., 2011*).

6.3 Das HIV-1 Tat-Protein und Angiogenese

Das HIV-1 Tat-Protein ist ein Transaktivator der HIV-1 Replikation und Transkription

(*Neuveut et al., 1996; Rana et al., 1999*) und trägt zur Immundefizienz während der AIDS Erkrankung bei. Darüber hinaus induziert das HIV-1 Tat-Protein angiogene Effekte im Endothel, was zur Entwicklung des Kaposi Sarkoma im AIDS Stadium bei Patienten führen kann (*Rubartelli et al., 1998*). Das 86-Aminosäuren-Tat-Protein wird von zwei Exons kodiert (*Neuveut et al., 1996*). Die ersten 72 Aminosäuren werden von dem ersten Exon kodiert, die übrigen 14 C-terminalen Aminosäuren von einem weiteren Exon. Das Tat-Protein besteht aus 5 funktionellen Domänen, einer N-terminalen-, einer Cystein-reichen-, einer Kern-, einer basischen- und einer C-terminalen Region. Die basische Region enthält die RNA-Bindungsdomäne und ein NLS (Nuclear Localization Signal). Außerdem ist sie zuständig für die Aufnahme von Tat in die Zelle durch die zelluläre Membran. Im Gegensatz dazu bindet die Cystein-reiche Region unspezifisch an zahlreiche Komplexe und ist für die Oligomerisierung des Tat-Proteins verantwortlich (*Rana et al., 1999*).

Eine eventuelle Anwendung des Tat-Proteins für eine pro-angiogene Therapie muss mögliche negative Nebenwirkungen des viralen Proteins berücksichtigen. Es ist bekannt, dass das Tat-Protein eine immunsuppressive Wirkung hat. Es wurde gezeigt, dass die Tat-Aminosäuren Lys51, Arg52 und Asp67 für die Unterdrückung der Antigenpräsentation mittels MHC Klasse I essentiell sind. Die Tat-Wirkung basiert auf der Hemmung des 20S Proteasoms und der Kompetition des Tat-Proteins mit dem Proteasom-Aktivator PA28. Die Mutation der Aminosäuren Lys51, Arg52 und Asp67 zu Ala führt zur Aufhebung der Tat-Wirkung auf die Antigenpräsentation (*Huang et al., 2002*).

Das HIV-1 Tat-Protein ist ein angiogener Wachstumsfaktor. Es konnte gezeigt werden, dass die basische Domäne des viralen Proteins für die Stimulierung des Wachstums und der Migration von Endothelzellen verantwortlich ist (*Albini et al., 1996*). Der exakte Mechanismus der Wirkungsweise ist noch unklar. Es wurde angenommen, dass die basische Domäne des Tat-Proteins über den VEGF Rezeptor 2 wirkt (*Scheidegger et al., 2001*). Andererseits penetriert die basische Domäne in die Zelle und hat einen Einfluss auf das Proteasomsystem (*Huang et al., 2002; Seeger et al., 1997*).

6.4 Mechanismus der Angiogenese und Arteriogenese

In unterschiedlichen experimentellen Studien wurde die Adaptation des Gefäßsystems des erwachsenen Organismus an die chronische Ischämie durch Angiogenese und Arteriogenese gezeigt (*Folkman et al., 1971; Schaper et al., 1999*). Die ersten Publikationen über Angiogenese befassten sich mit der Vaskularisierung von Tumoren (*Folkman et al., 1971*).

Bei der Angiogenese handelt sich um die Neubildung von Kapillaren in dem ischämischen Areal, wie zum Beispiel beim Karzinom, Apoplex und ischämischer Gefäßkrankheit. Die Angiogenese ist ein komplexer Prozess, der ein intensives Zusammenspiel zwischen den beteiligten Zellen, löslichen Faktoren und extrazellulären Matrixkomponenten erfordert. Die Angiogenese bezieht sich auf die Aussprossung von Endothelzellen, welche schließlich zur Formierung eines kapillären Netzwerks führt (*Folkman et al., 1997*).

In unserem Labor haben wir zunächst den Mechanismus der Tumorangiogenese erforscht. Es konnte gezeigt werden, dass die anti-angiogene Substanz Curcumin ein Hemmstoff der CSN-assoziierten Kinasen ist (*Bech-Otschir et al., 2002*). Durch die Hemmung der CSN-assoziierten Kinasen kommt es zum Abbau des Transkriptionsfaktors c-Jun durch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS). Der Transkriptionsfaktor c-Jun reguliert den Hauptteil der VEGF-Produktion in Tumorzellen, und der Abbau von c-Jun führt zur Abnahme der VEGF-Produktion in HeLa und HL-60 Zellen um 75% (*Pollmann et al., 2001*).

Die Arteriogenese stellt die zweite Form des Gefäßwachstums dar. Sie wurde als eigenständiger Prozess erkannt und wird inzwischen auch als eigenständiges therapeutisches Ziel angesehen (*Schaper et al., 1999*). Arteriogenese bezeichnet das Wachstum von bereits existierenden Arteriolen zu funktionell bedeutenden Kollateralen. Die Rolle der Arteriogenese im Sinne der Verbesserung der regionalen Durchblutung und Vermeidung von Ischämiefolgen ist gut erforscht (*Nohara et al., 1983; Schwartz et al., 1985*). Das Kollateralwachstum findet, im Gegensatz zur Angiogenese, nicht im ischämischen Gewebe selbst, sondern proximal davon statt (*Schaper et al., 1996*). Der entscheidende Stimulus ist daher auch nicht die Ischämie selbst, sondern mechanische Kräfte durch Umverteilung des Blutflusses (*Singh et al., 1998*). In unserer Arbeit haben wir den initialen Effekt von Tat-Peptiden auf die Stimulation der Angiogenese untersucht.

6.5 Testung der Effekte von Tat-Protein und von Tat-Peptiden auf das Proteasomsystem

Um Tat-Peptide für eine Therapie von vaskulären Erkrankungen potenziell nutzbar zu machen, haben wir zunächst die Effekte einer Vielzahl von synthetisierten Tat-Peptiden auf das Proteasomsystem getestet. Wir hatten gezeigt, dass vollständiges Tat-Protein das 20S Proteasom hemmt und den Proteasom-Aktivator PA28 vom Proteasom verdrängt. Außerdem führt die Tat-Bindung an den 19S Regulator zur Stimulierung des 26S Proteasoms (*Seeger et al., 1997*). Darüber hinaus wurde demonstriert, dass das Tatpep1 den gleichen Effekt auf das

Proteasomsystem ausübt wie das vollständige Tat-Protein. Sowohl Tatpep1 als auch vollständiges Tat-Protein hemmen die Antigenpräsentation via MHC Klasse I (*Huang et al., 2002*). Diese Eigenschaften des Tat-Proteins wären für die pro-angiogene Anwendung des viralen Proteins ungeeignet. Die Mutation der Tat-Aminosäuren Lys51, Arg52 und Asp67 führt zum vollständigen Verlust des Tat-Protein-Effekts auf das Proteasomsystem und auf die Antigenpräsentation (*Huang et al., 2002*). Daraus resultierte die Synthese des Tat-Peptides Tatpep5.

Darüber hinaus wurden die Tat-Peptide Tatpep6 bis Tatpep18 synthetisiert. Tatpep6 resultiert aus einem Literaturvergleich. Es stellt die Minimalregion des Tat-Proteins dar, die in allen Tat-Peptiden mit pro-angiogener Wirksamkeit enthalten ist. Die Peptide Tatpep6 bis Tatpep18 wurden zunächst mit dem 20S Proteasom inkubiert und so ihr Effekt auf die Peptidaseaktivität des Proteasoms getestet. Mit Tatpep5, Tatpep15 und Tatpep16 wurde kein Hemmeffekt auf das 20S Proteasom gemessen. Alle anderen Peptide hatten einen Hemmeffekt auf das Proteasom und sind demzufolge für eine klinische Anwendung in der Therapie ungeeignet.

6.6 Einfluss der Tat-Peptide auf die Transkriptionsfaktoren c-Jun und SP1

Ein weiterer wesentlicher Faktor zur Einschätzung des Effekts der Tat-Peptide auf die Angiogenese ist deren Einfluss auf die Stimulation von Angiogenesetranskriptionsfaktoren wie c-Jun und SP1. Die Angiogenese wird im Wesentlichen reguliert durch c-Jun und SP1. Die Behandlung von HUVEC mit vollständigem Tat-Protein führte zum Anstieg der endogenen Konzentration von c-Jun und SP1. Diese bestätigte den Angiogeneseeffekt des Tat-Proteins. Auf Grund dieses Ergebnisses wurde der Effekt der Tat-Peptide auf die Konzentrationen der Transkriptionsfaktoren untersucht. Beim Einsatz von Curcumin resultierte eine Senkung der Konzentrationen der Transkriptionsfaktoren, währenddessen Tatpep15 und Tatpep16 konzentrationsabhängig eine Erhöhung des endogenen c-Jun- und SP1- Spiegels bewirkten.

Weiterhin zeigten Tatpep5, Tatpep15 und Tatpep16 keinen inhibitorischen Effekt auf das Zellwachstum der HUVEC in dem MTT-Assay. Daher haben Tatpep5, Tatpep15 und Tatpep16 weder toxische noch apoptotische Effekte unter den verwendeten experimentellen Bedingungen. Im Gegensatz dazu hatte die Inkubation der Zellen mit Curcumin, das für seinen apoptotischen Effekt bekannt ist (*Bech-Otschir et al., 2001; Liontas et al., 2004*), eine Reduktion der Proliferation um 60% zur Folge.

6.7 Einfluss der Tat-Peptide auf die Produktion von bFGF und VEGF

bFGF kann an Gefäßen die Proliferation aller drei Gefäßzellarten (Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Fibroblasten) stimulieren. bFGF wurde 1974 zum ersten Mal isoliert. Es wird als Polypeptid von einer Vielzahl verschiedener Zellen synthetisiert und liegt in zwei verschiedenen Formen vor, als acidic FGF (aFGF) mit 16 kD und als basic FGF (bFGF) mit 18 kD. Im Gegensatz zu VEGF ist FGF nicht allein spezifisch für Endothelzellen, sondern bindet sich an verschiedene Zelltypen wie zum Beispiel glatte Muskelzellen, Fibroblasten und auch Myoblasten. Durch die unterstützende Funktion bei der Degradierung von Kapillarmembranen, bei der Migration und Proliferation von Endothelzellen und durch die Produktion des Plasminogen-Aktivators spielt FGF eine wichtige Rolle in der Angiogenese (*Descheemaeker et al., 1993; Okada et al., 1996; Lafreniere et al., 2004*). Während andere Wachstumsfaktoren pleiotrop wirksam sind, ist VEGF ein hochspezifisches Mitogen für Endothelzellen. Die biologische Bedeutung von VEGF beschränkt sich aber nicht auf die Induktion der Zellproliferation. Über die Expression bestimmter Adhäsionsmoleküle auf Endothel und Zellen des peripheren Blutes fördert dieser Wachstumsfaktor die Zellmigration und Zellkommunikation und bildet so mit seinen Rezeptoren ein essenzielles Regulationssystem für die Formation von Blutgefäßen während der embryonalen Entwicklung (*Leung et al., 1989*). Darüberhinaus verfügt VEGF auch über Einfluss auf die Endothelzell-Differenzierung (*Carmeliet et al., 1995*). Unterbindet man die Signaltransduktion bei Versuchstieren *in utero*, zeigen die Embryonen keine Endothel- oder hämopoetischen Stammzellen. VEGF ist demnach als entscheidende Determinante der Differenzierung von Hämangioblasten in endotheliale Vorläuferzellen und Stammzellen der Blutbildung anzusehen. Ausserdem kommt es unter seinem Einfluss durch Einbau von Fenestrierungen in das Endothel sowie durch Formation von Kanälen zu gesteigerter Gefäßpermeabilität (*Neufeld et al., 1999*).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Tat-Peptide keinen relevanten Einfluss auf die VEGF-Produktion in HUVEC haben. Im Gegensatz dazu haben Tat-Peptide jedoch einen konzentrationsabhängigen Einfluss auf bFGF-Produktion. Die FGF-Familie spielt eine wesentliche Rolle in der Prozess der Arteriogenese (*Lebherz et al., 2003*). Dennoch ist die vaskuläre Adaptation bei Ischämie als Ganzes ein komplexer Prozess, bei dem viele verschiedene Faktoren eine Rolle spielen. Die FGF-Familie fördert die Angiogenese durch die Steigerung der VEGF-Produktion und der Expression seines Rezeptors (*Hata et al., 1999*).

6.8 Tatpep5, Tatpep15 und Tatpep16 stimulieren die Produktion von PAI-1 in HUVEC

PAI-1 ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 48 kD und gehört zur Familie der Serinprotease-Inhibitoren (*Loskutoff et al., 1987*). Seine physiologische Funktion besteht hauptsächlich in der Inhibition der Plasminogen-Aktivatoren (t-PA und u-PA) (*Bos et al., 1992*). Es nimmt damit eine zentrale Funktion in der Regulation der Bildung stabiler Thromben ein (*Rånby et al., 1988*). PAI-1 wird im Plasma durch Bindung an Vitronectin in seiner aktiven Konformation stabilisiert (*Wiman et al., 1988*). Darüber hinaus spielt die Expression von PAI-1 eine wichtige Rolle in der Regulation der Zellmigration und Angiogenese (*Inyang et al., 1990*). Die Produktion von PAI-1 in HUVEC wird beschleunigt durch die Präsenz der Transkriptionsfaktoren c-Jun und SP1 (*Arts et al., 1999, Chen et al., 1998*). PAI-1 spielt eine essenzielle Rolle in dem angiogenen Programm (*Bajou et al., 2004; McMahon et al., 2001; Vogten et al., 2003*). Als weiteres Kriterium für die pro-angiogene Wirkung der Tat-Peptide wurde die PAI-1 Produktion von HUVEC gemessen. Mit Hilfe eines spezifischen ELISA-Tests wurde die PAI-1 Konzentration im Überstand von HUVEC quantifiziert.

Das vollständige Tat-Protein steigert die PAI-1 Produktion um 50% im Vergleich zur Kontrolle. Es konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass das Tat-Protein sowie Tat-Peptide die Sekretion von PAI-1 in HUVEC stimulieren. Die Curcumin-Behandlung der HUVEC resultiert in der Senkung der PAI-1-Produktion, was mit hoher Wahrscheinlichkeit auf die Reduzierung der c-Jun und SP1 Protein-Konzentrationen zurückzuführen ist. Die Hemmung der PAI-1 Produktion lässt sich durch die Hemmung der CSN-assoziierten Kinasen erklären. Tatpep5 und Tatpep15 waren zweifach effektiver in der Stimulation der PAI-1-Sekretion im Vergleich zum Tat-Protein. Das Tatpep16 hatte den gleichen Effekt wie das Tat-Protein. Die Stimulation der PAI-1-Sekretion macht die Tat-Peptide Tatpep5, Tatpep15 und Tatpep16 zu potenziellen Peptiden für das pro-angiogene Programm.

6.9 Tatpep5, Tatpep15 und Tatpep16 unterstützen die Invasion/Migration sowie die Gefäßneubildung in HUVEC

Die Angiogenese ist ein komplexer Vorgang, der auf dem intensiven Zusammenspiel von Zellen, löslichen Faktoren und extrazellulären Matrixkomponenten basiert. Die Angiogenese beinhaltet in vivo das Wachstum und die Stabilisierung neuer Gefäße (*Vailhé et al., 2001*).

Diskussion

Analog zur in vivo-Angiogenese durchliefen die eingesetzten mikrovaskulären Endothelzellen auch in-vitro nach Stimulation mit pro-angiogenen Faktoren die verschiedenen Stadien der angiogenen Kaskade wie Migration, Proliferation und Differenzierung in kapillarähnliche Strukturen mit einem zentralen Lumen, welche eindeutig dem Wachstum von Gefäßen in vivo zugeordnet werden können. Der proteolytische Abbau der extrazellulären Matrix führt zu einem lokalen Anstieg von Wachstumsfaktoren (z.B. VEGF, bFGF, platelet-derived growth factor, epidermal growth factor) und Peptidfragmenten (z.B. Fibrin, Hyaluronsäure), die die Migration und Proliferation von HUVEC unterstützen (*Liekens et al., 2002*).

Die zunächst durchgeführten Untersuchungen hatten zum Ziel, den Einfluss der Tat-Peptide auf die Invasion und Migration von HUVEC zu analysieren. Das für die Endothelzellkultur verwendete Medium enthielt keine proliferationssteigernden Faktoren, so dass ausschließlich der Effekt der Tat-Peptide auf die Invasion und Migration von HUVEC untersucht werden konnte. Der angiogene Faktor bFGF spielt eine wichtige Rolle in der Invasion und Migration von Endothelzellen (*Descheemaeker et al., 1993; Okada et al., 1996*) und wurde als positive Kontrolle verwendet. Curcumin diente als negative Kontrolle. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die vielfach beschriebene Steigerung der Invasion und Migration von Endothelzellen durch bFGF (*Scharpfenecker et al., 2007*). Tatpep5 und Tatpep15 stimulieren die Migration und Invasion von HUVEC im Matrigel-Invasionsassay ähnlich wie bFGF. Curcumin, als bekannter Inhibitor der Angiogenese, zeigte eine Hemmung der Invasion und Migration von HUVEC. Diese Ergebnisse stellten einen ersten Schritt in der Untersuchung des Einflusses der Tat-Peptide auf die in-vitro Angiogenese dar. Zur umfassenden Analyse dieser Wirkungen wurden weitere in-vitro Untersuchungen mittels Gefäßneubildungsassay durchgeführt. Diese diente zur qualitativen und quantitativen Beurteilung der Bildung von kapillarähnlichen Strukturen. Wie die vorliegenden Daten zeigen, wurde die Bildung tubulärer Strukturen von HUVEC im in-vitro Gefäßneubildungsassay unter dem Einfluss von Tatpep5, Tatpep15 und Tatpep16 stimuliert. Tatpep15 zeigte die stärkste Stimulation. Daneben wurde der bekannte positive Effekt von bFGF auf die Bildung tubulärer Strukturen bestätigt.

Anhand dieser verschiedenen Modelle zur in-vitro Angiogenese ließ sich zeigen, dass Tatpep5, Tatpep15 und Tatpep16 in der Lage sind, angiogeneserelevante Endothelzellfunktionen zu stimulieren. So wurden die Proliferation, die Migration und die Bildung kapillarähnlicher tubulärer Strukturen von HUVEC durch die ausgewählten Tat-peptide signifikant stimuliert.

7 Zusammenfassung

Die pro-angiogene Kapazität des durch HIV-1 exprimierten multifunktionellen Proteins Tat ist bekannt. Das Tat-Protein induziert Angiogenese, bekannt ist die Ausbildung des Kaposi Sarkoms während der AIDS-Erkrankung. Das Anliegen des Projektes bestand in der Identifizierung von Tat-Peptiden, die Angiogenese induzieren, aber keinen Effekt auf das Immunsystem haben. Solche Peptide könnten für die Therapie schwer heilbarer vaskulärer Erkrankungen dienen.

Das Tat-Protein hemmt die Antigenpräsentation mittels MHC Klasse I Molekülen. Der Mechanismus dieses Effekts wurde im Labor aufgeklärt und bei der Synthese und Auswahl pro-angiogener Tat-Peptide berücksichtigt.

Ausgehend von der essentiellen Sequenz des Tat-Peptides wurden verschiedene Peptide synthetisiert. HUVEC wurden mit diesen Tat-Peptiden behandelt. Hierbei wurde deren Einfluss auf das Ubiquitin/Proteasom-System analysiert. Kriterien für die Auswahl potenzieller pro-angiogener Eigenschaften der Tat-Peptide waren die Induktion der Transkriptionsfaktoren c-Jun und SP1 sowie von PAI-1 in HUVEC. c-Jun und SP1 wurden mittels Western blot, PAI-1 mittels spezifischem ELISA bestimmt. Ein wichtiger Schritt der Angiogenese ist die Invasion/Migration der Endothelzellen durch die Basalmembran. Die Invasion von Endothelzellen wurde in einer modifizierten Boyden-Kammer gemessen. Der weitere Einfluss der Tat-Peptide auf die Angiogenese wurde durch den Matrigel-Assay für die Tubulogenese untersucht.

Es wurden Tat-Peptide mit proangiogenem Effekt synthetisiert, welche keinen Einfluss auf das Ubiquitin/Proteasom-System haben. Im HUVEC System konnten 2 Tat-Peptide (Tatpep5 und Tatpep15) mit proangiogener Kapazität selektiert werden. Tatpep5 und Tatpep15 zeigten weder einen toxischen noch einen apoptotischen Effekt auf das Zellwachstum der HUVEC in dem MTT-Assay. Tatpep5 und Tatpep15 stimulierten die Migration und Invasion von HUVEC im Matrigel-Invasionsassay ähnlich wie bFGF (*Ismail et al., 2006*). Die ausgewählten Tat-Peptide induzierten eine Stimulation der Bildung kapillarähnlicher tubulärer Strukturen, welche im qualitativen und quantitativen Gefäßneubildungsassay gezeigt wurde. Die erreichten Ergebnisse können Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen sein. In einer anschließenden Forschungsreihe sollten die Effekte der in den molekularbiologischen Studien vor-selektierten Tat-Peptide auf die Vaskularisierung im Tiermodell untersucht werden. Dabei soll nachgewiesen werden, ob die Peptide eine therapeutisch relevante Angiogenese induzieren können.

8 Summary

Therapeutic angiogenesis represents a novel approach to treat critical limb ischemia when revascularization is no more an option. The clinical use of the vascular endothelial growth factor is questioned, because of its side effects. This study was designed to identify and characterise human immunodeficiency virus type 1 Tat-derived peptides based on their pro-angiogenic properties. A series of Tat-derived peptides were synthesized containing mutations in the basic domain. To minimize side effects Tat peptides were selected exerting no effects on the proteasome and on the growth of human umbilical vein endothelial cells. Tat peptides, Tatpep5 and Tatpep15, increased the endogenous levels of the pro-angiogenic transcription factors c-Jun and SP1 as well as the production of the plasminogen activator inhibitor-1 by human umbilical vein endothelial cells. A significant induction of endothelial cell invasion was observed upon treatment of human umbilical vein endothelial cells with Tat peptides. In addition, selected Tat peptides induced tube formation by human umbilical vein endothelial cells as visualized and quantified in a Matrigel matrix. Our data demonstrate that both Tatpep5 and Tatpep15 fulfil essential criteria for pro-angiogenic substances. They represent the basis for the development of novel pro-angiogenic drugs for therapeutic angiogenesis, which might be applied for treatment of unreconstructible critical limb ischemia.

9 Literaturverzeichnis

- Albini A, Iwamoto Y, Kleinman H K. A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells. *Cancer Research* 1987; 47:3239-3245.
- Albini A, Barillari G, Benelli R, Gallo RC, Ensoli B. Angiogenic properties of human immunodeficiency virus type 1 Tat protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:4838-4842.
- Albini A, Soldi R, Giunciuglio D, Giraud E, Benelli R, Primo L, Noonan D, Salio M, Camussi G, Rockl W, Bussolino F. The angiogenesis induced by HIV-1 Tat protein is mediated by the Flk-1/KDR receptor on vascular endothelial cells. *Nat Med* 1996; 2:1371-1375.
- Amann B, Lüdemann C, Rückert R, Lawall H, Liesenfeld B, Schneider M, Schmidt-Lucke J. Design and rationale of a randomized, double-blind, placebo-controlled phase III study for autologous bone marrow cell transplantation in critical limb ischemia: the BONE Marrow Outcomes Trial in Critical Limb Ischemia (BONMOT-CLI). *Vasa* 2008; 37:319-25.
- Amann B, Lüdemann C, Ratei R, Schmidt-Lucke J. Autologous Bone Marrow Cell Transplantation Increases Leg Perfusion and Reduces Amputations in Patients With Advanced Critical Limb Ischemia Due to Peripheral Artery Disease. *Cell Transplantation* 2009; 371-380.
- Arbiser JL, Klauber N, Rohan R, van Leeuwen R, Huang MT, Fisher C, Flynn E, Byers HR. Curcumin is an in vivo inhibitor of angiogenesis. *Mol Med* 1998; 4:376-383.
- Armstrong SA, Barry DA, Leggett RW, Mueller CR. Casein kinase II-mediated phosphorylation of the C-terminus of SP1 decreases its DNA binding activity. *J Biol Chem* 1997; 272:13489-13495.
- Arras M, Ito WD, Scholz D, Winkler B, Schaper J, Schaper W. Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hind limb. *J Clin Invest* 1998; 101:40-50.
- Arts J, Grimbergen J, Toet K, Kooistra T. On the role of c-Jun in the induction of PAI-1 gene expression by phorbol ester, serum, and IL-1alpha in HepG2 cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:39-46.
- Asahara T. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; 275:964-967.

Literaturverzeichnis

- Bajou K, Maillard C, Jost M, Lijnen RH, Gils A, Declerck P, Carmeliet P, Foidart JM, Noel A. Host-derived plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) concentration is critical for in vivo tumoral angiogenesis and growth. *Oncogene* 2004; 23:6986-6990.
- Barillari G, Ensoli B. Angiogenic effects of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein and its role in the pathogenesis of AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15:310-326.
- Baumeister W, Walz J, Zuhl F, Seemuller E. The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* 1998; 92:367-380.
- Baumgartner I, Isner JM. Stimulation of peripheral angiogenesis by vascular endothelial growth factor (VEGF). *Vasa* 1998; 27:201-206.
- Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, Blair R, Kearney M, Walsh K, Isner JM Constitutive expression of phVEGF165 after intramuscular gene transfer promotes collateral vessel development in patients with critical limb ischemia. *Circulation* 1998; 97:1114-1123.
- Baumgartner I, Isner JM. Somatic gene therapy in the cardiovascular system. *Annu Rev Physiol* 2001; 63:427-450.
- Bech-Otschir D, Kraft R, Huang X, Henklein P, Kapelari B, Pollmann C, Dubiel W. COP9 signalosome-specific phosphorylation targets p53 to degradation by the ubiquitin system. *EMBO J* 2001; 20:1630-1639.
- Bech-Otschir D, Seeger M, Dubiel W. The COP9 signalosome: at the interface between signal transduction and ubiquitin-dependent proteolysis. *J Cell Sci* 2002; 115:467-473.
- Berkhout B, Gatignol A, Rabson AB, Jeang KT. TAR-independent activation of the HIV-1 LTR: evidence that tat requires specific regions of the promoter. *Cell* 1990; 62:757-767.
- Bos R, Nieuwenhuizen W. Bispecific monoclonal antibodies increase the fibrin-specific fibrinolytic activity of tissue-type plasminogen activator (tPA) and urokinase-type plasminogen activator (uPA). *Ann N Y Acad Sci* 1992; 667:428-30.
- Bradford, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72:248-54.
- Brindle N. Growth factors in endothelial regeneration. *Cardiov Res* 1993; 27:1162-1172.
- Caldwell RB, Bartoli M, Behzadian MA, El-Remessy AE, Al-Shabrawey M, Platt DH, Caldwell RW. Vascular endothelial growth factor and diabetic retinopathy: pathophysiological mechanisms and treatment perspectives. *Diabetes Metab Res*

Literaturverzeichnis

- Rev. 2003; 19:442-55.
- Carmeliet P, Collen D. Vascular development and disorders: molecular analysis and pathogenic insights. *Kidney Int* 1998; 53:1519-4159.
- Carmeliet P. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*. 2005; 3:4-10.
- Celletti FL, Hilfiker PR, Ghafouri P, Dake MD. Effect of human recombinant vascular endothelial growth factor165 on progression of atherosclerotic plaque. *J Am Coll Cardiol* 2001; 37:2126-2130.
- Celletti FL, Waugh JM, Amabile PG, Brendolan A, Hilfiker PR, Dake MD. Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nat Med* 2001; 7:425-429.
- Cerundolo V, Benham A, Braud V, Mukherjee S, Gould K, Macino B, Neefjes J, Townsend A. The proteasome-specific inhibitor lactacystin blocks presentation of cytotoxic T-lymphocyte epitopes in human and murine cells. *Eur J Immunol* 1997; 27:336-341.
- Chen YQ, Su M, Walia RR, Hao Q, Covington JW, Vaughan DE. Sp1 sites mediate activation of the plasminogen activator inhibitor-1 promoter by glucose in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1998; 273:8225-8231.
- Craiu A, Gaczynska M, Akopian T, Gramm CF, Fenteany G, Goldberg AL, Rock KL. Lactacystin and clasto-lactacystin beta-lactone modify multiple proteasome beta-subunits and inhibit intracellular protein degradation and major histocompatibility complex class I antigen presentation. *J Biol Chem* 1997; 272:13437-13445.
- Demir R, Yaba A, Huppertz B. Vasculogenesis and angiogenesis in the endometrium during menstrual cycle and implantation. *Acta Histochem*. 2010; 112:203-14.
- Descheemaeker K. On the regulation of the plasminogen activator inhibitor-1 gene expression. *Verh K Acad Geneesk Belg* 1993; 55:225-264.
- Diehm C, Darius H, Pittrow D, Schwertfeger M, Tepohl G, Haberl RL, Allenberg JR, Burghaus I, Trampisch HJ. Prognostic value of a low post-exercise ankle brachial index as assessed by primary care physicians. *Atherosclerosis* 2011; 214:364-372.
- Dynan WS, Tjian R. The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell* 1983; 35:79-87.
- Eferl R, Wagner EF. AP-1: A double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2003; 3:859-868.
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 2003; 9:669-676.
- Fojas de Borja P, Collins NK, Du P, Azizkhan-Clifford J, Mudryj M. Cyclin A-CDK

Literaturverzeichnis

- phosphorylates Sp1 and enhances Sp1-mediated transcription. *EMBO J* 2001; 20:5737-5747.
- Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285:1182-1186.
- Folkman J, Klagsburn M. Angiogenic factors. *Science* 1987; 235:442-447.
- Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995; 27-31.
- Folkman J. Addressing tumor blood vessels. *Nat Biotechnol.* 1997; 15:510.
- Folkman J. Therapeutic angiogenesis in ischemic limbs. *Circulation* 1998; 97:1108-10.
- Fontaine R, Kim M, Kieny R. Die chirurgische Behandlung der peripheren Durchblutungsstörungen. *Helvetica Chirurgica Acta* 1954; 21:499-533.
- Frankel AD. Activation of HIV transcription by Tat. *Curr Opin Genet Dev* 1992; 2:293-298.
- Gallo RC. Tat as one key to HIV-induced immune pathogenesis and Tat (correction of Pat) toxoid as an important component of a vaccine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:8324-8326.
- Garcia A, Cereghini S, Sontag E. Protein phosphatase 2A and phosphatidylinositol 3-kinase regulate the activity of Sp1-responsive promoters. *J Biol Chem.* 2000; 275:9385-9389.
- Gargett CE, Lederman F, Lau TM, Taylor NH and Rogers PAW. Lack of correlation between vascular endothelial growth factor production and endothelial cell proliferation in the human endometrium. *Human Reproduction* 1999; 14:2080-2088.
- Gerber HP, McMurtrey A, Kowalski J, Yan M, Keyt BA, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J Biol Chem* 1998; 273:30336-30343.
- Gottsäter A. Managing risk factors for atherosclerosis in critical limb ischaemia. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2006; 32:478-483.
- Grines CL, Watkins MW, Helmer G, Penny W, Brinker J, Marmur JD, West A, Rade JJ, Marrott P, Hammond HK, Engler RL. Angiogenic Gene Therapy (AGENT) trial in patients with stable angina pectoris. *Circulation* 2002; 105:1291-1297.
- Gutierrez LS, Schulman A, Brito-Robinson T, Noria F, Ploplis VA, Castellino FJ. Tumor development is retarded in mice lacking the gene for urokinase-type plasminogen activator or its inhibitor, plasminogen activator inhibitor-1. *Cancer Res* 2000; 60:5839-5847.

Literaturverzeichnis

- Hanahan D and Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86:353-364.
- Hata Y, Rook SL, Aiello LP. Basic fibroblast growth factor induces expression of VEGF receptor KDR through a protein kinase C and p44/p42 mitogen-activated protein kinase-dependent pathway. *Diabetes* 1999; 48:1145-1155.
- Heil M, Eitenmuller I, Schmitz-Rixen T, Schaper W. Arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and differences. *J Cell Mol Med* 2006; 10:45-55.
- Henry TD, Annex BH, McKendall GR, Azrin MA, Lopez JJ, Giordano FJ, Shah PK, Willerson JT, Benza RL, Berman DS, Gibson CM, Bajamonde A, Rundle AC, Fine J, McCluskey ER. The VIVA trial: Vascular endothelial growth factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. *Circulation* 2003; 107:1359-1365.
- Henry TD, Grines CL, Watkins MW, Dib N, Barbeau G, Moreadith R, Andrasfay T, Engler RL. Effects of Ad5FGF-4 in patients with angina: an analysis of pooled data from the AGENT-3 and AGENT-4 trials. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50:1038-1046.
- Hertig AT. Angiogenesis in the early human chorion. *Contrib Embryol Carnegie Inst* 1935; 25:37-43.
- Hoey T, Weinzierl RO, Gill G, Chen JL, Dynlacht BD, Tjian R. Molecular cloning and functional analysis of *Drosophila* TAF110 reveal properties expected of coactivators. *Cell* 1993; 72:247-260.
- Huang LM, Joshi A, Willey R, Orenstein J, Jeang KT. Human immunodeficiency viruses regulated by alternative trans-activators: genetic evidence for a novel non-transcriptional function of Tat in virion infectivity. *EMBO J* 1994; 13:2886-2896.
- Huang X, Seifert U, Salzmann U, Henklein P, Preissner R, Henke W, Sijts AJ, Kloetzel PM, Dubiel W. The RTP site shared by the HIV-1 Tat protein and the 11S regulator subunit alpha is crucial for their effects on proteasome function including antigen processing. *J Mol Biol* 2002; 323:771-782.
- Ikeda E, Achen MG, Breier G, Risau W. Hypoxia-induced transcriptional activation and increased mRNA stability of vascular endothelial growth factor in C6 glioma cells. *J Biol Chem* 1995; 270:19761-19766.
- Imamura H, Takao S, Aikou T. A modified invasion-3-(4,5- dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay for quantitating tumor cell invasion. *Cancer Res* 1994; 54:3620-3624.
- Inyang AL, Tobelem G. Tissue-plasminogen activator stimulates endothelial cell migration in wound assays. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 171:1326-1332.

Literaturverzeichnis

- Ismail M, Henklein P, Huang X, Braumann C, Rückert RI, Dubiel W. Identification of HIV-1 Tat peptides for future therapeutic angiogenesis. *Eur J Haematol* 2006; 77:157-165.
- Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R, Blair R, Haley L, Asahara T, Rosenfield K, Razvi S, Walsh K, Symes JF. Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF₁₆₅ in patient with ischaemic limb. *Lancet* 1996; 348:370-374
- Isner JM, Baumgartner I, Rauh G, Schainfeld R, Blair R, Manor O, Razvi S, Symes JF. Treatment of thrombangiitis obliterans (Buerger's disease) by intramuscular gene transfer of vascular endothelial growth factor: Preliminary clinical results. *J Vasc Surg* 1998; 28:964-975
- Jariel-Encontre I, Pariat M, Martin F, Carillo S, Salvat C, Piechaczyk M. Ubiquitylation is not an absolute requirement for degradation of c-Jun protein by the 26 S proteasome. *J Biol Chem* 1995; 270:11623-11627.
- Jakobovits A, Smith DH, Jakobovits EB, Capon DJ. A discrete element 3' of human immunodeficiency virus 1 (HIV-1) and HIV-2 mRNA initiation sites mediates transcriptional activation by an HIV trans activator. *Mol Cell Biol* 1988; 8:2555-2561.
- Jeang KT, Gatignol A. Comparison of regulatory features among primate lentiviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 1994; 188:123-144.
- Kadonaga JT, Carner KR, Masiarz FR, Tjian R. Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell* 1987; 51:1079-1090.
- Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, Li T, Isner JM, Asahara T. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 3422-3427.
- Karin M, Liu Zg, Zandi E. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 1997; 9:240-246.
- Kloetzel PM. Antigen processing by the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2:179-187.
- Kloetzel PM. Generation of major histocompatibility complex class I antigens: functional interplay between proteasomes and TPPII. *Nat Immunol* 2004; 5:661-669.
- Kok TW, Yue PY, Mak NK, Fan TP, Liu L, Wong RN. The anti-angiogenic effect of sinomenine. *Angiogenesis* 2005; 8:3-12.
- Kopp F, Dahlmann B, Hendil KB. Evidence indicating that the human proteasome is a complex dimer. *J Mol Biol* 1993; 229:14-19.
- Korpisalo P, Hytönen JP, Laitinen JT, Laidinen S, Parviainen H, Karvinen H, Siponen J,

Literaturverzeichnis

- Marjomäki V, Vajanto I, Rissanen TT, Ylä-Herttua S. Capillary enlargement, not sprouting angiogenesis, determines beneficial therapeutic effects and side effects of angiogenic gene therapy. *Eur Heart J* 2011; 32:1664-72.
- Kumar R, Yoneda J, Bucana CD, Fidler IJ. Regulation of distinct steps of angiogenesis by different angiogenic molecules. *Int J Oncol* 1998; 12:749-757.
- Lafreniere JF, Mills P, Tremblay JP, El Fahime E. Growth factors improve the in vivo migration of human skeletal myoblasts by modulating their endogenous proteolytic activity. *Transplantation* 2004; 77:1741-1747.
- Leberherz C, von Degenfeld G, Karl A, Pfosser A, Raake P, Pachmayr F, Scholz D, Kupatt C, Boekstegers P. Therapeutic angiogenesis/arteriogenesis in the chronic ischemic rabbit hindlimb: effect of venous basic fibroblast growth factor retroinfusion. *Endothelium* 2003; 10:257-265.
- Lederman RJ, Mendelsohn FO, Anderson RD, Saucedo JF, Tenaglia AN, Hermiller JB, Hillegass WB, Rocha-Singh K, Moon TE, Whitehouse MJ, Annex BH. Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (the TRAFFIC study): a randomised trial. *Lancet* 2002; 359:2053-2058.
- Leung ZW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989; 246:1306-1309.
- Liekens S. The role of growth factors, angiogenic enzymes and apoptosis in neovascularization and tumor growth-collected publications. *Verh K Acad Geneesk Belg* 2002; 64:197-224.
- Liontas A, Yeger H. Curcumin and resveratrol induce apoptosis and nuclear translocation and activation of p53 in human neuroblastoma. *Anticancer Res* 2004; 24:987-998.
- Loskutoff DJ, Linders M, Keijer J, Veerman H, van Heerikhuizen H, Pannekoek H. Structure of the human plasminogen activator inhibitor 1 gene: nonrandom distribution of introns. *Biochemistry* 1987; 26:3763-3768.
- Loskutoff DJ, Curriden SA, Hu G, Deng G. Regulation of cell adhesion by PAI-1. *APMIS* 1999; 107:54-61.
- Losordo DW, Vale PR, Symes JF, Dunnington CH, Esakof DD, Maysky M, Ashare AB, Lathi K, Isner JM. Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation* 1998; 98: 2800-2804.
- Lupas J, Stock D, Jap B, Zwickl P, Baumeister W, Huber R. Structural features of 26S and 20S proteasomes. *Enzyme Protein* 1993; 47:252-273.

Literaturverzeichnis

- Lüdemann C, Lawall H, Liesenfeld B, Schmidt-Lucke J, Amann B. Stammzelltherapie der kritischen Extremitätenischämie: Halbzeitergebnisse der BONMOT-CLI-Studie. *Clin Res Cardiol* 2011; Suppl 1:100
- Luther M, Lepantalo M, Alback A, Matzke S. Amputation rates as a measure of vascular surgical results. *Br J Surg* 1996; 83:241-244.
- Luttun A, Carmeliet P. De novo vasculogenesis in the heart. *Cardiovasc Res* 2003; 58:378-89.
- McMahon GA, Petitslerc E, Stefansson S, Smith E, Wong MK, Westrick RJ, Ginsburg D, Brooks PC, Lawrence DA. Plasminogen activator inhibitor-1 regulates tumor growth and angiogenesis. *J Biol Chem* 2001; 276:33964-33968.
- Momburg F, Hammerling GJ. Generation and TAP-mediated transport of peptides for major histocompatibility complex class I molecules. *Adv Immunol* 1998; 68:191-256.
- Morales DE, McGowan KA, Grant DS, Maheshwari S, Bhartiya D, Cid MC, Kleinman HK, Schnaper HW. Estrogen promotes angiogenic activity in human umbilical vein endothelial cells in vitro and in a murine model. *Circulation* 1995; 91: 755-763.
- Nabel EG, Plautz G, Nabel GJ. Site-specific gene expression in vivo by direct gene transfer into arterial wall. *Science* 1990; 249:1285-1288.
- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999; 13:9-22.
- Neuveut C, Jeang KT. Recombinant human immunodeficiency virus type 1 genomes with tat unconstrained by overlapping reading frames reveal residues in Tat important for replication in tissue culture. *J Virol* 1996; 70:5572-5581.
- Nohara R, Kambara H, Murakami T, Kadota K, Tamaki S, Kawai C. Collateral function in early acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1983; 52:955-959.
- Okada SS, Grobmyer SR, Barnathan ES. Contrasting effects of plasminogen activators, urokinase receptor, and LDL receptor-related protein on smooth muscle cell migration and invasion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16:1269-1276.
- Orlic D, Hill JM, Arai AE. Stem cells for myocardial regeneration. *Circ Res* 2002; 91:1092-1102.
- Orlowski M. The multicatalytic proteinase complex (proteasome) and intracellular protein degradation: diverse functions of an intracellular particle. *J Lab Clin Med* 1993; 121:187-189.
- Orlowski M. The multicatalytic proteinase complex, a major extralysosomal proteolytic system. *Biochemistry* 1990; 29:10289-10297.
- Ossowski L, Aguirre-Ghiso JA. Urokinase receptor and integrin partnership: coordination of

Literaturverzeichnis

- signaling for cell adhesion, migration and growth. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12:613-620.
- Ouriel K, Donayre C, Shortell CK, Cimino C, Donnelly J, Oxley D, Green RM. The hemodynamics of thrombus formation in arteries. *J Vasc Surg.* 1991; 14:757-62.
- Ouriel K. Peripheral arterial disease. *Lancet* 2001; 358:1257-1264.
- Pal S, Claffey KP, Cohen HT, Mukhopadhyay D. Activation of Sp1-mediated vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor transcription requires specific interaction with protein kinase C zeta. *J Biol Chem* 1998; 273:26277-26280.
- Patan S, Haenni B, Burri PH. Implementation of intussusceptive microvascular growth in the chicken chorioallantoic membrane (CAM): 1. pillar formation by folding of the capillary wall. *Microvasc Res* 1996; 51:80-98.
- Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Vascular endothelial growth factor induces plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Com* 1991; 181:902-906.
- Pepper MS. Extracellular proteolysis and angiogenesis. *Thromb Haemost* 2001; 86:346-55.
- Pollmann C, Huang X, Mall J, Bech-Otschir D, Naumann M, Dubiel W. The constitutive photomorphogenesis 9 signalosome directs vascular endothelial growth factor production in tumor cells. *Cancer Res* 2001; 61:8416-8421.
- Preissner KT, Kanse SM, May AE. Urokinase receptor: a molecular organizer in cellular communication. *Curr Opin Cell Biol* 2000; 12:621- 628.
- Rana TM, Jeang KT. Biochemical and functional interactions between HIV-1 Tat protein and TAR RNA. *Arch Biochem Biophys* 1999; 365:175-185.
- Rånby M, Brändström A. Biological control of tissue plasminogen activator-mediated fibrinolysis. *Enzyme* 1988; 40:130-43.
- Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386:671-674.
- Rissanen TT, Vajanto I, Yla-Herttuala S. Gene therapy for therapeutic angiogenesis in critically ischaemic lower limb – on the way to the clinic. *Eur J Clin Invest* 2001; 31: 651-66.
- Rivett AJ. The multicatalytic proteinase. Multiple proteolytic activities. *J Biol Chem* 1989; 264:12215-12219.
- Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, Hwang D, Goldberg AL. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 1994; 78:761-771.
- Rohlf C, Ahmad S, Borellini F, Lei J, Glazer RI. Modulation of transcription factor Sp1 by

- cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 1997; 272:21137-21141.
- Rubartelli A, Poggi A, Sitia R, Zocchi MR. HIV-I Tat: a polypeptide for all seasons. *Immunol Today* 1998; 19:543-545.
- Ryu S, Zhou S, Ladurner AG, Tjian R. The transcriptional cofactor complex CRSP is required for activity of the enhancer-binding protein Sp1. *Nature* 1999; 397:446-450.
- Sato Y, Bifkin D. Autocrine activities of basic fibroblast growth factor: regulation of endothelial cell movement, plasminogen activator synthesis, and DANN synthesis. *J Cell Biol* 1988; 107:1199-1205.
- Schaper W and Ito WD: Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth. *Circulation Res* 1996; 79:911-919.
- Schaper W. On arteriogenesis - a reply. *Basic Res Cardiol* 2003; 98:183-184.
- Schaper W, Buschmann I. Arteriogenesis, the good and bad of it. *Eur Heart J* 1999; 20:1297-1299.
- Scharpfenecker M, van Dinther M, Liu Z, van Bezooijen RL, Zhao Q, Pukac L, Löwik CW, ten Dijke P. BMP-9 signals via ALK1 and inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and VEGF-stimulated angiogenesis. *J Cell Sci.* 2007; 120:964-72.
- Scheller B, Hehrlein C, Bocksch W, Rutsch W, Haghi D, Dietz U, Böhm M, Speck U. Treatment of coronary in-stent restenosis with a paclitaxel-coated balloon catheter. *N Engl J Med* 2006; 355:2113-2124.
- Scheidegger P, Weiglhofer W, Suarez S, Console S, Waltenberger J, Pepper MS, Jaussi R, Ballmer-Hofer K. Signalling properties of an HIV-encoded angiogenic peptide mimicking vascular endothelial growth factor activity. *Biochem J* 2001; 353:569-578.
- Schumacher B, Pecher P, von Specht BU, Stegmann T. Induction of neoangiogenesis in ischemic myocardium by human growth factors: first clinical results of a new treatment of coronary heart disease. *Circulation* 1998; 97: 645-650.
- Schwartz H, Leiboff RL, Katz RJ, Wasserman AG, Bren GB, Varghese PJ, Ross AM. Arteriographic predictors of spontaneous improvement in left ventricular function after myocardial infarction. *Circulation* 1985; 71:466-472.
- Seeger M, Ferrell K, Frank R, Dubiel W. HIV-1 tat inhibits the 20 S proteasome and its 11 S regulator-mediated activation. *J Biol Chem* 1997; 272:8145-8148.
- Shaulian E, Karin M. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene* 2001; 20:2390-2400.
- Shields JM, Yang VW. Two potent nuclear localization signals in the gut-enriched Krüppel-like factor define a subfamily of closely related Krüppel proteins. *J Biol Chem* 1997;

- 272:18504-18507.
- Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992; 359:843-845.
- Singh TM, Abe KY, Sasaki T, Zhuang YJ, Masuda H, Zarins CK. Basic fibroblast growth factor expression precedes flow-induced arterial enlargement. *J Surg Res* 1998; 77:165-173.
- Smith SK. Angiogenesis, vascular endothelial growth factor and the endometrium *Human Reproduction Update* 1998; 4:509-519.
- Song CZ, Keller K, Murata K, Asano H, Stamatoyannopoulos G., Functional interaction between coactivators CBP/p300, PCAF, and transcription factor FKLf2. *J Biol Chem* 2002; 277:7029-7036.
- Sprengers RW, Lips DJ, Moll FL, Verhaar MC. Progenitor cell therapy in patients with critical limb ischemia without surgical options. *Ann Surg* 2008; 247:411-420.
- Sprengers RW, Teraa M, Moll FL, de Wit GA, van der Graaf Y, Verhaar MC. Quality of life in patients with no-option critical limb ischemia underlines the need for new effective treatment. *J Vasc Surg* 2010; 52:843-849.
- Suzuki T, Kimura A, Nagai R, Horikoshi M. Regulation of interaction of the acetyltransferase region of p300 and the DNA-binding domain of Sp1 on and through DNA binding. *Genes Cells* 2000; 5:29-41.
- Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 1999; 5: 434-438.
- Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Kearney M, Pu LQ, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest* 1994; 93:662-670.
- Tang G, Hanna S, Wang R. Effect of nicotine on K channel currents in vascular smooth muscle cells from rat tail arteries. *Eur J Pharmacol* 1999; 364:247-254.
- Tepe G, Zeller T, Albrecht T, Heller S, Schwarzwälder U, Beregi JP, Claussen CD, Oldenburg A, Scheller B, Speck U. Local delivery of paclitaxel to inhibit restenosis during angioplasty of the leg. *N Engl J Med* 2008; 358:689-699.
- Torry DS and Torry RJ. Angiogenesis and the expression of vascular endothelial growth factor in endometrium and placenta. *Am J Reprod Immunol* 1997; 37:21-29.
- Vailhé B, Vittet D, Feige JJ. In vitro models of vasculogenesis and angiogenesis. *Lab Invest*

Literaturverzeichnis

- 2001; 81:439-452.
- Vale PR, Isner JM, Rosenfield K. Therapeutic angiogenesis in critical limb and myocardial ischemia. *J Interv Cardiol* 2001; 14:511-528.
- Vogten JM, Reijerkerk A, Meijers JC, Voest EE, Borel Rinkes IH, Gebbink MF. The role of the fibrinolytic system in corneal angiogenesis. *Angiogenesis* 2003; 6:311-316.
- Wiman B, Almquist A, Sigurdardottir O, Lindahl T. Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI) is bound to vitronectin in plasma. *FEBS Lett* 1988; 242:125-128.
- Yang H, Deschenes M, Ogilvie R, Terjung R. Basic fibroblast growth factor increases collateral blood flow in rats with femoral arterial ligation. *Circ Res* 1996; 79:62-69.
- Zhang G, Dass CR, Sumithran E, Di Girolamo N, Sun LQ, Khachigian LM. Effect of deoxyribozymes targeting c-Jun on solid tumor growth and angiogenesis in rodents. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96:683-696.

Anhang

Danksagung

Für den erfolgreichen Abschluß der vorliegenden Arbeit schulde ich vielen Menschen meinen herzlichen Dank.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Dubiel danke ich für die Möglichkeit, in seinem Labor meine Promotionsarbeit anfertigen zu dürfen. Er hat diese Arbeit mit seinen Ideen, seiner Geduld und Erfahrung und vielen fruchtbaren Diskussionen immer wieder vorangetrieben.

An dieser Stelle möchte ich Herrn PD Dr. med. Ralph I. Rückert danken, der mir viel Geduld und Vertrauen entgegengebracht und mich in schwierigen Situationen mit seiner Diskussionsbereitschaft und seinen wertvollen Ratschlägen zum Weitermachen motiviert hat. Weiterhin bedanke ich mich sehr bei Dawadschargal Bech-Otschir und Xiiaohua Huang für ihre Betreuung, ständige Diskussionsbereitschaft, zahlreichen Ideen und Motivation. Ich danke allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Dubiel für viele methodische Ratschläge und Hilfestellung bei der Durchführung von Experimenten. Ganz besonders danke ich natürlich meinen Eltern, die mir das Studium erst ermöglichten und mich jederzeit unterstützten, sowie meiner Frau Souzan, die meiner Arbeit viel Verständnis und Geduld entgegenbrachte.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationen

Ismail M, Braumann C, Rückert RI, Dubiel W, A possible therapy with HIV-1-Tat derived peptides for the treatment of unreconstructable end-stage vascular diseases. Langenbeck's Arch Chir Suppl I 2003; 120:551-552.

Ismail M, Rückert RI, Dubiel W, Identification of HIV-1 Tat peptides with pro-angiogenic effects for the treatment of end-stage vascular diseases. Acta Chir Belg 2003; 103:3-4

Ismail M, Rückert RI, Dubiel W, Angiogenese mit HIV-1-Tat-Peptiden: Grundlage der Behandlung chirurgisch nicht rekonstruierbarer peripherer arterieller Verschlusskrankheiten? MedReport 2003; 38:27

Ismail M, Henklein P, Huang X, Braumann C, Rückert RI, Dubiel W. Identification of HIV-1 Tat peptides for future therapeutic angiogenesis. Eur J Haematol 2006; 77(2):157-65.

Ismail M, Rückert JC, Rogala P, Sandrock D, Jacobi D, Müller JM, Thoracoscopic resection of mediastinal parathyroid glands with the DaVinci robotic system: The optimal surgical therapy. Surg Lap Endosc Percut Tech 2006; 16(4):299.

Ismail M, Swierzy M, Einhäupl KM, Rogalla P, Rückert RI, Rückert JC. Robotic-Assisted Thymectomy for Myasthenia Gravis. Ann Neurol 2008; 64:12 (4-64).

Ismail M, Maza S, Swierzy M, Tsilimparis N, Rogalla P, Sandrock D, Rückert RI, Müller JM, Rückert JC. Resection of ectopic mediastinal parathyroid glands with the da Vinci robotic system. Br J Surg 2010; 97(3):337-43.

Rückert JC, Swierzy M, **Ismail M**. Comparison of robotic and nonrobotic thoracoscopic thymectomy: a cohort study. J Thorac Cardiovasc Surg 2011; 141:673-7.

Rückert JC, **Ismail M**, Swierzy M, Sobel HK, Badakhshi H, Rogalla P, Rückert RI, Müller JM, Chirurgische Therapieverfahren bei Erkrankungen des Thymus. Viszeralchirurgie 2005; 635.

Rückert RI, Pirlich M, Rogalla P, **Ismail M**, Kasper A, Gerl H, Müller J, Endovascular therapy of non-aneurysmatic infrarenal aortic rupture. Zentralbl Chir 2006; 131:8-12.

Rückert JC, **Ismail M**, Swierzy M, Sobel HK, Jacobi CA, Rogalla P, Einhäupl KM, Müller JM. Results of Robotic-assisted Thoracoscopic Thymectomy. Surg Lap Endosc Percut Tech 2006; 16(4):295.

Rückert J, **Ismail M**, Robotic thymectomy for a mediastinal parathyroid gland. Int J Med Robot 2006; 2 (1):98-103.

Rückert JC, **Ismail M**, Neudecker J, Mall J, Rogalla P, Sandrock D, Braumann C, Jacobi CA, Müller JM, Complete Thoracoscopic Thymectomy With a Unilateral 3-Trocar Technique using the Da Vinci Robotic System. Surg Lap Endosc Percut Tech 2006; 16(4):288-289.

Braumann C, Jacobi CA, Menenakos Ch, **Ismail M**, Rückert JC, Müller JM, Computer-assisted surgery with the da Vinci system: Indications, advantages, limitations. A review. Hellenic Journal of Surgery 2006; 78 (4): 218-224.

Rückert RI, Pirlich M, Rogalla P, **Ismail M**, Müller JM. Successful endovascular treatment of infrarenal aortic rupture after chemotherapy of a mesenchymal periaortic tumor. Eur J Vasc Endovasc Surg 2007; 33(3):302-5.

Rückert JC, **Ismail M**, Swierzy M, Sobel HK, Braumann C, Jacobi CA, Rogalla P, Rückert RI, Egert M, Müller JM, Results of robotic-assisted thoracoscopic thymectomy. Surg Endosc 2007; 21: 1-106.

Braumann C, Hartmann J, Ordemann J, Menenakos Ch, **Ismail M**, Müller JM, Jacobi CA. Laparoscopic Treatment of Gastroesophageal Reflux Disease and Upside-Down Stomach with the Da Vinci System. Int J Med Robot 2007; 3 (2):164-180.

Rückert JC, **Ismail M**, Swierzy M, Sobel HK, Braumann C, Jacobi CA, Rogalla P, Einhäupl KM, Müller JM. The Advantage Of Robotic – Assisted Thymectomy. Int J Med Robot 2007; 3(2):178-180.

Anhang

Rückert JC, **Ismail M**, Swierzy M, Sobel H, Rogalla P, Meisel A, Wernecke KD, Rückert RI, Müller JM. Thoracoscopic thymectomy with the da Vinci robotic system for myasthenia gravis. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1132:329-35.

Rückert JC, **Ismail M**, Swierzy M, Braumann C, Badakhshi H, Rogalla P, Meisel A, Rückert RI, Müller JM. Minimally invasive thymus surgery. *Chirurg* 2008; 79(1):18, 20-5.

Braumann C, Jacobi CA, Menenakos C, **Ismail M**, Rückert JC, Müller JM. Robotic-assisted laparoscopic and thoracoscopic surgery with the da Vinci system: a 4-year experience in a single institution. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech* 2008; 18(3):260-6.

Hartmann J, Jacobi CA, Menenakos C, **Ismail M**, Braumann C. Surgical treatment of gastroesophageal reflux disease and upside-down stomach using the Da Vinci robotic system. A prospective study. *J Gastrointest Surg* 2008; 12(3):504-9.

Rückert JC, Swierzy M, **Ismail M**, Rogalla P, Meisel A, Rückert RI. Robotic-assisted thymectomy? Report of 134 patients. *Interact CardioVasc Thorac Surg* 2008; 7:147-200.

Ruckert JC, Swierzy M, **Ismail M**. Robotic assisted thymectomy: a 5 year experience, *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008; 136:1107-1109.

Swidsinski A, Doerffel Y, Loening-Baucke V, Theissig F, Rückert JC, **Ismail M**, Rau WA, Gaschler D, Weizenegger M, Kühn S, Schilling J, Doerffel WV. Acute appendicitis is characterized by local invasion with *Fusobacterium nucleatum/necrophorum*. *Gut*. 2009; Published Online: 18 Nov. 2009.

Tsilimparis N, Gregor JI, Swierzy M, **Ismail M**, Rogalla P, Weichert W, Rückert JC. Intrapericardial paraganglioma in a 78-year-old female patient. *Am Surg*. 2010 Apr;76:450-1.

de Bucourt M, Swierzy M, **Ismail M**, Gregor J, Webler M, Rückert JC. A novel sternal closure technique with implants suitable for complex dehiscences. *Surg Innov*. 2010 Dec;17:353-5. Epub 2010 Aug 10.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe, und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, 08.12.2011