

Technische Universität München

Fakultät für Medizin

Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie
der Technischen Universität München

**Modulation des NF- κ B-Systems in Anwesenheit der ITD-Mutation
oder nach Inkubation mit ozLDL**

Bianca Patrizia Preissler

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines **Doktors der Medizin** genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:.

1. Univ.-Prof. Dr. K. Brand
2. Univ.-Prof. Dr. K.-L. Laugwitz

Die Dissertation wurde am 28.03.2014 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 22.10.2014 angenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	5
1.1	Das NF- κ B-System.....	5
1.1.1	Aktivierung und Regulation des NF- κ B-Systems.....	7
1.1.2	Der TNF-Signalweg.....	10
1.1.3	Der LPS-Aktivierungsweg.....	11
1.1.4	NF- κ B-regulierte Gene und deren Funktion.....	12
1.1.5	Interaktion von NF- κ B mit den C/EBP-Proteinen.....	13
1.2	Der FLT3-Rezeptor und AML.....	15
1.2.1	Akute myeloische Leukämie.....	15
1.2.2	Der FLT3-Rezeptor und Leukämie.....	15
1.2.3	FLT3-WT und seine Signalkaskade.....	17
1.2.4	FLT3-ITD und seine Signalkaskade.....	19
1.2.5	NF- κ B-Aktivierung durch FLT3 über AKT.....	19
1.3	Ozon.....	20
1.3.1	Ozon in der Medizin.....	20
1.3.2	Ozon und sein Einfluss auf die NF- κ B-Signalübertragung.....	20
1.3.3	Ozon als Produkt im Organismus.....	21
1.4	Arteriosklerose.....	22
1.4.1	Definition, Ätiologie und Epidemiologie.....	22
1.4.2	Die Pathogenese der Arteriosklerose – Schaumzellbildung und modifizierte Lipoproteine.....	23
1.4.3	Die Rolle von NF- κ B bei Arteriosklerose.....	24
1.4.4	Ozon – allgemeine Grundlagen.....	25
1.4.5	Ozon und Arteriosklerose.....	25
1.5	Fragestellung.....	26
1.5.1	NF- κ B und C/EBP β in FLT3-positiven Zellen.....	26
1.5.2	Ozon und NF- κ B.....	26
2	Material und Methoden.....	27
2.1	Material.....	27
2.1.1	Antikörper.....	27
2.1.2	Reagenzien.....	27

2.2	Methoden.....	28
2.2.1	Zellkultur.....	28
2.2.2	Ozonierung von PBS.....	29
2.2.3	Ozonierung von Lipoproteinen.....	30
2.2.4	Lipidextraktion.....	30
2.2.5	Zellvitalitätstest.....	31
2.2.6	Isolierung zytosolischer und nukleärer Extrakte.....	31
2.2.7	Western Blot-Analyse.....	32
2.2.8	Gelretardierungsassay.....	33
2.2.9	Supershift-Analyse und Kompetitionsstudien.....	33
2.2.10	Endotoxin-Test.....	34
2.2.11	Statistische Auswertung.....	34
3	Ergebnisse.....	35
3.1	Charakterisierung des NF- κ B-Systems in FLT3-ITD-positiven 32D-Zellen.....	35
3.1.1	NF- κ B-Aktivität in FLT3-WT- und FLT3-ITD-positiven 32D-Zellen.....	35
3.1.2	Charakterisierung der Untereinheiten des durch FLT3-ITD aktivierten NF- κ B.....	36
3.1.3	Bestimmung der p50- und p65-Konzentration in FLT3-WT- bzw. FLT3-ITD-positiven 32D-Zellen.....	38
3.1.4	Bestimmung der Konzentrationen von I κ B α und I κ B β in FLT3-WT- und FLT3-ITD-positiven 32D-Zellen.....	40
3.1.5	Stimulation von FLT3-WT-Zellen mit IL-3.....	42
3.1.6	Bestimmung der Konzentration von C/EBP β in 32D-Zellen.....	43
3.2	Modulation von NF- κ B durch ozonierte Lipoproteine.....	44
3.2.1	TBARS-Messung von ozLDL.....	44
3.2.2	Abnahme der Cholesterinkonzentration in ozLDL.....	45
3.2.3	Hemmung der LPS-induzierten Aktivierung von NF- κ B durch ozLDL.....	46
3.2.4	Fehlende Toxizität von ozLDL.....	47
3.2.5	OzLDL zeigt nur einen geringen Effekt auf die Zellvitalität.....	48
3.2.6	Abnahme der NF- κ B-Hemmung im zeitlichen Verlauf.....	50
3.2.7	Hemmung der LPS-induzierten Aktivierung von NF- κ B durch ozLDL in verschiedenen Zelllinien.....	52

3.2.8	Die NF- κ B-Aktivität wird nicht durch Ozon oder Lipoproteine alleine gehemmt.....	53
4	Diskussion.....	54
4.1	NF- κ B und FLT3.....	54
4.1.1	Die NF- κ B-Aktivierung durch FLT3-ITD.....	54
4.1.2	Die NF- κ B-Untereinheiten.....	56
4.1.3	Nachweis von p50 und p65.....	57
4.1.4	Nachweis von I κ B α und I κ B β	57
4.1.5	IL-3 und FLT3-WT-positive 32D-Zellen.....	58
4.1.6	C/EBP β und NF- κ B.....	58
4.1.7	Klinisch-therapeutische Relevanz von FLT3.....	59
4.2	NF- κ B und ozonierte Lipoproteine.....	60
4.2.1	TBARS.....	61
4.2.2	Charakterisierung von ozLDL.....	62
4.2.3	Hemmung der NF- κ B Aktivierung durch ozLDL.....	62
4.2.4	Toxizitätstests.....	62
4.2.5	Die NF- κ B-Hemmung im zeitlichen Verlauf.....	63
4.2.6	Reproduzierbarkeit des Effekts in verschiedenen Zellen.....	63
4.2.7	Ausblick.....	64
5	Zusammenfassung.....	65
6	Literaturverzeichniss.....	67
7	Anhang.....	86
7.1	Abkürzungen.....	86
7.2	Publikation.....	91
7.3	Lebenslauf	92
7.4	Danksagung.....	93

1. Einleitung

1.1 Das NF- κ B-System

Bei der Nuklearfaktor- κ B (NF- κ B)/Rel-Familie handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, die zentral an der Regulation zahlreicher Gene bei entzündlichen sowie immunologischen Prozessen beteiligt sind und außerdem eine wichtige Rolle bei Proliferation, Differenzierung und Apoptose spielen [10, 11, 32, 62, 93, 206, 207]. Sowohl bei akut als auch bei chronisch entzündlichen Prozessen, sowie bei malignen Erkrankungen wird eine Dysregulation des NF- κ B-Systems diskutiert [13, 18, 31, 65, 181, 206, 207].

Zwei Untereinheiten bilden als Homo- oder Heterodimer das regulatorische NF- κ B-Protein [11, 14, 127, 166]. Dabei handelt es sich am Häufigsten um einen Komplex aus p50 und p65 (RelA), an deren Stelle auch c-Rel, p52 oder RelB sowie die Vorläuferproteine p105 (p50) und p100 (p52) treten können [10, 11, 14, 70, 127, 166]. Gemeinsam haben diese NF- κ B/Rel-Proteine alle eine C-terminale sogenannte Rel-Homologie-Domäne (RHD, ca 300 Aminosäuren). Diese besteht aus einem Helix-Loop-Helix (HLH)-Motiv, das die DNA-Bindung ermöglicht, einer Dimerisierungsdomäne und einer Sequenz, die für den Transport der Proteine in den Zellkern („nuclear localization sequence“, NLS) verantwortlich ist [127, 143, 166]. Diese NLS wird im Zytosol unstimulierter Zellen durch inhibitorische Proteine, unter anderem I κ B α , β und ϵ maskiert [10, 184, 185, 202]. Über einen zentralen Abschnitt aus mindestens sechs Ankyrin-Motiven („ankyrin repeat domain“, ARD), der für alle Inhibitorproteine charakteristisch ist, binden diese an die NLS sowie einen C-terminal davon gelegenen Bereich der RHD und verhindern so die nukleäre Translokation der NF- κ B-Proteine [11, 14, 127, 143]. Bei einigen NF- κ B-Untereinheiten wie z.B. p65 trägt außerdem eine sogenannte NF- κ B/Rel/dorsal (NRD)-Domäne in der N-terminalen Region ihrer RHD zur Interaktion mit den I κ B-Proteinen bei [11, 143]. Die Vorläuferproteine p105 (I κ B γ) und p100 (I κ B δ) verfügen neben einer RHD auch über eine C-terminale inhibitorische ARD. Die Existenz dieser beiden strukturellen Motive erklärt die duale Funktion dieser Moleküle als NF- κ B-Proteine einerseits und als Inhibitoren andererseits [11, 127, 166].

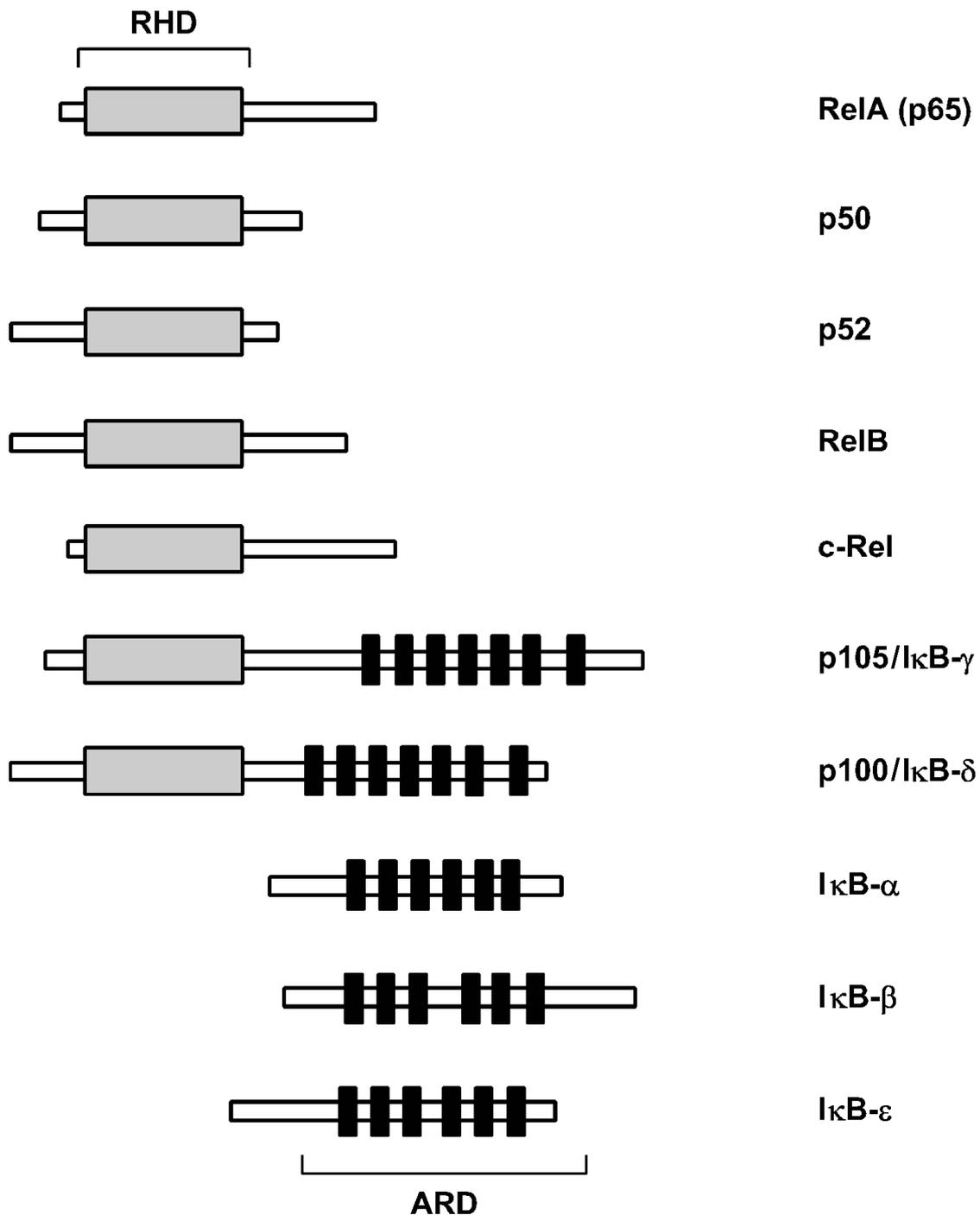


Abbildung 1: Wichtige Regionen der NF-κB/Rel-Familie und deren Inhibitorproteine. Den NF-κB Dimeren ist eine Rel-Homologie-Domäne (RHD) gemein, deren Bestandteile für die Dimerisierung, die DNA-Bindung, die nukleäre Translokation und die IκB-Bindung notwendig ist. Die IκB Proteine haben eine charakteristische Domäne („ankyrin repeat domain“, ARD), die essentiell für die Bindung an NF-κB und für die Maskierung der nukleären Lokalisationsdomäne (NLS) ist. Die Vorläuferproteine p100 und p105 besitzen eine RHD und eine ARD.

1.1.1 Aktivierung und Regulation des NF- κ B-Systems

Eine große Zahl an Stimuli (insgesamt mehr als 150) kann die NF- κ B-Komplexe aktivieren [11, 14, 140, 166]. Zu diesen gehören neben proinflammatorischen Zytokinen wie TNF (Tumornekrosefaktor) oder IL-1 (Interleukin-1) auch Bakterien und bakterielle Proteine (v.a. Lipopolysaccharid, LPS), Viren und virale Produkte, Wachstumsfaktoren sowie verschiedene Formen von zellulärem Stress [11, 14, 70, 166].

Zunächst induzieren diese Stimuli die Phosphorylierung der inhibitorischen I κ B-Proteine an spezifischen Serinresten in ihrem N-Terminus, worauf eine Ubiquitinmarkierung an spezifischen Lysinresten folgt [10, 70, 184]. Anschließend werden die Inhibitorproteine Proteasom-vermittelt proteolysiert [92, 184]. Da nun die NLS der NF- κ B-Transkriptionsfaktoren frei vorliegt, kommt es zur nukleären Translokation des Dimers [11, 70, 92, 184].

Im Nukleus steuert der Transkriptionsfaktor seinerseits die spezifische Expression von über 150 Genen [10, 11, 14, 92, 127, 140], indem er im Zellkern an regulatorische κ B-Promotor- und Enhancer-Elemente bindet. Die Gene kodieren unter anderem für Zytokine (z.B. TNF, IL-1, IL-6), Chemokine (z.B. IL-8; MCP-1, „monocyte chemotactic protein-1“), Zelladhäsionsmoleküle (z.B. ICAM-1, „intercellular adhesion molecule-1“; VCAM-1, „vascular cell adhesion molecule-1“), Wachstumsfaktoren (z.B. G/M-CSF, granulocyte-macrophage colony stimulating factor) sowie Akute-Phase-Proteine (z.B. Angiotensinogen, Serum-Amyloid-A-Precursor) [11, 14, 70, 140]. So induziert NF- κ B die Produktion einiger seiner eigenen Aktivatoren, wie etwa TNF oder IL-1 [140]. Außerdem kontrolliert NF- κ B auch die Transkription des Inhibitorproteins I κ B α , woraus eine strenge Autoregulation des Systems resultiert [11, 62, 127, 140].

Der sogenannte I κ B-Kinase-Komplex (IKK) ist für den initialen Schritt der Aktivierung von NF- κ B, die Serinphosphorylierung der I κ B-Proteine verantwortlich. Dieser hochmolekulare, zytosolische Komplex (ca. 300-900 kDa) setzt sich in seiner „klassischen“ Form aus den kinaseaktiven Molekülen IKK α (85 kDa) und IKK β (87 kDa) zusammen, die Homo- oder Heterodimere bilden, sowie dem Adapterprotein IKK γ (50 und 52 kDa) [87, 92, 160]. IKK α und IKK β , deren Primärstruktur sehr ähnlich ist, verfügen über eine N-terminale Kinase-Domäne (KD) sowie eine Leucin-Zipper (LZ)-ähnliche Struktur, die für ihre Dimerisierung notwendig ist. Die Bindung des Adapterproteins IKK γ erfolgt über ein C-terminales HLH-Motiv, das zudem die Aktivität der KD moduliert [171, 204, 211].

IKK β scheint laut mehrerer Untersuchungen für die Aktivierung wie auch für die anschließende Inaktivierung des IKK-Komplexes essentiell zu sein [54, 92]. Über die Bedeutung von IKK α ist bisher noch weniger bekannt, doch es soll an spezifischen

Signalwegen, wie z.B. an der B-Zellreifung sowie der Proliferation, beziehungsweise Differenzierung insbesondere der Keratinozyten, beteiligt sein [49, 85, 87, 163]. Einigen Studien zufolge könnte IKK α möglicherweise an IKK β gebunden von demselben phosphoryliert werden und damit zur Einleitung der I κ B-Degradierung durch den IKK-Komplex oder zur Erhöhung der transkriptionellen Aktivität verschiedener NF- κ B-Proteine durch Phosphorylierung beitragen [119, 167]. Das Adapterprotein IKK γ wird als regulatorische Komponente im IKK-Komplex angesehen [61, 92, 156, 160].

Mechanismen, die die transkriptionelle Aktivität, beziehungsweise die DNA-Bindungsfähigkeit von NF- κ B auf (prä-)transkriptioneller Ebene modulieren, sind bisher nur teilweise charakterisiert. Dazu gehört insbesondere die Phosphorylierung der Untereinheiten (p65, c-Rel, p50) des Dimers [14, 61, 206]. So führt die durch TNF oder IL-1 induzierte Aktivierung von IKK α und IKK β neben der Degradierung von I κ B auch zu einer Phosphorylierung von p65 an verschiedenen Serinresten [119, 159, 195, 196]. An der Übertragung der Phosphatreste sind laut Studien unter anderem die Kinasen PI3K (Phosphatidylinositol 3'-Kinase) und AKT/PKB (Proteinkinase B) [119, 167] sowie (nach Stimulation mit TNF) auch CKII (Caseinkinase II) [196] beteiligt. Außerdem wird p65 unter Einfluss von TNF von PKAc („cyclic AMP-dependent protein kinase A“) [219], MSK1 („mitogen- and stressactivated kinase 1“) [193] und PKC ζ (Proteinkinase C ζ) [51] phosphoryliert, wodurch sich jeweils eine stabile Interaktion von p65 mit dem Koaktivator CBP (CREB-bindendes Protein)/p300 ausbilden kann, welche die transkriptionelle Aktivität von NF- κ B moduliert [51, 219]. Neben Histon-Acetylasen wie CBP/p300 [164] können durch die p65-Phosphorylierung aber auch Histon-Deacetylasen als Korepressoren an nukleäres NF- κ B rekrutiert werden [8]. Für die positive oder negative Regulation der NF- κ B-abhängigen Genexpression sind diese posttranskriptionellen Modifikationen also von entscheidender Bedeutung. Variable Kombinationen der einzelnen NF- κ B-Untereinheiten, geringe Unterschiede in den κ B-Bindungssequenzen der DNA sowie die Kooperation mit anderen Transkriptionsfaktoren haben ebenfalls Auswirkungen auf die differentielle Regulierung der Expression der einzelnen NF- κ B-abhängigen Gene [10, 14, 127, 173, 174, 197, 206].

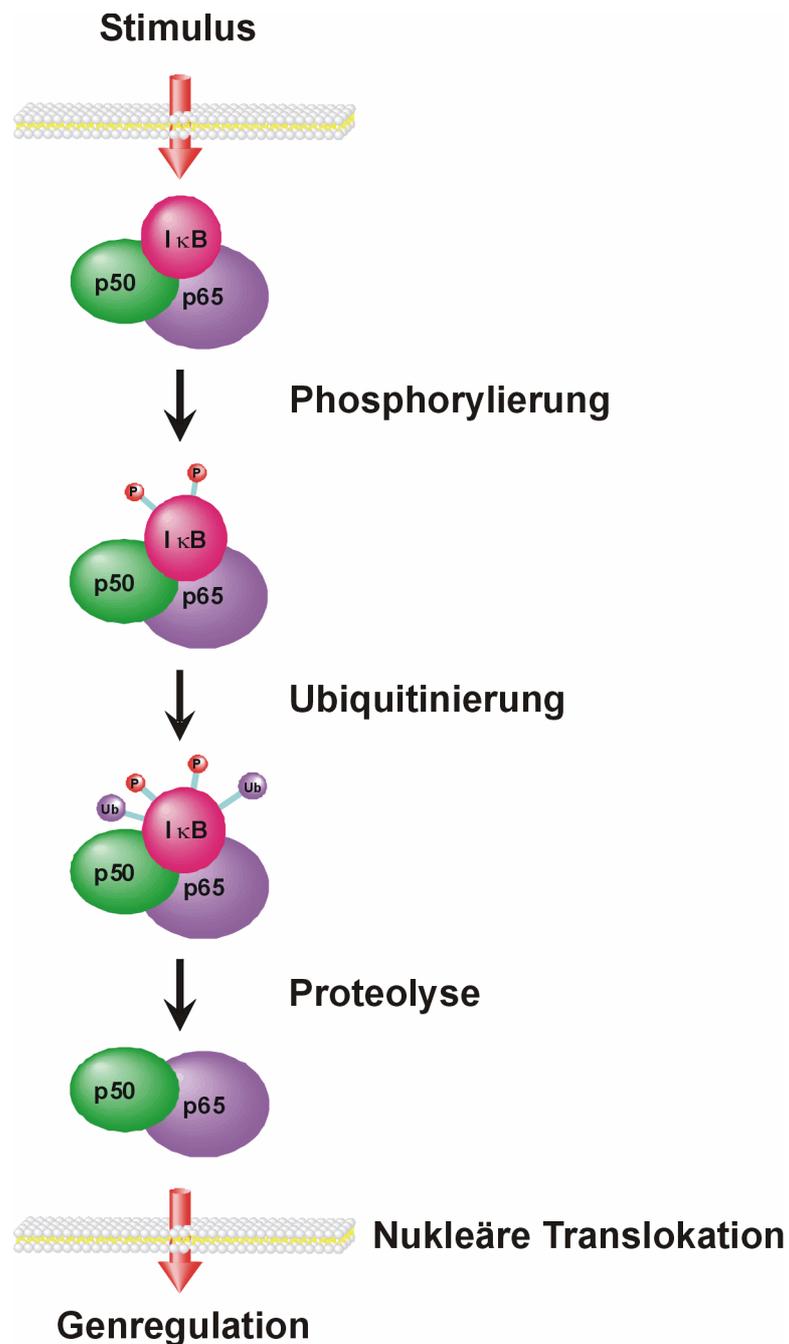


Abbildung 2: Die Aktivierung von NF- κ B. Durch eine Stimulierung der Zelle kommt es zur Phosphorylierung und Ubiquitinmarkierung von I κ B. Dieser Vorgang ist das Signal zur Proteolyse der I κ B-Proteine. Der nun vom Inhibitor befreite und damit aktivierte NF- κ B-Komplex kann nun in den Zellkern übertreten, um dort an regulatorische κ B-Promoter- und Enhancer-Elemente verschiedener Zielgene zu binden und so deren Transkription zu beeinflussen.

1.1.2 Der TNF-Signalweg

Verschiedene Zelltypen und einige Tumore sind in der Lage das Zytokin TNF (TNF α) zu bilden. Es dient als Mediator bei entzündlichen, immunologischen und malignen Vorgängen [15, 19]. TNF ist entscheidend an fundamentalen zellulären Abläufen wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose beteiligt [19]. Eine Dysregulation der TNF-vermittelten Signalübertragung ist bei zahlreichen Erkrankungen wie Sepsis und septischem Schock, rheumatoider Arthritis, chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und bei malignen Prozessen bedeutend [15, 84].

Durch Stimulation einer Zelle mit TNF wird die Aktivierung der proinflammatorischen Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 („activator protein-1“) induziert [18, 19]. Das Zytokin kann über eine Caspase-Kaskade auch apoptoseassoziierte Prozesse fördern [19, 93]. Die Bindung von TNF an zwei unterschiedliche Rezeptoren, TNF-RI (p55) und TNF-RII (p75), leitet die TNF-induzierten Signalwege ein. Es kommt jeweils zu einer Trimerisierung der Rezeptoren. Dadurch wird die Anlagerung mehrerer Signalproteine an die zytoplasmatische Domäne der Rezeptoren möglich. Zunächst bindet TRADD („TNF-RI-associated death domain protein“) an TNF-RI und interagiert mit mindestens drei weiteren Molekülen: RIP1 („receptor-interacting protein 1“), FADD („Fas-associated death domain protein“), das über Caspase 8 und weitere Caspasen zur TNF-vermittelten Apoptose führt, sowie TRAF2 („TNF-R-associated factor 2“) [19, 149]. Eine Belegung des TNF-RII mit TNF resultiert in einer direkten Bindung von TRAF2 an den Rezeptor, was seinerseits TRAF1 anlagert [154, 155]. Demnach spielt TRAF2 für beide Rezeptoren eine zentrale Rolle in den frühen Mechanismen der Signalübertragung, die zu einer Aktivierung des IKK-Komplexes und der MAP-Kinasen wie JNK oder p38 führen und den darauf folgenden Aktivierungen von NF- κ B bzw. AP-1 [19, 92].

Für die IKK-Aktivierung durch TNF-RI sind sowohl TRAF2 als auch RIP erforderlich, wobei TRAF2 den IKK-Komplex rekrutiert während RIP durch eine nicht-enzymatische Interaktion mit IKK γ zur IKK-Aktivierung führt [215]. Weitere Studien weisen auf eine Rolle von MEKK-3 („mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase-3“) [208], CDC37 („cell division cycle 37 homolog“), Hsp90 („Hitzeschockprotein 90“) [42], Sphingomyelinasen sowie aPKC („atypische Proteinkinase C“) [19, 97] bei der Aktivierung von NF- κ B durch TNF hin.

TNF α kann auch die Apoptose einleiten, wie bereits oben erwähnt [19]. Die Stimulation durch TNF führt über TRADD und FADD zur Aktivierung von Caspase 8. Im Anschluss aktiviert die durch TNF α induzierte Caspase 8 das Bid („BH3 interacting domain death

agonist“)-Protein oder die Caspase 3, die zahlreiche Proteine spaltet und dadurch den Zelltod induziert [149].

1.1.3 Der LPS-Aktivierungsweg

Wichtige Bestandteile der äußeren Membran gramnegativer Bakterien sind Lipopolysaccharide [146]. Auf das Immunsystem wirken sie als Antigene und ihre Identifizierung führt z.B. in Monozyten/Makrophagen zur Synthese von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF α und IL-1 β [146]. Ihre Struktur ermöglicht außerdem eine serologische Charakterisierung [146]. LPS besteht aus drei Teilen: 1) Lipid A (Endotoxin), 2) Kernregion, 3) Polysaccharidketten. Die meisten Lipid A-Moleküle werden in Konzentrationen im pM-Bereich durch den TLR („toll-like receptor“) 4 detektiert, der eine wichtige Rolle im angeborenen Abwehrsystem spielt [146]. Das Akute-Phase-Protein LBP („LPS-binding protein“) erkennt in der Blutbahn das LPS und bildet mit dem Lipid A-Rest (in Form von frei zirkulierenden oder noch in der Bakterienmembran eingebetteten Molekülen) stabile Komplexe [141]. Die Funktion von LBP liegt in der Beschleunigung der Bindung von LPS an CD14 [55]. CD14 besitzt weder eine Transmembran- noch eine zytoplasmatische Domäne. Bei der Präsentation von LPS an dem TLR4/MD2 („myeloid differentiation protein 2“)-Komplex scheint dieses Molekül eine wichtige Rolle zu spielen. MD2 wirkt als extrazelluläres Adapterprotein, bindet LPS und leitet durch die Bindung an extrazelluläre Leucin-reiche Regionen („leucine-rich-repeats“) von TLR4 die Signalübertragung ein. Zusätzlich besitzt das Glykoprotein TLR4 eine zytoplasmatische Domäne, die so genannte Toll/IL-1R (TIR)-Domäne. Vier Adaptermoleküle mit TIR-Domäne sind bis heute bekannt, die für die TLR4-Signalübertragung verantwortlich sind: MyD („myeloid differentiation factor“) 88, Mal („MyD88 adapter-like“) bzw. TIRAP („TIR-domain-containing adapter protein“), TRIF („TIR-domain-containing adapter inducing interferon β “) bzw. TICAM1 („TIR-domain-containing adapter molecule 1“) und TRAM („TRIF-related adapter molecule“) bzw. TIRP („TIR-containing protein“) genannt [55].

Mehrere Signalwege wurden bisher identifiziert, die zu einer MyD88-abhängigen bzw. zu einer zeitlich verzögerten MyD88-unabhängigen Antwort führen [141]. Der erste und schnellere Weg erfolgt über eine Homodimerisierung von TLR4, was zur Rekrutierung von MyD88 führt. Dieses Protein besteht aus einer TIR-Domäne, die durch eine kurze Sequenz mit einer N-terminalen DD („death domain“)-Region verbunden ist. Außerdem ist MyD88 in der Lage Homo- oder Heterodimere mit anderen TIR-Domäne-Adaptermolekülen wie Mal

[141] zu bilden. Die folgende Assoziation von MyD88 mit Proteinen der IL-1-Rezeptor-assoziierten Kinasen (IRAK)-Familie erfolgt über DD/DD-Interaktionen [55]. Die IRAK-Proteine sind eine Familie bestehend aus vier Mitgliedern: IRAK-1, IRAK-2, IRAK-4 und IRAK-M, denen eine N-terminale DD- und eine zentrale Serin/Threonin-Kinase-Domäne gemein sind [3]. Die Assoziation von IRAK-4 führt somit zu einer ersten Phosphorylierung von IRAK-1, worauf eine Autophosphorylierung dieses Proteins folgt. Anschließend dissoziieren das hyperphosphorylierte IRAK-1 und das daran gebundene TRAF6 („TNF receptor-associated factor 6“) vom Rezeptorkomplex und assoziieren an der Membran mit TAB2 („TAK1 binding protein 2“), welches seinerseits die MAPK („mitogen-activated protein kinase“-Kinase TAK1 („transforming growth factor- β -activated kinase 1“) aktiviert. Nun wird IRAK-1, möglicherweise durch einen Ubiquitin-abhängigen Mechanismus, an der Membran abgebaut [88, 110, 141]. TAK1, das konstitutiv an das Adapterprotein TAB1 gebunden ist, fungiert dann als Aktivator der NF- κ B-, p38- und JNK (c-Jun N-terminal kinase)-Signalwege [141]. Jetzt erfolgt die Aktivierung von NF- κ B über den IKK-Komplex wie oben beschrieben.

Der MyD88-unabhängige, langsamere Signalweg führt über den Rezeptorkomplex TLR4/TRAM/TRIF. Während TRAM nur ein Verbindungsprotein ist, bindet TRIF an TRAF6 über verschiedene N-terminale TRAF6-Bindungsdomänen [141]. Die Weiterführung des Signals verläuft nun wie im MyD88-abhängigen Weg über den IKK-Komplex bis zur Aktivierung von NF- κ B.

1.1.4 NF- κ B-regulierte Gene und deren Funktion

Die Expression vieler verschiedener Gene wird durch NF- κ B reguliert. Dabei handelt es sich hauptsächlich um Gene, die sowohl an entzündlichen und immunologischen Prozessen (TNF, IL-1, IL-6) als auch an Vorgängen der Zellproliferation (z.B. G/M-CSF, „granulocyte/macrophage-colony stimulating factor“ und c-myc) beteiligt sind [14, 61, 184, 206]. Außerdem spielen die NF- κ B-Zielgene eine Rolle bei Chemotaxis (z.B. IL-8; MCP1, „monocyte chemotactic protein 1“), Adhäsionsvorgängen (z.B. ICAM1, „intercellular adhesion molecule 1“, VCAM1, „vascular cell adhesion molecule 1“, ELAM, „endothelial-leucocyte adhesion molecule“) und der Thrombogenese (z.B. Tissue-Faktor) [16, 23, 28, 47, 58, 59, 112, 140, 203]. Auch bei apoptotischen Vorgängen wird NF- κ B eine entscheidende Rolle zugeschrieben. Die antiapoptotische Wirkung von NF- κ B beruht dabei einerseits auf einer Induktion antiapoptotischer Gene (z.B. Mangan-Superoxid-Dismutase, Zinkfinger-

protein A20, die Bcl-2-Homologen A1/Bfl-1, IAP- und TRAF-verwandte Moleküle) und andererseits auf einem Antagonismus der Caspase 8-Aktivität und p53-Funktion [12, 17, 128].

1.1.5 Interaktion von NF- κ B mit den C/EBP-Proteinen

Die NF- κ B-Proteine agieren bei der Steuerung der Expression verschiedener Gene zusammen mit einem dichten Netzwerk anderer Transkriptionsfaktoren, wie z.B. C/EBP („CCAAT/enhancer-binding protein“), AP-1, Sp-1 oder Oct-1 [127, 173, 174, 197, 205]. N-terminal besitzen die Proteine der C/EBP-Familie eine Transaktivierungsdomäne und am homologen C-Terminus charakterisiert sie eine basische DNA-Bindungsdomäne sowie ein Leucin-Zipper-Motiv, weshalb sie als bZIP-Proteine bezeichnet werden [100, 147, 197]. Mittels der LZ-Struktur können die C/EBP-Moleküle Homo- und Heterodimere bilden [101, 147, 197]. Dabei sind sowohl zwischen verschiedenen C/EBP-Proteinen als auch mit Transkriptionsfaktoren anderer Familien Assoziationen möglich, z.B. mit NF- κ B, AP-1, CREB oder STAT („signal transducer and activator of transcription protein“) [2, 147, 197]. Die C/EBP-Proteine spielen eine wichtige Rolle im Metabolismus und bei der Differenzierung insbesondere von Adipozyten, Hepatozyten und myelomonozytären Zellen [4, 147, 197].

C/EBP β hemmt die Proliferation von monozytären Zellen, indem es den Retinoblastom/E2F/Cyclin E Signalweg angreift. Dadurch ist es nicht direkt für die Morphologie von Makrophagen verantwortlich, aber an deren Differenzierung beteiligt [76].

Im Rahmen von inflammatorischen und immunologischen Prozessen ist C/EBP β (NF-IL6) für die Regulation zahlreicher Gene verantwortlich [147, 197]. Es induziert z.B. die Produktion von Zytokinen wie IL-1, IL-6, IL-8 oder TNF sowie von Akute-Phase-Proteinen, unter anderem Serum-Amyloid A, Komplement C3 und CRP (C-reaktives Protein), während gleichzeitig die Expression anderer Gene wie Angiotensinogen oder ICAM-1 und einiger viraler Gene, z.B. HPV („human papillomavirus“)-16 oder HPV-18, vermindert wird [2, 20, 99, 147].

Aufgrund seiner unterschiedlichen Funktionen unterliegt C/EBP β einer komplexen und teilweise noch ungeklärten Regulation. In unstimulierten Zellen maskieren negativ regulatorische intramolekulare Regionen die N-terminale Transaktivierungsdomäne, sodass das Protein in transkriptionell inaktiver Form existiert [96, 190]. Zum einen wird C/EBP β in vielen Geweben wie vor allem Leber, Intestinaltrakt, Lunge und Fettgewebe konstitutiv

exprimiert [147, 197], zum anderen können proinflammatorische Zytokine wie IL-1, IL-6 und TNF, LPS sowie Glucagon und Dexamethason über die Induktion der mRNA die de novo-Synthese von C/EBP β steigern [4, 68, 126]. Insbesondere posttranskriptionelle Mechanismen – in erster Linie Phosphorylierungsreaktionen – nehmen jedoch eine Schlüsselstellung bei der Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors ein [2, 147]. Eine Phosphorylierung von C/EBP β ist laut zweier Studien durch eine cAMP-abhängige PKA nach Behandlung von PC12-Zellen mit Forskolin ebenso wie von Kolorektalkarzinomzellen mit Antioxidantien eine essentielle Voraussetzung für die nukleäre Translokation des Transkriptionsfaktors [43, 129]. In myelomonozytären bzw. in transformierten Hepatozyten induzieren LPS und TNF gleichfalls eine schnelle Umverteilung von C/EBP β in den Zellkern [94, 209]. Außerdem wurde auch eine TNF-vermittelte Phosphorylierungsreaktion beschrieben, die in Maushepatozyten den nukleären Export von C/EBP β fördert [35]. Ferner konnte gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung im Bereich der basischen Region durch PKA oder PKC die DNA-Bindung des Transkriptionsfaktors bei Durchführung von Gelretardierungsassays behindert [120, 187]. Nach Stimulation von Rattenhepatozyten mit EGF („epidermal growth factor“) fand eine weitere Untersuchung mit derselben Methode ebenfalls eine Reduktion der DNA-Bindung von C/EBP β , während TGF β („transforming growth factor β “) diese inhibitorische Wirkung antagonisieren und die DNA-Bindungsaffinität erhöhen konnte [148]. Schließlich wird die Maskierung der Transaktivierungsdomäne von *ras*-abhängigen MAP-Kinasen durch Phosphorylierung der inhibitorischen Region aufgehoben und C/EBP β so in seinen transkriptionel aktiven Zustand überführt [134, 190]. Das Transaktivierungspotential wird ebenso durch eine Phosphorylierung der Aktivierungsdomäne durch PKC nach Stimulation mit LPS oder proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1, IL-6 und TNF [186] sowie durch eine Phosphorylierung des Leucin-Zippers durch eine Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Proteinkinase gesteigert [198]. Außerdem wurde beschrieben, dass C/EBP β mit dem Koaktivator CBP/p300 assoziiert [131]. Durch Phosphorylierung kann Insulin diese Interaktion der Koaktivatoren über PKB bzw. PI3K verhindern und so die transkriptionelle Aktivität von C/EBP β negativ regulieren [75]. Die Existenz dieser zahlreichen Regulationsmechanismen erlaubt in Abhängigkeit von Stimulus, Zelltyp und Spezies eine variierende Modulation der C/EBP β -induzierten Genexpression [147, 190].

C/EBP β und NF- κ B sind an der Regulation von Genen, welche eine wichtige Rolle bei Entzündung, Immunität und malignen Prozessen spielen beteiligt. Dabei reguliert C/EBP β die NF- κ B-Signalkaskade, indem es das Level von I κ B- α reduziert [39].

1.2 Der FLT3-Rezeptor und AML

1.2.1 Akute myeloische Leukämie

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine heterogene Gruppe maligner hämatopoetischer Störungen, die charakterisiert werden durch unkontrollierte Proliferation klonaler neoplastischer Zellen und Akkumulation von unvollständig differenzierten Blasten im Knochenmark, die verschiedene Reifestufen aufweisen und nicht den natürlichen Zelltod sterben [52, 124]. AML macht etwa 80% der Leukämien Erwachsener aus [124]. Abgesehen von beträchtlichen Fortschritten in der Diagnostik der verschiedenen AML-Subtypen und leichten Verbesserungen in der Therapie, erzielen die gängigen Chemotherapien nur initial Remissionen, so dass die meisten Patienten einen Rückfall erleiden und an der Krankheit sterben [52, 124]. Seit den 70er Jahren pendelt die 5-Jahres Überlebensrate um die 15-30% und für Patienten, die älter als 60 Jahre sind, fällt die Prognose noch schlechter aus [124].

In den letzten Jahren wurden beachtliche Fortschritte bei der Aufklärung der molekularen Pathogenese der AML gemacht. Auf der einen Seite blockieren Fusionsproteine aus Transkriptionsfaktoren wie etwa AML1/ETO („eight-twenty-one“, auch genannt MTG8 [115]), PML-RAR α („promyelocytic leukemia-retinoic acid receptor α “ [137]), CBF β /MYH11 („core binding factor β /myosin heavy chain“ [158]) oder MLL/AF9 die Differenzierung der Zellen, indem sie ihre Zielgene unterdrücken. Andererseits sind das unkontrollierte Zellwachstum und die Hochregulierung der für das Überleben der Zelle zuständigen Gene notwendige Ereignisse für die Entstehung einer Leukämie. Häufig finden sich in Leukämien Mutationen in wachstumsregulierenden Genen, wie etwa FLT3 (Fms-like tyrosine kinase 3), Ras und c-Kit. Mutationen in Signaltransduktionsmolekülen induzieren Veränderungen in der Aktivität und der Expression von verschiedenen Transkriptionsfaktoren, die für eine normale Differenzierung des Knochenmarks notwendig sind [124].

1.2.2 Der FLT3-Rezeptor und Leukämie

Fms-like tyrosine kinase 3 (FLT3) (auch bezeichnet als Fötale Leber Kinase 2 [Flk-2] oder Stammzell Tyrosin Kinase 1 [STK-1]) gehört zur Familie der Klasse III Rezeptortyrosinkinasen (RTKIII), welche auch FLT1, FMS, PDGFR β („platelet-derived growth factor“) und KIT enthält. Dabei handelt es sich um membranständige Rezeptoren mit fünf immunoglobulinähnlichen extrazellulären Domänen, einer transmembranären Domäne und

einer Kinasedomäne, die durch einen sogenannten Kinasespalt mit regulatorischer Funktion geteilt ist [25, 44, 50, 63, 72, 83, 90].

Das menschliche FLT3-Gen liegt auf dem Chromosom 13 (13q12), besteht aus 24 Exons und kodiert für ein Protein aus 1000 bzw. 993 Aminosäuren in Mäusen bzw. Menschen. Das Protein zeigt sich als kräftige 140 kDa und als schwächere 160 kDa Bande, wobei erstere die unvollständig glycosylierte, mannosereiche, unreife Form und letzteres das vollständig N-glycosylierte, reife Protein ist. Größenangaben variieren von 130 bis 143 kDa und von 155 bis 160 kDa [44, 63, 117].

FLT3 wird von frühen hämatopoetischen Stammzellen, von B-Zell- und Makrophagenvorläufern exprimiert und spielt eine wichtige Rolle bei ihrer Entwicklung, Proliferation und Überleben [77]. Außerdem findet sich der Rezeptor auch in Plazenta, Gonaden und Gehirn [44, 45, 63]. Der Ligand des FLT3 (FL) wird membrangebunden auf Stromazellen des Knochenmarks und in löslicher Form exprimiert. FLT3 findet sich auch in hohem Maße in hämatologischen Tumoren und in 70 bis 100% der akuten myeloischen Leukämien aller FAB-Subtypen („French-American-British“, eine Klassifikation zur zytomorphologischen Einteilung akuter Leukämien und myelodysplastischer Syndrome, benannt nach den Nationalitäten der sie ausarbeitenden Hämatopathologen) [63, 72].

In bis zu einem Drittel aller AML Fälle ist der FLT3-Rezeptor mutiert und stellt damit die häufigste Mutation überhaupt bei AML dar [77]. Es werden vor allem zwei verschiedene Mutationen beschrieben. Die eine Sorte von Mutationen zeichnet sich durch internal tandem duplications (FLT3-ITD) im Exon 14 und/oder 15 des Rezeptors aus. Sie tritt in etwa 25% der Fälle auf und führt zur Insertion mehrerer Aminosäurereste in die juxtamembranäre Domäne des Rezeptors. Die andere Sorte von Mutationen sind Punktmutationen, kleine Deletionen oder Insertionen, in der Aktivierungsschleife der Tyrosinkinasedomäne (FLT3-TKD) des Rezeptors. In etwa 7% der AML Patienten tritt diese Mutation auf [33, 44, 45, 63, 72, 90, 132].

Diese Mutationen führen zu einer ligandunabhängigen Aktivierung des Rezeptors, die Zellen proliferieren und sind strahlensensibel. Transduziert man die FLT3-ITD Mutation auf retrovirale Weise in Spenderknochenmark bei Transplantationsexperimenten, dann entsteht ein Myeloproliferatives Syndrom beim Empfänger dieses Knochenmarks [63, 72, 132]. Klinisch bedeutet die FLT3-ITD Mutation für den Patienten eine schlechtere Prognose [33, 44, 45, 63, 72, 83, 90, 132].

1.2.3 FLT3-WT und seine Signalkaskade

Die meisten Wild-Typ (WT-) FLT3-Rezeptoren werden auf der Zelloberfläche als inaktive Monomere exprimiert. Die Bindung des FL induziert eine Dimerisierung, welche wiederum zur Autophosphorylierung des Rezeptors und dessen Aktivierung führt. Beim inaktiven Rezeptor nimmt die juxtamembrane Domäne eine gut organisierte β -Faltblattstruktur an, welche mit der Kinasedomäne interagiert, die das katalytische Zentrum der Kinase verbirgt, so dass die inaktive Kinasekonformation stabilisiert ist. Durch die Ligand-induzierte Dimerisierung und Konformationsänderungen werden zwei entscheidende juxtamembranäre Tyrosinreste phosphoryliert. Diese befinden sich an den Stellen Y589 und Y591. Dies destabilisiert die Konformation der juxtamembranären Domäne und erlaubt ihr, sich von dem aktiven Zentrum der Kinase wegzubewegen, was zu deren Aktivierung führt. Die Aktivierung des FLT3 Rezeptors durch den FL führt zu schneller Autophosphorylierung und Aktivierung einer großen Zahl von Signalübermittlern [44, 72, 83, 90, 122, 213, 214].

Als Adapterproteine sind bisher SHC, VAV, SHP-2 („Src homology domain 2-containing protein tyrosine phosphatase“), PLC- γ („Phospholipase C- γ “), GAB1 (GRB-associated binder 1/2“), GAB2, GRB2 („growth factor receptor bound protein-2“), PI3K („Phosphoinositol-3-Kinase“) und GAP („GTPase-activating protein“) bekannt. Sie werden durch den Rezeptor phosphoryliert und dadurch aktiviert. GAB1 und GAB2 sind Adapterproteine, welche an den aktivierten FLT3-Rezeptor binden. GAB2 wird vom aktivierten FLT3 an Tyrosinresten phosphoryliert und assoziiert mit SHP-2 und mit p85. Nicht alle Zelllinien exprimieren GAB1, doch in GAB1 exprimierenden Zellen findet ebenfalls eine Komplexbildung von GAB1, SHP-2 und p85 statt. Auch in diesen Zellen wird durch Aktivierung des FLT3 mit FL GAB1 tyrosinphosphoryliert. GAB1 und GAB2 binden konstitutiv an GRB2, daher auch der Name „GRB associated binder 1/2“ [213].

GAP und VAV sind zwei Adapterproteine, welche ebenfalls vom FL stimulierten FLT3-Rezeptor an Tyrosin phosphoryliert werden. Es konnte jedoch keine Assoziation mit dem Rezeptor detektiert werden. Möglicherweise spielen sie etwas später in der Signalkaskade des Rezeptors eine Rolle [50, 157].

PLC γ ist ein direktes Substrat des FLT3-Rezeptors. Das Protein assoziiert durch FL Stimulierung an den FLT3 und wird an Tyrosin phosphoryliert [50].

Die Bindung von GRB2 und SHC an die phosphorylierten Tyrosinreste des aktivierten Rezeptors führt dazu, dass ein Komplex aus GRB2 und SOS („son of sevenless“ [123]) zur Plasmamembran verlagert wird. Dies ermöglicht die Interaktion von RAS mit SOS, woraufhin ein an RAS gebundenes GDP zu GTP phosphoryliert wird. Dadurch ist RAS aktiviert. RAS

Proteine sind kleine GTPasen, welche wiederum die Serin/Threonin Kinase RAF-1 aktivieren. Die Aktivierung von RAF-1 führt wiederum durch die Aktivierung weiterer Kinasen zur Phosphorylierung und Aktivierung und der Transkriptionsfaktoren ERK-1 und ERK-2 („extracellular signal-regulated kinases“), die dadurch in den Zellkern transportiert werden [44, 77].

Das PI3K Enzym ist ein Heterodimer bestehend aus der regulatorischen Untereinheit p85 und der katalytischen Untereinheit p110. Bezüglich PI3K wurden unterschiedliche Aussagen publiziert. Die Kinase bindet entweder direkt an FLT3 oder über ein Adapterprotein, wie GAB1/2, GRB2 oder SHP-2. Offensichtlich enthält der murine FLT3-Rezeptor in seinem carboxyterminalen Ende eine Bindungsstelle für p85, die regulatorische Untereinheit von PI3K. Aus diesem Grund kann dieser FLT3-Rezeptor an PI3K direkt assoziieren. Im humanen FLT3 fehlt diese Bindungsstelle jedoch im carboxyterminalen Ende. Statt dessen besitzt der menschliche FLT3 eine zweite Kinasedomäne. Eine Interaktion zwischen humanem FLT3 und PI3K ist nur über vermittelnde Proteine möglich. Als notwendige Adaptoren wurden SHP-2, GRB2, GAB1/2 und SHIP („SH2 domain-containing inositol phosphatase“) identifiziert. SHIP assoziiert mit SHC an GRB2 und beide werden durch die FL Stimulierung des Rezeptors an ihren Tyrosinresten phosphoryliert. Außerdem bedingt die Stimulierung durch FL eine Assoziation von SHIP mit PI3K [50, 77, 212, 213]. In Zellen, die sich in einer späten Phase der myeloiden Reifung befinden, findet sich außerdem das Molekül CBL, welches durch die Stimulierung mit FL phosphoryliert wird und an PI3K bindet. In frühen B-Zellen dagegen ist dieses Protein nicht nachweisbar. CBL ist konstitutiv an GRB2 gebunden [103].

Ist PI3K mittels der Adapterproteine durch den aktiven FLT3-Rezeptor aktiviert worden, so konvertiert es die Plasmamembranlipide Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate (PIP₂) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphaten (PIP₃). Diverse Signalproteine akkumulieren daraufhin am aktivierten PI3K wie zum Beispiel AKT oder PDK1. Der Kontakt von AKT mit den PIP₃ an der Plasmamembran führt zur Phosphorylierung von AKT durch PDK1. Diese Phosphorylierung stimuliert die katalytische Aktivität von AKT, was dazu führt, dass eine Schar weiterer Proteine durch AKT phosphoryliert werden, die Zellwachstum, den Eintritt in den Zellzyklus und Zellüberleben bewirken [37].

Neben ERK-1, ERK-2 und den durch AKT aktivierten Transkriptionsfaktoren wird auch ein STAT durch die Aktivierung von FLT3 mit FL phosphoryliert und in den Zellkern transportiert. Unter den bekannten STAT Proteinen 1-6 ist es STAT5a, welches an Tyrosin

phosphoryliert wird, nicht jedoch STAT5b. Und im Gegensatz zum herkömmlichen JAK/STAT Signalweg werden durch FL keine JAKs („Januskinasen“ [86]) phosphoryliert [213].

1.2.4 FLT3-ITD und seine Signalkaskade

Im Gegensatz zum WT-Rezeptor, der von seinem Liganden aktiviert wird, sich anschließend autophosphoryliert und seine Adapterproteine aktiviert, ist der mutierte FLT3-Rezeptor konstitutiv aktiviert. Er bedarf keines Liganden um weitere Signalmoleküle an Tyrosin zu phosphorylieren und Signalkaskaden anzuschalten. In Zellen, die den FLT3-Rezeptor mit der ITD Mutation exprimieren, werden die Proteine AKT, ERK und STAT5 in konstitutiv phosphoryliertem Zustand nachgewiesen [72].

So wie in den FLT3-WT exprimierenden Zellen wird auch in den Zellen des ITD-mutierten Rezeptors SHC an den FLT3 adaptiert und phosphoryliert. Die Transkriptionsfaktoren C/EBP α und PU.1 werden in ITD exprimierenden Zellen unterdrückt [44].

Ein wesentlicher Unterschied zwischen den durch den FLT3-WT-Rezeptor aktivierten Signalwegen und den durch FLT3-ITD besteht darin, dass nur der FLT3-ITD-Rezeptor STAT5 aktiviert, nicht jedoch der WT [83, 170]. Um genau zu sein phosphoryliert der Wild-Typ FLT3 nur STAT5a, aber nicht STAT5b [213]. Die internal tandem duplication im FLT3-Rezeptor führt dazu, dass die Zellen ligandunabhängig proliferieren, Kolonien bilden und gegenüber strahleninduzierter Apoptose resistent sind. Von den erwähnten Signalkaskaden werden ERK und AKT schwach aktiviert, wohingegen STAT5 stark aktiviert wird [132]. Verglichen mit dieser starken Aktivierung von STAT5 wird STAT3 nur schwach durch den FLT3-ITD aktiviert und der Wild-Typ Rezeptor ist überhaupt nicht in der Lage, STAT3 zu aktivieren [170].

1.2.5 NF- κ B-Aktivierung durch FLT3 über AKT

AKT kann zum Überleben der Zelle beitragen, indem es Transkriptionsfaktoren, welche die Expression von pro- oder antiapoptotischen Genen kontrollieren, phosphoryliert. Entweder inhibiert AKT Faktoren, welche Gene exprimieren, die den Zelltod vermitteln, oder stimuliert Faktoren, die Gene exprimieren, die das Überleben der Zelle induzieren. Einer dieser Transkriptionsfaktoren, welcher durch AKT hochreguliert werden kann, ist NF- κ B. Die Mitglieder der NF- κ B Familie bilden Dimere, üblicherweise Heterodimere bestehend aus p65 und p50 (siehe Abschnitt 1.1 und 1.1.1). Unter unstimulierten Bedingungen befinden sie sich

im Zytosol. Dort wird die Funktion der NF- κ B durch seine Assoziation an den hemmenden Cofaktor I κ B, der NF- κ B gebunden hält, reguliert. Wird I κ B durch Kinasen phosphoryliert, welche als IKKs bezeichnet werden, so begünstigt dies seine Ubiquitinmarkierung und konsekutiv seinen Abbau mittels Proteasom. Das wiederum ermöglicht NF- κ B, in den Zellkern zu gelangen und dort seine Zielgene hochzuregulieren.

Akt ist in der Lage, IKK α direkt zu phosphorylieren und damit zu aktivieren. Außerdem wird angenommen, Akt sei entscheidend am IKK-vermittelten Abbau von I κ B beteiligt [48, 124].

1.3 Ozon

1.3.1 Ozon in der Medizin

Ozon wurde in der Vergangenheit für mehrere therapeutische Ansätze verwendet, z.B. wurde versucht, frische Hautwunden (Ulcera cruris, Fisteln, Abszesse, Gangrän, Dekubitalgeschwüre), Verbrennungen und Virusinfekte (Herpes simplex, Herpes zoster) durch Spülen der Wunden mit ozoniertem Wasser zu desinfizieren und dadurch eine schnellere Ausheilung zu bewirken. Auch in Form von subkutanen, intramuskulären und intraarteriellen Injektionen sowie als rektale Insufflationstherapie (chronisch entzündliche Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa) wurde Ozon angewendet. Besonders geeignet für einen kurativen Einsatz von Ozon erscheinen jedoch die Erkrankungen der Zahnmedizin (Karies, Endo- und Parodontopathien) aufgrund ihrer in erster Linie mikrobiellen Ätiologie [80]. Ein weiterer, eher spekulativer therapeutischer Ansatz, ist die so genannte extrakorporale Ozon-Eigenblutbehandlung, bei der dem Patienten Blut entnommen wird, welches dann extrakorporal mit exakt vorgegebenen Mengen Ozon angereichert und reinfundiert wird. Bei der Behandlung arterieller Verschlusskrankheiten und zur Anregung einer geschwächten Immunabwehr soll dieses Verfahren therapeutischen Nutzen bringen [27].

1.3.2 Ozon und sein Einfluss auf die NF- κ B-Signalübertragung

Ozon besitzt neben seiner Fähigkeit, Mikroorganismen abzutöten, eine hohe Reaktivität gegenüber verschiedenen Biomolekülen und nimmt möglicherweise Einfluss auf immunologische zelluläre Prozesse [106, 199, 200]. Experimente, in denen Ozon in Gasform appliziert wurde, zeigten, dass Ozon in Zellen des Respirationstrakts bzw. in Leukozyten eine Modulation des Aktivierungsstatus von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B, C/EBP β und AP-1

bewirkt. Dies wurde anhand von Gelretardierungsassays bestimmt. Es wurden Kulturen menschlicher Nasenepithelzellen mit Ozon behandelt und anschließend NF- κ B in nukleären Zellextrakten nachgewiesen [135]. Man verabreichte Ratten Ozon zum inhalieren, um anschließend deren Bronchiallavage auf mRNA zu untersuchen [79, 102]. Je nach Bedingung aktivierte Ozon die Expression von Zytokinen oder Chemokinen wie IL-8 oder MCP1 bzw. hemmte die Expression von IL-2 [7, 22, 89, 217]. 260 Ozon-sensitive Gene wurden bei einer Transkriptionsanalyse mit Lungengewebe identifiziert, von denen 80% inhibiert und 20% induziert wurden [67]. Unter diesen wurden mehrere NF- κ B-regulierte Gene sowie einige mit der Immunantwort in Zusammenhang stehende Gene gefunden. Zum jetzigen Zeitpunkt sind die Effekte von Ozon auf die NF- κ B-assoziierte Signalübertragung/Transkription nicht weiter charakterisiert. Außerdem wurde die Wirkung von Ozon in wässrigem Milieu auf die genannten transkriptionellen Systeme nicht untersucht.

1.3.3 Ozon als Produkt im Organismus

In letzter Zeit wurde überraschenderweise in mehreren Studien ein Vorkommen von Ozon endogen im menschlichen Organismus postuliert [106, 199-201]. Ozon soll insbesondere an der körpereigenen Immunabwehr beteiligt sein. In neueren Studien wurden Hinweise dafür gefunden, dass Ozon auch *in vivo* als Teil der Immunabwehr generiert wird und eine wichtige Rolle bei der körpereigenen Regulation von Entzündungen spielt [199, 201]. Während der Bekämpfung von Bakterien wird ein Molekül gebildet, das exakt die chemischen Eigenschaften von Ozon aufweist [199, 201]. Offenbar wird dieses Ozon von körpereigenen Antikörpern gebildet, wenn bakterielle Infektionen durch aktivierte Leukozyten, insbesondere B-Lymphozyten, bekämpft werden [199, 201]. Diese Produktion von Ozon als Antwort auf Inflammation durch Antigen-Antikörper-Komplexe wurde als „antibody-catalyzed water-oxidation pathway“ bezeichnet [199, 201]. Das auf diese Weise gebildete Ozon ist scheinbar in der Lage, Bakterien abzutöten [199, 201]. Diese Hinweise auf das *in vivo*-Vorkommen eines so reaktiven Moleküls wie Ozon und dessen Beteiligung an der körpereigenen Immunabwehr eröffnen völlig neue Forschungsansätze, wenn die Vielzahl von potentiellen Reaktionspartnern von Ozon im menschlichen Gewebe vor Augen geführt wird.

1.4 Arteriosklerose

1.4.1 Definition, Ätiologie und Epidemiologie

Arteriosklerose gehört zu den systemischen, chronisch-entzündlichen Erkrankungen. Sie ruft herdförmige Veränderungen der mesenchymalen Zellen der inneren Gefäßwand (Intima), sowie der inneren Schichten der mittleren Gefäßwand (Media) hervor und befällt vor allem große und mittelgroße elastische sowie muskuläre Arterien [153].

Schon im Kindesalter beginnt die Arteriosklerose sich zu entwickeln. Zunächst asymptomatisch über viele Jahre führt sie im mittleren und hohen Alter zu den typischen Organschädigungen. Ihre Genese ist multifaktoriell bedingt, denn sowohl exogene Risikofaktoren, als auch genetische Veranlagung liegen ihr zugrunde. Man grenzt unbeeinflussbare Faktoren (familiäre Disposition, Lebensalter, männliches Geschlecht) von beeinflussbaren Faktoren, welche wiederum in zwei Gruppen unterteilt werden können, ab. Zu den Risikofaktoren erster Ordnung gehören Dyslipoproteinämien (hohes Gesamtcholesterin, hohes LDL-Cholesterin, niedriges HDL-Cholesterin), Bluthochdruck, Diabetes mellitus und Nikotinabusus. Zu den Risikofaktoren zweiter Ordnung zählt man hohes Lipoprotein (a), Antiphospholipid-Antikörper, Hyperfibrinogenämie, Hyperhomocysteinämie, Bewegungsmangel und Adipositas. Bevor eine arteriosklerotische Läsion entsteht, kommt es zunächst zu einer endothelialen Dysfunktion. In diesem Stadium lagern sich Lipide in die Gefäßwand ein und es kommt zum Einwandern von Makrophagen, T-Lymphozyten, sowie zur Migration und Proliferation glatter Muskelzellen [23, 67]. Daraus entsteht der sogenannte arteriosklerotische Plaque. Durch die verminderte Vasorelaxation und die Raumforderung in der Gefäßwand entsteht eine Behinderung des Blutstroms. Hinzu kommen noch prokoagulatorische Prozesse [59]. Durch Lumeneinengung oder Ruptur des Plaques entstehen Thrombosen. Dies führt unter lokaler Aktivierung der Blutgerinnung zum kompletten Verschluss des Gefäßes. Daher ist das Endstadium der Arteriosklerose die Infarzierung des von diesem Gefäß abhängigen Gewebes [153]. Prinzipiell kann jede Arterie des Organismus von Arteriosklerose befallen werden. Am häufigsten sind jedoch die Gefäße folgender Organe betroffen: Herz (Angina pectoris, Herzinfarkt), Gehirn (transitorische ischämische Attacke, Schlaganfall), Extremitäten (periphere arterielle Verschlusskrankheit mit Claudicatio intermittens, Gangrän). Als Folge von Veränderungen an Herz und Gehirn ist die Arteriosklerose die häufigste Ursache für Tod und Behinderung in den westlichen Industrieländern [153]. Hierbei stellen die ischämische Herzerkrankung und der Myokardinfarkt die bedeutsamsten Organschädigungen dar.

1.4.2 Die Pathogenese der Arteriosklerose – Schaumzellbildung und modifizierte Lipoproteine

Die Entwicklung der Arteriosklerose verläuft in mehreren Stadien. Zu Beginn des arteriosklerotischen Krankheitsprozesses führen die oben beschriebenen Risikofaktoren zur Schädigung der Endothelzellen. Etliche Aufgaben der Zelle – Aufrechterhaltung des Gefäßtonus, Regulation von Thrombozyten- und Leukozytenadhäsion, Hemmung der Migration und Proliferation glatter Muskelzellen – können dadurch nicht mehr erfüllt werden [23, 46, 203]. Außerdem kommt es zu einer verminderten Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) und der vermehrten Bildung von freien Sauerstoffradikalen. Der daraus resultierende oxidative Stress ist für jedes Stadium der Arteriosklerose pathophysiologisch von großer Bedeutung.

Zunächst entstehen durch die Einlagerung von Lipiden und die Migration von Makrophagen und glatten Muskelzellen in die arteriosklerotische Läsion so genannte „Fatty-Streak-Läsionen“. Dann wandert oxidiertes LDL (oxLDL) durch das Endothel in die Gefäßwand ein und führt dort zu einer abnormen Lipidablagerung innerhalb der Gefäßwand [175-179]. In der so entstandenen Neointima proliferieren die Gefäßmuskelzellen und akkumulieren die Makrophagen [23, 153]. In diesem Stadium der Arteriosklerose besteht nur eine geringe Raumforderung in der Gefäßwand und nur selten eine Lumeneinengung.

Eine weitere Besonderheit ist das Auftreten von so genannten Schaumzellen [109]. Wenn Makrophagen das im Überschuss vorhandene Fett phagozytieren und so zu Adipozyten-ähnlichen Zellen degenerieren, entstehen daraus Schaumzellen. Bei dieser Entwicklung spielt die Modifikation von Lipoproteinen eine wichtige Rolle. Diese Lipoproteine können durch ihre Einlagerung in der Arterienwand enzymatisch oder nicht-enzymatisch modifiziert werden [66, 179, 210]. Die Oxidation von LDL zu oxLDL führt dabei zu einer verstärkten Bindung dieses Lipoproteins an die Makrophagen.

Ein arteriosklerotischer Plaque entsteht, wenn weitere Makrophagen und T-Zellen einwandern und vermehrt glatte Gefäßmuskeln proliferieren. Dadurch entsteht eine Raumforderung in der Gefäßwand und der Blutfluss wird beeinträchtigt. Meistens wird der Plaque durch eine fibröse Kappe und die darüber liegenden Endothelzellen vom Gefäßlumen abgeschirmt. Es kommt außerdem zu Kalzifizierungsprozessen, die der kalzifizierenden Arteriosklerose („Gefäßverkalkung“) ihren Namen gegeben haben [5, 23, 66].

Bei der Arteriosklerose kann es auch zu einer Ruptur eines solchen Plaques kommen. Eine Ruptur führt zum Kontakt der Gefäßwand und des Plaqueinhalts mit dem zirkulierenden Blut. Dadurch kommt es zu einer raschen Aktivierung von Thrombozyten und es entsteht eine

Thrombose, die das betroffene Gefäß komplett verschließt und damit zur Infarzierung des davon abhängigen Gewebes führt.

1.4.3 Die Rolle von NF- κ B bei Arteriosklerose

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B spielt bei der Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse eine entscheidende Rolle (siehe Abschnitt 1.1). Viel deutet darauf hin, dass eine Dysregulation des NF- κ B-Systems auch zur Entstehung der Arteriosklerose beiträgt [23, 46, 59]. In arteriosklerotischen Läsionen kann *in situ* aktiviertes NF- κ B nachgewiesen werden [28, 31]. Dabei handelt es sich um die aktivierte Form des NF- κ B, die in Monozyten, Makrophagen und in glatten Muskelzellen gefunden wurde. In früheren Entwicklungsstufen der Arteriosklerose ist aktiviertes NF- κ B auch in Endothelzellen nachweisbar. Möglicherweise spielen mehrere NF- κ B-Zielgene bei den Prozessen der Arteriosklerose eine Rolle. In diesen Vorgängen sind Chemokine, Zytokine, Adhäsionsmoleküle, Wachstumsfaktoren und Proteasen, sowie prokoagulatorische und anti-apoptische Proteine involviert. In der arteriosklerotischen Läsion finden sich viele Modulatoren, die zumindest *in vitro* das NF- κ B-System in den pathogenetischen entscheidenden Zellen beeinflussen können. Dazu gehören IL-1, TNF, aktivierte Thrombozyten, virale und bakterielle Produkte, Thrombin, oxLDL und Fibronectin [29, 58, 139, 206]. Diese Induktion von NF- κ B-regulierten Genen könnte auf den Verlauf der beteiligten entzündlichen Prozesse und auf die Entstehung der arteriosklerotischen Läsion Einfluss haben. Durch die Induktion von NF- κ B-Zielgenen wird die Chemotaxis von Lymphozyten und Monozyten gesteigert, deren Transmigration wiederum durch spezifische NF- κ B-regulierte, endotheliale Adhäsionsmoleküle gesteuert wird. In dieser frühen Phase kommt es außerdem durch die Aktivierung des NF- κ B-Systems zu einer vermehrten Expression von Wachstumsfaktoren, die die Proliferationsvorgänge im Gefäßendothel fördern. Auch in späteren Stadien der Arteriosklerose ist NF- κ B von Bedeutung, z.B. bei der Expression von prokoagulatorischen Proteinen oder wiederum bei der Produktion von Wachstumsfaktoren, aber auch bei der Produktion von Proteasen sowie der Apoptose [31]. Außerdem kommt es zu einer gesteigerten Produktion von Tissue-Faktor, wodurch das Risiko thrombotischer Ereignisse erhöht wird [29].

1.4.4 Ozon – allgemeine Grundlagen

Ozon ist ein Molekül, das aus drei Sauerstoffatomen besteht. Sein Oxidationsvermögen ist beinahe ebenso stark, wie das des atomaren Sauerstoffs und wird nur von wenigen Stoffen übertroffen wie F_2 , $S_2O_8^{2-}$, H_4XeO_6 , KrF_6 [151]. Als Gas ist Ozon blau, in flüssigem Zustand (Sdp. $-110,5^\circ C$) violettblau und in festem Zustand (Smp. $-192,5^\circ C$) schwarz-violett. Seine Moleküle sind gewinkelt (Bindungswinkel 117°) mit gleichen Abständen der O-Atome (128 pm) und somit einer delokalisierten π -Bindung [151].

Bei Ozon handelt es sich um eine endotherme Verbindung, die thermodynamisch so instabil ist, dass es selbst bei $-120^\circ C$ stark explosiv ist. In der Stratosphäre wird Ozon durch UV-Strahlung gebildet. Die dafür benötigte Energie entspricht einer Wellenlänge von $\lambda < 240$ nm. Somit wird Ozon bei $\lambda < 310$ nm wieder abgebaut. Dieses Gleichgewicht führt zur Bildung der Ozonschicht, einem wichtigen Schutzschild gegen ultraviolette Strahlung. Durch stille elektrische Entladungen wird Ozon industriell hergestellt [151].

Bereits Ende des 19. Jahrhunderts wurde Ozon zur Desinfektion von Wasser sowie zur Konservierung von Lebensmitteln eingesetzt, da es die herausragende Fähigkeit besitzt Mikroorganismen (Bakterien, Viren, Parasiten) abzutöten [41, 142, 150, 183, 192]. Jüngste Studien entdeckten Ozon sogar als hoch potentes bakterizides Biomolekül an der Schnittstelle zwischen angeborener und erworbener Immunität und postulieren eine regulatorische Rolle bei entzündlichen Prozessen [199, 200]. Bisher ist die therapeutische Bedeutung von Ozon in der Medizin bzw. Zahnmedizin nur ungenügend untersucht.

1.4.5 Ozon und Arteriosklerose

In neueren Studien werden Hinweise auf das Vorkommen von Ozon in humanen arteriosklerotischen Arterien gegeben [106, 199, 200]. In arteriosklerotischem Gewebe, das mittels Endarteriektomie der Arteria carotis gewonnen wurde, konnten Moleküle nachgewiesen werden, die nur durch die Ozonierung von Lipiden entstehen. Dies lässt vermuten, dass Ozon während der Entstehung der arteriosklerotischen Läsion gebildet wird. Außerdem konnte eine Zunahme dieser Ozon-spezifischen Produkte festgestellt werden, als arteriosklerotisches Gewebe aus dem Plaque kultiviert und *in vitro* aktiviert wurde [200]. Zusätzlich konnte die Produktion von Ozon durch Antikörper bei der körpereigenen Immunantwort nachgewiesen werden (antibody-catalyzed water-oxidation pathway, siehe Abschnitt 1.3.4). Interessanterweise finden sich alle Komponenten, die nötig sind, diesen Ozon-produzierenden Abwehrmechanismus zu aktivieren, in arteriosklerotischen Läsionen.

Die arteriosklerotische Läsion zeichnet sich durch die Akkumulation von Lipoproteinen aus [199-201]. In modifizierter Form tragen diese Lipoproteine zur Entstehung der Arteriosklerose bei. Daher stellt sich die Frage, wie sich die Ozonierung von Lipoproteinen auf zelluläre Funktionen auswirkt.

1.5 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wurden zwei Themengebiete bearbeitet. Es sollte untersucht werden wie NF- κ B und C/EBP β vom FLT3-Rezeptor beeinflusst werden und wie Ozon die Aktivierung von NF- κ B beeinträchtigt.

1.5.1 NF- κ B und C/EBP β in FLT3-positiven Zellen

Zunächst wurde getestet, welchen direkten Effekt der FLT3-Rezeptor in 32D-Zellen auf das NF- κ B-System besitzt und wie sich eine Mutation des FLT3-Rezeptors auf die Aktivität des NF- κ B-Systems auswirkt. Weiterhin galt es, unter diesen Bedingungen die Wirkung der FLT3-Mutation auf Mechanismen der NF- κ B-Signaltransduktion zu analysieren. Dazu wurden die Konzentrationen der NF- κ B Untereinheiten und die der Inhibitorproteine I κ B α und I κ B β untersucht.

Ferner sollte untersucht werden, welchen Effekt der FLT3-Rezeptor in 32D-Zellen auf den Transkriptionsfaktor C/EBP β hat. Zu diesem Zweck wurden dessen Konzentrationen im Zytosol gemessen.

1.5.2 Ozon und NF- κ B

Außerdem wurde in dieser Studie erarbeitet, welchen Effekt ozoniertes LDL (ozLDL) auf die NF- κ B-vermittelte Signalübertragung hat. Dies konnte im zeitlichen Verlauf und an verschiedenen Zellen demonstriert werden. Dazu galt es auch zu untersuchen, ob der beobachtete Effekt auf eine Wirkung von Nebenprodukten, die bei der Ozonierung von Lipiden entstehen, zurückzuführen ist, oder auf einer toxischen Wirkung beruht.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antikörper

Alle Antikörper stammen (sofern nicht anders angegeben) von Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, Deutschland). In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Antikörper (Ak) eingesetzt:

Western Blot:

β -Aktin	monoklonaler Maus-Ak gegen N-Terminus (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)
Cyclin B1	polyklonaler Kaninchen-Ak gegen Aminosäuren 1-433
NF- κ B, p65	polyklonaler Kaninchen-Ak gegen N-Terminus
NF- κ B, p50	monoklonaler Maus-Ak gegen N-Terminus
I κ B α	polyklonaler Kaninchen-Ak gegen C-Terminus
I κ B β	polyklonaler Kaninchen-Ak gegen C-Terminus
C/EBP β	polyklonaler Kaninchen-Ak gegen C-Terminus

Sekundäre Ak: Peroxidase-konjugierter, polyklonaler Ziege-Ak gegen Kaninchen-IgG und Peroxidase-konjugierter, monoklonaler Ziege-Ak gegen Maus-IgG (Dianova, Hamburg, Deutschland)

Supershift:

NF- κ B, p65	polyklonaler Kaninchen-Ak gegen N-Terminus
NF- κ B, p50	polyklonaler Kaninchen-Ak gegen NLS-Region
NF- κ B, c-Rel	polyklonaler Kaninchen-Ak gegen N-Terminus

2.1.2 Reagenzien

Tumornekrosefaktor α (TNF α , rekombinant, human) sowie Lipopolysaccharid (LPS; *E. coli* 0111:B4) wurden von Sigma-Aldrich bezogen, humanes Low Density Lipoprotein (LDL) von Biomedical Technologies Inc. (Stoughton, USA). Flt3/FLK-2 Ligand (FL) und Interleukin-3 (IL-3 rekombinant, murin) stammten ebenfalls von Sigma-Aldrich.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Für den ersten Teil der Experimente wurden murine hämatopoetische 32D-Zellen verwendet. Die FLT3-WT- und die FLT3-ITD-positiven 32D-Zellen wurden von Prof. Dr. med J. Duyster (III. Medizinische Klinik, Klinikum rechts der Isar der Technische Universität München, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Von den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Duyster wurde eine Linie der 32D-Zellen anhand des viralen Mig-Vektors mit dem FLT3-WT-Rezeptor transfiziert und eine andere Linie mit dem FLT3-ITD-Rezeptor [72]. Diese hintereinandergeschalteten Duplikationen in den Exons 14 und/oder 15 der DNA führen zur Insertion mehrerer Aminosäurereste in der juxtamembranären Domäne des Rezeptors. Die 32D-Zellen wurden in RPMI 1640 unter Zusatz von 8,5% FKS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 15% „Walter and Eliza Hall Institute“ (WEHI-3B)-Medium kultiviert. WEHI-3B Medium erhält man aus 90 - 95% Iscove-Medium (Biochrom, Berlin, Deutschland) mit 5 - 10% FKS, 2 mM L-Glutamin und 2,5 - 1,5 x 10⁻⁵ M Mercaptoethanol (beides von Sigma-Aldrich). Die FLT3-WT-positiven 32D-Zellen benötigten zum Wachstum 2 ng/ml Interleukin-3 (IL-3). Beide Linien wurden bis zu einer Dichte von 1 - 1,5 x 10⁶ Zellen/ml kultiviert (37°C, 5% CO₂) und alle 3 - 4 Tage 1:50 gesplittet. Für die Experimente wurden die Zellen in einer Dichte von 4 - 5 x 10⁶ Zellen pro Schale in 6-Well-Kulturplatten ausgesät.

Für die zweite Serie an Experimenten wurde die Zelllinie THP-1 (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) verwendet. Dabei handelt es sich um Zellen einer humanen akuten myeloiden Leukämie. THP-1-Zellen wurden in RPMI 1640-Medium (Biochrom) unter Zugabe von 7,5% FKS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin bis zu einer Dichte von 0,5-1 x 10⁶ Zellen/ml kultiviert (37°C, 5% CO₂). Die Zellen wurden für die Experimente in einer Dichte von 2 - 3 x 10⁶ Zellen pro Schale in 6-Well-Kulturplatten (Nunc, Wiesbaden, Deutschland) ausgesät.

Humane Monozyten konnten aus Blut von gesunden Spendern gewonnen werden, indem man heparinisiertes Vollblut zentrifugierte und den Buffy Coat (Leukozytenfilm) abpipettierte. Dieser wurde mit Medium verdünnt, in ein mit Biocoll-Trennlösung (Biochrom) gefülltes LeucoSepTM-Röhrchen (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland) pipettiert und erneut zentrifugiert. So entstand eine weiße Monozytenschicht zwischen Plasma und Trennlösung. Anschließend wurden die Monozyten in RPMI mit 2% FKS gewaschen und mittels hämatologischer Analyse (Sysmex Deutschland, Norderstedt, Deutschland) differenziert. Die

so gewonnenen Monozyten wurden anschließend mit dem „Monocyte Isolation Kit II“ (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) negativ isoliert. Dabei wurden alle Nicht-Monozyten indirekt magnetisch mittels Biotin-konjugierter Antikörper und Anti-Biotin MicroBeads gelabelt. Durch die Entfernung der so magnetisch markierten Zellen erhält man die gereinigten Monozyten. Für diesen Prozess wurde als Puffer immer eiskaltes, steriles PBS (Biochrom) mit 5% FKS und 2mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (Sigma-Aldrich) verwendet. Daraufhin wurden die Zellen in 24-Well-Kulturplatten ($2,5 \times 10^6$ /well) in THP-1-Medium (RPMI, Biochrom; 7,5% FKS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin; OPI Media Supplement (Sigma-Aldrich) und nicht-essentielle Aminosäuren (Gibco Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), 37°C, 5% CO₂) für 24 Stunden (adhärente Monozyten) oder 8 Tage (Makrophagen) ausgesät. Mittels Durchflusszytometrie konnte eine Immunphänotypisierung der Monozyten anhand der Oberflächenantigene CD45, CD14, HLA-DR, CD3, CD4, CD8 und CD19 durchgeführt werden, welche eine Reinheit von über 95% bestätigte.

HUVEC Endothelzellen (Promocell, Heidelberg, Deutschland) wurden in Zellkulturmedium („endothelial cell growth medium“, Promocell) unter Zusatz von 10% FKS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin sowie 12,3 ml Supplement Mix (Promocell) kultiviert (37°C, 5% CO₂) und alle 2 - 3 Tage nach Ablösen mittels EDTA/Trypsin gesplittet.

2.2.2 Ozonierung von PBS

PBS wurde durch einen Ozongenerator (Ozonosan photonik; Dr. Hänsler GmbH, Iffezheim, Deutschland) mit gasförmigem Ozon der Ausgangskonzentration 75 µg/ml für 15 min behandelt (durchperlt). Eine Behandlung mit ozoniertem Gas dieser Konzentration führt aufgrund des physikalischen Lösungsverhaltens und des Erreichens der Sättigungsgrenze in deionisiertem Wasser zu einer Konzentration von Ozon in Wasser von 17 µg/ml bei 4°C.

Die Ozonherstellung wurde mit einem Photometer (Ozonosan photonik), das in den Ozongasprozessor integriert ist, überwacht und mit einem weiteren Messgerät bestätigt (GM-6000-NZL; Anseros, Tübingen, Deutschland). Um die Ozonierung von PBS zu überprüfen, wurde die entsprechende Ozonkonzentration in Wasser unter identischen Bedingungen photometrisch gemessen (Palintest; Gateshead, England).

2.2.3 Ozonierung von Lipoproteinen

Humanes Low Density Lipoprotein (LDL) wurde von Biomedical Technologies Inc. bezogen. Zur Produktion der LDL-Lösung wurden 200 µl humanes LDL (Proteinkonzentration: 5 mg/ml) mit PBS in einer zuvor mit PBS gewaschenen PD-10-Säule (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) dialysiert, um EDTA zu entfernen. Danach wurde das LDL in 100 ml PBS gelöst, um eine Endkonzentration von 10 µg/ml zu gewinnen. Diese Lösung wurde mit dem Ozongasprozessor behandelt, um ozoniertes LDL (ozLDL) herzustellen. Entsprechend den Anweisungen des Herstellers wurde die LDL-Lösung mit Ozongas durchperlt. Die Ozonherstellung wurde auch in diesem Fall mit einem Photometer (vgl. Abschnitt 2.2.2) überwacht.

Basierend auf Halbwertszeit-Tests wurde die ozonierete Lösung mindestens 1 h unter sterilen Bedingungen stehen gelassen, sodass das nicht reagierte Ozon entweichen konnte. Die Reaktion von LDL mit Ozon wurde durch die Bestimmung sog. „Thiobarbituric Acid Reactive Substances“ (TBARS) überwacht. Diese Methode dient der Bestimmung des Oxidationsgrads von Lipiden. Außerdem wurde die durch Ozon induzierte Fragmentierung von Apolipoprotein B durch Western Blots bestimmt.

2.2.4 Lipidextraktion

Mit einer Lösung aus Chloroform und Methanol im Verhältnis 2:1 (inkl. 0,01% Butylhydroxytoluol; Sigma-Aldrich) wurden Lipidextrakte aus nativem LDL, oxLDL oder ozLDL (je 3 mg) extrahiert, die organischen Fraktionen gesammelt, in Stickstoffatmosphäre vollständig eingedampft und anschließend in 300 µl Hexan für eine weitere Trennung gelöst. Mit einer Bakerbond spe Extraktionssäule (Baker, Paris, Frankreich) erfolgte die Trennung des Gesamtlipidextrakts. Zuvor wurde die Säule mit 5 ml Hexan gewaschen, dann wurden die Lipide mit jeweils 2 ml von 8 Lösungsmittelgemischen mit steigender Polarität eluiert. Fraktion 1 bestand aus 1% Ethylacetat in Hexan, Fraktion 2 aus 5% Ethylacetat in Hexan, Fraktion 3 aus 15% Ethylacetat in Hexan, Fraktion 4 aus 30% Ethylacetat in Hexan, Fraktion 5 aus 60% Ethylacetat in Hexan, Fraktion 6 aus 100% Ethylacetat, Fraktion 7 aus 30% Methanol in Dichlormethan und Fraktion 8 aus 100% Methanol. Die Eluate wurden vollständig eingedampft und in 300 µl Methanol gelöst. Fraktion 1 enthielt Cholesterinester, Fraktion 3 Triglyceride und freies Cholesterin und Fraktion 7 Phospholipide. Die Lipide wurden enzymatisch mittels Cholesterol C System (Roche, Penzberg, Deutschland) bestimmt.

2.2.5 Zellvitalitätstest

Mit Hilfe des sogenannten „CellTiter-Glo luminescent cell viability test“ (Promega, Mannheim, Deutschland) wurde die Vitalität der Zellen überprüft. Die Menge an ATP lässt sich als Marker für die metabolische Aktivität in den kultivierten Zellen quantifizieren. Dabei ist die Menge an ATP direkt proportional zu der Zahl intakter Zellen in der Kultur.

Nachdem die Zellen in Mikrotiterplatten (Nunc) mit den zu testenden Bedingungen vorbehandelt waren, wurde das CellTiter-Glo-Reagenz zugegeben und 10 min inkubiert. Das durch das ATP intakter Zellen erzeugte Lumineszenzsignal wurde bei 405 nm photometrisch gemessen und über die erhaltene optische Dichte (OD) die Stoffwechselaktivität der Zellen quantitativ ermittelt.

2.2.6 Isolierung zytosolischer und nukleärer Extrakte

Zelluläre und nukleäre Proteine wurden nach einem in der Literatur beschriebenen und leicht modifizierten Verfahren isoliert [118]. THP-1-Zellen (3×10^6) oder 32D-Zellen (5×10^6) wurden abzentrifugiert ($200 \times g$, 5 min, 4°C) und einmal in PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation ($2.000 \times g$, 2 min, 4°C) wurden die Zellpellets in Puffer A (0,1% Nonidet P-40; 10 mM Hepes, pH 7,9; 10 mM KCl; 1,5 mM MgCl_2 ; 0,5 mM Dithiothreitol (DTT); 300 mM Saccharose; je 0,75 $\mu\text{g/ml}$ Pepstatin, Antipain, Chymostatin, Aprotinin und Leupeptin sowie 0,5 mM PMSF) gelöst und 5 min auf Eis inkubiert. Dies dient dazu, die äußeren Zellmembranen aufzubrechen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt ($15.800 \times g$, 30 sec, RT) wurde der Überstand mit der zytosolischen Fraktion von den noch intakten Zellkernen abpipettiert und auf Eis gelagert. Eine Kontamination der nukleären Extrakte durch zytosolische Proteine wurde durch einen Waschschrift der Kerne in Puffer A und eine erneute Zentrifugation vermieden. Um die Proteinausbeute zu verbessern wurde der Überstand anschließend abgenommen, mit der zytosolischen Fraktion vereint und bei -80°C aufbewahrt. Die im Pellet enthaltenen Zellkerne wurden daraufhin in Puffer B (20 mM Hepes, pH 7,9; 100 mM KCl; 100 mM NaCl; 20% Glycerin, 0,5 mM DTT; Proteaseinhibitoren wie in Puffer A) aufgenommen und die Kernmembranen mittels eines Ultraschallhomogenisators aufgebrochen. Die Membranfragmente wurden durch Zentrifugation ($15.800 \times g$, 30 sec, RT) abgetrennt. Die so gewonnenen Extrakte wurden bei -80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Bei der Herstellung der Extrakte aus adhärennten Zellen kam das gleiche Verfahren zum Einsatz, allerdings mussten diese vor dem ersten Zentrifugationsschritt nach Entfernen des

Mediums in PBS gewaschen und anschließend mit Hilfe von Zellschabern vom Boden der 6-Well-Kulturplatten abgelöst werden.

Die Proteinkonzentrationen der zytosolischen und nukleären Extrakte wurden mit Hilfe des Bradford-Assays (Biorad, München, Deutschland) bestimmt. Als Messgröße diente hierbei die Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie Brilliant Blau G 250 von 465 nm zu 595 nm durch Proteinbindung.

2.2.7 Western Blot-Analyse

Die Anwesenheit bestimmter Proteine in zytosolischen und nukleären Extrakten wurden mittels Western Blot untersucht. Nach Zugabe von SDS-Probenpuffer (20,8 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1,27% SDS; 4% Glycerin; 1,25% Mercaptoethanol; 330 µM EDTA; 0,2% Bromphenolblau) wurden 5 - 15 µg der jeweiligen Proteinextrakte für 5 min auf 95°C erhitzt. In einem 12%-igen Polyacrylamid-Fertigel (Novex Pre-Cast Gel; Invitrogen, Groningen, Niederlande) erfolgte die anschließende Auftrennung der Proteine. Zur Feststellung der Proteingrößen wurden vorgefärbte Molekulargewichtsstandards (Rainbow: Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland; Kaleidoscope: Biorad, München, Deutschland; Page Ruler: Fermentas, Burlington, Kanada) aufgetragen. Nach Auftrennung der Proteine wurden die Gele 15 min in Transferpuffer (25 mM Tris-HCl, pH 8,3; 0,2 M Glycin) äquilibriert und die Proteine im Wet Blot-Verfahren auf eine ebenfalls äquilibrierte Nitrocellulosemembran (PALL Gelman Sciences, Dreieich, Deutschland) transferiert. Die gewaschenen Membranen wurden mit Ponceau S (Sigma-Aldrich) gefärbt, um eine gleichmäßige Übertragung der Proteine aus den Gelen zu überprüfen. Nach 10 min wurden die Färbelösungen abgespült, das Proteinmuster fotografiert und die Membranen 1 h lang in PBST (PBS + 0,05% Tween 20) mit 5% Magermilchpulver inkubiert, um die freien Stellen auf der Membran mit Protein abzusättigen und unspezifische Antikörperbindungen zu verhindern. Anschließend wurden die Membranen mit den entsprechenden primären Antikörpern (siehe 2.1.1; Verdünnung je nach Antikörper 1 : 200 bis 1 : 2.000, jeweils in PBST + 1% Milchpulver) für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach Waschen mit PBST + 1% Milchpulver (3 x 10 min, RT) erfolgte die Inkubation (1 Std., RT) mit dem entsprechenden sekundären, Peroxidase-konjugierten Antikörper (siehe 2.1.1; Verdünnungen in PBST + 1% Milchpulver wie folgt: Anti-Kaninchen 1 : 20.000; Anti-Maus: 1 : 7.500). Im Anschluss an weitere Waschschritte mit PBST (1 x 15 min, 4 x 5 min, RT) wurden die Antigen-Antikörper-Komplexe auf den Membranen mit Hilfe des ECL-

Verfahrens auf Röntgenfilmen (beides von Perkin Elmer Life Sciences, Jügesheim, Deutschland) sichtbar gemacht und mittels Densitometrie ausgewertet oder direkt gescannt.

2.2.8 Gelretardierungsassay

Die Anwesenheit aktiver, DNA-bindender Transkriptionsfaktoren in nukleären Extrakten wurden mittels Gelretardierungsassay untersucht. Hierfür kamen doppelsträngige Oligonukleotide mit Bindungssequenzen für die jeweiligen Transkriptionsfaktoren zum Einsatz. Ein Oligonukleotid mit dem prototypischen Ig κ -Motiv (5'-CAGAGGGGACTTTCCGAGA-3'; MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland) diente als NF- κ B-Konsensussequenz. Dieses wurde in Anwesenheit der erforderlichen Nukleotide durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) mit [α -³²P]dCTP (>3000 Ci/mmol) (Perkin Elmer Life Sciences) markiert. Nicht gebundene Nukleotide konnten mittels Sephadex G50-Säulen (Roche Diagnostics) abgetrennt werden. Gleiche Proteinmengen nukleärer Extrakte (4 - 8 μ g) wurden in Bindepuffer (20 mM Hepes, pH 7,9; 50 mM KCl; 1 mg/ml BSA; 0,5 mM EDTA; 1 mM DTT; 0,1% Nonidet P-40; 5% Glycerin; 50 ng Poly[d(I-C)]/ μ l; Roche Diagnostics) aufgenommen und 30 min mit dem radioaktiv markierten Oligonukleotid (10 ng, 10⁵ cpm) inkubiert [172]. Nach Zugabe des Ladepuffers (0,25 x TBE-Puffer [10 x TBE: 890 mM Tris; 890 mM Borsäure; 20 mM EDTA pH 8,0]; 40% Glycerin; 0,2% Bromphenolblau) erfolgte anschließend die Auftrennung der Proteine mittels Gelelektrophorese in einem 4%-igen Polyacrylamidgel in 0,25 x TBE-Puffer. Als positive Kontrollen dienten routinemäßig nukleäre Extrakte LPS-stimulierter THP-1-Zellen oder ITD-positiven 32D-Zellen. Die quantitative Auswertung der getrockneten Gele erfolgte mittels Autoradiographie und Densitometrie.

2.2.9 Supershift-Analyse und Kompetitionsstudien

Die Differenzierung der Untereinheiten der aktivierten DNA-Protein-Komplexe wurde mit der Supershift-Analyse durchgeführt. Die Wanderungsgeschwindigkeit des DNA-gebundenen Komplexes in der nativen Gelelektrophorese konnte durch spezifische Bindung von Antikörpern an die entsprechende Untereinheit verringert werden. Dazu wurden 2 - 4 μ g der nukleären Extrakte mit jeweils 2 ng des betreffenden Supershift-Antikörpers (siehe 2.1.1) für 1 h bei 4°C präinkubiert und anschließend mit Hilfe des Gelretardierungsassays weiter analysiert (siehe 2.2.8). Diesmal wurde dazu ein 6%-iges Polyacrylamidgel in 0,25 x TBE-

Puffer verwendet. Dieselbe Menge nukleären Extraktes ohne Antikörper-Vorinkubation wurde gleichzeitig zur Kontrolle elektrophoretisch aufgetrennt. Die an den jeweiligen Antikörper gebundenen Proteine bilden im Gel eine Bande weit oberhalb der ungebundenen Untereinheiten von NF- κ B.

Zudem wurden in Kompetitionsstudien die nukleären Extrakte mit einem 100-fachen Überschuss unmarkierter Oligonukleotide (IL-8 wt, C/EBP β (IL-8), NF- κ B (IL-8), C/EBP β -Konsensus, Oct-1-Konsensus oder SP-1) als spezifische Kompetitoren inkubiert und anschließend im Gelretardierungsassay untersucht. Auch hier diente die elektrophoretische Auftrennung einer gleichen Menge nukleären Extraktes ohne Zugabe eines Kompetitors als Kontrolle.

2.2.10 Endotoxin-Test

Vor Beginn der Experimente wurden alle eingesetzten Medien und Reagenzien auf ihren Gehalt an Endotoxinen überprüft. Hierfür wurde in dem quantitativen, chromogenen Limulus-Amöbozyten-Lysat Assay (Bio Whittaker, Verviers, Belgien) die Endotoxin-abhängige Spaltung des Substrats Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA bei 405 nm erfasst. Nur Substanzen, deren Pyrogen-Endkonzentration weniger als 10 pg/ml betrug, fanden Verwendung.

2.2.11 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde Microsoft Excel 2002 eingesetzt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung (MW \pm SD) angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung des NF- κ B-Systems in FLT3-ITD-positiven 32D-Zellen

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss die ITD-Mutation des FLT3-Rezeptors auf die Aktivierung von NF- κ B ausübt.

3.1.1 NF- κ B-Aktivität in FLT3-WT- und FLT3-ITD-positiven 32D-Zellen

Als Voraussetzung für die hier präsentierte Studie wurden Zellen der murinen hämatopoetischen Linie 32D stabil mittels eines Mig Vektors entweder mit dem WT-FLT3-Rezeptor oder mit dem ITD-FLT3-Rezeptor transfiziert (siehe Abschnitt 2.2.1).

Zunächst sollte untersucht werden, ob der FLT3-Rezeptor beim Auftreten einer ITD-Mutation einen direkten aktivierenden Einfluss auf das NF- κ B-System besitzt. Gelretardierungsassays wurden verwendet um die Aktivität von NF- κ B zu ermitteln. Interessanterweise konnte in nukleären Extrakten von 32D-Zellen mit ITD-Mutation eine deutliche Zunahme der Aktivität von NF- κ B gegenüber den mit dem FLT3-WT-Rezeptor transfizierten Zellen gezeigt werden (Abb.1). In den gleichen nukleären Extrakten wurde als Ladungskontrolle auch die Aktivität des konstitutiven Transkriptionsfaktors Sp-1 bestimmt, der in beiden Proben vergleichbare Aktivitätsniveaus aufwies.

Die Aktivität von NF- κ B in FLT3-ITD-positiven 32D-Zellen und die NF- κ B-Aktivität in FLT3-WT-positiven 32D-Zellen wurden quantifiziert, indem die Intensität der Signale mittels Densitometrie ausgewertet wurden (Abb.2). Das Diagramm verdeutlicht, dass die NF- κ B Aktivität in den FLT3-ITD-Proben etwa dreifach höher ist, als die Aktivität von NF- κ B in FLT3-WT-Zellen.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der ITD-positive FLT3-Rezeptor einen aktivierenden Einfluss auf das NF- κ B-System ausübt.

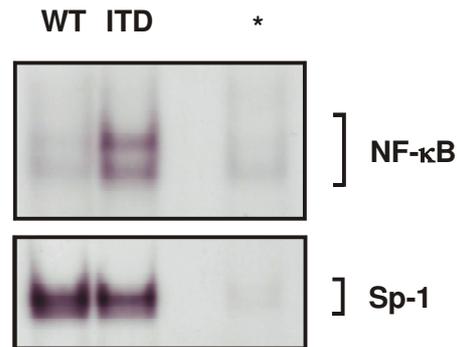


Abbildung 1: Aktivierung von NF- κ B in FLT3-ITD-positiven 32D-Zellen. Die Experimente wurden in 32D-Zellen durchgeführt, die stabil mit dem FLT3-WT- bzw. FLT3-ITD-Rezeptor transfiziert worden waren. Die Aktivität von NF- κ B wurde mit Gelretardierungsassays erfasst. Die DNA-Bindung des konstitutiven Transkriptionsfaktors Sp-1 wurde zur Kontrolle gleicher Ladung und Qualität der Extrakte bestimmt. In der Kompetitionsstudie (*) wurde der Extrakt der FLT3-ITD-Zellen mit einem 100-fachen Überschuss nicht markierter Oligonukleotide präinkubiert, welche die NF- κ B-Sequenz des IL-8-Proteins enthielten.

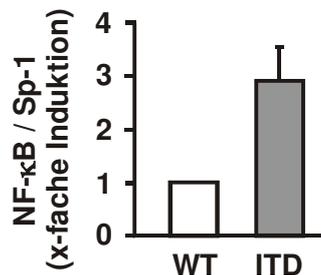


Abbildung 2: Quantifizierung der FLT3-ITD-Rezeptor-abhängigen NF- κ B-Aktivierung. Transfizierte 32D-Zellen wurden im Hinblick auf die DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B untersucht. Die Aktivität von NF- κ B wurde mit Gelretardierungsassays erfasst. Die Intensität der Banden wurde densitometrisch ermittelt. Die Sp-1-Bindung wurde zur Überprüfung gleicher Ladung und Qualität der Extrakte bestimmt. Die NF- κ B/Sp-1-Werte der ITD-32D Proben von jeweils drei unabhängigen Experimenten sind als Vielfache der unstimulierten WT-Kontrollen abgebildet (MW \pm SD).

3.1.2 Charakterisierung der Untereinheiten des durch FLT3-ITD aktivierten NF- κ B

Da es sich bei NF- κ B um einen dimeren Transkriptionsfaktor handelt, der auf verschiedene Weise aus seinen Untereinheiten gebildet werden kann, sollte im Rahmen dieser Studie die Zusammensetzung der NF- κ B-Komplexe untersucht werden, die durch den FLT3-ITD-Rezeptor aktiviert werden. Mittels Supershift-Analysen sollte gezeigt werden, welche

Untereinheiten von NF- κ B bei der Aktivierung des NF- κ B-Systems durch den mutierten FLT3-ITD-Rezeptor beteiligt sind. Es galt herauszufinden, ob die Zusammensetzung des NF- κ B Komplexes möglicherweise nach der Initialisierung der NF- κ B-Kaskade durch FLT3-ITD variiert.

In diesem Experiment wurden zuerst die beiden unbehandelten Proben der 32D-Zellen aufgetragen (Abb. 3; Bahn 1: FLT3-WT-Rezeptor, Bahn 2: FLT3-ITD-Rezeptor). In weiteren FLT3-WT- und FLT3-ITD-positiven Proben wurden nach der Inkubation mit Antikörpern gegen die häufigsten NF- κ B-Untereinheiten (p65, p50 und c-rel) ebenfalls Gelretardierungsassays durchgeführt. Die Präinkubation der Extrakte mit Antikörpern gegen p65 (Bahnen 3 und 4) führte zu einer Retardierung der DNA-Protein-Komplexe in der Gelelektrophorese, die mit der Abwesenheit der oberen Bande im typischen NF- κ B-Muster einhergeht. Bei Zugabe von p50-Antikörpern (Bahnen 5 und 6) war die Laufgeschwindigkeit beider Banden im Gel reduziert, wobei zusätzlich die untere Bande von NF- κ B deutlich schwächer ausfiel. c-rel-Antikörper dagegen (Bahnen 7 und 8) beeinflussten das Laufverhalten im Gel nicht. Demzufolge bestehen die aktivierten NF- κ B-Komplexe in Anwesenheit der FLT3-ITD-Mutation, so wie auch die NF- κ B-Komplexe in FLT3-WT-Zellen, vorwiegend aus den Untereinheiten p65 und p50 (Abb. 3).

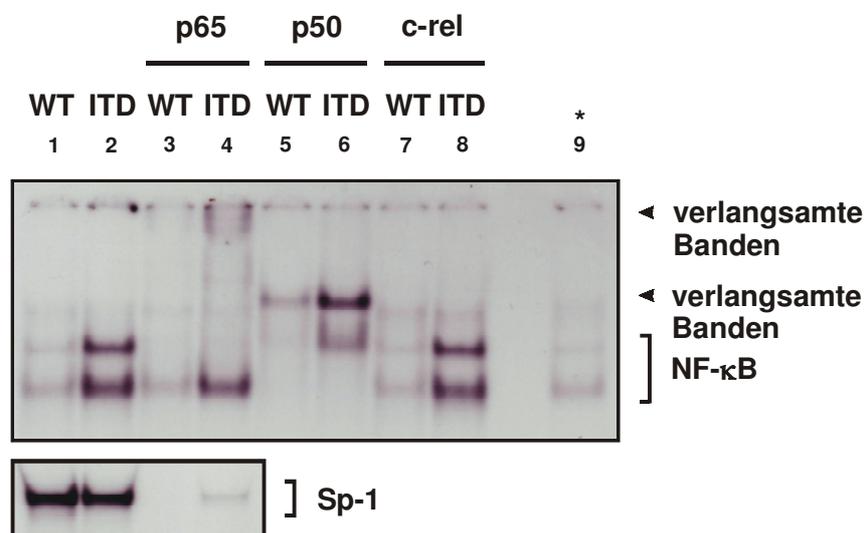


Abbildung 3: Identifizierung der durch FLT3-ITD aktivierten NF- κ B-Untereinheiten p65 und p50 mit Supershift. Drei Extrakte von jeweils FLT3-WT-Zellen und FLT3-ITD-Zellen wurden mit Supershift-Antikörpern für p65, p50 und c-rel präinkubiert. Die Banden mit den verlangsamten, gebundenen NF- κ B-Untereinheiten sind markiert (◀). Ladungs- und Qualitätskontrolle: Transkriptionsfaktor Sp-1. In der Kompetitionsstudie (*) wurde der Extrakt der FLT3-ITD-Zellen mit einem 100-fachen Überschuss nicht markierter Oligonukleotide präinkubiert, welche die IL-8-Konsensussequenz enthielten.

3.1.3 Bestimmung der p50- und p65-Konzentration in FLT3-WT- bzw. FLT3-ITD-positiven 32D-Zellen

Angesichts der gegenüber FLT3-WT-Zellen gesteigerten NF- κ B-Aktivität in 32D-Zellen, die den FLT3-ITD-Rezeptor stabil exprimieren, stellte sich die Frage, ob dieser Umstand auf eine vermehrte NF- κ B-Proteinsynthese oder auf eine erhöhte regulatorische Aktivität der vorliegenden Proteinkomplexe zurückzuführen ist. Dazu wurden in zytosolischen und nukleären Extrakten (siehe Abschnitt 2.2.6), die aus den oben beschriebenen Zellen gewonnen wurden, die Konzentrationsveränderungen der NF- κ B-Untereinheiten p50 und p65 nach Aktivierung von NF- κ B durch den FLT3-ITD-Rezeptor ermittelt. Die Western Blot-Analyse diente dazu, beide Proteine zu detektieren (Abb. 4). Dabei wurde eine nur leicht höhere Konzentration von p50 und p65 sowohl im Zytosol, als auch im Nukleus in den FLT3-ITD- gegenüber den FLT-WT-positiven 32D-Zellen gemessen. Der relativ kleine Unterschied in der Proteinexpression von p50 und p65 korreliert nicht mit dem oben beschriebenen Anstieg der DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B zwischen FLT3-WT- und FLT3-ITD-Zellen (siehe Abschnitt 3.1.1). Dies deutet darauf hin, dass in den durch die ITD-Mutation aktivierten Zellen eine deutliche Zunahme der NF- κ B-Bindungsaktivität ohne signifikante Zunahme der Untereinheiten p50 und p65 statt findet (Abb. 4).

Die Konzentration von p50 und p65 in 32D-Zellen mit ITD-mutiertem FLT3-Rezeptor wurde im Vergleich zu ihrer Konzentration in WT-32D-Zellen quantifiziert, indem die Intensität der Signale mittels Densitometrie ausgewertet wurde (Abb. 5). Die Werte für p50 und p65 in Zytosol und Kern der FLT3-WT-positiven 32D-Zellen wurden als 1 definiert und die Ergebnisse der FLT3-ITD-positiven 32D-Zellen dazu in Relation gesetzt. Die graphische Darstellung zeigt, dass die Signalstärke der p50-Banden von 1 auf $1,25 \pm 0,35$ im Zytosol und von 1 auf $1,2 \pm 0,27$ im Kern zunimmt. Bei p65 steigt im Zytosol die Bandenintensität von 1 auf $1,26 \pm 0,13$ und im Kern von 1 auf $1,04 \pm 0,36$. Dabei handelt es sich um eine minimale Zunahme der Konzentration in den FLT3-ITD-Zellen gegenüber den FLT3-WT-Zellen.

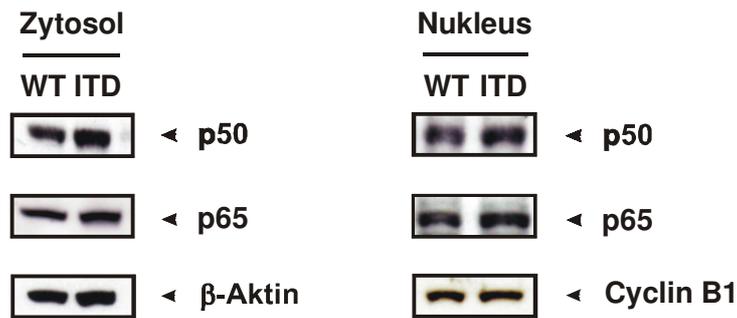


Abbildung 4: FLT3-ITD-Zellen zeigen einen geringen Anstieg der p50- und p65-Konzentration gegenüber den FLT3-WT-positiven 32D-Zellen im Western Blot. Zytosolische und nukleäre Extrakte von FLT3-WT- und FLT3-ITD-Zellen wurden im Western Blot mit Antikörpern gegen p50 und p65 inkubiert. Die Bestimmung der Menge des Zellstrukturproteins β -Aktin diente als Ladungs- und Qualitätskontrolle der zytosolischen Extrakte. Bei den nukleären Extrakten wurde als entsprechende Kontrolle Cyclin B1 eingesetzt.

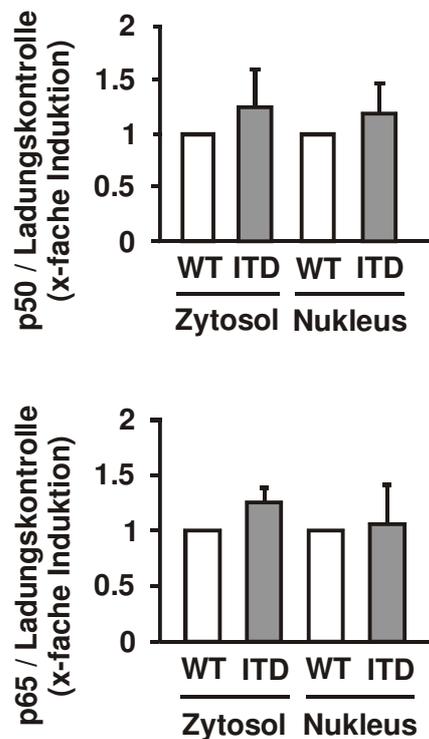


Abbildung 5: Densitometrische Auswertung der Proteinkonzentrationen von p50 und p65 in FLT3-WT- und FLT3-ITD-positiven 32D-Zellen. Die Menge von p50 und p65 in FLT3-WT- und FLT3-ITD-positiven 32D-Zellen wurde mittels Western Blot-Analyse bestimmt und auf die Ladungskontrollen normalisiert. Die p50/ β -Aktin-, p65/ β -Aktin-, p50/Cyclin B1- bzw. p65/Cyclin B1-Werte der ITD-positiven 32D-Proben von jeweils drei unabhängigen Experimenten sind als Vielfache der unstimulierten Wild-Typ-Kontrollen abgebildet (MW \pm SD).

3.1.4 Bestimmung der Konzentrationen von I κ B α und I κ B β in FLT3-WT- und FLT3-ITD-positiven 32D-Zellen

Da NF- κ B im Zytosol an seine Inhibitorproteine I κ B α und I κ B β gebunden ist (siehe Abschnitt 1.1.1), spielt für die Aktivierung von NF- κ B eine zentrale Rolle, in welchen Konzentrationen diese Proteine in den Zellen vorliegen und ob sie aktiviert und mittels Proteolyse abgebaut werden. Deshalb sollte als nächster Schritt der Einfluss des FLT3-Rezeptors auf die aktivierungsabhängige Proteolyse von I κ B α und I κ B β untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden die Konzentrationen von I κ B α und I κ B β mittels Western Blot-Analyse bestimmt. Entgegen unseren Erwartungen wurde für I κ B α ein geringer Konzentrationsanstieg im Zytosol von FLT3-WT- zu FLT3-ITD-Zellen und ein geringer Konzentrationsabfall im Nukleus nachgewiesen. Für I κ B β ergab sich eine etwas stärkere Konzentrationszunahme im Zytosol und eine stärkere Konzentrationsabnahme im Kern (Abb. 6). Diese nur geringen Unterschiede von I κ B α und I κ B β zwischen den FLT3-WT- und den FLT3-ITD-Zellen können den bereits oben beschriebenen deutlichen Unterschied der NF- κ B-Bindungsaktivität (siehe Abschnitt 3.1.1) nicht erklären. Vielmehr ist zu vermuten, dass in den durch die FLT3-ITD-Mutation aktivierten Zellen ein deutlicher Anstieg der DNA-Bindungsaktivität von NF- κ B ohne signifikante Änderung der Konzentrationen von I κ B α und I κ B β statt findet.

Die Konzentrationen von I κ B α und I κ B β in 32D-Zellen mit FLT3-ITD-Rezeptor wurden gegenüber ihren Konzentrationen in FLT3-WT-Zellen quantifiziert, indem die Intensität der Signale mittels Densitometrie ausgewertet wurde (Abb. 7). Die Werte für I κ B α und I κ B β in Zytosol und Nukleus der FLT3-WT-positiven 32D-Zellen wurden als 1 definiert und die Ergebnisse der FLT3-ITD-positiven 32D-Zellen dazu in Relation gesetzt. Die Diagramme verdeutlichen, dass die Konzentration von I κ B α im Zytosol von 1 auf $1,13 \pm 0,23$ zu- und im Kern von 1 auf $0,82 \pm 0,25$ abnimmt. Ein Einfluss der ITD-Mutation auf I κ B α ist somit nicht nachweisbar. I κ B β zeigt dagegen eine Zunahme im Zytosol von 1 auf $1,31 \pm 0,40$ und einen Konzentrationsabfall im Kern von 1 auf $0,34 \pm 0,18$. Dies könnte möglicherweise zur gesteigerten NF- κ B-Aktivität in FLT3-ITD-Zellen beitragen.

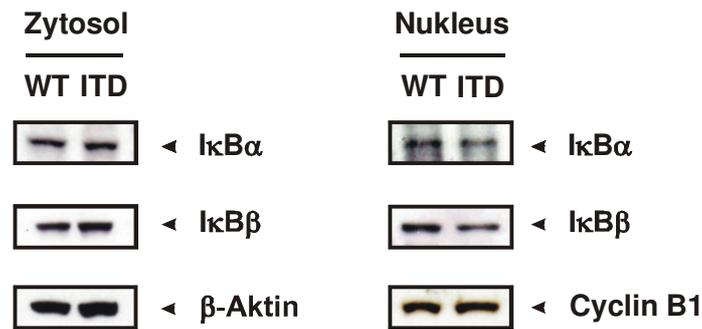


Abbildung 6: Bestimmung der Konzentrationen von IκBα und IκBβ in FLT3-WT- bzw. FLT3-ITD-positiven 32D-Zellen. Zytosolische und nukleäre Extrakte von FLT3-WT- und FLT3-ITD-Zellen wurden im Western Blot mit Antikörpern gegen IκBα und IκBβ inkubiert (Ladungs- und Qualitätskontrolle: β-Aktin bzw. Cyclin B1).

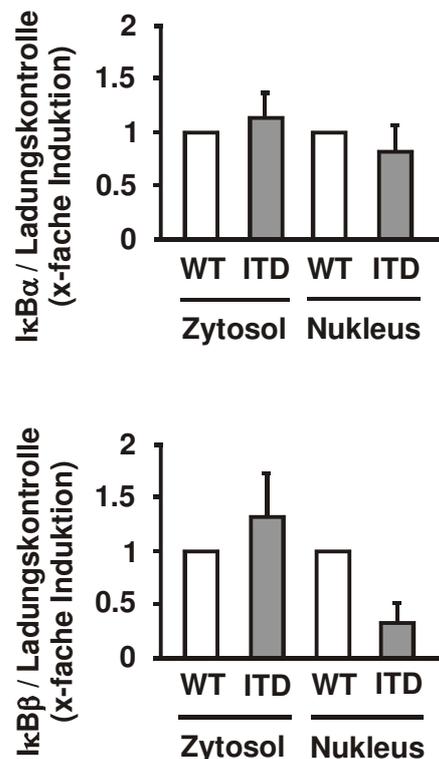


Abbildung 7: Densitometrische Analyse der Konzentrationen von IκBα und IκBβ in FLT3-WT bzw. FLT3-ITD-positiven Zellen. Die Menge von IκBα und IκBβ wurde mittels Western Blot-Analyse bestimmt. Die IκBα/β-Aktin- und IκBβ/β-Aktin-, bzw. IκBα/Cyclin B1- und IκBβ/Cyclin B1-Werte der ITD-Proben sind als Vielfache der unstimulierten Kontrollen abgebildet (drei unabhängige Experimente; MW ± SD).

3.1.5 Stimulation von FLT3-WT-Zellen mit IL-3

Damit die FLT3-WT-positiven 32D-Zellen undifferenziert bleiben und sich im ständigen Zellzyklus befinden, muss der Zellkultur entweder FL oder der Wachstumsfaktor IL-3 zugegeben werden (siehe Abschnitt 2.2.1). Um zu testen, ob IL-3 die NF- κ B-Signalkaskade aktiviert, wurden die FLT3-WT-Zellen mit verschiedenen Dosen an IL-3 stimuliert. Es zeigte sich im Gelretardierungsassay eine gleichbleibend niedrige NF- κ B-Aktivität in allen WT-Proben (Abb. 8). Weder 2 ng/ml, noch 20 ng/ml IL-3 führten zu einem signifikanten Anstieg der NF- κ B Bindungsaktivität, während die Probe aus den FLT3-ITD-Zellen wie gewohnt eine deutlich erhöhte NF- κ B-Aktivität auch ohne äußeren Stimulus zeigte.

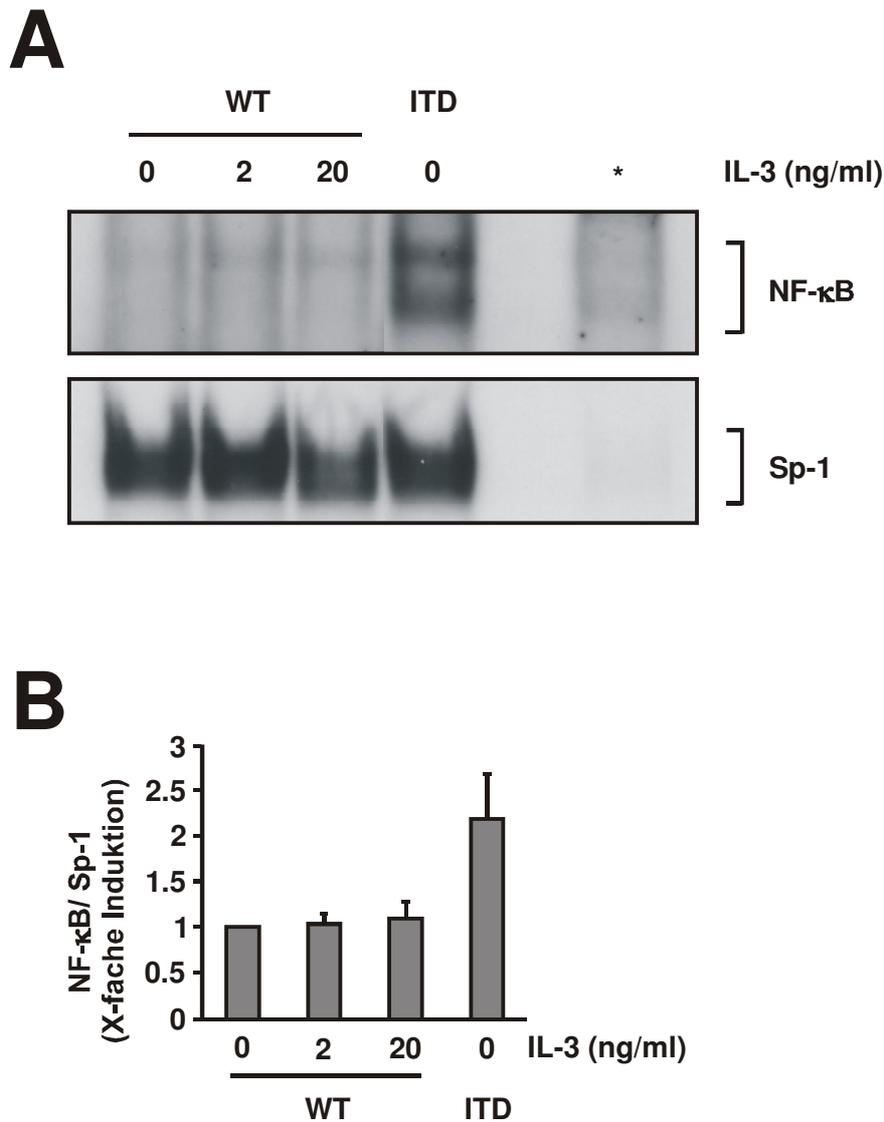


Abbildung 8: Bestimmung NF- κ B-Aktivität nach Stimulation von FLT3-WT-Zellen mit IL-3. FLT3-WT-positiv 32D-Zellen wurden mit den Dosen 0, 2 und 20 ng/ml IL-3 für 1 h präinkubiert. Als Positivkontrolle dienten die aktivierten FLT3-ITD-Zellen. A) Die Aktivität von NF- κ B wurde mit Gelretardierungsassays erfasst. In der Kompetitionsstudie (*) wurde der Extrakt der FLT3-ITD-Zellen

mit einem 100-fachen Überschuss nicht markierter Oligonukleotide mit IL-8 Konsensussequenz präinkubiert. B) Densitometrische Analyse der NF- κ B-Aktivität im Gelretardierungsassay von drei unabhängigen Experimenten (Ladungs- und Qualitätskontrolle: Sp-1).

3.1.6 Bestimmung der Konzentration von C/EBP β in 32D-Zellen

Aufgrund der deutlich erhöhten Aktivität von NF- κ B in FLT3-ITD-positiven 32D-Zellen sollte abschließend im ersten Abschnitt dieser Arbeit untersucht werden, ob ein ähnliches Aktivierungsmuster für C/EBP β in 32D-Zellen nachweisbar ist. Dazu wurden Zellextrakte aus FLT3-WT- und FLT3-ITD-positiven 32D-Zellen gewonnen. Die Western Blot-Analyse ergab, dass im Zytosol der FLT3-ITD-positiven Zellen eine weit höhere Menge an C/EBP β enthalten war, als in den FLT3-WT-positiven Zellen (Abb. 9). Zu sehen sind die drei Banden entsprechend der drei Isoformen von C/EBP β : LAP* (38 kDa), LAP (35 kDa) und LIP (20kDa) die miteinander unterschiedliche Heterodimere bilden können (Abb. 9A) [147].

Die Konzentration von C/EBP β in FLT3-ITD-positiven 32D-Zellen wurde gegenüber dessen Proteinexpression in FLT3-WT-positiven 32D-Zellen quantifiziert, indem die Intensität der Signale mittels Densitometrie ausgewertet wurde. Das Diagramm verdeutlicht, dass die Menge von C/EBP β im Zytosol der mutierten Zellen um das 3,85-fache höher ist, als in den WT-Zellen (Abb 9B).

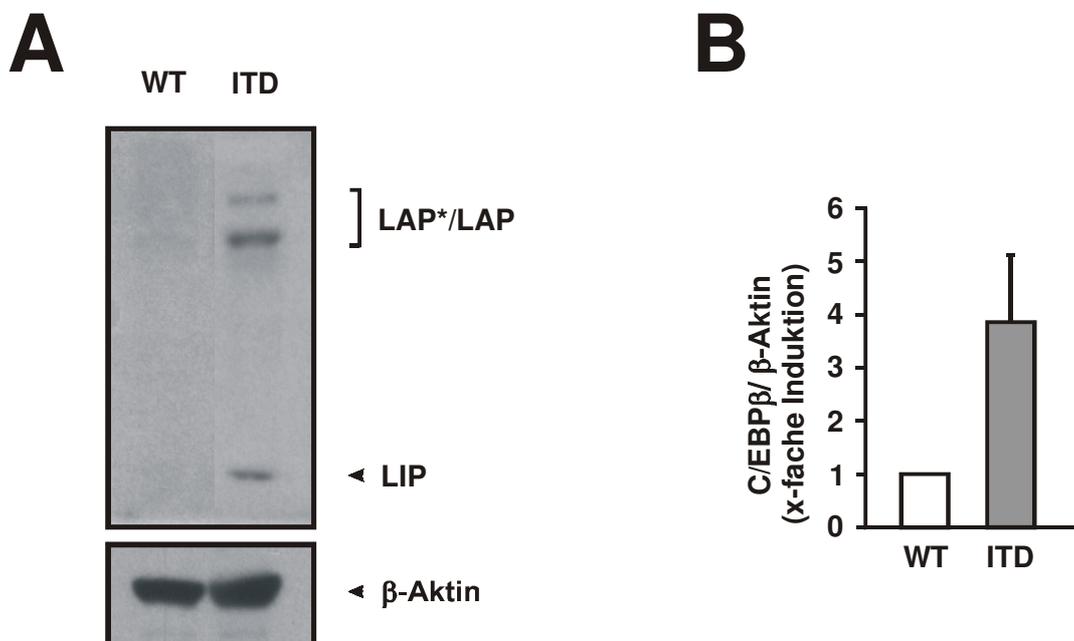


Abbildung 9: Nachweis von C/EBP β in FLT3-ITD-positiven 32D-Zellen. A) Die Konzentration von C/EBP β im Zytosol in beiden Zellpopulationen wurde mit Western Blot-Analyse semiquantitativ erfasst. B) Die Bandenintensität wurde densitometrisch ausgewertet (Ladungs- und Qualitätskontrolle:

β -Aktin). Die C/EBP β / β -Aktin-Werte der FLT3-ITD-Proben von jeweils drei unabhängigen Experimenten sind als Vielfache der unstimulierten FLT3-WT-Kontrollen abgebildet (MW \pm SD).

3.2 Modulation von NF- κ B durch ozonierte Lipoproteine

Der zweite Abschnitt dieser Studie behandelt den Effekt von ozLDL auf das NF- κ B-System. Zunächst wurden Vorversuche durchgeführt, die zur Untersuchung von oxidierten Lipoproteinen dienten. Um ozLDL für weitere Studien einsetzen zu können, waren erst Experimente zu seiner Charakterisierung und Toxizität erforderlich.

3.2.1 TBARS-Messung von ozLDL

Zur Herstellung von ozLDL wurde humanes LDL ozoniert wie in Material und Methoden beschrieben (siehe Abschnitt 2.2.3). Um zu bestimmen, in welchem Maße die mehrfach ungesättigten Fettsäuren oxidiert waren, wurden die TBARS-Werte gemessen. Dabei wird Malondialdehyd nachgewiesen, da diese Substanz bei der oxidativen Spaltung von Doppelbindungen entsteht, die in verschiedenen ungesättigten Fettsäuren mit mindestens drei Doppelbindungen (z.B. Linolensäure, Arachidonsäure) vorkommen. Bei ungesättigten Fettsäuren handelt es sich um langkettige Kohlenwasserstoffe, die bis zu vier Doppelbindungen besitzen können. Sie bilden Restgruppen von Phospholipiden, Triglyceriden und verestertem Cholesterin und sind wichtiger Bestandteil von LDL. Nach Behandlung von LDL mit Ozon in n=7 Experimenten reichten die Werte für die TBARS von 42,3 nmol/mg bis 144,7 nmol/mg (Mittelwert 90,5 nmol/mg) (Tab. 1). Malondialdehyd war im nativen LDL nicht messbar.

ozLDL	TBARS (nmol/mg)
Präp. Nr. 1	42,3
Präp. Nr. 2	144,7
Präp. Nr. 3	141,9
Präp. Nr. 4	46,2
Präp. Nr. 5	49,6
Präp. Nr. 6	72,7
Präp. Nr. 7	136,7

Tabelle 1: Messung der TBARS. Nach 16-minütiger Behandlung mit Ozon wurden die TBARS-Werte in sieben ozLDL-Lösungen gemessen.

3.2.2 Abnahme der Cholesterinkonzentration in ozLDL

Zur Bestimmung der Konzentration von Cholesterin in LDL, oxLDL und ozLDL wurde mit allen drei Substanzen (je 3 mg Protein) eine Lipidextraktion durchgeführt (siehe Abschnitt 2.2.4). Mit Lösungsmittelgemischen steigender Polarität wurden die Lipoproteine aus einer Säule eluiert. Bei den Eluenten handelte es sich um eine Verdünnungsreihe von 1% Ethylacetat in Hexan, bis 100% Ethylacetat und schließlich 100% Methanol. Die gewonnenen acht Fraktionen enthielten in Fraktion 1 Cholesterinester, in Fraktion 3 freies Cholesterin und Triglyceride und in Fraktion 7 Phospholipide. Mittels Cholesterinoxidase-Untersuchungen wurden die Cholesterinkonzentrationen bestimmt. Bei diesem Test bindet die Cholesterinoxidase an die 3-Hydroxygruppe des Cholesterins und katalysiert somit dessen Oxidation zu 5-Cholesten-3-on. Im Anschluss bewirkt dieses Enzym die Isomerisierung zum 4-Cholesten-3-on. Ein Peroxydaseenzym reduziert das aus der Redoxreaktion entstandene Wasserstoffperoxid, während ein oxidiertes Indikatormolekül die Peroxidase aktiviert und mit ihr ein Chromophor bildet, das photometrisch gemessen werden kann.

In LDL und in oxLDL konnten etwa gleich hohe Konzentrationen an Cholesterin gemessen werden. So enthielt LDL ein Gesamtcholesterin von 45,35 mg/dl (n=4) und oxLDL von 57,15 mg/dl (Tab. 2). Außerdem bestand bei beiden Substanzen auch ein ähnliches Verhältnis zwischen freiem und verestertem Cholesterin. Die Werte an freiem Cholesterin in LDL und

oxLDL aus n=4 Experimenten schwankten zwischen 9,25 mg/dl und 19,05 mg/dl, während die an verestertem Cholesterin zwischen 26,14 mg/dl und 53,11 mg/dl lagen. Jedoch konnte im Gegensatz dazu in ozLDL kaum Gesamtcholesterin nachgewiesen werden, wobei in der untersuchten Fraktion 3 kein freies Cholesterin detektiert wurde. Diese Ergebnisse deuten an, dass bei der Ozonierung von LDL das Cholesteringerüst gespalten wird oder zumindest eine Oxidation statt findet, die zur Bildung einer Ketogruppe in Position 3 führt, welche die Bindung der Cholesterinoxidase an das Cholesterin hemmt.

Lipoproteine	Gesamt- cholesterin (Konzentration in mg/dl)	Freies Cholesterin (Konzentration in mg/dl)	Verestertes Cholesterin (Konzentration in mg/dl)
LDL Nr. 1	44,52	12,86	31,66
LDL Nr. 2	49,17	12,86	36,31
LDL Nr. 3	45,18	19,05	26,14
LDL Nr. 4	42,52	9,52	33,00
oxLDL Nr. 1	47,84	14,76	33,08
oxLDL Nr. 2	66,45	13,33	53,11
ozLDL Nr. 1	3,99	0,00	3,99
ozLDL Nr. 2	3,99	0,00	3,99
ozLDL Nr. 3	3,99	0,00	3,99
ozLDL Nr. 4	4,65	0,00	4,65

Tabelle 2: Cholesterinkonzentrationen in verschiedenen Lipoproteinen. Über eine Extraktionssäule wurden durch Lösungsmittelgemische steigender Polarität natives LDL, oxLDL und ozLDL (jeweils 3 mg) eluiert. Die Fraktion 1 enthielt Cholesterinester, die Fraktion 3 das freie Cholesterin. Die Konzentrationen an Cholesterin wurden im Anschluss enzymatisch analysiert. Die dargestellte Konzentration an Gesamtcholesterin wurde aus der Summe an freiem und verestertem Cholesterin ermittelt.

3.2.3 Hemmung der LPS-induzierten Aktivierung von NF- κ B durch ozLDL

Da NF- κ B eine zentrale Rolle bei entzündlichen Prozessen spielt und Ozon als immunmodulatorisches Agens bekannt ist (siehe Abschnitt 1.3.3), galt es herauszufinden, ob ozLDL einen direkten Effekt auf das NF- κ B-System ausübt. THP-1-Zellen wurden für 30 min mit 10 μ g/ml ozLDL vorbehandelt und anschließend mit 10 μ g/ml LPS stimuliert. Die Zellen, die nicht mit ozLDL vorbehandelt worden waren, reagierten auf die Stimulation mit LPS mit einer deutlichen Zunahme der Aktivität von NF- κ B. In den mit ozLDL vorbehandelten Proben zeigte sich hingegen eine deutlich reduzierte NF- κ B-Aktivierung im Gelretardierungsassay (Abb. 10). Die Bindungsaktivität des konstitutiven Transkriptionsfaktors Sp-1 wurde durch die Behandlung der Zellen mit ozLDL oder LPS nicht beeinflusst.

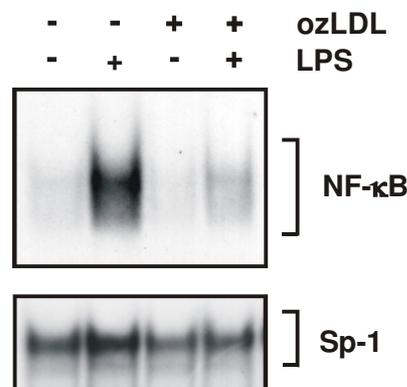


Abbildung 10: Hemmung der LPS-induzierten Aktivierung von NF- κ B durch ozLDL. Jeweils ca. 3×10^6 /ml THP-1-Zellen wurden in PBS (Bahnen 1 und 2) oder in PBS mit ozoniertem LDL (Bahnen 3 und 4) für 30 min inkubiert. Anschließend wurde mit 10 μ g/ml LPS für 1 h stimuliert (Bahnen 2 und 4) und der nukleäre Zellextrakt gewonnen. Die Aktivität von NF- κ B und SP-1 wurde durch Gelretardierungsassays bestimmt (Ladungs- und Qualitätskontrolle: Sp-1).

3.2.4 Fehlende Toxizität von ozLDL

Toxikologische Studien waren weiterhin erforderlich, um schädigende Folgen von ozLDL auf die Zellen auszuschließen. Alle Bedingungen der späteren Experimente wurden auf mögliche toxische Effekte untersucht, welche den beobachteten Wirkungen auf die Zellen zugrunde liegen könnten.

Nach jeder Behandlung der Zellen mit Ozon wurde die Morphologie der Zellen im Mikroskop begutachtet und die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt. Außerdem wurde die mögliche toxische Wirkung von ozLDL auf die Zellen durch Trypanblau-Färbung überwacht.

Zusätzlich wurde mit Hilfe des Bradford-Assays der Proteingehalt in Zytosol und Kern der untersuchten Zellen bestimmt. Anhand der Tabelle 3 ist zu sehen, dass weder ozLDL noch der Stimulus LPS in den verwendeten Konzentrationen oder Bedingungen toxisch wirkte.

Behandlung der Zellen	Zellzahl (% Kontrolle) MW \pm SD n=3	Trypanblau (% der Gesamt- zellzahl) MW \pm SD n=3	Proteingehalt Zytosol Nukleus (% Kontrolle) MW \pm SD n=3	
PBS	100	5,0\pm3,0	100	100
ozPBS	97\pm15	5,9\pm1,6	100\pm1	128\pm20
LDL	104\pm42	3,0\pm2,0	98\pm1	120\pm29
ozLDL	118\pm10	4,0\pm1,2	96\pm4	110\pm5
PBS+LPS	125\pm31	4,6\pm1,1	96\pm10	98\pm15
ozPBS+LPS	102\pm16	4,4\pm1,2	103\pm3	110\pm14
LDL+LPS	112\pm29	3,5\pm1,3	95\pm10	124\pm19
ozLDL+LPS	103\pm13	6,0\pm1,8	97\pm2	99\pm9

Tabelle 3: Untersuchung der Toxizität von ozLDL. Jeweils gleiche Mengen an THP-1-Zellen wurden mit PBS, ozPBS, LDL (10 μ g/ml) oder ozLDL (10 μ g/ml) für 30 min vorinkubiert und dann entweder unstimuliert gelassen oder mit 10 μ g/ml LPS für 1 h stimuliert. In drei unabhängigen Experimenten wurde die Zellzahl mittels mikroskopischer Zellzählung bestimmt. Die Zellzahl in der nur mit PBS behandelten Proben wurde als 100 % definiert (MW \pm SD). Bei den Trypanblau-Tests sind die Ergebnisse in % toter Zellen von der Gesamtzahl angegeben (MW \pm SD, n=3). Der Proteingehalt in Zytosol und Kern von drei unabhängigen Experimenten wurde mit dem Bradford-Assay bestimmt. Die Proben, die nur mit PBS behandelt wurden, sind als 100 % definiert und die Ergebnisse als MW \pm SD angegeben.

3.2.5 ozLDL zeigt nur einen geringen Effekt auf die Zellvitalität

Ein Zellvitalitätstest diente zur weiteren Untersuchung der Toxizität von ozLDL. Die Zellen wurden wie in Abschnitt 3.2.3 vorbehandelt und mit 10 µg/ml LPS bzw. 2ng/ml TNF stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit dem Kit-Reagenz (siehe Abschnitt 2.2.5) inkubiert, um deren metabolische Aktivität zu ermitteln. Die ATP-Konzentrationen zeigen, dass ozLDL die Vitalität der Zellen nicht beeinträchtigt (Tab. 4).

Behandlung der Zellen	Zellvitalitäts- Test (% Kontrolle) MW±SD (n=4)
PBS	100
ozPBS	111±20
LDL	115±27
ozLDL	96±12
PBS+LPS	90±13
ozPBS+LPS	101±23
LDL+LPS	83±14
ozLDL+LPS	93±8

Tabelle 4: ozLDL hat kaum einen Einfluss auf die Zellvitalität. THP-1-Zellen wurden entweder mit PBS, ozPBS, 10 µg/ml LDL oder 10 µg/ml ozLDL für 30 min vorinkubiert und anschließend entweder unstimuliert belassen oder mit 10 µg/ml LPS für 1 h stimuliert. Der Zellvitalitätstest stellt die ATP-Konzentrationen der stimulierten Proben in Prozent zu der ATP-Konzentration in nur mit PBS behandelten Zellen (100 % Kontrolle) dar (MW ± SD, n=4).

TNF wurde bei dieser Untersuchung als zweiter Stimulus verwendet, da TNF NF-κB über einen anderen Signalkaskadeweg als LPS aktiviert (siehe Abschnitt 1.2.2 und 1.2.3). Daher war die Messung, ob mit ozoniertem PBS oder mit ozoniertem LDL vorbehandelte und mit

TNF stimulierte Zellen im Zellvitalitätstest beeinträchtigt sind, für die weiteren Versuche interessant (Tab. 5). Auch in mit TNF stimulierten Zellen konnte mittels Zellvitalitätstest keine Beeinträchtigung des Zellstoffwechsels nach Inkubation in ozPBS oder ozLDL festgestellt werden.

Behandlung der Zellen	Zellvitalitäts- Test (% Kontrolle) MW±SD (n=4)
PBS	100
PBS+TNF	110±45
ozPBS+TNF	122±53
LDL+TNF	131±91
ozLDL+TNF	123±57

Tabelle 5: Fehlender Einfluss von ozLDL auf die Zellvitalität. THP-1-Zellen wurden entweder mit PBS, ozPBS, 10 µg/ml LDL oder 10 µg/ml ozLDL für 30 min vorinkubiert und anschließend entweder unstimuliert belassen oder mit 2 ng/ml TNF für 15 min stimuliert. Der Zellvitalitätstest stellt die ATP-Konzentrationen der Zellen in Prozent der ATP-Menge in der Kontrolle dar. Als Kontrolle (100 %) dienen die nur mit PBS behandelte Zellen (MW ± SD, n=4).

3.2.6 Abnahme der NF-κB-Hemmung im zeitlichen Verlauf

Um einzugrenzen, wie lange sich der hemmende Effekt von ozLDL auf die Aktivierbarkeit von NF-κB auswirkt, wurden mehrere Proben von THP-1-Zellen mit ozLDL vorinkubiert und dann unterschiedlich lang in Zellmedium ruhen gelassen (0, 2, 6, 24 h). Erst nach dieser Ruhephase wurden die Zellen mit 10 µg/ml LPS stimuliert. Mittels Gelretardierungsassays konnte die Aktivierung von NF-κB in nicht-präinkubierten THP-1 Zellen nach LPS Stimulation (Bahn 2) gezeigt werden. An den Bahnen 3 und 4 sah man (wie in Abb. 10) die vollständige Hemmung der NF-κB-Bindungsaktivität durch ozLDL nach der Stimulation mit LPS. Auch zwei Stunden nach Entfernung von ozLDL konnte man noch eine fast vollständige

Hemmung der LPS-induzierten NF- κ B-Aktivierung beobachten. Dieser hemmende Effekt von ozLDL war allerdings zu späteren Zeitpunkten (6, 24 h) deutlich reduziert (Bahnen 8, 12, 16) (Abb. 11).

Die oben beschriebenen Ergebnisse des Gelretardierungsassays wurden mittels Densitometrie quantifiziert (Abb. 12). Die Inhibierung der LPS-induzierten NF- κ B-Aktivierung nach 30-minütiger Behandlung mit ozLDL wurde als 100 % definiert (gestrichelte Linie) und die Hemmung nach den jeweiligen Zeitspannen in Prozent angegeben.

Dieses Experiment verdeutlicht, dass es sich bei dem Effekt der Hemmung der NF- κ B-Aktivität durch ozLDL um einen reversiblen Prozess handelt. Außerdem zeigt der Versuch, dass die Inhibierung der NF- κ B-Aktivität nicht auf einer direkten Interaktion zwischen ozLDL und LPS beruht, da das Ersetzen von ozLDL durch Medium nicht zu einer sofortigen Aktivierbarkeit von NF- κ B durch LPS-Stimulation führt.

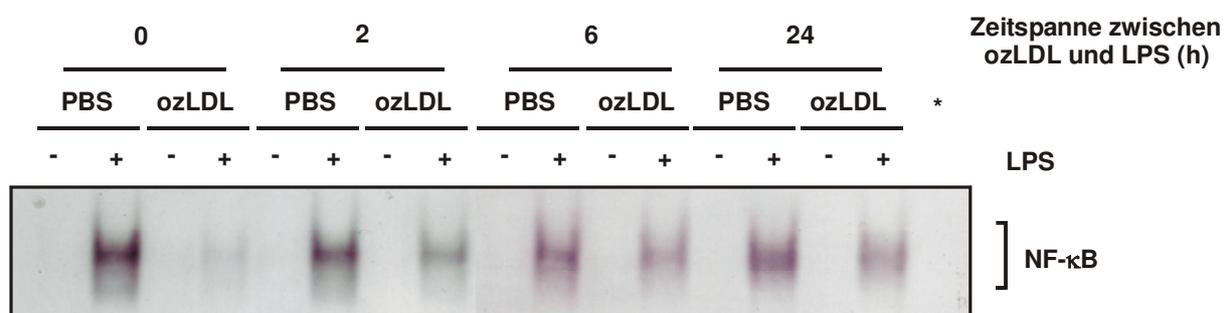


Abbildung 11: Die Hemmung der LPS-induzierten NF- κ B-Aktivierung ist reversibel. Je $1,5 \times 10^6$ /ml THP-1-Zellen wurden in PBS (Bahnen 1 und 2) oder in ozLDL (Bahnen 3 und 4) für 30 min vorbehandelt und anschließend für 1 h mit $10 \mu\text{g/ml}$ LPS stimuliert (Zeitpunkt 0 h). Für die weiteren Zeitpunkte wurden die Zellen erst 90 min mit PBS (Bahnen 5, 6, 9, 10, 13, 14) oder mit ozLDL (Bahnen 7, 8, 11, 12, 15, 16) behandelt, dann in Medium inkubiert und nach 2, 6, und 24 h mit $10 \mu\text{g/ml}$ LPS für 1 h stimuliert. Die Aktivität von NF- κ B und Sp-1 (Kontrolle hier nicht abgebildet) wurde durch Gelretardierungsassays bestimmt. In der Kompetitionsstudie (*) wurde der Extrakt der Probe 16 mit einem 100-fachen Überschuss nicht markierter Oligonukleotide präinkubiert, die die IL-8-Konsensussequenz enthielten.

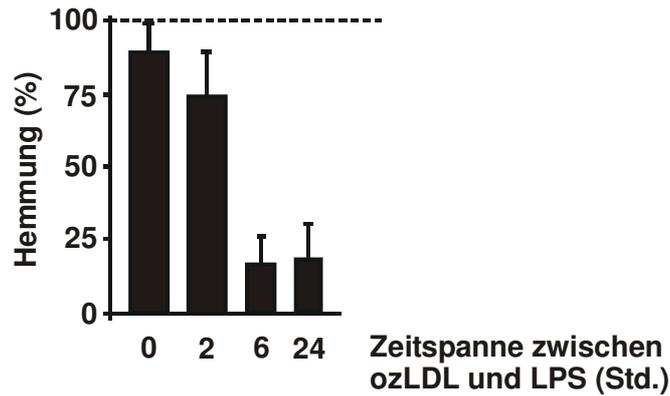


Abbildung 12: Die Hemmung der LPS-induzierten NF- κ B-Aktivierung ist reversibel. Die Proben wurden behandelt wie in Abbildung 11 beschrieben. Die Aktivität von NF- κ B wurde mit Gelretardierungsassays erfasst und densitometrisch ausgewertet (Ladungs- und Qualitätskontrolle: Sp-1). Die maximale Hemmung der Aktivierung von NF- κ B durch oxLDL wurde als 100 % definiert und die jeweiligen Ergebnisse nach 0, 2, 6 und 24 h Inkubation als Prozent davon angegeben. Es wurden je drei voneinander unabhängige Experimente gemittelt (MW \pm SD).

3.2.7 Hemmung der LPS-induzierten Aktivierung von NF- κ B durch oxLDL in verschiedenen Zelllinien

Im folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob auch in anderen Zellen, die mit Atherosklerose assoziiert sind, insbesondere in primären humanen Monozyten, der Effekt von oxLDL auf die LPS-induzierte Aktivierung von NF- κ B zu beobachten ist. Humane Monozyten wurden dazu aus Vollblut isoliert (siehe Abschnitt 2.2.1), für 30 min in 10 μ g/ml oxLDL vorbehandelt und anschließend mit 10 μ g/ml LPS stimuliert. Durch die Präinkubation mit oxLDL wurde die LPS-induzierte Zunahme der DNA-Bindung von NF- κ B im Gelretardierungsassay stark gehemmt (Abb. 13).

Eine deutliche Inhibierung der NF- κ B-Translokation bei einer Vorbehandlung mit den modifizierten Lipoproteinen zeigten auch Makrophagen, die für 8 Tage in der Zellkulturschale aus humanen Monozyten ausdifferenziert worden waren. Auch in Endothelzellen (HUVEC) konnte dieser Effekt beobachtet werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass nicht nur in dem hier verwendeten THP-1-Modell, sondern auch in humanen Monozyten und Makrophagen sowie in Endothelzellen die inhibierende Wirkung von oxLDL auf die LPS-vermittelte Aktivierung von NF- κ B stattfindet.

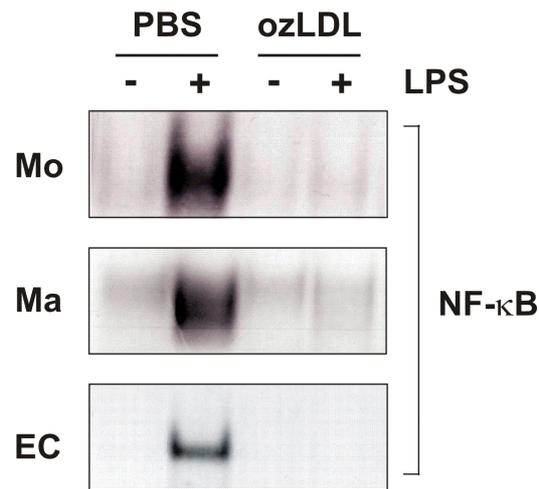


Abbildung 13: Hemmung der LPS-induzierten Aktivierung von NF- κ B durch ozLDL in Monozyten, Makrophagen und Endothelzellen. Primäre humane Monozyten (Mo), aus Monozyten differenzierte Makrophagen (Ma) und HUVEC-Zellen (EC) wurden mit 10 μ g/ml ozLDL für 30 min vorinkubiert. Anschließend wurden 10 μ g/ml LPS für 1 h zugegeben. Im Gelretardierungsassay wurde die Aktivität von NF- κ B im nukleären Extrakt dargestellt.

3.2.8 Die NF- κ B-Aktivität wird nicht durch Ozon oder Lipoproteine alleine gehemmt

Das nächste Kontrollexperiment war erforderlich, um auszuschließen, dass der inhibitorische Effekt von ozLDL auf die LPS-induzierte NF- κ B-Aktivierung auf einer direkten Wirkung des Ozon beruht. Ebenso galt es zu untersuchen, ob LDL alleine, also das nicht mit Ozon modifizierte Lipoprotein, inhibierend wirken kann. Hierzu wurden die monozytären Zellen in PBS, ozPBS (siehe Abschnitt 2.2.2), unbehandeltem LDL oder ozLDL 30 min inkubiert und anschließend mit 10 μ g/ml LPS für 1 h stimuliert. In den mit PBS, ozPBS und LDL behandelten Proben konnte eine deutliche Aktivierung von NF- κ B beobachtet werden (Abb. 14). Die Vorbehandlung mit ozLDL führte jedoch zu einer beinahe vollständigen Hemmung der NF- κ B Aktivierung, so wie bereits oben beschrieben. Somit wird deutlich, dass der inhibitorische Effekt von ozLDL alleine auf der oxidativen Modifikation von LDL beruht.

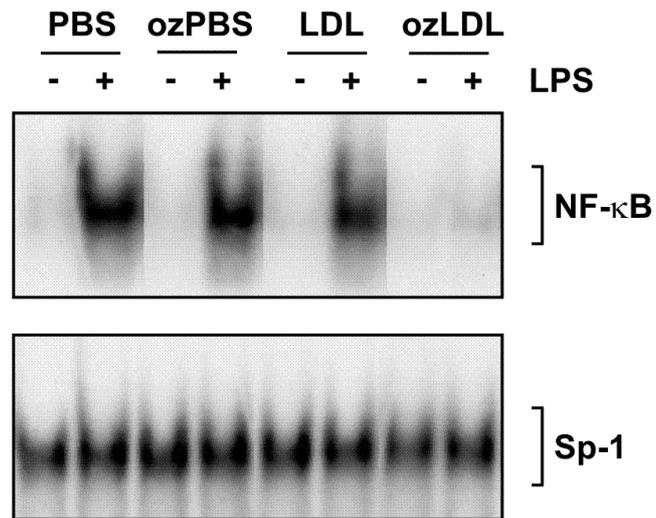


Abbildung 14: Die NF-κB-Aktivität wird nicht durch Ozon oder Lipoproteine alleine gehemmt. Monozytäre Zellen wurden mit PBS, ozPBS, 10 µg/ml LDL oder 10 µg/ml ozLDL für 30 min vorbehandelt. Anschließend wurden 10 µg/ml LPS für 1 h zugegeben. Mit Gelretardierungsassays wurde die Aktivität von NF-κB erfasst (Ladungs- und Qualitätskontrolle: Sp-1).

4. Diskussion

Diese Arbeit hat gezeigt, dass der FLT3-Rezeptor, wenn er die ITD-Mutation trägt, eine aktivierende Wirkung auf das NF- κ B-System hat. Dabei werden p50 und p65 aktiviert, ohne dass diese Proteine oder deren Inhibitoren vermehrt nachweisbar sind. Des Weiteren wurde im Rahmen dieser Arbeit herausgefunden, dass oxLDL die Aktivierbarkeit von NF- κ B durch LPS hemmt. Diese Hemmung ist in verschiedenen Zellen reproduzierbar, zeitlich reversibel und beruht nicht auf einem toxischen Effekt.

4.1 NF- κ B und FLT3

Die konstitutive, Wachstumsfaktor-unabhängige Aktivität des FLT3-ITD-Rezeptors wurde mehrfach an verschiedenen Zelllinien nachgewiesen [33, 44, 63, 72, 83, 111, 124, 130, 133, 170, 182, 218]. Bisher war bekannt, dass der FLT3-ITD-Rezeptor die AKT-Signalkaskade, STAT5/3 und den RAS/ERK-1/2-Signalweg aktiviert. Hingegen herrschte bisher noch keine absolute Klarheit darüber, ob durch den Rezeptor NF- κ B aktiviert wird [26, 121, 182].

4.1.1 Die NF- κ B-Aktivierung durch FLT3-ITD

Die Signaltransduktionswege, die durch den FLT3-WT- [25, 44, 50, 57, 71] oder den FLT3-ITD-Rezeptor [45, 63] aktiviert werden, wurden mehrfach untersucht, seltener jedoch deren Ziel, die Transkriptionsfaktoren, wie z.B. Foxo 3a [33] oder STAT [44, 45, 63, 73]. Brandts et al. haben anhand von Western Blot-Analysen die Mengen des phosphorylierten und damit aktivierten AKT in FLT3-WT-positiven und in FLT3-ITD-positiven 32D-Zellen mit und ohne Zugabe des FLT3-Liganden FL verglichen. Dies zeigte eine konstitutive Aktivierung von AKT in FLT3-ITD-positiven Zellen. Das aktivierte AKT wiederum phosphoryliert und inaktiviert dadurch den Transkriptionsfaktor Foxo3a [33]. Auf ähnliche Weise haben Choudhary et al., Gilliland et al. und Grundler et al. nachgewiesen, dass Transkriptionsfaktoren aus der STAT-Familie durch den FLT3-ITD-Rezeptor aktiviert werden. Dadurch stellte sich für uns die Frage, ob auch NF- κ B in FLT3-ITD-positiven Zellen aktiviert wird.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde die Aktivität von NF- κ B in den Zellkernen von FLT3-WT- und FLT3-ITD-positiven Zellen miteinander verglichen. Die Experimente haben gezeigt,

dass die Aktivität von NF- κ B in FLT3-ITD-positiven Zellen deutlich höher als in FLT3-WT-positiven Zellen ist. Diese Ergebnisse sind hier erstmalig anhand von Gelretardierungsassays in 32D-Zellen gewonnen worden. Vergleichbare Studien wurden bisher mit derselben Methode nur an Mef-Zellen durchgeführt [121]. Wie bereits im Kapitel Zellkultur beschrieben (siehe Abschnitt 2.2.1), handelt es sich bei den 32D-Zellen um murine hämatopoetische Zellen, in die der FLT3-WT- und der FLT3-ITD-Rezeptor stabil mit dem viralen Mig-Vektor transfiziert worden waren [33, 45, 63, 76, 77, 98, 124, 130, 132, 145, 170, 218]. Malinge et al. benutzen hingegen Mef-Zellen, eine Zelllinie aus murinen embryonalen Fibroblasten, die lediglich transient transfiziert wurde. Dabei wurden unterschiedliche Mengen des retroviralen Vektors MSCV/Neo verwendet. Nach Transfektion der Mef-Zellen mit ansteigenden Mengen von MSCV/Neo, der den mutierten FLT3-ITD-Rezeptor kodiert, konnte ein Anstieg der Aktivität von NF- κ B gemessen werden. Wurden die Mef-Zellen mit ansteigenden Mengen des Vektors transfiziert, der den FLT3-WT-Rezeptor kodiert, wurde ebenfalls ein Anstieg der Aktivität von NF- κ B gemessen. Genauso wie wir haben Malinge et al. die Aktivität von NF- κ B mit dem Gelretardierungsassay gemessen und ebenso wie in unseren Ergebnissen ist auch bei den Gelretardierungsassays von Malinge et al. eine deutlich höhere NF- κ B-Aktivität in den FLT3-ITD-positiven Mef-Zellen gemessen worden, als in den FLT3-WT-positiven Mef-Zellen [121].

Eine andere Publikation wiederum beschreibt die Expression des durch NF- κ B induzierten Zytokins IL-6 [182]. Takahashi et al. benutzen dazu Ba/F3-Zellen, eine murine hämatopoetische Zelllinie, die den FLT3-WT-Rezeptor stabil überexprimiert. Mit quantitativer PCR wurde IL-6 gemessen, nachdem die Ba/F3-Zellen mit verschiedenen Inhibitoren, die die NF- κ B-Signalkaskade blockieren, vorbehandelt worden waren [182]. Deren Arbeit zeigt, dass Zellen, in denen FLT3 überexprimiert wird, vermehrt IL6 produzieren. Somit postulieren Takahashi et al., dass der FLT3-Rezeptor NF- κ B aktiviert. Diese These ähnelt unserer Arbeitshypothese, dass der aktive FLT3-ITD-Rezeptor NF- κ B stärker aktiviert als der inaktive FLT3-WT-Rezeptor. Jedoch unterscheiden sich die Arbeiten darin, dass wir den mutierten FLT3-ITD-Rezeptor untersucht haben und die Bindungsaktivität des NF- κ B direkt mit Gelretardierungsassays nachgewiesen haben.

Da von NF- κ B bereits bekannt ist, dass es die Zellproliferation aktiviert [10, 29, 61], korreliert das Resultat, dass in FLT3-ITD-positiven Zellen die Aktivität von NF- κ B größer ist als in FLT3-WT-positiven Zellen, mit den Ergebnissen anderer Studien, wonach die Aktivierung der FLT3-Signalkaskade eine entscheidende Rolle bei Proliferation von malignen Zellen [63, 64, 77, 95, 180] und bei physiologischen Prozessen wie Proliferation von

Vorläuferzellen des Bluts [1], Antiapoptose und Überleben der Zelle [165] spielt. Somit könnte NF- κ B maßgeblich an dem malignen Zellwachstum der FLT3-ITD-positiven Zellen beteiligt sein. Unsere Beobachtung, dass die Aktivität von NF- κ B in FLT3-ITD-positiven Zellen hochreguliert ist, ist auch mit den Ergebnissen anderer Studien vereinbar, nach denen der FLT3-ITD-Rezeptor konstitutiv aktiviert ist und in diesen Zellen unabhängig von Wachstumsfaktoren den AKT-Signalweg aktiviert [33, 45, 63, 124, 132, 170], da AKT in der Lage ist, den NF- κ B-Weg zu aktivieren [78, 124, 138, 152]. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass in den FLT3-ITD-positiven Zellen NF- κ B durch den FLT3-ITD-Rezeptor via AKT aktiviert wird. Die Aktivierung von AKT durch den FLT3-Rezeptor könnte in weiteren Studien untersucht werden.

4.1.2 Die NF- κ B-Untereinheiten

Die in dieser Studie vorliegende Untersuchung der Untereinheiten von NF- κ B ergab, dass durch den FLT3-ITD-positiven Rezeptor überwiegend das NF- κ B-Dimer p65-p50 aktiviert wird (siehe 3.1.2). Dieses Resultat ist nicht erstaunlich, da dieses Dimer an den meisten durch NF- κ B regulierten Prozessen beteiligt ist [13, 21, 32, 113, 189, 207]. Der Komplex aus p50-p50 hat überwiegend eine inhibierende Wirkung auf die Transkription, da ihm die Transaktivierungsdomäne TAD fehlt [40, 53, 114]. p50-c-Rel-Komplexe wirken wiederum aktivierend auf die Transkription [10, 74, 162, 191]. Da das Dimer aus p65 und p50 im Zellkern die Transkription von Genen bewirken kann, die für Zellwachstum, Produktion von Wachstumsfaktoren und Hemmung der Apoptose zuständig sind [13, 21, 189, 207], könnte die gesteigerte Aktivität von NF- κ B in FLT3-ITD-positiven Zellen an dem ligandunabhängigen Wachstum dieser Zellen beteiligt sein.

Die in den FLT3-WT-Zellen vorliegenden NF- κ B-Komplexe bestehen zwar auch aus den Untereinheiten p65 und p50 (Abbildung 3, 3.1.2), deren Bindungsaktivität ist im Gelretardierungsassay allerdings deutlich geringer, als die NF- κ B Aktivität der FLT3-ITD-positiven Zellen. Das deutet darauf hin, dass auch in den FLT3-WT-positiven Zellen NF- κ B maßgeblich an Wachstum, Proliferation und Produktion von Wachstumsfaktoren beteiligt sein kann, ohne Ligandaktivierung jedoch sehr geringe Auswirkungen hat. Hayakawa et al. haben an BA/F3-Zellen mit Trypan-Blau-Färbung gezeigt, dass die FLT3-WT-positiven Zellen ohne FL- oder IL3-Stimulation nach zwei Tagen größtenteils abgestorben sind, mit FL-Stimulation ihre Zahl verdoppelt haben und die FLT3-ITD-positiven Zellen nach zwei Tagen unabhängig ob mit oder ohne Cytokin-Stimulation ihre Population verachtfacht haben [83].

4.1.3 Nachweis von p50 und p65

Nachdem mittels Gelretardierungsassay in den FLT3-ITD-positiven 32D-Zellen eine deutlich höhere Aktivität von NF- κ B als in den FLT3-WT-positiven Zellen gemessen worden war, stellte sich die Frage, ob die mutierten Zellen vielleicht mehr von diesem Transkriptionsfaktor bilden und somit mehr NF- κ B-Moleküle in deren Zellkernen nachweisbar sind. Zu diesem Zweck wurden die Mengen von p50 und p65 im Zytosol und im Nukleosol mit Western Blot gemessen. Unsere Experimente zeigten nur geringe, nicht signifikante Anstiege an p50 und p65 in den mutierten Zellen gegenüber den WT-Zellen. Diese Beobachtung legt nahe, dass die erhöhte Aktivität von NF- κ B nicht auf eine erhöhte Expression der NF- κ B-Untereinheiten zurückzuführen ist. In der Literatur wird beschrieben, dass eine gesteigerte Aktivität durch Phosphorylierung von NF- κ B erfolgt [13, 61]. Außerdem wäre eine Regulation der transkriptionellen Aktivität von NF- κ B auf nukleärer Ebene auch durch Co-Aktivatoren möglich. Ein Molekül, das mit NF- κ B interagieren und dessen Funktion modifizieren kann, ist C/EBP β [104, 105, 147]. Die Untersuchung von C/EBP β in FLT3-WT- und in FLT3-ITD-positiven Zellen wird in 4.1.6 näher beschrieben.

4.1.4 Nachweis von I κ B α und I κ B β

Abgesehen von der Aktivierung des p65-p50 Dimers durch Phosphorylierung oder Co-Aktivatoren ist für die Aktivität von NF- κ B entscheidend, ob es von seinen Inhibitormolekülen gebunden und im Zytosol zurückgehalten wird. Daher wurden in dieser Studie auch die Mengen der Inhibitorproteine I κ B α und I κ B β gemessen. Wenn ein Stimulus die NF- κ B Signalkaskade aktiviert, werden die I κ B-Proteine phosphoryliert, mit Ubiquitin markiert und mittels Proteasom proteolysiert [10, 70, 92, 184]. Die Phosphorylierung von I κ B erfolgt durch die zwei Proteinkinasen IKK α und IKK β . Diese liegen im Cytosol meist in einem Komplex gebunden mit der regulatorischen Untereinheit IKK γ oder NEMO vor. Die meisten Signaltransduktionswege, über die NF- κ B aktiviert werden kann, münden in der Aktivierung des IKK-Komplexes [78].

Erst wenn I κ B proteolysiert ist, wird NF- κ B freigesetzt und kann in den Zellkern wandern. Daher wäre eine reduzierte Zahl an I κ B Molekülen in FLT3-ITD-positiven Zellen eine Erklärung für die gesteigerte Aktivität von NF- κ B gewesen. Anders als erwartet haben unsere Experimente jedoch ergeben, dass nur kleine Schwankungen in der Proteinkonzentration von I κ B auftraten, welche die erhöhte nukleäre Bindungsaktivität von NF- κ B nicht erklären können. Dieses Ergebnis bestärkt die oben in 4.1.3 beschriebene Vermutung, dass NF- κ B hier

nicht über den üblichen Weg, durch Phosphorylierung und proteasomalen Abbau seiner Inhibitoren I κ B α und I κ B β aktiviert wird, sondern dass an diesem Aktivierungsprozess Co-Aktivatoren beteiligt sind.

4.1.5 IL-3 und FLT3-WT-positive 32D-Zellen

Unser Experiment, ob der Wachstumsfaktor IL-3, welchen wir für die Zellkultur der 32D-Zellen verwendeten, die Expression von NF- κ B in FLT3-WT-positiven 32D-Zellen beeinflusst, zeigte keinen relevanten NF- κ B Anstieg bei unterschiedlichen Dosen von IL-3. Im Gegensatz dazu zeigte sich nach Inkubation mit ansteigenden Mengen des physiologischen FLT3-Rezeptorliganden FL in FLT3-WT-positiven 32D-Zellen bei Haas et al. ein relevanter Anstieg von C/EBP β -LIP und dem LIP/LAP-Verhältnis [77]. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Wachstumsfaktor IL-3 gut geeignet ist, um die FLT3-WT-positiven Zellen in Zellkultur am Leben zu halten und zu vermehren, ohne dabei NF- κ B zu aktivieren. Somit handelt es sich bei der im Gelretardierungsassay in Abbildung 1 und 3 des Ergebnisteils gezeigten geringen Aktivität von NF- κ B in FLT3-WT-positiven Zellen um eine IL-3-unabhängige konstitutive Aktivität von NF- κ B. Wird dagegen der FLT3 Ligand FL zur Kultivierung der Zelllinie 32D verwendet, könnte die Aktivierung von C/EBP β gegebenenfalls eine indirekte Aktivierung von NF- κ B hervorrufen, was einen objektiven Vergleich zwischen der intrinsischen Aktivität von NF- κ B in FLT3-WT- und in FLT3-ITD-positiven Zellen erschwert.

4.1.6 C/EBP β und NF- κ B

Wie oben bereits erläutert, gibt es auf nukleärer Ebene Co-Aktivatoren, die mit NF- κ B gemeinsam agieren und gegebenenfalls dessen Bindungsaktivität an die DNA verstärken. Ein solcher Co-Aktivator kann C/EBP β sein. C/EBP β ist ähnlich wie NF- κ B an der Transkription von Genen beteiligt, die für Wachstum, Differenzierung, Proliferation oder Inflammation zuständig sind [147]. Es wurde bereits in früheren Studien gezeigt, dass C/EBP β mit p50 interagieren kann [104, 144, 147, 174]. Daher galt es im nächsten Schritt die Mengen von C/EBP β in FLT3-ITD-positiven und in FLT3-WT-positiven Zellen zu vergleichen. In dieser Studie wurden in FLT3-ITD-positiven Zellen deutlich höhere Mengen an C/EBP β als in FLT3-WT-positiven Zellen gemessen. Auch Haas et al. haben gesteigerte LIP Levels in FLT3-ITD-positiven Zellen im Vergleich zu FLT3-WT-Zellen gesehen [77]. Gesteigerte Mengen an LIP oder ein Anstieg des LIP/LAP-Verhältnisses sind mit Proliferation assoziiert

[36, 91] und wahrscheinlich an der Entstehung von Lymphomen oder Leukämien beteiligt [145]. Unter den C/EBP β -Untereinheiten wirkt LIP inhibierend auf die Transkription, da ihm die transaktivierende Domäne am N-terminalen Ende fehlt. Während LAP und LAP* an der Vermittlung von Differenzierung und Antiproliferation beteiligt sind, hemmt LIP deren Transaktivierungsaktivität und fördert dadurch die Proliferation [77, 145].

4.1.7 Klinisch-therapeutische Relevanz von FLT3

Der Organismus besitzt mehrere Abwehrmechanismen, um zu verhindern, dass maligne Tumore entstehen. Dazu gehören angeborene und erworbene Prozesse des Immunsystems, antiproliferative transkriptionelle Programme und Apoptose [30, 128, 136]. Wenn einer dieser Schutzmechanismen defekt ist, kann ein maligner Tumor entstehen. Normale Zellen brauchen ein Signal von einem Wachstumsfaktor, um sich aus dem ruhenden Stadium des Zellzyklus in einen aktiven, proliferativen Status zu bewegen. Diese Signale werden der Zelle durch Rezeptoren, welche in der Zellmembran liegen, vermittelt. Tumorzellen hingegen vermehren sich Wachstumsfaktor-unabhängig [82].

Daher ist der FLT3-Rezeptor, nachdem er auf der Oberfläche von AML Zellen entdeckt worden war, als mögliches Ziel für Pharmakotherapie der AML ins Augenmerk der Forscher gerückt [26, 69, 111, 218]. Der FLT3-Rezeptor befindet sich in der Regel auf hämatopoetischen Stamm- und Vorläuferzellen. Physiologisch wird er durch seinen Liganden FL aktiviert, während der durch die ITD mutierte Rezeptor permanent und Ligand-unabhängig aktiviert ist. Für die AML-Patienten, in deren Blasten dieser mutierte FLT3-ITD-Rezeptor gemessen wurden, bedeutet dies eine besonders schlechte Prognose [77, 161, 180].

Eine Reihe kleiner Tyrosinkinaseinhibitoren (TKIs), welche gegen FLT3 eingesetzt werden können, wurde bereits entdeckt. Zu diesen TKIs gehören zum Beispiel Herbimycin, AG1295 und AG1296 [107, 108, 168, 188, 194, 216]. Sie zeigten eine zytotoxische Wirkung auf genau die Blasten, die den FLT3-ITD-Rezeptor tragen. Weitere TKIs, die bereits klinisch erprobt wurden sind CEP-701, MLN518 oder PKC412. CEP701 wird auch Lestaurtinib genannt und ist ein Indolcarbazolderivat. Dabei handelt es sich um ein kleines Molekül, das die Phosphorylierung des aktivierten FLT3-Rezeptors Dosis-abhängig inhibiert, in dem es sich in die Tasche des Rezeptor setzt, in der sonst ATP gebunden wird. Somit kann ATP den Rezeptor nicht phosphorylieren und die Signalkaskade des FLT3-ITD-Rezeptors ist unterbrochen [168]. In Blutproben von an AML erkrankten Kindern bewirkte Lestaurtinib eine signifikant höhere Zytotoxizität bei FLT3-ITD-positiven Zellen, als bei FLT3-WT-

positiven Zellen [34]. Als Lestaurtinib in der klinischen Phase 1 und 2 als Monotherapie an Patienten getestet wurde, zeigten sich erste Erfolge, wie signifikante Senkungen der peripheren Leukämie- und der Knochenmarksblasten [24, 169]. Auch MLN518, ein Piperazinyl-Quinazolin und PKC412, ein N-Benzolystaurosporin wurden in klinischen Studien Phase 1 getestet und erreichten eine Reduktion der FLT3-ITD-positiven Zellen [116, 194].

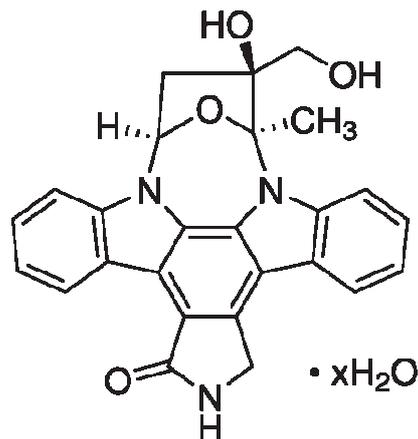


Abbildung 15: Die Strukturformel des FLT3-Inhibitor CEP701. Dieser Tyrosinkinaseinhibitor ist ein Indolcarbazolderivat und hemmt FLT3, indem es an die ATP-Tasche bindet.

4.2 NF- κ B und ozonierte Lipoproteine

In der Vergangenheit haben zahlreiche Studien gezeigt, dass in leukämischen Zellen, speziell in den Zellen der AML, NF- κ B dysreguliert und konstitutiv aktiviert ist [139]. Demzufolge wurden viele Versuche unternommen, NF- κ B als Ziel für Medikamente im Rahmen von Chemotherapien gegen Tumorerkrankungen zu nutzen [56]. In dieser Studie wurden diese Ansätze ergänzt, indem gezeigt wurde, wie NF- κ B mit ozonierten Lipoproteinen inhibiert werden kann.

Studien haben gezeigt, dass sich Ozon in atherosklerotischen Läsionen von Arterien befindet [200]. Im arteriosklerotischen Gewebe, welches durch Endarteriektomie der Arteria carotis gewonnen wurde, hat man Steroide nachgewiesen, die ausschließlich durch die Ozonierung von Cholesterol entstehen [200]. Somit kann man vermuten, dass Ozon während der Entstehung der arteriosklerotischen Läsion gebildet wird. Wenn arteriosklerotisches Gewebe aus der Plaque kultiviert und *in vitro* aktiviert wurde, konnte eine Zunahme dieser Ozon-spezifischen Produkte festgestellt werden [200]. Somit könnte Ozon eine besondere Rolle bei

der Entstehung der arteriosklerotischen Plaque einnehmen [125]. Mithilfe von Antikörpern, die in der Lage sind, die chemische Reaktion von Wasser und molekularem Sauerstoff zu Ozon zu katalysieren [199], wurde nachgewiesen, dass neutrophile Granulozyten, die entsprechende Antikörper auf ihrer Oberfläche tragen, in der Lage sind, Ozon zu produzieren [9].

Arteriosklerotische Plaques entstehen, wenn sich LDL in die Gefäßwand einlagert, wo es von Schaumzellen phagozytiert wird, die aus Makrophagen entstanden sind [109]. Da NF- κ B eine zentrale Rolle bei der Pathogenese der Arteriosklerose spielt [13, 31, 32, 38], galt es hier zu untersuchen, welchen Einfluss ozoniertes LDL auf NF- κ B ausübt. Während LDL eine wichtige physiologische Rolle beim Transport von Cholesterin in die peripheren Gewebe spielt, bedeutet ein hohes LDL-Level eine erhöhte Gefahr durch Arteriosklerose. Die hier vorliegende Arbeit beschreibt, wie man LDL mit Ozon modifizieren kann und wie dieses Molekül auf die Aktivierung von NF- κ B wirkt. Bisher wurde noch von keiner anderen Arbeitsgruppe dieses neue Molekül ozLDL untersucht und seine Wirkung auf NF- κ B gemessen. Jedoch zeigten auch Produkte der Ozonierung von Cholesterin, zum Beispiel das 5 α ,6 α -Cholesterinepoxid und das von Wentworth et al. identifizierte 5,6-Secosterol hemmende Effekte auf die NF- κ B-Aktivität [200].

4.2.1 TBARS

Nachdem wir durch die Ozonierung von LDL ozLDL hergestellt hatten, musste noch untersucht werden, welche Nebenprodukte bei der Ozonierung von Lipiden entstehen und ob diese den beobachteten Effekt auf NF- κ B hervorrufen. Die „thiobarbituric acid reactive substances“ entstehen, wenn mehrfach ungesättigte Fettsäuren oxidativ gespalten werden. Dazu gehört zum Beispiel Malondialdehyd. Die TBARS-Untersuchungen lassen keine Korrelation zwischen der Hemmung von NF- κ B und der Malondialdehyd-Produktion erkennen. Cappello et al. haben untersucht, ob die NF- κ B Inhibierung durch ozoniertes LDL bei unterschiedlichen Mengen an Malondialdehyd auch unterschiedlich ausfällt. Dabei wurden keine signifikanten Schwankungen gemessen. Somit kann gefolgert werden, dass dem Malondialdehyd keine inhibierende Wirkung auf NF- κ B zuzuschreiben ist.

4.2.2 Charakterisierung von ozLDL

In dieser Studie sollten die Veränderungen von LDL-Cholesterin untersucht werden, um die Zusammensetzung von ozLDL näher zu charakterisieren, da in der Literatur ein Produkt der Ozonierung von Cholesterin als Bestandteil des arteriosklerotischen Plaques beschrieben und Cholesterin ein wichtiger Bestandteil von LDL ist [200]. Der Cholesterinoxidase-Versuch zeigt, dass sich in ozLDL wenig Cholesterinester und kein freies Cholesterin befinden, wohingegen in LDL und oxLDL reichlich freies und verestertes Cholesterin zu messen war. Daraus lässt sich folgern, dass es sich bei ozLDL um eine neue Substanz handelt, die sich deutlich von dem bereits gut erforschten oxLDL [32, 81, 175] unterscheidet. Somit können die aus den Experimenten mit oxLDL gewonnenen Erkenntnisse nicht auf ozLDL übertragen werden.

4.2.3 Hemmung der NF- κ B Aktivierung durch ozLDL

Die in 3.2.3 beschriebenen Experimente haben gezeigt, dass mit Ozon behandeltes LDL in der Lage ist, das NF- κ B-System in der monozytären Zelllinie THP-1 zu inhibieren. Die THP-1-Zellen wurden mit LPS stimuliert und der Effekt einer erhöhten NF- κ B-Aktivität blieb in den mit ozLDL vorbehandelten Zellen aus. Diese Hemmung wurde allein durch die Modifikation des Lipoproteins verursacht, da weder ozoniertes PBS noch unbehandeltes LDL eine hemmende Wirkung hervorriefen. Nach Vorinkubation mit ozLDL konnte in monozytären THP-1-Zellen eine nahezu vollständige Hemmung der durch LPS induzierten NF- κ B-Aktivierung gezeigt werden. Somit wird deutlich, dass ozLDL einen großen Einfluss auf die Aktivität von NF- κ B hat, der zu einer bedeutenden Wirkung in der atherosklerotischen Läsion führen kann.

4.2.4 Toxizitätstests

Diese Hemmung basiert nicht auf einem zytotoxischen Effekt, wie die weiteren Experimente zeigten. Da es sich bei Ozon um ein hochreaktives und aggressives Agens handelt [151], musste streng überwacht werden, ob die beobachteten Effekte von ozLDL nicht auf einer toxischen Wirkung beruhten. Da es sich bei der Inhibierung der LPS-vermittelten NF- κ B-Aktivierung um einen reversiblen Effekt handelt, war eine toxische Wirkung des ozLDL unwahrscheinlich. Außerdem beeinflusste die Behandlung mit ozLDL in den Experimenten weder den konstitutiven Transkriptionsfaktor Sp-1, noch das Strukturprotein Aktin. Bei der

Beobachtung der Zellmorphologie und der Zellzahl unter dem Mikroskop, sowie nach Auswertung der abgestorbenen Zellen mit Trypanblau-Färbung oder Messung des Proteingehalts mittels Bradford-Assay konnte kein toxischer Effekt auf die mit ozLDL behandelten Zellen nachgewiesen werden. Auch die anhand der ATP-Konzentration (Kit-Reagenz, beschrieben in 3.2.5) ermittelte Zellvitalität von LPS- oder TNF-stimulierten Monozyten wurde von ozLDL nicht beeinträchtigt.

4.2.5 Die NF- κ B-Hemmung im zeitlichen Verlauf

In den Versuchen von 3.2.6 zeigt sich, dass der hemmende Effekt von ozLDL nach einiger Zeit abnimmt. Nach der Inkubation von THP-1-Zellen mit ozLDL ist die Aktivierbarkeit von NF- κ B durch LPS zunächst vollkommen gehemmt. Dieser Effekt ist nach zwei Stunden noch zu sehen, aber etwas abgeschwächt. Nach sechs bzw. 24 Stunden ist NF- κ B in den THP-1-Zellen, die zuvor in ozLDL inkubiert waren, wieder deutlich stärker mit LPS aktivierbar, wengleich ein leichter hemmender Effekt auch nach 24 Stunden noch anhält. Diese Reversibilität des hemmenden Effekts legt nahe, dass die Hemmung der NF- κ B-Aktivierbarkeit durch ozLDL nicht auf eine toxische Wirkung des ozLDL auf die THP-1-Zellen zurückzuführen ist.

Dieser Versuch zeigt auch deutlich, dass der hemmende Effekt von ozLDL auf die Aktivierbarkeit von NF- κ B nicht auf einer Interaktion zwischen LPS und ozLDL außerhalb der Zelle beruht, da die Zellen nach der Vorinkubation mit ozLDL für ihre jeweilige Ruhephase in ozLDL-freiem Medium inkubiert werden. Erst dort erfolgt die Stimulation mit LPS. Somit muss der hemmende Effekt von ozLDL im Inneren der Zelle erfolgen.

Sollte ozLDL therapeutisch bei chronisch entzündlichen Erkrankungen genutzt werden, wie gasförmiges Ozon bei Colitis ulcerosa [60] oder gelöstes Ozon zur Therapie von Infektionen [27] und in der Zahnheilkunde [80], definiert dieses Experiment über die zeitliche Reversibilität der NF- κ B Hemmung einen zeitlichen Rahmen für die ozLDL Wirkung und liefert Anhaltspunkte dafür, wann ggf. eine Behandlung wiederholt werden müsste.

4.2.6 Reproduzierbarkeit des Effekts in verschiedenen Zellen

Ebenso wie in den oben beschriebenen THP-1-Zellen ließ sich der hemmende Effekt von ozLDL auf die Aktivierbarkeit von NF- κ B in mit LPS stimulierten Zellen auch bei primären menschlichen Monozyten, welche aus Vollblut gewonnen worden waren, beobachten. Säte

man diese Monozyten in 24-Well-Kulturplatten aus und gab THP-1-Medium sowie nicht-essentielle Aminosäuren hinzu (wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben), so differenzierten sie nach 24 Stunden zu adhärenen Monozyten und nach 8 Tagen zu Makrophagen. Auch in diesen ausdifferenzierten Makrophagen, zeigte sich die Reduktion der LPS-abhängigen Aktivierbarkeit von NF- κ B nach Inkubation der Zellen in ozLDL. Derselbe Effekt war auch an endothelialen HUVEC Zellen zu beobachten. Das bedeutet, dass unsere im Modell anhand der THP-1 Zellen beobachtete Wirkung von ozLDL auf NF- κ B durchaus auf die Zellen übertragbar ist, die im menschlichen Körper an der Bildung von atherosklerotischen Plaques beteiligt sind.

Die Tatsache, dass die Hemmung der Aktivierbarkeit von NF- κ B durch ozLDL in verschiedenen Zellen nachgewiesen werden konnte, gibt nur einen kleinen Anhalt dafür, wie vielseitig ozLDL möglicherweise einsetzbar wäre. Vielleicht beruht der positive Effekt, den Ozon bei der extrakorporalen Ozon-Eigenblutbehandlung auf Patienten mit arterieller Verschlusskrankheit hat, auf dieser Wirkung von ozLDL auf NF- κ B [27]. Ähnliches könnte sogar in der Orthopädie für die Behandlung von Bandscheibenvorfällen beim Einsatz von Ozon eine Rolle spielen [6, 27].

4.2.7 Ausblick

Zusammengefasst lassen diese Ergebnisse nur erahnen, wofür ozLDL noch eingesetzt werden könnte. Ein neuer Ansatz, die hemmende Wirkung von ozLDL auf NF- κ B zu untersuchen wäre, dieses Experiment einmal an 32D Zellen zu testen. Interessant wäre nicht nur, ob sich die NF- κ B Aktivität in FLT3-ITD-positiven Zellen hemmen ließe, sondern ob dadurch auch das maligne, Ligand-unabhängige Zellwachstum zu stoppen wäre. Wenn ozLDL so wirkungsvoll Entzündungen hemmt, wie es in unseren Experimenten NF- κ B inhibiert hat, dann sollte versucht werden, ozLDL in Infusionslösungen oder Injektionslösungen anzuwenden.

5. Zusammenfassung

Der FLT3-Rezeptor ist ein auf hämatopoetischen Vorläuferzellen vorkommender transmembranärer Rezeptor, dessen Signalkaskaden aktiviert werden, sobald der Rezeptor durch seinen Liganden aktiviert wird. Das Auftreten einer ITD-Mutation führt zu einer konstitutiven Aktivierung des FLT3-Rezeptors, daher bedeutet dessen Nachweis im Blut von an AML erkrankten Patienten eine schlechtere Prognose. Die Transkriptionsfaktoren NF- κ B/Rel spielen eine zentrale Rolle bei immunologischen, entzündlichen und malignen Erkrankungen. Eine Dysregulation des NF- κ B-Systems wird bei der Entstehung von Arteriosklerose genauso wie bei der Entstehung von malignen Tumoren angenommen.

Das Ziel des ersten Teils dieser Arbeit war es herauszuarbeiten, ob ein Zusammenhang zwischen der gesteigerten Aktivität des FLT3-Rezeptors mit ITD-Mutation und der Aktivität von NF- κ B besteht. Dazu wurden FLT3-ITD-positive Zellen mit FLT3-WT-Zellen verglichen und im Hinblick auf die Aktivität von NF- κ B untersucht. Zusätzlich wurden die Untereinheiten von NF- κ B identifiziert und quantitativ gemessen. Außerdem wurde die Mengen der Inhibitorproteine von NF- κ B, I κ B α und I κ B β , im Cytosol sowie im Nukleus bestimmt. Es zeigte sich, dass die NF- κ B Bindungsaktivität in FLT3-ITD-positiven Zellen deutlich höher als in FLT3-WT-Zellen ist. Jedoch sind die Mengen an p50 und p65, sowie die Mengen an I κ B α und I κ B β in beiden Zellen annähernd gleich. Daher wurde eine Steigerung der NF- κ B Aktivität über Co-Aktivatoren postuliert. Da ein solcher Co-Aktivator C/EBP β sein könnte, wurden in den FLT3-WT- und in den FLT3-ITD-positiven Zellen auch die zytosolischen Mengen von LAP, LAP* und LIP untersucht. Dieser Versuch hat in den FLT3-ITD-positiven Zellen deutlich höhere Mengen an C/EBP β gezeigt. Ein Einfluss des Wachstumsfaktors IL-3 auf diese Ergebnisse wurde ausgeschlossen.

Neuere Studien haben ein Vorkommen von Ozon in atherosklerotischen Plaques nachgewiesen. Dieses wird möglicherweise durch Leukozyten zusammen mit ihren Antikörpern produziert. Im zweiten Teil dieser Arbeit galt es, den Einfluss von oxLDL auf NF- κ B zu untersuchen. Die Vorinkubation mit oxLDL führte zu einer reversiblen Hemmung der LPS-vermittelten Aktivierung von NF- κ B in verschiedenen Zelltypen. Dabei wurden Zellen untersucht, die an der Erkrankung Arteriosklerose beteiligt sind: Monozyten, Makrophagen und Endothelzellen. Mit verschiedenen Kontrollexperimenten wurde ausgeschlossen, dass der oben beschriebene Effekt auf einer Wirkung von Ozon, LDL oder PBS allein beruht. Außerdem konnte mit weiteren Versuchen gezeigt werden, dass die Hemmung der NF- κ B Aktivität nicht auf einen toxischen Effekt zurückzuführen ist. Es konnte

auch keine direkte Korrelation der TBARS-Werte mit den beobachteten Effekten von ozLDL auf die Zellen festgestellt werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass ozLDL ein großes therapeutisches Potential birgt, wenn man es als Hemmer des NF- κ B-Systems in entzündlichen oder in malignen Erkrankungen einsetzen könnte.

6. Literatur

- 1 Akashi, K., Traver, D. and Zon, L.I., The complex cartography of stem cell commitment, *Cell*, 121 (2005) 160-2.
- 2 Akira, S. and Kishimoto, T., NF-IL6 and NF-kappa B in cytokine gene regulation, *Adv Immunol*, 65 (1997) 1-46.
- 3 Akira, S. and Takeda, K., Toll-like receptor signalling, *Nat Rev Immunol*, 4 (2004) 499-511.
- 4 Alam, T., An, M.R. and Papaconstantinou, J., Differential expression of three C/EBP isoforms in multiple tissues during the acute phase response, *J Biol Chem*, 267 (1992) 5021-4.
- 5 Alexopoulos, N. and Raggi, P., Calcification in atherosclerosis, *Nat Rev Cardiol*, 6 (2009) 681-8.
- 6 Andreula, C.F., Simonetti, L., De Santis, F., Agati, R., Ricci, R. and Leonardi, M., Minimally invasive oxygen-ozone therapy for lumbar disk herniation, *AJNR Am J Neuroradiol*, 24 (2003) 996-1000.
- 7 Arsalane, K., Gosset, P., Vanhee, D., Voisin, C., Hamid, Q., Tonnel, A.B. and Wallaert, B., Ozone stimulates synthesis of inflammatory cytokines by alveolar macrophages in vitro, *Am J Respir Cell Mol Biol*, 13 (1995) 60-8.
- 8 Ashburner, B.P., Westerheide, S.D. and Baldwin, A.S., Jr., The p65 (RelA) subunit of NF-kappaB interacts with the histone deacetylase (HDAC) corepressors HDAC1 and HDAC2 to negatively regulate gene expression, *Mol Cell Biol*, 21 (2001) 7065-77.
- 9 Babior, B.M., Takeuchi, C., Ruedi, J., Gutierrez, A. and Wentworth, P., Jr., Investigating antibody-catalyzed ozone generation by human neutrophils, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (2003) 3031-4.
- 10 Baeuerle, P.A. and Baltimore, D., NF-kappa B: ten years after, *Cell*, 87 (1996) 13-20.
- 11 Baeuerle, P.A. and Henkel, T., Function and activation of NF-kappa B in the immune system, *Annu Rev Immunol*, 12 (1994) 141-79.
- 12 Baichwal, V.R. and Baeuerle, P.A., Activate NF-kappa B or die? *Curr Biol*, 7 (1997) R94-6.
- 13 Baldwin, A.S., Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB, *J Clin Invest*, 107 (2001) 241-6.
- 14 Baldwin, A.S., Jr., The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights, *Annu Rev Immunol*, 14 (1996) 649-83.

- 15 Balkwill, F. and Mantovani, A., Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*, 357 (2001) 539-45.
- 16 Barath, P., Fishbein, M.C., Cao, J., Berenson, J., Helfant, R.H. and Forrester, J.S., Tumor necrosis factor gene expression in human vascular intimal smooth muscle cells detected by in situ hybridization, *Am J Pathol*, 137 (1990) 503-9.
- 17 Barkett, M. and Gilmore, T.D., Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors, *Oncogene*, 18 (1999) 6910-24.
- 18 Barnes, P.J. and Karin, M., Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases, *N Engl J Med*, 336 (1997) 1066-71.
- 19 Baud, V. and Karin, M., Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives, *Trends Cell Biol*, 11 (2001) 372-7.
- 20 Bauknecht, T. and Shi, Y., Overexpression of C/EBPbeta represses human papillomavirus type 18 upstream regulatory region activity in HeLa cells by interfering with the binding of TATA-binding protein, *J Virol*, 72 (1998) 2113-24.
- 21 Baumgartner, B., Weber, M., Quirling, M., Fischer, C., Page, S., Adam, M., Von Schilling, C., Waterhouse, C., Schmid, C., Neumeier, D. and Brand, K., Increased IkappaB kinase activity is associated with activated NF-kappaB in acute myeloid blasts, *Leukemia*, 16 (2002) 2062-71.
- 22 Becker, S., Jordan, R.L., Orlando, G.S. and Koren, H.S., In vitro ozone exposure inhibits mitogen-induced lymphocyte proliferation and IL-2 production, *J Toxicol Environ Health*, 26 (1989) 469-83.
- 23 Berliner, J.A., Navab, M., Fogelman, A.M., Frank, J.S., Demer, L.L., Edwards, P.A., Watson, A.D. and Lusa, A.J., Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics, *Circulation*, 91 (1995) 2488-96.
- 24 Bernstein, M.L., Targeted therapy in pediatric and adolescent oncology, *Cancer*, 117 2268-74.
- 25 Beslu, N., LaRose, J., Casteran, N., Birnbaum, D., Lecocq, E., Dubreuil, P. and Rottapel, R., Phosphatidylinositol-3' kinase is not required for mitogenesis or internalization of the Flt3/Flk2 receptor tyrosine kinase, *J Biol Chem*, 271 (1996) 20075-81.
- 26 Birkenkamp, K.U., Geugien, M., Schepers, H., Westra, J., Lemmink, H.H. and Vellenga, E., Constitutive NF-kappaB DNA-binding activity in AML is frequently mediated by a Ras/PI3-K/PKB-dependent pathway, *Leukemia*, 18 (2004) 103-12.

-
- 27 Bocci, V.A., Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art, *Arch Med Res*, 37 (2006) 425-35.
- 28 Bourcier, T., Sukhova, G. and Libby, P., The nuclear factor kappa-B signaling pathway participates in dysregulation of vascular smooth muscle cells in vitro and in human atherosclerosis, *J Biol Chem*, 272 (1997) 15817-24.
- 29 Brand, K., Eisele, T., Kreusel, U., Page, M., Page, S., Haas, M., Gerling, A., Kaltschmidt, C., Neumann, F.J., Mackman, N., Baeurele, P.A., Walli, A.K. and Neumeier, D., Dysregulation of monocytic nuclear factor-kappa B by oxidized low-density lipoprotein, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17 (1997) 1901-9.
- 30 Brand, K., Mackman, N. and Curtiss, L.K., Interferon-gamma inhibits macrophage apolipoprotein E production by posttranslational mechanisms, *J Clin Invest*, 91 (1993) 2031-9.
- 31 Brand, K., Page, S., Rogler, G., Bartsch, A., Brandl, R., Knuechel, R., Page, M., Kaltschmidt, C., Baeuerle, P.A. and Neumeier, D., Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion, *J Clin Invest*, 97 (1996) 1715-22.
- 32 Brand, K., Page, S., Walli, A.K., Neumeier, D. and Baeuerle, P.A., Role of nuclear factor-kappa B in atherogenesis, *Exp Physiol*, 82 (1997) 297-304.
- 33 Brandts, C.H., Sargin, B., Rode, M., Biermann, C., Lindtner, B., Schwable, J., Buerger, H., Muller-Tidow, C., Choudhary, C., McMahon, M., Berdel, W.E. and Serve, H., Constitutive activation of Akt by Flt3 internal tandem duplications is necessary for increased survival, proliferation, and myeloid transformation, *Cancer Res*, 65 (2005) 9643-50.
- 34 Brown, P., Meshinchi, S., Levis, M., Alonzo, T.A., Gerbing, R., Lange, B., Arceci, R. and Small, D., Pediatric AML primary samples with FLT3/ITD mutations are preferentially killed by FLT3 inhibition, *Blood*, 104 (2004) 1841-9.
- 35 Buck, M., Zhang, L., Halasz, N.A., Hunter, T. and Chojkier, M., Nuclear export of phosphorylated C/EBPbeta mediates the inhibition of albumin expression by TNF-alpha, *Embo J*, 20 (2001) 6712-23.
- 36 Calkhoven, C.F., Muller, C. and Leutz, A., Translational control of C/EBPalpha and C/EBPbeta isoform expression, *Genes Dev*, 14 (2000) 1920-32.
- 37 Cantley, L.C., The phosphoinositide 3-kinase pathway, *Science*, 296 (2002) 1655-7.
- 38 Cappello, C., Saugel, B., Huth, K.C., Zwergal, A., Krautkramer, M., Furman, C., Rouis, M., Wieser, B., Schneider, H.W., Neumeier, D. and Brand, K., Ozonized low

- density lipoprotein (ozLDL) inhibits NF-kappaB and IRAK-1-associated signaling, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27 (2007) 226-32.
- 39 Cappello, C., Zwergal, A., Kanclerski, S., Haas, S.C., Kandemir, J.D., Huber, R., Page, S. and Brand, K., C/EBPbeta enhances NF-kappaB-associated signalling by reducing the level of IkappaB-alpha, *Cell Signal*, 21 (2009) 1918-24.
- 40 Carvalho-Sousa, C.E., da Silveira Cruz-Machado, S., Tamura, E.K., Fernandes, P.A., Pinato, L., Muxel, S.M., Cecon, E. and Markus, R.P., Molecular basis for defining the pineal gland and pinealocytes as targets for tumor necrosis factor, *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2 10.
- 41 Chang, C.N., Ma, Y.S. and Zing, F.F., Reducing the formation of disinfection by-products by pre-ozonation, *Chemosphere*, 46 (2002) 21-30.
- 42 Chen, G., Cao, P. and Goeddel, D.V., TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90, *Mol Cell*, 9 (2002) 401-10.
- 43 Chinery, R., Brockman, J.A., Dransfield, D.T. and Coffey, R.J., Antioxidant-induced nuclear translocation of CCAAT/enhancer-binding protein beta. A critical role for protein kinase A-mediated phosphorylation of Ser299, *J Biol Chem*, 272 (1997) 30356-61.
- 44 Choudhary, C., Muller-Tidow, C., Berdel, W.E. and Serve, H., Signal transduction of oncogenic Flt3, *Int J Hematol*, 82 (2005) 93-9.
- 45 Choudhary, C., Schwable, J., Brandts, C., Tickenbrock, L., Sargin, B., Kindler, T., Fischer, T., Berdel, W.E., Muller-Tidow, C. and Serve, H., AML-associated Flt3 kinase domain mutations show signal transduction differences compared with Flt3 ITD mutations, *Blood*, 106 (2005) 265-73.
- 46 Collins, T., Endothelial nuclear factor-kappa B and the initiation of the atherosclerotic lesion, *Lab Invest*, 68 (1993) 499-508.
- 47 Collins, T. and Cybulsky, M.I., NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J Clin Invest*, 107 (2001) 255-64.
- 48 Datta, S.R., Brunet, A. and Greenberg, M.E., Cellular survival: a play in three Akts, *Genes Dev*, 13 (1999) 2905-27.
- 49 DiDonato, J.A., Hayakawa, M., Rothwarf, D.M., Zandi, E. and Karin, M., A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB, *Nature*, 388 (1997) 548-54.

- 50 Dosil, M., Wang, S. and Lemischka, I.R., Mitogenic signalling and substrate specificity of the Flk2/Flt3 receptor tyrosine kinase in fibroblasts and interleukin 3-dependent hematopoietic cells, *Mol Cell Biol*, 13 (1993) 6572-85.
- 51 Duran, A., Diaz-Meco, M.T. and Moscat, J., Essential role of RelA Ser311 phosphorylation by zetaPKC in NF-kappaB transcriptional activation, *Embo J*, 22 (2003) 3910-8.
- 52 Estrov, Z., Shishodia, S., Faderl, S., Harris, D., Van, Q., Kantarjian, H.M., Talpaz, M. and Aggarwal, B.B., Resveratrol blocks interleukin-1beta-induced activation of the nuclear transcription factor NF-kappaB, inhibits proliferation, causes S-phase arrest, and induces apoptosis of acute myeloid leukemia cells, *Blood*, 102 (2003) 987-95.
- 53 Fennewald, S.M., Aronson, J.F., Zhang, L. and Herzog, N.K., Alterations in NF-kappaB and RBP-Jkappa by arenavirus infection of macrophages in vitro and in vivo, *J Virol*, 76 (2002) 1154-62.
- 54 Fischer, C., Page, S., Weber, M., Eisele, T., Neumeier, D. and Brand, K., Differential effects of lipopolysaccharide and tumor necrosis factor on monocytic IkappaB kinase signalsome activation and IkappaB proteolysis, *J Biol Chem*, 274 (1999) 24625-32.
- 55 Fitzgerald, K.A., Rowe, D.C. and Golenbock, D.T., Endotoxin recognition and signal transduction by the TLR4/MD2-complex, *Microbes Infect*, 6 (2004) 1361-7.
- 56 Frelin, C., Imbert, V., Griessinger, E., Peyron, A.C., Rochet, N., Philip, P., Dageville, C., Sirvent, A., Hummelsberger, M., Berard, E., Dreano, M., Sirvent, N. and Peyron, J.F., Targeting NF-kappaB activation via pharmacologic inhibition of IKK2-induced apoptosis of human acute myeloid leukemia cells, *Blood*, 105 (2005) 804-11.
- 57 Fukuda, S., Broxmeyer, H.E. and Pelus, L.M., Flt3 ligand and the Flt3 receptor regulate hematopoietic cell migration by modulating the SDF-1alpha(CXCL12)/CXCR4 axis, *Blood*, 105 (2005) 3117-26.
- 58 Gawaz, M., Neumann, F.J., Dickfeld, T., Koch, W., Laugwitz, K.L., Adelsberger, H., Langenbrink, K., Page, S., Neumeier, D., Schomig, A. and Brand, K., Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells, *Circulation*, 98 (1998) 1164-71.
- 59 Gawaz, M., Page, S., Massberg, S., Nothdurfter, C., Weber, M., Fisher, C., Ungerer, M. and Brand, K., Transient platelet interaction induces MCP-1 production by endothelial cells via I kappa B kinase complex activation, *Thromb Haemost*, 88 (2002) 307-14.

- 60 Geng, Y., Wang, W., Ma, Q., Peng, L.Q. and Liang, Z.H., [Ozone therapy combined with sulfasalazine delivered via a colon therapy system for treatment of ulcerative colitis], *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao*, 30 2683-5.
- 61 Ghosh, S. and Karin, M., Missing pieces in the NF-kappaB puzzle, *Cell*, 109 Suppl (2002) S81-96.
- 62 Ghosh, S., May, M.J. and Kopp, E.B., NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses, *Annu Rev Immunol*, 16 (1998) 225-60.
- 63 Gilliland, D.G. and Griffin, J.D., Role of FLT3 in leukemia, *Curr Opin Hematol*, 9 (2002) 274-81.
- 64 Gilliland, D.G. and Griffin, J.D., The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia, *Blood*, 100 (2002) 1532-42.
- 65 Gilmore, T.D., Koedood, M., Piffat, K.A. and White, D.W., Rel/NF-kappaB/IkappaB proteins and cancer, *Oncogene*, 13 (1996) 1367-78.
- 66 Glass, C.K. and Witztum, J.L., Atherosclerosis. the road ahead, *Cell*, 104 (2001) 503-16.
- 67 Gohil, K., Cross, C.E. and Last, J.A., Ozone-induced disruptions of lung transcriptomes, *Biochem Biophys Res Commun*, 305 (2003) 719-28.
- 68 Granger, R.L., Hughes, T.R. and Ramji, D.P., Stimulus- and cell-type-specific regulation of CCAAT-enhancer binding protein isoforms in glomerular mesangial cells by lipopolysaccharide and cytokines, *Biochim Biophys Acta*, 1501 (2000) 171-9.
- 69 Griessinger, E., Imbert, V., Lagadec, P., Gonthier, N., Dubreuil, P., Romanelli, A., Dreano, M. and Peyron, J.F., AS602868, a dual inhibitor of IKK2 and FLT3 to target AML cells, *Leukemia*, 21 (2007) 877-85.
- 70 Grilli, M., Chiu, J.J. and Lenardo, M.J., NF-kappa B and Rel: participants in a multiform transcriptional regulatory system, *Int Rev Cytol*, 143 (1993) 1-62.
- 71 Grosjean-Raillard, J., Ades, L., Boehrer, S., Tailler, M., Fabre, C., Braun, T., De Botton, S., Israel, A., Fenaux, P. and Kroemer, G., Flt3 receptor inhibition reduces constitutive NFkappaB activation in high-risk myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia, *Apoptosis*, 13 (2008) 1148-61.
- 72 Grundler, R., Miething, C., Thiede, C., Peschel, C. and Duyster, J., FLT3-ITD and tyrosine kinase domain mutants induce 2 distinct phenotypes in a murine bone marrow transplantation model, *Blood*, 105 (2005) 4792-9.

- 73 Grundler, R., Thiede, C., Miething, C., Steudel, C., Peschel, C. and Duyster, J., Sensitivity toward tyrosine kinase inhibitors varies between different activating mutations of the FLT3 receptor, *Blood*, 102 (2003) 646-51.
- 74 Grundstrom, S., Anderson, P., Scheipers, P. and Sundstedt, A., Bcl-3 and NFkappaB p50-p50 homodimers act as transcriptional repressors in tolerant CD4+ T cells, *J Biol Chem*, 279 (2004) 8460-8.
- 75 Guo, S., Cichy, S.B., He, X., Yang, Q., Ragland, M., Ghosh, A.K., Johnson, P.F. and Unterman, T.G., Insulin suppresses transactivation by CAAT/enhancer-binding proteins beta (C/EBPbeta). Signaling to p300/CREB-binding protein by protein kinase B disrupts interaction with the major activation domain of C/EBPbeta, *J Biol Chem*, 276 (2001) 8516-23.
- 76 Gutsch, R., Kandemir, J.D., Pietsch, D., Cappello, C., Meyer, J., Simanowski, K., Huber, R. and Brand, K., CCAAT/enhancer-binding protein beta inhibits proliferation in monocytic cells by affecting the retinoblastoma protein/E2F/cyclin E pathway but is not directly required for macrophage morphology, *J Biol Chem*, 286 22716-29.
- 77 Haas, S.C., Huber, R., Gutsch, R., Kandemir, J.D., Cappello, C., Krauter, J., Duyster, J., Ganser, A. and Brand, K., ITD- and FL-induced FLT3 signal transduction leads to increased C/EBPbeta-LIP expression and LIP/LAP ratio by different signalling modules, *Br J Haematol*, 148 777-90.
- 78 Hacker, H. and Karin, M., Regulation and function of IKK and IKK-related kinases, *Sci STKE*, 2006 (2006) re13.
- 79 Haddad, E.B., Salmon, M., Koto, H., Barnes, P.J., Adcock, I. and Chung, K.F., Ozone induction of cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC) and nuclear factor-kappa b in rat lung: inhibition by corticosteroids, *FEBS Lett*, 379 (1996) 265-8.
- 80 Haffajee, A.D. and Socransky, S.S., Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases, *Periodontol 2000*, 5 (1994) 78-111.
- 81 Hamilton, T.A., Major, J.A., Armstrong, D. and Tebo, J.M., Oxidized LDL modulates activation of NFkappaB in mononuclear phagocytes by altering the degradation of IkappaBs, *J Leukoc Biol*, 64 (1998) 667-74.
- 82 Hanahan, D. and Weinberg, R.A., The hallmarks of cancer, *Cell*, 100 (2000) 57-70.
- 83 Hayakawa, F., Towatari, M., Kiyoi, H., Tanimoto, M., Kitamura, T., Saito, H. and Naoe, T., Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines, *Oncogene*, 19 (2000) 624-31.

-
- 84 Hotchkiss, R.S. and Karl, I.E., The pathophysiology and treatment of sepsis, *N Engl J Med*, 348 (2003) 138-50.
- 85 Hu, Y., Baud, V., Oga, T., Kim, K.I., Yoshida, K. and Karin, M., IKK α controls formation of the epidermis independently of NF- κ B, *Nature*, 410 (2001) 710-4.
- 86 Ihle, J.N., The Janus protein tyrosine kinases in hematopoietic cytokine signaling, *Semin Immunol*, 7 (1995) 247-54.
- 87 Israel, A., The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF- κ B? *Trends Cell Biol*, 10 (2000) 129-33.
- 88 Janssens, S. and Beyaert, R., Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members, *Mol Cell*, 11 (2003) 293-302.
- 89 Jaspers, I., Flescher, E. and Chen, L.C., Ozone-induced IL-8 expression and transcription factor binding in respiratory epithelial cells, *Am J Physiol*, 272 (1997) L504-11.
- 90 Jonsson, M., Engstrom, M. and Jonsson, J.I., FLT3 ligand regulates apoptosis through AKT-dependent inactivation of transcription factor FoxO3, *Biochem Biophys Res Commun*, 318 (2004) 899-903.
- 91 Jundt, F., Raetzl, N., Muller, C., Calkhoven, C.F., Kley, K., Mathas, S., Lietz, A., Leutz, A. and Dorken, B., A rapamycin derivative (everolimus) controls proliferation through down-regulation of truncated CCAAT enhancer binding protein β and NF- κ B activity in Hodgkin and anaplastic large cell lymphomas, *Blood*, 106 (2005) 1801-7.
- 92 Karin, M. and Ben-Neriah, Y., Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity, *Annu Rev Immunol*, 18 (2000) 621-63.
- 93 Karin, M. and Lin, A., NF- κ B at the crossroads of life and death, *Nat Immunol*, 3 (2002) 221-7.
- 94 Katz, S., Kowenz-Leutz, E., Muller, C., Meese, K., Ness, S.A. and Leutz, A., The NF- κ B transcription factor is related to C/EBP β and plays a role in signal transduction, differentiation and leukemogenesis of avian myelomonocytic cells, *Embo J*, 12 (1993) 1321-32.
- 95 Kelly, L.M., Liu, Q., Kutok, J.L., Williams, I.R., Boulton, C.L. and Gilliland, D.G., FLT3 internal tandem duplication mutations associated with human acute myeloid leukemias induce myeloproliferative disease in a murine bone marrow transplant model, *Blood*, 99 (2002) 310-8.

-
- 96 Kowenz-Leutz, E., Twamley, G., Ansieau, S. and Leutz, A., Novel mechanism of C/EBP beta (NF-M) transcriptional control: activation through derepression, *Genes Dev*, 8 (1994) 2781-91.
- 97 Kronke, M., Involvement of sphingomyelinases in TNF signaling pathways, *Chem Phys Lipids*, 102 (1999) 157-66.
- 98 Kuo, A.H., Stoica, G.E., Riegel, A.T. and Wellstein, A., Recruitment of insulin receptor substrate-1 and activation of NF-kappaB essential for midkine growth signaling through anaplastic lymphoma kinase, *Oncogene*, 26 (2007) 859-69.
- 99 Kyo, S., Inoue, M., Nishio, Y., Nakanishi, K., Akira, S., Inoue, H., Yutsudo, M., Tanizawa, O. and Hakura, A., NF-IL6 represses early gene expression of human papillomavirus type 16 through binding to the noncoding region, *J Virol*, 67 (1993) 1058-66.
- 100 Landschulz, W.H., Johnson, P.F., Adashi, E.Y., Graves, B.J. and McKnight, S.L., Isolation of a recombinant copy of the gene encoding C/EBP, *Genes Dev*, 2 (1988) 786-800.
- 101 Landschulz, W.H., Johnson, P.F. and McKnight, S.L., The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins, *Science*, 240 (1988) 1759-64.
- 102 Laskin, D.L., Fakhrzadeh, L., Heck, D.E., Gerecke, D. and Laskin, J.D., Upregulation of phosphoinositide 3-kinase and protein kinase B in alveolar macrophages following ozone inhalation. Role of NF-kappaB and STAT-1 in ozone-induced nitric oxide production and toxicity, *Mol Cell Biochem*, 234-235 (2002) 91-8.
- 103 Lavagna-Sevenier, C., Marchetto, S., Birnbaum, D. and Rosnet, O., FLT3 signaling in hematopoietic cells involves CBL, SHC and an unknown P115 as prominent tyrosine-phosphorylated substrates, *Leukemia*, 12 (1998) 301-10.
- 104 LeClair, K.P., Blonar, M.A. and Sharp, P.A., The p50 subunit of NF-kappa B associates with the NF-IL6 transcription factor, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89 (1992) 8145-9.
- 105 Lekstrom-Himes, J. and Xanthopoulos, K.G., Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors, *J Biol Chem*, 273 (1998) 28545-8.
- 106 Lerner, R.A. and Eschenmoser, A., Ozone in biology, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (2003) 3013-5.

- 107 Levis, M., Allebach, J., Tse, K.F., Zheng, R., Baldwin, B.R., Smith, B.D., Jones-Bolin, S., Ruggeri, B., Dionne, C. and Small, D., A FLT3-targeted tyrosine kinase inhibitor is cytotoxic to leukemia cells in vitro and in vivo, *Blood*, 99 (2002) 3885-91.
- 108 Levis, M., Tse, K.F., Smith, B.D., Garrett, E. and Small, D., A FLT3 tyrosine kinase inhibitor is selectively cytotoxic to acute myeloid leukemia blasts harboring FLT3 internal tandem duplication mutations, *Blood*, 98 (2001) 885-7.
- 109 Li, A.C. and Glass, C.K., The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention, *Nat Med*, 8 (2002) 1235-42.
- 110 Li, L., Cousart, S., Hu, J. and McCall, C.E., Characterization of interleukin-1 receptor-associated kinase in normal and endotoxin-tolerant cells, *J Biol Chem*, 275 (2000) 23340-5.
- 111 Li, Y., Li, H., Wang, M.N., Lu, D., Bassi, R., Wu, Y., Zhang, H., Balderes, P., Ludwig, D.L., Pytowski, B., Kussie, P., Piloto, O., Small, D., Bohlen, P., Witte, L., Zhu, Z. and Hicklin, D.J., Suppression of leukemia expressing wild-type or ITD-mutant FLT3 receptor by a fully human anti-FLT3 neutralizing antibody, *Blood*, 104 (2004) 1137-44.
- 112 Libby, P., Coronary artery injury and the biology of atherosclerosis: inflammation, thrombosis, and stabilization, *Am J Cardiol*, 86 (2000) 3J-8J; discussion 8J-9J.
- 113 Liou, H.C. and Hsia, C.Y., Distinctions between c-Rel and other NF-kappaB proteins in immunity and disease, *Bioessays*, 25 (2003) 767-80.
- 114 Liu, J. and Beller, D., Aberrant production of IL-12 by macrophages from several autoimmune-prone mouse strains is characterized by intrinsic and unique patterns of NF-kappa B expression and binding to the IL-12 p40 promoter, *J Immunol*, 169 (2002) 581-6.
- 115 Lo Coco, F., Pisegna, S. and Diverio, D., The AML1 gene: a transcription factor involved in the pathogenesis of myeloid and lymphoid leukemias, *Haematologica*, 82 (1997) 364-70.
- 116 Lowenberg, B., Griffin, J.D. and Tallman, M.S., Acute myeloid leukemia and acute promyelocytic leukemia, *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* (2003) 82-101.
- 117 Lyman, S.D., James, L., Vanden Bos, T., de Vries, P., Brasel, K., Gliniak, B., Hollingsworth, L.T., Picha, K.S., McKenna, H.J., Splett, R.R. and et al., Molecular cloning of a ligand for the flt3/flk-2 tyrosine kinase receptor: a proliferative factor for primitive hematopoietic cells, *Cell*, 75 (1993) 1157-67.

- 118 Mackman, N., Brand, K. and Edgington, T.S., Lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the human tissue factor gene in THP-1 monocytic cells requires both activator protein 1 and nuclear factor kappa B binding sites, *J Exp Med*, 174 (1991) 1517-26.
- 119 Madrid, L.V., Mayo, M.W., Reuther, J.Y. and Baldwin, A.S., Jr., Akt stimulates the transactivation potential of the RelA/p65 Subunit of NF-kappa B through utilization of the Ikappa B kinase and activation of the mitogen-activated protein kinase p38, *J Biol Chem*, 276 (2001) 18934-40.
- 120 Mahoney, C.W., Shuman, J., McKnight, S.L., Chen, H.C. and Huang, K.P., Phosphorylation of CCAAT-enhancer binding protein by protein kinase C attenuates site-selective DNA binding, *J Biol Chem*, 267 (1992) 19396-403.
- 121 Malinge, S., Monni, R., Bernard, O. and Penard-Lacronique, V., Activation of the NF-kappaB pathway by the leukemogenic TEL-Jak2 and TEL-Abl fusion proteins leads to the accumulation of antiapoptotic IAP proteins and involves IKKalpha, *Oncogene*, 25 (2006) 3589-97.
- 122 Marchetto, S., Fournier, E., Beslu, N., Aurrant-Schleinitz, T., Dubreuil, P., Borg, J.P., Birnbaum, D. and Rosnet, O., SHC and SHIP phosphorylation and interaction in response to activation of the FLT3 receptor, *Leukemia*, 13 (1999) 1374-82.
- 123 Margolis, B. and Skolnik, E.Y., Activation of Ras by receptor tyrosine kinases, *J Am Soc Nephrol*, 5 (1994) 1288-99.
- 124 Martelli, A.M., Nyakern, M., Tabellini, G., Bortul, R., Tazzari, P.L., Evangelisti, C. and Cocco, L., Phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathway and its therapeutical implications for human acute myeloid leukemia, *Leukemia*, 20 (2006) 911-28.
- 125 Marx, J., *Medicine*. Ozone may be secret ingredient in plaques' inflammatory stew, *Science*, 302 (2003) 965.
- 126 Matsuno, F., Chowdhury, S., Gotoh, T., Iwase, K., Matsuzaki, H., Takatsuki, K., Mori, M. and Takiguchi, M., Induction of the C/EBP beta gene by dexamethasone and glucagon in primary-cultured rat hepatocytes, *J Biochem*, 119 (1996) 524-32.
- 127 May, M.J. and Ghosh, S., Rel/NF-kappa B and I kappa B proteins: an overview, *Semin Cancer Biol*, 8 (1997) 63-73.
- 128 Mayo, M.W. and Baldwin, A.S., The transcription factor NF-kappaB: control of oncogenesis and cancer therapy resistance, *Biochim Biophys Acta*, 1470 (2000) M55-62.

- 129 Metz, R. and Ziff, E., cAMP stimulates the C/EBP-related transcription factor rNFIL-6 to trans-locate to the nucleus and induce c-fos transcription, *Genes Dev*, 5 (1991) 1754-66.
- 130 Minami, Y., Yamamoto, K., Kiyoi, H., Ueda, R., Saito, H. and Naoe, T., Different antiapoptotic pathways between wild-type and mutated FLT3: insights into therapeutic targets in leukemia, *Blood*, 102 (2003) 2969-75.
- 131 Mink, S., Haenig, B. and Klempnauer, K.H., Interaction and functional collaboration of p300 and C/EBPbeta, *Mol Cell Biol*, 17 (1997) 6609-17.
- 132 Mizuki, M., Fenski, R., Halfter, H., Matsumura, I., Schmidt, R., Muller, C., Gruning, W., Kratz-Albers, K., Serve, S., Steur, C., Buchner, T., Kienast, J., Kanakura, Y., Berdel, W.E. and Serve, H., Flt3 mutations from patients with acute myeloid leukemia induce transformation of 32D cells mediated by the Ras and STAT5 pathways, *Blood*, 96 (2000) 3907-14.
- 133 Mizuki, M., Schwable, J., Steur, C., Choudhary, C., Agrawal, S., Sargin, B., Steffen, B., Matsumura, I., Kanakura, Y., Bohmer, F.D., Muller-Tidow, C., Berdel, W.E. and Serve, H., Suppression of myeloid transcription factors and induction of STAT response genes by AML-specific Flt3 mutations, *Blood*, 101 (2003) 3164-73.
- 134 Nakajima, T., Kinoshita, S., Sasagawa, T., Sasaki, K., Naruto, M., Kishimoto, T. and Akira, S., Phosphorylation at threonine-235 by a ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL6, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90 (1993) 2207-11.
- 135 Nichols, B.G., Woods, J.S., Luchtel, D.L., Corral, J. and Koenig, J.Q., Effects of ozone exposure on nuclear factor-kappaB activation and tumor necrosis factor-alpha expression in human nasal epithelial cells, *Toxicol Sci*, 60 (2001) 356-62.
- 136 O'Byrne, K.J., Dalglish, A.G., Browning, M.J., Steward, W.P. and Harris, A.L., The relationship between angiogenesis and the immune response in carcinogenesis and the progression of malignant disease, *Eur J Cancer*, 36 (2000) 151-69.
- 137 O'Connell, P.A., Madureira, P.A., Berman, J.N., Liwski, R.S. and Waisman, D.M., Regulation of S100A10 by the PML-RAR-alpha oncoprotein, *Blood*, 117 4095-105.
- 138 Ozes, O.N., Mayo, L.D., Gustin, J.A., Pfeffer, S.R., Pfeffer, L.M. and Donner, D.B., NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase, *Nature*, 401 (1999) 82-5.
- 139 Page, S., Fischer, C., Baumgartner, B., Haas, M., Kreusel, U., Loidl, G., Hayn, M., Ziegler-Heitbrock, H.W., Neumeier, D. and Brand, K., 4-Hydroxynonenal prevents

- NF-kappaB activation and tumor necrosis factor expression by inhibiting IkappaB phosphorylation and subsequent proteolysis, *J Biol Chem*, 274 (1999) 11611-8.
- 140 Pahl, H.L., Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors, *Oncogene*, 18 (1999) 6853-66.
- 141 Palsson-McDermott, E.M. and O'Neill, L.A., Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4, *Immunology*, 113 (2004) 153-62.
- 142 Paraskeva, P. and Graham, N.J., Ozonation of municipal wastewater effluents, *Water Environ Res*, 74 (2002) 569-81.
- 143 Phelps, C.B., Sengchanthalangsy, L.L., Huxford, T. and Ghosh, G., Mechanism of I kappa B alpha binding to NF-kappa B dimers, *J Biol Chem*, 275 (2000) 29840-6.
- 144 Poli, V., The role of C/EBP isoforms in the control of inflammatory and native immunity functions, *J Biol Chem*, 273 (1998) 29279-82.
- 145 Quintanilla-Martinez, L., Pittaluga, S., Miething, C., Klier, M., Rudelius, M., Davies-Hill, T., Anastasov, N., Martinez, A., Vivero, A., Duyster, J., Jaffe, E.S., Fend, F. and Raffeld, M., NPM-ALK-dependent expression of the transcription factor CCAAT/enhancer binding protein beta in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma, *Blood*, 108 (2006) 2029-36.
- 146 Raetz, C.R. and Whitfield, C., Lipopolysaccharide endotoxins, *Annu Rev Biochem*, 71 (2002) 635-700.
- 147 Ramji, D.P. and Foka, P., CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation, *Biochem J*, 365 (2002) 561-75.
- 148 Rana, B., Xie, Y., Mischoulon, D., Bucher, N.L. and Farmer, S.R., The DNA binding activity of C/EBP transcription factor is regulated in the G1 phase of the hepatocyte cell cycle, *J Biol Chem*, 270 (1995) 18123-32.
- 149 Rath, P.C. and Aggarwal, B.B., TNF-induced signaling in apoptosis, *J Clin Immunol*, 19 (1999) 350-64.
- 150 Restaino, L., Frampton, E.W., Hemphill, J.B. and Palnikar, P., Efficacy of ozonated water against various food-related microorganisms, *Appl Environ Microbiol*, 61 (1995) 3471-5.
- 151 Riedel, E., *Die Chalkogene*, Berlin, New York (1994).
- 152 Romashkova, J.A. and Makarov, S.S., NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling, *Nature*, 401 (1999) 86-90.

- 153 Ross, R., Atherosclerosis--an inflammatory disease, *N Engl J Med*, 340 (1999) 115-26.
- 154 Rothe, M., Sarma, V., Dixit, V.M. and Goeddel, D.V., TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40, *Science*, 269 (1995) 1424-7.
- 155 Rothe, M., Wong, S.C., Henzel, W.J. and Goeddel, D.V., A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor, *Cell*, 78 (1994) 681-92.
- 156 Rothwarf, D.M., Zandi, E., Natoli, G. and Karin, M., IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the IkappaB kinase complex, *Nature*, 395 (1998) 297-300.
- 157 Rottapel, R., Turck, C.W., Casteran, N., Liu, X., Birnbaum, D., Pawson, T. and Dubreuil, P., Substrate specificities and identification of a putative binding site for PI3K in the carboxy tail of the murine Flt3 receptor tyrosine kinase, *Oncogene*, 9 (1994) 1755-65.
- 158 Rowe, D., Strain, L., Lowe, C. and Jones, G., A case of acute myeloid leukemia with inv(16)(p13q22) reveals a novel MYH11 breakpoint and a new CBF beta-MYH11 transcript variant, *Haematologica*, 92 (2007) 1433-4.
- 159 Sakurai, H., Chiba, H., Miyoshi, H., Sugita, T. and Toriumi, W., IkappaB kinases phosphorylate NF-kappaB p65 subunit on serine 536 in the transactivation domain, *J Biol Chem*, 274 (1999) 30353-6.
- 160 Scheidereit, C., Signal transduction. Docking IkappaB kinases, *Nature*, 395 (1998) 225-6.
- 161 Schlenk, R.F., Dohner, K., Krauter, J., Frohling, S., Corbacioglu, A., Bullinger, L., Habdank, M., Spath, D., Morgan, M., Benner, A., Schlegelberger, B., Heil, G., Ganser, A. and Dohner, H., Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia, *N Engl J Med*, 358 (2008) 1909-18.
- 162 Schmitz, M.L. and Baeuerle, P.A., The p65 subunit is responsible for the strong transcription activating potential of NF-kappa B, *Embo J*, 10 (1991) 3805-17.
- 163 Senftleben, U., Cao, Y., Xiao, G., Greten, F.R., Krahn, G., Bonizzi, G., Chen, Y., Hu, Y., Fong, A., Sun, S.C. and Karin, M., Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway, *Science*, 293 (2001) 1495-9.
- 164 Sheppard, K.A., Rose, D.W., Haque, Z.K., Kurokawa, R., McInerney, E., Westin, S., Thanos, D., Rosenfeld, M.G., Glass, C.K. and Collins, T., Transcriptional activation by NF-kappaB requires multiple coactivators, *Mol Cell Biol*, 19 (1999) 6367-78.

- 165 Shurin, M.R., Esche, C. and Lotze, M.T., FLT3: receptor and ligand. Biology and potential clinical application, *Cytokine Growth Factor Rev*, 9 (1998) 37-48.
- 166 Siebenlist, U., Franzoso, G. and Brown, K., Structure, regulation and function of NF-kappa B, *Annu Rev Cell Biol*, 10 (1994) 405-55.
- 167 Sizemore, N., Lerner, N., Dombrowski, N., Sakurai, H. and Stark, G.R., Distinct roles of the I kappa B kinase alpha and beta subunits in liberating nuclear factor kappa B (NF-kappa B) from I kappa B and in phosphorylating the p65 subunit of NF-kappa B, *J Biol Chem*, 277 (2002) 3863-9.
- 168 Small, D., Targeting FLT3 for the treatment of leukemia, *Semin Hematol*, 45 (2008) S17-21.
- 169 Smith, B.D., Levis, M., Beran, M., Giles, F., Kantarjian, H., Berg, K., Murphy, K.M., Dausers, T., Allebach, J. and Small, D., Single-agent CEP-701, a novel FLT3 inhibitor, shows biologic and clinical activity in patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia, *Blood*, 103 (2004) 3669-76.
- 170 Spiekermann, K., Bagrintseva, K., Schwab, R., Schmieja, K. and Hiddemann, W., Overexpression and constitutive activation of FLT3 induces STAT5 activation in primary acute myeloid leukemia blast cells, *Clin Cancer Res*, 9 (2003) 2140-50.
- 171 Stancovski, I. and Baltimore, D., NF-kappaB activation: the I kappaB kinase revealed? *Cell*, 91 (1997) 299-302.
- 172 Stein, B. and Baldwin, A.S., Jr., Distinct mechanisms for regulation of the interleukin-8 gene involve synergism and cooperativity between C/EBP and NF-kappa B, *Mol Cell Biol*, 13 (1993) 7191-8.
- 173 Stein, B., Baldwin, A.S., Jr., Ballard, D.W., Greene, W.C., Angel, P. and Herrlich, P., Cross-coupling of the NF-kappa B p65 and Fos/Jun transcription factors produces potentiated biological function, *Embo J*, 12 (1993) 3879-91.
- 174 Stein, B., Cogswell, P.C. and Baldwin, A.S., Jr., Functional and physical associations between NF-kappa B and C/EBP family members: a Rel domain-bZIP interaction, *Mol Cell Biol*, 13 (1993) 3964-74.
- 175 Steinberg, D., Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance, *J Biol Chem*, 272 (1997) 20963-6.
- 176 Steinberg, D., Modified forms of low-density lipoprotein and atherosclerosis, *J Intern Med*, 233 (1993) 227-32.
- 177 Steinberg, D., Oxidative Modification of LDL in the Pathogenesis of Atherosclerosis, *Am J Geriatr Cardiol*, 2 (1993) 38-41.

- 178 Steinberg, D., Role of oxidized LDL and antioxidants in atherosclerosis, *Adv Exp Med Biol*, 369 (1995) 39-48.
- 179 Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Khoo, J.C. and Witztum, J.L., Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity, *N Engl J Med*, 320 (1989) 915-24.
- 180 Stirewalt, D.L. and Radich, J.P., The role of FLT3 in haematopoietic malignancies, *Nat Rev Cancer*, 3 (2003) 650-65.
- 181 Tak, P.P. and Firestein, G.S., NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases, *J Clin Invest*, 107 (2001) 7-11.
- 182 Takahashi, S., Harigae, H., Ishii, K.K., Inomata, M., Fujiwara, T., Yokoyama, H., Ishizawa, K., Kameoka, J., Licht, J.D., Sasaki, T. and Kaku, M., Over-expression of Flt3 induces NF-kappaB pathway and increases the expression of IL-6, *Leuk Res*, 29 (2005) 893-9.
- 183 Tanner, B.D., Kuwahara, S., Gerba, C.P. and Reynolds, K.A., Evaluation of electrochemically generated ozone for the disinfection of water and wastewater, *Water Sci Technol*, 50 (2004) 19-25.
- 184 Thanos, D. and Maniatis, T., NF-kappa B: a lesson in family values, *Cell*, 80 (1995) 529-32.
- 185 Thompson, J.E., Phillips, R.J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Ghosh, S., I kappa B-beta regulates the persistent response in a biphasic activation of NF-kappa B, *Cell*, 80 (1995) 573-82.
- 186 Trautwein, C., Caelles, C., van der Geer, P., Hunter, T., Karin, M. and Chojkier, M., Transactivation by NF-IL6/LAP is enhanced by phosphorylation of its activation domain, *Nature*, 364 (1993) 544-7.
- 187 Trautwein, C., van der Geer, P., Karin, M., Hunter, T. and Chojkier, M., Protein kinase A and C site-specific phosphorylations of LAP (NF-IL6) modulate its binding affinity to DNA recognition elements, *J Clin Invest*, 93 (1994) 2554-61.
- 188 Tse, K.F., Allebach, J., Levis, M., Smith, B.D., Bohmer, F.D. and Small, D., Inhibition of the transforming activity of FLT3 internal tandem duplication mutants from AML patients by a tyrosine kinase inhibitor, *Leukemia*, 16 (2002) 2027-36.
- 189 Turco, M.C., Romano, M.F., Petrella, A., Bisogni, R., Tassone, P. and Venuta, S., NF-kappaB/Rel-mediated regulation of apoptosis in hematologic malignancies and normal hematopoietic progenitors, *Leukemia*, 18 (2004) 11-7.

- 190 Twamley-Stein, G., Kowenz-Leutz, E., Ansieau, S. and Leutz, A., Regulation of C/EBP beta/NF-M activity by kinase oncogenes, *Curr Top Microbiol Immunol*, 211 (1996) 129-36.
- 191 Udalova, I.A., Richardson, A., Denys, A., Smith, C., Ackerman, H., Foxwell, B. and Kwiatkowski, D., Functional consequences of a polymorphism affecting NF-kappaB p50-p50 binding to the TNF promoter region, *Mol Cell Biol*, 20 (2000) 9113-9.
- 192 Unal, R., Kim, J.G. and Yousef, A.E., Inactivation of *Escherichia coli* O1 57:H7, *Listeria monocytogenes*, and *Lactobacillus leichmannii* by combinations of ozone and pulsed electric field, *J Food Prot*, 64 (2001) 777-82.
- 193 Vermeulen, L., De Wilde, G., Van Damme, P., Vanden Berghe, W. and Haegeman, G., Transcriptional activation of the NF-kappaB p65 subunit by mitogen- and stress-activated protein kinase-1 (MSK1), *Embo J*, 22 (2003) 1313-24.
- 194 Wadleigh, M., DeAngelo, D.J., Griffin, J.D. and Stone, R.M., After chronic myelogenous leukemia: tyrosine kinase inhibitors in other hematologic malignancies, *Blood*, 105 (2005) 22-30.
- 195 Wang, D. and Baldwin, A.S., Jr., Activation of nuclear factor-kappaB-dependent transcription by tumor necrosis factor-alpha is mediated through phosphorylation of RelA/p65 on serine 529, *J Biol Chem*, 273 (1998) 29411-6.
- 196 Wang, D., Westerheide, S.D., Hanson, J.L. and Baldwin, A.S., Jr., Tumor necrosis factor alpha-induced phosphorylation of RelA/p65 on Ser529 is controlled by casein kinase II, *J Biol Chem*, 275 (2000) 32592-7.
- 197 Wedel, A. and Ziegler-Heitbrock, H.W., The C/EBP family of transcription factors, *Immunobiology*, 193 (1995) 171-85.
- 198 Wegner, M., Cao, Z. and Rosenfeld, M.G., Calcium-regulated phosphorylation within the leucine zipper of C/EBP beta, *Science*, 256 (1992) 370-3.
- 199 Wentworth, P., Jr., McDunn, J.E., Wentworth, A.D., Takeuchi, C., Nieva, J., Jones, T., Bautista, C., Ruedi, J.M., Gutierrez, A., Janda, K.D., Babior, B.M., Eschenmoser, A. and Lerner, R.A., Evidence for antibody-catalyzed ozone formation in bacterial killing and inflammation, *Science*, 298 (2002) 2195-9.
- 200 Wentworth, P., Jr., Nieva, J., Takeuchi, C., Galve, R., Wentworth, A.D., Dilley, R.B., DeLaria, G.A., Saven, A., Babior, B.M., Janda, K.D., Eschenmoser, A. and Lerner, R.A., Evidence for ozone formation in human atherosclerotic arteries, *Science*, 302 (2003) 1053-6.

- 201 Wentworth, P., Jr., Wentworth, A.D., Zhu, X., Wilson, I.A., Janda, K.D., Eschenmoser, A. and Lerner, R.A., Evidence for the production of trioxigen species during antibody-catalyzed chemical modification of antigens, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (2003) 1490-3.
- 202 Whiteside, S.T., Epinat, J.C., Rice, N.R. and Israel, A., I kappa B epsilon, a novel member of the I kappa B family, controls RelA and cRel NF-kappa B activity, *Embo J*, 16 (1997) 1413-26.
- 203 Witztum, J.L. and Steinberg, D., Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis, *J Clin Invest*, 88 (1991) 1785-92.
- 204 Woronicz, J.D., Gao, X., Cao, Z., Rothe, M. and Goeddel, D.V., IkappaB kinase-beta: NF-kappaB activation and complex formation with IkappaB kinase-alpha and NIK, *Science*, 278 (1997) 866-9.
- 205 Wu, G.D., Lai, E.J., Huang, N. and Wen, X., Oct-1 and CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) bind to overlapping elements within the interleukin-8 promoter. The role of Oct-1 as a transcriptional repressor, *J Biol Chem*, 272 (1997) 2396-403.
- 206 Wulczyn, F.G., Krappmann, D. and Scheidereit, C., The NF-kappa B/Rel and I kappa B gene families: mediators of immune response and inflammation, *J Mol Med*, 74 (1996) 749-69.
- 207 Yamamoto, Y. and Gaynor, R.B., Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer, *J Clin Invest*, 107 (2001) 135-42.
- 208 Yang, J., Lin, Y., Guo, Z., Cheng, J., Huang, J., Deng, L., Liao, W., Chen, Z., Liu, Z. and Su, B., The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF-kappaB activation, *Nat Immunol*, 2 (2001) 620-4.
- 209 Yin, M., Yang, S.Q., Lin, H.Z., Lane, M.D., Chatterjee, S. and Diehl, A.M., Tumor necrosis factor alpha promotes nuclear localization of cytokine-inducible CCAAT/enhancer binding protein isoforms in hepatocytes, *J Biol Chem*, 271 (1996) 17974-8.
- 210 Yla-Herttuala, S., Is oxidized low-density lipoprotein present in vivo? *Curr Opin Lipidol*, 9 (1998) 337-44.
- 211 Zandi, E., Rothwarf, D.M., Delhase, M., Hayakawa, M. and Karin, M., The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation, *Cell*, 91 (1997) 243-52.

- 212 Zhang, S. and Broxmeyer, H.E., p85 subunit of PI3 kinase does not bind to human Flt3 receptor, but associates with SHP2, SHIP, and a tyrosine-phosphorylated 100-kDa protein in Flt3 ligand-stimulated hematopoietic cells, *Biochem Biophys Res Commun*, 254 (1999) 440-5.
- 213 Zhang, S., Fukuda, S., Lee, Y., Hangoc, G., Cooper, S., Spolski, R., Leonard, W.J. and Broxmeyer, H.E., Essential role of signal transducer and activator of transcription (Stat)5a but not Stat5b for Flt3-dependent signaling, *J Exp Med*, 192 (2000) 719-28.
- 214 Zhang, S., Mantel, C. and Broxmeyer, H.E., Flt3 signaling involves tyrosyl-phosphorylation of SHP-2 and SHIP and their association with Grb2 and Shc in Baf3/Flt3 cells, *J Leukoc Biol*, 65 (1999) 372-80.
- 215 Zhang, S.Q., Kovalenko, A., Cantarella, G. and Wallach, D., Recruitment of the IKK signalosome to the p55 TNF receptor: RIP and A20 bind to NEMO (IKKgamma) upon receptor stimulation, *Immunity*, 12 (2000) 301-11.
- 216 Zhao, M., Kiyoi, H., Yamamoto, Y., Ito, M., Towatari, M., Omura, S., Kitamura, T., Ueda, R., Saito, H. and Naoe, T., In vivo treatment of mutant FLT3-transformed murine leukemia with a tyrosine kinase inhibitor, *Leukemia*, 14 (2000) 374-8.
- 217 Zhao, Q., Simpson, L.G., Driscoll, K.E. and Leikauf, G.D., Chemokine regulation of ozone-induced neutrophil and monocyte inflammation, *Am J Physiol*, 274 (1998) L39-46.
- 218 Zheng, R., Friedman, A.D. and Small, D., Targeted inhibition of FLT3 overcomes the block to myeloid differentiation in 32Dcl3 cells caused by expression of FLT3/ITD mutations, *Blood*, 100 (2002) 4154-61.
- 219 Zhong, H., Voll, R.E. and Ghosh, S., Phosphorylation of NF-kappa B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300, *Mol Cell*, 1 (1998) 661-71.

7. Anhang

7.1 Abkürzungen

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
AML	akute myeloische Leukämie
AP	activator protein
aPKC	atypische Proteinkinase C
ARD	ankyrin repeat domain
ATP	Adenosintriphosphat
Bid	BH3 interacting domain death agonist
BSA	bovines Serumalbumin
C/EBP	CCAAT/enhancer-binding protein
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CBF β /MYH11	core binding factor β /myosin heavy chain
CBR	CREB-bindendes Protein
CDC	cell division cycle
Ci	Curie
CKII	Caseinkinase II
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
cpm	counts per minute
CREB	CRE-bindendes Protein
CRP	C-reaktives Protein
DD	death domain
dl	Deziliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
ELAM	endothelial-leucocyte adhesion molecule
ERK	extracellular signal-regulated kinases
F ₂	Fluormolekül

FAB	French-American-British
FADD	Fas-associated death domain protein
FKS	fetales Kälberserum
FL	FLT3 Ligand
Flk-2	fetal liver kinase-2
FLT3	Fms-like tyrosine kinase 3
g	Erdbeschleunigung
G/M-CSF	granulocyte/macrophage colony stimulating factor
GAB1/2	GRB-associated binder 1/2
GAP	GTPase-activating protein
GDT	Guanosindiphosphat
GRB2	growth factor receptor bound protein-2
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H ₄ XeO ₆	Perxenonsäure
HCL	Salzsäure
HDL	high density lipoprotein
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HLH	Helix-Loop-Helix
HPV	human papillomavirus
Hsp	Hitzeschockprotein
ICAM	intercellular adhesion molecule
IgG	Immunglobulin G
IKK	IκB-Kinase-Komplex
IL	Interleukin
IRAK	IL-1-Rezeptor-assozierte Kinasen
ITD	internal tandem duplication
IκB	inhibitor of κB
JAK	Januskinase
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KCl	Kaliumchlorid
KD	Kinasedomäne
kDa	Kilodalton
KrF ₆	Kryptonhexafluorid

LBP	LPS-binding protein
LDL	low density lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharid
LZ	Leucin-Zipper
Mal	MyD88 adapter-like
MAPK	mitogen associated protein kinase
MCP	monocyte chemotactic protein
MD2	myeloid differentiation protein 2
Mef	mouse embrionic fibroblasts
MEKK	mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	millimolar
mmol	Millimol
mol	Mol
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MSK1	mitogen- and stressactivated kinase 1
MW	Mittelwert
MyD	myeloid differentiation factor
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NF- κ B	Nuklearfaktor- κ B
ng	Nanogramm
NLS	nuclear localization sequence
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NRD	NF- κ B/Rel/dorsal
O	Sauerstoffatom
OD	optische Dichte
oxLDL	oxidiertes LDL
ozLDL	ozoniertes LDL
ozPBS	ozonierte Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung

PBST	PBS + 0,05% Tween 20
PDGFR β	platelet-derived growth factor
pg	Picogramm
PI3K	Phosphoinositol 3'-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-4,5-Triphosphat
PKAc	cyclic AMP-dependent protein kinase A
PKB	Proteinkinase B
PKC ζ	Proteinkinase C ζ
PLC- γ	Phospholipase C- γ
pm	Picometer
pM	picomolar
PML-RAR α	promyelocytic leukemia-retinoic acid receptor α
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RHD	Rel-Homologie-Domäne
RIP	receptor-interacting protein
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RTKIII	Rezeptortyrosinkinase III
S ₂ O ₈ ²⁻	Peroxodisulphat
SD	Standardabweichung
Sdp.	Siedepunkt
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
sec	Sekunden
SHIP	SH2 domain-containing inositol phosphatase
SHP-2	Src homology domain 2-containing protein tyrosine phosphatase
Smp.	Schmelzpunkt
SOS	son of sevenless
STAT	signal transducer and activator of transcription protein
STK-1	Stammzell Tyrosin Kinase 1
TAB	TAK1 binding protein
TAD	Transaktivierungsdomäne
TAK	transforming growth factor- β -activated kinase
TBARS	thiobarbituric acid reactive substances

TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TGF β	transforming growth factor β
TICAM1	TIR-domain-containing adapter molecule 1
TIR	Toll/IL-1R
TIRAP	TIR-domain-containing adapter protein
TIRP	TIR-containing protein
TKD	Tyrosinkinasedomäne
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
TLR	toll-like receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TNF-RI/II	TNF-Rezeptor I/II
TRADD	TNF-RI-associated death domain protein
TRAF	TNF-receptor-associated factor
TRAM	TRIF-related adapter molecule
TRIF	TIR-domain-containing adapter inducing interferon β
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	unit
UV	Ultraviolett
VCAM	vascular cell adhesion molecule
WEHI	Walter and Eliza Hall Institute
WT	Wild-Typ
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter

7.2 Publikation

Cappello, C., Saugel, B., Huth, K.C., Zwergal, A., Krautkramer, M., Furman, C., Rouis, M., Wieser, B., Schneider, H.W., Neumeier, D. and Brand, K., Ozonized low density lipoprotein (ozLDL) inhibits NF-kappaB and IRAK-1-associated signaling, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27 (2007) 226-32.

7.3 Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Bianca Patrizia Preissler geb. Wieser
Adresse: Malsenstraße 39, 80638 München
Geburtstag und -ort: 16. Januar 1982 in Schwarzach im Pongau
Familienstand: verheiratet

Tätigkeiten:

seit 10/13 Assistenzärztin für Wirbelsäulenchirurgie, Benedictus Krankenhaus Tutzing
07/13 – 09/13 Assistentin in der Praxis Dr. Wieser, Kirchseeon
12/10 – 06/13 Assistenzärztin für Unfallchirurgie, Klinikum Dritter Orden München
10/10 – 11/10 Assistenzärztin für Allgemeinchirurgie, Klinik Dr. Schreiber, München
01/09 – 09/10 Assistenzärztin für Herzchirurgie, Deutsches Herzzentrum München

Studium:

04/04 – 10/08 Klinik Humanmedizin, Technische Universität München
10/03 – 04/04 Philosophie, neuere deutsche Literatur, Geschichte der Medizin, LMU
09/01 – 06/03 Vorklinik Humanmedizin, Semmelweis Universität Budapest

7.4 Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Technischen Universität München in der Forschungsgruppe für Molekularbiologie des Herrn Prof. Dr. K. Brand. Ich bedanke mich an dieser Stelle bei dem ehemaligen Direktor des Instituts, Herrn Prof. Dr. D. Neumeier und seinem Nachfolger Herrn Prof. Dr. J. Ruland, für die Bereitstellung der Arbeitsmaterialien und Geräte.

Mein größter Dank gilt Herrn Prof. Dr. Brand für die spannende Aufgabenstellung und die wissenschaftliche Betreuung meiner Doktorarbeit. Ich bin überaus dankbar, dass er mich über die lange Zeit und über die weite Distanz nie mit meiner Arbeit allein gelassen hat. Durch seine Einfühlsamkeit und individuelle Arbeitsbedingungen konnte stets eine Lösung für Probleme gefunden werden.

Ebenso dankbar bin ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Brand. Mein Dank gilt vor allem Dr. M. Quirling und Dr. C. Cappello für die kreative Unterstützung bei den einzelnen Themen, sowie auch Dr. S. Page für die hervorragende Zusammenarbeit und Dr. S. Haas für zahlreiche produktive Anregungen.

Herzlichen Dank auch an M. Krautkrämer, A. Ertl und C. Grubmüller für die Einarbeitung in die gängigen Labortechniken und Durchführung der Experimente.

Vielen Dank Herrn Dr. Huber für all die Korrekturen mit zahlreichen Verbesserungsvorschlägen.

Außerdem danke ich Herrn Dr. B. Saugel, Herrn Dr. A. Zwergal und Herrn Dr. M. Jakob dafür, dass sie mir mit ihrer Begeisterungsfähigkeit immer wieder Motivation für und Spaß bei Forschung und Beruf vermittelten.

Nicht zuletzt möchte ich aber ganz besonders meiner Familie, meinen Freunden und meinen Studienkollegen danken, dass sie immer für mich da waren, wenn ich moralische Unterstützung brauchte. Ich danke Annika, Vicki und Sonja für die schöne Zeit und dass sie mir immer wieder Mut gemacht haben.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, ohne deren Unterstützung ich mein Studium nicht beginnen hätte können. Ich bedanke mich dafür, dass sie immer hinter mir standen und an mich geglaubt haben.