Induktion von Apoptose durch ungesättigte Fettsäuren in Zellen des kardiovaskulären Systems

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Pharmazie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Michael Reinbold
aus Kischinew

Marburg/Lahn 2007

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg
als Dissertation am 11. Mai 2007 angenommen:
Erstgutachter: Prof. Dr. Dr. J. Krieglstein
Zweitgutachter: Prof. Dr. S. Klumpp
Tag der mündlichen Prüfung: 11. Mai 2007

In Dankbarkeit meinen Eltern gewidmet

Die vorliegende Arbeit entstand am Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Fachbereichs Pharmazie der Philipps-Universität Marburg sowie am Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie des Fachbereichs Pharmazie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster auf Anregung und unter der Leitung von

Herrn Professor Dr. Dr. Josef Krieglstein.

Ich möchte mich recht herzlich für die Förderung und unermüdliche Unterstützung, für seine freundliche Motivation, für die zahlreichen Anregungen zur Durchführung erfolgreicher Projekte und nicht zuletzt für seine stete Bereitschaft zu konstruktiven Diskussionen, bedanken. Ohne die intensiven und innovativen Arbeitsgespräche wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Mein besonderer Dank gilt ebenfalls Frau Professor Dr. Susanne Klumpp vom Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie der Westfälischen Wilhelms-Universität in Münster für ihre stete Diskussionsbereitschaft, die fachliche Anleitung, ausdauernde Betreuung und für das kritische Durchschauen der Manuskripte. Auch möchte ich mich bedanken, dass Frau Professor Susanne Klumpp es mir ermöglicht hat, meine Dissertation in ihrem Arbeitskreis in Münster fertigzustellen. Es war eine sehr schöne und ereignisreiche Zeit, die ich nicht missen möchte.

Großen Dank schulde ich auch meinen Kooperationspartnern vom Universitätsklinikum Marburg der Abteilung für präventive Kardiologie Herrn Prof. Dr. Jürgen Schäfer, Herrn Dr. Muhidien Soufi sowie Ulricke Otte für das freundliche Arbeitsklima und die angenehme Zusammenarbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei Priv. Doz. Dr. Gabriele Weißen-Plenz, Dr. Oliver Hofnagel und Priv. Doz. Dr. Stefan Lorkowski vom Institut für Atheroskleroseforschung Münster sowie Priv. Doz. Dr. Uwe Kirchhefer vom Institut für Pharmakologie Münster für die erfolgreiche Zusammenarbeit und die freundliche Atmosphäre bedanken.

Ein weiteres Dankeswort gilt auch allen meinen Kollegen sowohl in Marburg als auch in Münster, die das bestehende nette und freundliche Arbeitsklima unterstrichen haben.

Ganz besonders möchte ich mich bei Renate Hartmannsgruber für die hervorragende technische und vor allem moralische Unterstützung im Labor sowie bei der Pflege der Meerschweinchen bedanken.

Herzlichster Dank gilt Frau Dr. Biggi Hufnagel, die mich seit dem ersten Tag der wissenschaftlichen Tätigkeit begleitet, motiviert, in jeder Hinsicht unterstützt und immer zu mir gehalten hat, auch in schwierigsten Situationen, sowohl bei der Arbeit als auch privat.

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG 1

1.1 Apoptose 1

1.1.1 Apoptose – die Grundlagen 1

1.1.2 Apoptose und Nekrose: Unterschiede der Morphologie 2

1.1.3 Die Maschinerie der Apoptose 4

1.1.3.1 Die Caspasen 4

1.1.3.2 Die Mitochondrien 7

1.1.3.3 Die Bcl-2-Familie 7

1.1.3.4 Weitere Apoptoseauslöser 9

1.1.4 Krankheiten und Apoptose 10

1.2 Reversible Phosphorylierung 12

1.2.1 Proteinkinasen und Phosphatasen 12

1.2.2 Die Einteilung der Proteinphosphatasen 14

1.2.3 Die Proteinphosphatase 2C 16

1.2.4 Die Proteinphosphatase 2C, Bad und die Fettsäure-induzierte Apoptose 20

1.3 Das Endothel, Lipide und die Atherogenese 24

1.3.1 Das Endothel ist das größte endokrine Organ 24

1.3.1.1 Die endotheliale Dysfunktion 26

1.3.2 Lipoproteinstoffwechsel 28

1.3.3 Lipoproteinlipase 34

1.3.4 Atherogenese 40

1.4 Zielsetzung und Fragestellung dieser Arbeit 45

2 MATERIALIEN UND METHODEN 48

2.1 Materialien 48

2.1.1 Antikörper 48

2.1.2 Chemikalien 48

2.1.3 Verbrauchs- und Zellkulturmaterialien 50

2.1.4 Geräte 51

2.1.5 Software 52

2.2 Zellkultur 52

2.2.1 Allgemeine Arbeitsweise in der Zellkultur 52

2.2.2 Kultivierung und Charakterisierung von humanen Zellen 53

2.2.2.1 THP-1-Zellen 53
2.2.2.2 HUVECs 55
2.2.2.3 Kokultivierung von THP-1-Zellen und HUVECs 56
2.2.2.4 Primäre murine Kardiomyozyten 59
2.2.2.5 Nilblaufärbung zur Lipiddetektion in der Zelle 59

2.2.3 Bestimmung der Apoptoserate mit Hoechst 33258 59

2.2.4 Apoptoseinduktion in HUVECs durch Staurosporin 60

2.2.5 Apoptoseinduktion in HUVECs durch Serumentzug 60

2.2.6 Apoptoseinduktion in HUVECs mit Lipoproteinen und Lipase 61

2.2.7 Apoptoseinduktion in HUVECs mit VLDL und Makrophagenmedium 61

2.2.8 Apoptoseinduktion in kokultivierten HUVECs mit VLDL 61

2.3 Tiere und Tierhaltung 62

2.3.1 Meerschweinchen 62

2.3.2 Diäten und Fütterung 62

2.3.3 Blutentnahme und Untersuchung der Blutseren 65

2.3.4 Präparation und Gewebekonservierung 66

2.3.5 Histologische Methoden 66

2.3.5.1 TUNEL-Färbung 67

2.4 Untersuchungen auf Proteinebene 67

2.4.1 Proteinbestimmung 67

2.4.1.1 Aufschluss von Zellen für das Westernblotting 67
2.4.1.2 Bestimmung der Proteinmenge 68

2.4.2 SDS-PAGE und Western Blotting 69

2.4.2.1 Prinzip von SDS-PAGE und Western Blotting 69
2.4.2.2 Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele 70
2.4.2.3 SDS-PAGE 71
2.4.2.4 Western Blotting und Immunodetektion 72

2.4.3 Immunzytochemie 74

2.4.3.1 Das Prinzip der Immunzytochemie 74
2.4.3.2 Detektion von Bad bzw. Lipoproteinlipase mit Texas Red 75
2.4.3.3 Detektion von PP2Cβ mit Fluoresceinisothiocyanat 75

2.4.3.4 Doppelfärbung von Bad und PP2Cβ 76

2.5 Untersuchungen auf RNA Ebene 77

2.5.1 Polymerase-Kettenreaktion nach reverser Transkription 77

2.5.1.1 Prinzip der RT-PCR 77
2.5.1.2 Extraktion der Gesamt RNA 78
2.5.1.3 Gehaltsbestimmung der Gesamt-RNA 78
2.5.1.4 Reverse Transkription 79
2.5.1.5 Polymerase-Kettenreaktion 79
2.5.1.6 Verifizierung von RT-PCR-Produkten auf dem Agarose-Gel 80

2.5.2 RNA-Interferenz 81

2.5.2.1 Geschichte und Prinzip der RNA-Interferenz 81
2.5.2.2 Mechanismus der RNA-Interferenz 82
2.5.2.3 Auswahl von geeigneter siRNA Sequenz 83
2.5.2.4 Transfektion von siRNA in THP-1-Zellen 84

2.6 Lipoproteine 85

2.6.1 Gewinnung der Blutseren 85

2.6.2 Trennung der Lipoproteinfraktionen 85

2.6.2.1 Prinzip der Lipoproteintrennung mittels Ultrazentrifugation 85
2.6.2.2 VLDL 86
2.6.2.3 IDL 86
2.6.2.4 LDL 87
2.6.2.5 HDL 87

2.6.3 Dialyse der Lipoproteinfraktionen 87

2.6.4 Bestimmung der Lipidparameter in Lipoproteinfraktionen 88

2.7 Statistik 89

3 ERGEBNISSE 90

3.1 Expression von PP2Cα, PP2Cβ und Bad in HUVECs und THP-1-Zellen 90

3.1.1 Expression von PP2Cα und PP2Cβ 90

3.1.2 Expression von Bad 91

3.1.3 Immunzytochemische Detektion von PP2Cβ und Bad 91

3.2 Apoptoseinduktion durch Fettsäuren, Staurosporin sowie Serumentzug 93

3.2.1 Apoptoseinduktion in HUVECs durch Fettsäuren mit bestimmten Eigenschaften 93

3.2.2 Apoptoseinduktion in HUVECs durch Staurosporin 94

3.2.3 Apoptoseinduktion in HUVECs durch Serumentzug 95

3.3 Kombinationsbehandlungen in HUVECs 96

3.3.1 Ginkgo biloba Inhaltsstoffe und Ölsäure 96

3.3.2 Lipoproteine und Ölsäure 97

3.3.2.1 Kombinationsbehandlung in HUVECs mit Lipoproteinen und Ölsäure 97

3.3.2.2 Messung der Lipidaufnahme in HUVECs nach einer Behandlung mit Lipoproteinen und Ölsäure 98

3.4 Docosahexaensäure als Zellprotektivum und Zelldestruktivum 100

3.4.1 Docosahexaensäure als PP2C-Aktivator und Apoptoseauslöser 100

3.4.1.1 Aufnahme der Docosahexaensäure in HUVECs je nach Serumgehalt des Mediums 101

3.4.2 Docosahexaensäure als Zellprotektivum 102

3.4.2.1 Docosahexaensäure und Staurosporin 102

3.4.2.2 Docosahexaensäure und Serumentzug 104

3.4.3 Kombinationsbehandlung von HUVECs mit Docosahexaensäure und Ölsäure 105

3.4.4 Ölsäure als Zellprotektivum 105

3.5 Untersuchungen zur Apoptoseinduktion durch Fettsäuren aus Lipoproteinen 107

3.5.1 Expression der Lipoproteinlipase 107

3.5.1.1 Untersuchungen auf mRNA Ebene 107

3.5.1.2 Untersuchungen auf Proteinebene 109

3.5.1.3 Untersuchung der Lipoproteinlipase-Expression nach Entfernung von PMA aus dem Zellmedium 111

3.5.1.4 Immunzytochemische Untersuchungen 112

3.5.2 Untersuchungen zur Translokation der Lipoproteinlipase 112

3.5.2.1 Untersuchung der Lipoproteinlipase-Translokation nach Behandlung der HUVECs mit Makrophagenmedium 113

3.5.2.2 Untersuchung der Lipoproteinlipase Translokation nach Kokultivierung von HUVECs mit Makrophagen 114

3.5.3 Schädigung der Endothelzellen durch VLDL und Lipoproteinlipase 116

3.5.3.1 Schädigung der HUVECs mit VLDL und Lipoproteinlipase 116

3.5.3.2 Schädigung der HUVECs mit VLDL und Lipoproteinlipase-haltigem Makrophagenmedium 117

3.5.3.3 Schädigung der HUVECs mit VLDL in der Kokultur mit Makrophagen 119

3.5.3.4 Untersuchung des Einflusses der VLDL-Konzentration während der Schädigung von HUVECs in der Kokultur mit Makrophagen 120

3.5.3.5 Untersuchung des Einflusses der THP-1-Zelldichte während der Schädigung von HUVECs in der Kokultur mit Makrophagen 121

3.5.3.6 Untersuchung der schädigenden Wirkung von VLDL auf HUVECs nach einer Vorinkubation mit Lipoproteinlipase-haltigen Medium 122

3.5.4 Reduktion der Apoptoserate durch Orlistat 124
3.5.4.1 Reduktion der Endothelzellschädigung durch Orlistat 124
3.5.4.2 Reduktion der Endothelzellschädigung durch Orlistat 125
3.5.5 Reduktion der LPL Expression und Apoptoserate mit RNA-Interferenz 125
3.5.5.1 Herunterregulation der Lipoproteinlipase auf mRNA-Ebene 126
3.5.5.2 Herunterregulation der Lipoproteinlipase auf Proteinebene 127
3.5.5.3 Untersuchung der Apoptoserate von HUVECs, kokultiviert mit siRNA-behandelten THP-1-Zellen 128

3.6 Fütterungsversuch an Meerschweinchen 130

3.6.1 Nahrungsaufnahme und Gewichtsentwicklung 130
3.6.1.1 Nahrungsaufnahme der Meerschweinchen 130
3.6.1.2 Gewichtsentwicklung der Meerschweinchen 132
3.6.2 Blutuntersuchung der Meerschweinchen 133
3.6.3 Makroskopische Veränderungen an den Meerschweinchengeweben 135
3.6.3.1 Untersuchung der Meerschweinchen-Herzen 135
3.6.3.2 Untersuchung der Meerschweinchen-Aorten 137
3.6.4 Expressionsuntersuchung von PP2Cβ und Bad im Meerschweinchengewebe sowie in murinen Kardiomyozyten 138
3.6.4.1 Expressionsuntersuchung von PP2Cβ im Meerschweinchengewebe sowie in murinen Kardiomyozyten 138
3.6.4.2 Expressionsuntersuchung von Bad im Meerschweinchengewebe sowie in murinen Kardiomyozyten 139
3.6.5 Immunhistochemische Untersuchungen der Meerschweinchenaortenbögen 140
3.6.5.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung 140
3.6.5.2 Elastica van Gieson-Färbung 140
3.6.5.3 Oil Red O-Färbung 142
3.6.6 Immunhistochemische Untersuchungen der Meerschweinchenherzen 143
3.6.6.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung 143
3.6.6.2 Oil Red O-Färbung 144
3.6.6.3 Untersuchung der Zelldichte in den Herzschnitten 146
3.6.6.4 Messung des Zelltodes in den Herzschnitten mit der TUNEL-Methode 147

4 DISKUSSION 149

4.1 Die Grundlagen sowie die Zielsetzung dieser Arbeit 149

4.2 Untersuchungen in der Zellkultur 154

4.2.1 Apoptoseinduktion in Endothelzellen 154
4.2.2 Untersuchungen zur Protektion von Endothelzellen 156

4.2.3 Apoptoseinduktion in HUVECs durch physiologische Lipide, freigesetzt durch Lipoproteinlipase von Makrophagen 161

4.3 Untersuchungen *in vivo* 173

5 ZUSAMMENFASSUNG 182

6 LITERATURVERZEICHNIS 185

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1-1: Morphologie der Apoptose und der Nekrose 3
Abb. 1.1-2: Schematische Darstellung der Apoptosemechanismen 6
Abb. 1.1-3: Bcl-2-Familienmitglieder mit anti- bzw. proapototischer Wirkung 8
Abb. 1.1-4: Einteilung der Bcl-2-Proteine 9
Abb. 1.1-5: Erkrankungen, die mit einer Fehlregulation des apoptotischen Zelltodes verbunden sind 11
Abb. 1.2-1: Prinzip der reversiblen Phosphorylierung von Proteinen 13
Abb. 1.2-2: Einteilung der Proteinphosphatasen 15
Abb. 1.2-3: Übersicht der identifizierten PP2C-Isoformen 17
Abb. 1.2-4: Struktur der PP2Cα 18
Abb. 1.2-5: Übersicht einiger bekannter PP2C-Substrate 19
Abb. 1.2-6: Die Rolle von Bad in der Apoptose 22
Abb. 1.2-7: Fettsäuren, Derivate, die PP2C-Aktivierung und Apoptoseinduktion 23
Abb. 1.3-1: Querschnitt durch ein gesundes arterielles Blutgefäß 25
Abb. 1.3-2: Zusammensetzung der Lipoproteine 29
Abb. 1.3-3: Humane Apolipoproteine 30
Abb. 1.3-4: Lipoproteinstoffwechsel 33
Abb. 1.3-5: Die Lipasefamile und ihre Mitglieder 35
Abb. 1.3-6: Regulation der Lipoproteinlipase-Expression und -Aktivität 37
Abb. 1.3-7: Atherogenese (Teil I und II) 42
Abb. 1.3-8: Atherogenese (Teil III) 44

Abb. 2.2-1: Zusammensetzung von Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI-1640) 53
Abb. 2.2-2: Strukturformel von Phorbol-12-myristat-13-acetat 54
Abb. 2.2-3: Aufbau der direkten Kokultur für immunzytochemische Untersuchungen 58
Abb. 2.2-4: Aufbau der separaten Kokultur von HUVECs und THP-1-Zellen 58
Abb. 2.2-5: Strukturformel von Hoechst 33258 59
Abb. 2.2-6: Strukturformel von Staurosporin 60
Abb. 2.3-1: Zusammensetzung der Meerschweinchendiäten 64
Abb. 2.3-2: Nährstoffverhältnisse in den Meerschweinchendiäten 65
Abb. 2.3-3: Lipidparameter der Meerschweinchenseren und die benutzte Messmethode 66
Abb. 2.4-1: Das Prinzip des Blotting-Ablaufs 72
Abb. 2.4-2: Strukturformel von Texas Red® 75
Abb. 2.4-3: Strukturformel von Fluoresceinisothiocyanat (FITC) 75
Abb. 2.5-1: Mechanismus der RNA-Interferenz 83
Abb. 2.5-2: Sekundärstruktur der siRNA-Ziel-mRNA von Lipoproteinlipase 84
Abb. 2.6-1: Lipidparameter der Lipoproteinfraktionen und die benutzte Messmethode 88
Abb. 2.6-2: Konzentrationsbezug der eingesetzten Lipoproteinklassen 88
Abb. 2.7-1: Signifikanzniveaus der eingesetzten Symbole 89

Abb. 3.1-1: Expression von PP2Cα und PP2Cβ in HUVECs und THP-1-Makrophagen 90
Abb. 3.1-2: Expression von Bad in HUVECs und THP-1-Zellen 91
Abb. 3.1-3: Lokalisation von PP2Cβ und Bad in HUVECs 92
Abb. 3.1-4: Lokalisation von PP2Cβ und Bad in THP-1-Makrophagen 92
Abb. 3.2-1: Untersuchung der Apoptoseinduktion von ungesättigten Fettsäuren in HUVECs 93
Abb. 3.2-2: Apoptoseinduktion durch Staurosporin 94
Abb. 3.2-3: Zeitabhängigkeit der HUVECs-Schädigung nach Serumentzug 95
Abb. 3.3-1: Kombinationsbehandlung mit Ölsäure und Ginkgo biloba Inhaltsstoffen 96
Abb. 3.3-2: Kombinationsbehandlung mit Lipoproteinen und Ölsäure 97

Abb. 3.3-3: Lipidaufnahme in HUVECs nach Behandlung mit Lipoproteinen und Ölsäure 99
Abb. 3.4-1: Behandlung von HUVECs mit DHA im Medium mit und ohne Serum 100
Abb. 3.4-2: Aufnahme der Docosahexaensäure in HUVECs im serumfreien und –haltigen Medium 101
Abb. 3.4-3: Kombinationsbehandlung der HUVECs mit Docosahexaensäure und Staurosporin..... 103
Abb. 3.4-4: Kombinationsbehandlung der HUVECs mit Docosahexaensäure und Serumentzug 104
Abb. 3.4-5: Kombinationsbehandlung der HUVECs mit Ölsäure und DHA 105
Abb. 3.4-6: Kombinationsbehandlungen der HUVECs mit Ölsäure und Serumentzug bzw. Staurosporin 106
Abb. 3.5-1: Expression der Lipoproteinlipase auf mRNA-Ebene in HUVECs und THP-1-Zellen 108
Abb. 3.5-2: Zeitabhängigkeit der Lipoproteinlipase mRNA-Expression in THP-1-Zellen nach Zugabe von PMA 108
Abb. 3.5-3: Zeitabhängigkeit der Lipoproteinlipase-Expression in sich differenzierenden THP-1-Zellen 109
Abb. 3.5-4: Zeitabhängigkeit der Lipoproteinlipase-Expression im Zelllysat und Medium von sich differenzierenden THP-1-Zellen 110
Abb. 3.5-5: Lipoproteinlipase-Expression in sich differenzierenden THP-1-Zellen mit und ohne Wechsel des Mediums 111
Abb. 3.5-6: Lokalisation der Lipoproteinlipase in HUVECs, THP-1-Makrophagen und in der Kokultur 112
Abb. 3.5-7: Translokation der Lipoproteinlipase nach Behandlung mit Makrophagenmedium 114
Abb. 3.5-8: Translokation der Lipoproteinlipase in der Kokultur 115
Abb. 3.5-9: Schädigung der HUVECs mit VLDL und Lipasen 117
Abb. 3.5-10: Schädigung der HUVECs mit VLDL im Makrophagenmedium 118
Abb. 3.5-11: Schädigung der HUVECs mit VLDL in der Kokultur mit Makrophagen 119
Abb. 3.5-12: Konzentrationsabhängigkeit von VLDL während der Schädigung kokultivierter HUVECs 120
Abb. 3.5-13: Abhängigkeit der Schädigung kokultivierter Endothelzellen von der THP-1-Zelldichte 121
Abb. 3.5-14: Apoptoseinduktion in HUVECs mit VLDL nach einer Vorbehandlung der Zellen mit Lipoproteinlipase-haltigem Makrophagenmedium bzw. in der Kokultur 123
Abb. 3.5-15: Reduktion der apoptotischen Schädigung durch VLDL und bovine Lipoproteinlipase mit Orlistat 124
Abb. 3.5-16: Reduktion der apoptotischen Schädigung durch VLDL im Makrophagenmedium mit Orlistat 125
Abb. 3.5-17: Herunterregulation der Lipoproteinlipase auf mRNA-Ebene mit siRNA 126
Abb. 3.5-18: Herunterregulation der Lipoproteinlipase auf Proteinebene 127
Abb. 3.5-19: Reduktion der Lipoproteinlipase-Expression und Apoptoserate in HUVECs mit siRNA 129
Abb. 3.6-1: Futteraufnahme der Meerschweinchen 131
Abb. 3.6-2: Entwicklung des Körpergewichts der Meerschweinchen 132
Abb. 3.6-3: Untersuchung der Serumlipide der Meerschweinchen 134
Abb. 3.6-4: Messung der Gewichts- und Längenparameter der Meerschweinchenherzen 136
Abb. 3.6-5: Oil Red O-Färbung der Meerschweinchen-Aorten 137
Abb. 3.6-6: Expression von PP2Cβ im Meerschweinchengewebe und in murinen Kardiomyozyten ... 138
Abb. 3.6-7: Expression von Bad im Meerschweinchengewebe und in murinen Kardiomyozyten 139
Abb. 3.6-8: Aortenbogen - Hämatoxylin-Eosin-Färbung 141
Abb. 3.6-9: Aortenbogen – Elastin van Gieson Färbung 141
Abb. 3.6-10: Aortenbogen - Oil Red O-Färbung 142
Abb. 3.6-11: Herzgewebe – Hämatoxylin-Eosin-Färbung 144
Abb. 3.6-12: Herzgewebe - Oil Red O-Färbung 145
Abb. 3.6-13: Herzgewebe - Untersuchung zur Zelldichtebestimmung 146
Abb. 3.6-14: Herzgewebe - TUNEL-Färbung 148

Abb. 4.2-1: Strukturformel von Orlistat *170*
Abb. 4.3-1: Sterbefälle mit Myokardinfarkt oder Schlaganfall als Ursache *175*

Abkürzungsverzeichnis

AIDS	*acquired immunodeficiency syndrome*
AIF	*apoptosis-inducing factor*
Akt (PKB)	Proteinkinase B
Apaf-1	Apoptose-Protease-Aktivierungsfaktor-1
Apo	Apolipoprotein
APS	Ammoniumperoxysulfat
Bad	*Bcl-xL/Bcl-2 associated death promoter*
Bax	*Bcl-2 associated x protein;* Bcl-assoziertes X-Protein
BCA	*bicinchoninic acid*
Bcl	*B-cell-lymphoma*
BH	*Bcl-2 homology domain*
Bid	*BH3 interacting domain death agonist*
BLAST	*basic local alignment search tool*
Bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CAD	*caspase-activated DNase*
cDNA	*Copy* DNA
C. elegans	*Caenorhabditis elegans*
Caspase	*cysteine-dependent aspartat specific protease*
CFTR	*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*
CM	Chylomikronen
DARP-32	*dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein*
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
ECL	*enhanced chemiluminescence*
EDF	endotheliale Dysfunktion
EDRF	*endothelium-derived relaxing factor*
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fas	*fibroblast-associated*
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoroisothiocyanat

FMD	*flow mediated vasodilatation*
HE	Hämatoxylin-Eosin
HDL	*high density lipoprotein*
HIV	*human immunodeficiency virus*
HMG-CoA	Hydroxymethylglutaryl-CoA
HRP	*horseradish peroxidase*, Meerrettichperoxidase
HSPG	Heparansulfatproteoglykane
HTGL	hepatische Triglyceridlipase
HUVECs	*human umbilical vein endothelial cells*
IAP	*inhibitor of apoptosis*
IC_{50}	inhibitorische Konzentration
ICAD	*inhibitor of caspase-activated DNase*
ICAM	*intracellular adhesion molecule*
ICC	*immunocytochemistry*
IDL	*intermediate density lipoprotein*
IHC	*immunohistochemistry*
i.p.	intra peritoneal
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LCAT	Lecithin-Acyltransferase
LDL	*low density lipoprotein*
LPL	Lipoproteinlipase
MAPK	*mitogen activated protein kinase*
MCP	*macrophage chemoattractant protein*
M-CSF	*macrophage colony stimulating factor*
MEM	*Modified Eagle's Medium*
MKK	*MAP-Kinase Kinase*
MMLV	*Moloney-Murine-Leukemia-Virus*
mRNA	*messenger* RNA
NO	*nitric oxide*
nt	*nucleotide*
oxLDL	oxidiertes LDL
OD_{260}	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm
p	Signifikanzniveau

PAF	*platelet-activating factor*
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PBS	*phosphate-buffered saline*
PCR	*polymerase chain reaction*
PHP	Proteinhistidinphosphatase
PKA	Proteinkinase A
PKB (Akt)	Proteinkinase B
PL	Pankreaslipase
PLTP	Phospholipid-Transferprotein
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP	Proteinphosphatase
PP1	Proteinphosphatase 1
PP2A	Proteinphosphatase 2
PP2B	Proteinphosphatase 2B
PP2C	Proteinphosphatase 2C
PPM	Proteinphosphatase M, magnesiumabhängig
PPP	Phosphoproteinphosphatasen
PTP	Proteintyrosinphosphatasen
RISC	*RNA-induced silencing complex*
RNAi	RNA-Interferenz
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	*rotations per minute*
RT	Raumtemperatur
rTdT	*recombinant terminal deoxynucleotidyl transferase*
RT-PCR	*reverse transcriptase polymerase chain reaction*
SAPKs	*stress-activated protein kinases*
S.D.	Standardabweichung
SDS	*sodium dodecylsulfate;* Natriumlaurylsulfat
siRNA	*small interfering RNA*
Smac	*second mitochondrial activator of caspases*
SMC	*smooth muscle cells*
TBST	*Tris-buffered saline with Tween*

TEMED	N, N, N´, N´-Tetramethylethylendiamin
THP-1	humane myeloide Leukämiezelllinie
TM	transmembranäre Region
TNFR1	Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1
t-PA	*tissue plasminogen activator*
TRAIL	*tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*
TUNEL	*terminal deoxynucleotidyl dUDT nick end labeling*
U	*unit*
VCAM	*vascular cell adhesion molecule*
VLDL	*very low density lipoprotein*

1 Einleitung

1.1 Apoptose

Ein fester Bestandteil des Lebens wird durch den Tod dargestellt. Umso klarer wird diese Aussage, wenn man bedenkt, dass täglich etwa 100 Milliarden Zellen in einem gesunden menschlichen Körper zugrunde gehen (Grimm, 2003). Sie werden von Nachbarzellen verdaut und durch neue Zellen ersetzt. Dieses natürliche Gleichgewicht ist für die Entwicklung und die Erhaltung des Organismus von äußerster Bedeutung.

Bereits 1842 hatte Vogt erkannt, dass der Zelltod physiologisch hervorgerufen werden kann, und 1885 beobachtete Flemming die Zellkernfragmentation. Die Relevanz dieses Prozesses wurde jedoch lange Zeit unterschätzt (Clarke und Clarke, 1996). Hinderlich war, dass das Absterben von Zellen im Körper sehr schnell geschieht und es somit entsprechend kompliziert ist dieses Phänomen nachzuweisen bzw. zu erforschen. Weiterhin ist es für viele Wissenschaftler schwer gewesen zu akzeptieren, dass lebende Zellen sich selbst umbringen könnten. Man ging davon aus, dass der Zelltod nur durch aktive Zellschädigungen von Außen auftreten würde. Erst im Jahre 1964 wurde von Lockshin und Williams der Begriff des programmierten Zelltodes verwendet (Lockshin und Williams, 1965) und 1972 durch Kerr mit Apoptose gekennzeichnet (Kerr *et al.*, 1994). Der Terminus stammt aus dem Griechischen und bedeutet „fallende Blätter“, eine bildliche Assoziation für den zum Leben gehörenden Tod.

1.1.1 Apoptose – die Grundlagen

Apoptose ist ein Prozess, bei dem ein Suizidstimulus zum gesteuerten Untergang der Zelle führt. Im Gegensatz dazu ist die Nekrose, griechisch „Leichnam“, ein destruktives Ereignis, das nach einer exogenen Zellschädigung auftritt. Während der nekrotische Tod eher pathologischer Natur ist, bildet die Apoptose einen physiologisch bedeutungsvollen terminalen Differenzierungsprozess, ohne den eine Homöostase des Organismus nicht möglich wäre. Bereits in der Embryonalentwicklung kommt es zu einer Modellierung der verschiedenen Gewebe mit einem Auf- aber auch Abbau von Zellen. So bilden sich etwa Hautfalten zwischen den Fingern eines Embryos, die noch ein altes Relikt unserer Vorfahren aus dem Wasser sind, durch gezielte Apoptose zurück, um letztendlich die Form einer Hand

zu erlangen. Die Evolution zeigt, dass für das Hervorbringen des Lebens es einfacher ist, etwas Geschaffenes kontrolliert zu eliminieren, als es von vornerein komplett zu entwickeln. Weiterhin spielt die Apoptose eine wichtige Rolle bei der Verteidigung des Organismus. Dementsprechend werden etwa infizierte oder entartete Zellen gezielt durch das Immunsystem beseitigt. Durch dieses altruistische Verhalten wird der Gesamtorganismus vor Krankheiten geschützt (Griffin und Hardwick, 1997; Bantel und Schulze-Osthoff, 2003).

1.1.2 Apoptose und Nekrose: Unterschiede der Morphologie

Apoptose, auch programmierter Zelltod genannt, ist gekennzeichnet durch ein initiales Schrumpfen und Kondensieren des Zytoplasmavolumens, was zum Ablösen aus dem Gewebeverband führt. Durch den Verlust von Wasser aus dem Intrazellulärvolumen kommt es zu einer Verdichtung und Konzentrierung des Zellinhaltes. Jedoch bleiben Plasmamembranen und die einzelnen Zellorganellen intakt. Somit wird eine inflammatorische Antwort ausgeschlossen. Im späteren Verlauf kommt es durch Fragmentierung der Zytoskelettbestandteile zu einer weiteren Volumenreduktion und zu einem „*membrane blebbing*“, jedoch zu keinem Verlust der Membranintegrität (Kanduc *et al.*, 2002). Im Gegensatz zur Nekrose ist die Apoptose ein aktiver Prozess, der eine hohe Energiemenge in Form von ATP benötigt (Skulachev, 2006).

Weiterhin kann man eine typische Zellkernschrumpfung beobachten, die mit einer Chromatinverdichtung einhergeht (Kanduc *et al.*, 2002). In einem späteren Verlauf bewirken Endonukleasen eine spezifische Fragmentierung der DNA zwischen den Nukleosomen (Eastman, 1995; Nagata, 2000). Durch diesen Vorgang entstehen Bruchstücke, die jeweils 200 Basenpaare (bp) bzw. ein Vielfaches davon lang sind. Diese zeigen nach einer elektrophoretischen Auftrennung ein für Apoptose typisches Muster, die DNA-Leiter (Shi, Y. F. *et al.*, 1990). Schließlich kommt es ebenfalls zu einer Fragmentierung des Zellkerns und zu einem Zerfall der Zelle in sogenannte apoptotische Körperchen. Diese Zellbruchstücke, immer noch von einer intakten Membran umschlossen, können Teile des Chromatins, des endoplasmatischen Retikulums und sogar ganze Mitochondrien beinhalten. Die Umlagerung von Phosphatidylserin, einem Phospholipid, von der Membraninnen- auf die Membranaußenseite markiert diese Zelle für eine endozytotische Aufnahme durch Nachbarzellen und Makrophagen (Denecker *et al.*, 2000). Somit wird eine apoptotische Zelle vollständig, ohne eine entzündliche Reaktion eliminiert und wiederverwertet (Savill und Fadok, 2000) (Abb. 1.1-1).

Neben der Apoptose, kann man auch ein durch äußere Einflüsse ausgelöstes Konzept, das mit einem Mord der Zelle verglichen werden kann, beobachten; die Nekrose. Im Gegensatz zur Apoptose läuft die Nekrose passiv ohne Energieverbrauch ab und ist auch entsprechend weniger geordnet (Eguchi *et al.*, 1997; Skulachev, 2006). Bei nekrotischen Zellen beobachtet man eher eine Volumenvergrößerung des Zytoplasmas, auch Onkose genannt (Andersson und Wang, 1998). Das Chromatin kondensiert in diesem Fall unregelmäßig und man erhält nach elektrophoretischer Auftrennung nur asymmetrische Bruchstückgrößen. Durch Überdehnung der Plasmamembran kommt es zu einer Schädigung dieser und zum Einstrom von extrazellulärem Wasser in die Zelle bzw. deren Zellorganellen. Schließlich löst das Anschwellen der Strukturen den Austritt des Zellinhalts aus, was eine lokale Entzündungsreaktion und Gewebeschädigung zur Folge hat. (Savill und Fadok, 2000) (Abb. 1.1-1).

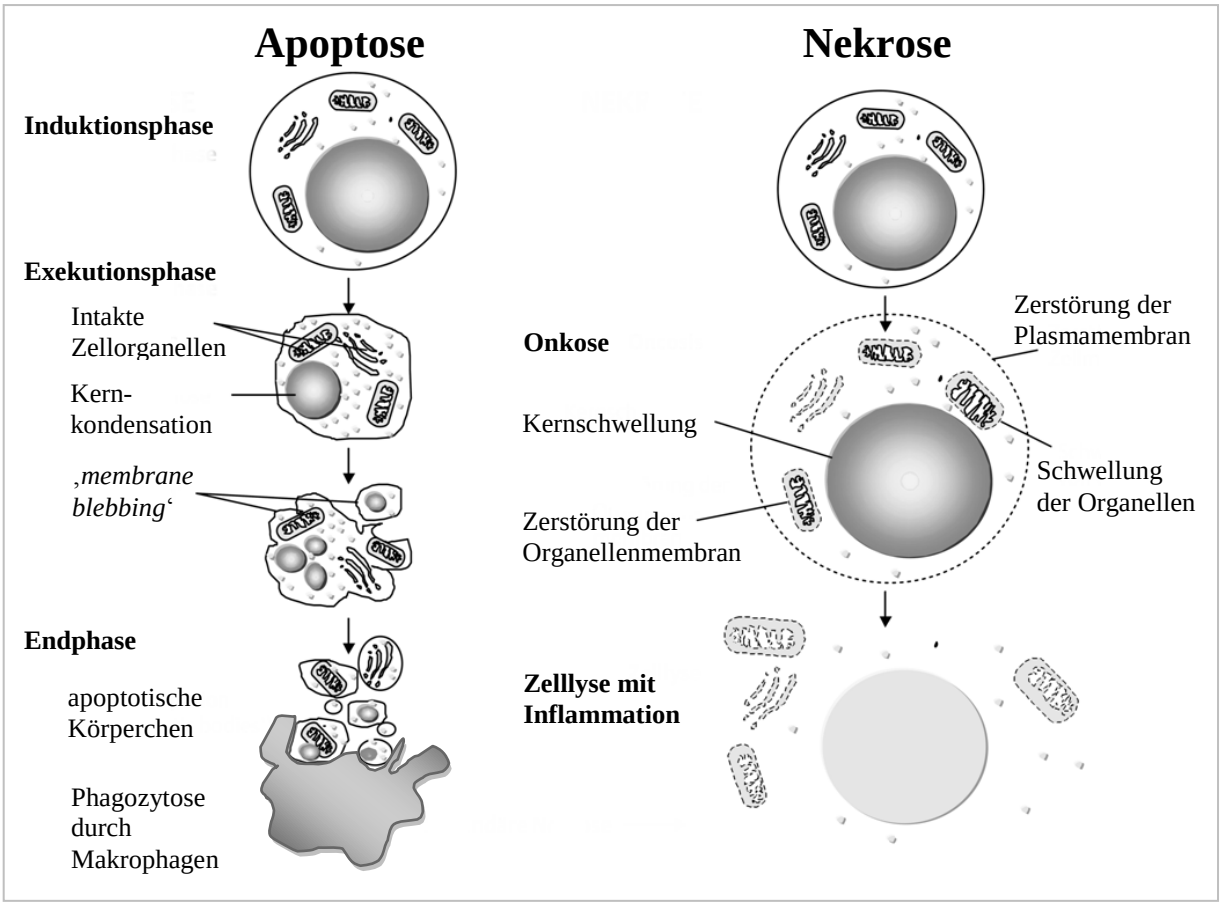


Abb. 1.1-1: Morphologie der Apoptose und der Nekrose

Die Abbildung ist modifiziert nach Bohm *et al*., 2006.

Eine derartig klare Unterscheidung des Zelltodes in Apoptose und Nekrose ist nach heutigen Erkenntnissen jedoch nur selten möglich. Sie stellen allenfalls Extremsituationen

dar, wobei die Wirklichkeit meistens Aspekte beider Zelltodesarten beinhaltet (Leist *et al.*, 1997; Nicotera und Melino, 2004; Fink und Cookson, 2005).

1.1.3 Die Maschinerie der Apoptose

Die moderne Wissenschaft beschäftigt sich schon seit geraumer Zeit mit der Aufklärung der Apoptose. Man hat eine Menge Erkenntnisse über den Zelltod gesammelt, doch werden beinah wöchentlich neue Proteine und Signalwege, die während des apoptotischen Zelluntergangs aktiv sind, publiziert. Wesentliche Komponenten bei der Ausführung der Apoptose sind u.a. spezielle Proteasen - die Caspasen, die Bcl-2-Familie, bestehend aus einer Gruppe von Regulatorproteinen, sowie die Mitochondrien der Zelle (Reed, 2000). Alle pro-apoptotischen Moleküle sind in der lebenden Zelle zu finden. Sie sind jedoch entweder in einem inaktiven Zustand oder räumlich von ihrem Apoptose-auslösenden Wirkort getrennt. Dadurch scheint sich die Zelle vor einer zufälligen Induktion der Apoptose zu schützen.

1.1.3.1 Die Caspasen

Caspasen sind proteolytisch aktive Enzyme, die Bezeichnung wurde von „*cysteinyl aspartate-specific proteinase*“ abgeleitet. Diese hochspezifischen Proteasen sind die eigentlichen Exekutoren der Apoptose. In der Zelle liegen sie in inaktiver Form als Procaspasen vor. Erst nach einer Proteolyse werden sie aktiv (Thornberry und Lazebnik, 1998). Während der sogenannten Caspase-Kaskade können sich diese Enzyme gegenseitig aktivieren. Diese Reaktionskette scheint evolutionär konserviert zu sein (Nunez *et al.*, 1998). Man unterteilt sie je nach ihrer Aktivierbarkeit und ihrem Substrat in Initiator- sowie Effektorcaspasen (Cohen, G. M., 1997).

Initiator-Procaspasen sind die Vorgänger der Initiatorcaspasen und stehen am Anfang der Caspase-Kaskade. Sie können auf zwei Wegen zu wirksamen Form aktiviert werden, durch äußere (extrinsische) sowie innere (intrinsische) Signale.

Die Aktivierung der Enzyme über den extrinsischen Signalweg erfolgt über sogenannte Todesrezeptoren wie TRAIL, Fas oder TNFR1 (Sartorius *et al.*, 2001). Diese membranständigen Proteine sind zu jeder Zeit an der Zelloberfläche vorhanden und trimerisieren nach einem Kontakt mit dem entsprechenden Liganden. Auf der Innenseite der Membran binden Adaptormoleküle, an die sich schließlich die Procaspasen-8 anlagern. Dieser Vorgang führt zu deren Aktivierung und Ablösung vom Rezeptorkomplex (Gupta, 2001). Die Initiator-Caspasen können nun nachgeschaltete Effektor-Caspasen proteolysieren, was die

Caspase-Kaskade in Gang bringt. Zu den weiteren Substraten der Caspase-8 gehört auch das pro-apoptotische Bid, dass zu tBid (*truncated* Bid) modifiziert wird und die proapoptotischen Faktoren Bak, Bad und Bax aktiviert. Dieser Vorgang führt wiederum zu einer verstärkten Aktivierungs-Rückschleife (Luo *et al.*, 1998; Wood und Newcomb, 1999; Condorelli *et al.*, 2001; Wei *et al.*, 2001) (Abb. 1.1-2).

Der intrinsische Weg der Apoptoseinduktion beginnt mit der Ausbildung der Apoptosomen, die sich aufgrund eines mitochondrialen Membranzusammenbruchs bilden. Ein Apoptosom ist ein heptagonaler Komplex, der aus Apaf-1 (Apoptose-Protease-Aktivierungsfaktor-1) Molekülen besteht. Das im Zytosol vorhandene inaktive Apaf-1 wird durch Smac (*second mitochondrial activator of caspases*), das aus Mitochondrien heraustritt, zur aktiven Form umgewandelt. Nach einer Anlagerung von Cytochrom c, das ebenfalls von Mitochondrien sezerniert wird, verändert sich die Konformation des Apaf-1, was zu einer Oligomerisierung führt (Benedict *et al.*, 2000; Pop *et al.*, 2006; Shi, Y., 2006; Bao und Shi, 2007). Das nun aktive Apoptosom aktiviert die Initiator-Procaspase-9 zur Wirkform, die andere Effektor-Caspasen aktiviert (Guegan *et al.*, 2001; Pop *et al.*, 2006) (Abb. 1.1-2).

Die so in Gang gebrachte Caspasen-Kaskade ist von nun an nicht mehr aufzuhalten. Die aktivierten Effektor-Caspasen übernehmen die Ausführung des Todesprogramms, zu diesen zählen vor allem die Caspasen-3, -6 und -7 (Slee *et al.*, 2001). Diese proteolysieren dann spezifisch eine Reihe von bestimmten Proteinen in der Zelle. So werden Teile des Zytoskeletts, Myosin, und indirekt auch die DNA des Zellkerns degradiert, was letztendlich zum Zelluntergang führt (Maravei *et al.*, 1997; Enari *et al.*, 1998; Moretti *et al.*, 2002) (Samejima *et al.*, 1999). Andere Substrate, wie etwa das Endonuklease-inaktivierende PARP (*poly (ADP-ribose) polymerase*), werden durch gezielte Spaltung ihrer zellschützenden Funktion beraubt (Simbulan-Rosenthal *et al.*, 1999). Ähnlich verhält es sich mit ICAD (*inhibitor of caspase-activated DNase*), dieses Protein wird von Caspasen gespalten und kann danach nicht mehr CAD (*caspase-activated DNase*) inhibieren. Somit führt der Vorgang ebenfalls zur Degradation der DNA (Nagata, 2000). Die anderen Caspasen übernehmen vor allem vermittelnde Wirkungen innerhalb der Kaskade (Widmann *et al.*, 1998) (Abb. 1.1-2).

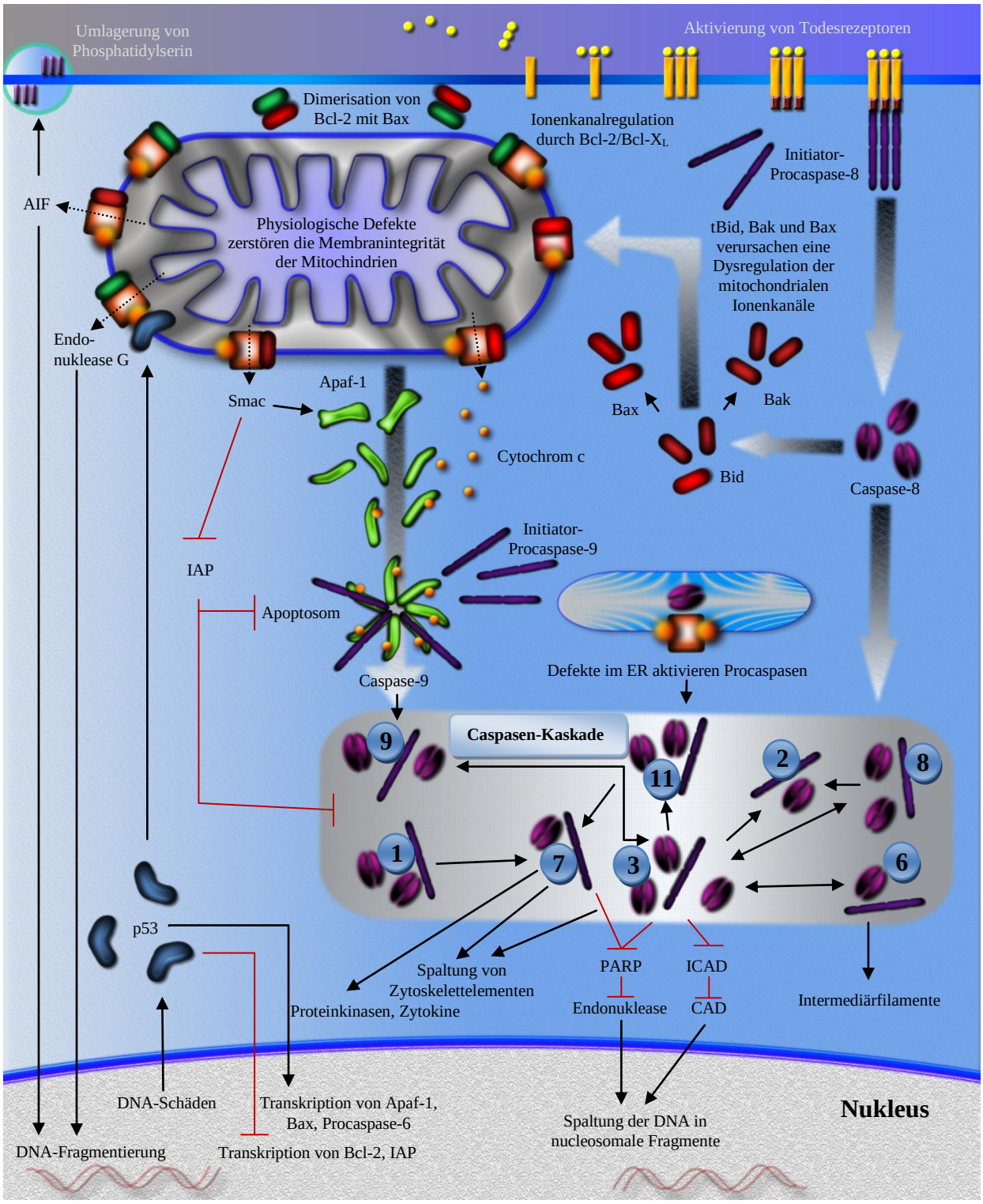


Abb. 1.1-2: Schematische Darstellung der Apoptosemechanismen

Legende:

: Hauptwege der Apoptose

: fördert/aktiviert

: hemmt/inaktiviert

ER : endoplasmatisches Retikulum .

: Caspase

: Procaspase

1 : Caspasen-Nummer

(Für eine genaue Beschreibung der Abbildung siehe Kapitel 1.1.3.)

1.1.3.2 Die Mitochondrien

Die Kraftwerke der Zelle spielen bei der intrinsischen Apoptoseinduktion eine entscheidende Rolle. Sie können selbstständig oder aufgrund einer Porenbildung durch proapoptotische Proteine der Bcl-2-Familie, wie z.B. tBid, Bak und Bax, den Zelltod bewirken (Kroemer und Reed, 2000). Durch verschiedene Toxine, reaktive Sauerstoffspezies, Strahlung oder Energiedysbalancen kann die mitochondriale Membranintegrität gestört werden, was zu einem auswärtigen Strom von bestimmten Apoptose-auslösenden Proteinen ins Zytosol führen kann. Zu diesen zählen neben den schon beschriebenen Cytochrom c und Smac, die das Apoptosom ausbilden und die Caspasen-Kaskade aktivieren, die Endonuklease G und der Apoptose induzierende Faktor (AIF). Die beiden Letztgenannten sind an der Spaltung des Chromatins beteiligt (Eastman, 1995; Daugas *et al.*, 2000), wobei AIF zusätzlich die Translokation von Phosphatidylserin von der Innen- auf die Außenseite der Plasmamembran bewirkt und demgemäß, wie bereits erwähnt, die Zelle nach außen für das Immunsystem „markiert“ (Susin *et al.*, 1999) (Abb. 1.1-2).

1.1.3.3 Die Bcl-2-Familie

Bis heute sind 25 Gene, dieser immer noch mit Rätseln behafteten Genfamilie, bekannt (Gross, 2005). Das als Onkogen identifizierte Bcl-2-Protein wurde 1988 im B-Zelllymphom entdeckt, daher der Name (Reed *et al.*, 1988). Neben Bcl-X_L ist es ein permanent aktiver antiapoptotischer Faktor. Beide sind an der Regulation von mitochondrialen sowie sarkoplasmatischen Kanälen beteiligt (Kim, R., 2005). Prinzipiell lassen sich die Bcl-2-Familienmitglieder in zwei Gruppen unterteilen, in die pro- und die antiapoptotisch wirksamen Proteine.

Zur antiapoptotischen Fraktion gehören neben den erwähnten Bcl-2 und Bcl-X_L noch drei andere Vertreter, Bcl-w, Mcl-1 sowie A1. Zu den proapoptotischen Mitgliedern zählen Bax, Bak, Bok, Bcl-X_S, Bid, Bik/Nbk, Bim, Krk und Mtb (Antonsson und Martinou, 2000) (Abb. 1.1-3).

Zwar kann diese Differenzierung in „gut“ und „böse“ aufgrund der Wirksamkeit erfolgen, eine Verwandtschaft der einzelnen Mitglieder ist aufgrund einer niedrigen Aminosäurensequenz-Homologie auf den ersten Blick nicht einfach ersichtlich. Es gibt jedoch vier spezifische Regionen, sogenannte Bcl-2 homologe Domänen (*BH-domains*), welche durchaus bei den Mitgliedern der Proteinfamilie konserviert vorliegen (Farrow und Brown, 1996; Kelekar und Thompson, 1998) (Abb. 1.1-4).

Antiapoptotisch	Proapoptotisch
	Bax
	Bak
Bcl-2	Bok
Bcl-X_L	Bcl-X_S
Bcl-w	Bad
Mcl-1	Bid
A1	Bik/Nbk
	Bim
	Krk
	Mtd

Abb. 1.1-3: Bcl-2-Familienmitglieder mit anti- bzw. proapototischer Wirkung

Alle Mitglieder der Bcl-2-Familie haben mindestens eine dieser Domänen, einige weisen zusätzlich eine Transmembrandomäne auf, mit der sie an Membranen binden können (Hsu und Hsueh, 2000). Diese Bereiche bestimmen das gegenseitige Interaktionspotential zwischen den einzelnen Vertretern der Familie. Die BH1- und BH2-Domänen sind für die Interaktion der antiapoptotischen Faktoren Bcl-2 und Bcl-X_L mit Bax verantwortlich (Yin *et al.*, 1994). Die N-terminale BH4-Domäne findet man nur bei antiapoptotischen Vertretern der Bcl-2-Familie, welche für die Bindung an Apoptose-induzierende Faktoren verantwortlich gemacht wird (Huang *et al.*, 1998) (Abb. 1.1-4).

Dagegen können die proapoptotischen Proteine weiterhin in zwei Gruppen unterteilt werden. Zur ersten zählen die Proteine der sog. *BH3 only*-Untergruppe, zur anderen die Proteine mit einer „Multidomäne“, die zur Bax-Subfamilie gehören (Antonsson und Martinou, 2000). Dementsprechend sind diese Mitglieder wie z.B. Bax, Bak und Bok, an der Mitochondrienmembran aktiv. Hier können sie, meist nach einer Oligomerisierung, Poren bilden und somit Cytochrom c und andere Apoptose-fördernde Substanzen freisetzen (Green und Reed, 1998; Shimizu *et al.*, 1999; Antonsson, 2001; Wei *et al.*, 2001). Dagegen scheint die BH3-Domäne eine Rolle bei der Heterodimerisierung mit anderen, sowohl pro- wie auch antiapoptotischen Bcl-2-Proteinen zu spielen (Zha *et al.*, 1997; Hinds *et al.*, 2007) (Abb. 1.1-2. und Abb. 1.1-4).

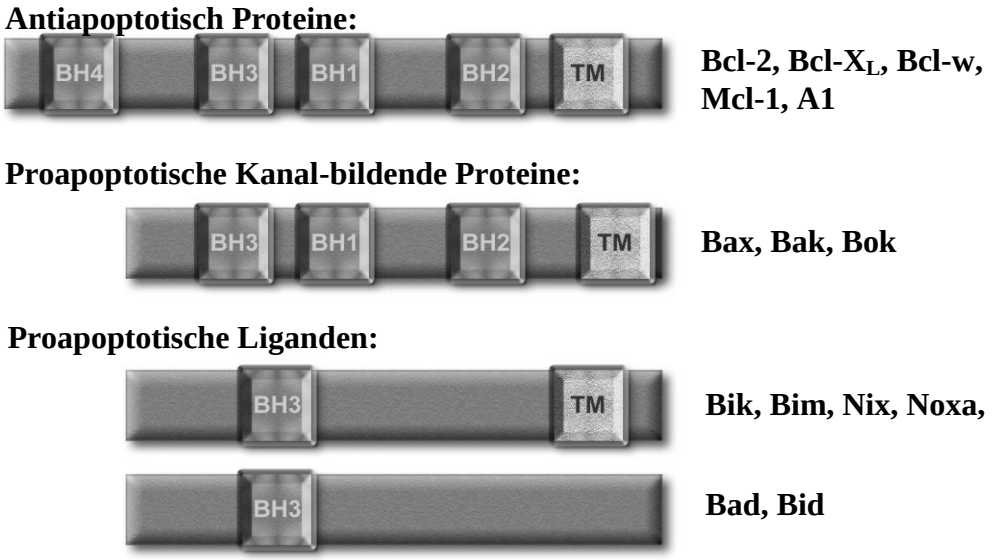


Abb. 1.1-4: Einteilung der Bcl-2-Proteine

TM: Transmembrandomäne

Die Abbildung ist modiziert nach Hsu und Hsueh, 2000.

So kann zusammengefasst werden, dass das Gleichgewicht zwischen den pro- und antiapoptotischen Bcl-2-Familienmitgliedern über Tod und Leben entscheidet. Liegt das Verhältnis auf der Seite der antiapoptotischen Gruppe, dann sind entsprechend die proapoptotischen Vertreter als Heterodimere gebunden. Sie sind somit nicht in der Lage die Integrität der Mitochondrien zu stören. Infolgedessen kann keine Freisetzung von Cytochrom c und anderen Faktoren aus den „Kraftwerken“ erfolgen und die Zelle überlebt. Das beschriebene Gleichgewicht der pro- und antiapoptotischen Bcl-2-Mitglieder kann die Zelle u.a. durch Expressionsänderung oder durch Phosphorylierung dieser Proteine gezielt beeinflussen (Hsu und Hsueh, 2000).

1.1.3.4 Weitere Apoptoseauslöser

Die Maschinerie der Apoptose kann aber nicht nur über eine Aktivierung der Todesrezeptoren oder über die mitochondriale Membrandysfunktion erfolgen, es sind noch weitere Faktoren bekannt, welche zum programmierten Zelltod führen können.

Stress des endoplasmatischen Retikulums führt zu einer Dysregulation der Ca^{2+}-Homöostase (Wang, H. G. *et al.*, 1999; Ferrari *et al.*, 2002; Pinton und Rizzuto, 2006) und zu einer Aktivierung der dort gegenwärtigen Procaspasen zu Caspasen, was schließlich zum Zelluntergang führt (Breckenridge *et al.*, 2003; Jimbo *et al.*, 2003) (Abb. 1.1-2).

Auch können Mutationsdefekte im Nukleus der Zelle den Tod initiieren. Das Gen für den Tumorsupressor p53 wird bei einer auftretenden DNA-Schädigung aktiviert. Dieser Transkriptionsfaktor führt zu einer Neusynthese proapoptotischer Faktoren wie Apaf-1, Bax und Procaspase-6 sowie zu einer Transkriptionshemmung von antiapoptotischen Faktoren wie Bcl-2, Bcl-X_L und IAP (*inhibitor of apoptosis protein*) (Lane, 1992; Cregan *et al.*, 1999; Marchenko *et al.*, 2000; Sheikh und Fornace, 2000; Gupta *et al.*, 2001) (Abb. 1.1-2).

Eine weitere Möglichkeit die Apoptose auszulösen, ist die Ausschüttung von Granzym B, einer Serinprotease. Durch diesen Vorgang können zytotoxische T-Lymphozyten in den anvisierten Zellen gezielt Apoptose induzieren (Smyth *et al.*, 1996; Lord *et al.*, 2003). Diese Enzyme greifen direkt durch Aktivierung der Procaspase-3 und Procaspase-7 in die Caspase-Kaskade ein (Miller, 1997; Pham und Ley, 1997). Der beschriebene Mechanismus ist eine äußerst wirksame und elegante Methode des Immunsystems den Organismus von unerwünschten oder infizierten Zellen zu befreien (Trapani und Sutton, 2003).

Apoptose von Zellen im Organismus ist also ein sehr fein gesteuerter Mechanismus, welcher ein komplexes Wechselspiel von pro- wie antiapoptotischen Genen voraussetzt. Wenn die Feinmechanik der Zellproliferation oder Apoptose nicht funktioniert, entstehen Störungen in der Gewebehomöostase und somit bestimmte Krankheitsbilder.

1.1.4 Krankheiten und Apoptose

Es gibt Schätzungen, dass mehr als die Hälfte der Erkrankungen, die nicht therapiert werden können, auf einem Missverhältnis zwischen Apoptose und Proliferation beruhen (Rudin und Thompson, 1997) (Abb. 1.1-5).

So findet man bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson eine erhöhte Apoptoserate von Neuronen in bestimmten Hirnregionen vor. Während beim Morbus Parkinson dopaminerge Neurone in der Substantia Nigra Zugrunde gehen, beruht die Alzheimerdemenz auf einer Großhirnrindenatrophie (Tatton *et al.*, 2003; Alberghina und Colangelo, 2006). Ischämische Erkrankungen wie Koronarsklerose, Herzinfarkt und Schlaganfall führen aufgrund einer Minderversorgung des Gewebes mit lebenswichtigen Nährstoffen und Sauerstoff zum apoptotischen Zelltod (MacManus und Linnik, 1997; Ferrer, 2006). Dementsprechend sind auch bestimmte Herzmuskelerkrankungen mit einer erhöhten Zellapoptoserate assoziiert (Reeve *et al.*, 2005; Gonzalez *et al.*, 2006). Ein Missverhältnis mit einem Überwiegen der Apoptose- im Vergleich zur Zellteilungsrate ist weiterhin bei HIV (*human immunodeficiency virus*)-Infektionen bzw. AIDS (*acquired immunodeficiency syndrome*), Hepatiden und Atherosklerose nachgewiesen (Dimmeler *et al.*,

1998; Boyle, 1999; Rossig *et al.*, 2001; Phenix *et al.*, 2002; Bantel und Schulze-Osthoff, 2003; Kutuk und Basaga, 2006) (Abb. 1.1-5).

Assoziiert mit erhöhter Apoptoserate	Assoziiert mit erniedrigter Apoptoserate
Morbus Alzheimer	
Morbus Parkinson	
AIDS	Krebs
Ischämische Erkrankungen	Autoimmunerkrankungen
Diabetes mellitus	Virusinfektionen
Atherosklerose	
Hepatiden	

Abb. 1.1-5: Erkrankungen, die mit einer Fehlregulation des apoptotischen Zelltodes verbunden sind

Dagegen bekämpfen Onkologen die hyperplasierenden Erkrankungen, welche auf eine verminderte Apoptoseinduktion zurückzuführen sind (Fesik, 2005; Meng *et al.*, 2006). Die unkontrollierte Proliferation der erkrankten Zellen führt zum Invasionswachstum und zur Metastasierung. Die Ursachen für die mangelnde Fähigkeit Zelltod auszulösen sind durch Fehlregulationen in der Apoptosemaschinerie zu finden. Man beobachtet z.B. in Tumoren Expressionserhöhungen von antiapoptotischen Bcl-2-Familienmitgliedern wie Bcl-2 und Bcl-X_L. Auch Defekte der Caspase-3 oder Mutationen in Genen von Todesrezeptoren können mit Krebserkrankungen assoziiert werden. Zur Manipulation der Apoptoseinduktion sind u.a. viele virale Krankheitserreger in der Lage. So können Epstein-Barr-Viren die Expression der zellulären Bcl-2-Proteine verändern (Kim, L. H. *et al.*, 2004). Der Tumorsupressor p53 kann durch Hepatitisviren gehemmt werden (Kew, 1997; Feitelson, 1998). Weiterhin wird vermutet, dass fast alle Autoimmunerkrankungen mit einer reduzierten Apoptoserate einhergehen (Akdis *et al.*, 2004; Fadeel und Orrenius, 2005) (Abb. 1.1-5).

Obwohl die moderne Wissenschaft heutzutage schon ein enormes Wissen über den Zelltod gesammelt hat, lassen sich die oben genannten pathologischen Zustände leider nur zu einem geringen Anteil kausal therapieren. Die Grundlagenforschung ist weiterhin verpflichtet

die gewaltige Maschinerie des Zelltodes aufzuklären, damit bald Heilmittel gegen diese Erkrankungen entwickelt werden können.

1.2 Reversible Phosphorylierung

Die reversible Proteinphosphorylierung ist einer der wichtigsten Mechanismen zur Regulation von zellulären Vorgängen. Edmond H. Fischer und Edwin G. Krebs haben in den 50er Jahren des letzten Jahrhunderts als Erste dieses Phänomen entdeckt (Krebs *et al.*, 1959). Für diese sensationelle Forschung wurden beide Wissenschaftler 1992 mit dem Nobelpreis geehrt.

1.2.1 Proteinkinasen und Phosphatasen

Bis heute weiß man, dass das menschliche Genom etwa 500 Proteinkinasen und ca. 150 Proteinphosphatasen kodiert (Cohen, P., 2001). Das Hauptaugenmerk der Wissenschaft war lange Zeit auf den scheinbar dominant vertretenden Kinasen, welche eine Phosphatgruppe des ATPs bzw. GTPs auf Proteine übertragen können, gerichtet. Die funktionellen Gegenspieler, die Phosphatasen, welche das kovalent gebundene Phosphat wieder hydrolysieren können, wurden dagegen vernachlässigt (Cohen, P. und Cohen, 1989; Hunter, 1995) (Abb. 1.2-1).

Es schien, nicht nur durch ihre zahlenmäßige Überlegenheit, dass die Kinasen spezifischer reagieren als ihre Gegenspieler. Heute weiß man jedoch, dass diese Ansicht nicht richtig ist. Phosphatasen sind wichtige spezifisch und differenziert agierende Regulatoren, die durch Dephosphorylierung bedeutsame Signalwege an- und abschalten können (Herzig und Neumann, 2000; Dombradi *et al.*, 2002).

Bei der reversiblen Phosphorylierung werden gammaständige Phosphatgruppen des energiereichen ATPs bzw. GTPs kovalent auf eine bestimmte Aminosäure eines Proteins übertragen, welches aufgrund der gebundenen geladenen Gruppe seine Konformation und dadurch seine Eigenschaften verändert (Canagarajah *et al.*, 1997; Cohen, P., 2000a).

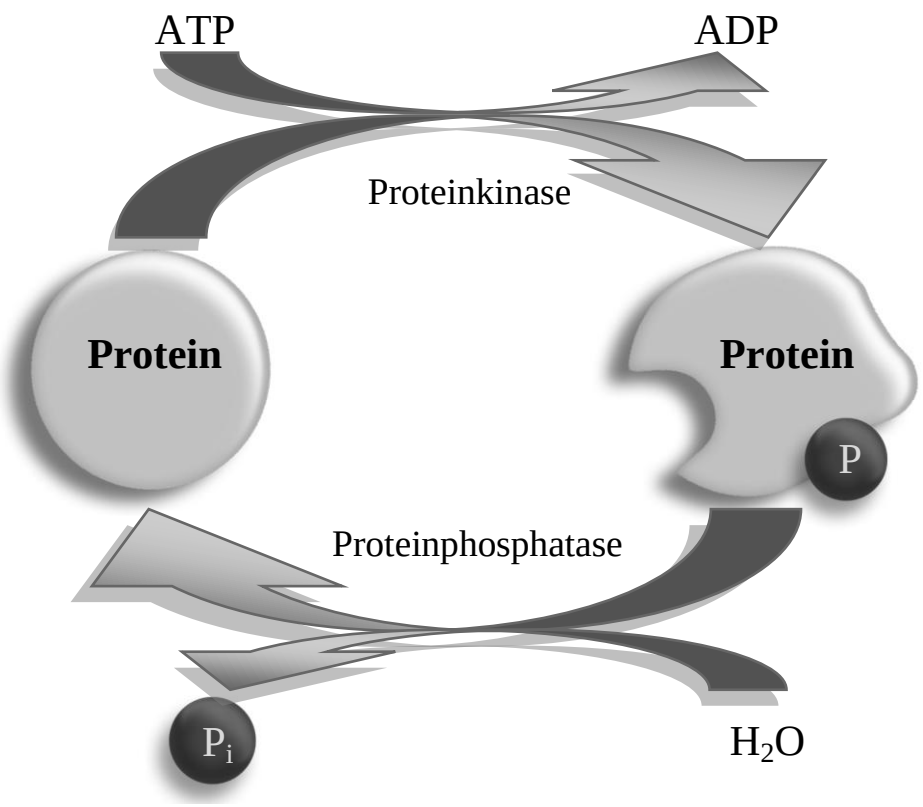


Abb. 1.2-1: Prinzip der reversiblen Phosphorylierung von Proteinen

Proteinkinasen sind in der Lage eine Phosphatgruppe des energiereichen ATP-Moleküls auf bestimmte Aminosäuren eines Proteins zu übertragen, welches dadurch seine Konformation verändert. Phosphatasen können das kovalent gebundene Phosphat wieder hydrolytisch abspalten, was die ursprüngliche Proteinkonformation wieder herstellt.

Etwa 30% aller humanen Proteine beinhalten molekular gebundenes Phosphat, die meisten weisen multiple Phosphorylierungsstellen auf (Cohen, P., 2000b). Der Phosphorylierungsgrad eines Proteins hängt davon ab wie das Gleichgewicht zwischen Proteinkinasen und Proteinphosphatasen ist (Abb. 1.2-1). Beide Enzymklassen werden selbst ebenfalls durch den Mechanismus der reversiblen Phosphorylierung weiter reguliert und kontrolliert (Dombradi *et al.*, 2002).

Die reversible Phosphorylierung spielt bei fast allen physiologischen zellulären Prozessen eine entscheidende Rolle. So werden etwa die hormonelle Sekretion (Weigel, 1996), Mitose und Meiose (Nigg *et al.*, 1996; Brar *et al.*, 2006), Energiestoffwechsel (Fueger, 2005), Signaltransduktion in der Zelle (Graves und Krebs, 1999), Transkription von Genen (Holmberg *et al.*, 2002; Kobor und Greenblatt, 2002) sowie der apoptotische Zelltod durch Kinasen bzw. Phosphatasen reguliert und dirigiert (Gjertsen und Doskeland, 1995; Ruvolo *et al.*, 2001; Wada und Penninger, 2004; Klumpp *et al.*, 2006).

Folgendermaßen rufen bereits minimale Dysbalancen des Protein-phosphorylierungsgrades infolge des gestörten Verhältnisses von Kinasen zu Phosphatasen funktionelle Störungen im Organismus hervor. Eine exzessive Phosphorylierungsrate ist oft Ursache von pathologischen Zuständen wie Krebs, Diabetes mellitus sowie ischämischen und chronisch inflammatorischen Erkrankungen. Es deutet sich an, dass bei diesen Krankheiten der Einsatz von spezifischen Proteinkinase-Inhibitoren vielversprechend sein könnte (Cohen, P., 2001). Zurzeit befinden sich mehr als 30 Kinasehemmstoffe entweder in klinischen Phasen oder sind bereits als Arzneistoffe zugelassen (Fabian *et al.*, 2005).

Weiterhin ist bekannt, dass viele Toxine und Pathogene gezielt die Phosphorylierung von Proteinen im Organismus verändern. Beispielsweise ist der wichtigste Virulenzfaktor des Beulenpesterregers *Yersinia pestis*, der im Mittelalter etwa 25% der Weltbevölkerung das Leben gekostet hat, eine Tyrosinphosphatase, die in der Zielzelle unkontrollierte Dephosphorylierungsreaktionen verursacht (Bliska, 1995). Okadainsäure, ein auf viele Phosphatasen inhibierend wirksamer Inhaltsstoff der marinen Dinoflagellaten, ruft sehr häufig Intoxikationen nach Verzehr von Meeresfrüchten hervor (Cohen, P. *et al.*, 1990; Klumpp *et al.*, 1990). Ferner ist bekannt, dass das in Cyanobakterien vorkommende Heptapeptid Microcystin aufgrund einer hemmenden Wirkung auf Proteinphosphatasen 1 und 2A eine ausgeprägte Hepato- und Neurotoxizität besitzt. Bereits in niedrigen Konzentrationen kann es Leberkarzinome hervorrufen (MacKintosh *et al.*, 1990; Gehringer, 2004).

1.2.2 Die Einteilung der Proteinphosphatasen

Die Enzymfamilie der Proteinphosphatasen wird in zwei Gruppen unterteilt, je nachdem ob sie das an Sauerstoff (O-Phosphatasen) oder das an Stickstoff (N-Phosphatasen) gebundene Phosphat abspalten können (Abb. 1.2-2). Man findet Phosphatester an Serin-, Threonin- und Tyrosinresten, dagegen können Phosphorsäureamide an Histidin, Arginin und Lysin gebunden werden.

Die O-Phosphatasen sind in drei Großfamilien unterteilt. Die Serin/Threonin-Phophatasen wurden als erste identifiziert und erst später in die Familien der Phosphoproteinphosphatasen (PPP) bzw. die magnesiumabhängigen Proteinphosphatasen (PPM) differenziert (Abb. 1.2-2).

Zur PPP-Familie zählen die Proteinphosphatase 1 (PP1), die Proteinphosphatase 2A (PP2A) und die Proteinphosphatase 2B (PP2B). Sie haben im Gegensatz zu anderen Enzymen *in vitro* eine relativ hohe Substratspezifität, weshalb die Einteilung dieser Subfamilie je nach Verhalten in Bezug auf Inhibitoren und Aktivatoren erfolgte (Ingebritsen und Cohen, 1983b;

Cohen, P. und Cohen, 1989). So können die Mitglieder der PP1-Gruppe sehr spezifisch die β-Untereinheit der Glykogen-Phosphorylase-Kinase dephosphorylieren. Gleichzeitig werden sie durch zwei hitzestabile Proteine (I-1 und I-2) im nanomolaren Bereich gehemmt. Dagegen erfolgt mit diesen Inhibitoren keine Hemmung der PP2-Enzyme. Diese im Gegensatz, sind aber in der Lage die α-Untereinheit der Glykogen-Phosphorylase-Kinase zu dephosphorylieren (Cohen, P. und Cohen, 1989). Weiterhin ergänzen die Proteinphosphatasen PP4, PP5, PP6 und die PP7 die PPP-Großfamilie.

Proteinphosphatasen				
O-Proteinphosphatasen (Phosphorsäureester)				**N**-Proteinphosphatasen (Phosphorsäureamide)
	Serin/Threonin		Tyrosin	Histidin
PPP:	PP1 PP2A PP2B PP4 PP5 PP6 PP7	**PTP:**	zytosolische transmembranäre dualspezifische	**PHP**
PPM:	PP2C Pyruvatdehydrogenase-Phosphatase			

Abb. 1.2-2: Einteilung der Proteinphosphatasen

Abkürzungen:

PPP: Phosphoproteinphosphatasen
PPM: magnesiumabhängige Proteinphosphatasen
PTP: Proteintyrosinphosphatasen
PHP: Proteinhistidinphosphatase

Die PP2-Familie kann aufgrund ihrer Kationenabhängigkeit klassifiziert werden. So sind die PP2A-Mitglieder ähnlich wie die Vertreter der PP1-Gruppe nicht von Metallionen abhängig. Dagegen bedarf die Gruppe der PP2B (Calcineurin) einer Anwesenheit von Calciumionen (Cohen, P. und Cohen, 1989; Barford, 1996). Die Gruppe der PP2C ist indessen nur in Gegenwart von Magnesiumionen aktiv, weswegen sie auch zur PPM-Familie gezählt wird. Hierzu gehört auch die Pyruvatdehydrogenase-Phosphatase (Cohen, P., 1994).

Alle Serin/Threonin-Phosphatasen zeigen weiterhin auch ein unterschiedliches Verhalten gegenüber Okadainsäure. Während die PP2A schon bei geringsten Konzentrationen (IC_{50}=1 nM) gehemmt wird, ist die Menge des Inhibitors für die Hemmung der PP1 deutlich höher (IC_{50}=10-15 nM). Die PP2B ist noch resistenter gegenüber Okadainsäure während die PP2C-Aktivität durch Okadainsäure überhaupt nicht beeinflusst wird (Cohen, P. und Cohen, 1989; Cohen, P. *et al.*, 1989).

Die dritte Großfamilie der O-Proteinphosphatasen bilden die in den 80er Jahren entdeckten Proteintyrosinphosphatasen (PTP). Sie werden in drei Gruppen eingeteilt: in transmembrane, zytosolische und dualspezifische PTPs. Für ihre Aktivität benötigen sie im Gegensatz zu Serin/Threonin-Phosphatasen keine Metallionen.

Es war seit langem bekannt, dass Prokaryoten Phosphatasen besitzen, die auch Stickstoff-gebundenes Phosphat abspalten können. Lange Zeit ging man davon aus, dass in Eukaryoten solche Enzyme nicht vorhanden sind. Im Jahre 2002 identifizierten der Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. Klumpp sowie eine schwedische Gruppe unabhängig von einander die Präsenz einer bis dahin unbekannten Enzymklasse im Säuger, den ersten Vertreter der Proteinhistidinphosphatasen (Klumpp *et al.*, 2002a) und (Ek *et al.*, 2002). Dieses Enzym zeigt keine Verwandtschaft bezüglich der Sequenzhomologie zu O-Proteinphosphatasen und scheint eine wichtige Rolle im Energie- und Neurotransmitter-stoffwechsel zu spielen (Klumpp *et al.*, 2002a; Klumpp *et al.*, 2003a; Mäurer *et al.*, 2005).

1.2.3 Die Proteinphosphatase 2C

Die Proteinphosphatase 2C gehört, wie schon erwähnt, zur PPM-Großfamilie der Serin/Threonin-Phosphatasen. Calcium kann die enzymatische Aktivität hemmen, jedoch sind die notwendigen Konzentrationen unphysiologisch hoch (Pato und Kerc, 1991; Wang, Y. *et al.*, 1995). Diese Hemmung scheint kompetetiver Art zu sein, da steigende Magnesiumkonzentrationen diese aufheben. Derzeit ist kein spezifischer Inhibitor der PP2C bekannt. Gängige Phosphatasehemmer wie Okadainsäure, Tautomycin als auch Microcystin beeinflussen ihre Aktivität nicht. Infolgedessen war die Untersuchung der physiologischen Rolle der PP2C lange Zeit eingeschränkt. Die einzige Möglichkeit die Funktion dieser Enzymfamilie zu untersuchen, bestand in der Herunterregulation des Enzyms. Da *Knockout*-Tiere nicht überlebensfähig sind, musste mit der Methodik der RNA-Interferenz (RNAi) das Enzym in seiner Expression gehemmt werden. Mit Hilfe dieses Mechanismus der spezifischen Genstilllegung ist es mehreren Arbeitskreisen gelungen, die Expression der

PP2C herunter zu regulieren und dadurch die Funktion des Enzyms zu untersuchen (Prajapati *et al.*, 2004; Schwarz *et al.*, 2006).

Die ursprünglich aus der Rattenleber isolierte α-Isoform der PP2C wurde zunächst aufgrund der Substratspezifität in die PPP-Familie eingeordnet und als Proteinphosphatase 1A bezeichnet (Kikuchi *et al.*, 1977; Hiraga *et al.*, 1981). Erst mehrere Jahre nach der Entdeckung des Enzyms wurde aufgrund von Sequenzvergleichsanalysen festgestellt, dass die neuen Phosphatasen nicht mit den Mitgliedern der PPP-Familie verwandt sind, sondern eine eigenständige Phosphatasefamilie darstellen (Das, A. K. *et al.*, 1996). Elf konservierte Motive konnten in eukaryotischen PP2C-Isoformen identifiziert werden (Bork *et al.*, 1996) und es sind bereits zwölf PP2C-Isoformen bekannt (Komaki *et al.*, 2003; Dworak, 2006; Klumpp *et al.*, 2006; Tamura *et al.*, 2006) (Abb. 1.2-3).

Isoform:	**Lokalisation**:	**Referenzen:**
PP2Cα	ubiquitär	(Mann *et al.*, 1992; Takekawa *et al.*, 1998)
PP2Cβ	ubiquitär	(Kato *et al.*, 1995; Marley *et al.*, 1998; Seroussi *et al.*, 2001)
PP2Cγ/FIN13	ubiquitär	(Guthridge *et al.*, 1997)
PP2Cδ/ILKAP	ubiquitär	(Leung-Hagesteijn *et al.*, 2001)
PP2Cε	Gehirn, Herz, Hoden	(Li, M. G. *et al.*, 2003)
PP2Cζ	ubiquitär	(Kashiwaba *et al.*, 2003)
PP2Cη	Hoden	(Komaki *et al.*, 2003)
Wip1		(Fiscella *et al.*, 1997)
CaMKP/hFEM2/POPX2	ubiquitär	(Koh *et al.*, 2002)
CaMKP-N/POPX1	Gehirn, Hoden	(Koh *et al.*, 2002)
NERPP-2C	Gehirn	(Labes *et al.*, 1998)
PHLPP1	ubiquitär	(Gao *et al.*, 2005)

Abb. 1.2-3: Übersicht der identifizierten PP2C-Isoformen

PP2Cα und PP2Cβ, die ersten untersuchten Isoformen, sind unter den Spezies Mensch, Ratte und Kaninchen hoch konserviert (> 90%) und ubiquitär lokalisiert. Die humanen Isoformen haben eine Sequenzidentität von 75%, weisen jeweils eine molare Masse von 42 bzw. 45 kDa auf und stellen die am besten untersuchten sowie charakterisierten Mitglieder der PP2C-Isoenzyme dar (Mann *et al.*, 1992; Wenk *et al.*, 1992). Von der PP2Cα konnten zwei und von der PP2Cβ sogar sechs unterschiedliche Spleißvarianten identifiziert werden

(Mann *et al.*, 1992; Terasawa *et al.*, 1993; Takekawa *et al.*, 1998; Seroussi *et al.*, 2001). Sowohl von der α- wie auch von der β-Isoform der PP2C wurden, durch Kristallisation gewonnene, räumliche Strukturen aufgenommen (Das, A. K. *et al.*, 1996; Dworak, 2006) (Abb. 1.2-4).

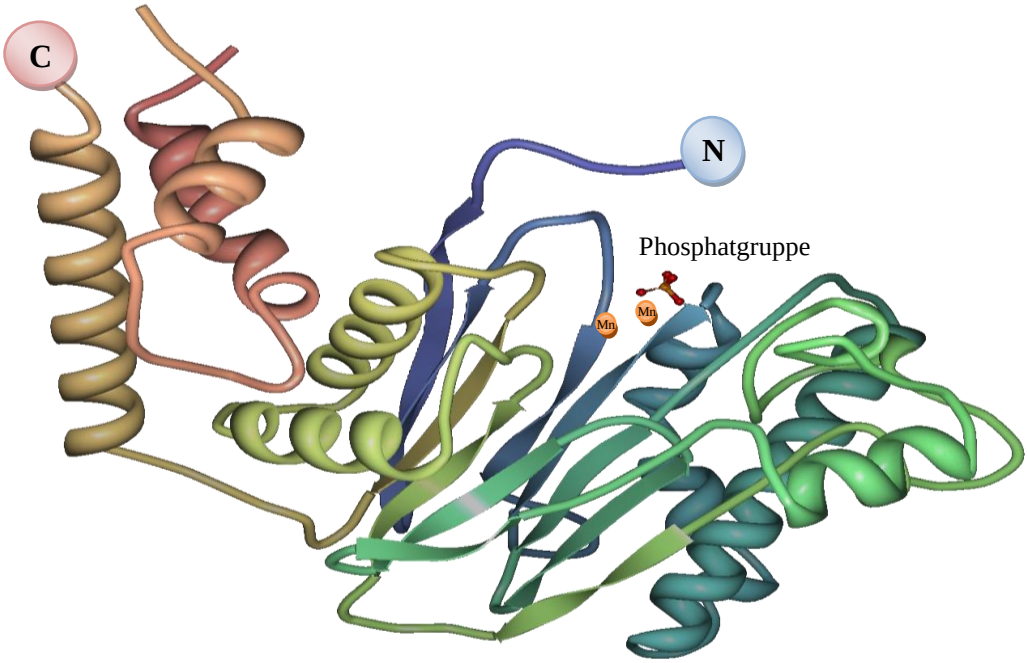


Abb. 1.2-4: Struktur der PP2Cα

Die katalytische Domäne des Proteins bilden sechs α-Helices (Spiralen) und elf β-Faltblattstrukturen (flache Pfeile). Im katalytischen Zentrum befinden sich zwei für die Aktivität essentielle Manganionen, die im zentralen β-Sandwich fixiert werden und für die Abspaltung des Phosphatrestes (tetraedrische Form) notwendig sind.
Die Abbildung wurde mit Hilfe des Programms MBT Protein Workshop 1.35 unter Verwendung der publizierten Daten (Das, A. K. *et al.*, 1996) aus der *Molecular Modelling*-Datenbank (MMDB) des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) erstellt.

Die Enzyme der PP2C-Familie weisen ein breites Spektrum an Substraten auf. Es wurden bereits über 40 verschiedene identifiziert (Klumpp *et al.*, 2006). Diese Isoenzyme spielen im Kohlenhydrat- (Glycogen-synthase/phosphorylase), Hormon- (HSL, PR), Neurotransmitter- (DARP-32, mGluR3), Lipidstoffwechsel (AMPK, HMG-CoA-Reduktase), an der Regulation von Ionenkanälen (Ca^{2+}-Kanäle, CFTR), Steuerung verschiedener Signalwege (MKKs 3b/4/6/7, PKB, PKC) sowie in der Apoptose (ARC, Bad, Ask1, p53) eine wichtige Rolle (Abb. 1.2-5).

Substrat:		Referenzen:
AMPK	*5'-AMP-activated protein kinase*	(Moore *et al.*, 1991; Wang, M. Y. und Unger, 2005)
ARC	*Apoptosis repressor with a caspase recruitment domain*	(Zhang und Herman, 2006)
ASK1	*Apoptosis signal-regulatin kinase I*	(Tamura *et al.*, 2006)
Bad	*Bcl-X_L/Bcl-2 associated death promoter*	(Klumpp *et al.*, 2003b)
Ca^{2+}-Kanäle		(Li, D. *et al.*, 2005)
CaMK	*Ca^{2+}/Calmodulin-dependent protein kinases*	(Fukunaga *et al.*, 1993)
CDK2 und 6	*Cyclin-dependent kinase 2/6*	(Cheng, A. *et al.*, 2000)
CFTR	*Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*	(Travis *et al.*, 1997)
DARP-32	*Dopamine/cAMP-regulated phosphoprotein, 32kDa*	(Desdouits *et al.*, 1998)
mGluR3	*Metabotropic glutamate receptor 3*	(Flajolet *et al.*, 2003)
Glycogen-synthase/ phosphorylase		(Ingebritsen *et al.*, 1983)
HMG-CoA-Reduktase		(Ching *et al.*, 1997)
HMG-CoA-Reduktase-Kinase		(Ingebritsen und Cohen, 1983a)
HSL	Hormonsensitive Lipase	(Olsson und Belfrage, 1987)
MKKs 3b/4/6/7	MAPK *(mitogen-activated protein kinase)* Kinasen 3b/4/6/7	(Hanada *et al.*, 1998)
P38		(Takekawa *et al.*, 1998)
P53		(Fiscella *et al.*, 1997; Ofek *et al.*, 2003)
PKB/Akt, PKC	Proteinkinase B/C	(Gao *et al.*, 2005)
PR	Progesteronrezeptor	(Proia *et al.*, 2006)
SEK1	SAPK *(stress-activated protein kinase)*/ERK *(extracellular-sigmal-regulated kinase)* Kinase 1	(Takekawa *et al.*, 1998)
Smad		(Lin *et al.*, 2006)
TAK1	TGF-β *(transforming growth factor-β)*-aktivierende Kinase 1	(Hanada *et al.*, 2001; Li, M. G. *et al.*, 2003)
TH	Tyrosinhydroxylase	(Bevilaqua *et al.*, 2003)

Abb. 1.2-5: Übersicht einiger bekannter PP2C-Substrate

Modifiziert nach Klumpp et al., 2006.

Auf ein Substrat der PP2C, das bei der Fettsäure-induzierten Apoptose eine wichtige Rolle spielt, möchte ich näher eingehen, das proapoptotische Protein aus der Bcl-2-Familie Bad (Klumpp *et al.*, 2003b; Zhu *et al.*, 2005).

1.2.4 Die Proteinphosphatase 2C, Bad und die Fettsäure-induzierte Apoptose

Wie bereits in den Kapiteln 1.2.2 und 1.2.3 beschrieben, handelt es sich bei der PP2C-Familie um Enzyme, deren Aktivität von Magnesium- und Manganionen abhängig ist (Cohen, P. und Cohen, 1989; Terasawa *et al.*, 1993; Cohen, P., 1994). Die notwendige Konzentration der Magnesiumionen für die maximale Aktivierung der PP2Cα und PP2Cβ ist mit mehr als 20 mM sehr hoch und unphysiologisch. Ein Grund dafür, warum diese Enzyme zunächst mit Skepsis behandelt und ihre Rolle im Organismus bezweifelt wurde.

Eine entscheidende Beobachtung konnte im Labor von Frau Prof. Dr. Klumpp gemacht werden. Die α- und β-Isoformen der PP2C konnten in Anwesenheit von bestimmten Fettsäuren bereits bei physiologischen Magnesiumkonzentrationen maximal aktiviert werden, während andere Phosphatasen wie PP2A, PP1, PP2B sowie die PTPs und die unspezifischen alkalischen oder sauren Phosphatasen in ihrer Aktivität unbeeinflusst blieben (Klumpp *et al.*, 1998; Klumpp *et al.*, 2002b). Diese sensationelle Entdeckung war ein Beweis dafür, dass diese Enzyme durchaus eine wichtige Rolle im Organismus spielen und durch Fettsäuren reguliert werden könnten.

Es wurde nun systematisch untersucht, welche Fettsäuren die PP2C-Aktivität steigern konnten. Durch zahlreiche Experimente konnte gezeigt werden, dass diese Substanzen bestimmte strukturelle Eigenschaften haben sollten. Eine ausreichende Lipophilie, also eine Fettsäurekettenlänge von mindestens 15 C-Atomen, eine freie Carboxylgruppe sowie eine ungesättigte und *cis*-konfigurierte Doppelbindung waren die Voraussetzungen (Klumpp *et al.*, 1998; Klumpp *et al.*, 2002b). Zu diesen Aktivatoren gehörte eine Vielzahl von physiologischen Fettsäuren wie Ölsäure (18:1, *cis*-Δ^{9}), Linolsäure (18:2, *cis*-$\Delta^{9,12}$), γ-Linolensäure (18:3, *cis*-$\Delta^{6,\ 9,12}$), Arachidonsäure (20:4, *cis*-$\Delta^{5,8,11,14}$) und Docosahexaensäure (DHA) (22:6, *cis*-$\Delta^{4,\ 7,\ 10,\ 13,\ 16,\ 19}$), während die gesättigten Fettsäuren wie Stearinsäure (18:0), Palmitinsäure (16:0) und Laurinsäure (12:0) die Aktivität nicht steigern konnten. Weiterhin zeigten strukturell modifizierte Ölsäurederivate, wie das *trans*-Isomer Elaidinsäure (18:1, *trans*-Δ^{9}) und der Ölsäuremethylester, dessen Carboxylgruppe nicht frei vorliegt, keine Aktivitätsveränderung der PP2C (Klumpp *et al.*, 1998; Klumpp *et al.*, 2002b) (Abb. 1.2-7).

Eine weitere aufregende Entdeckung der Arbeitskreise von Frau Prof. Dr. Klumpp und Herrn Prof. Dr. Dr. Krieglstein stellte die Identifikation des PP2C-Substrates Bad dar (Klumpp *et al.*, 2003b). Das Mitglied der Bcl-2-Familie hat, wie bereits erwähnt, proapoptotische Eigenschaften (Yang *et al.*, 1995; Yang und Korsmeyer, 1996; Hsu und Hsueh, 2000).

Die phosphorylierte Form von Bad, katalysiert durch Proteinkinasen wie Akt, ist für die Vitalität der Zelle entscheidend (Datta *et al.*, 2000; Bae *et al.*, 2001; Nofer *et al.*, 2001). Das Phospho-Bad wird durch sogenannte 14-3-3-Proteine gebunden und komplexiert, was eine sterische Interaktion mit den antiapoptotischen Proteinen Bcl-2 und Bcl-X_L unmöglich macht (Zha *et al.*, 1996; Datta *et al.*, 2000; Masters *et al.*, 2001; Rosenquist, 2003) (Abb. 1.2-6). Bis heute sind sieben Phosphorylierungsstellen von Bad bekannt, sechs von ihnen liegen sehr eng in der C-terminalen Domäne des Proteins nebeneinander (Klumpp *et al.*, 2004). PP2Cα und PP2Cβ sind in der Lage an vier dieser Phosphorylierungstellen zu dephosphorylieren (Klumpp *et al.*, 2003b; Klumpp *et al.*, 2004): Während die Phosphorylierungsstellen Ser-112 bzw. Ser-136 für die Bindung an 14-3-3 notwendig sind (Masters *et al.*, 2001), verhindert das kovalent gebundene Phosphat an Ser-155 die Heterodimerisation mit Bcl-X_L (Tan *et al.*, 2000). Dagegen ist über die physiologische Rolle der Phophatgruppe am Thr-117 bisher nichts bekannt (Klumpp *et al.*, 2004).

Wird Bad durch Proteinphosphatasen dephosphoryliert, heterodimerisisert es über seine BH3-Domäne mit den Proteinen Bcl-2 bzw. Bcl-X_L, was deren antiapoptotische Wirkung aufhebt (Ruvolo *et al.*, 2001) (Kapitel 1.1.3.3). Diese zellschützenden Proteine können daraufhin nicht mehr mit Bax heterodimerisieren. Letzteres kann dann, wie bereits beschrieben, nach einer Oligomerisiserung Poren-ähnliche Kanäle in der Mitochondrienmembran bilden und somit die Freisetzung von Cytochrom c und anderen proapoptotischen Molekülen in das Zytosol der Zelle ermöglichen (Yang *et al.*, 1995; Zha *et al.*, 1997). Der so eingeschlagene intrinsische Weg der Apoptoseinduktion führt über die Aktivierung der vorher angesprochenen Caspasen zum Untergang der Zelle (Antonsson, 2001). Ferner verlieren die durch Bad gebundenen antiapoptotischen Proteine wie Bcl-2 und Bcl-X_L ihre stabilisierenden Eigenschaften bezüglich der Ionenhomöostase der Mitochondrien (Ouyang und Giffard, 2004) (Kapitel 1.1.3 und Abb. 1.2-6).

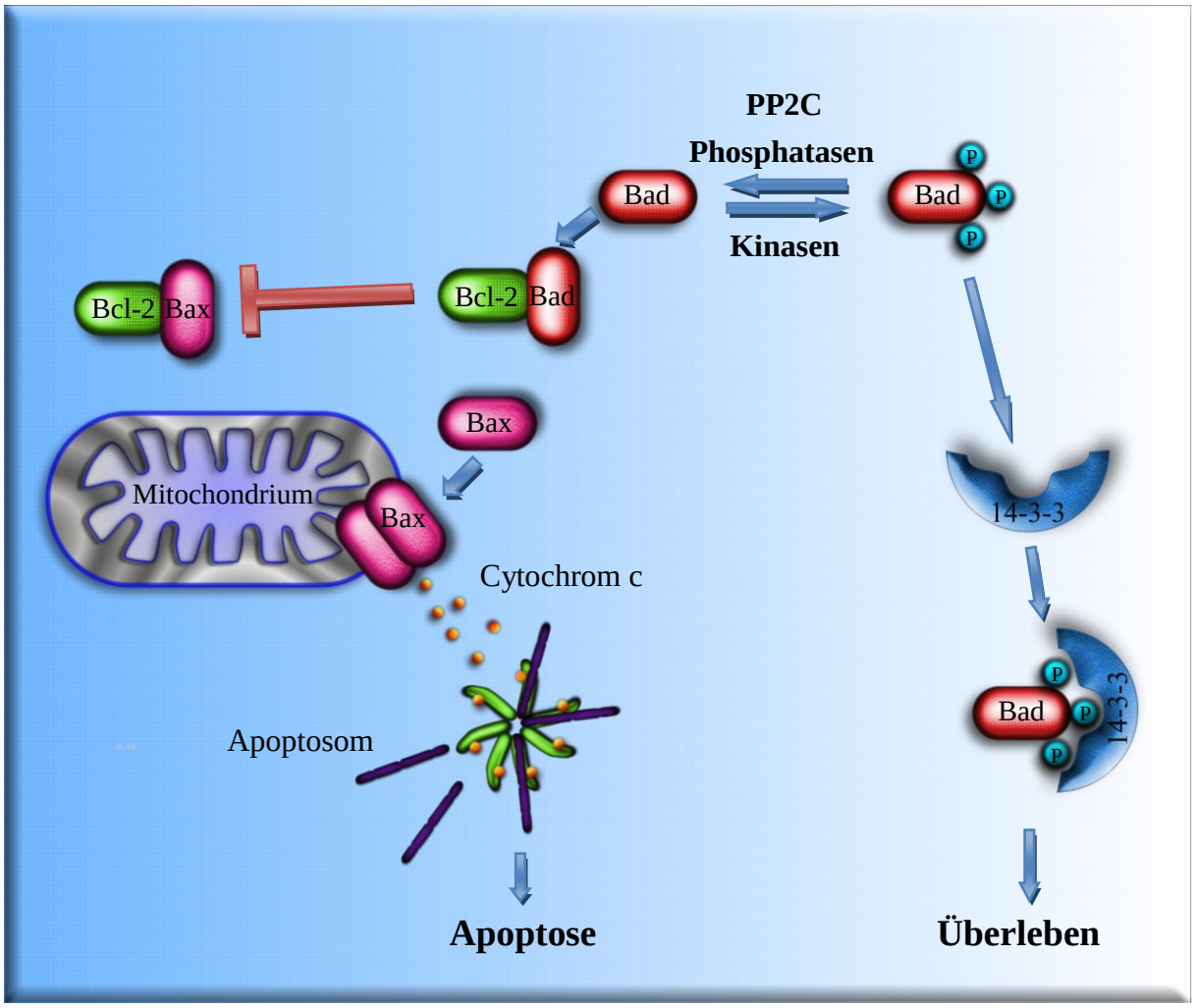


Abb. 1.2-6: Die Rolle von Bad in der Apoptose

Proteinkinasen und Proteinphosphatasen, wie z.B. die PP2C, regulieren den Phosphorylierungsgrad von Bad. Ist Bad phosphoryliert, so können 14-3-3-Proteine mit dem Protein assoziieren und dadurch die proapoptotische Funktion aufheben. Das Resultat ist ein Überleben der Zelle. Dagegen führt eine Dephosphorylierung von Bad zu einer Aktivierung der proapoptotischen Eigenschaften des Proteins. Das dephosphorylierte Bad kann mit Bcl-2 oder Bcl-X_L Heterodimerkomplexe bilden, woraufhin das proapoptotische Bax frei wird. Dieses kann nach einer Oligomerisierung Porenkomplexe in der Mitochondrienwand bilden und dadurch die Freisetzung von Cytochrom c sowie anderen proapoptotischen Proteinen initiieren. Daraufhin wird das Apoptosom aktiviert, welches die Caspasen-Kaskade in Gang bringt und zur Apoptose der Zelle führt (Kapitel 1.1.3)

Interessanterweise konnte in unseren Arbeitskreisen gezeigt werden, dass Fettsäuren mit einer bestimmten strukturellen Form in neuronalen Zellen Apoptose induzieren können. Die notwendigen sterischen Voraussetzungen der Fettsäuren für die Auslösung des Zelltodes waren die gleichen, wie für die Aktivierung der PP2Cα und PP2Cβ (Ahlemeyer *et al.*, 2001b; Klumpp *et al.*, 2002b; Klumpp *et al.*, 2006) (Abb. 1.2-7). Nachdem sowohl die PP2C-Isoformen als auch Bad in den Zellen identifiziert wurden, führte diese auffallende Korrelation zu der Hypothese, dass die PP2C, nach einer Aktivierung durch bestimmte Fettsäuren wie etwa Ölsäure, das proapoptotische Protein Bad dephosphorylieren und somit apoptotischen Zelltod auslösen könnte (Abb. 1.2-7).

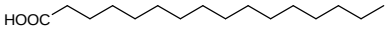
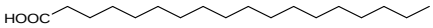
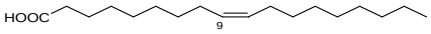
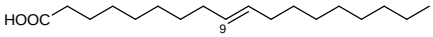
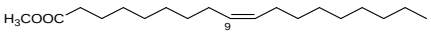
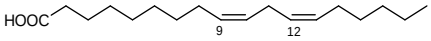
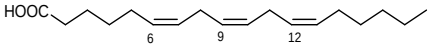
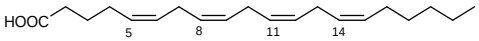
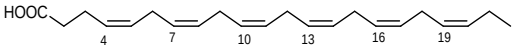
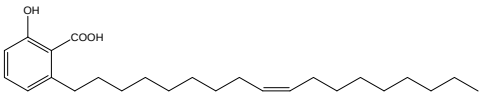
Fettsäurestruktur und Name	Kurzbezeichnung	Aktivierung von PP2C *in vitro*	Apoptose-induktion in der Zellkultur
Palmitinsäure 	(16:0)	NEIN	NEIN
Stearinsäure 	(18:0)	NEIN	NEIN
Ölsäure 	(18:1, *cis*-Δ^{9})	JA	JA
Elaidinsäure 	(18:1, *trans*-Δ^{9})	NEIN	NEIN
Ölsäuremethylester 	(18:1, *cis*-Δ^{9}), Methylester	NEIN	NEIN
Linolsäure 	(18:2, *cis*-$\Delta^{9,12}$)	JA	JA
γ-Linolensäure 	(18:3, *cis*-$\Delta^{6, 9,12}$)	JA	JA
Arachidonsäure 	(20:4, *cis*-$\Delta^{5,8,11,14}$)	JA	JA
Docosahexaensäure 	(22:6, *cis*-$\Delta^{4, 7, 10, 13, 16, 19}$)	JA	JA
Ginkgolsäure 		JA	JA

Abb. 1.2-7: Fettsäuren, Derivate, die PP2C-Aktivierung und Apoptoseinduktion

Die Daten entsprechen den folgenden Publikationen:
(Klumpp *et al.*, 1998; Klumpp *et al.*, 2002b; Hufnagel, 2005; Hufnagel *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2005)

Gleichzeitig war man sich jedoch der Tatsache bewusst, dass an Neuronen keine ausreichend hohen Fettsäurekonzentrationen für eine PP2C-Aktivierung entstehen können. Schließlich ernähren sich Nervenzellen fast ausschließlich durch Glukose. Es stellte sich die Frage an welchen Zellen im Organismus Fettsäuren in großen Mengen vorkommen. Die Antwort war klar, an den Endothelzellen der Blutgefäße.

Auch hier konnte die Korrelation zwischen der Apoptoseinduktion und der PP2C-Aktivierung beobachtet werden. Endothelzellen wurden durch gewisse Fettsäuren geschädigt, gleichzeitig waren diese Lipide in der Lage, die Aktivität der PP2Cα und PP2Cβ um mehr als

das Zehnfache zu steigern (Hufnagel, 2005; Hufnagel *et al.*, 2005) (Abb. 1.2-7). Weiterhin konnte man experimentell demonstrieren, dass isolierte Fettsäuren aus humanen Lipoproteinen sowohl die PP2C-Isoformen α und β aktivieren, als auch Apoptose in endothelialen Zellen auslösen können.

Doch welche pathologischen Auswirkungen könnte der apoptische Untergang von Endothelzellen im Organismus haben? Zur Beantwortung dieser Frage soll die Physiologie des Endothels kurz erläutert werden.

1.3 Das Endothel, Lipide und die Atherogenese

Im folgenden Teil wird beschrieben, welche physiologische und pathologische Rolle das Endothel im Organismus einnimmt. Des Weiteren werden der Lipidstoffwechsel und die Atherogenese charakterisiert, wobei die Lipoproteinlipase (LPL), das entscheidende Enzym im Fettsäuremetabolismus, besonderes Augenmerk findet.

1.3.1 Das Endothel ist das größte endokrine Organ

Das Endothel kleidet als einlagige Zellschicht die luminale Seite aller Blutgefäße, sowohl die feinen Kapillaren als auch die großen Venen und Arterien, aus (Abb. 1.3-1). Bedenkt man wie komplex dieses Netzwerk ist, wird deutlich, was für eine gigantische Oberfläche dieses Organ aufweist, nämlich die von etwa sechs Tennisplätzen. Bei einem Gewicht von rund 1800 g ist das gesamte Endothel weiterhin schwerer als die Leber (Quaschning *et al.*, 2000)

Durch die strategisch bedeutende Lage zwischen dem Blut und den Geweben spielt das Endothel eine entscheidende Rolle bei der Resorption und Freisetzung von Nährstoffen, Modulierung des Gefäßtonus und -wachstums, der Thrombozytenaggregation sowie der Blutgerinnung.

Dieses Organ kann verschiedene vasoaktive Stoffe freisetzen, die maßgeblich die Gefäßweite und somit die Durchblutung der entsprechenden Organe regulieren. Unterschiedliche Substanzen, wie Hormone, Neurotransmitter und Gerinnungsfaktoren können zu einer Endothel-abhängigen Vasodilatation führen (Cohen, R. A., 1995). Weiterhin bewirkt eine durch einen gesteigerten Gefäßtonus bedingte Scherkrafterhöhung die

Freisetzung der als *endothelium-derived relaxing factor* bekannten Substanz, genauer Stickstoffmonoxid (NO). NO bewirkt an glatten Muskelzellen der Widerstandsgefäße eine Reduktion des Muskeltonus und führt dadurch zu einer Verringerung des Blutdrucks (Bredt *et al.*, 1990). Dieses Phänomen der Endothel-abhängigen Vasodilatation ist von enormer physiologischer Wichtigkeit, vor allem bei körperlicher Belastung und anderen blutdrucksteigernden Situationen.

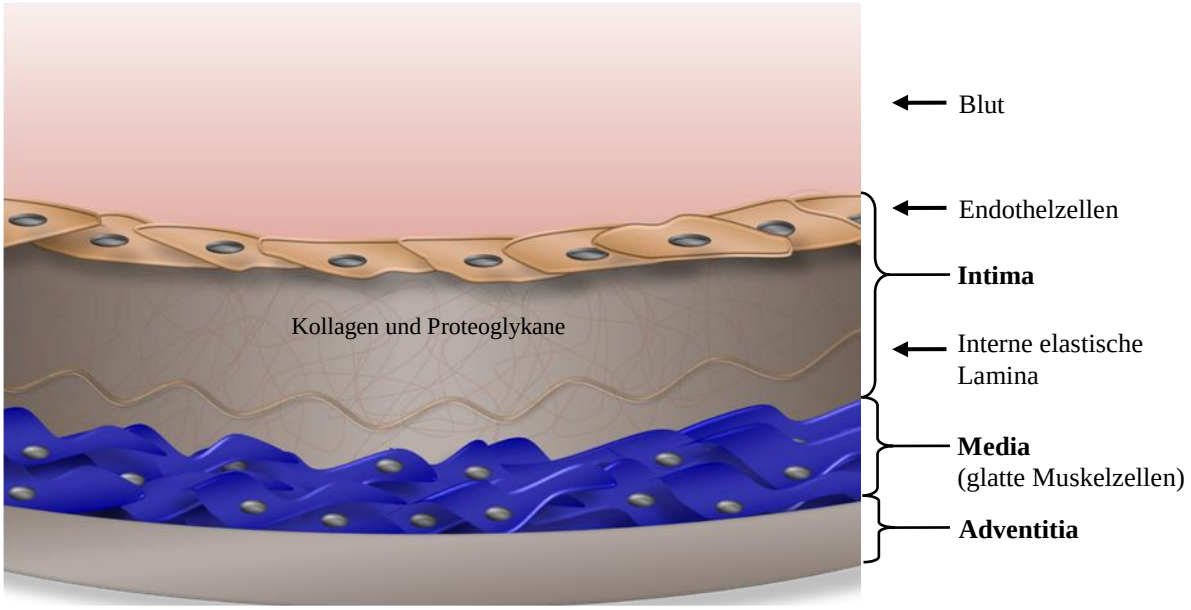


Abb. 1.3-1: Querschnitt durch ein gesundes arterielles Blutgefäß

Die großen Arterien bestehen aus drei morphologisch trennbaren Schichten. Die auf der luminalen Seite liegende Intima, bestehend aus einlagig gewachsenen Endothelzellen, einer Schicht von elastischen Fasern und der internen elastischen Lamina. Darauffolgend liegt die Media, welche von glatten Muskelzellen gebildet wird. Die Adventitia, bestehend aus Bindegewebe, befindet sich als äußerste Schicht dahinter.
(Die Schichtdicke der realen Intima ist vom Verhältnis her wesentlich kleiner als in der schematischen Zeichnung dargestellt.)

Eines der wichtigsten Enzyme der Blutgerinnungskaskade, Thrombin, führt ebenso zu einer Freisetzung von NO. Durch die resultierende Tonusreduktion wird die Koagulation des Blutes verhindert (Bombeli *et al.*, 1997). Für die Synthese dieses kleinen Moleküls, mit einer Halbwertszeit von wenigen Sekunden, sind endotheliale NO-Synthasen (eNOS) verantwortlich, die L-Arginin als Ausgangstoff verbrauchen (Bredt *et al.*, 1990). Weiterhin können Gefäßendothelzellen das Eicosanoid Prostacyklin freisetzen, welches ebenfalls vasodilatativ und sich ferner hemmend auf die Thrombozytenaggregation auswirken kann (Dusting *et al.*, 1979).

Aber das Endothel kann auch Vasokonstriktoren sezernieren. Neben Endothelin, einem Peptid mit 21 Aminosäuren, das über ET_A- und ET_B-Rezeptoren wirkt, können Eicosanoide wie Thromboxan A2 sowie Prostaglandin H2 freigesetzt werden (Korbut und Moncada, 1978; Kohan, 2006). Außerdem wird im Endothel die Aktivität des Renin Angiotensin Systems reguliert. Das in Endothelzellen exprimierte *Angiotensin Converting Enzyme* katalysiert die Umwandlung von Angiotensin I zu Angiotensin II, dem stärksten physiologischen Vasokonstriktor.

Das Endothel reguliert jedoch nicht nur, wie schon erwähnt, den Vasotonus, sondern ist auch eine physiologische Barriere für Nährstoffe, Pathogene sowie Zellen des Immunsystems. Es ist bekannt, dass dieses Organ sowohl die Permeabilität als auch die Adhäsion von Leukozyten und die Transmigration von Makromolekülen reguliert (Cines *et al.*, 1998; Toborek und Kaiser, 1999).

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass das Endothel ein hoch aktives parakrines, endokrines und autokrines Organ, welches unentbehrlich für die Aufrechterhaltung des vaskulären Tonus und der Gefäßhomöostase, ist. Eine Störung dieses Gleichgewichts hat große Auswirkungen auf das Blutgefäßsystem und den gesamten Organismus.

1.3.1.1 Die endotheliale Dysfunktion

Die endotheliale Dysfunktion (EDF) ist durch eine Reduktion der Bioverfügbarkeit von Vasodilatatoren, allen voran NO, charakterisiert, wohingegen die Menge an gefäßkostriktorischen Faktoren wie Endothelin steigt (Feletou und Vanhoutte, 2006). Diese Unausgeglichenheit der vasoaktiven Kräfte führt zu einer Verschlechterung des Endothel-vermittelten Gefäßdilatationsmechanismus (Bonetti et al., 2003). Weiterhin beobachtet man eine Verschlechterung des Hämostasesystems, da prokoagulatorische und Thrombozytenaggregations-fördernde Stoffe u.a. etwa Thromboxan A2 dominieren und ihre Antagonisten NO und Prostazyklin sowie fibrinolytische Stoffe wie t-PA (*tissue plasminogen activator*) nicht mehr in ausreichender Konzentration synthetisiert werden (Newby, D. E. *et al.*, 1999).

Das pathologische Ereignis EDF kann durch Messung von verschiedenen Markern im Blut bestimmt werden. So steigen im Serum verschiedene Entzündungsparameter wie z.B. das C-reaktive Protein, Zytokine und Prostanoide an (Bombeli *et al.*, 1997). Ferner kann diese systemische Erkrankung nicht invasiv mit Hilfe der *flow mediated vasodilatation* Methode

(kurz FMD) ambulant bei Patienten diagnostiziert werden (Kostner, 2003; Deanfield et al., 2005).

Die Ursachen und Auslöser der EDF sind vielfältig. Es steht jedoch fest, dass ein Ungleichgewicht der sich proliferierenden und absterbenden Endothelzellen das pathologische Bild hervorruft. Endothelzellen sind im Grunde sehr widerstandsfähig, die Lebenszeit ist beim Gesunden mit über 100 Tagen sehr hoch. Jedoch ist die endotheliale Proliferationszeit unter vaskulären Stressbedingungen wie Angiogenese, Hyperlipoproteinämie und Hypertension deutlich reduziert und kann dann weniger als fünf Tage betragen. Dies deutet auf eine erhöhte Apoptoserate hin (Shimokawa *et al.*, 1987; Folkman und D'Amore, 1996; Choy *et al.*, 2001).

Als wichtige Auslöser dieser pathologischen Störung spielen reaktive Sauerstoffspezies (ROS), die sowohl die Apoptoserate der Endothelzellen erhöhen, als auch endotheliale Vasodilatatoren inaktivieren können, eine dominierende Rolle (Rubanyi und Vanhoutte, 1986; Choy *et al.*, 2001; Griendling und FitzGerald, 2003). Weitere Ursachen sind oxidiertes bzw. glykosyliertes LDL, Rauchen, metabolisches Syndrom, schlecht eingestellter Diabetes mellitus, eine genetische Prädisposition zu Gerinnungsstörungen, arterielle Hypertonie und entscheidend, die Hyperlipoproteinämie (Dimmeler *et al.*, 1998; Choy *et al.*, 2001; Rossig *et al.*, 2001; Artwohl *et al.*, 2003). Dagegen können Estrogene, HDL, NO und Antioxidantien entgegenwirken und somit die Progression der EDF verlangsamen (Dimmeler *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2001; Nofer *et al.*, 2001; Subah Packer, 2007).

EDF ist assoziiert mit einer Vielzahl pathologischer Ereignisse: Herz- und Nierenschäden, Koronarsyndrom, Mikroalbuminurie, Thrombose, Präeklampsie, Insulinresistenz, Übergewicht, chronischen Entzündungserkrankungen wie rheumatoide Arthritis und Hypertonie (Abdu *et al.*, 2001; Blanco *et al.*, 2005; Feletou und Vanhoutte, 2006). Gesichert ist weiterhin, dass eine Fehlfunktion und die damit verbundene Permeabilitätserhöhung des Endothels für Leukozyten und Lipoproteine den initialen Schritt der Atheroskleroseentstehung darstellt (Bonetti *et al.*, 2003; Feletou und Vanhoutte, 2006; Kaperonis *et al.*, 2006).

Lipide spielen in der Atherogenese eine entscheidende Rolle, weshalb sie hier ebenfalls vorgestellt werden sollen.

1.3.2 Lipoproteinstoffwechsel

Lipide stellen einen Oberbegriff für Substanzen, die aufgrund ihrer Lipophilie eine schlechte Wasserlöslichkeit aufweisen und deshalb im Blut in „verpackter“ Form transportiert werden müssen. Zu diesen Stoffen gehören neben Fettsäuren, die verestert in Triglyceriden oder Phospholipiden vorkommen, fettlösliche Vitamine sowie Cholesterol und seine Ester. Die Beförderung dieser essentiellen Bausteine ist für den Organismus von entscheidender Bedeutung. Dabei werden Einzelmoleküle, z.B. Steroidhormone und Fettsäuren entweder an Transportproteine gebunden oder sie bilden mizellare Komplexe mit Proteinen, den Lipoproteinen.

Diese Partikel haben eine amphiphile Struktur, wobei im Kern ein lipophiles Milieu herrscht, in dem sich Triglyceride, Cholesterolester und andere Lipide befinden, während die äußere Hülle aus hydrophilen Phospholipiden, bestimmten Proteinen, den sogenannten Apolipoproteinen (Apo) und freiem Cholesterol besteht. Eine derartige Verkapselung ermöglicht es dem Körper riesige Lipidmengen zu transportieren. Der Triglyceridgehalt im Blut kann nach einer deftigen Mahlzeit auf Werte jenseits von 1000 mg/dl ansteigen (Jackson *et al.*, 1976; Zilversmit, 1979).

Lipoproteine sind nicht nur Teilchen mit einer heterogenen Zusammensetzung, sondern haben auch unterschiedliche Funktionen, Partikelgrößen und Dichten. Die Klassifizierung erfolgt aufgrund ihrer unterschiedlichen Sedimentations- bzw. Fluktuationseigenschaften. Man kann die einzelnen Lipidklassen durch präparative Ultrazentrifugation von einander trennen (Kapitel 2.6.2 und Abb. 1.3-2). Weiterhin kann man sie auch aufgrund der elektrophoretischen Beweglichkeit differenzieren. Diese zusätzliche Unterscheidung ist wichtig, da es Lipoproteine mit ähnlicher Dichte gibt, die jedoch eine völlig unterschiedliche Funktion ausüben (Neubeck *et al.*, 1977; Smith, L. C. *et al.*, 1978).

Lipoproteinfraktion	Dichte in g/ml	Partikelgröße in nm	Zusammensetzung in %				
			TG	CE	FC	PL	Protein
Chylomikronen	<0.95	100-1000	90	2	1	5	2
VLDL	0.95-1.006	30-70	54	13	7	16	10
IDL	1.006-1.019	25-30	20	34	9	20	17
LDL	1.019-1.063	15-25	4	41	11	21	23
HDL	1.063-1.210	7-12	5	13	5	35	42

Abb. 1.3-2: Zusammensetzung der Lipoproteine

Die einzelnen Lipidklassen enthalten unterschiedliche Mengen an Triglyceriden (TG), Cholesterinestern (CE), freien Cholesterol (FC), Phospholipiden (PL) und Proteinen. Weitere Abkürzungen: VLDL: *very low density lipoprotein*, LDL: *low density Lipoprotein*, IDL: *intermediate density lipoprotein*, HDL: *high density lipoprotein* (modifiziert nach Schwandt, 2001)

Die Eigenschaften der Lipoproteine in ihrer metabolischen Funktion werden jedoch nicht durch die Lipidzusammenstellung, sondern aufgrund der differenzierten Apo-Konstellation beeinflusst. Diese Momentaufnahme des Proteinprofils verändert sich fließend mit dem Austausch der Lipide in den Partikeln und wandelt somit auch die Lipidklasse um. Die Nomenklatur von Alaupovic umfasst bis heute 13 verschiedene Gruppen dieser Proteine, die alphabetisch gekennzeichnet werden (Alaupovic *et al.*, 1972).

Die Apolipoproteine haben drei Hauptfunktionen. An erster Stelle dienen sie der Stabilisierung sowie dem Transport. Ferner sind sie als eine Art Schlüssel für den Stoffwechsel unentbehrlich, Lipoproteine können ohne diese Proteine weder aus der Zelle sezerniert, noch in Zielzellen aufgenommen werden. Zuletzt können sie als Kofaktoren von Enzymen, z.B. der LPL, aktiv fungieren (Morrisett *et al.*, 1977; Schwandt P., 2001) (Abb. 1.3-3).

Apolipoprotein	Dichteklasse	Masse (kDa)	Funktion
A-I	HDL	28,5	Strukturprotein, Bindung an HDL-Rezeptoren, Aktivierung der LCAT
A-II	HDL	17	Aktivierung der hepatischen Lipase
A-IV	CM, HDL	46	Aktivierung der LCAT, Triglyceridstoffwechsel
B-100	LDL, VLDL	550	Strukturprotein, Sekretion von Triglyceriden und Cholesterin, Aktivierung der LCAT
B-48	CM, VLDL	265	Resorption von fettlöslichen Vitaminen aus der Nahrung
C-I	CM, VLDL	6,5	Bindungshemmung an den LDL-Rezeptor, Aktivierung der LCAT
C-II	CM, VLDL	8,8	Aktivierung der LPL
C-III	CM, VLDL	8,9	Hemmung der LPL
D (A-III)	HDL	29	Aktivierung der LCAT
E	CM, VLDL, HDL	34	Notwendig für die Bindung am VLDL-, LDL-Rezeptor, Ausschleusung von Cholesterol aus peripheren Geweben
F	HDL	30	Unbekannt
G	VLDL	72	Unbekannt
H	CM	55	Unbekannt
J	HDL	70	Unbekannt
(a)	Lp (a)	350-900	Unbekannte Funktion in der Blutgerinnung

Abb. 1.3-3: Humane Apolipoproteine

CM: Chylomikronen, LCAT: Lecithin-Acyltransferase, LPL: Lipoproteinlipase

An dieser Stelle folgt nun eine kurze Beschreibung der einzelnen Lipoproteinfraktionen sowie ihre Rolle im humanen Stoffwechsel, den man in einen exogenen bzw. endogenen differenziert (Abb. 1.3-4).

Der exogene Metabolismus ist charakterisiert durch die Zufuhr von Lipiden von Außen. Die aus der Nahrung stammenden Triglyceride, Cholesterolester und andere Lipide werden mit Hilfe von Gallensäuren emulgiert und dadurch wasserlöslich gemacht. Die Pankreaslipase hydrolysiert die Triglyceridbestandteile zu freien Fettsäuren und 2-Monoacylglycerol, die von der Schleimhaut des Intestinums resorbiert werden. Cholesterolester werden durch die Cholesterolesterase zu freien Fettsäuren und Cholesterol

hydrolysiert, welches je nach Fettgehalt der Mahlzeit unterschiedliche Resorptionsraten aufweist. Nach einer Wiederveresterung in den Dünndarmepithelzellen erfolgt der Transport der resorbierten Triglyceride und Cholesterolester in Chylomikronen (Hussain, 2000).

Chylomikronen sind Lipoproteinpartikel mit der geringsten Dichte und dem größten Durchmesser (Abb. 1.3-2). Sie bestehen zum größten Teil aus mit Glycerol veresterten Fettsäuren und transportieren Lipide unter Umgehung der Leber über die Lymphe durch den Ductus thoracicus ins Blut. Nach einer Abgabe der Triglyceride an Gewebe, hier spielt das endothelständige Enzym LPL eine entscheidende Rolle, werden die cholesterolreichen Chylomikronen-Remnants sehr schnell über entsprechende Rezeptoren von der Leber aufgenommen (Smith, L. C. *et al.*, 1978) (Abb. 1.3-4).

Im Hungerzustand versorgt der endogene Metabolismus periphere Gewebe mit Triglyceriden und Cholesterol. Lipoproteine sehr niedriger Dichte (VLDL) bestehen etwa zur Hälfte aus Triglyceriden, die endogen von der Leber produziert wurden. Eine erhöhte Kohlenhydratzufuhr, Alkohol und ein großes Angebot an gesättigten und einfach ungesättigten Fettsäuren stimulieren die Synthese von VLDL und Triglyceriden (Janero *et al.*, 1984; Heath *et al.*, 2007). Dagegen scheinen mehrfach ungesättigte Omega-3-Fettsäuren diese zu hemmen (Davidson, 2006). Am naszierenden VLDL-Partikel fehlen Apo E und Apo C-II. HDL tauscht diese Apolipoproteine, Phospholipide, und Triglyceride gegen freies Cholesterol mit VLDL aus. Diese Reaktion wird katalysiert durch das Phospholipid-Transferprotein (Jackson *et al.*, 1976; Oliveira *et al.*, 1993; van Tol, 2002).

Während der Bindung des VLDL-Partikels an den endothelständigen VLDL-Rezeptor mit Apo E und der Interaktion von Apo C-II mit der kapillären LPL kommt es zur Hydrolyse und Entleerung der Triglyceridspeicher des Lipoproteins und zur Fettsäurefreisetzung. Nach dieser Delipidierung entstehen VLDL-Remnants (Medh et al., 2000; Takahashi et al., 2003). Diese können auf zwei Wegen verstoffwechselt werden: Sie können über LDL-Rezeptoren von der Leber aufgenommen oder über die Zwischenstufe der Lipoproteine intermediärer Dichte (IDL) mit Hilfe der hepatischen Triglyceridlipase (HTGL) in Lipoproteine niedriger Dichte (LDL) umgewandelt werden (Smith, L. C. *et al.*, 1978; Schwandt P., 2001) (Abb. 1.3-4).

Cholesterol ist für den Organismus ein lebenswichtiger Stoff, dessen Synthese in fast allen Geweben, vor allem jedoch in der Leber, stattfindet. Es wird von Zellen als Membranbaustein sowie als Präkursor von Steroidhormonen und Vitamin D verbraucht (Papahadjopoulos *et al.*, 1973; Payne und Hales, 2004). Ein Erwachsener kann bei einer cholesterolarmen Ernährung täglich etwa 1 g davon produzieren. Die Ausgangssynthese des

Steroids erfolgt mit aktivierter Essigsäure (Acetyl-CoA). Die Schrittmacherenzyme hierbei sind die 3-Hydroxy-methyl-3-glutaryl-CoA (HMG-CoA) -Synthase und -Reduktase, deren Aktivität bei Bedarf um den Faktor 200 reguliert werden kann (Goldstein und Brown, 1984).

Beim Gesunden transportieren die LDL Partikel mehr als zwei Drittel des gesamten Blutserumcholesterols. Wie bereits erwähnt, werden sie zum einen durch Delipidierung aus VLDL erzeugt, können aber zum anderen auch aktiv von der Leber sezerniert werden. Etwa 70% des LDL wird über LDL-Rezeptoren, die in allen Zellen exprimiert werden, aufgenommen und abgebaut (van Berkel *et al.*, 1995). Dieser metabolische Abbau ist durch die Anzahl der Rezeptoren limitiert und dadurch sättigbar. Die Schwellenkonzentration liegt bei etwa 200 mg/dl LDL-Cholesterol. Darüberhinaus kann LDL über den sogenannten Scavenger-Weg aufgenommen werden, welcher im Gegensatz zu LDL-Rezeptoren nicht begrenzt ist. Hierbei werden LDL-Teilchen durch Endo- oder Pinozytose sowohl über niedrigaffine als auch über spezifisch modifizierte Scavenger-Rezeptoren aufgenommen (Krieger und Herz, 1994; van Berkel *et al.*, 1995).

Im Organismus gibt es weiterhin einen sogenannten reversen Cholesteroltransport. Neben der Haut, die durch Zellverlust etwa 100 mg Cholesterol täglich eliminiert, ist die Leber das einzige Organ, das Cholesterol über die Gallenblase in Form von Gallensäuren ausscheiden kann (Javitt, 2002). Hierbei spielen die Lipoproteine hoher Dichte (HDL) die Schlüsselrolle (von Eckardstein *et al.*, 2001). Sie haben den höchsten Protein- sowie Phospholipidanteil aller Lipoproteinfraktionen (Abb. 1.3-2), werden zunächst als diskoidale Partikel in der Leber synthetisiert und ferner in das Lymphgefäßsystem abgegeben, wo sie mit Chylomikronen assozieren (Groener *et al.*, 1989; Oliveira *et al.*, 1993). Im Blut können die HDL-Präkursoren Cholesterol an den Membranen peripherer Zellen aufnehmen, wodurch sie eine sphärische Form erhalten. Mit Hilfe des Enzyms Lecithin-Acyltransferase (LCAT) verestern sie Cholesterol und transportieren es zur Leber zurück (Dobiasova und Frohlich, 1999) (Abb. 1.3-4).

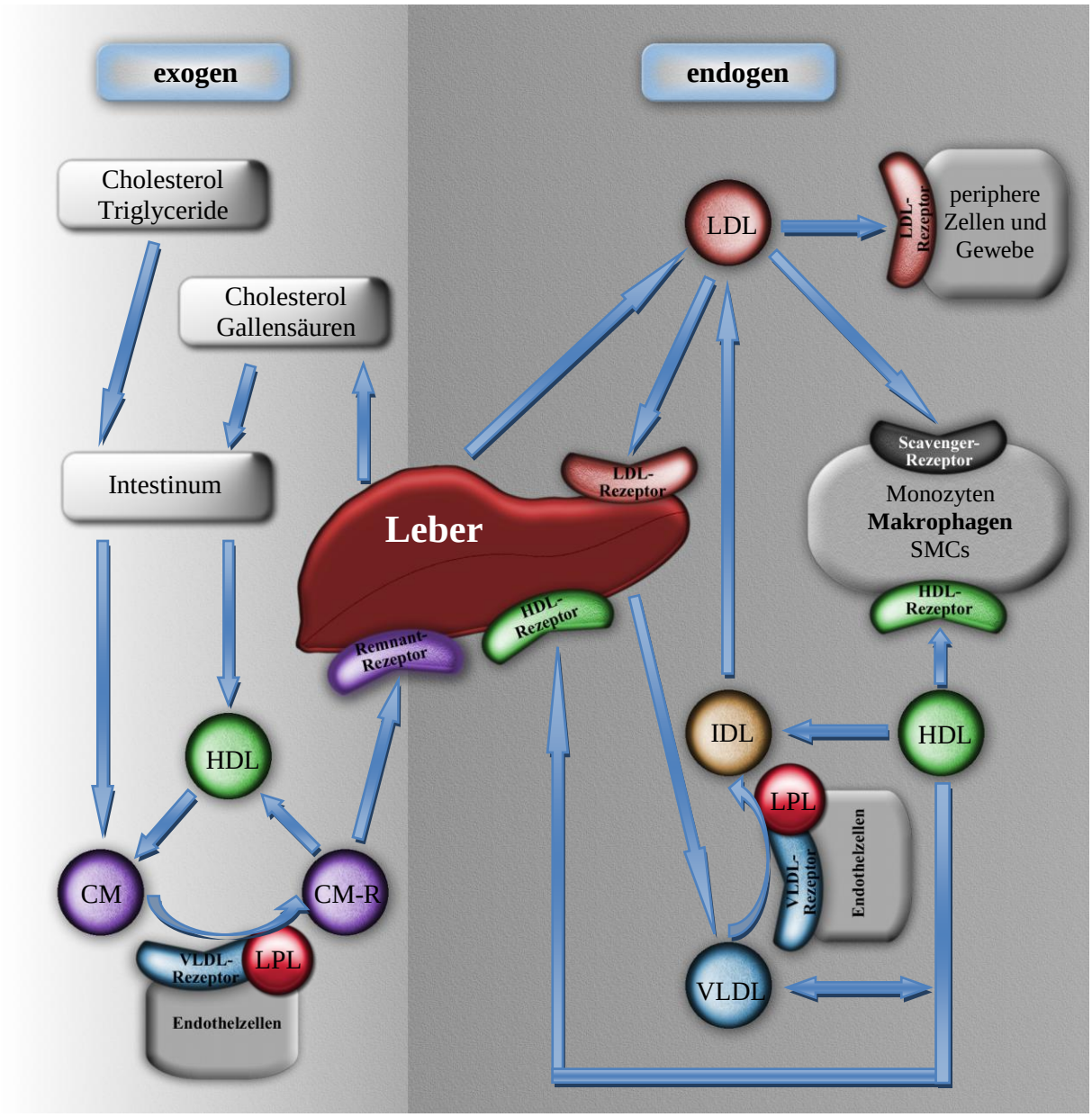


Abb. 1.3-4: Lipoproteinstoffwechsel

Abkürzungen:

CM:	Chylomikronen	CM-R:	Chylomikronen-Remnants
LPL:	Lipoproteinlipase	SMCs:	glatte Muskelzellen
➡	Umwandlung zu/Interaktion		

Erläuterungen zur Abbildung im Kapitel 1.3.2.

LCAT ist an der Veresterung von mehr als drei Viertel des Blutserumcholesterols beteiligt, wobei die in Position sn-2 ständige Fettsäure des Lecithinmoleküls auf freies Cholesterol übertragen wird. Das dabei entstehende Lysophosphatidylcholin wird an Albumin gebunden und wieder verestert. Der wichtigste Kofaktor der LCAT ist das Apo A-I, obwohl auch Apo A-IV, Apo D und Apo C-I die Aktivität des Enzyms erhöhen können (Dobiasova und Frohlich, 1999) (Abb. 1.3-3).

Weiterhin spielen sogenannte Transferproteine im Lipoproteinstoffwechsel eine wichtige Rolle. Das am besten untersuchte Enzym dieser Klasse ist das Cholesterolester-Transferprotein (CETP), welches den Austausch von Cholesterolestern und anderen Kernlipiden unter den einzelnen Lipoproteinklassen katalysiert. So können etwa Triglyceride aus VLDL durch Cholesterolester aus HDL im äquimolaren Verhältnis ausgetauscht werden, was die Konversion des VLDL zu LDL bewirkt (Forrester *et al.*, 2005). Daneben existiert ein weiteres Transferprotein, das Phospholipid-Transferprotein (PLTP), welches den Transport von fettlöslichen Vitaminen wie α-Tocopherol zwischen Lipoproteinen und Zellmembranen erleichtert (Huuskonen und Ehnholm, 2000).

Ein anderes, für den Lipoprotein- und Lipidstoffwechsel zentrales Enzym ist die LPL, die im nachfolgenden Kapitel vorgestellt werden soll.

1.3.3 Lipoproteinlipase

Allgemeines und Historisches zu den Mitgliedern der Lipasefamilie

Bereits 1943 hat man beobachtet, dass eine intravenöse Injektion von Heparin etwas freisetzte, das eine lipolytische Aktivität aufwies und die postprandiale Lipämie zu reduzieren vermochte (Robinson und Harris, 1959; Robinson und Jennings, 1965). Hinter dem damals genannten *heparin-releasable clearing factor* verbergen sich zwei für den Lipidstoffwechsel essentielle Enzyme, die hepatische Triglyceridlipase (HTGL) sowie die LPL. Beide zählen zur Großfamilie der Lipasen, wobei die Pankreaslipase (PL) zusätzlich dieser Kategorie angehört (Hide *et al.*, 1992). Alle drei genannten Enzyme, katalysieren die gleiche enzymatische Reaktion. Sie hydrolysieren Triacylglyceride zu freien Fettsäuren sowie 2-Monoacylglycerol und freiem Glycerol. Während das Verdauungsenzym PL die Nahrungstriglyceride spaltet und somit die Resorption im Darm ermöglicht, spielt die in der Leber vorkommende HTGL, wie bereits erwähnt, eine wichtige Rolle bei der Hydrolyse von Triglyceriden aus IDL, LDL sowie HDL (Ben-Zeev *et al.*, 1987; Kirchgessner *et al.*, 1989; Persson *et al.*, 1989; Hide *et al.*, 1992; Wong und Schotz, 2002).

Ein weiterer Vertreter aus der Familie der Lipasen ist die endotheliale Lipase (EL), die erst 1999 von zwei unabhängigen Arbeitskreisen gleichzeitig identifiziert wurde (Hirata *et al.*, 1999; Jaye *et al.*, 1999). Im Gegensatz zu HTGL, LPL und PL zeigt die EL nur eine sehr geringe Aktivität bei der Spaltung von Triglyceriden. Dagegen ist die Hydrolyse von Phospholipiden zu freien Fettsäuren sehr wirksam (Badellino und Rader, 2004). Es ist bekannt, dass dieses Enzym vor allem im HDL-Stoffwechsel eine Rolle spielt, wobei eine Überexpression eine Reduktion der HDL-Fraktion bewirkt (Ishida *et al.*, 2003).

Die LPL wurde bereits 1952 als ein lipolytisches Enzym identifiziert. Man erkannte, dass die Lipase, welche im Muskel- und im Fettgewebe vorkam, in Anwesenheit von synthetischen Triglyceridemulsionen kaum aktiv war, seine Aktivität bei Zugabe von Serumlipoproteinen jedoch stark steigerte (Korn und Quigley, 1957). Erst später erkannte man die Notwendigkeit des Apo C-II, welches Bestandteil von VLDL und Chylomikronen ist, für die Aktivierung des Enzyms (Kapitel 1.3.2 und Abb. 1.3-3). Seit diesem Zeitpunkt wurde das untersuchte Enzym als LPL bezeichnet. Nach diesen Pionierarbeiten wurden die Struktur, Genetik, Expression, Regulation sowie die Rolle der Lipase in pathologischen Ereignissen sehr gründlich untersucht (Mead *et al.*, 2002).

Kategorie	**Lipoproteinlipase (LPL)**	**Hepatische Lipase (HTGL)**	**Pankreaslipase (PL)**	**Endotheliale Lipase (EL)**
Chromosomlokation	8p22	15q21–q23	10q24-q26	18q21.1
Gensymbol	LIPD	LIPC	PNLIP	LIPG
Gene id	NM_000237	NM_000236	NM_000936	NM_006033
Protein id	NP_000228	NP_000227	NP_000927	NP_006024
Enzymklassifikation	3.1.1.34	3.1.1.3	3.1.1.3	3.1.1.3
Syntheseort	Muskel-, Fettgewebe, Makrophagen	Leber	Pankreas	Endothelzellen, Makrophagen
Funktion	Triacylhydrolase	Triacylhydrolase	Triacylhydrolase	Phosholipase

Abb. 1.3-5: Die Lipasefamile und ihre Mitglieder

Struktur und Expression der LPL

Die cDNA der LPL codiert ein Protein mit 475 Aminosäuren, wovon jedoch ein hydrophobes Signalpeptid mit 27 Aminosäuren abgespalten wird. Die Molekülmasse des 448 Aminosäuren langen Proteins beträgt 50 Kilodalton (kDa) (Braun und Severson, 1992a). Nach

einer elektrophoretischen Trennung findet man das Protein jedoch auf einer Laufhöhe von etwa 55 kDa, was auf einen Glykosylierungsgrad von 8-12% zurückzuführen ist (Iverius und Ostlund-Lindqvist, 1976; Vannier und Ailhaud, 1989; Vannier *et al.*, 1989). Es ist gezeigt worden, dass mehrere Glykosylierungsstellen essentiell für die Aktivität und Sekretion des Enzyms sind (Semenkovich *et al.*, 1990; Enerback und Gimble, 1993). Die aktive Form der LPL ist ein nichtkovalentes Homodimer. Eine Dissoziation führt zu einer irreversiblen Inaktivierung und weist im Vergleich zur aktiven Form nur 1/6000 der Affinität zu Heparin auf (Osborne *et al.*, 1985; Lookene *et al.*, 2004).

Genspezifische Untersuchungen der cDNA in unterschiedlichen Spezies haben gezeigt, dass die LPL unter den Säugern stark konserviert vorkommt. Das codierende LPL-Gen besteht aus zehn Exons und neun Introns (Enerback und Gimble, 1993; Raisonnier *et al.*, 1995; Mead *et al.*, 2002). Interessanterweise existieren mehrere Genmutationsformen der LPL, welche auf die Rolle dieses Enzyms in verschiedenen pathologischen Formen hinweisen (Murthy *et al.*, 1996).

Molekularbiologische, immunhistochemische sowie enzymgekoppelte histologische Untersuchungen ergaben, dass die Lipase zwar konserviert in Säugern vorkommt, die Expression jedoch nicht ubiquitär zu sein scheint. Vielmehr findet man LPL vor allem in Geweben, die einen hohen Fettsäuremetabolismus aufzeigen, etwa in der Herz-, Skelett- sowie glatter Muskulatur und im Fettgewebe. Ferner wird das Enzym in geringerer Menge in Makrophagen, Milchdrüsen, Nebennieren, Milz, Hoden und Nieren gebildet (Cryer, 1981; Wang, C. S. *et al.*, 1992). Darüberhinaus wird das Protein auch in fetalen Hepatozyten exprimiert. Nach der Geburt wird die Synthese jedoch komplett unterdrückt, weshalb LPL auch als extrahepatische Lipase bezeichnet wurde (Staels und Auwerx, 1992). Interessanterweise findet man gerade in Endothelzellen, an deren luminaler Membran die LPL enzymatisch aktiv ist, keine mRNA des Enzyms (Camps *et al.*, 1990b; Camps *et al.*, 1991).

Die Expression und Aktivität der LPL ist durch eine Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Faktoren reguliert. So steigern erhöhte Glukose-, Insulin- sowie Fettsäurespiegel die Expression und Aktivität der Lipase in Makrophagen. Möglicherweise ein Grund dafür, dass diese Patienten eine hohe Inzidenz an atherosklerotischen Erkrankungen aufweisen (Renier *et al.*, 1996; Sartippour *et al.*, 1998) (Abb. 1.3-6). In der folgenden Abbildung sind einige Faktoren zusammengestellt worden, die einen Einfluss auf die Enzym-Expression und -Aktivität haben.

Mediator/Zustand	Gewebe/Zellart	Effekt auf LPL	Referenzen
Katecholamine	Braunes Fettgewebe Weißes Fettgewebe Kardiomyzyten	 Aktivität ↑ Aktivität ↓ Aktivität ↑	(Carneheim *et al.*, 1988)
Glukokorticoide	Präadipozyten Makrophagen	mRNA ↑, Aktivität ↑	(Kawakami *et al.*, 1986; Domin *et al.*, 1991; Fried *et al.*, 1993)
Insulin	Präadipozyten Makrophagen	Aktivität ↑	(Kawakami *et al.*, 1986; Sartippour und Renier, 2000)
Estrogene	Präadipozyten	mRNA ↓	(Homma *et al.*, 2000)
Fettsäuren	Makrophagen	mRNA ↑, Aktivität ↑	(Michaud und Renier, 2001)
Glukose	Makrophagen	mRNA ↑, Aktivität ↑	(Sartippour *et al.*, 1998; Sartippour und Renier, 2000)
M-CSF	Makrophagen	mRNA ↑, Aktivität ↑	(Mori *et al.*, 1991)
Nahrungskarenz	Adipozyten Kardiomyozyten	Aktivität ↓ Aktivität ↑	(Doolittle *et al.*, 1990; Braun und Severson, 1992b, 1993; Amri *et al.*, 1996)
Lipidreiche Ernährung	Adipozyten Kardiomyozyten	Aktivität ↑ Aktivität ↓	(Doolittle *et al.*, 1990; Amri *et al.*, 1996)
ROS	Makrophagen	Aktivität ↑	(Renier *et al.*, 1996)

Abb. 1.3-6: Regulation der Lipoproteinlipase-Expression und -Aktivität

M-CSF: *macrophage colony-stimulating factor*, ROS: reaktive Sauerstoffspezies

Synthese, Translokation und Funktion des Enzyms

Der funktionelle enzymatische Wirkort der LPL ist die luminale Seite der Endothelzellen, trotzdem wird das Enzym nicht in diesen Zellen exprimiert (Camps *et al.*, 1990b). Vielmehr sind es Parenchymzellen wie Myo- und Adipozyten, die das Protein produzieren und an die Endothelzellen abgeben (Braun und Severson, 1992b).

Die Translation des LPL-Proteins findet am rauhen endoplasmatischen Retikulum statt, wo auch eine N-Glykosylierung sowie eine Homodimerisierung erfolgen. Die nun aktive Enzymform wird in den Golgi-Apparat transportiert. Nach einer weiteren Glykosylierungsstufe wird das Enzym als Dimer durch die Zellmembran vesikulär abgegeben, wo es dann an Heparansulfatproteoglykanen (HSPG) bindet. Zuletzt beobachtet man eine Translokation des Enzyms durch das Endothel und eine Bindung an dessen geladene HSPG, die ebenfalls an der äußeren Membran der Endothelzellen exprimiert werden (Braun und Severson, 1992a).

Der genaue Mechanismus dieser Translokation und Transzytose ist jedoch immer noch nicht im Detail aufgeklärt. Vermutet wurden ein unspezifischer Transport der LPL an HSPG-Brücken zwischen den Parenchym- und Endothelzellen (Blanchette-Mackie *et al.*, 1989).

Weiterhin wurde ein sättigbarer HSPG-abhängiger Transport von der basalen zur apikalen Seite des Endothels charakterisiert (Saxena *et al.*, 1991). Die neuesten Untersuchungen belegen mit Hilfe ^{125}I- radioaktiv markierter LPL, dass es einen VLDL-Rezeptor abhängigen transzytären Transportmechnismus geben muss (Saxena *et al.*, 1991; Braun und Severson, 1992a; Obunike *et al.*, 2001).

Postuliert wird der folgende Hergang der Lipoproteinbindung sowie der Hydrolyse der beinhalteten Lipide: Die luminal ständige, HSPG-gebundene Lipase interagiert mit dem VLDL-Rezeptor, welcher ebenfalls an der äußeren Endothelmembran exprimiert wird (Medh *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2003). Triglyceridreiche Lipoproteine, allen voran Chylomikronen und VLDL, binden über Apo E an den VLDL-Rezeptor und über Apo C-II an das Enzym, um es zu aktivieren. So können etwa 40 LPL-Moleküle gleichzeitig an einem Lipoproteinpartikel angreifen, um maximale Hydrolyseraten zu erzielen (Scow und Olivecrona, 1977). Die so aktivierte Lipase spaltet Triglyceride aus den Lipoproteinen zu freien Fettsäuren und 2-Monoacylglycerol. Diese Lipide werden von Endothelzellen aufgenommen, dort entweder wieder verestert oder an die tiefer liegenden Zellen, vor allem zu Adipo- und Myozyten weiter transportiert (Goldberg, 1996).

Die Rolle des Enzyms in pathologischen Zuständen

Die LPL als zentrales und entscheidendes Enzym im Lipidmetabilmus ist mit einer Reihe krankhafter Prozesse im Organismus assoziert, u.a. Chylomikronämie, Adipositas, Diabetes mellitus sowie Atherosklerose (Mead *et al.*, 2002).

Chylomikronämie ist eine pathologische Erhöhung der Triglyceridkonzentrationen im Blutserum. Selbst im nüchternen Zustand können Werte von 1000 bis 2000 mg/dl Gesamttriglyceride erreicht werden. Klinisch manifestiert sich eine chronische Pankreatitis, begleitet von Xanthomen, einer Lebervergrößerung sowie einer Lipaemia retinalis (Tanaka *et al.*, 2002). Die Ursachen dieses Krankheitsbildes ist meistens ein enzymatischer Defekt der LPL oder des Kofaktors Apo C-II. Ein unbehandelter Diabetes mellitus sowie ein Alkoholabusus können die Hypertriglyceridämie weiter verstärken.

Adipositas ist eine Störung des Körpergewichtes, welche durch genetische, metabolische sowie durch das Nahrungsverhalten verursachte Faktoren beeinflusst wird. Die LPL ist als energieliefernde Enzym für die Versorgung von Adipozyten und Myozyten essentiell. Es ist gezeigt worden, dass adipöse Ratten eine erhöhte Expression und Aktivität der Lipase im Fett- im Vergleich zu Muskelgewebe aufweisen. Dagegen hatten Tiere mit einem niedrigen Körpergewicht häufig eine reduzierte LPL-Expression und –Aktivität

(Gruen *et al.*, 1978; Greenwood, 1985). Diese Beobachtungen konnten auch beim Menschen festgestellt werden (Schwartz und Brunzell, 1978; Ong und Kern, 1989). Weiterhin scheint körperliche Bewegung sowie Nahrungskarenz die Aktivität des Enzyms in der Skelettmuskulatur zu erhöhen, was die Utilisation der Fettsäuren im Muskelgewebe erleichtert. Gleichzeitig wurde jedoch auch im Fettgewebe dieser Patienten eine erhöhte Akitivität der LPL festgestellt, vermutlich um Körperfettreserven aufrechtzuerhalten (Bessesen *et al.*, 1991; Simsolo *et al.*, 1993).

Die Rolle der LPL in der Atherogenese ist dagegen sehr kontrovers diskutiert. So kann ein schützender Effekt in Fett- sowie Muskelgewebe beobachtet werden. Eine hohe Aktivität der kapillären Lipase in diesen Geweben und die damit verbundenen Beseitigung der Lipide aus dem Blut, führt zu einem verbesserten Lipoproteinprofil mit einer Erhöhung der HDL-Fraktion (Shimada *et al.*, 1993; Shimada *et al.*, 1996; Mead und Ramji, 2002). Dagegen scheint die Lipase in größeren arteriellen Gefäßen, vor allem von Makrophagen synthetisiert, pro-atherogen zu sein. Das dort produzierte Enzym kann selbst in inaktiver Form als eine Art Brücke zwischen Lipoproteinen und Zellen fungieren, was die Aufnahme der Lipidpartikel in die Zellen erleichtert (Goldberg, 1996). Des Weiteren kann die LPL die Bildung der Lipoprotein-Remnants beschleunigen, welche von Makrophagen phagozytiert werden können und dabei zu Schaumzellen degenerieren (Lindqvist *et al.*, 1983). Darüberhinaus können eine Reihe Atherosklerose-fördernder Faktoren, wie Insulin, Glukose und freie Fettsäuren, die Aktivität- sowie Expression des Enzyms in Makrophagen erhöhen, was auch bei Diabetes mellitus-Patienten beobachtet wurde (Sartippour und Renier, 2000; Beauchamp *et al.*, 2002; Beauchamp *et al.*, 2004) (Abb. 1.3-6). Zuletzt seien noch die Eigenschaften der LPL erwähnt, die Proliferation der glatten Muskelzellen zu stimulieren und als Monozytenahäsionsmolekül zu fungieren (Mamputu *et al.*, 1997; Mamputu *et al.*, 2000).

Die Forschungsergebnisse zeigen, dass nicht die Lipase alleine für die pathologische Situation der Atherosklerose verantwortlich ist. Vielmehr spielt es eine Rolle wo das Protein exprimiert wird. So kann nach der heutigen Datenlage behauptet werden, dass die LPL in Adipo- sowie Myozyten eine anti-atherogene Funktion aufweist, während die Lipase in der arteriellen Gefäßwand sich schädlich auswirken kann.

Aber welche Auswirkungen hat die Atherosklerose auf die Gefäße und den Organismus? Zur Beantwortung dieser Frage sollen hier die Mechanismen der Atherogenese kurz vorgestellt werden.

1.3.4 Atherogenese

Atherosklerose, auch als Arteriosklerose oder von Laien als „Gefäßverkalkung“ bezeichnet, ist eine Erkrankung der großen Arterien, aus deren Folgeerkrankungen wie Herzinfarkt und Schlaganfall in den Industrienationen etwa die Hälfte aller Todesfälle resultieren. Die Forschung hat mit Hilfe von molekularbiologischen sowie epidemiologischen Studien eine Menge über die Pathomechanismen und Risikofaktoren der Atherogenese ergründet. Heute weiß man, dass die Erkrankung ein multifaktorieller Prozess ist, der durch endogene als auch exogene Faktoren wesentlich beeinflusst werden kann. Trotz der umfangreichen wissenschaftlichen Bemühungen gibt es immer noch keine kausale Therapie dieser Erkrankung. Es ist der Medizin momentan nur möglich einzelne Risikofaktoren zu reduzieren. Hierzu zählen vor allem Hyperlipoproteinämie, arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Tabakrauchen, Adipositas etc.. Diese einzelnen Einflüsse können, wenn nebeneinander vorkommend, das Gesamtrisiko der Arteriosklerose nicht nur additiv, sondern sogar exponentiell erhöhen (Lusis, 2000; Assmann und Gotto, 2004).

Atherosklerose ist eine progressive arterielle Erkrankung mit einer Verengung des Lumens, charakterisiert durch eine Akkumulation von Lipiden, fibrösen Elementen sowie einer lokalen Entzündungsreaktion in der Gefäßwand. Auch wenn die vollständige Pathogenese der Erkrankung nicht komplett gesichert ist, gibt es jedoch deutliche theoretische Ansätze, die hier vorgestellt werden sollen.

Die Antwort auf eine Endothelverletzung

Die allgemein akzeptierte *response to injury* Hypothese zur Entwicklung der Atherosklerose wurde 1973 von Ross entwickelt und wird bis heute generell akzeptiert (Ross, 1993). Hiernach stellt die Schädigung des Endothels, etwa durch apoptotischen Untergang der Zellen, den initialen Schritt der Atherombildung dar (Kapitel 1.3.1.1). So kann nach einer Verletzung dieser feinen Zellschicht mittels Balonkatheter eine massive Gefäßwandverdickung beobachtet werden (Virmani *et al.*, 1994). Die Ursache dieser vaskulären Ereignisse ist eine gestörte Integrität des Endothels, welche das Eindringen von Makromolekülen und Zellen in die Intima erleichtert und fördert. Man beobachtet atherosklerotische Läsionen häufig an abzweigenden Stellen der Arterien, wie etwa dem Aortenbogen. Hier herrscht aufgrund einer turbulenten Blutströmung eine ungleichmäßige Ausrichtung der Endothelzellen, was ebenfalls zu einer gestörten Integrität führt (Gimbrone, 1999).

Transmigration von Lipoproteinen und Leukozyten

Der nächste atherogene Schritt ist durch eine Akkumulation von Lipoproteinen in der Intima der Gefäßwand gekennzeichnet. Die Anhäufung von Lipiden in der subendothelialen Matrix findet statt, wenn das Blutserum-LDL-Cholesterol erhöht ist, was einen wichtigen Risikofaktor der Atherosklerose darstellt (Lusis, 2000). Die Lipidpartikel diffundieren durch *tight junctions* passiv zwischen den Endothelzellen und setzten sich im subendothelialen Raum fest. Apo B ist dabei für die Interaktion mit Matrixproteoglykanen von entscheidender Bedeutung (Boren *et al.*, 1998). Diese zunächst fixierten Lipoproteine werden nach einer Weile chemisch modifiziert. Es finden Oxidations-, Lipolyse- sowie Proteolysereaktionen an den LDL-Teilchen statt. Diese Veränderungen initiieren eine inflammatorische Antwort im Gefäß, die durch eine Leukozytenmigration in die vaskuläre Wand vermittelt wird. Der Grund für diese lokale Entzündungsreaktion ist die Antwort des Endothels auf das oxidierte LDL, das zur Produktion verschiedener proinflammatorischer Faktoren führt. Dies sind entzündungsfördernde Substanzen wie Adhäsionsmoleküle, chemotaktische Proteine und Wachstumsfaktoren (Abb. 1.3-7).

Die sogenannten Adhäsionsmoleküle, zu denen neben P-Selektin sowie E-Selektin VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) und ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule*) zählen, werden auf der luminalen Membran der Endothelzellen exprimiert. Sie führen zur vereinfachten und beschleunigten Bindung und Transmigration von Monozyten und T-Lymphozyten in den subendothelialen Raum (Dong *et al.*, 1998; Collins *et al.*, 2000). Ferner sezernieren aktivierte Endothelzellen chemotaktische Faktoren wie etwa das MCP-1 (*monocyte chemotactic protein*), das die Anwerbung von Monozyten in die Gefäßwand weiter stimuliert (Boring *et al.*, 1998; Gu *et al.*, 1998) (Abb. 1.3-7).

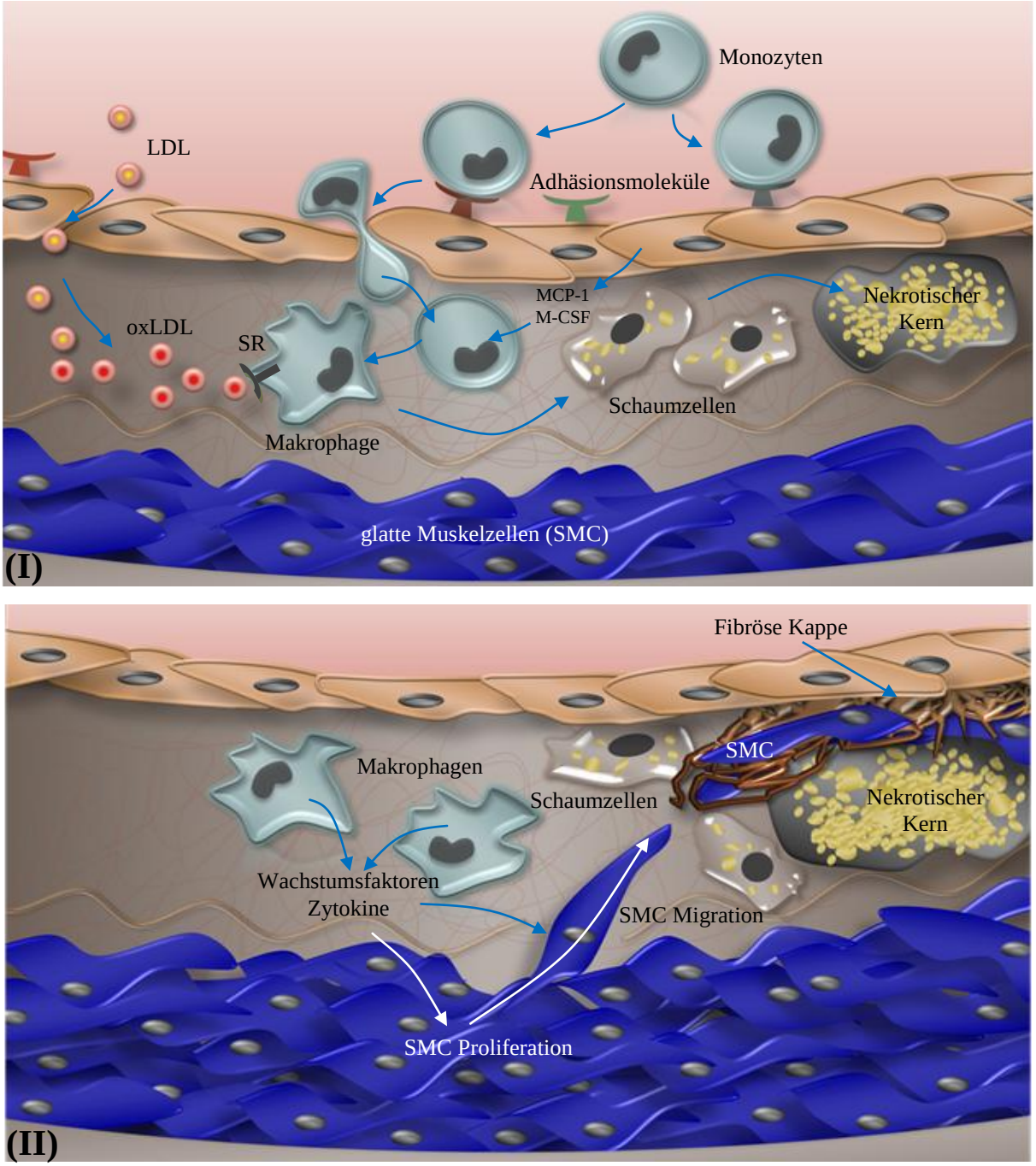


Abb. 1.3-7: Atherogenese (Teil I und II)

I: Bildung von Fettstreifen (*fatty streaks*)
Nach einer Endothelschädigung kommt es zu einer erleichterten Penetration von Lipoproteinen (LDL) und Monozyten in die Intima. Dies wird zusätzlich durch Adhäsionsmoleküle an der luminalen Seite des Endothels verstärkt. Das Endothel produziert chemotaktische Proteine (MCP-1) und Wachstumsfaktoren (M-CSF), welche die Monozytenmigration und –reifung stimulieren. Die migrierten Lipoproteine (LDL) werden oxidiert (oxLDL) und können von Makrophagen, die sich aus Monozyten differenzieren, unkontrolliert durch Scavenger-Rezeptoren (SR) aufgenommen werden. Daraufhin degenerieren diese Zellen zu Schaumzellen, welche später absterben und zellulären Schrott bzw. Lipidablagerungen in der Intima hinterlassen.

II: Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen
Makrophagen produzieren Zytokine und Wachstumsfaktoren, welche die Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen (SMC) in der Intima anregen, wo sie extrazelluläre Matrix freisetzen. Der nekrotische Kern, eine Ansammlung von toten Zellen und Lipiden, ist von einer fibrösen Kappe umgeben, die vor allem aus Kollagen besteht und die Stabilität des Atheroms bestimmt.

Makrophagen, Schaumzellen sowie die Bildung der fibrösen Plaques

Die in die Intima eingewanderten Monozyten proliferieren und differenzieren sich zu Makrophagen. Endotheliale Zytokine, wie etwa das M-CSF (*macrophage colony stimulating factor*), führen zur Anregung des Makrophagenwachstums und zur Induktion von Scavenger-Rezeptoren in diesen Zellen (Smith, J. D. *et al.*, 1995). Nun können die Phagozyten über diese nicht durch Rückkopplung gehemmten Rezeptoren oxitativ modifiziertes LDL aus der Gefäßwand unkontrolliert aufnehmen und degenerieren schließlich zu sogenannten Schaumzellen (Suzuki *et al.*, 1997; Podrez *et al.*, 2000) (Abb. 1.3-7).

Im weiteren Verlauf der Atherogenese beobachtet man eine Verdickung der Gefäßwand, was auf einer erhöhten Proliferationsrate von glatten Muskelzellen und deren Migration in die Intima zurückzuführen ist. Der Grund dafür liegt vor allem in einer Sekretion verschiedener Zytokine und Wachstumsfaktoren durch Makrophagen und T-Zellen (Libby, 2002). Des Weiteren können Angiotensin II sowie Homocystein das Wachstum von glatten Muskelzellen anregen (Negoro *et al.*, 1995; Gerhard und Duell, 1999). Diese Prozesse führen zu einer erhöhten Bildung von extrazellulärer Matrix im subendothelialen Raum, was einerseits der Plaque Stabilität verleiht, andererseits die Transmigration und Bindung von Lipoproteinen in der Intima erleichtert (Kostner, 2003) (Abb. 1.3-7).

Langfristig führen die beschriebenen Vorgänge zu einer deutlichen Reduktion des Lumens der arteriellen Gefäße und somit zu einer verringerten Durchblutung der entsprechenden Organe. Die klinischen Bilder von stabilen Atheromen entsprechen, je nach Lage der vaskulären Wandverdickung, der koronaren Herzkrankheit, der vaskulären Demenz sowie der peripheren Verschlusskrankheit. Diese Plaques können über Jahrzehnte lediglich zu Durchblutungsstörungen führen und sind durch eine dicke und feste fibröse Kappe charakterisiert (Abb. 1.3-7).

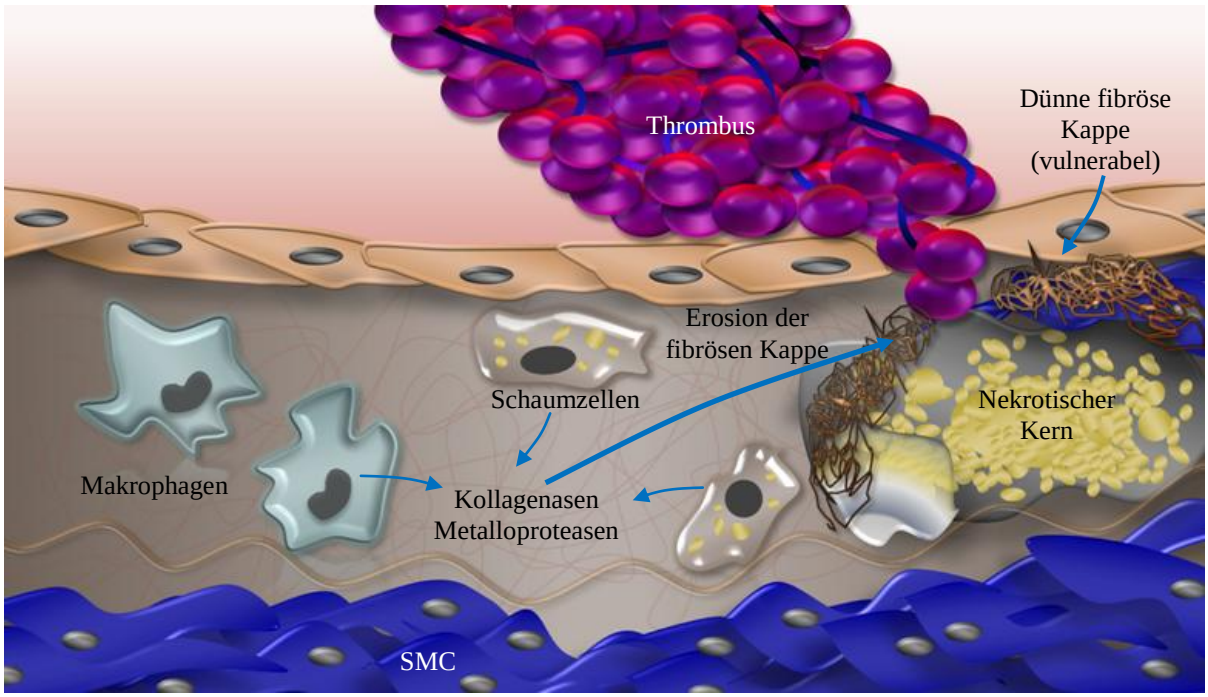


Abb. 1.3-8: Atherogenese (Teil III)

III: Plaqueruptur und Thrombusbildung
Makrophagen und Schaumzellen setzen verschiedene Proteasen frei, die die extrazelluläre Matrix (fibröse Kappe) angreifen und somit eine vulnerable Plaque erzeugen. Nach einer Ruptur der fibrösen Kappe kommt es sofort zur Aktivierung der Hämostase, zu einem Thrombus und dadurch zum Gefäßverschluss mit folgender Ischämie.

Diese Beständigkeit kann jedoch verloren gehen, wenn verschiedene Proteasen, durch Makrophagen und Schaumzellen sezerniert, die Matrix degradieren (Newby, A. C. und Zaltsman, 1999; Libby, 2000). Weiterhin kann die Hemmung der Matrixsynthese der glatten Muskelzellen durch T-Zellen, nach Freisetzung von Interferon-γ, erfolgen (Libby und Aikawa, 2002). Aus der stabilen Plaque wird eine vulnerable Plaque. Diese ist jetzt durch eine dünne, verletzliche und instabile fibröse Kappe gekennzeichnet. Das unbeständige Atherom kann einreißen und es entsteht eine Ruptur, was sofort zur Hämostasereaktion am verletzten Endothel führt. Dadurch kann das Blutgefäß vollständig verschließen, was eine Ischämie der entsprechenden Gewebe zur Folge hat (Virmani *et al.*, 2001; Shah, 2003; Kavurma *et al.*, 2005) (Abb. 1.3-8). Diese akut lebensbedrohliche Situation entspricht je nach Lage der okkludierten Arterie am häufigsten dem Myokard- oder dem zerebralen Infarkt.

Zusammenfassend kann die Atherosklerose als eine chronische entzündliche Erkrankung des arteriellen Gefäßsystems bezeichnet werden, begleitet durch Lipid-, Zelleinlagerung, einer Proliferation glatter Muskelzellen in der Intima sowie einer Gefäßlumenverengung.

1.4 Zielsetzung und Fragestellung dieser Arbeit

Aus früheren Arbeiten ist bekannt, dass die PP2C durch Fettsäuren aus Lipoproteinen, isoliert mit Hilfe der Lipoproteinlipase (LPL) *in vitro*, in ihrer Aktivität stimuliert werden konnte. Diese Fettsäuren waren ferner in der Lage Apoptose in endothelialen Zellen auszulösen (Hufnagel *et al.*, 2005). Mit Hilfe der RNA-Interferenz (RNAi) konnte ein kausaler Zusammenhang zwischen der Aktivierung der PP2C und der Apoptoseinduktion in Endothelzellen durch Fettsäuren belegt werden (Schwarz *et al.*, 2006). Diese Tatsachen weisen daraufhin, dass auch im Organismus ähnliche Prozesse stattfinden könnten. Eine endotheliale Apoptose, ausgelöst durch Fettsäuren, wäre der Initialschritt der Atherosklerose. Trotzdem weiß man nicht, ob die Konzentrationen dieser Fettsäuren am Endothel und vor allem in direkter Umgebung der PP2C *in vivo* so hoch sein können, um das Enzym zu aktivieren und dadurch den Zelltod zu initiieren. Der Schwerpunkt dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Erörterung dieses Sachverhaltes.

Es sollte jedoch zunächst in kleineren Projekten untersucht werden, ob Endothelzellen auch gezielt vor dem apoptotischen Untergang geschützt werden können. Deshalb sollten auch die Endothelzell-protektiven Eigenschaften von einzelnen Lipoproteinfraktionen, der Omega-3-Fettsäure Docosahexaensäure (DHA) sowie den Inhaltsstoffen von Ginkgo biloba in der Zellkultur untersucht werden.

Ginkgo biloba-Extrakte werden seit Jahrhunderten in der traditionellen Medizin als Geriatrika eingesetzt. Es liegen Erkenntnisse vor, die beschreiben, dass sie einen neuroprotektiven Effekt besitzen. Es sollte zudem untersucht werden, ob diese zellschützenden Eigenschaften auch an kultivierten Endothelzellen beobachtet werden können.

Während LDL und VLDL als unabhängige Risikofaktoren in der Atherogenese bekannt sind, korreliert ein hoher HDL-Wert mit einer verringerten Inzidenz atherosklerotischer Erkrankungen. Mit Hilfe des bereits etablierten Zellkulturmodells sollten die Endothelzell-schützenden Eigenschaften dieser Lipide untersucht werden.

DHA stimuliert die Aktivität der PP2C *in vitro* und ist in der Lage die Endothelzellen zu schädigen. Es ist jedoch auch bekannt, dass Omega-3-Fettsäuren protektive Eigenschaften haben können. Daher bestand eine weitere Aufgabe darin, zu prüfen, ob die DHA in niedriger Konzentration der Apoptose dieser Zellen entgegenwirken kann.

Der große Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war jedoch die Entwicklung eines neuen, der Physiologie-nahen Zellkulturmodells. Hierbei sollte mit Hilfe von humanen Zellen sowie unter Einsatz humaner Lipoproteinfraktionen belegt werden, dass physiologische

Mengen der LPL aus menschlichen Makrophagen in der Lage sind genügend Fettsäuren freizusetzen, welche die Endothelzellen schädigen können. Da die LPL an der luminalen Seite des Endothels für die Spaltung von Triglyceriden aus Lipoproteinen verantwortlich ist, jedoch das Enzym nicht in diesen Zellen synthetisiert wird, sollte gezeigt werden, dass die Lipase aus kultivierten Makrophagen in das Zellmedium sezerniert und anschließend an HSPG der endothelialen Membran spezifisch binden kann. Dazu sollten Endothelzellen und Makrophagen im gleichen Kompartiment kokultiviert werden.

Im Anschluss sollte demonstriert werden, dass die nun endothelial gebundene Lipase in der Lage ist, physiologische Konzentrationen von Lipoproteinen zu hydrolysieren, wobei untersucht werden sollte, ob die dabei freigesetzten Fettsäuren Apoptose in den Zellen auslösen können.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob die Hemmung der LPL-Aktivität mit einem spezifischen Inhibitor die Menge an freigesetzten Fettsäuren aus Lipoproteinen reduziert und daraufhin die Apoptoseinduktion in Endothelzellen verringert werden würde.

Mit Hilfe der modernen Methodik der RNAi sollte zudem dargestellt werden, dass die Herunterregulation der LPL in Makrophagen die freigesetzte Fettsäuremenge in der Kokultur mit Endothelzellen reduziert und daraufhin die Apoptoserate der Endothelzellen ebenfalls verringert werden kann.

Wenn diese Hypothesen verifiziert würden, dann könnten diese Ergebnisse einen deutlichen Hinweis dafür geben, dass im Körper ähnliche Fettsäuremengen freigesetzt werden, welche dann durch Aktivierung der PP2C zur Apoptose der Endothelzellen führen. Dies würde die proatherogene Rolle der ungesättigten Fettsäuren bekräftigen.

Weiterer Schwerpunkt der wissenschaftlichen Arbeit war zu untersuchen, ob eine ölsäurereiche Diät in gezüchteten Meerschweinchen eine atherosklerotische Läsionsentstehung induzieren kann. Dieses Vorhaben ist ein wichtiger Schritt die an Zellkulturen gewonnenen Erkenntnisse im intakten Versuchstier zu überprüfen und um letztendlich unsere Hypothese zu verifizieren. Dazu sollten Dunkin-Hartley-Meerschweinchen mit einem Spezialfutter, welches mit 25% Trioleat angereichert wurde, über den Zeitraum von fünf Monaten ad libitum gefüttert werden. Durch Kontrolle der gefressenen Futtermenge sowie der Körpergewichtsentwicklung der Tiere sollte der Verlauf des Fütterungsversuches dokumentiert werden. Anschließend sollte neben der Untersuchung der Blutserumparameter die Progression der Atherosklerose in mit Trioleat-gefütterten Meerschweinchen im Vergleich zu fettarmgefütterten Tieren untersucht werden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die vorliegende Arbeit die durch Lipide induzierte Atherogenese näher beleuchten sollte, um vielleicht neue Therapieansätze zu finden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Antikörper

Erstantikörper:

Anti-α-Tubulin, monoklonal, Maus	Sigma, Taufkirchen
Anti-Bad, monoklonal, Maus	Cell Signaling, Beverly, USA
Anti-Bad, polyklonal, Kaninchen	Cell Signaling, Beverly, USA
Anti-LPL, monoklonal, Maus	Geschenk von Herrn Dr. Brunzell, University of Washington, Seattle, USA
Anti-PP2Cα, polyklonal, Kaninchen	AG Klumpp, Münster
Anti-PP2Cβ, polyklonal, Kaninchen	AG Klumpp, Münster

Zweitantikörper:

anti-Kaninchen IgG, biotinyliert, Ziege	Vector Labs., Burlingame, USA
anti-Maus IgG, biotinyliert, Pferd	Vector Labs, Burlingame, USA
Texas Red® anti-Kaninchen IgG, Ziege	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Texas Red® anti-Maus IgG, Pferd	Molecular Probes, Leiden, Niederlande

2.1.2 Chemikalien

Agar	Merck, Darmstadt
Agarose	Gibco, Eggenstein
Amersham ECL Kit	Amersham, Buckinghamshire, England
Ammoniumperoxysulfat (APS)	AppliChem, Gatersleben
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma, Taufkirchen
BSA-Standard	Sigma, Taufkirchen
Calpaininhibitor	Sigma, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Taufkirchen

DNase I	Sigma, Taufkirchen
Docosahexaensäure (DHA)	Sigma, Taufkirchen
EDTA	Sigma, Taufkirchen
Ethanol 96%	Lenz Chemie, Westerburg
GBX Developer/Replenisher	Sigma, Taufkirchen
GBX Fixer/Replenisher	Eastman Kodak, New York, USA
Glycerol	Sigma, Taufkirchen
Glycin	Sigma, Taufkirchen
Höchst 33258 (Bisbenzimid)	Sigma, Taufkirchen
Isopropanol	Riedel de Haen, Seelze
Kaliumbromid	Sigma, Taufkirchen
Kaliumchlorid	Sigma, Taufkirchen
Kaliumdihydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Lipoproteinlipase von *Pseudomonas ssp.*	Sigma, Taufkirchen
Lipoproteinlipase, bovin	Sigma, Taufkirchen
Magermilchpulver	Heirler Cenovis, Radolfzell
Meerschweinchendiäten	Altromin, Lage
Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen
Methanol	Merck, Darmstadt
Micro BCA Protein Assay	Interchim, Montlucon, Frankreich
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Sigma, Taufkirchen
Natriumchlorid	Riedel de Haen, Seelze
Natriumhydrogencarbonat	Sigma, Taufkrichen
Natriumhydroxid	Sigma, Taufkrichen
Nilblau A	Sigma, Taufkirchen
Oligofectamin®	Gibco, Eggenstein
Ölsäure >99% (*cell culture tested*)	Sigma, Taufkirchen
Orlistat	isoliert aus Xenical™ Kapseln
Paraformaldehyd	Sigma, Taufkirchen
Pferdeserum	PAA, Marburg
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Taufkirchen
Ponceau S	Serva Feinbiochemica, Heidelberg

Rotiphorese® 30 (30% Acrylamid)	
Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Sodium dodecylsulfate (SDS)	Sigma, Taufkrichen
Sterilium®	Bode Chemie, Hamburg
N, N, N´, N´-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma, Taufkirchen
Tris	Roth, Karlsruhe
Tris-HCl	Merck, Darmstadt
Triton®-X-100	Sigma, Taufkirchen
Trypanblau	Sigma, Taufkirchen
Trypsinlösung	Promocell, Heidelberg
Tween 20	Sigma, Taufkirchen
Wasser, demineralisiert	Milli QTM, Millipore, Neu-Isenburg
Wasserstoffperoxid 30%	Sigma, Taufkirchen
Ziegenserum	PAA, Marburg

2.1.3 Verbrauchs- und Zellkulturmaterialien

Cellstar®-Röhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Corning®-Sterilfilter (0,22 µm)	Corning, New York, USA
Dako Pen	Dako, Glostrup, Dänemark
Deckgläser, 24 mm Ø	Kobe, Marburg
Embedding Molds, 22 mm	Thermo Electron, Bremen
Embedding Molds, 7x7x5 mm	Thermo Electron, Bremen
Falcon® Zellkulturflaschen	Fisher Scientific, Schwerte
Humane umbilikale venöse Endothelzellen (HUVECs)	Promocell, Heidelberg
HUVECs *growth medium*	Promocell, Heidelberg
Hybond Nitrocellulosemembran	Amersham, Braunschweig
Kodak X-OMAT AR Film	Eastman Kodak, New York, USA
Kryoröhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Kryo-serumfreies Medium	Promocell, Heidelberg
Mikrotiterplatte Nunc-Immuno™	Nunc, Roskilde, Dänemark
Millex® Sterilfilter (0,22 µM)	Millipore, Bedford, USA
Objektträger, 76 x 26 mm	IDL, Nidderau
OptiMEM®	Gibco, Eggenstein

Quickseal-System	Beckmann, Krefeld
Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI-1640)	Sigma, Taufkirchen
Shandon Cryomatrix	Thermo Electron, Bremen
THP-1-Zellen	Institut für Atherosklerose-forschung, Münster
Whatman-Papier	Schleicher & Schüll, Dassel
Zellkulturschalen (Ø 35, 50mm und 90mm), Multiwells 24er	Fisher Scientific, Schwerte

2.1.4 Geräte

Autoklav	HICLAVE HV-110 L, Tokio, Japan
Blottingapparatur	Biometra, Göttingen
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 150	Zeiss, Jena
Hitzesterilisator	TV 40 UT, Memmert, Emmerdingen
Konfokales Laserscanningmikroskop	LSM 510; Zeiss, Jena
Kühlzentrifuge	Microfuge® R Centrifuge, Beckman
Lichtmikroskop	Olympus® OM-4Ti; Olym., Tokio, Japan
pH-Meter	Digital pH-Meter, Knick, Berlin
Photometer	BioMate3, ThermoSpectronic, Dreieich
Pumpe	Laboport, KNF Neuberger, Freiburg
Quickseal System	Beckmann, Krefeld
Reinstwasser-Anlage	Milli QTM, Millipore, Neu-Isenburg
Rotoren für Ultrazentrifuge	Beckmann, Krefeld Modelle 50.3 Ti und 50.4 Ti
Schneidevorrichtung (tube slicer)	Beckmann, Krefeld
Spannungsquelle	Electrophoresis Power Supply EPS 600, Pharmacia, Freiburg
Ultraschallgerät	Sonifier B-12, Branson Sonic Power Company, Danbury, USA
Ultrazentrifuge (Modell L-8-55M)	Beckmann, Krefeld
Waagen	P163, Mettler-Toledo, Gießen Envirco C424 H, Ceag Schirp, Borken
Werkbänke	Lamin Air ELB 2448, Heraeus, Hanau

Zentrifuge	Sepatech Biofuge 13, Heraeus Hanau

2.1.5 Software

Endnote X	www.endnote.com
Macromedia Fireworks 8	Macromedia
Microsoft Office 2007	Microsoft
Microsoft Windows XP	Microsoft
WinSTAT	Robert K. Fitch, www.winstat.com
Zeiss LSM Image Browser 3.5	Zeiss, Jena

2.2 Zellkultur

2.2.1 Allgemeine Arbeitsweise in der Zellkultur

Die Arbeitstechniken in der Zellkultur erfordern eine aseptische Handlungsweise. Alle benötigten Reagenzien und Geräte wurden sterilisiert, um Keimarmut zu erzeugen. Arbeiten an lebenden Zellen sind ausschließlich in sterilen Werkbänken mit vertikalem oder horizontalem laminaren Luftzug durchgeführt worden.

Glasgeräte sind vor Benutzung bei 180°C 120 min hitzesterilisiert, wässrige Lösungen, wie doppelt destilliertes Wasser, PBS (*phosphate buffered saline)* sowie Pipettenspitzen für Eppendorfpipetten sind bei 121°C und 2 Bar Überdruck 60 min autoklaviert worden. Das Zellmedium für die THP-1-Monozyten wurde sterilfiltriert, Endothelzellmedium sowie das OptiMEM steril bezogen.

PBS

NaCl	140 mM
KCl	2,7 mM
Na_2HPO_4	10 mM
KH_2PO_4	1,8 mM
pH 7,3	(eingestellt mit HCl)

2.2.2 Kultivierung und Charakterisierung von humanen Zellen

2.2.2.1 THP-1-Zellen

THP-1 ist eine humane monozytäre Suspensionszelllinie, isoliert aus dem Blut eines an Leukämie erkrankten Kindes. Für die Kultivierung dieser eukaryotischen Zellen wurde nachfolgendes Medium verwendet.

Komponente	Gehalt [mg/l]	Komponente	Gehalt [mg/l]
Aminosäuren			
L-Arginin	200,00	L-Leucin	50,00
L-Asparagin	50,00	L-Lysin x HCI	40,00
L-Asparaginsäure	20,00	L-Methionin	15,00
L-Cystein	50,00	L-Phenylalanin	15,00
L-Glutamin	300,00	L-Prolin	20,00
L-Glutaminsäure	20,00	L-Serin	30,00
L-Glycin	10,00	L-Threonin	20,00
L-Histidin	15,00	L-Tryptophan	5,00
L-Hydroxyprolin	20,00	L-Tyrosin	20,00
L-Isoleucin	50,00	L-Valin	20,00
Anorganische Salze			
$CaCl_2$	200,00	$MgSO_4$ x 7 H_2O	100,00
$Ca(NO_3)_2$ x 4 H_2O	100,00	NaCl	6000,00
$Fe(NO_3)_3$ x 9 H_2O	0,10	$NaHCO_3$	2000,00
KCl	400,00	NaH_2PO_4	800,00
Vitamine			
p-Aminobenzoesäure	1,00	Pyridoxal x HCI	1,00
D-Biotin	0,20	Riboflavin	0,20
Cholinchlorid	3,00	Thiamin x HCI	1,00
Folsäure	1,00	Vitamin B12	0,005
i-Inositol	35,00		
Nikotinamid	1,00		
Weitere Komponenten			
D-Glukose	2000,00	Phenolrot	5,00
Glutathion (reduziert)	1,00		

Abb. 2.2-1: Zusammensetzung von Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI-1640)

Komplettiertes RPMI-1640:

RPMI-1640	500 mL
Fetales Kälberserum (FCS)	10% (v/v)
Penicillin	100 U/mL
Streptomycin	100 µg/mL
L-Glutamin	2 mM

Die THP-1-Zellen wurden in 75 cm^2 Kulturflaschen mit komplettiertem RPMI 1640 Medium bei 37°C im Brutschrank (5% CO_2, 95% Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Alle drei bis vier Tage erfolgte ein Medienwechsel durch Abzentrifugation der Zellen und Resuspension des Pellet mit frischem Medium. Für Experimente mit THP-1-Makrophagen mussten die in Suspension vorliegenden THP-1-Monozyten zu adhärenten Makrophagen ausdifferenziert werden. Dies wurde durch Zugabe von 50 µM 2-Mercaptoethanol und 100 ng/mL Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) (Abb. 2.2-2) zum Zellmedium und anschließender Kultivierung im Brutschrank bei 37°C bewirkt (Tsuchiya *et al.*, 1982; Dory, 1993). Die vollständige Ausdifferenzierung zu Makrophagen dauert 72 h. Da die untersuchte Lipoproteinlipase (LPL) eine maximale Expressionsrate vor der vollständigen Ausdifferenzierung zu Makrophagen hatte, wurden die Versuche meist mit sich differenzierenden Zellen durchgeführt.

Bei allen Versuchen in denen das Zellmedium der THP-1-Makrophagen mit HUVECs in Kontakt kam, wurde 6 h nach Zugabe von PMA das Medium gewechselt, um die Endothelzellen vor PMA zu schützen.

Zur Kryokonservierung wurden die THP-1-Zellen bei 300 g für 10 min zentrifugiert und nach Zugabe des Einfriermediums in vorbereitete Gewebekulturröhrchen in mehrere Lagen Papiertücher gewickelt, um ein langsames Abkühlen der Proben zu ermöglichen. Die so eingepackten Röhrchen wurden über Nacht bei -80°C eingefroren und am nächsten Tag zur dauerhaften Lagerung in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt.

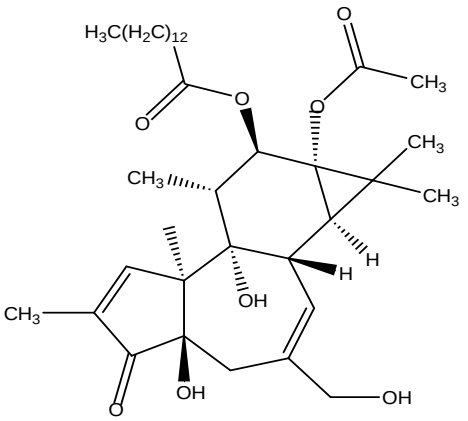


Abb. 2.2-2: Strukturformel von Phorbol-12-myristat-13-acetat

Einfriermedium:

RPMI-1640	500 mL
Fetales Kälberserum	10% (v/v)
Penicillin	100 U/mL
Streptomycin	100 µg/mL
L-Glutamin	2 mM
DMSO	10% (v/v)

Bei Bedarf wurden die in Flüssigstickstoff kryokonservierten Zellen im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, mit komplettiertem Medium versetzt und im Brutschrank bei 37°C kultiviert. Am darauf folgenden Tag wurde das Medium gewechselt, um DMSO-Reste aus dem Einfriermedium zu entfernen.

2.2.2.2 HUVECs

Der Begriff HUVECs steht als Abkürzung für humane umbilikale venöse Endothelzellen. Diese Primärzellen werden aus der Nabelschnur, direkt nach der Abnabelung des Kindes von der Mutter, isoliert. Man gewinnt die Zellen in dem die Umbilikalvene mit einer Kollagenaselösung gespült wird, welche die Endothelzellen ablöst. Die gepoolten HUVECs wurden von der Firma Promocell (Heidelberg) kryokonserviert und kommerziell bezogen.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Endothelzellwachstumsmediums der Firma Promocell (Heidelberg) in Kulturflaschen definierter Größe (75 cm²). Die Passagierung geschah bei einer Konfluenz von 90%, hierbei wurden die Zellen zweimal mit warmen PBS gewaschen, mit Trypsin/EDTA abgelöst, mit frischem Vollmedium 1:6 verdünnt und wieder ausgesät. Für Experimente wurden Zellen der Passage 3 bis 6 mit einer Konfluenz von 80% verwendet.

Zusammensetzung des Endothelzellwachstumsmediums:

FCS	0,02 ml/ml
Wachstumszusatz für Endothelzellen / Heparin	0,004 ml/ml
Humaner epidermaler Wachstumsfaktor	0,1 ng/ml
Humaner Fibroblasten-Wachstumsfaktor	1,0 ng/ml
Hydrocortison	1,0 µg/ml
Gentamycinsulfat	50 µg/ml
Amphotericin B	50,0 ng/ml
Endotheliales Wachstumsmedium	ad 500 ml

Zur Kryokonservierung wurden die trypsinisierten HUVECs bei 220 g für 5 min zentrifugiert und nach Zugabe von Kryomedium der Firma Promocell (Heidelberg) in vorbereitete Gewebekulturröhrchen pipettiert, über Nacht bei -80°C eingefroren und am nächsten Tag zur dauerhaften Lagerung in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt.

Das Auftauen der Zellen erfolgte bei 37°C im Wasserbad. Der Inhalt des Röhrchens wurde dann in eine bereits mit angewärmtem Zellmedium gefüllte Kulturflasche umgefüllt.

2.2.2.3 Kokultivierung von THP-1-Zellen und HUVECs

Um die Rolle der Fettsäure-induzierten Apoptose zu untersuchen, wurden sich differenzierende THP-1-Zellen mit HUVECs auf zwei verschiedene Arten kokultiviert.

Zur direkten Kokultivierung beider Zellen direkt nebeneinander in der gleichen Schale wurden als erstes THP-1-Monozyten mit PMA und 2-Mercaptoethanol nach Vorschrift adhärent ausgesät. Nach 6 h wurde das phorbolesterhaltige Medium entfernt und die Zellen zweimal mit warmen OptiMEM gewaschen. Dieser Schritt war notwendig, um die HUVECs nicht mit PMA in Kontakt kommen zu lassen. Durch den Medienwechsel konnte die Expression der LPL nicht beeinflusst werden. Als nächstes wurden trypsinisierte HUVECs definierter Zellzahl direkt in die Schalen mit sich differenzierenden THP-1-Zellen in OptiMEM ausgesät. Nach einem Zeitraum von 20 h nach Zugabe von PMA erfolgten immunzytochemische Aufnahmen der Zellen (Abb. 2.2-3).

Für alle anderen Versuche wurde die separate Kokultur etabliert. Hierbei wurden beide Zellarten in einem Kompartiment (gleiches Gefäß und Zellmedium), jedoch als separate *Monolayer* kultiviert. Dies hatte den Vorteil jede Zellsorte für sich genau analysieren zu

können. Hierzu wurden zunächst HUVECs in 19,6 cm^2 Schalen mit einer Zelldichte von 3 x 10^5 pro Schale im Endothelzellmedium kultiviert. THP-1-Zellen wurden auf präparierten Deckeln von 9,8 cm^2 Schalen in 0,5 ml PMA-haltigem OptiMEM ausgesät. Die Zelldichte betrug 1 x 10^5 bis 3 x 10^6 Zellen pro Schale. Nach 6 h Differenzierungszeit wurden die Zellen mit warmen OptiMEM gewaschen und der Schalendeckel mit adhärenten THP-1-Zellen kopfüber in die Schale mit HUVECs eingebracht. Vorher wurden die Endothelzellen ebenfalls mit OptiMEM gewaschen, um Serumreste zu entfernen und daraufhin mit 1,5 ml OptiMEM befüllt, um die Translokation der LPL von THP-1-Zellen zu den HUVECs möglich zu machen. Der Abstand zwischen den beiden einlagigen Zellschichten betrug 0,5 mm (Abb. 2.2-4).

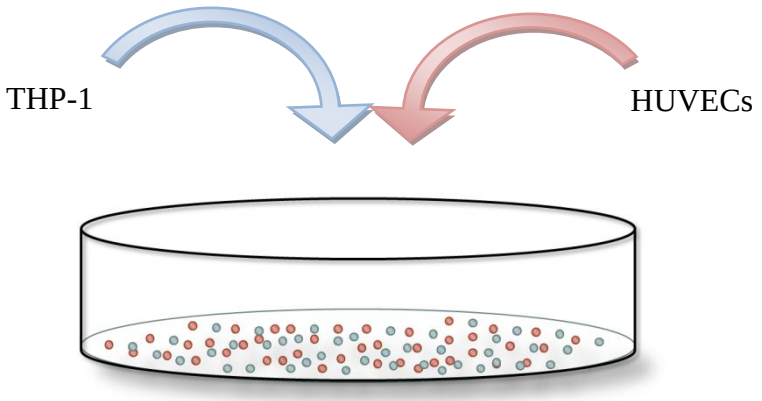


Abb. 2.2-3: Aufbau der direkten Kokultur für immunzytochemische Untersuchungen

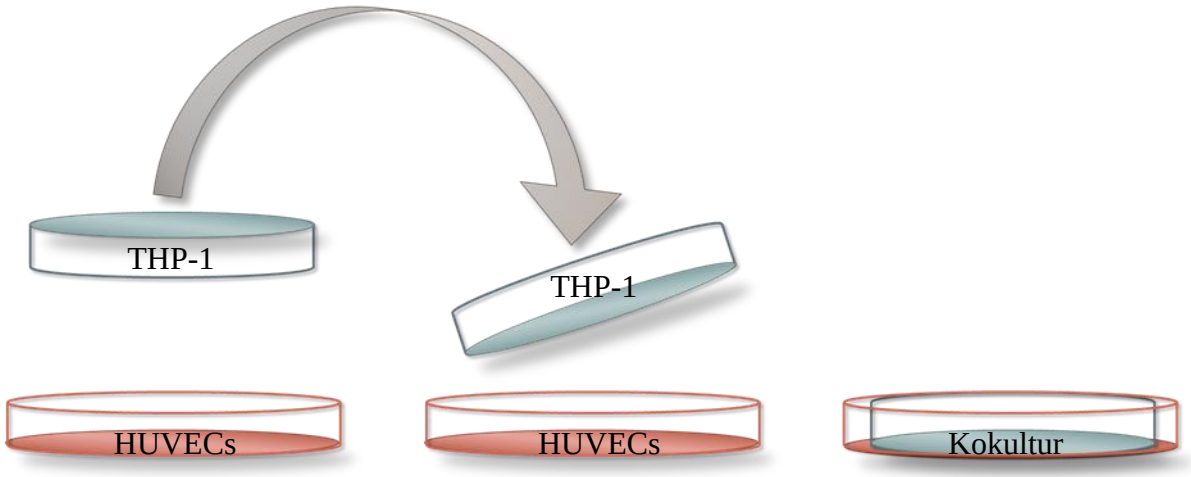


Abb. 2.2-4: Aufbau der separaten Kokultur von HUVECs und THP-1-Zellen

2.2.2.4 Primäre murine Kardiomyozyten

Die primären murinen Kardiomyozyten wurden freundlicherweise vom Institut für Pharmakologie am Universitätsklinikum Münster in Schalen kultiviert zur Verfügung gestellt.

2.2.2.5 Nilblaufärbung zur Lipiddetektion in der Zelle

Die Detektion von Lipidstrukturen erfolgte mit dem Farbstoff Nilblau A. Dabei handelt es sich um ein Gemisch aus einem blauen, basischen Oxazin, das mit Phospholipiden und freien Fettsäuren interagiert und einem roten Oxazon, das neutrale Lipide anfärbt. Der Farbstoff kann zur Lokalisierung und Quantifizierung von Lipiden in der Zelle verwendet werden (Dunnigan, 1968; Ostle und Holt, 1982). Die Fluoreszenzdetektion erfolgte mit dem konfokalen Laserscanningmikroskop. Die Zellen wurden nach der Lipidbehandlung 30 min mit Paraformaldehyd 4% fixiert, mit PBS gewaschen und anschließend für weitere 60 min mit der Nilblaulösung inkubiert. Nach erneutem gründlichem Waschen mit PBS konnten die Zellen analysiert werden, wobei jeweils repräsentative Aufnahmen gemacht wurden.

Nilblaulösung

Nilblau A	1 mg
PBS	100 ml

2.2.3 Bestimmung der Apoptoserate mit Hoechst 33258

Der membrangängige Farbstoff Hoechst 33258 (Abb. 2.2-5) bindet an Adeninreste der DNA-Helix. Dies ist eine anschauliche Methode zur Darstellung und Evaluierung apoptotisch veränderter Zellkerne. Als apoptotisch wurden die Zellen nur dann bezeichnet, wenn sie eine kondensierte, fragmentierte Morphologie aufwiesen.

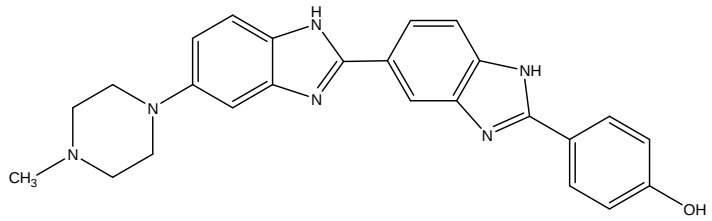


Abb. 2.2-5: Strukturformel von Hoechst 33258

Die Zellen wurden für 30 min mit Paraformaldehyd 4% fixiert. Anschließend erfolgte eine 30 min dauernde Behandlung mit dem Hoechst-Farbstoff in einer Konzentration von 10 µg/ml in Methanol unter Lichtschutz. Nach dem Entfernen der Farbstofflösung wurden die Schalen mit PBS befüllt und bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt. Die Zellen wurden nach Anregung des mit der DNA interkalierenden Farbstoffs mit einer Quecksilberlampe, durch ein Fluoreszenzmikroskop detektiert. Bei der Zählung der apoptotischen Zellen wurden mehrere repräsentative Stellen der Kulturschale ausgezählt. Die Dokumentation der Färbung erfolgte mit dem konfokalen Laserscanningmikroskop bei einer Anregungswellenlänge von 350 nm und einer Emissionswellenlänge von 420 bis 520 nm.

2.2.4 Apoptoseinduktion in HUVECs durch Staurosporin

1977 charakterisierten Omura und Mitarbeiter das Staurosporin, eine Substanz aus einer Streptomyces-Art, die ein starker Inhibitor von Proteinkinasen ist (Omura *et al.*, 1995) (Abb. 2.2-6). Die Hemmung solcher Enzyme führt in Zellen zur Induktion der Apoptose.

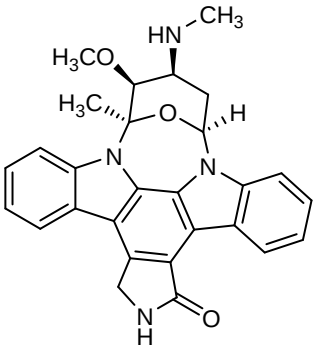


Abb. 2.2-6: Strukturformel von Staurosporin

In der vorliegenden Arbeit wurden 80% konfluente HUVECs mit 50 bis 300 nM Staurosporin im Endothelzellmedium (Promocell, Heidelberg) über einen Zeitraum von 5 bis 24 h behandelt und daraufhin die Apoptoserate bestimmt.

2.2.5 Apoptoseinduktion in HUVECs durch Serumentzug

Eine weitere Methode, um Apoptose in der Zellkultur auszulösen, ist der Serumentzug aus dem Medium. Serumdeprivation in Kultur bewirkt den Wegfall von exogen zugeführten Nährstoffen und Wachstumsfaktoren. Durch diesen Entzug werden die meisten Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus arretiert und langfristig geschädigt (Rhodes *et al.*, 1994).

Als serumfreies Medium wurden OptiMEM sowie das Endothelzellmedium der Firma Promocell (Heidelberg) verwendet. Beim Letzteren wurde das FCS und Wachstumsfaktoren enthaltene *supplement pack* nicht zum Medium zugegeben. HUVECs wurden 50 bis 72 h mit serumfreien Medien behandelt. Es folgte die Fixierung mit Paraformaldehyd 4% sowie die Untersuchung der Apoptoserate mit Hoechst 33258.

2.2.6 Apoptoseinduktion in HUVECs mit Lipoproteinen und Lipase

HUVECs wurden mit Lipoproteinen mit oder ohne LPL-Zugabe behandelt. Es wurden zwei verschiedene Lipasen verwendet, die bovine und die aus der *Pseudomonas ssp.* stammende. Nach 24 h Behandlung wurden die Zellen mit Paraformaldehyd 4% fixiert, mit dem Hoechst 33258 Farbstoff inkubiert und anschließend die Apoptoserate untersucht.

2.2.7 Apoptoseinduktion in HUVECs mit VLDL und Makrophagenmedium

THP-1-Monozyten wurden mit PMA sowie β-Mercaptoethanol nach Protokoll behandelt. Nach 6 h Differenzierungszeit wurde das Medium entfernt, die Zellen mit OptiMEM gewaschen und neues frisches Medium zugesetzt. Dieser Schritt war notwendig, um PMA-Reste zu eliminieren. Genau 6 h später, also insgesamt 12 h nach Zugabe von PMA, wurde das Zellmedium, in welches die LPL sezerniert wurde, entnommen. Mit diesem Medium wurden sowohl mit als auch ohne VLDL-Zugabe in Konzentrationen zwischen 0,1 bis 100 mg/dl die HUVECs inkubiert. Die Behandlungsdauer lag zwischen 24 und 48 h. Danach erfolgte eine Fixierung, Färbung und die Untersuchung der Apoptoserate.

2.2.8 Apoptoseinduktion in kokultivierten HUVECs mit VLDL

HUVECs und sich differenzierende THP-1-Zellen wurden zusammen in einem Kompartiment, wie im Kapitel 2.2.2.3 beschrieben, separat kokultiviert. In das gemeinsame Medium in der Kokultur wurde VLDL, 6 h nach Zugabe von PMA, in Konzentrationen zwischen 0,1 und 100 mg/dl zugegeben. Die Behandlungsdauer mit VLDL dauerte zwischen 14 und 18 h, also bis zum Zeitpunkt 20-24 h nach Addition von PMA. Die Apoptoserate der behandelten HUVECs wurde nach Fixierung und Färbung der Zellkerne analysiert.

2.3 Tiere und Tierhaltung

Alle Tiere wurden entsprechend den tierschutzrechtlichen Richtlinien gehalten und behandelt.

2.3.1 Meerschweinchen

Im Rahmen des Fütterungsversuchs wurden 40 männliche Dunkin-Hartley-Meerschweinchen (Alter 7 Wochen, Körpergewicht 350-400 g; Charles River, Sulzfeld) verwendet. Dabei wurden die Tiere in zwei Gruppen (n=20) aufgeteilt. Die Versuchsdauer belief sich auf 150 Tage. Die Einzelhaltung der Tiere wurde in Makrolon Typ IV Käfigen durchgeführt und erfolgte in einem klimatisierten Tierstall unter standardisierten Bedingungen (Raumtemperatur 23°C, relative Luftfeuchtigkeit 55%, zwölfstündiger Hell-Dunkel Rhythmus).

2.3.2 Diäten und Fütterung

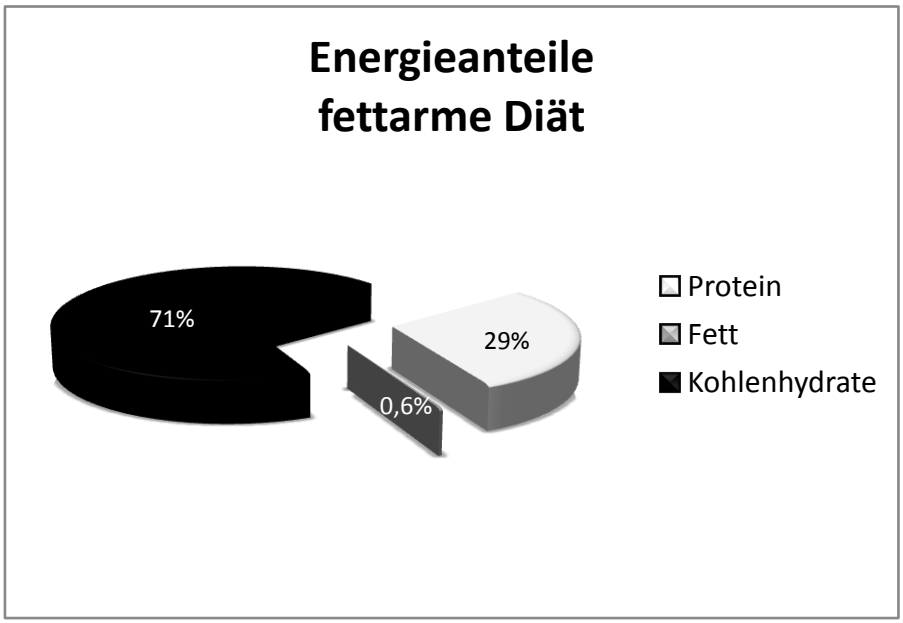
Die Fütterung erfolgte jeweils mit einer fettarmen und einer 25% Glycerol-Trioleat (Trioleat)-angereicherten Spezialdiät (Altromin, Lage) (Abb. 2.3-1). Entsprechend unterschiedlich waren die Energieanteile der beiden Diäten. Bei der fettarmen Diät waren die Kohlenhydrate dominierend, während bei der Trioleatdiät die Fette überwiegten. Die Energiedichte des Fettfutters war etwa 50% höher als die der Kontrolldiät (Abb. 2.3-1 und Abb. 2.3-2).

Das Futter wurde bei -20°C gelagert, um eine Oxidation der ungesättigten Fettsäuren zu vermeiden. Die Tiere hatten freien Zugang zum Futter (ad libitum) sowie zum Trinkwasser. Die verzehrte Futtermenge sowie das Körpergewicht der Meerschweinchen wurden zweimal pro Woche dokumentiert.

Diätbezeichnung Altromin: ***Inhaltsstoff***	**Fettarme Diät C 3056** ***mg/kg***	**Diät mit 25% Trioleat C 3056 modifiziert** ***mg/kg***
Protein	185295	133845
Fett	781	250000
Kohlenhydrate	449600	271500
Rohfaser	176561	176273
Rohasche	87704	86194
Feuchtigkeit	65560	48660
Disaccharide	238360	140360
Polysaccharide	211240	131140
Aminosäuren:		
Lysin	18188,1	12991,5
Methionin	10993,5	8842,5
Cystin	3297	2355
Threonin	7406,7	5290,5
Tryptophan	2058	1470
Arginin	10185	7275
Histidin	5460	3900
Isoleucin	7476	5340
Leucin	15162	10830
Phenylalanin	7392	5280
Valin	3328,5	2377,5
Alanin	2431,8	1737
Asparaginsäure	3574,2	2553
Glutaminsäure	24330,6	17379
Glycin	3181,5	2272,5
Prolin	13141,8	9387
Serin	5386,5	3847,5
Tyrosin	9628,5	6877,5
Vitamine und Zusätze:		
Vitamin E	150,4	150,3
Vitamin K3	10	10
Vitamin B1	20	20
Vitamin B2	20,3	20,2
Vitamin B6	15	15
Vitamin B12	0,042	0,038
Nikotinsäure	50,1	50,1
Pantothensäure	50,1	50,08
Folsäure	10,013	10,0
Biotin	0,201	0,201
Cholinchlorid	1012	1008
p-Aminobenzoesäure	100	100
Inosit	111,5	108,2
Vitamin C	3920	3920
Vitamin A I.E./kg	15000	15000
Vitamin D3 I.E./kg	500	500

Inhaltsstoff	**Fettarme Diät** *mg/kg*	**Diät mit 25% Trioleat** *mg/kg*
Mineralstoffe, Spurenelemente		
Calcium	9440	9238
Ges.Phosphor	7570	7068
Verd.Phosphor	7277	6784
Magnesium	3695	3671
Natrium	2482	2451
Kalium	16993	16943
Schwefel	2813	2434
Chlor	3641	3641
Eisen	181	180
Mangan	100	100
Zink	30	28
Kupfer	5,5	5,4
Jod	0,45	0,45
Molybdän	0,198	0,198
Fluor	4,1	4,1
Selen	0,329	0,298
Kobalt	0,137	0,133
Aluminium	6,09	5,41
Fettsäuren		
Myristinsäure C-14:0	0	0
Palmitinsäure C-16:0	0	0
Palmitoleinsäure C-16:1	0	0
Margarinsäure C-17:0	0	0
Stearinsäure C-18:0	0	0
Ölsäure C-18:1	0	239079
Linolsäure C-18:2	0	0
Linolensäure C-18:3	0	0
Arachinsäure C-20:0	0	0
Eicosaensäure C-20:1	0	0
Arachidonsäure C-20:4	0	0
Behensäure C-22:0	0	0
Umsetzbare Energie kcal/kg	2618,5	3950
Umsetzbare Energie kJ/kg	10962,9	16537,7
Protein (Massenprozent)	18,5	13,4
Fett (Massenprozent)	0,08	25
Kohlenhydrate (Massenprozent)	44,9	27,1
Protein Energie (kcal)	759,7	548,8
Fett Energie (kcal)	7,3	2325
Kohlenhydrate Energie (kcal)	1843,4	1113,2
Protein Energieanteil (%)	29,01	13,89
Fett Energieanteil (%)	0,28	58,86
Kohlenhydrate Energieanteil (%)	70,4	28,18

Abb. 2.3-1: Zusammensetzung der Meerschweinchendiäten



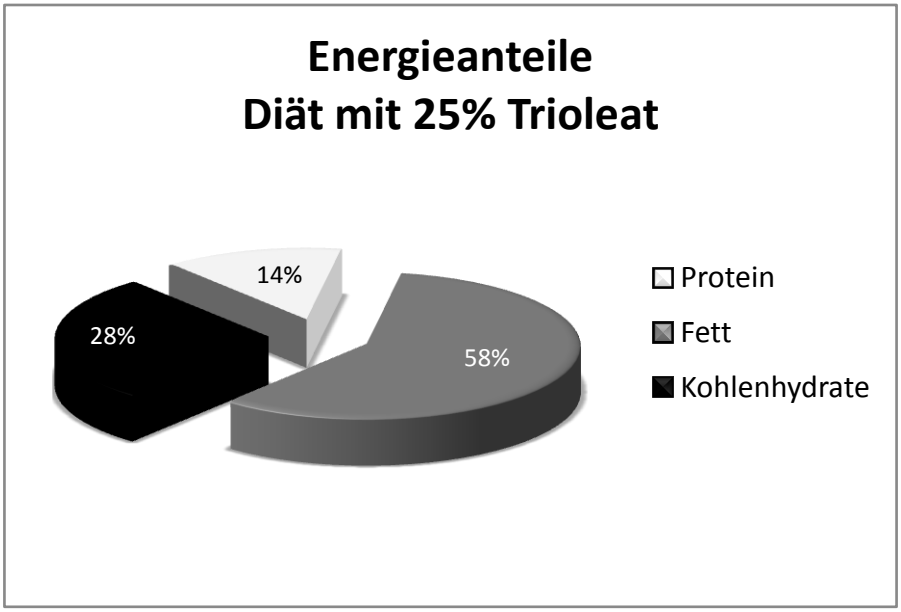


Abb. 2.3-2: Nährstoffverhältnisse in den Meerschweinchendiäten

2.3.3 Blutentnahme und Untersuchung der Blutseren

Nach 45 Tagen Fütterung wurde jeweils fünf Meerschweinchen aus jeder Gruppe 1 ml Blut durch Punktion die Ohrvene entnommen. Am Versuchsende erfolgte die Blutentnahme durch Herzpunktion an den euthanasierten Tieren.

Das Blut wurde bei Raumtemperatur (RT) 30 min stehen gelassen und für 15 min bei 3000 g zentrifugiert. Anschließend konnte das Serum entnommen und bei -80°C gelagert werden.

Die Untersuchung der Blutserumparameter erfolgte durch das Institut für Atheroskleroseforschung, Münster, mit der entsprechenden Methode:

Parameter	Methode
Triglyceride	GPO-PAP
Cholesterol, gesamt	CHOD-PAP
Cholesterol, HDL	CHOD-PAP
Cholesterol, LDL	CHOD-PAP

Abb. 2.3-3: Lipidparameter der Meerschweinchenseren und die benutzte Messmethode

2.3.4 Präparation und Gewebekonservierung

Nach 150 Tagen Fütterungszeit wurden die Meerschweinchen mit 100 mg Pentobarbital pro kg Körpergewicht i.p. narkotisiert und getötet. Nach dem öffnen des Thorax wurde aus dem noch schlagenden Herzventrikel Blut mit einer Spritze entnommen und anschließend die beiden Carotiden freipräpariert, mit Shandon Cryomatrix™ in Embedding Molds eingebettet und in flüssigem Stickstoff (-196°C) eingefroren. Die langfristige Lagerung erfolgte bei -80°C. Weiterhin wurden der Aortenbogen, der thorakale und abdominale Teil der Aorta sowie das Herz entnommen und auf die gleiche Art und Weise kryokonserviert. Die Herzen wurden zusätzlich gewogen und fotografiert. Nach Dekapitierung wurde das Fell vom Schädel entfernt, mit einer Schädelzange die Schädelkalotte bis zur Bregma aufgetrennt, die Knochen der Hemisphären freigelegt, das Gehirn vorsichtig entnommen und in Paraformaldehyd 4% konserviert.

2.3.5 Histologische Methoden

Gewebeschnitte der Herzen und Aorten in der Dicke von 10 µm wurden vom Institut für Atheroskleroseforschung in Münster angefertigt.

2.3.5.1 TUNEL-Färbung

Die TUNEL-Methode (*terminal deoxynucleotidyl dUDT nick end labeling*) eignet sich zur Untersuchung toter Zellen mit fragmentierter DNA. Es wurde der DeadEnd™ Colorimetric TUNEL System-Kit der Firma Promega nach Protokoll verwendet. Die Auswertung erfolgte kolorimetrisch am Lichtmikroskop.

2.4 Untersuchungen auf Proteinebene

2.4.1 Proteinbestimmung

2.4.1.1 Aufschluss von Zellen für das Westernblotting

Adhärente HUVECs und sich differenzierende THP-1-Zellen wurden mit PBS gewaschen, auf Eis mit Lysispuffer versetzt (50-100 µl pro 9,8 cm^2 Schale) und mit einem Schaber gesammelt. Die gewonnene Zellsuspension wurde zum Aufschluss mit Ultraschall homogenisiert und bei -80°C gelagert. Suspensionszellen wurden analog behandelt, jedoch wurde vorher das Medium abzentrifugiert, mit PBS gewaschen und nochmals vom Überstand abgetrennt. Der Zellniederschlag wurde dann mit dem Extraktionspuffer behandelt, mit Ultraschall aufgeschlossen und eingefroren.

Lysispuffer mit SDS (für Western Blotting)

Glycerol	1,0 ml
SDS 10%	3,0 ml
Tris-HCl pH 6,8 0,5 M	2,5 ml
Aqua dest.	2,5 ml
PMSF 1 M	10,0 µl
Trypsininhibitor 5 mg/ml	14,0 µl
Calpaininhibitor I 10 µM	100,0 µl

2.4.1.2 Bestimmung der Proteinmenge

BCA (bicinchoninic acid)

Proteinkonzentrationen wurden photometrisch mit dem BCA-Assay bestimmt (Smith, P. K. *et al.*, 1985). Dabei wird die Biuret-Reaktion genutzt, bei welcher Cu^{2+} -Ionen durch die Bindung von Peptiden zu Cu^{1+}-Ionen reduziert werden. BCA kann dann mit Cu^{1+} einen Chelatkomplex bilden, der eine starke Lichtabsorption bei 562 nm hat, die sich linear mit einer steigenden Proteinkonzentration vergrößert. Mit BSA als Referenzprotein wurde zunächst eine nach dem Protokoll des Herstellers vorgegebene Verdünnungsreihe angefertigt. BSA wurde hierbei in dem Puffer verdünnt, in welchem sich auch das später zu bestimmende Proteinlysat befand. Es wurden jeweils 3 µl Proteinlösung in 500 µl BCA Reagenz gegeben, gemischt und für 30 min bei 60°C im Wasserbad inkubiert. In eine Mikrotiterplatte wurden dann 200 µl jeder Probe und der Standardproben einpipettiert, um sie anschließend in einem Plattenreader photometrisch zu vermessen. Die Proteinkonzentration konnte dann anhand der erhaltenen Eichgerade und des Verdünnungsfaktors ermittelt werden.

Proteinmessung mit BCA-Lösung (Kit)

Reagenz A:	2% Na_2CO_3, 0,95% $NaHCO_3$,	
	0,16% Natriumtartrat in 0,2 M NaOH:	24 Teile
Reagenz B:	1% Bicinchoninsäure:	25 Teile
Reagenz C:	4% $CuSO_4$ x 5 H_2O:	1 Teil

Albuminstandard

BSA	2 mg/ml
NaCl	0,9%
NaN_3	0,05%

Proteinmessung nach Lowry

Bei dieser Proteinbestimmungsmethode werden auch membrangebundene Proteine miterfasst (Lowry *et al.*, 1951). Zunächst wurden 3-10 µl der zu untersuchenden Probe mit 100 µl demineralisiertem Wasser verdünnt und mit 2 ml frisch hergestelltem Lowry-Reagenz für 10 min bei RT inkubiert. Die enthaltene Natronlauge löst die membranständigen Proteine von den Zellen, woraufhin sich Protein-Kupferionenkomplexe bilden. Nach einer Zugabe von 100 µl Folin-Ciocalteau-Phenol-Reagenz bildete sich nach einer Inkubationszeit von 30 min bei RT eine der Proteinkonzentration proportionale Blaufärbung der Lösung, die daraufhin bei

720 nm photometrisch vermessen wurde. Zur Kalibrierung diente eine BSA-Standardreihe (5-80 µg BSA).

Lowry-Reagenz

Reagenz A:	2% Na_2CO_3 in 0,1 M NaOH	100 Teile
Reagenz B:	1% $CuSO_4$	1 Teil
Reagenz C:	2,7% Kalium-Natriumtartrat	1 Teil

2.4.2 SDS-PAGE und Western Blotting

2.4.2.1 Prinzip von SDS-PAGE und Western Blotting

Mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) können Nukleinsäuren oder Proteine nach Molekulargewicht aufgetrennt werden. Dabei wandern die zu untersuchenden Moleküle in einem elektrischen Feld durch eine aus einem Gemisch aus Acrylamid und Bisacrylamid bestehende Gelmatrix. Acrylamid bildet in Anwesenheit freier Radikale in einer Kettenreaktion lange Polymere, Bisacrylamid diente dazu, diese Polymere zu vernetzen. Als Katalysator wurde TEMED (N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin), als Radikalbildner APS (Ammoniumperoxodisulfat) eingesetzt. Durch eine Denaturierung der Proteine mit Sodiumdodecylsulfat (SDS) erhalten die resultierenden Proteinkomplexe eine gleichmäßig verteilte negative Ladung, was das Prinzip der Auftrennung nach der Molmasse ermöglicht. Um eine schärfere Bandentrennung zu erreichen wird über das Trenngel ("separating gel" oder "resolving gel") ein Sammelgel ("sampling gel" oder "stacking gel") gegossen, in dem die Proben aufgetragen werden. Sie müssen zunächst ein kurzes Stück durchwandern, bevor das Trenngel erreicht wird. Die Matrix im Sammelgel besitzt größere Poren und einen anderen pH-Wert als das Trenngel. Dadurch wandern die Proteine schnell und ohne eine Auftrennung als scharfe Bande. Mit Erreichen der Grenzfläche zum Trenngel, das ein dichteres Polymer-Netzwerk aufweist, wird ihre Geschwindigkeit, nun abhängig von der Molmasse, verringert und es kommt zu einer Trennung der Proteine nach der Größe.

Der Western Blot schließt sich an die SDS-Gelelektrophorese an. In einem, senkrecht zur ursprünglichen Laufrichtung, elektrischen Feld werden die sich im Gel befindlichen Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und dadurch immobilisiert. Die Immunodetektion des Proteins erfolgt mittels eines antigenspezifischen Primärantikörpers, der an Epitope bindet. An den primären Antikörper bindet wiederum ein sekundärer Antikörper,

an dem eine Peroxidase gekoppelt ist. Dieses Enzym katalysiert eine chemische Reaktion, bei der Chemolumineszenz freigesetzt wird. Die Detektion der Proteine erfolgt im Anschluss mittels Fotopapier, das durch das freigesetzte Licht belichtet wird.

2.4.2.2 Herstellung der SDS-Polyacrylamidgele

Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgele (10 cm x 10 cm x 0,5 mm), bestehend aus zwei Einheiten: einem 5%igen Sammelgel und einem 12,5%igen Trenngel gegossen.

Die bei der Herstellung verwendeten Lösungen setzten sich wie folgt zusammen:

Sammelgel (Für 10 Gele)

Rotiphorese® 30	3 ml
Sammelgelpuffer	5 ml
H_2O	12 ml
TEMED	30 µl
APS (20%)	120 µl

Sammelgelpuffer

Tris	60,5 g
SDS	4,0 g
H_2O	ad 1000 ml
pH 6.8	(eingestellt mit HCl)

Ammoniumperoxysulfat (APS) (20%)

APS	200 mg
H_2O	ad 1 ml

Trenngelpuffer

Tris	182 g
SDS	4 g
H_2O	ad 1000 ml
pH 8,8	(eingestellt mit HCl)

Zuerst wurde die Gel-Apparatur mit den Glasplatten, entsprechenden Abstandshaltern bzw. Kämmen aufgebaut und mit Agarlösung abgedichtet. Anschließend wurde das Trenngel eingegossen, der Zusatz von Radikalspender APS, wodurch die Polymerisation startete und TEMED, einem Katalysator, erfolgte kurz zuvor. Das flüssige Trenngel wurde nach dem Gießen mit Isopropanol überdeckt. Nach 45 min wurde der Alkohol entfernt und das Sammelgel nach gleichem Verfahren eingefüllt. Nach weiteren 45 min Polymerisationszeit konnten die fertigen Gele bei 4°C feucht gelagert werden.

2.4.2.3 SDS-PAGE

Mit Hilfe der SDS-Gelektrophorese werden Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Durch Zusatz von SDS und Erhitzen auf 95°C werden nichtkovalente Wechselwirkungen in nativen Proteinen aufgehoben. Die denaturierten Polypeptide binden SDS-Anionen und erhalten dadurch eine negative Ladung. Da die Menge an gebundenem SDS proportional zum Molekulargewicht der Proteine ist, wandern die SDS-Polypeptidkomplexe entsprechend ihrer Größe durch das Polyacrylamidgel. Als Referenz dienen kommerziell erhältliche, farbige Markerproteine.

Als Elektrophoresepuffer wurde ein Tris-Glycin-Puffer verwendet. Die Proteine wandern zwischen den schneller wandernden Chlorid-Ionen des Sammelgelpuffers und den langsamer wandernden Glycin-Ionen des Elektrophoresepuffers und werden dadurch in engen Banden im Sammelgel fokussiert. Beim Einwandern der Proben in das Trenngel, das eine geringere Porenweite, eine höhere Salzkonzentration sowie einen höheren pH-Wert besitzt, wandern die Glycin-Ionen an der Front, und die Proteine werden nun aufgrund ihrer molekularen Größe getrennt.

Die bei -80°C gelagerten Proteinproben wurden langsam auf Eis aufgetaut, bei der Probenvorbereitung in Probenpuffer im Verhältnis 1:5 bei 95°C 5 min hitzedenaturiert und anschließend zentrifugiert. Es wurden jeweils gleiche Proteinmengen pro Spur verwendet (20 bis 80 µg). Das im Probenpuffer enthaltene β-Mercaptoethanol, ein niedermolekulares Thiol, bewirkte eine Reduzierung von Disulfidbrücken in den Proteinen. Anschließend wurden die Proben in das Gel einpipettiert und nach Anlegen einer Spannung aufgetrennt. Für die Verweildauer im Sammelgel wurden 100 V, im Trenngel 180 V angelegt.

Probenpuffer

Tris	157,5 mg
SDS	1 g
2-Mercaptoethanol	1 ml
Glycerin	2 ml
Bromphenolblau	6 mg
Aqua dest.	6 ml
pH 6,8	(eingestellt mit HCl vor Bromphenolblauzugabe)

Elektrophoresepuffer

Tris	3,0 g
Glycin	14,4 g
SDS	1,0 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

2.4.2.4 Western Blotting und Immunodetektion

Der Transfer der Proteine auf die Matrix erfolgt auf elektrophoretischem Weg. Dabei wird ein elektrisches Feld angelegt, wodurch die Proteine aus dem Gel auf die Nitrocellulosemembran transportiert und dort gebunden werden. Gel und Membran wurden sandwichartig von Filterpapieren eingerahmt und zwischen die Elektroden gelegt (Abb. 2.4-1). Methanol im Puffer dient dazu SDS aus den Protein-Detergens-Komplexen zu entfernen und die Bindung der SDS-freien Proteine an die Membran zu erhöhen.

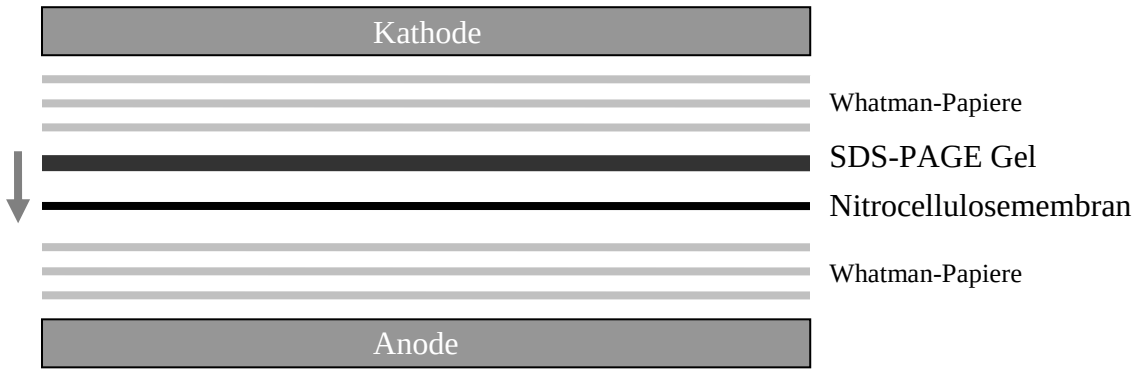


Abb. 2.4-1: Das Prinzip des Blotting-Ablaufs

Transferpuffer

Tris	3,027 g
Glycin	14,4 g
Methanol	100 ml
Aqua dest.	ad 1000 ml

Die Proteine wurden bei 250 mA für 55 min geblottet. Anschließend musste die Nitrocellulosemembran für 20 min in ein Ponceau S-Bad gelegt werden, um die Proteine zu fixieren und um sicherzustellen, dass das Blottingverfahren erfolgreich bzw. gleichmäßig war. Daraufhin wurde die Membran mit TBST (*Tris-buffered saline with Tween*) 5 min gewaschen, 60 min mit Blockpuffer (5% Magermilchpulver in TBST) bei RT behandelt und anschließend mit dem entsprechenden Erstantikörper über Nacht bei 4°C inkubiert.

Ponceaurot S-Lösung

Ponceau S rot	2 g
Trichloressigsäure	15 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

TBST

Tris	1,211 g
NaCl	8,765 g
Tween 20	1 ml
Aqua dest.	ad 1000 ml
pH 7,5	(eingestellt mit HCl)

Primäre Antikörper

Polyklonaler anti-Bad-Antikörper	1:1000 in 5% BSA/TBST
Monoklonaler anti-Bad-Antikörper	1:1000 in 5% BSA/TBST
Monoklonaler anti-LPL-Antikörper	1:1000 in 5% BSA/TBST
Polyklonaler anti-PP2Cα-Antikörper	1:1000 in 5% BSA/TBST
Polyklonaler anti-PP2Cβ-Antikörper	1:1000 in 5% BSA/TBST
Polyklonaler anti-α-Tubulin-Antikörper	1:10000 in 5% BSA/TBST

Sekundäre Antikörper

HRP-gekoppelter anti-Maus-Antikörper in 5% BSA in TBST

HRP-gekoppelter anti-Kaninchen-Antikörper in 5% BSA in TBST

Am nächsten Tag wurde die Membran mit TBST gewaschen und mit einem Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*; HRP)-gekoppelten Zweitantikörper (1:2500) für 60 min inkubiert. Nach einem weiteren Waschschritt wurde die Membran mit der ECL-Lösung behandelt. Die Peroxidase katalysiert die Oxidation des in der ECL-Lösung enthaltenen Luminol in der Gegenwart von Wasserstoff-Peroxid (H_2O_2). Durch die Oxidation wird das Luminol in einen angeregten Zustand versetzt und emittiert Licht, welches durch einen Kodakfotofilm in der Dunkelkammer sichtbar gemacht werden kann. Je nach Stärke der Signale wurde entsprechend die Expositionsdauer variiert. Der Fotofilm wurde dann mit einer Entwicklerlösung behandelt und anschließend fixiert.

2.4.3 Immunzytochemie

Für immunzytochemische Aufnahmen von THP-1-Zellen und HUVECs wurden die Zellen in Ø 35 mm Schalen auf Deckgläsern Ø 24 mm ausgesät.

2.4.3.1 Das Prinzip der Immunzytochemie

Die Immunzytochemie dient dem spezifischen qualitativen sowie quantitativen Nachweis von Proteinen in einzelnen Zellen. Im Zusammenhang mit Gewebeschnitten wird oftmals auch der Begriff Immunhistochemie verwendet. Der Vorteil dieser Methode, im Vergleich zu anderen Immunoassays, liegt in der Möglichkeit, Proteine auf morphologischer Ebene zu lokalisieren, um so Hinweise auf physiologische Zusammenhänge und Funktionen zu erhalten. Bei der Durchführung verwendet man spezifische Antikörper, die mit den Zielproteinen eine Bindung eingehen. Weiterhin erfolgt, wie bereits beim Western Blot beschrieben, eine Inkubation mit einem markierten Sekundärantikörper. Die Detektion der Antigen-Antikörper Komplexe erfolgt photometrisch mit fluoreszierenden Farbstoffmolekülen mit Hilfe eines Laserscanningmikroskops.

2.4.3.2 Detektion von Bad bzw. Lipoproteinlipase mit Texas Red

Zur immunzytochemischen Detektion von Bad und LPL wurde ein mit dem Fluoreszenzfarbstoff Texas Red® gekoppelter Zweitantikörper verwendet (Abb. 2.4-2). Die Zellen wurden zunächst mit Paraformaldehyd 4% fixiert und mit PBS gewaschen. Danach erfolgte eine Permeabilisierung der Zellmembranen mit 0,2% Triton-X-100 in PBS, um dem Antikörper Zugang zum Zielprotein zu ermöglichen. Unspezifische Bindestellen wurden mit Blockpuffer I maskiert. Es folgte eine Inkubation der Zellen mit dem Erstantikörper (beide monoklonal, in der Maus erzeugt) in einer Konzentration von 1:100 im Blockpuffer I bei 4°C über Nacht. Am nachfolgenden Tag und nach einem weiteren Waschschritt, erfolgte eine Inkubation der Zellen mit einem Texas Red-gekoppelten anti-Maus-Zweitantikörper. Danach wurden die Deckgläser mit einem handelsüblichen Nagellack auf Objektträgern fixiert und mit dem konfokalen Laserscanningmikroskop vermessen. Die Anregung für Texas Red erfolgte mit einem Helium-Neon-Laser bei einer Wellenlänge von 543 nm und einer Emissionswellenlänge größer 585 nm. Alle fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen eines Versuches wurden mit der gleichen Laserintensität und der gleichen Detektorsensitivität gemacht, um die Immunreaktivität zwischen verschiedenen Behandlungsgruppen vergleichen zu können.

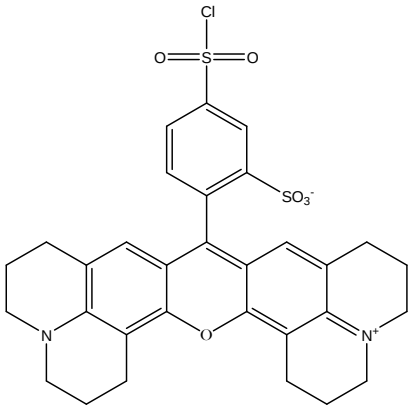


Abb. 2.4-2: Strukturformel von Texas Red®

2.4.3.3 Detektion von PP2Cβ mit Fluoresceinisothiocyanat

Die immunzytochemische Detektion von PP2Cβ erfolgte mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC; Abb. 2.4-3).

Nach einer Fixierung mit 4% Paraformaldehyd und einem Waschschritt mit PBS erfolgte eine Permeabilisierung der Zellmebranen mit 0,2% Triton-X-100 in PBS. Unspezifische Bindestellen wurden mit Blockpuffer II maskiert. Daraufhin wurden die Zellen mit dem Erstantikörper in einer Konzentration 1:100 gegen die PP2Cβ (polyklonal, im Kaninchen erzeugt) in Blockpuffer II bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen erneut intensiv mit PBS

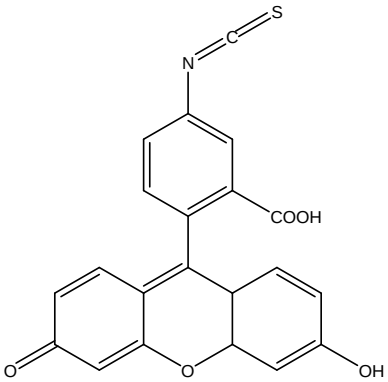


Abb. 2.4-3: Strukturformel von Fluoresceinisothiocyanat (FITC)

gewaschen und mit dem biotinylierten anti-Kaninchen Zweitantikörper für 1 h behandelt. Im Anschluss wurde wieder gewaschen und mit einer FITC-Lösung für 1 h unter Lichtschutz inkubiert. Danach wurden die Deckgläser mit einem handelsüblichen Nagellack auf Objekträgern fixiert und mit dem konfokalen Laserscanningmikroskop vermessen. Für FITC erfolgte die Anregung mit einem Argon-Laser; die optimale Anregungswellenlänge beträgt 494 nm, die der Emission 518 nm.

2.4.3.4 Doppelfärbung von Bad und PP2Cβ

Für die gleichzeitige Darstellung zweier Proteine sind spezifische Antikörper notwendig, die jeweils aus verschiedenen Spezies stammen. In dem Fall wurde ein polyklonaler anti-PP2Cβ Antikörper (Kaninchen) sowie ein monoklonaler anti-Bad Antikörper (Maus) für die Demonstration der Proteinexpression verwendet.

Zunächst erfolgte nach obigem Protokoll die Markierung für PP2Cβ mit FITC. Jedoch wurde nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper nicht sofort mit FITC Lösung behandelt, sondern zunächst wieder mit Blockpuffer I inkubiert. Nach einem Waschschritt mit PBS, wurde die Texas Red Färbung für Bad wie üblich durchgeführt und anschließend mit der FITC-Lösung, wie bereits beschrieben, inkubiert. Nach dem Eindeckeln konnten die Proben vermessen werden. Die Spektren der beiden verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe liegen weit genug auseinander, um simultan analysiert zu werden. Somit konnten beide Proteine gut nebeneinander durch sogenanntes Multitracking dargestellt werden. Ein Überlagern der jeweiligen Aufnahmen von Bad und PP2Cβ konnte eine simultane Darstellung der beiden Proteine und deren Lokalisation ermöglichen.

Triton X-100 0,2%

Triton X-100	20 µl
PBS	ad 10 ml

Blockpuffer I (Bad, LPL)

Pferdeserum	0,5 ml
PBS	ad 10 ml

Blockpuffer II (PP2Cβ)

Ziegenserum	0,5 ml
PBS	ad 10 ml

Erstantikörper-Lösung

Antikörper	10 µl
Blockpuffer	ad 1000 µl

Zweitantikörper-Lösung

anti-Kaninchen IgG biotinyliert	5 µl
Blockpuffer	ad 1000 µl

FITC-Lösung

FITC-Avidin	6 µl
PBS	ad 1000 µl

2.5 Untersuchungen auf RNA Ebene

2.5.1 Polymerase-Kettenreaktion nach reverser Transkription

2.5.1.1 Prinzip der RT-PCR

Bei der reversen Transkriptase Polymerase Kettenreaktion (RT-PCR) handelt es sich um eine *in vitro* Technik zur Vervielfachung und Analyse von Messenger-RNA (mRNA), dem Vorboten von Proteinen. Das Enzym reverse Transkriptase kehrt also die Reaktion, bei der aus DNA zunächst mRNA hergestellt wird, um. Hierbei wird aus mRNA *copy*-DNA (cDNA) synthetisiert. Mit Hilfe der PCR ist eine gezielte Vermehrung eines spezifischen DNA-Genomfragmentes der cDNA, das zwischen zwei Regionen mit bekannter Nukleotidsequenz liegt, möglich. Diese Methode erlaubt also die Amplifikation sehr geringer DNA-Mengen. Das Prinzip lässt sich so beschreiben: Zunächst erfolgt die Denaturierung der doppelsträngigen DNA (dsDNA), an welche sich am 5´- und 3´-Ende des zu amplifizierenden Bereichs spezifische Oligonukleotide, die Primer, anlagern. Dieser Vorgang wird als *Annealing* bezeichnet. Die Oligonukleotide werden von einer DNA-abhängigen DNA-Polymerase in Anwesenheit freier Desoxynukleosid-Triphosphate (dNTPs) entsprechend verlängert (*Elongation*). Die DNA-Polymerase vervielfacht den entstehenden DNA-Doppelstrang so lange bis die Reaktion unterbrochen wird. Dieser Abbruch kann z.B. mit einer Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 95°C erfolgen, wobei die dsDNA

denaturieriert wird. Kühlt man den Reaktionsansatz in Anwesenheit freier Oligonukleotide auf 40-60°C ab, so binden diese in Abhängigkeit ihres mittleren Schmelzwertes an die komplementäre Sequenz der DNA-Matrize. Die Synthese eines weiteren Doppelstranges kann nun wiederholt werden. Die Abfolge dieser drei Reaktionsschritte wird als Zyklus bezeichnet. Diese Zyklen werden zwischen 25- bis 40-mal wiederholt, bis genug amplifizierte DNA hergestellt wurde. Sie kann dann qualitativ anhand der Basenpaarlänge sowie quantitativ nach einer elektrophoretischen Auftrennung in einem Agarosegel bestimmt werden.

2.5.1.2 Extraktion der Gesamt RNA

Für die Extraktion der RNA aus HUVECs und THP-1-Zellen wurde ein RNA-Isolierungskit (RNeasy-Kit, Quiagen) nach Vorschrift verwendet.

Adhärente Zellen wurden zunächst mit PBS gewaschen und mit Lysispuffer gesammelt. Danach erfolgte eine Homogenisierung der Probe durch Auftragen auf die QIAshredder Spinsäule (Qiagen) sowie anschließender Zentrifugation bei 10000 g für 2 min. Als nächstes wurden 600 µl Ethanol 70% hinzugefügt und das Lysat auf die RNeasy Mini-Säule gegeben. Sie besteht aus Silicagel-Membranen, die spezifisch RNA binden. Alle anderen Bestandteile wie etwa DNA und Proteine wurden nach mehreren Wasch- und Zentrifugationsschritten mit verschiedenen Lösungen entfernt. Zum Schluss wurde die an der Säule bindende RNA mit 40 µl RNase-freien Wasser gespült. Die Lagerung des Filtrates erfolgte bei -80°C.

2.5.1.3 Gehaltsbestimmung der Gesamt-RNA

Die Konzentration sowie die Reinheit der RNA in der erhaltenen Lösung wurden photometrisch bestimmt. Jeweils 1 µl Probenlösung ad 120 µl Wasser bildete die mit dem UV-Meter zu vermessende Lösung. Die Absorption der RNA-Aromaten wurde bei 260 nm ermittelt. Um auch Verunreinigungen durch Proteine festzustellen, wurde zusätzlich bei 280 nm, dem Absorptionsmaximum aromatischer Aminosäuren, gemessen. Das Absorptionsverhältnis der optischen Dichten (OD) 260/280 nm sollte zwischen 1,7 und 2,0 liegen. Werte außerhalb dieser Grenzen deuten auf unreine Proben hin und wurden nicht verwendet.

Berechnung der Konzentration der RNA-Probe:

1 OD_{260} entspricht dabei 40 µg/ml RNA

Konzentration Gesamt-RNA = OD_{260} x 40 µg/ml x 120 (Verdünnungsfaktor)

2.5.1.4 Reverse Transkription

Dieser Schritt führt zum Umschreiben der Gesamt-RNA in cDNA mit Hilfe der reversen Transkriptase. Zunächst wurde folgendes Gemisch an Puffern, Desoxynukleotiden und Primern angesetzt:

Reaktionsansatz für die reverse Transkription

Gesamt-RNA (5 µg)	Volumen entsprechend
10 x PCR-Puffer	5µl
$MgCl_2$ 25 mM	5µl
DTT 0,1 M	1µl
Oligo-dT-Primer	2,5µl
dNTP-Mix (je 10 mM)	2,5µl
Aqua dest. steril.	ad 45µl

Diese Lösung wurde durch Trituration homogenisiert und für 5 min auf 65°C erhitzt. Dies hatte zur Folge, dass die RNA ihre Sekundärstruktur verlor, nach sofortigem Kühlen auf Eis blieb die Primärstruktur intakt. Als nächstes wurden 1 µl RNase Inhibitorlösung sowie 250 U der *Moloney-Murine-Leukemia-Virus*-Reversen Tranksriptase (MMLV-RT) zugegeben und 60 min bei 37°C inkubiert. Die so synthetisierte cDNA Lösung wurde danach kurz auf 95°C erhitzt, um das Enzym zu inaktivieren.

2.5.1.5 Polymerase-Kettenreaktion

Bei der PCR wird, wie bereits beschrieben, ein gewünschter DNA-Abschnitt amplifiziert. Neben der untersuchten LPL-mRNA wurde auch der Gehalt von β-Actin, einem Strukturprotein, überprüft, um die Konformität zu gewährleisten und quantitative Fehler auszuschließen. Die verwendeten Primersequenzen wurden mit BLAST-Search (*Basic local alignment search tool*) überprüft und sind für die jeweiligen Proteine spezifisch.

Es wurde folgender Reaktionsansatz für die PCR verwendet:

cDNA-Lösung	10 µl
Extensor PCR Master Mix	7 µl
1. Primer (10 pM)	5 µl
2. Primer (10 pM)	5 µl

Verwendete Primer:

LPL	→	5´-GGC TCT GCT TGA GTT GTA GA- 3´
	←	5´-TGT TCT GTA GAT TCG CCC AG- 3´
β-Actin	→	5´-ATT TGG CAC CAC ACT TTC TAC-3´
	←	5´-TCA CGC ACG ATT TCC CTC TCA-3´

Die Primersequenzen von LPL und β-Actin haben einen GC Prozentsatz von 50, bzw. 47,6%. Somit wurde für die LPL eine Annealingtemperatur von 60°C, für β-Actin 55°C errechnet. Die Denaturierung erfolgte 30 s lang bei 95°C, die Extension 120 s bei 72°C. Für die Vervielfältigung der DNA betrug die Zahl der Zyklen bei β-Actin und bei der Lipase 25. Bei diesen Konditionen lag die Amplifikation in einer exponentiellen Phase und lieferte somit eine direkte Korrelation zwischen der synthetisierten DNA und der mRNA Menge des untersuchten Proteins.

2.5.1.6 Verifizierung von RT-PCR-Produkten auf dem Agarose-Gel

Das 2%-ige Agarosegel bestand aus 2 g Agarose in 100 ml TBE-Puffer. Die Agarose wurde zunächst im Puffer in der Mikrowelle aufgekocht und blasenfrei in die Gelapparatur eingegossen. Zur Detektion der Nukleinsäuren wurde das Gel mit 50 µg Ethidiumbromid versetzt. Die Färbung mit diesem fluoreszierenden Farbstoff ermöglicht nicht nur eine Visualisierung, sondern auch die semi-Quantifizierung der DNA Menge auf dem Gel. Liegt der Farbstoff frei vor, ist die Emission sehr gering. Erst durch die Interkalierung des Farbstoffs in den Windungen der dsDNA wird die Lichtemission stark erhöht.

Die DNA-Lösungen wurden mit dem Laufpuffer 3 zu 1 vermischt, in die Gelkammer einpipettiert und 1 h bei 100 V elektrophoretisch getrennt. Zur Bestimmung der Fragmentgrößen diente ein DNA-Marker. Später wurden die PCR-Produkte unter einem UV-Licht-Transilluminator (312 nm) sichtbar gemacht. Das Gel wurde mit einer Videokamera fotografiert und digitalisiert.

TBE-Puffer 10 x

Tris	121,1 g
Borsäure	61,8 g
EDTA	7,40 g
Aqua dest.	ad 1000 ml

TBE-Puffer

TBE-Puffer 10 x	100 ml
Aqua dest.	ad 1000 ml

Laufpuffer

Probenpuffer (Blue/Orange Loading Dye 6x)	2 µl
Glycerin	2 µl
Aqua dest.	2 µl

2.5.2 RNA-Interferenz

2.5.2.1 Geschichte und Prinzip der RNA-Interferenz

RNAi beschreibt einen durch dsRNA ausgelösten hochkonservierten Mechanismus zur sequenzspezifischen Stilllegung von Genen. Diese Regulation der Genaktivität über eine Verminderung der RNA-Menge, das sog. RNA *silencing*, wurde in Pflanzen, Pilzen und Tieren unabhängig voneinander beschrieben. Die ersten Beobachtungen bezüglich des Mechanismus der RNAi wurden 1990 von Jorgensen gemacht, als er das Analogon des Gens für die Chalkonsynthase in eine Petunienart einschleuste (Napoli *et al.*, 1990; Jorgensen *et al.*, 1996). Er erhoffte eine Farbintensivierung der Blüten, doch was er zu sehen bekommen hatte war genau das Gegenteil. Die Blütenfarbe wurde blasser, teilweise verschwand sie völlig. Nahezu gleichzeitig beobachtete Cogoni ein ähnliches Phänomen an Brotschimmelpilzkulturen als er die Expression eines Enzyms der Carotinsynthese zu verstärken versuchte und es stattdessen „stilllegte“. Der Begriff der RNAi wurde erstmals 1998 von Andrew Fire und Craig Mellow am Modell von *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) geprägt. Die Arbeitsgruppe konnte damals zeigen, dass eine zu einer endogenen mRNA homologe dsRNA, die in eine Zelle eingebracht wird, zum Abbau der entsprechenden mRNA und damit zur sequenzspezifischen Stilllegung des Gens führt. Mittlerweile wurde dieses Ereignis bei zahlreichen weiteren Organismen, von Trypanosomen bis hin zur lebenden Maus

reproduziert. Derzeit betrachtet man die RNAi als Teil eines übergeordneten RNA *silencing*-Prozesses, dem eine fundamentale Rolle bei der zellulären Genregulation zugewiesen wird (Hannon, 2002). Weiterhin geht man davon aus, dass die RNAi einen Prozess zum Schutz des Genoms vor der Invasion mobiler genetischer Elemente wie z.B. viraler Nukleinsäuren, Transposons oder Transgenen darstellt (Montgomery *et al.*, 1998; Tabara *et al.*, 1999; Waterhouse *et al.*, 2001).

Seit ihrer Entdeckung kommt die Methodik der RNAi im Forschungslabor routinemäßig zur gezielten Inaktivierung von Genen zum Einsatz. Studien über einen Vergleich von RNAi mit der traditionellen *antisense*- Strategie deuten an, dass die RNAi die effektivere Methode ist (Vickers *et al.*, 2003).

Im Gegensatz zu einer dauerhaften Genunterbrechung, die durch den Begriff des *Knockouts* dargestellt wird, ist die Stilllegung des Gens mit der RNAi-Methodik transient, man spricht hier von einem *Knockdown.*

2.5.2.2 Mechanismus der RNA-Interferenz

Der Mechanismus der RNAi ist inzwischen teilweise anhand von genetischen Analysen im Pflanzensystem, aber auch in *C. elegans* und *Drosophila* aufgeklärt. Als Schlüsselenzym wurde die so genannte Dicer RNase III identifiziert. Diese Nuklease spaltet zytoplasmatische dsRNA in 21-23 nt lange Fragmente, welche die eigentlichen Effektoren der RNAi darstellen. Sie werden als *short interfering* RNAs (siRNA) bezeichnet (Harfe *et al.*, 2005). Eine anschließende Phosphorylierung der 5´-Enden der siRNA-Duplexe führt zur Aufnahme dieser in den RNA *induced silencing complex* (RISC). RISC ist ein Protein-Nuklease Komplex, der mit Hilfe des *antisense*- Strangs der siRNA über komplementäre Basenpaarung an die korrespondierende mRNA Sequenz herangeführt wird. Die Spaltung der Ziel-mRNA erfolgt endonukleolytisch in der Mitte des von der siRNA überspannten Sequenzabschnitts. Dieser Abbau resultiert in einer Reduktion der Genexpression und damit in einer Stilllegung der Expression des kodierten Proteins.

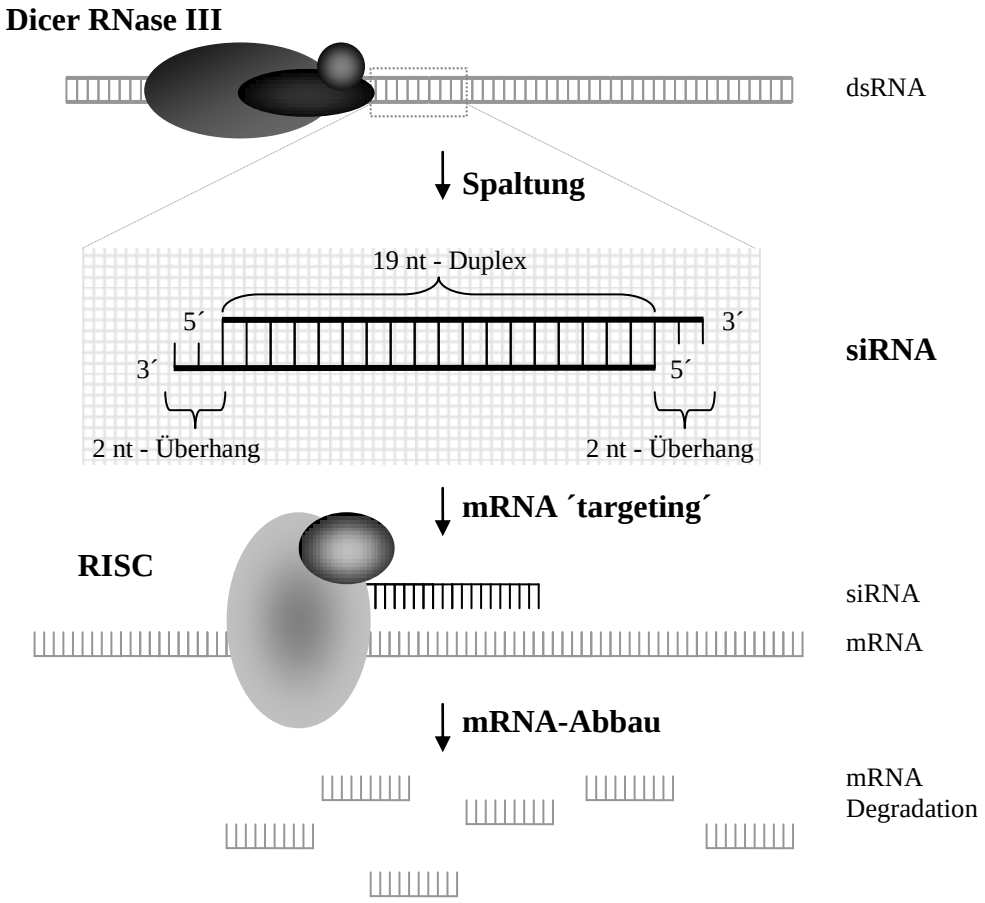


Abb. 2.5-1: Mechanismus der RNA-Interferenz

Die Genstilllegung findet entweder mit chemisch synthetisierten siRNAs statt oder auch neuerdings mit kurzen RNAs mit Haarschleifen, die von Plasmid- oder Virus-basierten Vektoren aus exprimiert werden und durch RISC im Zytoplasma zu funktionellen siRNAs prozessiert werden (Huppi *et al.*, 2005). Obwohl die meisten Untersuchungen *in vitro* durchgeführt wurden, berichten einige neuere Studien über *in vivo* Stilllegung von Genen durch Injektion von synthetisch hergestellten siRNAs (McCaffrey *et al.*, 2002). Auch wurde bereits die Expression der siRNAs von Plasmiden oder viralen Vektoren in Mäusen beschrieben (Rubinson *et al.*, 2003).

Die RNAi-Methode eignet sich hervorragend dafür, Gene stillzulegen, für deren Expressionsprodukte es keine spezifischen Hemmstoffe gibt, so wie z.B. für die PP2C.

2.5.2.3 Auswahl von geeigneter siRNA Sequenz

Die Auswahl der Targetsequenz für die RNAi ist von entscheidender Bedeutung für den Erfolg dieser Methode. Die siRNAs für die LPL wurden von der Firma MWG Biotech,

Ebersberg, bezogen. Das Erstellen der Sequenz erfolgte mit dem *MWG siRNA design tool* auf der Website des Unternehmens (www.mwg-biotech.com). Hier wurden nach verschiedenen Bewertungskriterien mehrere in Frage kommende Sequenzbereiche der LPL aufgelistet. Eine gleichzeitige Überprüfung der Gensequenzen in der BLAST-Datenbank, bezüglich Interaktionen mit anderen Genen, sicherte die Spezifität der siRNAs. Des Weiteren erstellte das Programm eine grafische Darstellung der Zielsequenz der mRNA (Abb. 2.5-2).

Als Sequenz für LPL wurde **5´- CCA GAC UCC AAU GUC A – 3´** ausgewählt. Diese vom Computerprogramm empfohlene Basenpaarung zeigte elf ungebundene Nukleotide in der Sekundärstruktur und eine niedrige negative Bindungsenergie, was mit den gängigen Empfehlungen für die Auswahl effektiver siRNA-Sequenzabschnitte übereinstimmt (Schubert *et al.*, 2005) (Abb. 2.5-2 links). Andere Bereiche der Ziel-mRNA, die z.B. einen Hairpinbereich beinhalten, gehen mit einer reduzierten Effektivität der „Stilllegung“ einher (rechts).

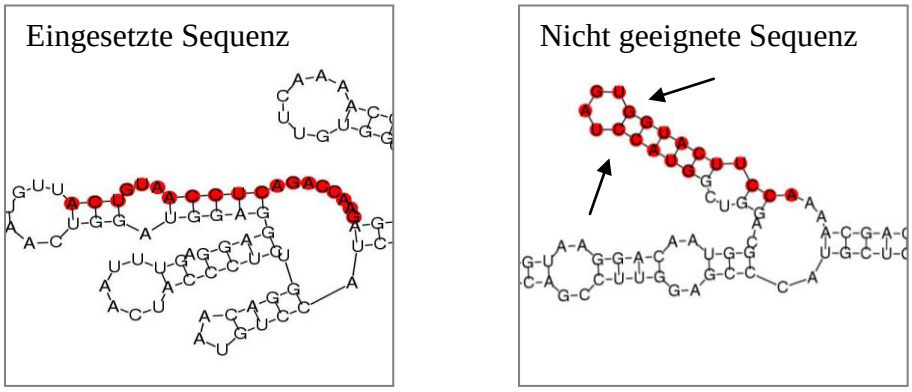


Abb. 2.5-2: Sekundärstruktur der siRNA-Ziel-mRNA von Lipoproteinlipase

Auf der linken Seite ist die Sekundärstruktur des Bereichs der Ziel-mRNA komplementär zur eingesetzten siRNA-Sequenz (eingekreiste Basen) dargestellt. Diese Region beinhaltet elf ungebundene Basenpaare, was mit einer hohen Effizienz und Expressionsreduktion einher geht. Rechts sieht man eine ungeignete Vergleichsstruktur mit einem Hairpinbereich (Haarnadel-ähnlich, Pfeile) und wenigen ungebundenen Basenpaaren. Dieser Bereich der mRNA weist eine hohe Spannungsenergie auf und ist für die RNAi nicht empfehlenswert.

2.5.2.4 Transfektion von siRNA in THP-1-Zellen

Die Transfektion der siRNA erfolgte mit dem kommerziell erhältlichen Oligofectamin der Firma Gibco (Eggenstein). Die Effektivität der Transfektion wurde zunächst mit vollständig ausdifferenzierten Makrophagen, 72 h nach Addition von PMA und bei einer Zelldichte von 10^6 pro Ø 35 mm Schale überprüft. Um Serumreste zu entfernen, wurden die adhärenten Zellen mit OptiMEM gewaschen. Danach erfolgte eine Inkubation der Zellen mit einer Lösung von Oligofectamin in OptiMEM (10 µl/ml) mit siRNA (150 pmol). OptiMEM ist ein

Medium ohne Antibiotikazusätze, diese können den *Silencing*-Mechanismus negativ beeinflussen. Anschließend wurde die LPL-Expression nach verschiedenen Zeitpunkten mittels RT-PCR sowie Western Blot untersucht. Zu jeder Probenentnahme wurden je eine siRNA-behandelte Zellgruppe sowie eine Kontrolle ohne siRNA analysiert. Dies war notwendig, da die Expression der LPL zeitlich nicht konstant war.

Die Schädigungsversuche erfolgten im Zeitfenster der maximalen LPL-Expression in sich differenzierenden THP-1-Zellen. Ziel war es die Proteinsynthese in diesem Bereich zu reduzieren. Da die Proteinexpression bereits nach 12-24 h nach PMA-Zugabe maximal war, wurden zur Untersuchung der optimalen Transfektionszeit die THP-1-Zellen entweder vor, nach oder simultan mit der Zugabe von PMA und β-Mercaptoethanol mit Oligofectamin und siRNA behandelt. Hierfür wurden die THP-1-Zellen in der gleichen Art und Weise, wie zuvor beschrieben, simultan mit siRNA sowie PMA behandelt. Nach 12 und 24 h wurde die LPL-Expression mittels Western Blot gemessen. Die Kontrollzellen wurden auf die gleiche Art und Weise mit Oligofectamin behandelt, jedoch erfolgte hier kein siRNA-Zusatz.

2.6 Lipoproteine

2.6.1 Gewinnung der Blutseren

Das Blut wurde gesunden ambulanten Patienten der Kardiologieabteilung des Universitätsklinikums Marburg in S-Monovetten der Firma Sarstedt entnommen. Nach 30 min Gerinnungszeit bei RT wurden die Proben bei 3000 g 15 min zentrifugiert und das Blutserum im Überstand bei 4°C gelagert.

2.6.2 Trennung der Lipoproteinfraktionen

2.6.2.1 Prinzip der Lipoproteintrennung mittels Ultrazentrifugation

Die Auftrennung der einzelnen Lipoproteinklassen erfolgte mittels sequentieller präparativer Ultrazentrifugation. Das Prinzip dieser Methode beruht auf den unterschiedlichen Sedimentations- bzw. Fluktuationseigenschaften der verschiedenen Blutserumbestandteile. Die Serumlipoproteine, die im jeweiligen Zentrifugationsschritt eine geringere Dichte besitzen als das übrige Serum, flottieren an der Oberfläche und können so gewonnen werden.

Die Dichte der Proben wurde im Anschluss an jeden Zentrifugationsschritt durch Zugabe einer definierten Menge von verschiedenen KBr-Lösungen so variiert, dass schrittweise die verschiedenen Lipoproteinklassen isoliert werden konnten. Bei allen Lipoproteinen wurden die Lipidparameter gemessen. Bis zur Dialyse, die die Fraktionen von KBr befreien sollte, wurden sie unter inerter Stickstoffatmosphäre bei 4°C aufbewahrt.

Zur Anwendung kam eine Ultrazentrifuge der Firma Beckmann (Krefeld; Modell L8-55M) mit entsprechendem Rotor (Beckmann, Krefeld; Modell 50.3 TI bzw. 50.4 TI). Als Probengefäße wurden die *Quickseal* Zentrifugenröhrchen (Beckmann, Krefeld) verwendet. Weiterhin kam die entsprechende Schneidevorrichtung (*tube slicer*; Beckman, Krefeld) zum Einsatz. Die Zentrifugation erfolgte bei einer Temperatur von 4°C unter Hochvakuum bei 49000 rpm.

2.6.2.2 VLDL

VLDL ist die Lipoproteinfraktion mit der geringsten Dichte und ist als erstes isoliert worden. Das Blutserum wurde mit einer Spritze und Kanüle in die entsprechenden Zentrifugenröhrchen aus Kunststoff (Beckmann, Krefeld) zu 5 ml aufgefüllt und mit dem *tube sealer* (Beckmann, Krefeld) luftdicht verschweißt. Nach einer Fixierung der Proben mit *tube spacern* (Beckmann, Krefeld) wurde 18 h bei oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Nach vorsichtiger Entnahme der Röhrchen aus der Ultrazentrifuge konnte der Über- vom Unterstand durch den *tube slicer* abgetrennt, die flottierende VLDL-Fraktion isoliert und der Unterstand zur Gewinnung der IDL-Fraktion eingesetzt werden.

2.6.2.3 IDL

Der untere Teil des Zentrifugats aus dem Schritt zur VLDL-Gewinnung konnte mit einer Spritzennadel gesammelt werden. Zum Spülen der Röhrchen wurde eine Kochsalzlösung mit einer Dichte von 1,006 g/ml benutzt und die Flüssigkeiten in ein neues Zentrifugenröhrchen pipettiert, mit je 188,6 µl einer KBr-Lösung mit der Dichte von 1,35 g/ml aufgestockt und auf 5 ml aufgefüllt. Dieser Schritt erhöhte die Dichte der Serumlösung auf 1,019 g/ml. Als nächstes wurden die Röhrchen, wie bereits beschrieben, versiegelt und in den Rotor eingesetzt. Die Zentrifugationsdauer betrug 18 h, danach erfolgte ebenfalls durch das Schneiden das Abtrennen der flotierenden IDL-Fraktion. Der Rest wurde zur LDL-Gewinnung verwendet.

2.6.2.4 LDL

Der Unterstand aus der IDL-Zentrifugation wurde, wie schon erwähnt, in neue Zentrifugenröhrchen überführt und mit einer KBr-Lösung mit einer Dichte von 1,019 g/ml gespült. Die Erhöhung der Dichte auf 1,063 g/ml für die Isolation der LDL-Fraktion erfolgte durch Zugabe von 740,8 µl einer KBr-Lösung der Dichte 1,35 g/ml. Anschließend wurde mit der Spüllösung auf 5 ml Volumen aufgefüllt und 24 h ultrazentrifugiert. Wiederum wurden die Röhrchen mittels der Schneideapparatur durchtrennt, der Überstand mit der LDL-Fraktion abgetrennt und der verbleibende Teil für die Isolation der HDL-Fraktion verwendet.

2.6.2.5 HDL

Im letzten Zentrifugationsschritt erfolgte die Trennung der HDL-Fraktion von Albumin und anderen Plasmaproteinen. Der Unterstand wurde mit einer Spüllösung einer Dichte von 1,063 g/ml gewaschen und nach Überführung der unteren Fraktion in einen Messzylinder überführt. Durch Nachspülung mit KBr-Lösung der Dichte 1,063 g/ml wurde das Volumen auf einen definierten Wert gebracht. Danach wurden 236 mg festes KBr pro ml zugegeben und durch vorsichtiges Schütteln in Lösung gebracht. Die Probe, die nun eine Dichte von 1,21 g/ml hatte, wurde, wie oben beschrieben, in Zentrifugenröhrchen überführt und versiegelt. Anschließend erfolgte die Ultrazentrifugation für 48 h. Nach diesem letzten Zentrifugationslauf wurden die Röhrchen, wie bereits beschrieben, geschnitten und die flottierende HDL-Fraktion gesammelt. Die lipoproteindefiziente Restmenge konnte als Negativkontrolle eingesetzt werden.

2.6.3 Dialyse der Lipoproteinfraktionen

Durch die notwendigen Dichtevariationen mit KBr kommt es während der präparativen Ultrazentrifugation zu sehr hohen Salzkonzentrationen in den Proben. Um diese unphysiologischen Elektrolyte zu eliminieren, wurden die Lipoproteinfraktionen dialysiert. Das Prinzip der Dialyse beruht auf einer semipermeablen Membran zwischen zwei Lösungen, durch die nur bestimmte Moleküle wandern können. Kleine Ionen und Wasser können diffundieren, die großen Partikel wie etwa Lipoproteine, können die Poren der Membran jedoch nicht passieren. Treibende Kraft bei diesem physikalischen Verfahren ist ein Konzentrationsgefälle zwischen den getrennten Lösungen. Als Dialysat diente eine NH_4HCO_3-Lösung in der Konzentration von 0,01 M. Die Proben wurden in Dialyseschläuche (Spectra/Por; molecularporous membrane tubing; MWCO (*molecular weight cut off*) 6000-

8000; Durchmesser: 14,6 mm (Firma SERVA, Heidelberg)); eingefüllt, die mit Klemmen verschlossen wurden. Es kamen jeweils 5 l der 0,01 M NH_4HCO_3-Lösung zur Dialyse von vier Proben zum Einsatz. Die Dialyse fand für 24 h unter ständiger Durchmischung des Dialysats mittels eines Magnetrührers im Kühlraum bei 4°C statt. Die Dialyselösung wurde sechs Tage lang jeweils zweimal täglich gewechselt, um ein ständiges Konzentrationsgefälle zu gewährleisten. Anschließend wurden die Lipoproteinfraktionen mit Stickstoff begast und bis zur Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

2.6.4 Bestimmung der Lipidparameter in Lipoproteinfraktionen

Folgende Lipidparameter wurden mit der entsprechenden Methode von der Abteilung für präventive Kardiologie am Universitätsklinikum Marburg analysiert:

Parameter	Methode
Cholesterol	CHOD-PAP
Triglyceride	GPO-PAP
Apo B	kinetische Nephelometrie
Apo A-I	kinetische Nephelometrie

Abb. 2.6-1: Lipidparameter der Lipoproteinfraktionen und die benutzte Messmethode

Die Konzentrationenangaben der Lipoproteine in Experimenten wurden folgendermaßen definiert:

Lipoproteinklasse	Konzentration bezogen auf
VLDL	Triglyceride
LDL	Apo B
HDL	Apo A-I

Abb. 2.6-2: Konzentrationsbezug der eingesetzten Lipoproteinklassen

2.7 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Microsoft Excel-Zusatzprogramm Winstat.

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± Standardabweichung (S.D.) aus n Versuchen angegeben. Bei homogenen Varianzen wurde die einfache Varianzanalyse mit nachfolgendem ANOVA und Scheffé-Test durchgeführt. Die Signifikanzniveaus in den Diagrammen sind folgendermaßen dargestellt:

Irrtumswahrscheinlichkeit (p)	Symbol
< 0.05	*
< 0.01	**
< 0.001	***

Abb. 2.7-1: Signifikanzniveaus der eingesetzten Symbole

3 Ergebnisse

3.1 Expression von PP2Cα, PP2Cβ und Bad in HUVECs und THP-1-Zellen

Die Proteinphosphatase 2C (PP2C) kann durch Fettsäuren mit bestimmter Struktur in ihrer Aktivität stimuliert werden. Bad, das proapoptotische Bcl-2-Protein, ist Substrat der PP2C und kann im dephosphorylierten Zustand Apoptose auslösen (Klumpp *et al.*, 2002b; Hufnagel *et al.*, 2005). Zur Untersuchung der Rolle der Fettsäure-induzierten Apoptose sollte sichergestellt werden, dass diese Proteine in HUVECs und THP-1-Zellen exprimiert werden.

3.1.1 Expression von PP2Cα und PP2Cβ

Der Nachweis der PP2C-Isoenzyme erfolgte mit gereinigten polyklonalen Antikörpern gegen diese Enzyme, die freundlicherweise von Frau Prof. Dr. Klumpp zur Verfügung gestellt wurden. Man kann erkennen, dass beide Isoformen in HUVECs (A) sowie in THP-1-Makrophagen (B) exprimiert werden (Abb. 3.1-1). Die Antikörper lieferten ein sehr spezifisches Signal.

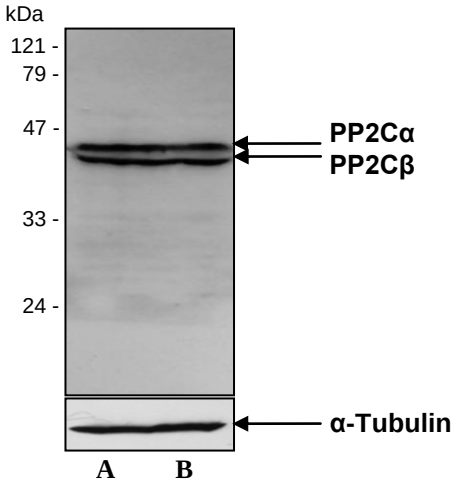


Abb. 3.1-1: Expression von PP2Cα und PP2Cβ in HUVECs und THP-1-Makrophagen

Die Spezifität der Antikörper wurde mit der Immunoblotanalyse von PP2Cα (45 kDa) und PP2Cβ (42kDa) im Zelllysat von HUVECs (A) und THP-1-Makrophagen (B) (72 h Differenzierung mit PMA) untersucht. Beide Antikörper lieferten jeweils nur eine Bande. Für die Darstellung der beiden Isoenzyme im Immunoblot wurden jeweils 40 µg Protein aufgetragen.

3.1.2 Expression von Bad

In früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass das proapoptotische Bcl-2-Protein Bad Substrat der PP2Cα und PP2Cβ ist (Klumpp *et al.*, 2003b). Eine Dephosphorylierung von Bad durch Phosphatasen kann Apoptose induzieren (Zhu *et al.*, 2005). Für die Verifizierung der Arbeitshypothese wurde die Expression des Proteins in HUVECs sowie in THP-1-Zellen untersucht. Hierzu wurde ein monoklonaler, kommerziell erhältlicher Antikörper eingesetzt (Abb. 3.1-2). Das Protein ist in HUVECs (A) und THP-1-Zellen (B und C) detektierbar gewesen. Interessanterweise war die Expression des Proteins in Endothelzellen (A) deutlich stärker ausgeprägt als in Monozyten (B) und Makrophagen (C).

Der Antikörper war sehr spezifisch und lieferte eine einzelne Bande, die Bad (23 kDa) entsprach.

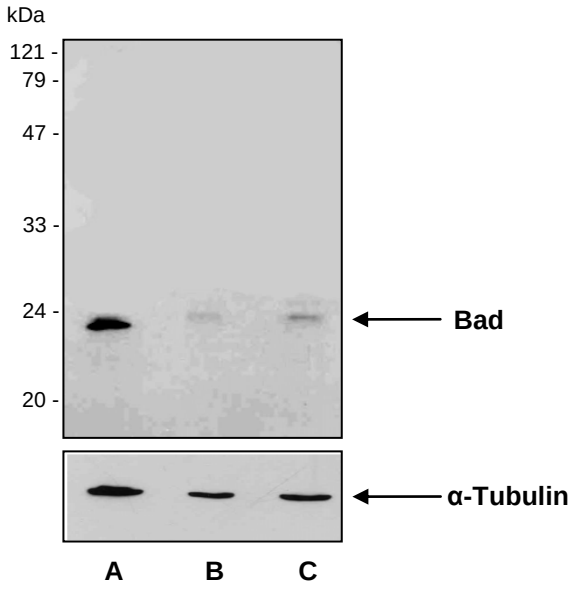


Abb. 3.1-2: Expression von Bad in HUVECs und THP-1-Zellen

Bad kann in HUVECs (A), THP-1-Monozyten (B) sowie THP-1-Makrophagen (72 h Differenzierung mit PMA) (C) nachgewiesen werden. Der Antikörper lieferte nur eine spezifische Bande. Die aufgetragenen Proteinmengen der Zelllysate betrugen jeweils 50 µg.

3.1.3 Immunzytochemische Detektion von PP2Cβ und Bad

Die PP2C dephosphoryliert das proapoptotische Protein Bad *in vitro*. Damit diese Proteine miteinander interagieren können, müssen sie im gleichen Zellkompartiment verfügbar sein. Für den Kolokalisationsnachweis in HUVECs und THP-1-Makrophagen (72 h Differenzierung mit PMA) wurden spezifische Antikörper gegen diese Proteine verwendet,

die bereits im Western Blot getestet wurden (Abb. 3.1-1 und Abb. 3.1-2). Für die immunzytochemische Analyse müssen sie in unterschiedlichen Spezies hergestellt worden sein. Der polyklonale PP2Cβ Antikörper wurde aus dem Kaninchen isoliert, der monoklonale Bad Antikörper aus der Maus. PP2Cβ und Bad waren im Zytosol beider Zellarten kolokalisiert (Abb. 3.1-3 und Abb. 3.1-4), somit ist eine Interaktion dieser Proteine möglich.

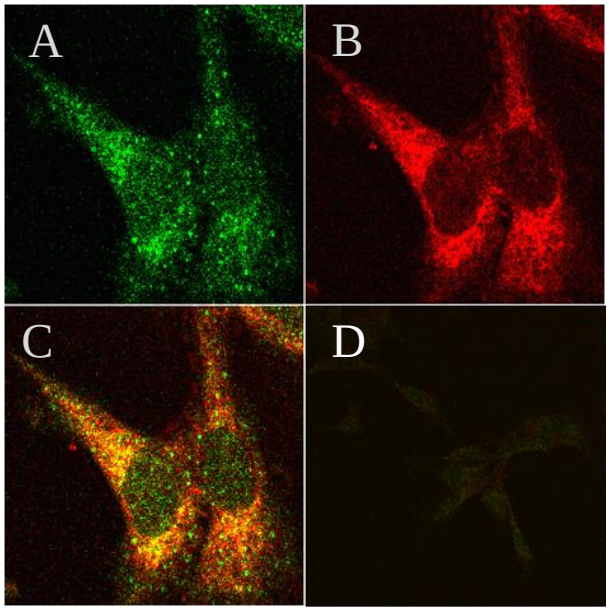


Abb. 3.1-3: Lokalisation von PP2Cβ und Bad in HUVECs

Die immunzytochemische Expressionsdarstellung demonstriert die PP2Cβ sowohl im Zytosol als auch im Zellkern (A), Bad ist ausschließlich im Zytosol der Zelle lokalisiert (B). Eine Überlagerung beider Aufnahmen (C) zeigt die Kolokalisation beider Proteine. Die Negativkontrolle (D) wurde ohne die Erstantikörperbehandlung aufgenommen und belegt die Spezifität des sekundären Antikörpers.

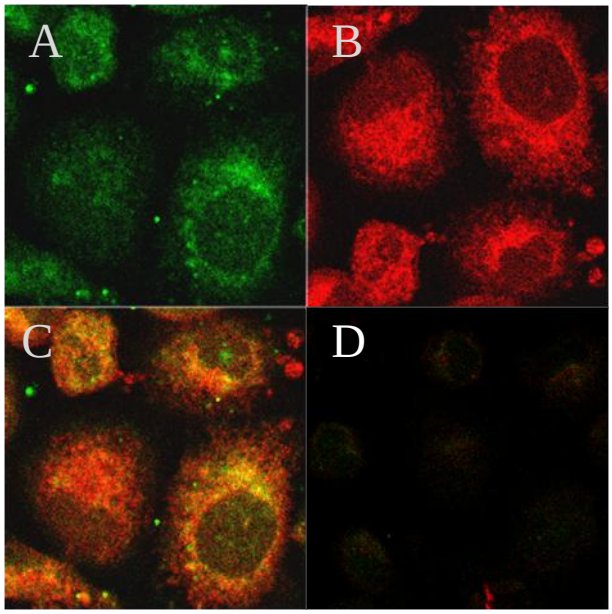


Abb. 3.1-4: Lokalisation von PP2Cβ und Bad in THP-1-Makrophagen

PP2Cβ (A) sowie Bad (B) sind im Zytosol präsent. Dies verdeutlicht die Überlagerung beider Bilder (C). Als Negativkontrolle dient eine Probe ohne die Erstantikörperinkubation (D), sie belegt die Spezifität des sekundären Antikörpers.

3.2 Apoptoseinduktion durch Fettsäuren, Staurosporin sowie Serumentzug

3.2.1 Apoptoseinduktion in HUVECs durch Fettsäuren mit bestimmten Eigenschaften

Es ist gezeigt worden, dass Fettsäuren Apoptose in HUVECs und in neuronalen Zellen auslösen können. Diese Fettsäuren sind gleichzeitig Aktivatoren der PP2C (Klumpp *et al.*, 2002b; Hufnagel *et al.*, 2005). Durch Frau Dr. Schwarz und Frau Dr. Hufnagel konnte ein kausaler Zusammenhang zwischen der Apoptoseinduktion durch Fettsäuren und der Aktivierung der Phosphatase nachgewiesen werden (Schwarz *et al.*, 2006).

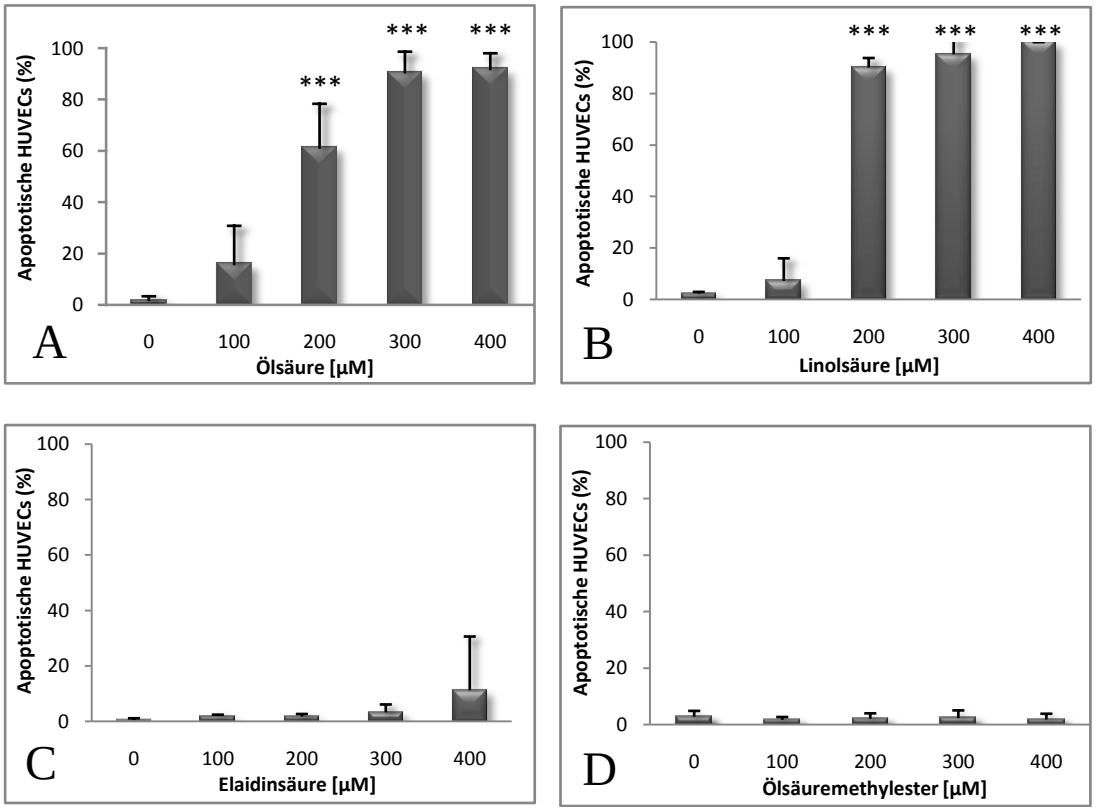


Abb. 3.2-1: Untersuchung der Apoptoseinduktion von ungesättigten Fettsäuren in HUVECs

Ölsäure und Linolsäure aktivieren die PP2C und induzieren den apoptotischen Zelltod. Die *trans*-Variante der Ölsäure, die Elaidinsäure, sowie der Ölsäuremethylester sind nicht in der Lage Apoptose hervorzurufen und aktivieren die PP2C nicht. Dargestellt sind die Mittelwerte der Apoptoserate der HUVECs in Prozent ± S.D.. ***$p < 0{,}001$ im Vergleich zur Kontrolle, die nur mit dem Vehikel behandelt wurde (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

Die Apoptose-auslösenden Fettsäuren haben alle definierte Strukturmerkmale, die für die Aktivierung der PP2C sowie für die Induktion des apoptotischen Zelltodes notwendig sind. Ölsäure (18:1, *cis*-Δ^{9}) und Linolsäure (18:2, *cis*-$\Delta^{9,12}$) aktivieren beide die PP2C und

induzieren den programmierten Zelltod (Abb. 3.2-1 A und B). Elaidinsäure (18:1, *trans*-Δ^9) und der Ölsäuremethylester (18:1, *cis*-Δ^9) entsprechen nicht den Anforderungen zur PP2C-Aktivierung und sind für HUVECs unschädlich (Abb. 3.2-1 C und D).

3.2.2 Apoptoseinduktion in HUVECs durch Staurosporin

Für die geplanten Versuche zur Untersuchung der Zellprotektion sollten Schädigungsmodelle entwickelt werden, die eine moderate Apoptoserate in HUVECs auslösen.

Staurosporin ist ein Proteinkinasehemmstoff, der Apoptose verursacht. Für die Schädigung der HUVECs wurden die Konzentration des Staurosporins (50-300 nM) und die Behandlungsdauer (5 bzw. 21 h) variiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Apoptoserate (Abb. 3.2-2). Das Ergebnis zeigte, dass 50 nM Staurosporin bereits nach 5 h (A) die Zellen signifikant geschädigt hatte, nach 21 h (B) war die Schädigung leicht erhöht. Es konnte beobachtet werden, dass Staurosporin die Zahl apoptotischer Zellen konzentrationsabhängig steigern konnte, während die Vervierfachung der Behandlungszeit nur geringe Auswirkungen auf den Zelltod hatte.

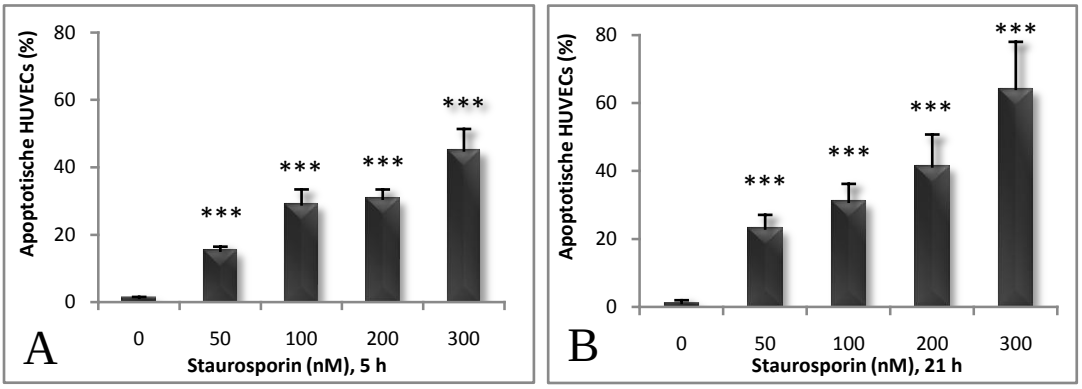


Abb. 3.2-2: Apoptoseinduktion durch Staurosporin

Staurosporin verursacht in geringer Menge massiven Zellschaden. Die Apoptoserate ist sowohl von der Konzentration wie auch von der Behandlungsdauer abhängig. Bereits nach 5 h (A) sind die Zellen durch 50 nM Staurosporin signifikant geschädigt, nach 21 h ist die Schädigung leicht gesteigert (B). Dargestellt sind die Mittelwerte der Apoptoserate der HUVECs in Prozent ± S.D.. ***$p < 0{,}001$ im Vergleich zur Kontrolle ohne Staurosporininkubation (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

3.2.3 Apoptoseinduktion in HUVECs durch Serumentzug

Serumentzug ist eine weitere relativ schonende Methode, um Apoptose zu induzieren. Der Vorteil dieser Schädigung liegt in der guten Steuerbarkeit und vergleichsweise niedriger Apoptoserate. Der Nachteil ist die zeitintensive Behandlungsdauer von mehreren Tagen. Es wurden zwei serumfreie Zellmedien eingesetzt. Einmal das modifizierte, kommerziell erhältliche Endothelzellmedium, das ohne das serumenthaltende *supplement pack* verwendet wurde, sowie das serumfreie OptiMEM. Nach 48 h konnte mit modifiziertem Endothelzellmedium signifikant der apoptotischer Zelltod induziert werden (Abb. 3.2-3 A). Durch die Inkubation der Endothelzellen mit OptiMEM konnte die Apoptose jedoch erst nach 58 h ausgelöst werden (Abb. 3.2-3 B). Es fiel auf, dass die Apoptoserate dann sehr schnell anstieg. Dies könnte sich negativ auf die folgenden Untersuchungen der Zellprotektion auswirken.

Aufgrund der konstanteren und besser kontrollierbaren Schädigung wurde für weitere Versuche zur Apoptoseinduktion durch Serumentzug das modifizierte Endothelzellmedium verwendet.

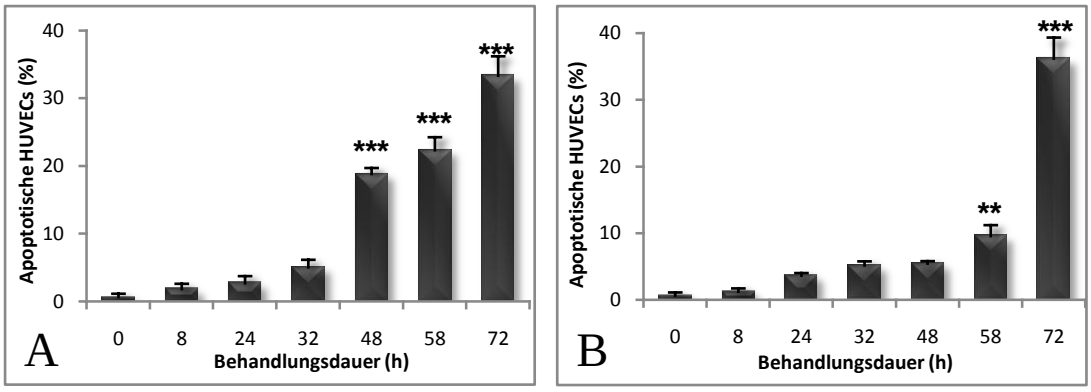


Abb. 3.2-3: Zeitabhängigkeit der HUVECs-Schädigung nach Serumentzug

HUVECs wurden mit serumfreien Medium behandelt und die Apoptoserate bestimmt. Es wurden Endothelzellmedium ohne *supplement pack* (A) sowie das serumfreie OptiMEM (B) als schädigende Agenzien eingesetzt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Apoptoserate der HUVECs in Prozent ± S.D.. **$p < 0{,}01$, ***$p < 0{,}001$ im Vergleich zur serumhaltigen Kontrolle (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

3.3 Kombinationsbehandlungen in HUVECs

3.3.1 Ginkgo biloba Inhaltsstoffe und Ölsäure

Ginkgo biloba wird seit Jahrhunderten als Arzneipflanze verwendet. Es gibt Untersuchungen, die einen neuroprotektiven Effekt der Ginkgo-Inhaltsstoffe belegen (Ahlemeyer *et al.*, 2001a; Ahlemeyer und Krieglstein, 2003; Massieu *et al.*, 2004). Diese Tatsache sollte auch an Endothelzellen überprüft werden. Die Schädigung erfolgte bei allen Gruppen mit 250 µM Ölsäure. Zudem waren die Zellen mit dem Ginkgoextrakt EGb 761 (Firma Schwabe) bzw. den isolierten Inhaltsstoffen Bilobalid, Ginkgolid A und Ginkgolid B inkubiert worden, um deren protektive Eigenschaften zu untersuchen. Die Zellen, die simultan mit EGb 761, Bilobalid und den Ginkgoliden A bzw. B behandelt wurden, zeigten konzentrationsabhängig eine reduzierte Apoptoserate (Abb. 3.3-1). Dabei fällt auf, dass Bilobalid die Zellen erst ab einer Konzentration von 50 µM schützt (B), während Ginkgolid B bereits ab 1 µM hochprotektiv ist (D). EGb 761 (A) bzw. Ginkgolid A (C) führten im Konzentrationsbereich ab 10 µg/ml bzw. 10 µM zu einer signifikanten Reduktion der Apoptoserate.

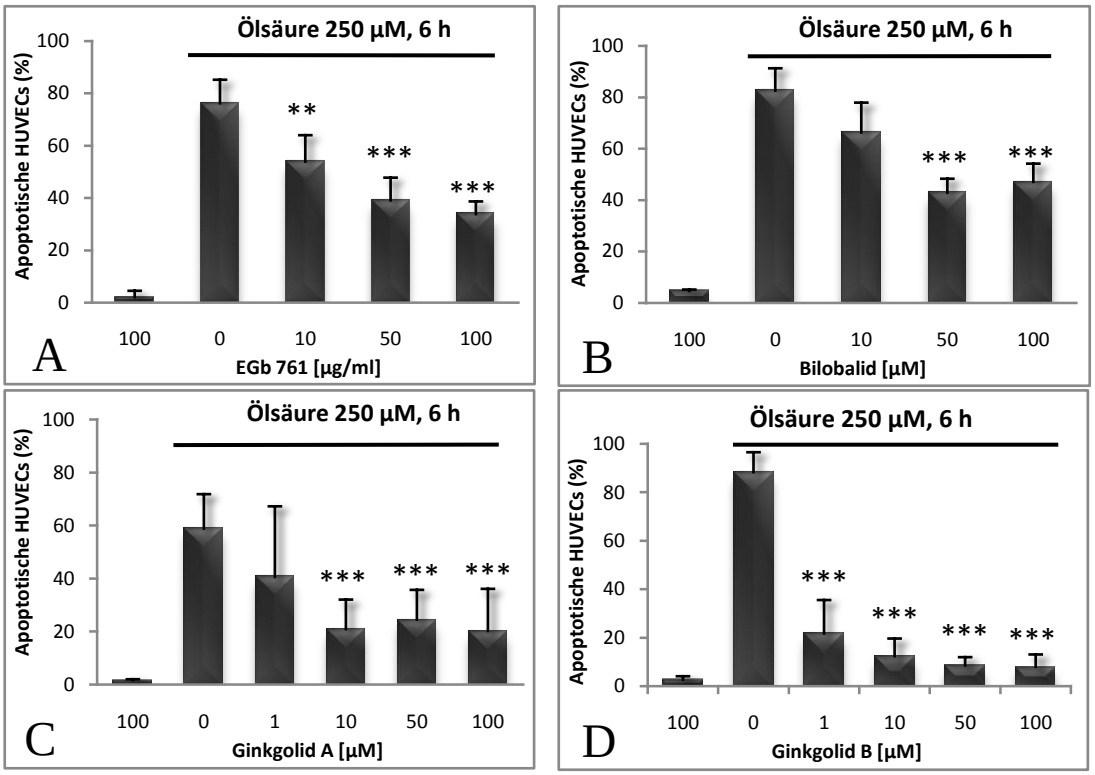


Abb. 3.3-1: Kombinationsbehandlung mit Ölsäure und Ginkgo biloba Inhaltsstoffen

HUVECs wurden mit 250 µM Ölsäure für 6 h geschädigt, simultane Inkubation mit EGb 761 (A), Bilobalid (B), Ginkgolid A (C) und Ginkgolid B (D) reduzierte die Zahl apoptotischer Zellen signifikant und konzentrationsabhängig. Dargestellt sind die Mittelwerte der Apoptoserate der HUVECs in Prozent ± S.D.. **$p < 0{,}01$, ***$p < 0{,}001$ im Vergleich zur Kontrolle, die nur mit dem jeweiligen Ginkgo Inhaltsstoff jedoch ohne Ölsäure behandelt wurde (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

3.3.2 Lipoproteine und Ölsäure

3.3.2.1 Kombinationsbehandlung in HUVECs mit Lipoproteinen und Ölsäure

Das Endothel ist ständig hohen Lipoproteinkonzentrationen ausgesetzt. Die Rolle der einzelnen Lipoproteinfraktionen in der Atherogenese ist sehr unterschiedlich. Während etwa LDL einen Risikofaktor darstellt, ist HDL eine günstige, schützende Größe. Es ist gezeigt worden, dass HDL Endothelzellen vor Apoptose schützen kann (Nofer *et al.*, 2001). Ziel der Versuche war herauszufinden, ob HDL wie auch die anderen Lipoproteinfraktionen zellprotektiv wirken können, wenn Gefäßzellen mit Ölsäure geschädigt werden.

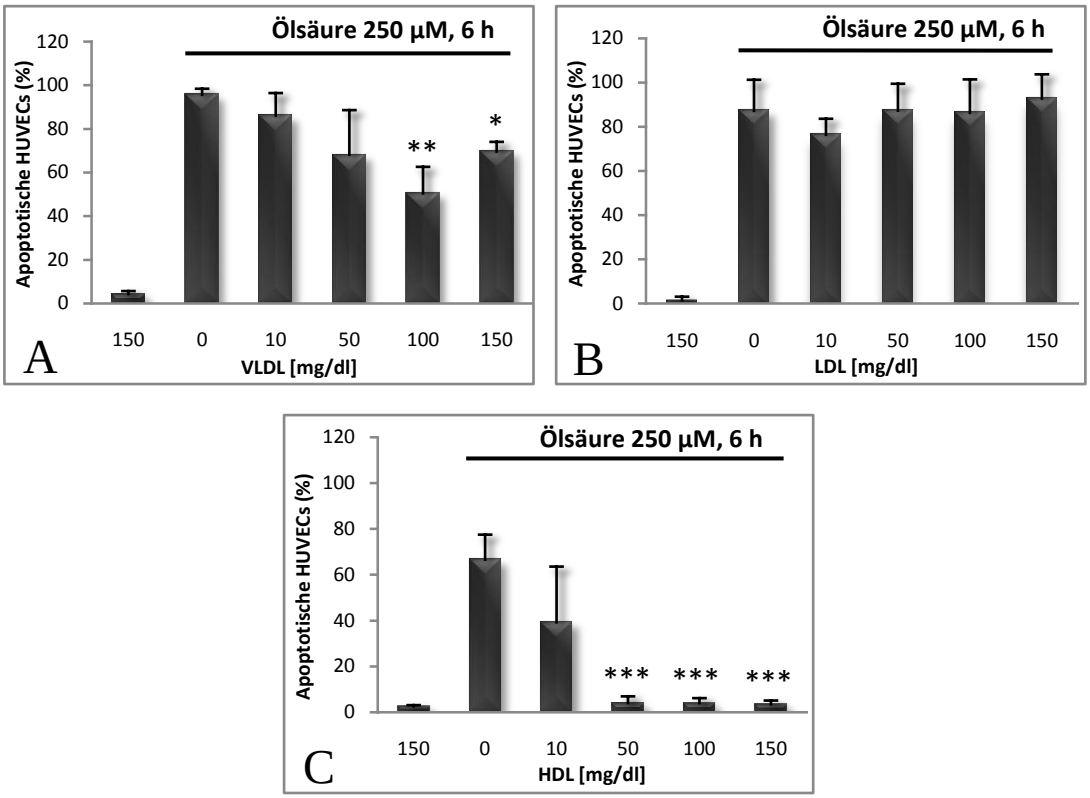


Abb. 3.3-2: Kombinationsbehandlung mit Lipoproteinen und Ölsäure

HUVECs wurden für 6 h simultan mit 250 µM Ölsäure und jeweils VLDL (A), LDL (B) und HDL (C) in verschiedenen Konzentrationen inkubiert. LDL zeigte keine protektiven Eigenschaften, wogegen VLDL und vor allem HDL die Zahl der apoptotischen Zellen konzentrationsabhängig reduzierten. Dargestellt sind die Mittelwerte der Apoptoserate der HUVECs in Prozent ± S.D.. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 im Vergleich zur Kontrolle, die nur mit dem Lipoprotein aber ohne Ölsäure behandelt wurde (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

Dazu wurden die Zellen mit 250 µM Ölsäure und den einzelnen Lipoproteinfraktionen für 6 h inkubiert. Danach erfolgte eine Auswertung der Apoptoserate. LDL zeigte keine protektiven Effekte (B), wogegen VLDL (A) ab einer Konzentration von 100 mg/dl die Apoptoserate reduzierte (Abb. 3.3-2). HDL (C) zeigte bereits ab einer Konzentration von 50 mg/dl einen hochprotektiven Effekt und reduzierte die Zahl toter Zellen bis auf Kontrollniveau.

3.3.2.2 Messung der Lipidaufnahme in HUVECs nach einer Behandlung mit Lipoproteinen und Ölsäure

Es konnte beobachtet werden, dass VLDL und vor allem HDL die Fettsäure-induzierte Apoptose in HUVECs reduzieren konnten. Deswegen wurde vermutet, dass der schützende Effekt dieser Lipoproteine aufgrund einer Ölsäurebindung durch diese Lipide zustande kommt. Um diese Fragestellung zu lösen, wurde die Lipidaufnahme in HUVECs mit Hilfe der Nilblau-Färbung gemessen.

HUVECs wurden für dieses Versuchsvorhaben jeweils mit VLDL, LDL und HDL in Anwesenheit oder Abwesenheit von Ölsäure behandelt. Im Vergleich zu der Negativkontrolle ohne Lipidzusatz, zeigten die Zellen eine hohe Lipidaufnahme nach einer Behandlung mit VLDL und LDL. Die Lipidfärbung nach Inkubation mit HDL zeigte eine niedrige Intensität. Nach einer Simultanbehandlung der Endothelzellen mit verschiedenen Lipoproteinen und 250 µM Ölsäure zeigten alle Zellgruppen eine hohe Lipidresorption. VLDL- und LDL-behandelte Zellen zeigten apoptotische Morphologie, im Gegensatz zu den HDL-behandelten (Abb. 3.3-3). Die mit HDL inkubierten Zellen zeigten jetzt jedoch eine deutliche Lipidaufnahme. Dies konnte nur die Ölsäure sein, denn HDL führte zu keiner Verstärkung der Färbung.

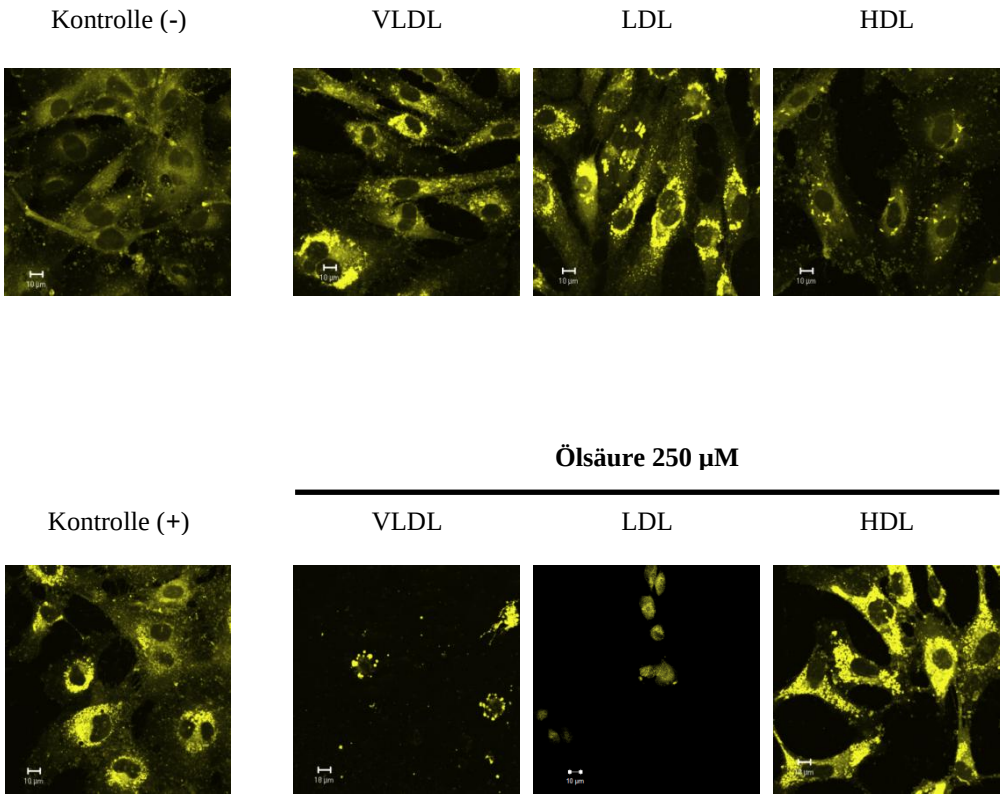


Abb. 3.3-3: Lipidaufnahme in HUVECs nach Behandlung mit Lipoproteinen und Ölsäure

Die Aufnahmen des konfokalen Laserscanningmikrokops belegen, dass Lipide aus VLDL und LDL in großer, aus HDL hingegen nur in geringer Menge resorbiert werden. Die Simultanbehandlung der Zellen mit Lipoproteinen und Ölsäure führte zu einer starken Lipidakkumulation. Dabei zeigten die mit VLDL bzw. mit LDL behandelten Zellen apoptotische Morphologie. Die HDL-Koinkubation mit Ölsäure führte zwar zu einer sehr starken Färbung, die Zellvitalität wurde jedoch nicht negativ beeinflusst. Als Kontrollen dienten normales Medium (-) und 400 µM Elaidinsäure (+), die gut von Endothelzellen aufgenommen wurde, ohne Apoptose auszulösen, verwendet.

3.4 Docosahexaensäure als Zellprotektivum und Zelldestruktivum

Die Rolle von Omega-3-Fettsäuren in der Atherogenese wird allgemein sehr kontrovers diskutiert (Hooper *et al.*, 2004; Ruxton *et al.*, 2004). Im Rahmen dieser Versuchsreihe wurde die DHA bezüglich ihrer Endothelzellprotektion und –destruktion experimentell untersucht.

3.4.1 Docosahexaensäure als PP2C-Aktivator und Apoptoseauslöser

DHA ist eine mehrfach ungesättigte Fettsäure, die alle strukturellen Anforderungen für die PP2C-Aktivierung erfüllt. Untersuchungen *in vitro* belegen eine deutliche Aktivitätssteigerung der PP2C durch DHA (Klumpp *et al.*, 1998). Für Schädigungsversuche wurden HUVECs mit DHA im Konzentrationsbereich zwischen 10 und 200 µM, jeweils im serumfreien und serumhaltigen Zellmedium, über einen Zeitraum von 24 h inkubiert. Endothelzellen wurden bei einer Schwellenkonzentration der Fettsäure signifikant geschädigt. Diese Konzentration war je nach Serumgehalt des Zellmediums unterschiedlich, da es bekannt ist, das Fettsäuren an Proteine, vor allem an Albumin, unspezifisch binden können (Fredrickson und Gordon, 1958). Im serumfreien Medium betrug die Schwellenkonzentration 100 µM DHA (Abb. 3.4-1 B), im normalen, serumhaltigen Zellmedium lag sie mit 200 µM DHA wesentlich höher (Abb. 3.4-1 A).

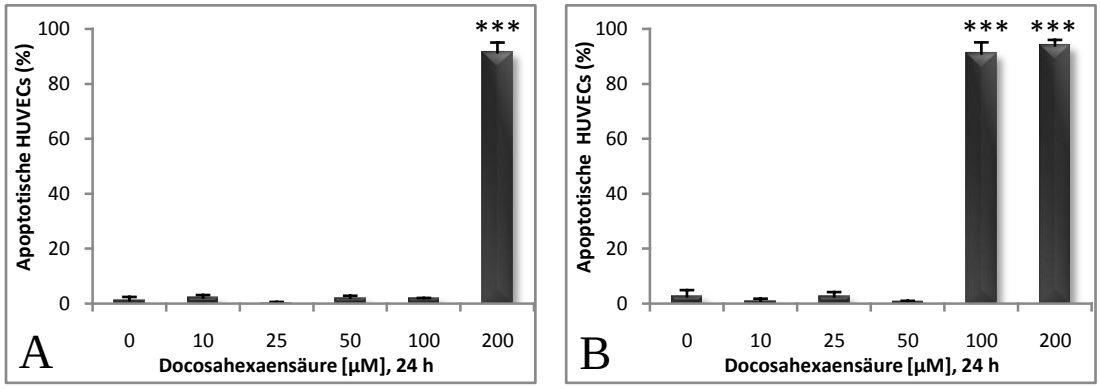


Abb. 3.4-1: Behandlung von HUVECs mit DHA im Medium mit und ohne Serum

DHA schädigte Endothelzellen im serumhaltigen Medium (A) ab einer Konzentration von 200 µM. Im serumfreien Medium (B) erfolgte die Schädigung bereits bei 100 µM. Dargestellt sind die Mittelwerte der Apoptoserate der HUVECs in Prozent ± S.D.. ***$p < 0{,}001$ im Vergleich zur Kontrolle, die nur mit Vehikel behandelt wurde (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

3.4.1.1 Aufnahme der Docosahexaensäure in HUVECs je nach Serumgehalt des Mediums

Mit Hilfe der Nilblau-Hoechst-Doppelfärbung wurde die DHA-Resorption je nach Serumgehalt des Mediums in HUVECs überprüft.

Die Fettsäure wurde jeweils einmal im serumfreien bzw. serumhaltigen Medium gelöst und für 24 h inkubiert. Im serumfreien Medium verursacht DHA in einer Konzentration von 100 µM apoptotischen Zelltod (Abb. 3.4-2 A), während die gleiche DHA-Konzentration im serumhaltigen Medium keine Apoptose auslöst (Abb. 3.4-2 B). Weiterhin kann man beobachten, dass die Färbung der Zellen bei der gleichen DHA-Konzentration im serumfreien Medium stärker ist als im serumhaltigen Medium. Dieses Ergebnis demonstriert anschaulich wie die Fettsäure an Serumbestandteile bindet und somit dem System entzogen wird.

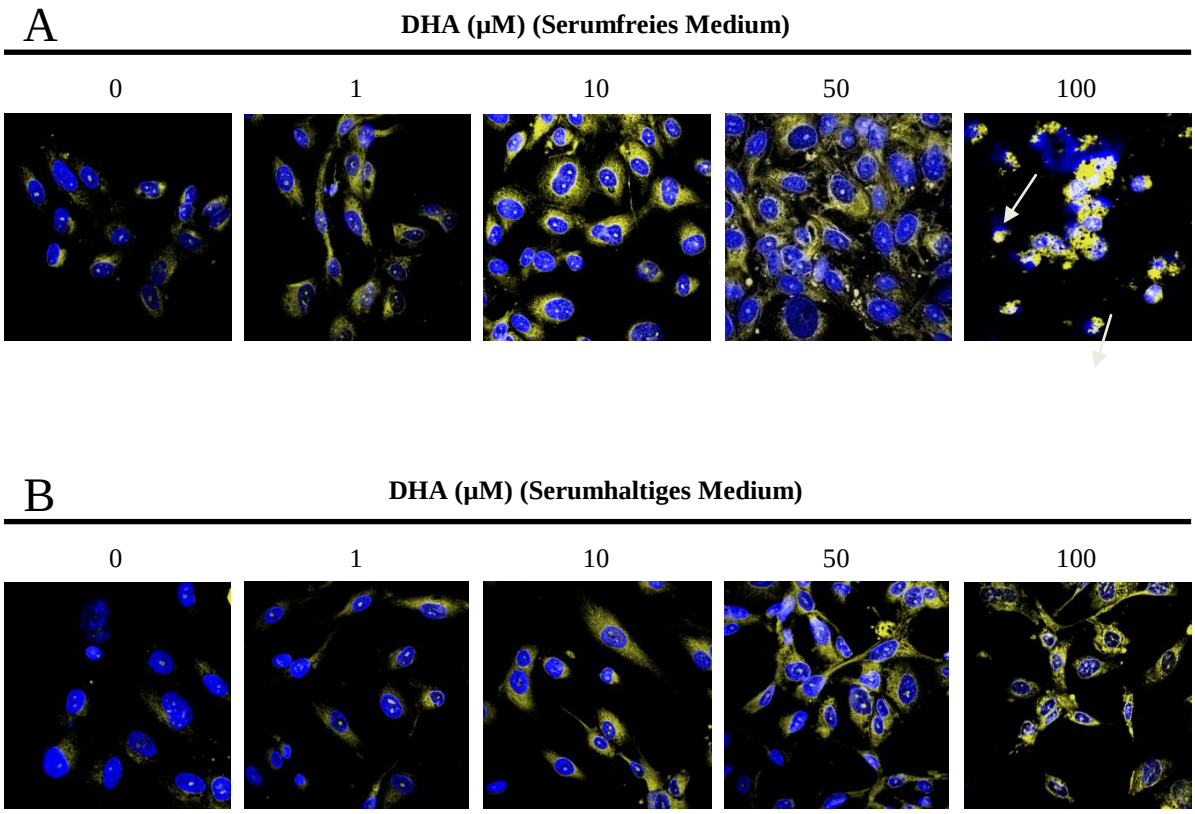


Abb. 3.4-2: Aufnahme der Docosahexaensäure in HUVECs im serumfreien und –haltigen Medium

Konfokale Laserscanningmikroskop-Aufnahmen belegen die Fettsäureaufnahme in die Zelle. 100 µM DHA verursachen im serumfreien Medium Apoptose, was die Morphologie der Zellkerne belegt (Pfeile). Im serumhaltigen Medium kann bei der gleichen Fettsäurekonzentration kein toxischer Effekt beobachtet werden.

3.4.2 Docosahexaensäure als Zellprotektivum

Es ist seit langer Zeit bekannt, dass bestimmte Völker wie etwa die Inuiten, welche einen hohen Fisch- und somit Omega-3-Fettsäurekonsum aufweisen, eine wesentlich niedrigere Herzinfarktinzidenz zeigen als andere Nationen (Das, U. N., 2000). Es stellte sich die Frage, ob dieser schützende Effekt auf eine endothelzellprotektive Eigenschaft der Omega-3-Fettsäuren, vor allem der DHA, zurückzuführen ist.

3.4.2.1 Docosahexaensäure und Staurosporin

Um den zellprotektiven Effekt von DHA zu untersuchen, wurden HUVECs mit der Fettsäure im Konzentrationsbereich von 1-100 µM für 24 h vorbehandelt. Wie in Vorversuchen gezeigt, ist die Staurosporinbehandlung sowie der Serumentzug geeignet schonend Apoptose in HUVECs auszulösen. Zunächst wurde nach der Fettsäure-Vorinkubation mit Staurosporin geschädigt und nach einer Behandlungsdauer von 5-6,5 h die Apoptoserate bestimmt. Es zeigte sich, dass DHA die Apoptoserate reduzieren kann. Interessanterweise war dieser Effekt nur bei bestimmten Konzentrationen zu beobachten. Im serumhaltigen Medium (Abb. 3.4-3 A) war die Protektion bei 50 µM zu beobachten, im serumfreien Medium bereits bei 1-10 µM DHA (Abb. 3.4-3 B). Diese ungleichen Konzentrationen lassen auf eine unterschiedliche freie, also ungebundene Menge der Fettsäure schließen, der vom Serumgehalt des Mediums abhängt.

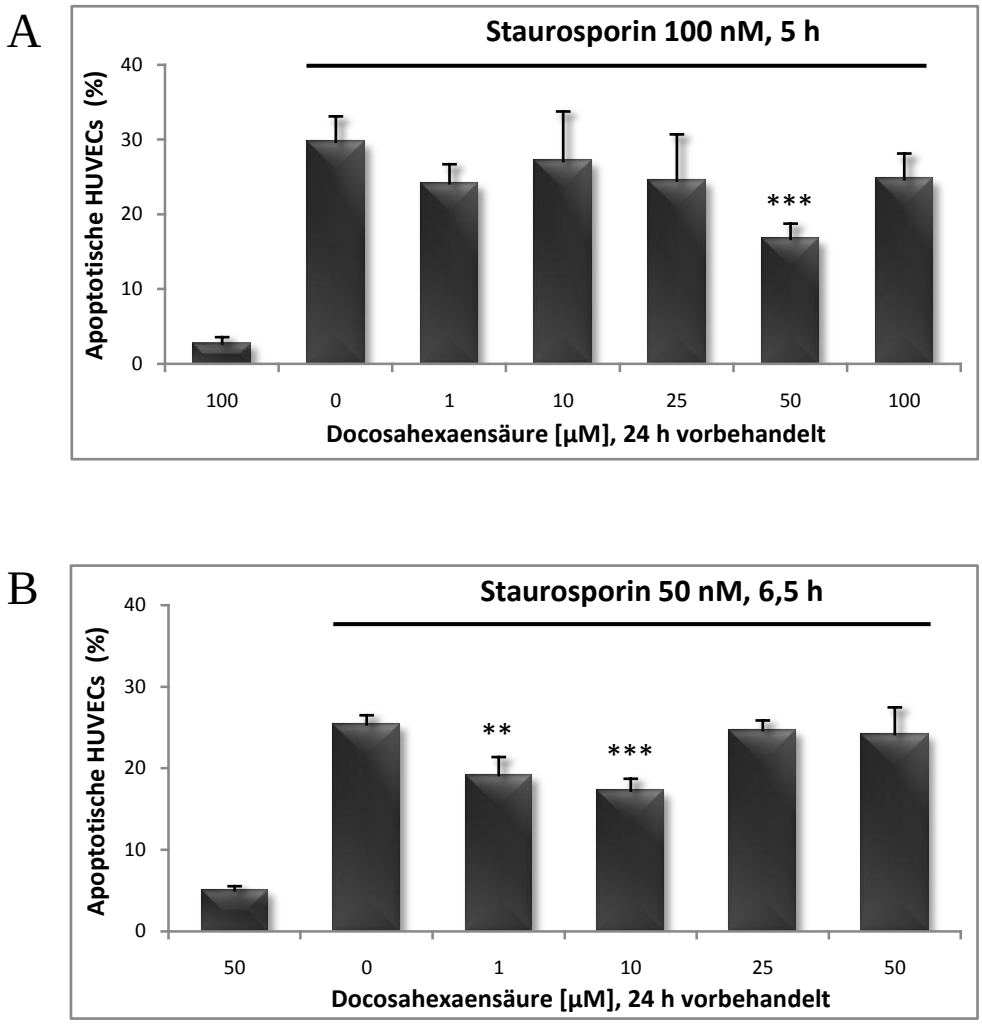


Abb. 3.4-3: Kombinationsbehandlung der HUVECs mit Docosahexaensäure und Staurosporin

Nach 24 h Vorinkubation der Zellen mit DHA wurde Staurosporin zugegeben, um Apoptose auszulösen. Nach 5 bzw. 6,5 h wurde das Ausmaß der Apoptose bestimmt. Dabei zeigte DHA einen signifikant protektiven Effekt, der im serumhaltigen Medium bei 50 µM (A) und im serumfreien Medium (B) schon bei 1-10 µM DHA zu beobachten war. Dargestellt sind die Mittelwerte der Apoptoserate der HUVECs in Prozent ± S.D.. **$p < 0{,}01$, ***$p < 0{,}001$ im Vergleich zur Kontrolle, die nur mit Staurosporin jedoch ohne DHA behandelt wurde (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

3.4.2.2 Docosahexaensäure und Serumentzug

Serumdeprivation ist, wie bereits erwähnt, ebenfalls eine schonende und gut zu kontrollierende Methode, um apoptotischen Zelltod auszulösen. Ziel der experimentellen Untersuchung war es die protektiven Eigenschaften von DHA unter Serumentzug zu analysieren. Hierzu wurden HUVECs mit DHA im serumfreien Medium für 57 h behandelt, anschließend wurde die Apoptoserate bestimmt. Es zeigte sich, dass DHA im niedrigen Konzentrationsbereich von 1 bis 10 µM schützend, dagegen bei höherer Konzentration von 100 µM toxisch für die Zellen war (Abb. 3.4-4).

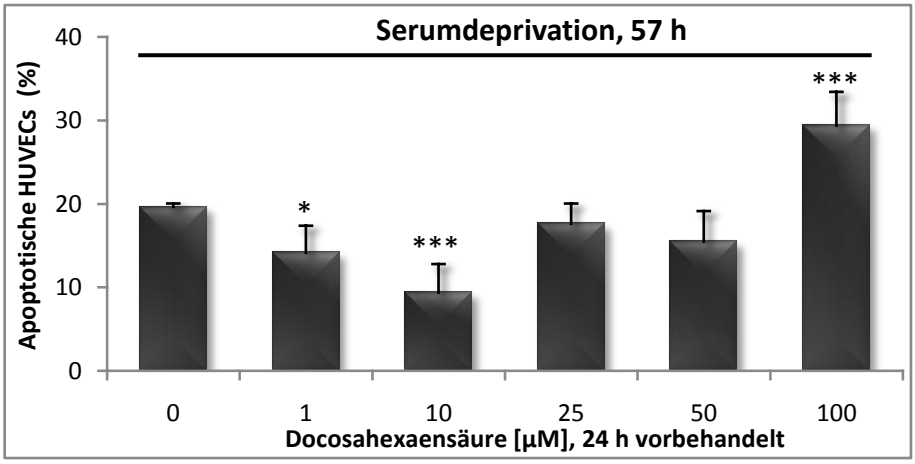


Abb. 3.4-4: Kombinationsbehandlung der HUVECs mit Docosahexaensäure und Serumentzug

Endothelzellen wurden mit DHA im serumfreien Medium für 57 h behandelt. Gruppen, welche mit einer DHA-Konzentration von 1 und 10 µM inkubiert wurden, zeigten eine im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduzierte Apoptoserate. Bei einer DHA-Konzentration von 100 µM war die Zahl der apoptotischen Zellen signifikant erhöht. Dargestellt sind die Mittelwerte der Apoptoserate der HUVECs in Prozent ± S.D.. *$p < 0{,}05$, ***$p < 0{,}001$ im Vergleich zur Kontrolle, die ohne DHA behandelt wurde (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

3.4.3 Kombinationsbehandlung von HUVECs mit Docosahexaensäure und Ölsäure

Im Rahmen der Versuchsreihe zur Untersuchung der Protektion durch DHA sollte auch geklärt werden, ob DHA die Apoptoserate der Endothelzellen ebenfalls reduzieren kann, wenn die Zellen mit Ölsäure geschädigt wurden. Nach einer Vorbehandlung der HUVECs mit DHA in verschiedenen Konzentrationen für 24 h, erfolgte eine Inkubation mit 250 µM Ölsäure und DHA für 6 h. Es wurde deutlich, dass die Apoptoserate der HUVECs durch die Zugabe der Omega-3-Fettsäure nicht reduziert, sondern konzentrationsabhängig erhöht war (Abb. 3.4-5).

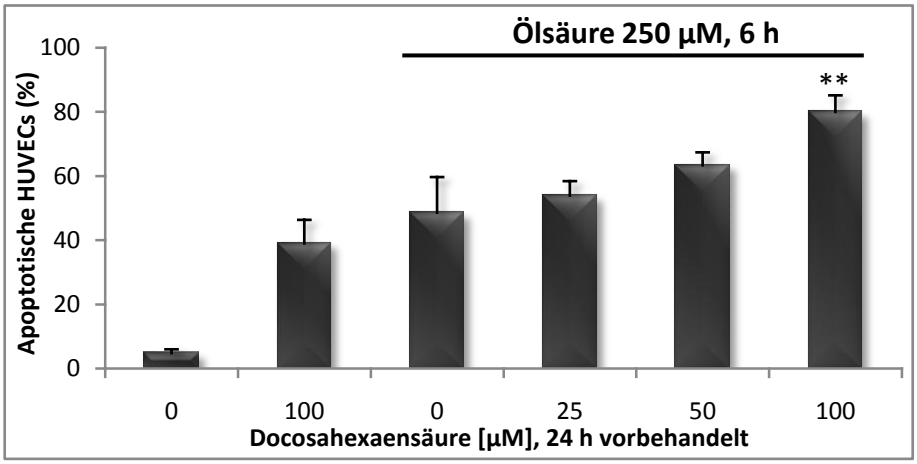


Abb. 3.4-5: Kombinationsbehandlung der HUVECs mit Ölsäure und DHA

Nach einer Vorbehandlung der Zellen mit DHA in verschiedenen Konzentrationen wurden die Zellen mit 250 µM Ölsäure für 6 h inkubiert. Es zeigte sich, dass DHA in Kombination mit Ölsäure die Apoptoserate erhöhte. Dargestellt sind die Mittelwerte der Apoptoserate der HUVECs in Prozent ± S.D.. **$p < 0,01$ im Vergleich zur Gruppe, die nur mit Ölsäure und ohne DHA behandelt wurde (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

3.4.4 Ölsäure als Zellprotektivum

Wie bereits beschrieben, zeigte DHA in niedrigen Konzentrationen Endothelzell-protektive Eigenschaften, während höhere Konzentrationen der Omega-3-Fettsäure die Zellen schädigten. Ziel war zu untersuchen, ob Ölsäure ebenfalls protektiv wirken kann. Dazu wurden HUVECs mit Ölsäure für 24 h vorinkubiert und jeweils durch Serumentzug für 67 h (A) bzw. mit 50 nM Staurosporin (B) für 6 h geschädigt (Abb. 3.4-6). Die Ergebnisse waren eindeutig: die Vorinkubation der Zellen mit Ölsäure konnte, im Gegensatz zur DHA, die Zahl apoptotischer Zellen nicht reduzieren (Abb. 3.4-6).

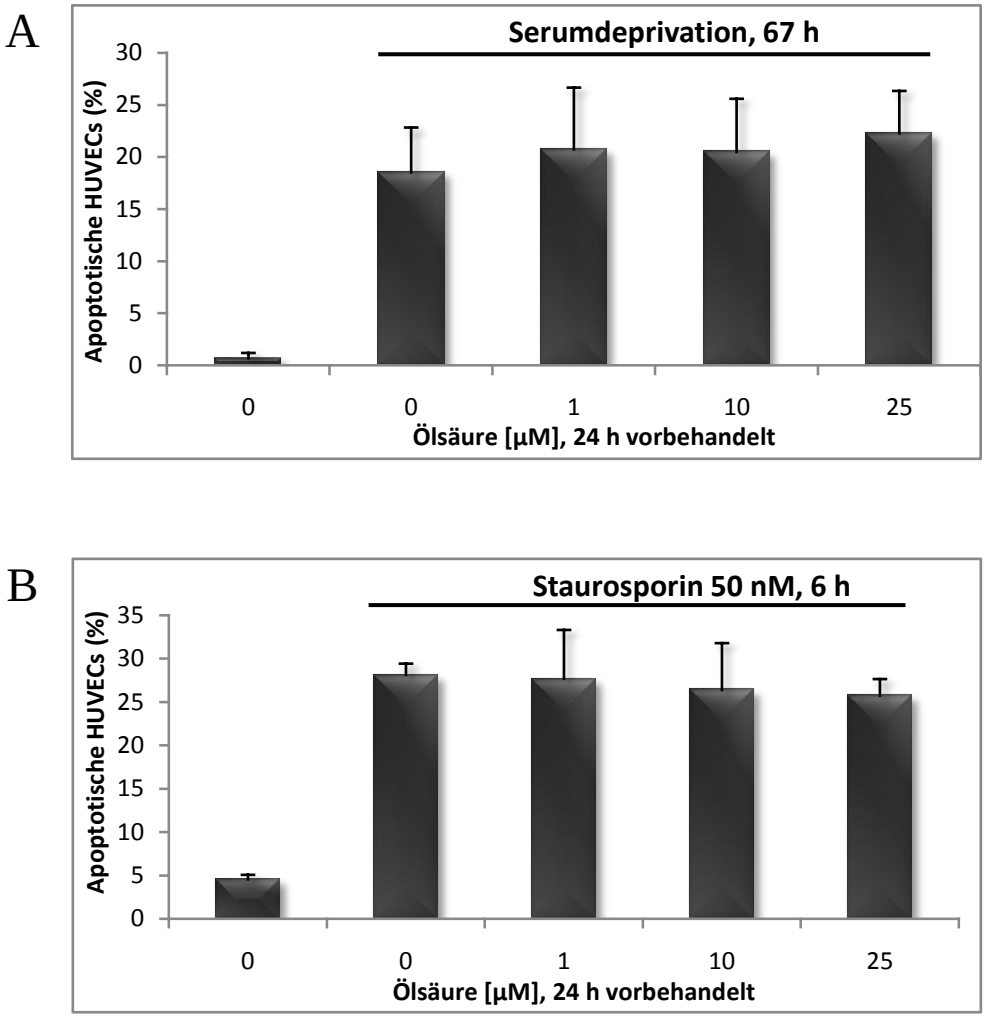


Abb. 3.4-6: Kombinationsbehandlungen der HUVECs mit Ölsäure und Serumentzug bzw. Staurosporin

Endothelzellen wurden mit Ölsäure in verschiedenen Konzentrationen für 24 h vorinkubiert. Danach erfolgte eine Schädigung der Zellen durch Serumentzug für 67 h (A) bzw. durch 50 nM Staurosporin für 6 h (B). Ölsäure war nicht in der Lage die Apoptoserate zu reduzieren. Dargestellt sind die Mittelwerte der Apoptoserate der HUVECs in Prozent ± S.D..

3.5 Untersuchungen zur Apoptoseinduktion durch Fettsäuren aus Lipoproteinen

Es ist bereits gezeigt worden, dass Fettsäuren aus Lipoproteinen die PP2C aktivieren und somit endotheliale Apoptose verursachen können (Hufnagel *et al.*, 2005). Das experimentelle Ziel war es ein definiertes, der Physiologie nahes Zellkulturmodell zu entwickeln, um zu zeigen, dass physiologische Triglyceride aus humanen Lipoproteinen durch die LPL aus kultivierten Makrophagen zu freien Fettsäuren hydrolysiert werden können. LPL ist ein entscheidendes Enzym im humanen Fettsäurestoffwechsel. Das Protein ist für die Freisetzung von Fettsäuren aus Lipoproteinen verantwortlich und somit der regulierende Faktor für den Transport dieser Lipide durch das Endothel.

Es sollte untersucht werden, ob die Menge der freigesetzten Lipide durch LPL aus THP-1-Zellen für eine Schädigung der Endothelzellen ausreichen würde. LPL aus diesen humanen Makrophagen diente dabei als physiologisches Werkzeug für die Freisetzung der Fettsäuren aus Lipoproteinen.

3.5.1 Expression der Lipoproteinlipase

Die LPL findet man an der luminalen Seite vom Endothel, wo das Enzym für die Hydrolyse von Triglyceriden aus Lipoproteinen verantwortlich ist. Interessanterweise findet die physiologische Synthese des Proteins nicht in Endothelzellen statt, sondern in Adipozyten, Myozyten und glatten Muskelzellen. Nach der gängigen Theorie wird also die synthetisierte LPL vom Parenchymgewebe durch das Endothel transloziert und bindet dann an der luminalen Seite an geladene Heparansulfatproteoglykane (HPSG) (Braun und Severson, 1992a). Weiterhin ist bekannt, dass der größte Anteil der LPL in atherosklerotischen Fettstreifen von Makrophagen produziert wird (O'Brien *et al.*, 1992; Babaev *et al.*, 2000). Ziel der Versuche war die Charakterisierung der Lipase-Expression in THP-1-Zellen und HUVECs.

3.5.1.1 Untersuchungen auf mRNA Ebene

Als erstes wurde auf mRNA Ebene untersucht in welchen Zellen LPL exprimiert wird. Hierzu wurde, unter Verwendung von spezifischen Primersequenzen gegen die humane LPL, mit der RT-PCR die Menge an exprimierter LPL-mRNA semiquantitativ gemessen. Es konnte festgestellt werden, dass LPL nicht in HUVECs (A) und nicht in THP-1-Monozyten (C)

synthetisiert wird (Abb. 3.5-1). Jedoch exprimieren THP-1-Makrophagen (B), die sich nach Zugabe von PMA aus THP-1-Monozyten ausdifferenzieren, die Lipase.

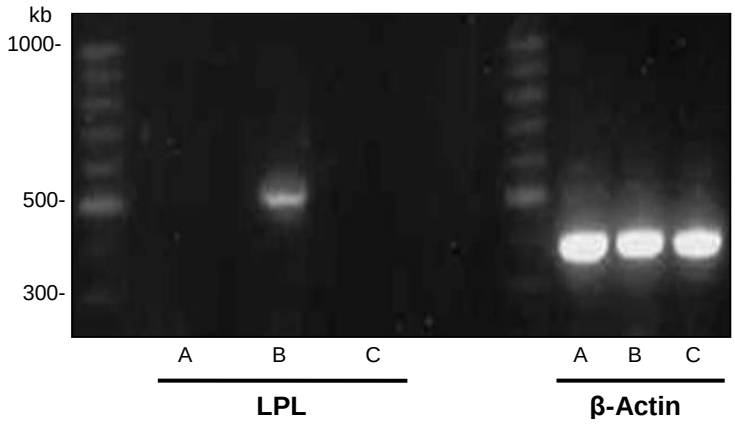


Abb. 3.5-1: Expression der Lipoproteinlipase auf mRNA-Ebene in HUVECs und THP-1-Zellen

Die mRNA der Lipase konnte nur in THP-1-Makrophagen (B) festgestellt werden. HUVECs (A) und THP-1-Monozyten (C) zeigten keine LPL-mRNA. Als Konformitätskontrolle wurde der Gehalt von β-Actin gemessen.

Die Zugabe des Phorbolesters, der eine Differenzierung der THP-1-Monozyten zu Makrophagen induziert, führte zu einer Expressionserhöhung der LPL. Somit war das nächste Ziel zu messen, wie die zeitliche Abhängigkeit der Lipaseexpression in THP-1-Zellen nach Zugabe von PMA war. Hierzu wurde der mRNA-Spiegel der LPL in sich differenzierenden THP-1-Zellen mit RT-PCR gemessen. Es zeigte sich, dass bereits nach 7,5 h die mRNA der LPL deutlich detektierbar war (Abb. 3.5-2).

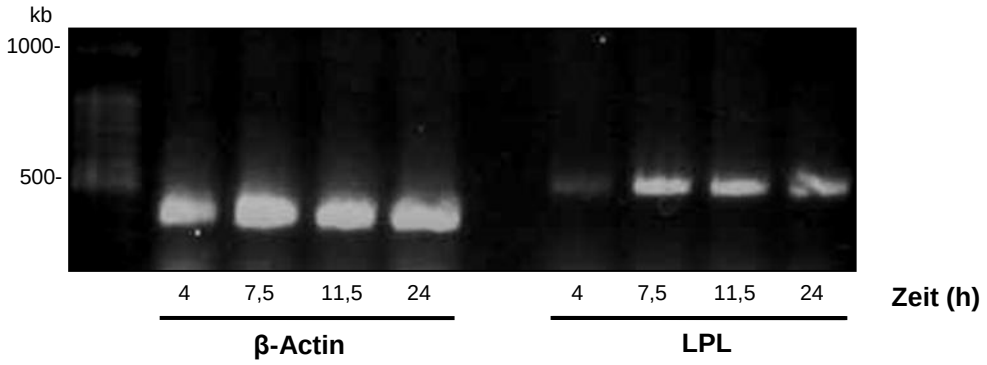


Abb. 3.5-2: Zeitabhängigkeit der Lipoproteinlipase mRNA-Expression in THP-1-Zellen nach Zugabe von PMA

Die Expression der LPL-mRNA in THP-1-Zellen steigt nach Zugabe von PMA und ist bereits nach 7,5 h deutlich messbar. Der β-Actin-Spiegel wurde als Konformitätskontrolle gemessen.

3.5.1.2 Untersuchungen auf Proteinebene

Mit Hilfe des monoklonalen anti-LPL Antikörpers MAb 5D2, der großzügig von Herrn Prof. Dr. Brunzell (University of Washington, Seattle, USA) zur Verfügung gestellt wurde, sollte ebenfalls der LPL-Proteinspiegel analysiert werden. Es sollte die zeitabhängige Expression des LPL-Proteins in sich differenzierenden THP-1-Zellen gemessen und mit Hilfe des Western Blots dargestellt werden. Die nachfolgende Abbildung demonstriert, dass der benutzte Antikörper zwar viele unspezifische Banden darstellt, auf Höhe der LPL bei 55 kDa ist jedoch nur eine Bande zu sehen, die mit Hilfe eines LPL-Antigens verifiziert werden konnte (Abb. 3.5-3). Die Expression der LPL in sich differenzierenden THP-1-Zellen ist nach etwa 9-24 h Inkubation mit PMA maximal. Nach längerer Behandlung mit Phorbolestern wurde der LPL-Spiegel wieder reduziert.

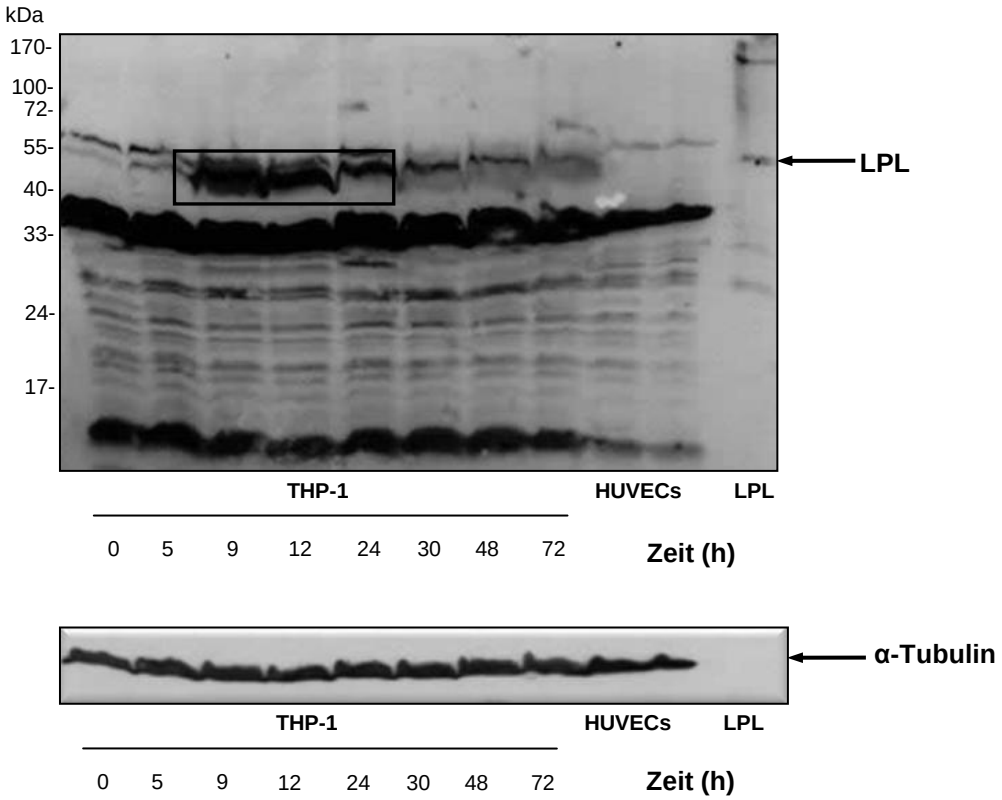


Abb. 3.5-3: Zeitabhängigkeit der Lipoproteinlipase-Expression in sich differenzierenden THP-1-Zellen

Der verwendete Antikörper MAb 5D2 zeigte viele unspezifische Banden. In Höhe des LPL-Proteins (55 kDa) ist jedoch nur ein starkes Signal zu sehen. Die LPL Expression ist maximal nach etwa 9 bis 24 h nach Zugabe von PMA (Viereck). Als Kontrolle (LPL) wurde 0,5 µg bovine LPL aufgetragen. Die Messung von α-Tubulin demonstriert die Auftragung gleicher Proteinmengen. Es wurden jeweils 40 µg Protein verwendet.

Als nächstes sollte untersucht werden, ob THP-1-Makrophagen auch in der Lage sind LPL in ihr Zellmedium abzugeben. Mit Hilfe des Western Blots konnte die LPL sowohl im Zelllysat (C) und als auch im Kulturmedium (M) von sich differenzierenden THP-1-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3.5-4). Erwähnenswert ist, dass das Protein im Medium zu späteren Zeitpunkten (10 h) messbar war im Vergleich zum Zelllysat (8 h).

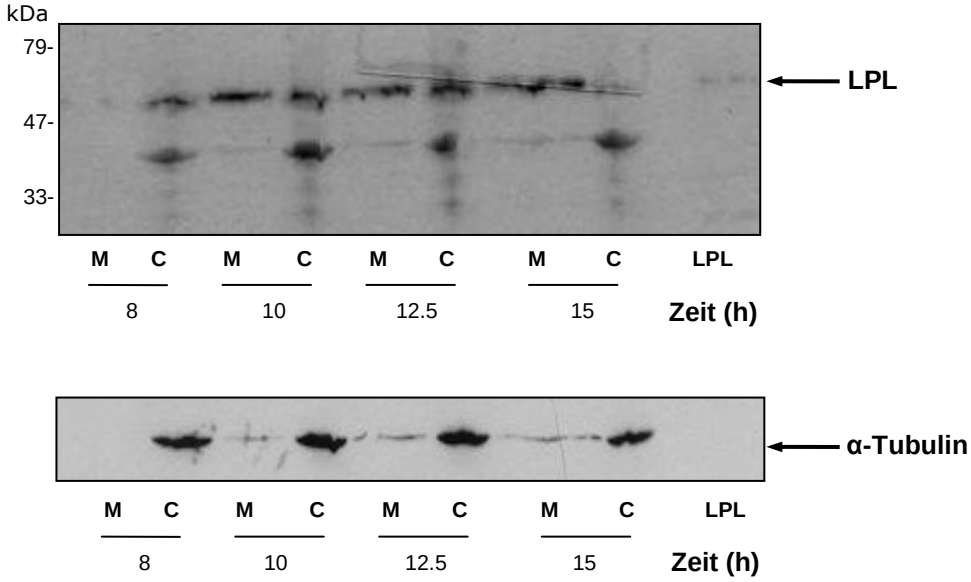


Abb. 3.5-4: Zeitabhängigkeit der Lipoproteinlipase-Expression im Zelllysat und Medium von sich differenzierenden THP-1-Zellen

LPL (55 kDa) ist im Zelllysat von sich differenzierenden THP-1-Zellen (C) und im Zellmedium (M) messbar. Das Protein erscheint im Zellmedium zu einem späteren Zeitpunkt (10 h) als im Zelllysat (8). Als Kontrollen wurden α-Tubulin und 0,5 µg bovine LPL als Antigen verwendet. Es wurden jeweils 20 µg Protein des Zelllysates bzw. 20 µl des Kulturmediums aufgetragen.

3.5.1.3 Untersuchung der Lipoproteinlipase-Expression nach Entfernung von PMA aus dem Zellmedium

THP-1-Monozyten differenzieren zu Makrophagen nach Zugabe von PMA. Weiterhin geben diese Zellen LPL in das Zellmedium ab. In späteren Versuchen sollten Endothelzellen mit Makrophagen in der gleichen Schale kokultiviert bzw. mit deren Zellmedium behandelt werden, um das Zusammenspiel dieser Zellarten näher zu beleuchten. Um unvorhersehbare Effekte seitens des PKC-Aktivators (PMA) an den Endothelzellen zu vermeiden, sollte sichergestellt werden, dass HUVECs während dieser Kokultivierung in keinen Kontakt mit PMA treten. Gleichzeitig sollte aber die Entfernung des Phorbolesters keine negativen Auswirkungen auf den Expressionsverlauf der LPL haben.

Zu Klärung dieses Sachverhaltes sollte das Medium der THP-1-Zellen nach 6 h Differenzierungszeit entfernt werden, um Reste von PMA zu eliminieren. Ziel der experimentellen Untersuchungen war es sicherzustellen, dass dieser Medienwechsel die Expression der LPL in sich differenzierenden THP-1-Zellen nicht beeinflusst. Hierzu wurden zwei Gruppen THP-1-Monozyten mit PMA behandelt und infolge einer Zeitabhängigkeit die LPL-Expression mittels Western Blot gemessen. Bei der ersten Gruppe (A) wurde nach 6 h PMA-Behandlung das Medium gewechselt, bei der zweiten nicht (B). Es zeigte sich, dass die LPL-Expression durch das Entfernen von PMA nicht sichtbar beeinflusst wurde (Abb. 3.5-5). Somit konnte vor dem Kokultivieren der THP-1-Zellen mit HUVECs das PMA-haltige Medium entfernt werden, ohne einen Einfluss auf die Expression der Lipase zu nehmen.

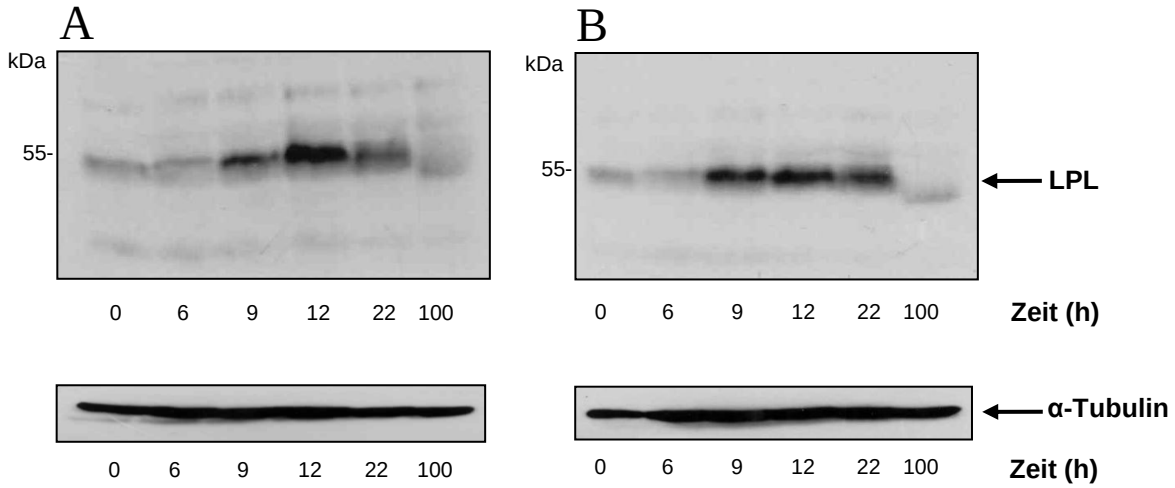


Abb. 3.5-5: Lipoproteinlipase-Expression in sich differenzierenden THP-1-Zellen mit und ohne Wechsel des Mediums

Die zeitabhängige LPL-Expression in sich differenzierenden THP-1-Zellen war in Gruppen, in denen nach 6 h PMA-Behandlung das Medium entfernt worden war (A), nicht anders als in Zellen ohne diesen Medienwechsel (B). Zur Kontrolle der Konformität diente die Messung von α-Tubulin. Zur Darstellung wurden jeweils 50 µg Protein aufgetragen.

3.5.1.4 Immunzytochemische Untersuchungen

Die mit Hilfe der RT-PCR gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass LPL in Makrophagen, jedoch nicht in Endothelzellen exprimiert wird. Nun sollte überprüft werden, ob mit dem MAb 5D2-Antikörper die Lokalisation der Lipase bestimmt werden kann. Ferner sollte untersucht werden, ob der Antikörper zwischen zusammenkultivierten THP-1-Zellen und HUVECs differenzieren kann.

Für die Untersuchung der lokalen Expression der LPL in HUVECs, THP-1-Makrophagen sowie in der direkten Kokultur beider Zellen nebeneinander, wurden mit Hilfe des konfokalen Laserscanningmikroskops immunzytochemische Aufnahmen gemacht. Der Antikörper zeigte zwar im Western Blot eine geringe Spezifität, führte jedoch bei der ICC zu einer Färbung von Makrophagen aber nicht von Endothelzellen (Abb. 3.5-6).

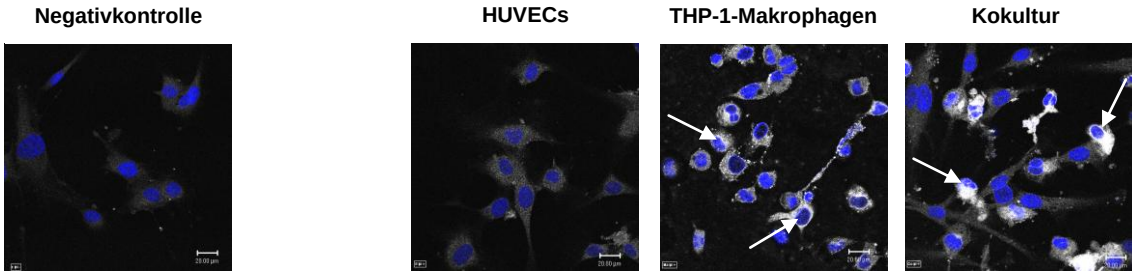


Abb. 3.5-6: Lokalisation der Lipoproteinlipase in HUVECs, THP-1-Makrophagen und in der Kokultur

Die LPL-Hoechst-Doppelfärbung von Endothelzellen demonstriert eine geringe Färbung der HUVECs im Vergleich zu THP-1-Makrophagen. In der direkten Kokultur sind die runden Makrophagen (Pfeile) deutlich stärker gefärbt als die konvexen HUVECs. Die Negativkontrolle wurde ohne den Primärantikörper behandelt, um Eigenfluoreszenz des Zweitantikörpers auszuschließen.

3.5.2 Untersuchungen zur Translokation der Lipoproteinlipase

Es ist akzeptiert, dass die in Parenchymzellen exprimierte LPL durch das Endothel hindurch transloziert und dort an der luminalen Seite der Gefäße bindet, um Lipide zu hydrolysieren. Um die Rolle der LPL in der endothelialen Apoptose zu untersuchen, war das experimentelle Ziel dieses Versuches die Translokation des Proteins von den THP-1-Makrophagen auf die HUVECs nachzuweisen.

Dazu sollten Endothelzellen mit Makrophagen kokultiviert bzw. mit deren Medium inkubiert werden, um danach zu untersuchen, ob die Lipase transloziert wurde.

3.5.2.1 Untersuchung der Lipoproteinlipase-Translokation nach Behandlung der HUVECs mit Makrophagenmedium

Endothelzellen wurden mit LPL-haltigem Medium von THP-1-Zellen, die unterschiedlich lange mit PMA behandelt wurden, inkubiert. Nach 1 h wurden die Proben mit PBS gewaschen, das Zelllysat gesammelt und mit Hilfe des Western Blots analysiert. Der Waschschritt sollte unspezifisch gebundene Lipase entfernen. Bei einer Fotofilm-Belichtungszeit von 45 min zeigten selbst unbehandelte HUVECs (0 h) ein Signal bei 55 kDa (Abb. 3.5-7 A). Wie zuvor beschrieben, dürfte dieses Signal nicht da sein, denn Endothelzellen exprimieren keine LPL. Diese Zellen produzieren jedoch ein anderes verwandtes Enzym, die endotheliale Lipase (EL). Das Protein vermag zwar kaum Triglyceride zu hydrolysieren, ist jedoch auf Aminosäurenebene relativ homolog zur LPL (44%). EL hat etwa die gleiche molare Masse wie die LPL und ist im Immunoblot ebenfalls wie LPL bei 55 kDa detektierbar (Choi, S. Y. *et al.*, 2002b). Scheinbar erkennt der MAb 5D2-Antikörper auch die EL, was die Untersuchung erschwerte. Zur Lösung dieser Problematik wurde folgender Denkansatz geschaffen:

Es ist zu vermuten, dass die Expression der EL in HUVECs konstant ist. Wenn der Antikörper sowohl die EL als auch die LPL erkennt, dann sollte die Differenz des Signals der Endothelzellen, die mit Makrophagenmedium behandelt wurden und den unbehandelten Zellen (0 h) der translozierten LPL-Menge entsprechen.

Um im Western Blot ein Signal zu bekommen, das allein der LPL entspricht, wurden unterschiedliche Belichtungszeiten des Fotopapiers angewendet. Die Zeit wurde so variiert (15 min) (Abb. 3.5-7 B), dass die Bande in unbehandelten HUVECs (0 h) gerade nicht erkennbar war. Theoretisch würde dann jede Zunahme des Signals auf dieser Höhe der translozierten LPL-Menge entsprechen. HUVECs, behandelt mit dem Makrophagenmedium, zeigten jedoch keine Veränderung dieser Bande. Die Analyse der behandelten Endothelzellproben demonstrierte, dass die LPL-Expression in HUVECs nicht messbar erhöht wurde. Als Positivkontrolle diente Zelllysat von sich differenzierenden THP-1-Zellen.

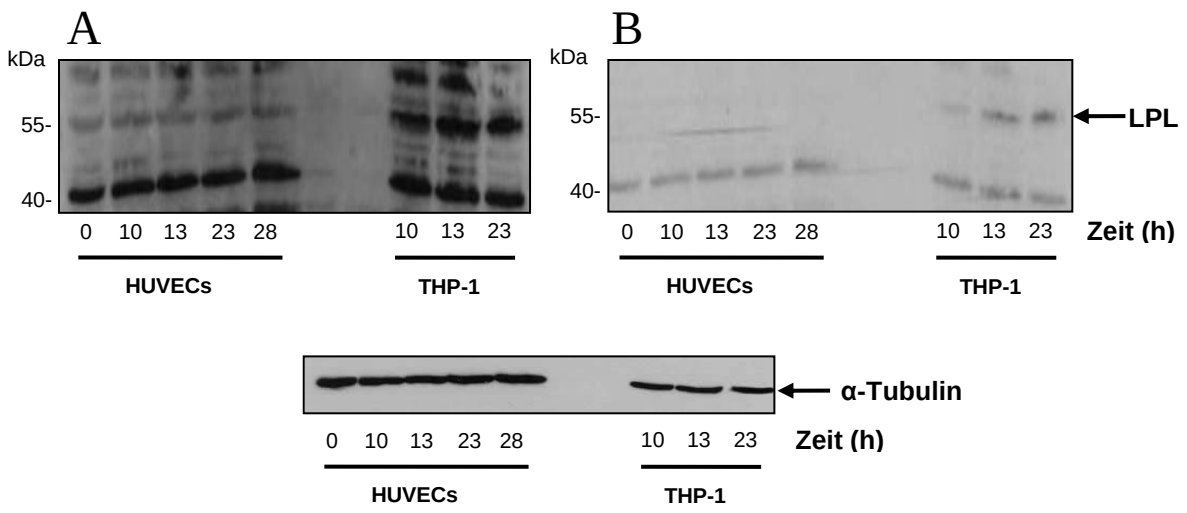


Abb. 3.5-7: Translokation der Lipoproteinlipase nach Behandlung mit Makrophagenmedium

HUVECs wurden für je 1 h mit LPL-haltigem Medium von Makrophagen, die unterschiedlich lange mit PMA differenziert wurden, inkubiert. Nach einem Waschschritt wurde die Expression der LPL in HUVECs mittels Western Blot untersucht. Als LPL-Kontrolle diente Zelllysat von sich differenzierenden THP-1-Makrophagen (55 kDa). Es konnte keine Veränderung der Bande beobachtet werden. Die Belichtungszeit betrug 45 min (A) bzw. 15 min (B). Zur Kontrolle gleicher Proteinmengen diente die Messung von α-Tubulin. Es wurden jeweils 30 µg Protein aufgetragen.

3.5.2.2 Untersuchung der Lipoproteinlipase Translokation nach Kokultivierung von HUVECs mit Makrophagen

HUVECs, die mit LPL-reichem Makrophagenmedium behandelt wurden, zeigten keine LPL im Western Blot. Im nächsten Schritt sollte analysiert werden, ob LPL von THP-1-Zellen zu kokultiverten HUVECs translozieren kann. Der Vorteil der Kokultur im Vergleich zu der Inkubation nur mit dem LPL-haltigen Medium bestand darin, dass die Lipase hier ständig neusynthetisiert werden konnte. Die Kokultur von HUVECs und sich differenzierenden THP-1-Zellen fand im gleichen Kompartiment und in der gleichen Schale statt, wobei beide Zellarten als separate *Monolayer* kultiviert wurden (Abb. 2.2-4). Nach bestimmten Zeitpunkten, in denen Lipase im Medium bereits vorhanden war (10 bis 28 h) (Abb. 3.5-3 und Abb. 3.5-4), wurden HUVECs mit PBS gewaschen, das Zelllysat gesammelt und mit der Western Blot Methode untersucht (Abb. 3.5-8).

Bei einer Belichtungszeit von 45 min (A) zeigten, wie bereits beschrieben, selbst unbehandelte HUVECs (0 h) ein Signal bei 55 kDa, was auf die in HUVECs vorhandene EL zurückzuführen ist. Dagegen entsprach bei einer Belichtungszeit von 15 min (B) die Bande der translozierten LPL-Menge. Während der Analyse der Endothelzellproben zeigte sich, dass HUVECs mit der Länge der Behandlungsdauer in der Kokultur eine erhöhte Expression der

LPL aufwiesen. Die Signalstärke der Bande der kokultivierten HUVECs war jedoch im Vergleich zu Banden der Makrophagen, die als Positivkontrolle verwendet wurden, vergleichsweise gering.

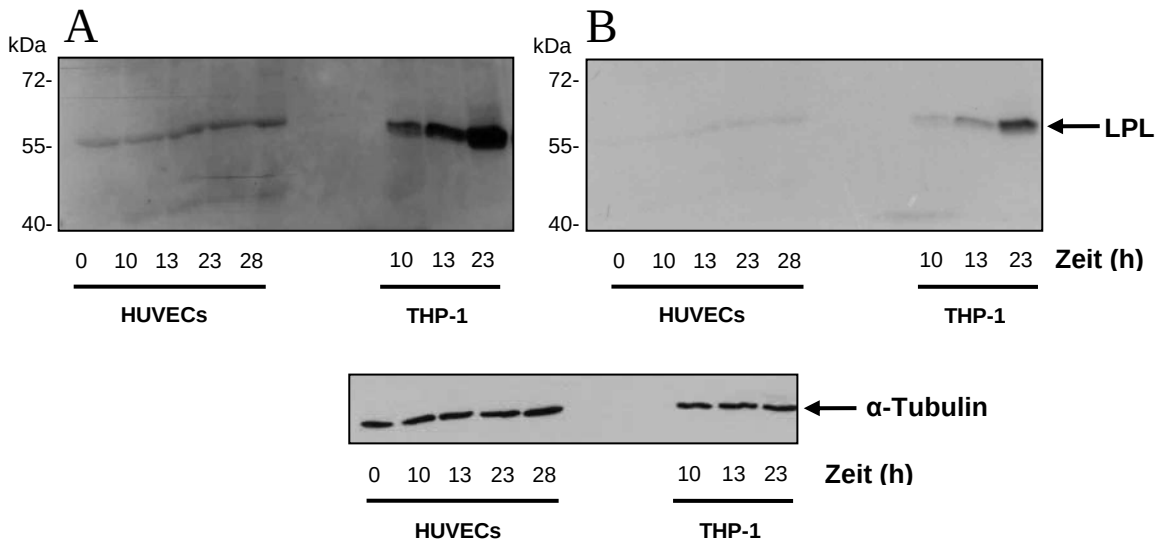


Abb. 3.5-8: Translokation der Lipoproteinlipase in der Kokultur

HUVECs wurden mit THP-1-Makrophagen kokultiviert. Nach 10 bis 28 h Behandlungsdauer mit PMA wurden die Zelllysate mit dem Western Blot untersucht. Das Signal auf Höhe der LPL in HUVECs steigt mit Dauer der Behandlungszeit in der Kokultur (55 kDa). Als Kontrolle dienten monokultivierte Endothelzellen (0 h HUVECs). Die Belichtungszeit des Fotopapiers betrug 45 (A) bzw. 15 min (B). Die Kontrolle der Konformität erfolgte durch die Messung von α-Tubulin. Es wurden 30 µg Protein aufgetragen.

3.5.3 Schädigung der Endothelzellen durch VLDL und Lipoproteinlipase

Es konnte bereits demonstriert werden, dass Fettsäuren, freigesetzt aus Lipoproteinen durch eine exogen zugesetzte Lipase, in der Lage waren die PP2C zu aktivieren und Apoptose in Endothelzellen auszulösen (Hufnagel *et al.*, 2005). LPL ist das zentrale Enzym, das für die Freisetzung von Fettsäuren aus Lipoproteinen im Organismus verantwortlich ist. Die Frage war, ob diese Triglycerid-Hydrolyse durch die Makrophagen-LPL ebenfalls in dem Umfang erfolgen kann, um Apoptose in HUVECs zu induzieren. Zur Klärung dieses Sachverhaltes sollte das etablierte, der Physiologie nahe Kokulturmodell dienen (Abb. 2.2-4). Davor sollten jedoch einige grundlegende Experimente durchgeführt werden.

3.5.3.1 Schädigung der HUVECs mit VLDL und Lipoproteinlipase

Anfangs wurden kultivierte HUVECs mit physiologischen VLDL-Konzentrationen mit und ohne exogen zugesetzte Lipase behandelt und nach einer Inkubationszeit von 24 h die Apoptoserate untersucht. Es wurden zwei kommerziell erhältliche Lipaseenzyme verwendet, eine Form aus *Pseudomonas ssp*. und die bovine LPL. Die Lipase aus der Pseudomonas-Art ist mit der humanen LPL nicht verwandt, lediglich die enzymatische Reaktion, bei der aus Triglyceriden freie Fettsäuren gespalten werden, ist identisch. Dagegen ist die Aminosäuresequenz der bovinen Form sehr homolog zum humanen Enzym und ist ein gängiges Werkzeug zur Untersuchung der physiologischen Bedeutung von LPL.

Zunächst sollte untersucht werden, ob die beiden Lipasen in der Lage waren Fettsäuren aus VLDL freizusetzen, die HUVECs schädigen könnten. In diesem Experiment ging es darum den Effekt der Fettsäuren aus Lipoproteinen zu untersuchen, weswegen die benutzen Enzyme in unphysiologisch hohen Dosen eingesetzt wurden.

Wie bereits publiziert, konnte natives VLDL in physiologischer Konzentration die Vitalität der Endothelzellen nicht negativ beeinflussen. Die Simultanbehandlung von Endothelzellen mit VLDL und LPL von *Pseudomonas ssp.* löste in HUVECs nach 24 h Apoptose aus (Abb. 3.5-9), dieses Ergebnis wurde bereits gezeigt (Hufnagel *et al.*, 2005). Weiterhin ist ersichtlich, dass bovine LPL ebenfalls Triglyzeride aus VLDL spalten konnte und dadurch eine massive Apoptoseinduktion in Endothelzellen auslöste (Abb. 3.5-9).

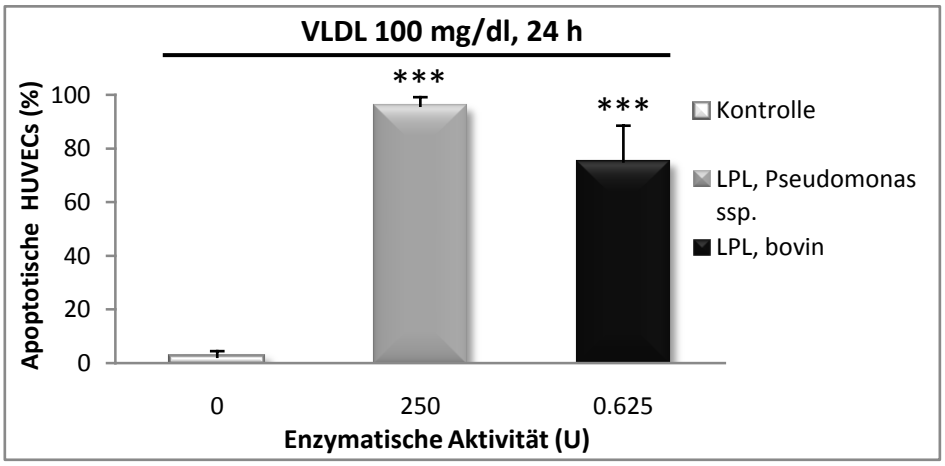


Abb. 3.5-9: Schädigung der HUVECs mit VLDL und Lipasen

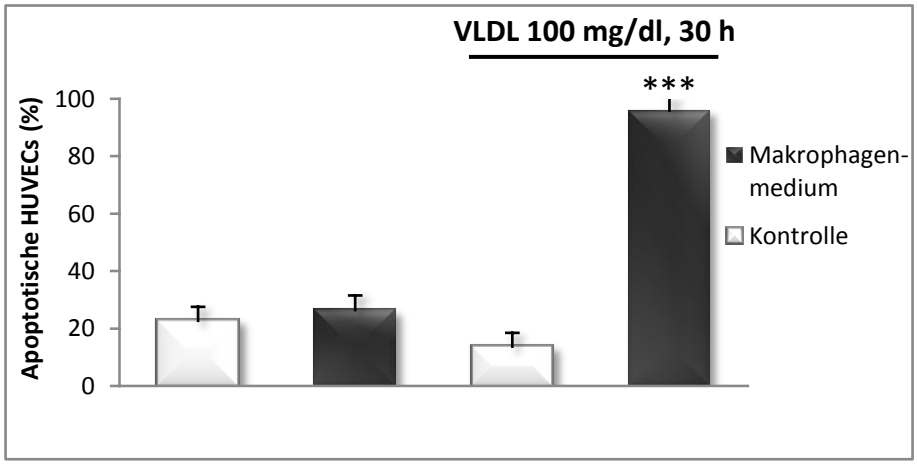
Physiologische VLDL-Konzentrationen hatten keine negativen Auswirkungen auf die Vitalität von HUVECs. Die Kombination von VLDL und Lipase verursachte nach 24 h Behandlungszeit Apoptose. Dargestellt sind die Mittelwerte der Apoptoserate der HUVECs in Prozent ± S.D.. ***$p < 0{,}001$ im Vergleich zur Kontrolle, die nicht mit LPL behandelt wurde (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

3.5.3.2 Schädigung der HUVECs mit VLDL und Lipoproteinlipase-haltigem Makrophagenmedium

In vorherigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass exogen zugesetzte LPL in der Lage war Triglyceride aus Lipoproteinen zu hydrolysieren, was Apoptose in HUVECs auslöste (Hufnagel *et al.*, 2005). In Arterien, wo sich Atherosklerose manifestieren kann, wird die größte Menge an LPL von Makrophagen synthetisiert (Yla-Herttuala *et al.*, 1991; O'Brien *et al.*, 1992; Babaev *et al.*, 2000). Somit war das experimentelle Ziel dieses Versuchsvorhabens, wie bereits erwähnt, zu zeigen, dass LPL von diesen Zellen in der Lage ist Lipoproteine zu spalten und somit genügend ungesättigte Fettsäuren freisetzen kann, um Endothelzellen zu schädigen. Hierzu wurden THP-1-Monozyten mit PMA und β-Mercaptoethanol zum Differenzieren gebracht. THP-1-Zellen produzieren LPL, wobei die maximale Expression nach etwa 9-12 h erreicht wird (Abb. 3.5-3). Um eine möglichst große Menge an LPL zu erhalten, wurde das Medium von sich differenzierenden THP-1-Zellen 12 h nach Zugabe von PMA entnommen, mit physiologischen VLDL-Konzentrationen angereichert und danach auf die HUVECs gegeben. Es stellte sich heraus, das VLDL im LPL-reichen Makrophagenmedium für die Zellen hochtoxisch war, obwohl beide Substanzen für sich alleine von den Endothelzellen gut vertragen wurden (Abb. 3.5-10 A). Um zu sehen, dass die unterschiedlichen Effekte nicht auf einer unterschiedlichen Lipidaufnahme beruhen, sollte mit der Nilblaufärbung die aufgenommene Fettmenge sichtbar gemacht werden. Es zeigte sich,

dass Endothelzellen alleine bei der Behandlung mit VLDL eine große Menge Lipide aufnahmen, dieses jedoch gut tolerierten. Die gleiche Konzentration an VLDL im Makrophagenmedium führte ebenfalls zu einer massiven Lipidaufnahme, aber jetzt mit der Folge des apoptotischen Zelltodes (Abb. 3.5-10 B).

A



B

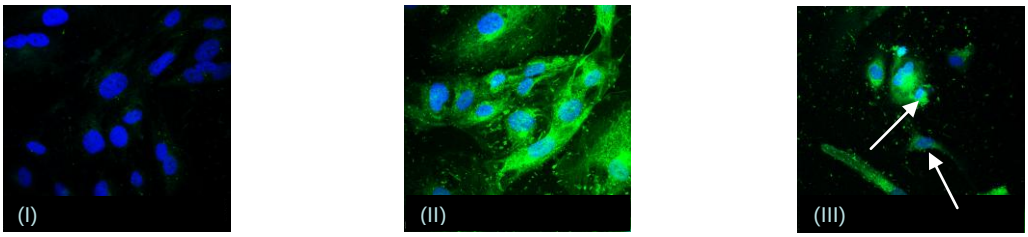


Abb. 3.5-10: Schädigung der HUVECs mit VLDL im Makrophagenmedium

(A) HUVECs wurden mit dem Zellmedium von sich differenzierenden THP-1-Zellen nach 12 h PMA-Inkubation für 30 h behandelt. Die Zugabe von VLDL zu diesem Medium führte zu einer massiven Apoptoserate von Endothelzellen. Dagegen hatten die gleichen VLDL Konzentrationen im Kontrollmedium sowie das Makrophagenmedium alleine keine große Auswirkung auf die Vitalität der HUVECs. Dargestellt sind die Mittelwerte der Apoptoserate der HUVECs in Prozent ± S.D.. ***$p < 0{,}001$ im Vergleich zur Kontrolle, die mit VLDL behandelt wurde (Varianzanalyse, Scheffé-Test).
(B) Die Nilblau-Hoechst-Doppelfärbung demonstriert sehr anschaulich die Lipidaufnahme und die apoptotische Zellkernmorphologie (Pfeile) nach Behandlung der HUVECs mit VLDL in Makrophagenmedium (III). VLDL alleine erhöht zwar die Lipidakkumulation (II) schädigt die Zellen jedoch nicht. Das Zellmedium der Makrophagen hat ebenfalls keinen Einfluss auf die Vitalität der HUVECs (I).

3.5.3.3 Schädigung der HUVECs mit VLDL in der Kokultur mit Makrophagen

Es konnte gezeigt werden, dass VLDL im Makrophagenmedium für HUVECs schädlich war. Um die beobachteten Effekte der Fettsäure-induzierten Apoptose weiter zu untersuchen, sollten die Endothelzellen und sich differenzierende THP-1-Zellen im gleichen Zellkultursystem zusammen gezüchtet werden.

Für die Etablierung der Schädigung mit VLDL wurden beide Zellen als separate *Monolayer* im gleichen Kompartiment kokultiviert (Abb. 2.2-4). Gleichzeitig wurde dem Medium VLDL in der Konzentration von 100 mg/dl für 16 h zugesetzt. Im Anschluss folgte eine Analyse der Apoptoserate der Endothelzellen. Es konnte festgestellt werden, dass die Kokultivierung der Endothelzellen mit Makrophagen bzw. die Zugabe von VLDL in der Monokultur der HUVECs jeweils keine Zellschädigung auslöste. Dagegen induzierte VLDL in der Kokultur nach 16 h signifikant den apoptotischen Zelltod in Endothelzellen (Abb. 3.5-11). Interessanterweise erfolgte die Schädigung der Endothelzellen in der Kokultur (16 h) wesentlich schneller als mit Makrophagenmedium (30 h) (Abb. 3.5-10).

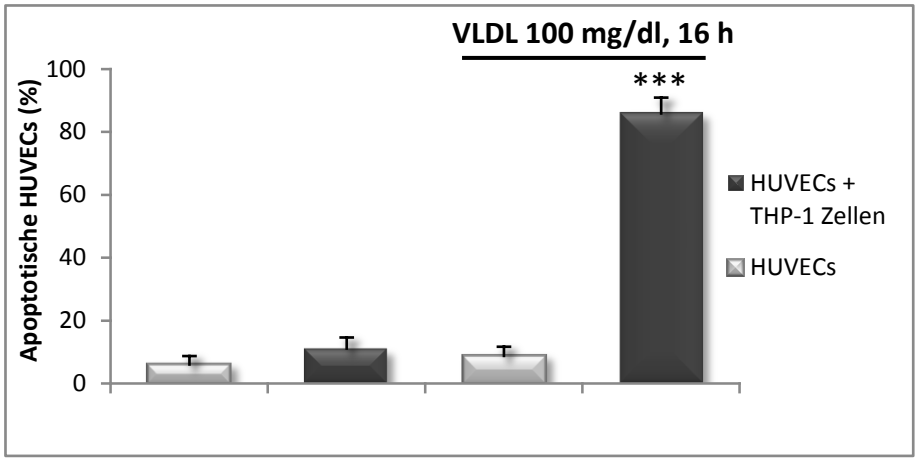


Abb. 3.5-11: Schädigung der HUVECs mit VLDL in der Kokultur mit Makrophagen

VLDL in der HUVECs-Monokultur bzw. die Kokultivierung alleine schädigten die Endothelzellen nicht. Die Zugabe von 100 mg/dl VLDL in der Kokultur führte zu einer massiven Schädigung der HUVECs. Dargestellt sind die Mittelwerte der Apoptoserate in Prozent ± S.D.. ***$p < 0{,}001$ im Vergleich zur Kontrolle, die mit VLDL behandelt wurde (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

3.5.3.4 Untersuchung des Einflusses der VLDL-Konzentration während der Schädigung von HUVECs in der Kokultur mit Makrophagen

In diesem Expreriment sollte untersucht werden, welchen Einfluss die VLDL-Konzentration auf die Schädigung von kokultivierten Endothelzellen mit Makrophagen hat. Hierzu wurden VLDL-Konzentrationen zwischen 0,1 und 100 mg/dl in das Medium der separaten Kokultur (Abb. 2.2-4) gegeben und nach 14 h Inkubationszeit die Apoptoserate der HUVECs bestimmt. Wie zuvor konnte VLDL monokultivierte Endothelzellen nicht schädigen. Auch die Kokultivierung beeinflusste die Apoptoserate der Zellen nicht negativ.

Es stellte sich aber heraus, dass kokultivierte Endothelzellen bereits nach einer Behandlung mit 10 mg/dl VLDL signifikant geschädigt wurden. Höhere Konzentrationen an VLDL führten zu einer noch höheren Apoptoserate (Abb. 3.5-12).

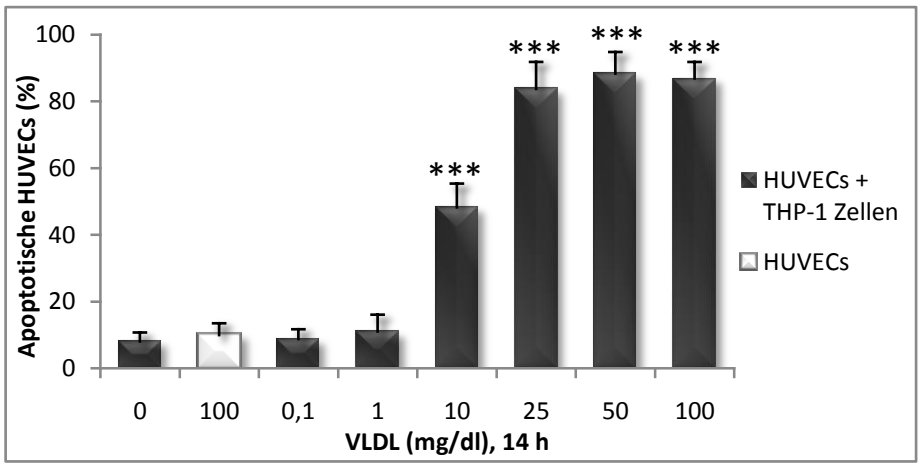


Abb. 3.5-12: Konzentrationsabhängigkeit von VLDL während der Schädigung kokultivierter HUVECs

Kokultivierte Endothelzellen wurden mit VLDL-Konzentrationen zwischen 0,1 und 100 mg/dl behandelt, wobei ab 10 mg/dl die endotheliale apoptotische Zellschädigung signifikant erhöht war. Dargestellt sind die Mittelwerte der Apoptoserate der HUVECs in Prozent ± S.D.. ***$p < 0{,}001$ im Vergleich zur Kontrolle, die mit 100 mg /dl VLDL in HUVECs-Monokultur behandelt wurde (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

3.5.3.5 Untersuchung des Einflusses der THP-1-Zelldichte während der Schädigung von HUVECs in der Kokultur mit Makrophagen

Im Folgenden sollte untersucht werden wie sich die Zelldichte der THP-1-Zellen auf die Schädigung der Endothelzellen in der Kokultur auswirkt. Für die geplanten RNAi-Versuche zur Herunterregulation der LPL war die Zelldichte ein wichtiger Faktor. Wäre sie zu hoch, könnte die Transfektionsrate mit siRNA in Mitleidenschaft gezogen werden. Somit war es von entscheidender Bedeutung zu wissen, ab welcher THP-1-Zelldichte die endotheliale Apoptose durch VLDL induziert wird. Hierfür wurden in der Kokultur THP-1-Zelldichten zwischen 10^5 bis $3x10^6$ pro Schale verwendet. Weiterhin wurde VLDL in einer Konzentration von 50 mg/dl zugegeben. Es zeigte sich, dass bereits bei einer THP-1-Zelldichte von $0{,}5x10^6$ pro Schale die Endothelzellen signifikant ($p < 0{,}05$) geschädigt wurden. Bei einer Zellzahl von $> 10^6$ THP-1-Zellen pro Schale war die Irrtumswahrscheinlichkeit noch geringer ($p < 0{,}001$). Ohne VLDL konnte, wie bereits gezeigt, in kokultiverten HUVECs keine hohe Apoptoserate detektiert werden.

Das Ergebnis zeigt, dass für eine endotheliale Schädigung in der Kokulur eine hohe THP-1-Zelldichte von $\geq 0{,}5x10^6$ pro Schale notwendig war.

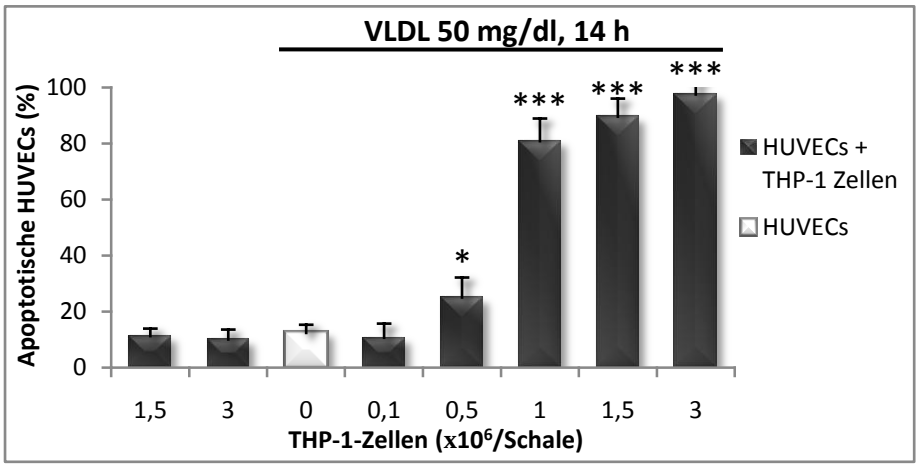


Abb. 3.5-13: Abhängigkeit der Schädigung kokultivierter Endothelzellen von der THP-1-Zelldichte

Endothelzellen in der Kokultur wurden mit 50 mg/dl VLDL für 14 h inkubiert. Dabei wurde die Anzahl der THP-1-Zellen zwischen 10^5 und $3x10^6$ pro Schale variiert. Ab einer THP-1-Zelldichte von $0{,}5x10^6$ pro Schale wurden HUVECs signifikant geschädigt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Apoptoserate der HUVECs in Prozent ± S.D.. *$p < 0{,}05$, ***$p < 0{,}001$ im Vergleich zur VLDL-behandelten Kontrolle in der Monokultur (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

3.5.3.6 Untersuchung der schädigenden Wirkung von VLDL auf HUVECs nach einer Vorinkubation mit Lipoproteinlipase-haltigen Medium

Der physiologische Wirkort der LPL ist die luminale Seite des Endothels. An HSPG-Strukturen gebunden, hydrolysiert das Enzym Triglyceride aus Lipoproteinen, wobei Fettsäuren freigesetzt werden, die im Muskel- und im Fettgewebe utilisiert werden. Ziel der Untersuchungen war es zu belegen, dass die translozierte LPL Menge, die an Endothelzellen gebunden ist, in der Lage ist Fettsäuren aus VLDL freizusetzen und dadurch zum Untergang der Zellen führen kann.

Als erstes wurden THP-1-Zellen mit PMA behandelt. Nach 12 h Differenzierungszeit wurden HUVECs mit dem LPL-haltigen Zellmedium der Makrophagen für 1 h vorinkubiert, mit PBS gewaschen und mit VLDL für 48 h behandelt. Es folgte eine Analyse der Apoptoserate mit dem Farbstoff Hoechst 33258. Als Kontrollen wurden Gruppen verwendet, die entweder nur mit VLDL behandelt wurden oder mit VLDL im Makrophagenmedium ohne den beschriebenen Medienwechsel. Wie zuvor demonstriert, löste VLDL im physiologischen Bereich keine Apoptose in HUVECs aus, dagegen waren Zellen, die mit VLDL im Makrophagenmedium behandelt wurden, signifikant geschädigt (Abb. 3.5-14 A). Die Zellgruppen, die mit dem Makrophagenmedium nur vorinkubiert wurden, damit die LPL an die Membran binden konnte, zeigten jedoch nach folgender VLDL-Inkubation keine signifikant erhöhte Schädigungsrate (Abb. 3.5-14 A).

Im nächsten Schritt wurden HUVECs mit sich differenzierenden THP-1-Makrophagen kokultiviert. Zu bestimmten Zeitpunkten nach Zugabe von PMA wurden die Endothelzellen aus dem System entfernt, mit PBS gewaschen und für 48 h mit VLDL behandelt. Anschließend erfolgte die Apoptoserate-Untersuchung. Als Kontrollen dienten HUVECs-Gruppen, die entweder mono- oder kokultiviert mit VLDL inkubiert wurden. Man konnte sehen, dass VLDL in der HUVECs-Monokultur unschädlich für die Zellen war, die kokultivierten Gruppen dagegen signifikant schädigen konnte (Abb. 3.5-14 B). Die vorinkubierten Gruppen, die aus der Kokultur entfernt wurden, konnten jedoch auch in diesem Versuchsaufbau nicht signifikant geschädigt werden (Abb. 3.5-14 B).

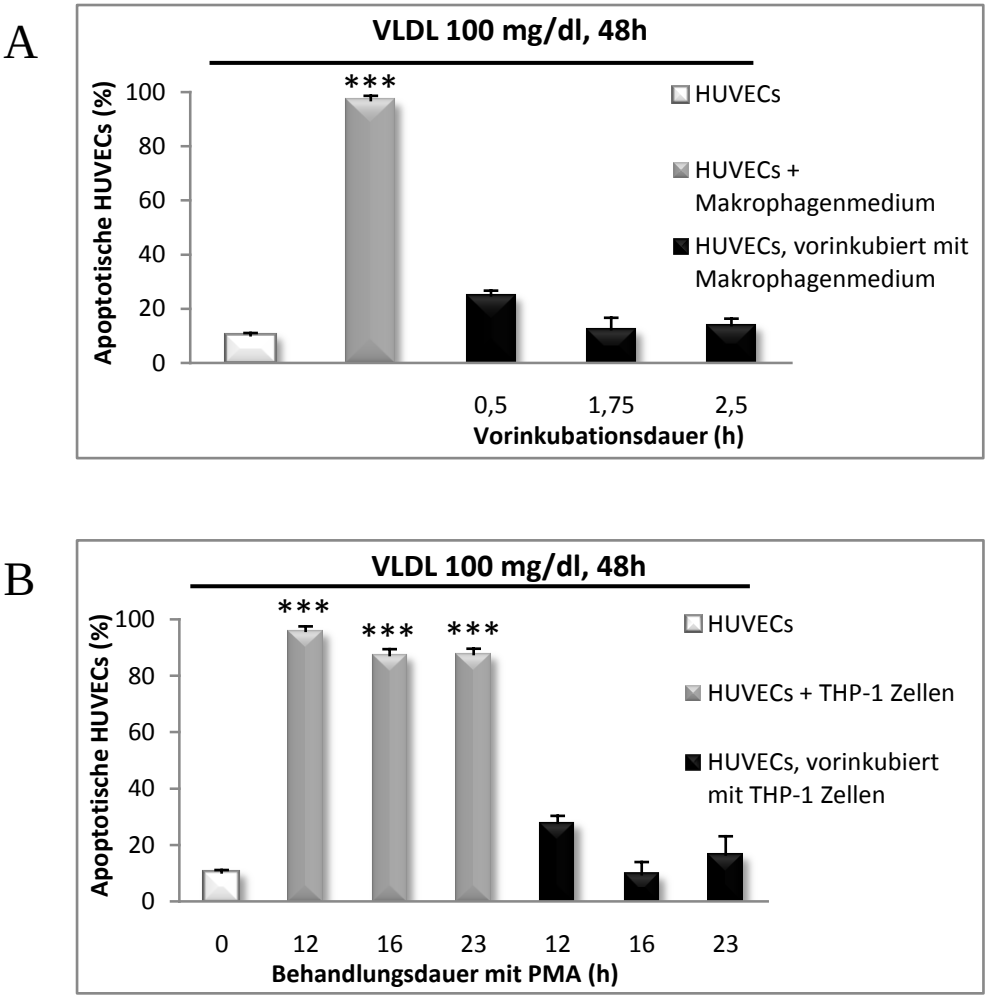


Abb. 3.5-14: Apoptoseinduktion in HUVECs mit VLDL nach einer Vorbehandlung der Zellen mit Lipoproteinlipase-haltigem Makrophagenmedium bzw. in der Kokultur

(A) HUVECs wurden mit LPL-haltigem Makrophagenmedium für 0,5 bis 2,5 h inkubiert. Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen 48 h lang mit VLDL behandelt. Kontrollzellen, die ohne Wechsel des Makrophagenmediums mit VLDL inkubiert wurden, waren signifikant geschädigt, im Gegensatz zu den vorbehandelten Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Apoptoserate der HUVECs in Prozent ± S.D.. ***$p < 0{,}001$ im Vergleich zur VLDL-behandelten Kontrolle im normalen Medium (Varianzanalyse, Scheffé-Test).
(B) Kokultivierte HUVECs in Kombination mit VLDL waren signifikant geschädigt. Dagegen wurden Endothelzellen, die in der Kokultur für eine bestimmte Zeit vorbehandelt wurden, kaum geschädigt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Apoptoserate der HUVECs in Prozent ± S.D.. ***$p < 0{,}001$ im Vergleich zur VLDL-behandelten HUVECs-Kontrolle (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

3.5.4 Reduktion der Apoptoserate durch Orlistat

Um die zuvor beobachteten Schädigungsergebnisse zu verifizieren, wurde der spezifische Lipaseinhibitor Orlistat zur Hemmung der LPL eingesetzt. Dieser Wirkstoff, der pharmazeutisch eingesetzt wird, findet als Pankreaslipasehemmer zur Therapie von Adipositas Verwendung. Ziel der experimentellen Untersuchungen war es zu zeigen, dass die apoptotische Schädigung, die durch Fettsäuren, freigesetzt durch LPL aus VLDL, hervorgerufen wird, durch eine Hemmung der Lipase reduziert wird.

3.5.4.1 Reduktion der Endothelzellschädigung durch Orlistat

Die Endothelzellen wurden, wie zuvor demonstriert (Abb. 3.5-9), mit VLDL und boviner LPL inkubiert, woraufhin die Zellen nach 24 h Behandlungsdauer durch Apoptose zugrunde gingen. Simultane Inkubation dieser Gruppen mit Orlistat reduzierte die Zahl geschädigter Zellen konzentrationsabhängig und signifikant (Abb. 3.5-15). Bereits in einer Konzentration von 4 µM konnte Orlistat einen protektiven Effekt aufweisen.

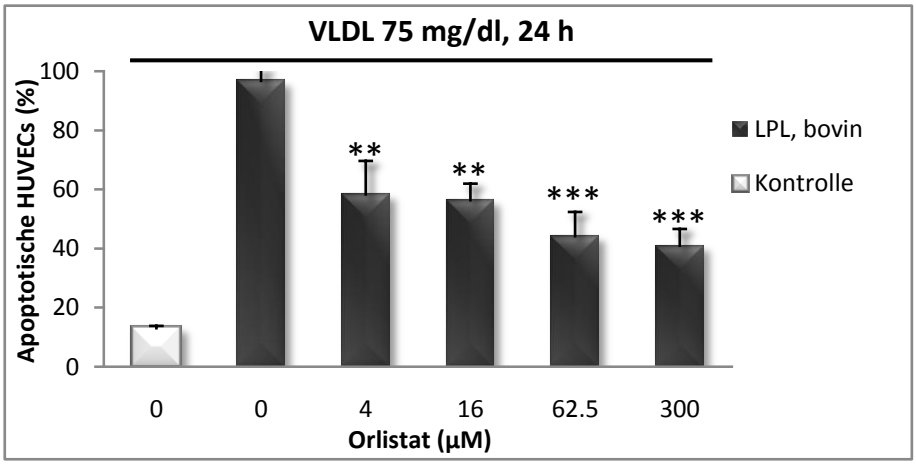


Abb. 3.5-15: Reduktion der apoptotischen Schädigung durch VLDL und bovine Lipoproteinlipase mit Orlistat

Der Lipaseinhibitor Orlistat, simultan behandelt mit VLDL und boviner LPL, wirkt zellprotektiv und reduziert die Apoptose der Endothelzellen signifikant. Dargestellt sind die Mittelwerte der apoptotischen HUVECs in Prozent ± S.D.. **p < 0,01, ***p < 0,001 im Vergleich zur VLDL-behandelten Kontrolle ohne Orlistat (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

3.5.4.2 Reduktion der Endothelzellschädigung durch Orlistat

Es konnte bereits gezeigt werden, dass Endothelzellen, die mit VLDL im Makrophagenmedium behandelt wurden, apoptotisch zugrunde gehen (Abb. 3.5-10). Eine simultane Behandlung dieser Zellen mit Orlistat reduzierte die Apoptoserate bereits ab einer Konzentration von 4 µM des Lipaseinhibitors signifikant.

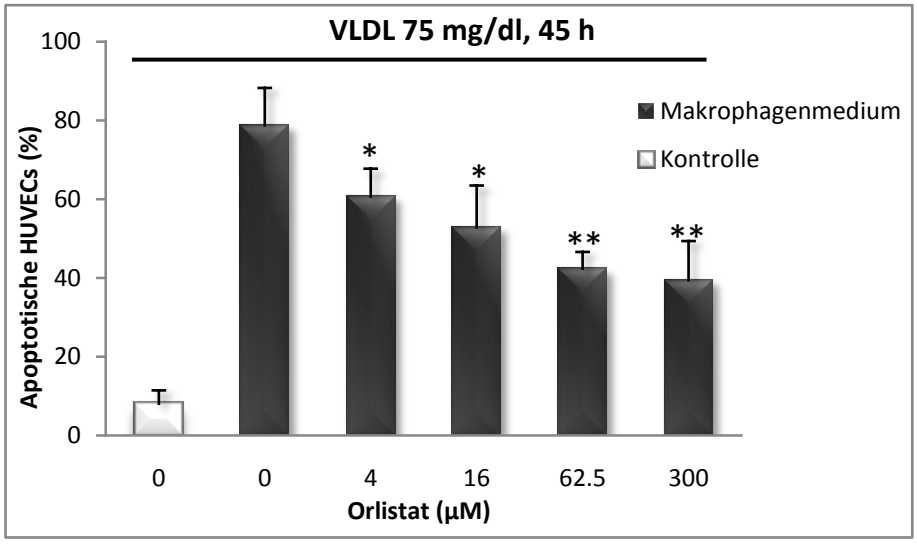


Abb. 3.5-16: Reduktion der apoptotischen Schädigung durch VLDL im Makrophagenmedium mit Orlistat

Endothelzellen, die mit VLDL im LPL-haltigen Makrophagenmedium behandelt wurden, sind apoptotisch geschädigt worden. Eine gleichzeitige Inkubation der Zellen mit Orlistat reduzierte die Anzahl apoptotischer Zellkerne signifikant. Dargestellt sind die Mittelwerte der Apoptoserate der HUVECs in Prozent ± S.D.. *$p < 0,05$, **$p < 0,01$ im Vergleich zur VLDL-behandelten Kontrolle ohne Orlistat (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

3.5.5 Reduktion der LPL Expression und Apoptoserate mit RNA-Interferenz

RNAi ist eine moderne molekularbiologische Methode, mit jener man spezifisch einzelne Gene und somit die Proteinbiosynthese gezielt stilllegen kann. Mit Hilfe dieser Technik sollte untersucht werden, ob eine Reduktion der LPL-Expression in THP-1-Makrophagen kausal mit einer erniedrigten Schädigung kokultivierter und mit VLDL behandelter Endothelzellen zusammenhängt. Eine verminderte Expression und somit reduzierte Aktivität der Lipase, sollte entsprechend die freigesetzte Menge schädlicher ungesättigter Fettsäuren aus VLDL vermindern und dadurch zu einer geringeren Apoptoseinduktion in HUVECs führen.

3.5.5.1 Herunterregulation der Lipoproteinlipase auf mRNA-Ebene

Zunächst sollte die RNAi-Methodik auf RNA-Ebene etabliert werden. Hierzu wurden THP-1-Zellen 72 h lang mit PMA zu Makrophagen ausdifferenziert. Nach einem Medienwechsel erfolgte eine Zugabe von siRNA und dem Transfektionsmedium im serumfreien Milieu. Als Kontrollen wurden entsprechende Zellgruppen nur mit dem Transfektionsreagenz ohne siRNA behandelt. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden die Zellen lysiert und die mRNA-Spiegel der LPL mit Hilfe der RT-PCR semiquantitativ untersucht. Es zeigte sich, dass die Behandlung mit kurzkettiger dsRNA eine Reduktion der LPL-mRNA nach 25–60 h zur Folge hatte (Abb. 3.5-17). Ein transienter *Knockdown* konnte leider nicht nachgewiesen werden, da die Zellen die toxischen serumfreien Bedingungen nicht lange genug vertragen haben.

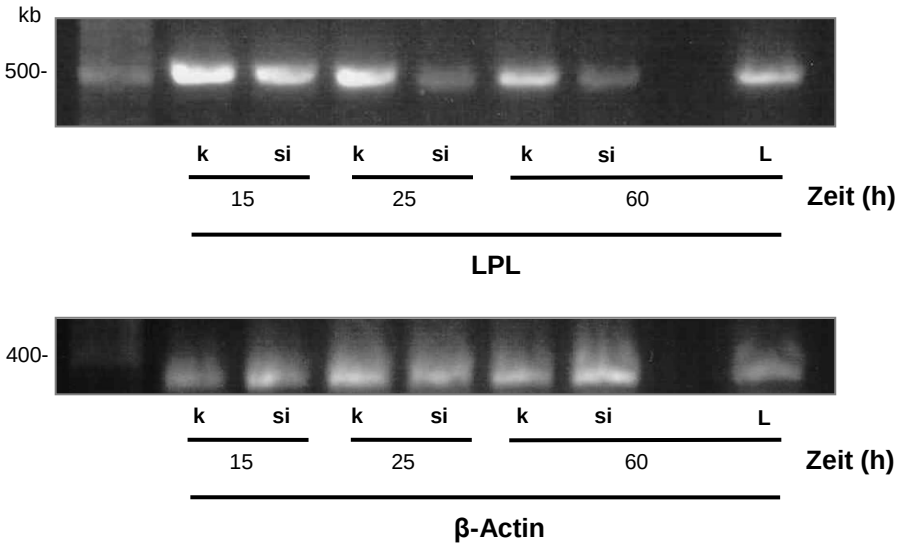


Abb. 3.5-17: Herunterregulation der Lipoproteinlipase auf mRNA-Ebene mit siRNA

THP-1-Makrophagen, die mit siRNA behandelt wurden (si), zeigten im Vergleich zu Kontrollgruppen ohne siRNA (k) nach 25-60 h reduzierte LPL-mRNA-Spiegel. Als weitere Kontrolle dienten Zellen, die im normalen serumhaltigen Medium ohne siRNA und Transfektionsreagenz kultiviert wurden (L). Zur Kontrolle der Konformität diente die Messung von β-Actin.

3.5.5.2 Herunterregulation der Lipoproteinlipase auf Proteinebene

Nachdem nun gezeigt wurde, dass die LPL-mRNA herabreguliert werden konnte, sollte geklärt werden, ob die Expressionsreduktion der LPL auch auf Proteinebene stattfindet. Hierzu wurden als nächstes die THP-1-Zellen analog zu Kapitel 3.5.5.1 behandelt, am Ende wurde jedoch das Proteinlysat der Zellen gesammelt und mittels Western Blot analysiert. Es stellte sich heraus, dass die Proteinexpression der LPL in siRNA-behandelten Zellen im Vergleich zu Kontrollgruppen 33 bis 66 h nach Transfektion reduziert wurde (Abb. 3.5-18). Der transiente *Knockdown* des Proteins konnte nicht gezeigt werden, da die Zellen längere Behandlungszeiten nicht toleriert haben.

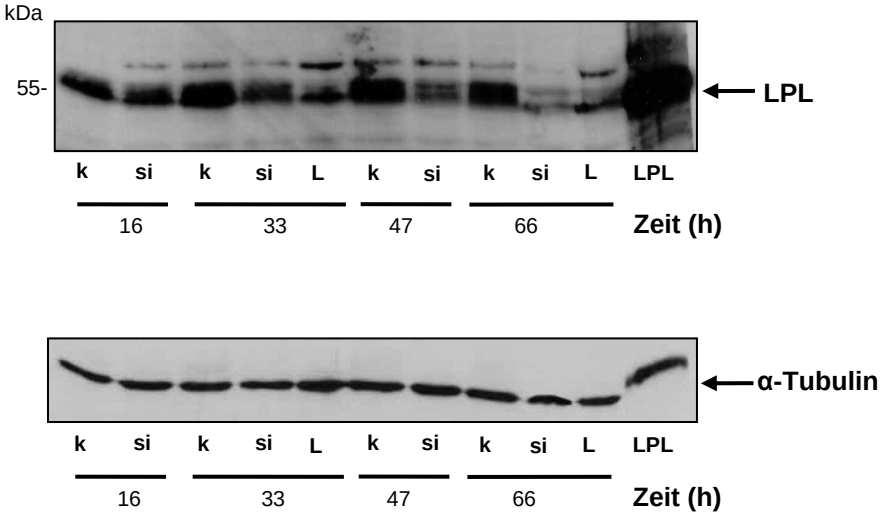


Abb. 3.5-18: Herunterregulation der Lipoproteinlipase auf Proteinebene

Ausdifferenzierte THP-1-Makrophagen, die mit siRNA behandelt wurden (si), zeigten reduzierte LPL-Spiegel im Vergleich zu Kontrollgruppen ohne siRNA (k) bzw. Zellen im serumhaltigen Medium, ebenfalls ohne siRNA (L). 1 µg bovine Lipase wurde als Positivkontrolle aufgetragen (LPL). Die Kontrolle der Konformität erfolgte durch Messung von α-Tubulin. Zur Darstellung wurden jeweils 40 µg Protein aufgetragen.

3.5.5.3 Untersuchung der Apoptoserate von HUVECs, kokultiviert mit siRNA-behandelten THP-1-Zellen

Ziel der RNAi-Experimente war es zu zeigen, dass eine Reduktion des LPL-Proteins mit einer Verringerung der Apoptoserate kokultivierter HUVECs im Zusammenhang steht. Wie im Kapitel 3.5.1.2 gezeigt, ist die Expression des LPL-Proteins in sich differenzierenden THP-1-Zellen bereits nach etwa 9-24 h Phorbolesterinkubation maximal. Die Schädigungsversuche in der Kokultur wurden entsprechend in diesem Zeitfenster durchgeführt (Kapitel 3.5.3.3). In der folgenden Untersuchung sollte die Lipase-Expression in eben diesem kurzen zeitlichen Intervall reduziert werden.

Es war methodisch nicht leicht die Menge des Proteins genau im Bereich von 12 bis 24 h nach PMA-Zugabe zu reduzieren, da sowohl der Parabel-förmige Expressionsverlauf der Lipase als auch die Transfektionsdauer kalkuliert werden mussten. Somit wurden mehrere Versuche mit unterschiedlichen Transfektionszeiten durchgeführt, meistens bereits vor der PMA-Zugabe. Es stellte sich jedoch heraus, dass die erfolgreichste Herunterregulation durch eine simultane Transfektion der THP-1-Monozyten parallel zur Phorbolesterzugabe beobachtet werden konnte. Die siRNA-behandelten Gruppen zeigten im Vergleich zu den Kontrollen eine sichtbar reduzierte Proteinexpression der LPL sowohl im Zelllysat als auch im Kulturmedium (Abb. 3.5-19 A). Interessanterweise ließ sich hier die LPL bereits nach einer kurzen Transfektionszeit von nur 12 h herunterregulieren. Bei ausdifferenzierten THP-1-Zellen (Abb. 3.5-18), die bereits 72 h mit PMA behandelt wurden, war diese Zeitspanne mit 33 h wesentlich länger.

Im folgenden Schritt sollte überprüft werden, ob die reduzierte LPL-Expression der THP-1-Zellen in der Kokultur, nach einer VLDL-Behandlung zu einer erniedrigten Apoptoseinduktion in HUVECs führt. Hierzu wurden THP-1-Zellen vor Kokultivierung gleichzeitig mit PMA und siRNA inkubiert. Nach 6 h wurde das PMA-haltige Medium verworfen und HUVECs mit den transfizierten THP-1-Zellen in der gleichen Schale, jedoch als separate *Monolayer*, kultiviert. Zum Zellmedium des Systems wurde VLDL hinzugefügt. Es zeigte sich, dass HUVECs, die mit siRNA-behandelten THP-1-Zellen kokultiviert wurden, im Vergleich zu den Zellgruppen ohne siRNA-Transfektion eine signifikant reduzierte Apoptoserate aufwiesen (Abb. 3.5-19 B).

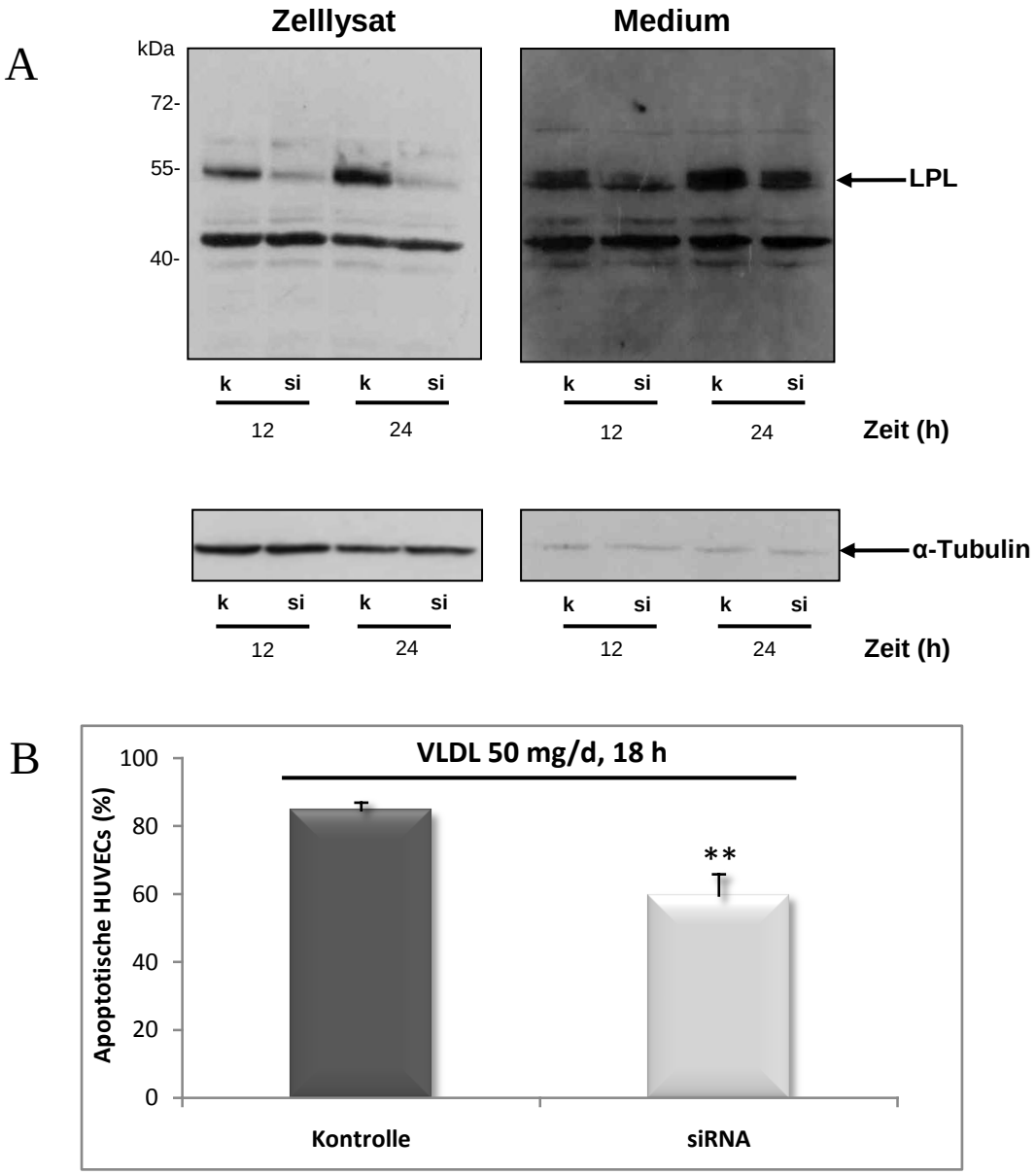


Abb. 3.5-19: Reduktion der Lipoproteinlipase-Expression und Apoptoserate in HUVECs mit siRNA

(A) THP-1-Zellen wurden mit PMA inkubiert, parallel erfolgte eine Transfektion mit siRNA (si). Mit Hilfe des Western Blots wurde die LPL-Expression untersucht. Im Vergleich zu den Kontrollen ohne siRNA (k) zeigten die transfizierten Zellen (si) deutlich reduzierte LPL-Proteinspiegel (Pfeile) sowohl im Zelllysat wie auch im Kulturmedium. Zur Kontrolle der Konformität diente die Messung von α-Tubulin. Es wurden jeweils 40 µg Protein, bzw. 20 µl Medium aufgetragen.
(B) THP-1-Zellen, die mit bzw. ohne siRNA behandelt wurden, sind mit HUVECs kokultiviert worden. Nach einer Zugabe von VLDL zeigten die Endothelzellen, die mit siRNA-transfizierten THP-1-Zellen gezüchtet wurden, eine signifikant erniedrigte Zahl apoptotischer Zellen im Vergleich zu Kontrollgruppen ohne siRNA-Inkubation. Dargestellt sind die Mittelwerte der Apoptoserate der HUVECs in Prozent ± S.D.. **$p < 0{,}01$ im Vergleich zur VLDL-behandelten Kontrolle ohne siRNA (Varianzanalyse, Scheffé-Test).

3.6 Fütterungsversuch an Meerschweinchen

Wie bereits beschrieben, können kultivierte Endothelzellen durch Fettsäuren aus Lipoproteinen apoptotisch geschädigt werden. Ziel dieses Versuchsvorhabens war es die beobachteten Ergebnisse bezüglich der Endothelschädigung mit ungesättigten Fettsäuren in der Zellkultur durch eine *in vivo*–Untersuchung zu verifizieren. Nach der *Response to Injury* Hypothese führt eine initiale Endothelzellschädigung zu einer vereinfachten Progression der Atherosklerose. Der Gedanke lag also nahe zu untersuchen, ob eine erhöhte Zufuhr von ungesättigten Fettsäuren durch die Nahrung zu einer Aktivierung der PP2C in Endothelzellen, somit zur Apoptose dieser Zellen und dadurch zu einer erhöhten Atheroskleroseprogredienz führen kann. Meerschweinchen eignen sich gut als Versuchstiere, da sie als reine Pflanzenfresser schnell atherosklerotische Läsionen ausbilden (Fernandez und Volek, 2006).

3.6.1 Nahrungsaufnahme und Gewichtsentwicklung

3.6.1.1 Nahrungsaufnahme der Meerschweinchen

Die Meerschweinchen wurden in zwei Gruppen (n=20) unterteilt. Die eine Hälfte der Tiere erhielt ein fettarmes während die andere ein mit 25% Glycerol Trioleat (25% Trioleat) angereichertes Futter bekommen hatte. Die Meerschweinchen hatten freien Zugang zum Futter (ad libitum) und Wasser. Zwei Mal pro Woche wurde die Futteraufnahme dokumentiert. Nach einigen Tagen Eingewöhnungszeit hatten die Tiere beide Futtersorten gut toleriert und gefressen. Langfristig wurden etwa 30-35 g des fettarmen Futters und etwa 20-25 g der mit Trioleat angereicherten Nahrung pro Tag konsumiert (Abb. 3.6-1 A). Die beiden Diäten haben sich deutlich in der Energiedichte unterschieden (Kapitel 2.3.2). Beim Vergleich der aufgenommenen Energie durch die Nahrung stellte sich heraus, dass beide Gruppen etwa die gleiche Kalorienmenge konsumierten. Es konnte gezeigt werden, dass die Meerschweinchen etwa 90-100 kcal pro Tag verzehrten (Abb. 3.6-1 B).

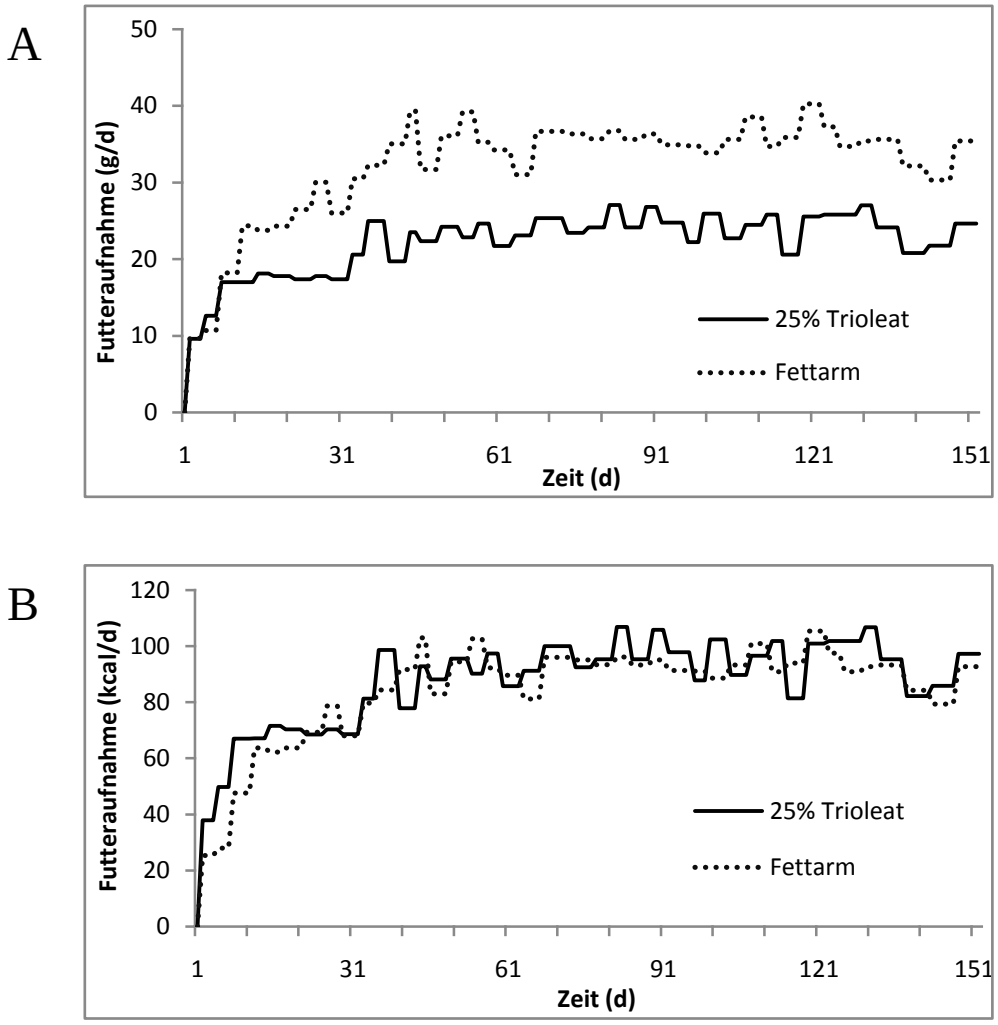


Abb. 3.6-1: Futteraufnahme der Meerschweinchen

(A) Der tägliche Konsum des Futters betrug bei der fettarm-gefütterten Gruppe etwa 30-35 g, bei der mit dem Trioleat-angereicherten Futter Gruppe etwa 20-25 g.
(B) Die aufgenommene Nahrungsenergie beider Gruppen war in etwa gleich, es wurden etwa 90-100 kcal pro Tag konsumiert.

3.6.1.2 Gewichtsentwicklung der Meerschweinchen

Das Körpergewicht jedes Tieres wurde zweimal pro Woche dokumentiert. Das durchschnittliche Initialgewicht von knapp 400 g erhöhte sich nach einer kurzen Umstellungszeit auf das neue Futter sehr schnell und gleichmäßig. Nach 150 Tagen betrug das Körpergewicht der jeweiligen Gruppen etwa 830 g pro Meerschweinchen. Interessanterweise war kein Gewichts- und Kalorienkonsumsunterschied festzustellen, obwohl die Gruppen jeweils Futter mit einer unterschiedlichen Energiedichte verzehrten (Abb. 3.6-2).

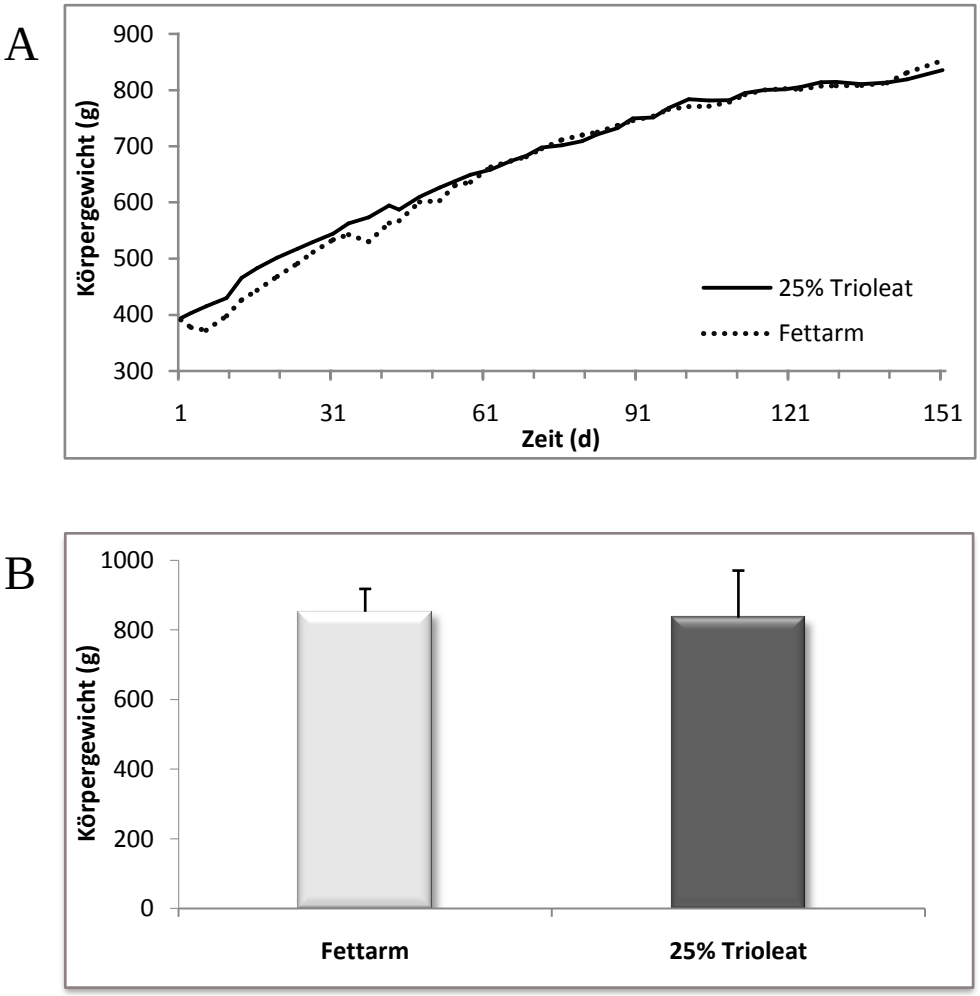


Abb. 3.6-2: Entwicklung des Körpergewichts der Meerschweinchen

(A) Das Gewicht am Anfang des Versuches betrug bei beiden Gruppen knapp 400 g pro Tier, am Ende war das durchschnittliche Gewicht auf etwa 830 g mehr als verdoppelt.
(B) Nach 150 Tagen gab es keinen signifikanten Gewichtsunterschied zwischen beiden Gruppen (n=17). Dargestellt sind die Mittelwerte der Meerschweinchen-Körpermassen in g ± S.D..

3.6.2 Blutuntersuchung der Meerschweinchen

Der Fütterungsversuch an Meerschweinchen sollte belegen, dass eine übermäßig hohe Zufuhr von ungesättigten Fettsäuren durch die Nahrung eine atherogene Wirkung haben kann. Da Serumlipide eine entscheidende Rolle bei der Atheroskleroseentwicklung einnehmen, sollten die Blutfettwerte der Tiere untersucht werden. Die erste Blutmessung erfolgte am Tag 45 nach Beginn der Fütterung. Jeweils fünf Tieren aus beiden Gruppen wurde Blut entnommen, um anschließend die Serumlipide zu analysieren. Es wurden Gesamtriglyceride, Gesamtcholesterol sowie die Cholesterolaufteilung in LDL und HDL gemessen. Man konnte erkennen, dass die Lipidparameter beider Gruppen sich nicht voneinander unterschieden haben (Abb. 3.6-3 A). Zusammengefasst konnte man feststellen, dass die Werte im Vergleich zu humanen Konzentrationen relativ niedrig waren. Triglyceride lagen bei etwa 80-100 mg/dl, Cholesterol bei etwa 40-50 mg/dl. Diese Werte entsprechen den physiologischen Konzentrationen der Tiere (Fernandez, 2001).

Die terminale Blutuntersuchung nach 151 d zeigte jedoch ein differenzierteres Bild. Während die Triglyceridkonzentrationen sich in beiden Gruppen nicht unterschieden haben, konnte man bei den Cholesterolwerten der mit Trioleat-gefütterten Tiere eine signifikante Erhöhung sowohl der LDL- wie auch der HDL-Fraktionen feststellen (Abb. 3.6-3 B). Die Daten wurden freundlicherweise von Herrn Priv. Doz. Dr. Lorkowski vom Institut für Atheroskleroseforschung Münster zur Verfügung gestellt.

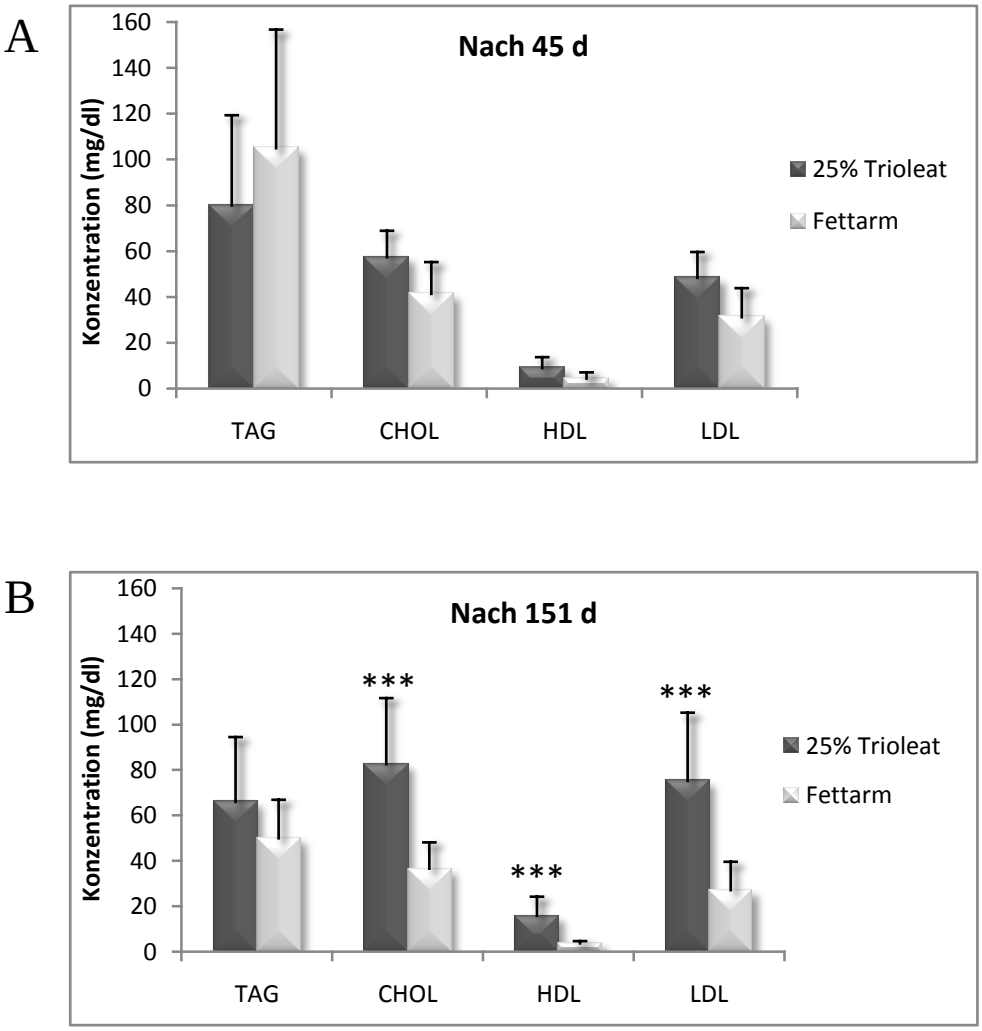


Abb. 3.6-3: Untersuchung der Serumlipide der Meerschweinchen

(A) Die erste Blutuntersuchung an jeweils fünf Tieren aus beiden Gruppen nach 45 Tagen Fütterung zeigte, dass die Lipidparameter Gesamttriglyceride (TAG), Gesamtcholesterol (CHOL) sowie die Cholesterolfraktionen HDL und LDL zu dem Zeitpunkt keine signifikanten Unterschiede aufwiesen. Auffallend war der relativ niedrige Gesamtcholesterinspiegel von etwa 40-50 mg/dl (n=5).
(B) Die terminale Blutuntersuchung nach 151 Tagen demonstrierte, dass die Cholesterolwerte (CHOL) der mit Trioleat gefütterten Gruppe signifikant erhöht waren. Sowohl das LDL-, wie auch das HDL-Cholesterol zeigten höhere Konzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Lipidkonzentrationen in mg/dl ± S.D.. ***$p < 0{,}001$ im Vergleich zu den Werten der fettarmgefütterten Kontrollgruppe (Varianzanalyse, Scheffé-Test) (n=17).
Die Daten wurden freundlicherweise von Herrn Priv. Doz. Dr. Lorkowski vom Institut für Atheroskleroseforschung Münster zur Verfügung gestellt.

3.6.3 Makroskopische Veränderungen an den Meerschweinchengeweben

Es sollte weiter untersucht werden, inwieweit die beiden unterschiedlichen Diäten die einzelnen Organe der Meerschweinchen beeinflussten. Es könnte sein, dass die PP2C auch in anderen Geweben durch die Ölsäure in der Nahrung aktiviert wird und entsprechende Veränderung induziert. Nach Euthanasierung der Meerschweinchen und Obduktion der einzelnen Gewebe wurden deutliche morphologische Veränderungen sichtbar. So fiel sofort auf, dass die mit Trioleat-gefütterten Tiere ein wesentlich stärker ausgeprägtes subkutanes wie viszerales Fettgewebe im Vergleich zu Kontroll-Meerschweinchen aufwiesen, obwohl die Gewichtsunterschiede zwischen den Gruppen nicht signifikant unterschiedlich waren. Gleichzeitig waren die großen Blutgefäße dieser Tiere von außen mit einer festen bindegewebeartigen Fettmatrix umgeben, was das Freipräparieren der Arterien erschwerte. Die Leber der fettgefütterten Gruppen sah im Vergleich zu Kontrollen gelblich krankhaft, vergrößert aus und zeigte eine pathologische Muskatnusszeichnung.

3.6.3.1 Untersuchung der Meerschweinchen-Herzen

Am deutlichsten war der Unterschied an den Herzen der beiden Gruppen erkennbar, denn die fettgefütterten Tiere wiesen drastisch festere und wenig elastische Gewebe auf. Sie wurden nach der Entnahme gewogen und fotografiert (Abb. 3.6-4 B). Der Vergleich beider Gruppen zeigte, dass mit Trioleat-gefütterte Tiere eine signifikant reduzierte Herzmasse im Vergleich zu Kontrolltieren hatten (Abb. 3.6-4 A). Weiterhin wurde die Herzlänge computergestützt gemessen. Diese Organe waren bei der mit Trioleat-gefütterten Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant kleiner (Abb. 3.6-4 C).

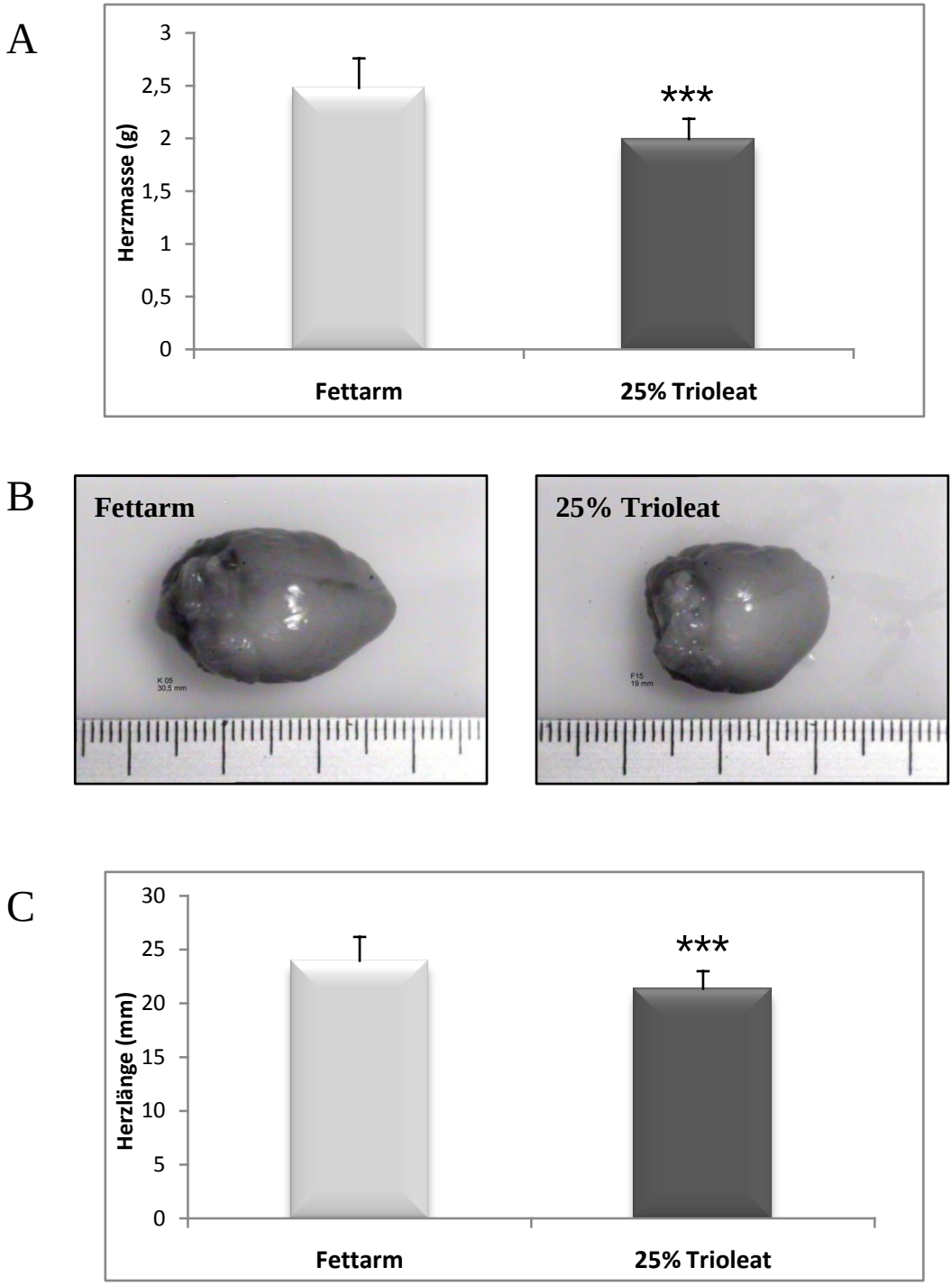


Abb. 3.6-4: Messung der Gewichts- und Längenparameter der Meerschweinchenherzen

(A) Die Untersuchung der Herzmassen ergab, dass Meerschweinchenherzen von mit Trioleat-gefütterten Tieren ein signifikant reduziertes Gewicht im Vergleich zur fettarmgefütterten Gruppe aufwiesen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Herzmassen in g ± S.D.. ***$p < 0{,}001$ im Vergleich zu Werten von fettarmgefütterten Tieren (Varianzanalyse, Scheffé-Test) (n=17).
(B) Die Fotoaufnahmen belegen, dass Meerschweinchenherzen der Kontrollgruppe im Vergleich zu mit Trioleat-gefütterten Tieren deutlich größer waren.
(C) Die Länge der fotografierten Herzen wurde computergestützt ausgemessen. Es zeigte sich, dass die Herzlänge, von der Herzspitze bis zum Ende der Vorhöfe gemessen, bei mit Trioleat-gefütterten Tieren signifikant reduziert vorlag. Dargestellt sind die Mittelwerte der gemessenen Herzlängen in mm ± S.D.. ***$p < 0{,}001$ im Vergleich zu Werten der fettarm-gefütterten Kontrollgruppe (Varianzanalyse, Scheffé-Test) (n=17).

3.6.3.2 Untersuchung der Meerschweinchen-Aorten

Natürlich sollte auch untersucht werden, ob sich atherosklerotische Läsionen an den Aorten der Meerschweinchen während der fünf Monate gebildet haben. Mit Hilfe der Oil Red O-Lipidfärbung wurden die Arterien angefärbt. Dabei konnten jedoch bei beiden Fütterungsgruppen keine sichtbaren Läsionen festgestellt werden (Abb. 3.6-5).

Diese Aufnahmen wurden von Herrn Dr. Hofnagel vom Institut für Atheroskleroseforschung Münster erstellt.

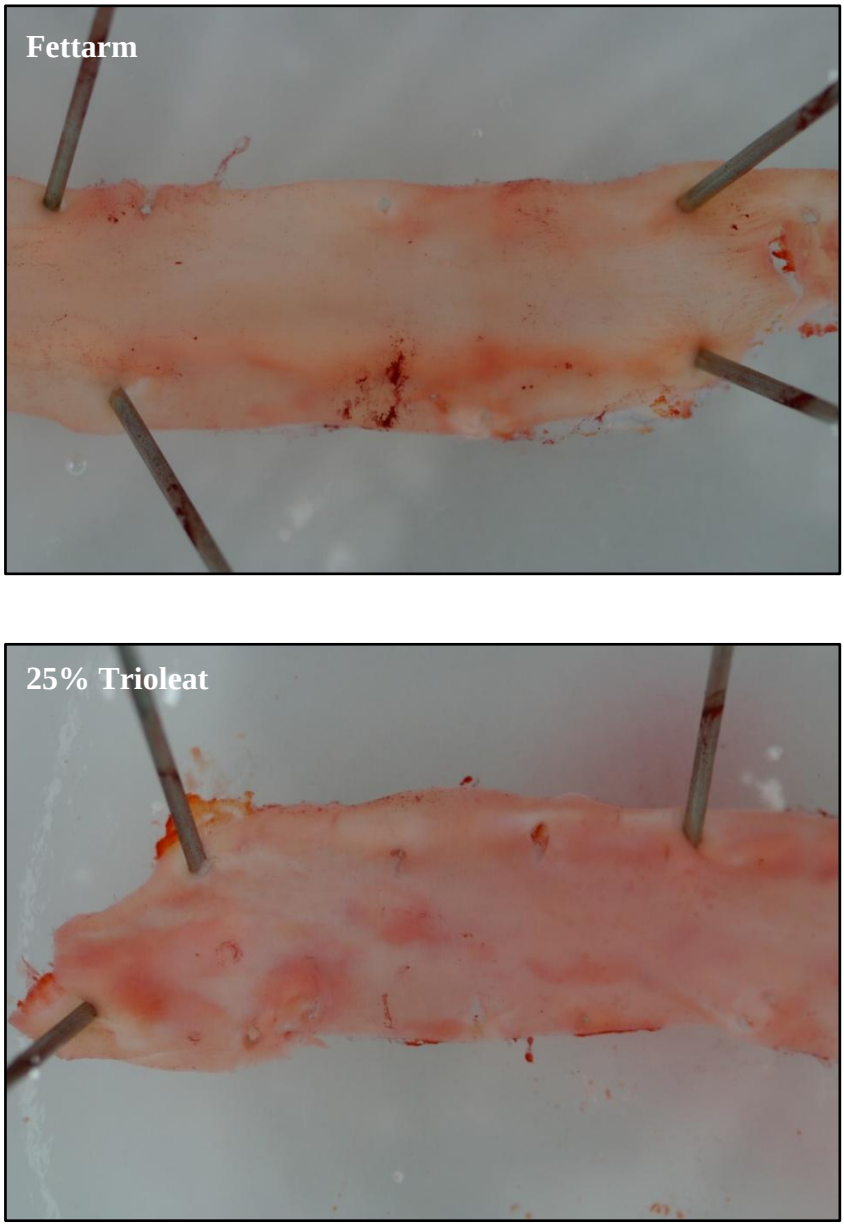


Abb. 3.6-5: Oil Red O-Färbung der Meerschweinchen-Aorten

Die Lipidfärbung der präparierten Aorten von fettarm- sowie mit Trioleat-gefütterten Meerschweinchen zeigten keine Lipideinlagerungen und keine atherosklerotischen Läsionen.
Die Abbildungen sind freundlicherweise von Herrn Dr. Hofnagel vom Institut für Atheroskleroseforschung Münster zur Verfügung gestellt worden.

3.6.4 Expressionsuntersuchung von PP2Cβ und Bad im Meerschweinchengewebe sowie in murinen Kardiomyozyten

Nach unserer Hypothese können ungesättigte Fettsäuren die PP2C aktivieren, die daraufhin das proapoptotische Bad dephosphoryliert und somit Apoptose auslösen kann. Um die Hypothese zu überprüfen, musste in folgenden Experimenten untersucht werden, dass diese Proteine in Geweben von Meerschweinchen auch exprimiert werden.

Weiterhin sollte die Expression dieser Proteine auch in kultivierten murinen Kardiomyozyten sichergestellt werden. Diese sollten als Zellkultursystem zur Untersuchung der Fettsäure-induzierten Apoptose auf den Herzmuskel verwendet werden.

3.6.4.1 Expressionsuntersuchung von PP2Cβ im Meerschweinchengewebe sowie in murinen Kardiomyozyten

Zunächst sollte die Expression der PP2Cβ detektiert werden. Mit Hilfe des polyklonalen PP2Cβ-Antikörpers konnte sichergestellt werden, dass die Phosphatase im Herzgewebe von mit Trioleat- (T) und fettarmgefütterten (K) Meerschweinchen sowie in murinen Kardiomyozyten (KM) exprimiert wird (Abb. 3.6-6).

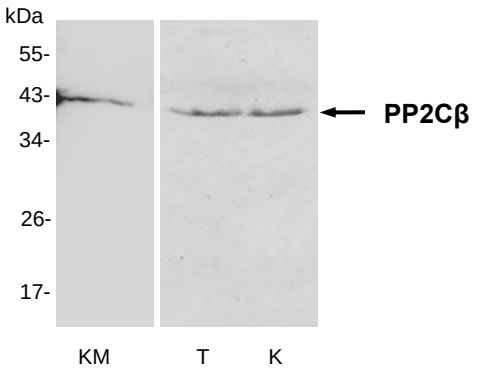


Abb. 3.6-6: Expression von PP2Cβ im Meerschweinchengewebe und in murinen Kardiomyozyten

PP2Cβ ist in murinen Kardiomyozyten (KM) und Meerschweinchenherzgewebe von mit Trioleat- (T) bzw. fettarmgefütterten (K) Tieren exprimiert. Es wurden jeweils 50 µg Protein aufgetragen.

3.6.4.2 Expressionsuntersuchung von Bad im Meerschweinchengewebe sowie in murinen Kardiomyozyten

Das proapoptotische Bad ist, wie bereits beschrieben, Substrat der PP2C und an der Apoptoseinduktion beteiligt. Um die Hypothese weiter zu überprüfen, sollte sichergestellt werden, dass auch dieses Protein in kultivierten Kardiomyozyten und im Herzgewebe von Meerschweinchen exprimiert wird.

Mit dem polyklonalen Bad-Antikörper konnte dessen Expression im Herzgewebe der Meerschweinchen aus der Trioleat- (T) und Kontrollgruppe (K) sowie in murinen Kardiomyozyten (KM) detektiert werden (Abb. 3.6-7).

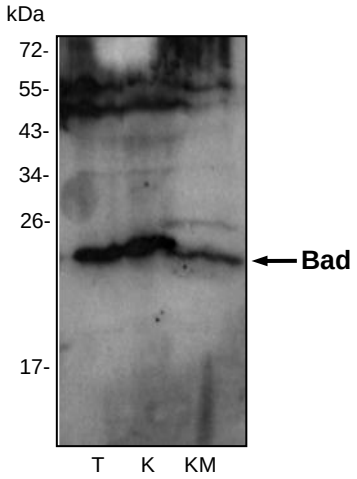


Abb. 3.6-7: Expression von Bad im Meerschweinchengewebe und in murinen Kardiomyozyten

Das Bcl-2-Protein Bad wird von murinen Kardiomyozyten (KM) und Meerschweinchen, gefüttert mit Trioleat-reicher (T) bzw. fettarmer Diät (K), exprimiert. Es wurden jeweils 50 µg Protein aufgetragen.

3.6.5 Immunhistochemische Untersuchungen der Meerschweinchenaortenbögen

Die Untersuchungen atherosklerotischer Läsionen wurden zunächst an den Aortenbögen der Meerschweinchen durchgeführt. Aufgrund der turbulenten Blutströmung kann die Atherombildung dort sehr schnell erfolgen.

3.6.5.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Aortenbogenschnitte der Versuchstiere wurden zur Übersicht mit der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) markiert und unter dem Lichtmikroskop analysiert. Die Aufnahmen zeigen, dass das Gewebe der mit Trioleat-gefütterten Tiere wesentlich schwächer angefärbt wurde als das der Kontrolltiere. Gleichfalls konnte eine Bindegewebe-Degradation und Dysorganisation in der Aorta bei der Fett-Gruppe beobachtet werden (Abb. 3.6-8). Die kompakte Elastinstruktur, welche bei Kontrolltieren sehr geordnet erscheint, war bei mit Trioleat-gefütterten Tieren diffuser und weniger komprimiert. Die Vergrößerung beweist, dass im Bereich der Subintima schaumartige interzelluläre Hohlräume bei mit Fett-gefütterten Tieren vorhanden waren, während diese Veränderungen bei Kontrollen fehlten.

Die Abbildungen wurden von Frau Priv. Doz. Dr. Weißen-Plenz vom Institut für Atheroskleroseforschung in Münster erstellt.

3.6.5.2 Elastica van Gieson-Färbung

Mit der Elastica van Gieson-Färbung wurde die Bindegewebsstruktur der Aorten untersucht. Die Aufnahmen zeigen, dass mit Trioleat-gefütterte Tiere (B) eine reduzierte, aufgelöste Elastin-Matrix im Vergleich zu Kontrolltieren (A) aufwiesen (Abb. 3.6-9).

Die Abbildungen wurden von Frau Priv. Doz. Dr. Weißen-Plenz vom Institut für Atheroskleroseforschung in Münster erstellt.

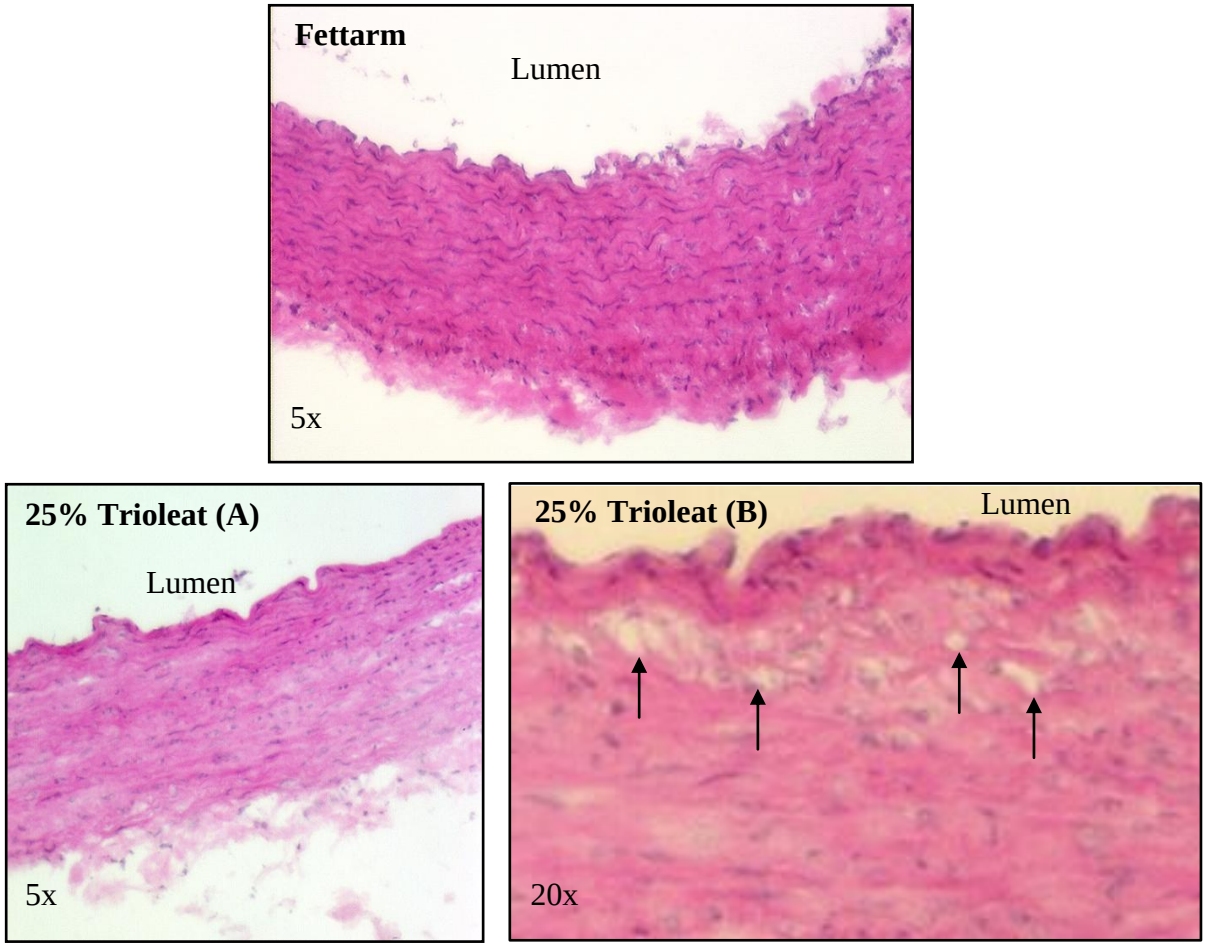


Abb. 3.6-8: Aortenbogen - Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die HE-Färbung der Gewebeschnitte vom Aortenbogen zeigen bei mit Trioleat-gefütterten (A) Tieren eine Degradation des Bindegewebes im Vergleich zur fettarmen Kontrolle auf. Die Vergrößerung (B) demonstriert, dass im subintimalen Bereich der Aorta große interzelluläre Lücken entstanden sind (Pfeile).
Die Aufnahmen wurden freundlicherweise von Frau Priv. Doz. Dr. Weißen-Plenz vom Institut für Atheroskleroseforschung in Münster zur Verfügung gestellt.

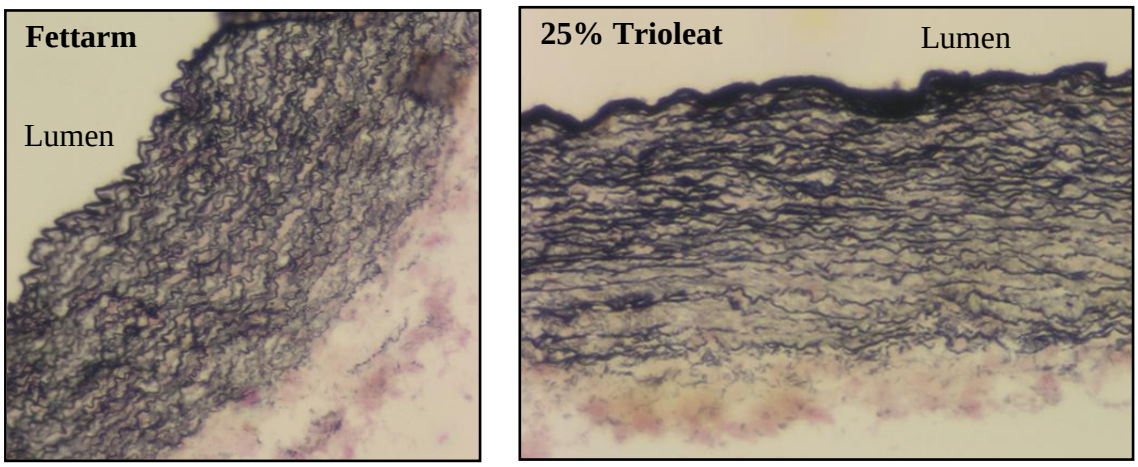


Abb. 3.6-9: Aortenbogen – Elastin van Gieson Färbung

Die Aufnahmen zeigen, dass Kontrolltiere eine dichtere, komplexere und mehr geordnete Elastinstruktur im Vergleich zu mit Trioleat-gefütterten Tieren aufweisen. Es kann eine Elastin-Degradation bei behandelten Tieren beobachtet werden.
Die Abbildungen wurden freundlicherweise von Frau Priv. Doz. Dr. Weißen-Plenz vom Institut für Atheroskleroseforschung in Münster zur Verfügung gestellt.

3.6.5.3 Oil Red O-Färbung

Zum Nachweis atherosklerotischer Läsionen wurden Schnitte des Aortenbogens mit dem Lipidfarbstoff Oil Red O markiert. Es konnten bei beiden Gruppen keine atherosklerotischen Läsionen detektiert werden. Während Kontrolltiere keine Fetteinlagerungen in der Aorta aufzeigten, waren die Gefäße von mit Trioleat-gefütterten Tieren im Bereich der Media und vor allem der Adventitia sehr stark gefärbt, was auf Lipidablagerungen in diesem Bereich hindeutet (Abb. 3.6-10).

Die Abbildungen wurden von Frau Priv. Doz. Dr. Weißen-Plenz vom Institut für Atheroskleroseforschung in Münster erstellt.

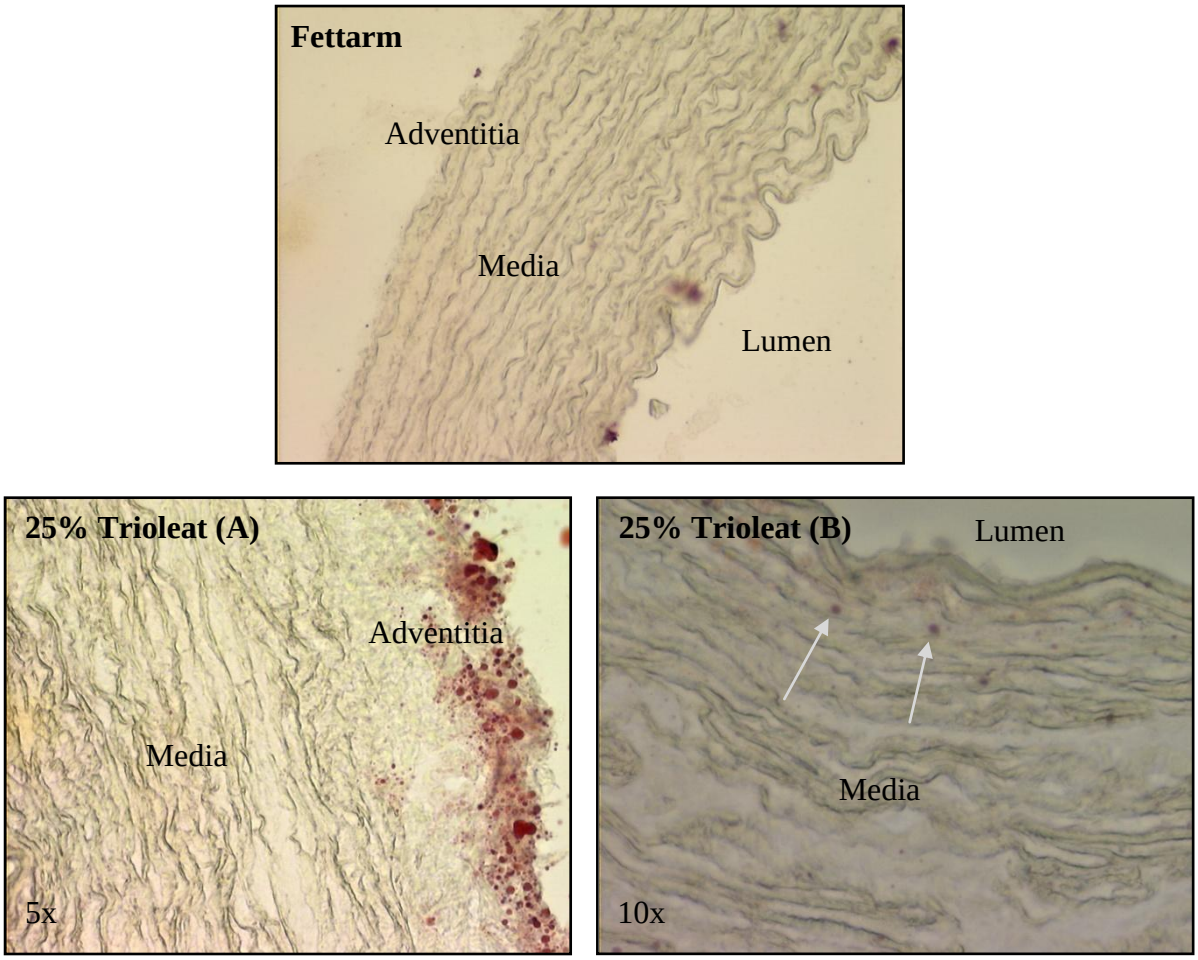


Abb. 3.6-10: Aortenbogen - Oil Red O-Färbung

Die Lipidfärbung belegte, dass es keine atherosklerotischen Läsionen in den Aorten gab. In der Media (B) (Pfeile) und vor allem in der Adventitia (A) der Trioleat-gefütterten Tiere konnten jedoch sehr starke Lipideinlagerungen detektiert werden. Dagegen zeigten die Aorten der Kontrollmeerschweinchen keine Fettablagerungen.
Die Aufnahmen wurden freundlicherweise von Frau Priv. Doz. Dr. Weißen-Plenz vom Institut für Atheroskleroseforschung in Münster zur Verfügung gestellt.

3.6.6 Immunhistochemische Untersuchungen der Meerschweinchenherzen

Nach unserer Hypothese müssten Endothelzellen, die einer hohen Fettsäurekonzentration ausgesetzt sind, apoptotisch geschädigt werden. Es ist zu vermuten, dass solche Lipidmengen nicht in der Aorta erreicht werden können. Dagegen bezieht das Herz etwa 70% seiner Energie aus Fettsäuren, entsprechend sollte dieses Gewebe auf Läsionen untersucht werden. Für dieses experimentelle Vorgehen wurden Gewebe-Sektionen mit der Dicke von 10 µm angefertigt, die angefärbt und analysiert wurden.

3.6.6.1 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Durch die HE-Färbemethode der Meerschweinchen-Herzschnitte wurde die Gewebestruktur übersichtlich dargestellt. Es ist deutlich, dass Kontrolltiere eine dichte, kompakte Muskelzellen-Struktur aufweisen. Dagegen erscheint das Gewebe von mit Trioleat-gefütterten Meerschweinchen wesentlich loser und weniger strukturiert (Abb. 3.6-11). Es konnten keine atherosklerotischen Läsionen in den Koronarien detektiert werden.

Die Abbildungen wurden von Frau Priv. Doz. Dr. Weißen-Plenz vom Institut für Atheroskleroseforschung in Münster erstellt.

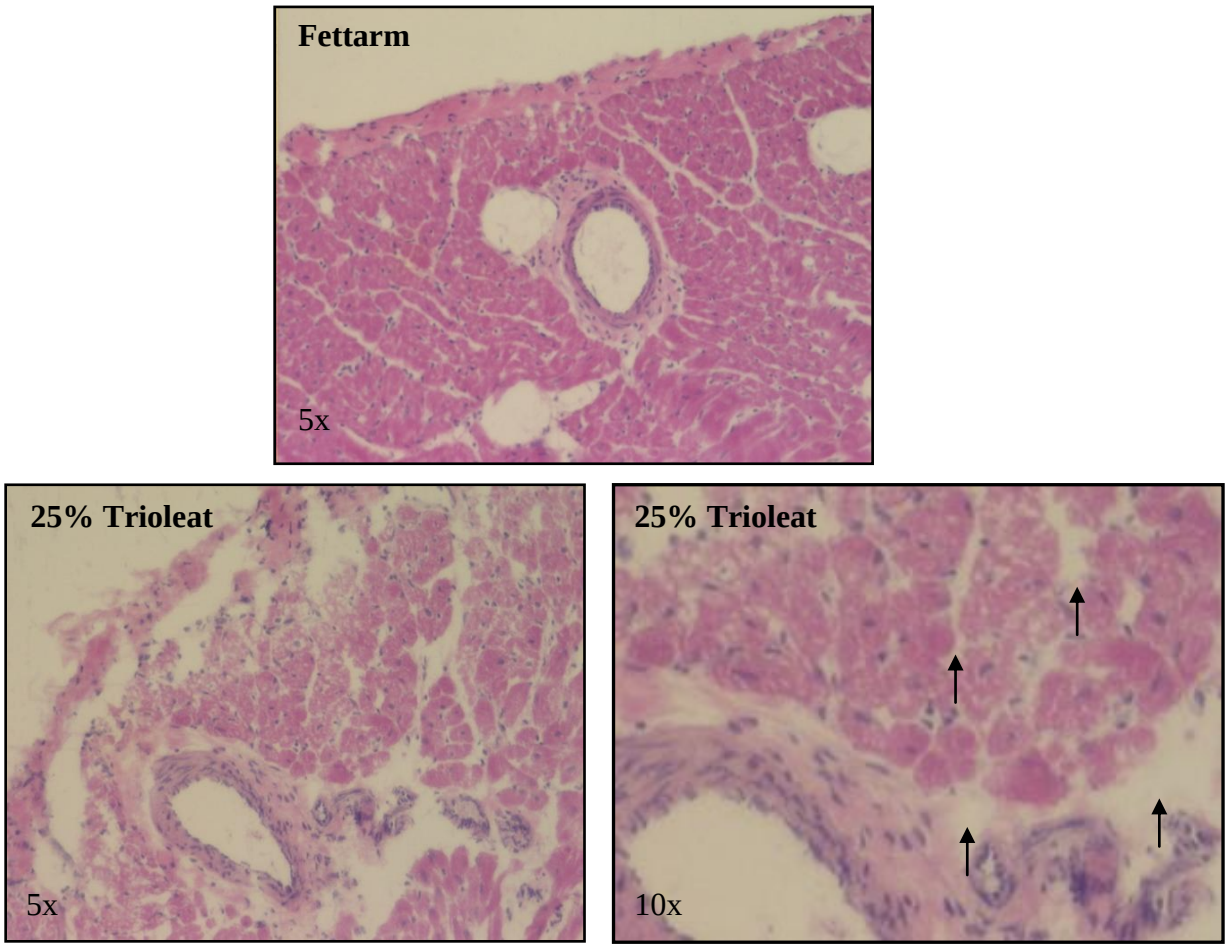


Abb. 3.6-11: Herzgewebe – Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Übersichtsfärbung demonstriert, dass das Herzmuskelgewebe von Kontrolltieren eine wesentlich kompaktere und zusammenhängende Struktur im Vergleich zu dem von mit Trioleat-gefütterten Tieren aufweist. Das Gewebe der Fett-Gruppe zeigt im äußeren Bereich des Herzens große interzelluläre Lücken auf (Pfeile). Bei beiden Gruppen konnten keine atherosklerotischen Läsionen beobachtet werden.
Die Abbildungen wurden freundlicherweise von Frau Priv. Doz. Dr. Weißen-Plenz vom Institut für Atheroskleroseforschung in Münster zur Verfügung gestellt.

3.6.6.2 Oil Red O-Färbung

Weiterhin sollte natürlich auch untersucht werden, ob sich Lipide in den Herzgeweben angereichert haben. Es konnte mit der Oil Red O-Färbung gezeigt werden, dass das Herzgewebe von mit Trioleat-gefütterten Tieren im Vergleich zur Kontrolle sehr starke Fettablagerungen aufwies (Abb. 3.6-12). Im Umfeld der Koronarien sind bei der mit Fett-gefütterten Gruppe (Pfeile) Lipidtropfen im Interstitium erkennbar. Dagegen weisen Myozyten im inneren Bereich des Herzmuskels intrazelluläre Ansammlungen von Fett auf.

Die Abbildungen wurden von Frau Priv. Doz. Dr. Weißen-Plenz vom Institut für Atheroskleroseforschung in Münster erstellt.

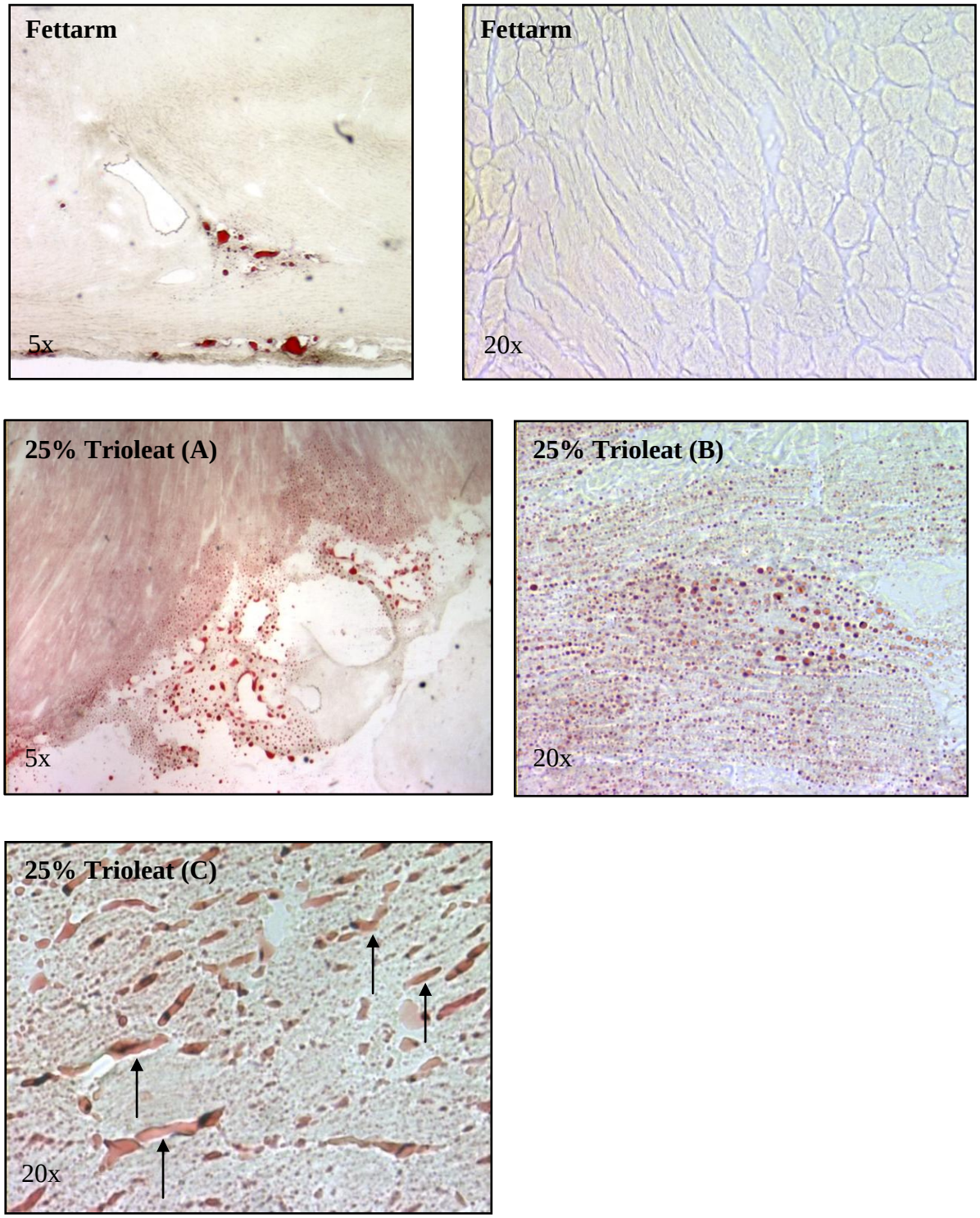


Abb. 3.6-12: Herzgewebe - Oil Red O-Färbung

Das Herzgewebe von Kontrolltieren zeigt im Bereich der Myozyten keine Lipideinlagerungen auf. Dagegen weisen die Herzen von mit Trioleat-gefütterten Meerschweinchen (A) sehr starke Fettablagerungen auf. Im äußeren Bereich des Herzmuskels um die Koronarien können Lipide zwischen den Zellen detektiert werden (C) (Pfeile). Indessen zeigen Herzmuskelzellen im inneren Teil des Ventrikels (B) eingelagertes Fett auf.
Die Abbildungen wurden freundlicherweise von Frau Priv. Doz. Dr. Weißen-Plenz vom Institut für Atheroskleroseforschung in Münster zur Verfügung gestellt.

3.6.6.3 Untersuchung der Zelldichte in den Herzschnitten

Wie bereits erwähnt, konnte gezeigt worden, dass die Herzen der mit Trioleat-gefütterten Meerschweinchen deutlich kleiner und leichter waren als die von Kontrolltieren (Abb. 3.6-4). Sollte die durch ungesättigte Fettsäuren aktivierte PP2C wirklich Apoptose induziert haben, dann müsste sich die Zelldichte in den Herzen der einzelnen Meerschweinchengruppen unterscheiden. Um diesen Punkt zu untersuchen, wurden Sektionen dieser Organe angefertigt und nach einer Markierung der Kerne mit dem Hoechst-Farbstoff, die durchschnittliche Zellzahl pro Fläche (0,05 mm^2) analysiert (Abb. 3.6-13 A).

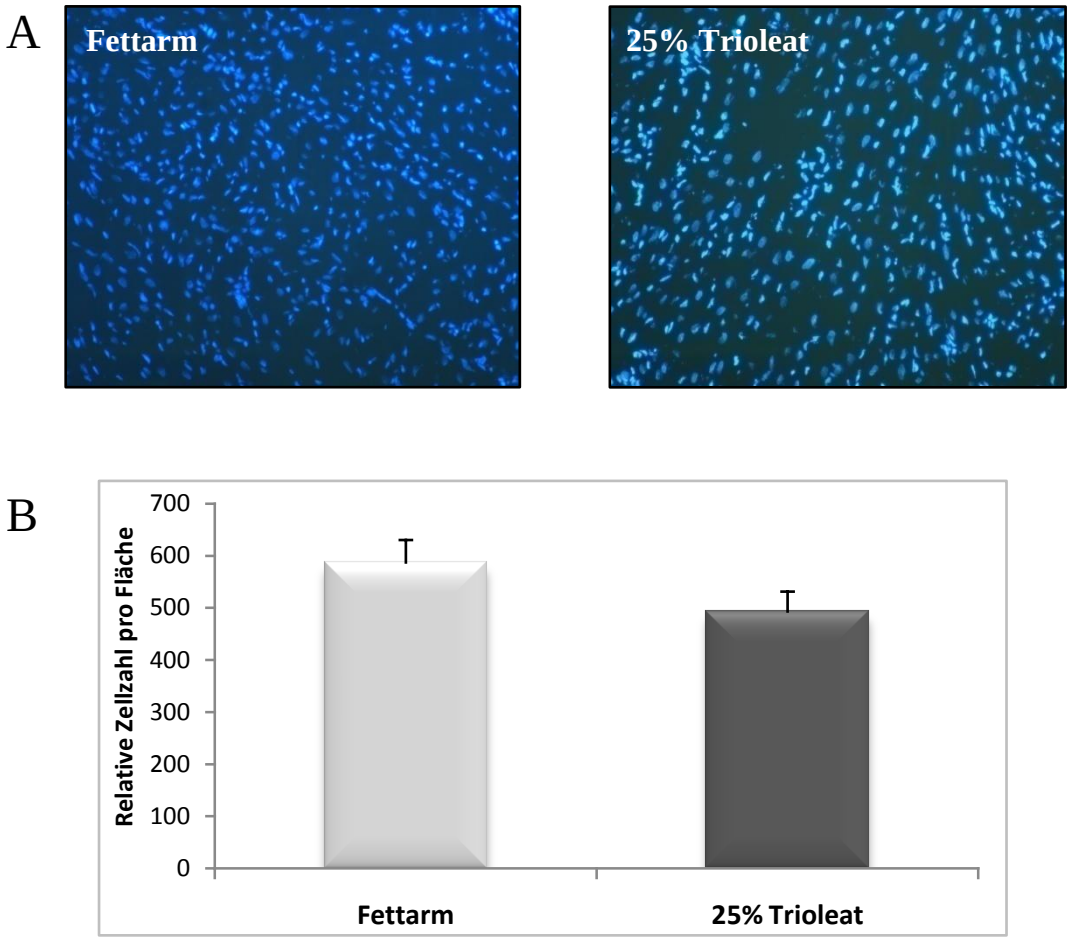


Abb. 3.6-13: Herzgewebe - Untersuchung zur Zelldichtebestimmung

Herzschnitte von mit fettarm- sowie mit Trioleat-gefütterten Meerscheinchen wurden mit dem Hoechst-Farbstoff angefärbt (A) und die durchschnittliche Zelldichte bestimmt (B). Zwar ist aufgrund einer niedrigen Probenzahl (n=3) keine statistische Auswertung möglich, die Tendenz ist jedoch klar erkennbar, dass die Zellzahl pro Fläche (0,05 mm^2) in Trioleat-gefütterten Herzen reduziert ist. Dargestellt sind die relativen Zelldichten im Herzgewebe ± S.D..
Diese Aufnahmen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Hofnagel vom Institut für Atheroskleroseforschung Münster zur Verfügung gestellt.

Aufgrund des enormen präparativen Aufwandes war es bis zur Fertigstellung dieser Arbeit nur möglich die Daten aus jeweils drei Tieren zu zeigen. Zwar ist eine deutliche Tendenz sichtbar, dass die Herzen der mit Trioleat-gefütterten Gruppe eine niedrigere Zelldichte aufweisen als die Kontrollen, jedoch ist dieser Unterschied wegen der niedrigen Probenanzahl (n=3) nicht statistisch auswertbar (Abb. 3.6-13 B).

Diese Aufnahmen wurden von Herrn Dr. Hofnagel vom Institut für Atheroskleroseforschung Münster erstellt.

3.6.6.4 Messung des Zelltodes in den Herzschnitten mit der TUNEL-Methode

Um festzustellen, dass am Herzmuskel die Zellen durch Apoptose zugrunde gegangen sind, sollte das Gewebe auf tote Zellen untersucht werden. Dazu wurde an den Herzschnitten die TUNEL-Methode angewendet. Dieser Zelltodnachweis beruht auf der Detektion von fragmentierter DNA. Herzgewebeschnitte von mit Trioleat-gefütterten Tieren zeigten im Bereich der Kardiomyozyten eine deutlich höhere Zahl TUNEL-positiver Zellen (Pfeile) im Vergleich zu Kontrolltieren auf (Abb. 3.6-14). Dagegen konnte am Endothel der Koronarien kein Zelltod detektiert werden. Als Positiv- bzw. Negativkontrolle wurden Schnitte verwendet, die entweder mit DNase I vorinkubiert oder ohne das rTdT-Enzym (*recombinant terminal deoxynucleotidyl transferase*) behandelt wurden.

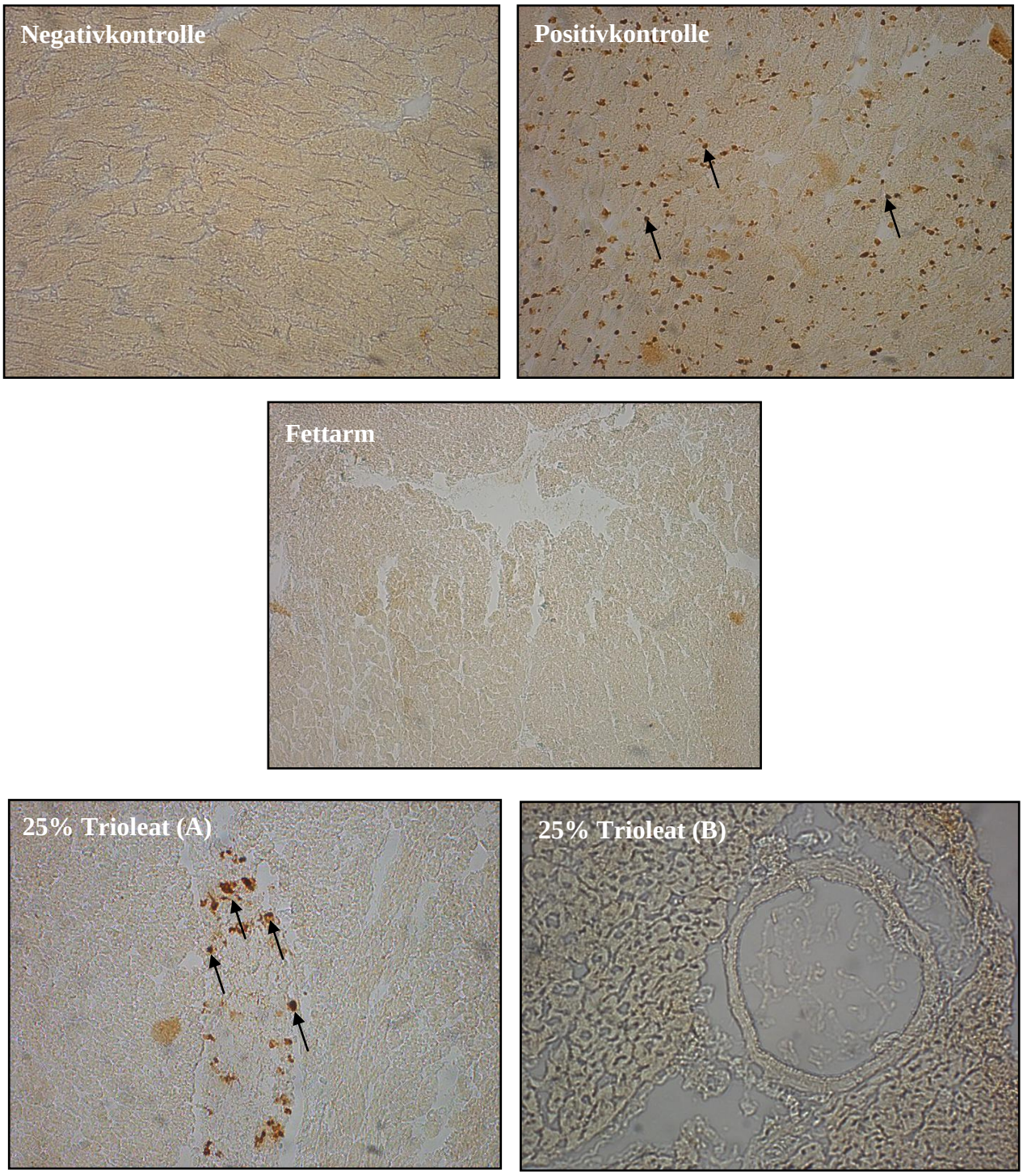


Abb. 3.6-14: Herzgewebe - TUNEL-Färbung

Im Herzgewebe von Meerschweinchen wurde zum Nachweis apoptotischer Zellen die DNA-Fragmentations-Färbemethode durchgeführt. Herzgewebe von mit Trioleat-gefütterten Tieren zeigte TUNEL-positive Zellkerne (A) (Pfeile) auf. Dagegen waren bei Kontrolltieren keine DNA-fragmentierten Zellen zu beobachten. Im Bereich von Koronararterien (B) von mit Trioleat-gefütterten Meerschweinchen konnten keine toten Zellen detektiert werden. Als Positivkontrolle dienten Herzschnitte, die vorher mit DNase I inkubiert wurden. Negativkontrolle wurde ohne das rTdT-Enzym angefärbt.

4 Diskussion

4.1 Die Grundlagen sowie die Zielsetzung dieser Arbeit

Die vorangegangenen Arbeiten

Die reversible Proteinphosphorylierung stellt den bedeutendsten posttranslationalen Regulationsmechanismus in der Signaltransduktion der Zelle dar. Lange Zeit wurden vor allem die zahlenmäßig dominierenden Proteinkinasen untersucht, die scheinbar spezifischer als die Proteinphosphatasen agierten (Cohen, P. und Cohen, 1989). Wissenschaftliche Studien belegten jedoch, dass diese Aussage nicht zutrifft: Die vorher in ihrer Untersuchung vernachlässigten Phosphatasen sind ebenso sehr wichtige regulatorische Enzyme, die durchaus eine differenzierte Substratspezifität besitzen und bedeutende Signalwege kontrollieren (Hunter, 1995; Gee und Mansuy, 2005; MacKeigan *et al.*, 2005).

Die physiologische Rolle der Proteinphosphatase 2C (PP2C), die zur Familie der magnesiumabhängigen Phosphatasen gehört, wurde gleichfalls kritisch betrachtet. Schließlich benötigte man doch für die volle enzymatische Aktivierung unwahrscheinlich hohe Magnesium- bzw. Mangankonzentrationen im millimolaren Bereich, die im Körper nie erreicht werden (Hiraga *et al.*, 1981; Wang, Y. *et al.*, 1995). Frau Prof. Dr. Klumpp und ihren Mitarbeitern gelang jedoch 1998 eine revolutionäre Beobachtung: Sie konnten in gezielten Experimenten feststellen, dass diese enorme Abhängigkeit in Anwesenheit von freien Fettsäuren mit bestimmten Strukturmerkmalen nicht beobachtet werden konnte (Klumpp *et al.*, 1998). Selbst bei einem niedrigen Magnesiumgehalt, der im Organismus vorkommt, konnten sowohl die PP2Cα als auch die PP2Cβ maximal aktiviert werden. Dieses Ergebnis war bahnbrechend, denn es zeigte, dass diese Enzyme auch unter physiologischen Bedingungen aktiv sein und somit auch *in vivo* eine große Bedeutung haben könnten.

Fettsäuren, die in der Lage sind diese Enzyme zu stimulieren, sollten folgende formelle Eigenschaften aufweisen: Sie müssen eine ausreichende Lipophile mit einer Kettenlänge von > 15 C-Atomen sowie eine freie Carboxylgruppe haben. Ferner ist eine oxidierbare, ungesättigte, *cis*-konfigurierte Doppelbindung in etwa der Mitte des Moleküls für die Aktivierung der Phosphatasen notwendig. Diese Voraussetzungen treffen für Ölsäure, Linolsäure, Arachidonsäure und Docosahexaensäure (DHA) zu, während gesättigte Fettsäuren wie z.B. Stearin- oder Palmitinsäure sowie das *trans*-Isomer der Ölsäure, die Elaidinsäure, die PP2C nicht aktivieren (Klumpp *et al.*, 1998).

Nachdem die Aktivatoren dieser Enzyme nun definiert waren, konnten die Arbeitskreise von Herrn Prof. Dr. Dr. Krieglstein und Frau Prof. Dr. Klumpp eine weitere wichtige Entdeckung machen: Die Fettsäuren, welche in der Lage waren die PP2C Aktivität zu steigern, konnten ebenfalls den apoptotischen Zelltod in Neuronen auslösen (Klumpp *et al.*, 2002b). Dieses Phänomen war ein weiterer höchstinteressanter Befund, denn es belegte eine eventuelle kausale Verknüpfung zwischen der Aktivierbarkeit der Phosphatasen und der Apoptoseinduktion in diesen Zellen. Jedoch gab es eine Unsicherheit bei den Experimenten in Neuronen: Hier werden keine hohen Fettsäurekonzentrationen erreicht, die ausreichen würden, um die Aktivität der PP2C zu steigern. Neuronale Zellen beziehen ihre Energie fast ausschließlich aus Kohlenhydraten, was die Relevanz der Fettsäure-induzierten Apoptose hier fragwürdig macht. Aus diesem Grunde wurden die Versuchsserien nun auf Endothelzellen übertragen.

Das Endothel stellt die physiologische Barriere zwischen Blut und Gewebe dar. Die Lipoproteinlipase (LPL) ermöglicht durch Hydrolyse der Blutlipide die Aufnahme von Fettsäuren im Organismus. Am Endothel entstehen also permanent hohe Fettsäurekonzentrationen, die theoretisch die PP2C aktivieren und im Folgenden deren apoptotischen Zelltod initiieren könnten. Diese Zellen wurden im Rahmen vorhergehender sowie der vorliegenden Arbeit mit großem Augenmerk untersucht. Durch Frau Dr. Hufnagel und Frau Dr. Schwarz konnte gezeigt werden, dass die in Neuronen beobachtete Korrelation ebenfalls für Endothelzellen und Makrophagen galt (Hufnagel *et al.*, 2005; Hufnagel *et al.*, 2007). Schließlich konnte dieses Ergebnis mit der Methodik der RNA-Interferenz (RNAi) durch eine Herunterregulation der PP2C sowie eine Reduktion der Fettsäure-induzierten Apoptoserate kausal belegt werden (Schwarz *et al.*, 2006) (Kapitel 1.2.3). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Fettsäuren aus humanen Lipoproteinen in der Lage waren den apoptotischen Zelltod in kultivierten Endothelzellen auszulösen. Diese isolierten Lipide konnten ebenfalls die PP2C *in vitro* stimulieren (Hufnagel, 2005; Hufnagel *et al.*, 2005).

Durch Frau Dr. Dworak konnte bereits die Kristallstruktur der PP2Cβ aufgeklärt werden (Dworak, 2006), die Ähnlichkeiten zur bereits bekannten α-Isoform zeigt (Das, A. K. *et al.*, 1996). Während die PP2Cα zwei Manganionen bindet, konnte bei der PP2Cβ nur ein Ion detektiert werden. Des Weiteren wurde beobachtet, dass die PP2Cβ als ein Homodimer vorliegt. Es ist bis heute jedoch nicht bekannt über welchen genauen Mechanismus die PP2C-Aktivierung erfolgt. Wahrscheinlich erscheint, dass die Fettsäuren durch eine spezifische Anlagerung an eine Bindetasche des Proteins eine Konformationsänderung des Enzyms herbeiführen. Um diese Theorie näher zu beleuchten, wurde bereits versucht eine

Kokristallisation der PP2C mit Ölsäure zu ermöglichen. Dies ist bis jetzt jedoch leider noch nicht gelungen.

In der Literatur existieren bezüglich der apoptoseauslösenden Eigenschaften von Ölsäure und anderen ungesättigten Fettsäuren im Vergleich zu gesättigten Fettsäuren kontroverse Publikationen. Sowohl apoptoseauslösende (Leaver *et al.*, 2002; Cheng, J. *et al.*, 2003; Healy *et al.*, 2003) als auch vor Apoptose schützende Eigenschaften von ungesättigten Fettsäuren wie Ölsäure sind beschrieben (Eitel *et al.*, 2002; Hardy *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2003; Hardy *et al.*, 2005). Gesättigte Fettsäuren riefen meistens entsprechend konträre Effekte hervor. Diese unterschiedlichen Beobachtungen resultieren aus den eingesetzten Konzentrationen der Fettsäure, dem verwendeten Zelltyp sowie anderen störenden Einflüssen und widersprechen unseren Ergebnissen nicht.

Interessanterweise konnte, sowohl die PP2C-Aktivierung als auch die Apoptoseinduktion durch Ölsäure, nach Zusatz von Stearinsäure (18:0) aufgehoben werden (Hufnagel *et al.*, 2007). Möglicherweise konkuriert die gesättigte Fettsäure kompetetiv mit der ungesättigten um die Bindestelle an der Phosphatase. Diese Hypothese könnte ebenfalls durch eine Kokristallisation der PP2C mit den Fettsäuren geklärt werden.

Dennoch blieb die Frage offen, über welchen Mechanismus die Fettsäure-bedingte Aktivierung der PP2C die Apoptose auslöst. Dieser Fragestellung folgend konnte im Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. Klumpp ein weiteres wichtiges Substrat der PP2C identifiziert werden, das proapoptotische Mitglied der Bcl-2-Familie Bad. Es konnte eindrucksvoll gezeigt werden, dass die PP2C Bad dephosphorylieren kann (Klumpp *et al.*, 2003b; Klumpp *et al.*, 2004).

Weiterhin konnte nach einer Ölsäureinkubation in neuronalen Zellen gezeigt werden, dass der Phosphorylierungsstatus von Bad abnahm (Klumpp *et al.*, 2003b; Zhu *et al.*, 2005). Ein Beleg dafür, dass die PP2C aktiv war. Das dephosphorylierte Bad kann anti-apoptotische Bcl-2-Proteine binden, woraufhin proapoptotisches Bax frei vorliegt, welches nach einer Oligomerisierung Membranporen an der Mitochondrienwand erzeugen kann. Dies führt schließlich zu einem Ausstrom von Cytochrom c sowie anderen apoptoseauslösenden Faktoren ins Zytosol und dadurch zur Aktivierung des Suizidprogramms (Yang *et al.*, 1995; Zha *et al.*, 1997; Ruvolo *et al.*, 2001; Hinds *et al.*, 2007).

Zielsetzung und Aufgabenstellung dieser Arbeit

Die vorliegende Arbeit sollte die physiologische Situation der Fettsäurefreisetzung am Endothel durch gezielte Experimente näher beleuchten. Es sollte untersucht werden, ob die Endothelzellen auch unter nahezu physiologischen Bedingungen durch freie ungesättigte Fettsäuren geschädigt werden konnten. Die Arbeiten zuvor deuten zwar auf eine Rolle der Fettsäure-induzierten Apoptose im Organismus hin, jedoch wurden einige Fragen nicht beantwortet: Werden die für eine Apoptoseinduktion notwendigen Fettsäurekonzentrationen überhaupt an Endothelzellen erreicht? Können daraufhin diese Fettsäuren wirklich die PP2C erreichen und aktivieren?

Der Schwerpunkt lag in der Ergründung des Mechanismus der Fettsäurefreisetzung in der Zellkultur sowie der Relevanz der Apoptoseinduktion in kultivierten Endothelzellen und im intakten Versuchstier.

Die Konzentrationsfrage kann nicht einfach durch eine Messung gelöst werden. Zwar werden im Blut Unmengen an Fettsäuren transportiert, doch sind sie zum größten Teil in veresterter Form, also nicht frei, in Lipoproteinen zu finden. Auch spielt das Albumin keine unwesentliche Rolle, da es im Blut immerhin in einer Konzentration von 0,6 mM vorkommt und in der Lage ist 0,1-0,2 mol Fettsäuren pro mol Protein zu transportieren (Fredrickson und Gordon, 1958). Es gibt in der Literatur unterschiedliche Konzentrationsangaben zu freien, nicht veresterten Fettsäuren im Blut. Diese schwanken postprandial und nüchtern zwischen 300 µM bei Gesunden und bis zu 700 µM bei Diabetikern (Wolever und Mehling, 2003; Mook *et al.*, 2004; Bajaj *et al.*, 2005; Hadigan *et al.*, 2006). Diese relativ hohen Werte würden theoretisch ausreichen, um Apoptose in Endothelzellen auszulösen. Bedenkt man jedoch, dass Fettsäuren reversibel an Serumproteinen spezifisch binden können, wird es sehr schwierig vernünftige Konzentrationen an freien Fettsäuren am Endothel großer Arterien vorherzusagen bzw. genau zu bestimmen.

Im Grunde müsste man sogar die Konzentration der Fettsäuren in der Zelle selbst messen, um die *in vitro* gezeigten Ergebnisse zur PP2C Aktivierung zu belegen. Doch selbst das würde zur Lösung des Rätsels nicht ausreichen, denn es wäre auch notwendig die Konzentration am Enzym in der Zelle zu analysieren, ein nahezu unmögliches Unterfangen.

In frühen atherosklerotischen Läsionen (*fatty streaks*) findet man bereits in jungen Jahren eine massive Ansammlung von Makrophagen im subendothelialen Raum der Intima. Diese Zellen produzieren sehr hohe Mengen an LPL, die wiederum an die luminale Seite des Endothels transloziert werden und dort Fettsäuren aus Lipoproteinen freisetzen. Von Endothelzellen aufgenommen, könnten sie apoptotischen Zelltod auslösen. Um die

beschriebenen vaskulären Verhältnisse in der Arterie nachzuahmen, sollten humane Endothelzellen und Makrophagen miteinander kokultiviert und mit menschlichen Lipoproteinen behandelt werden.

Daher war die Aufgabenstellung dieser experimentellen Arbeit ein System zu entwickeln, welches die Konzentrationsfrage zwar nicht beantworten kann, jedoch durch Einsatz eines Zellmodells und Lipiden die Physiologie im Organismus möglichst nahe imitiert. Es sollte möglich sein zu demonstrieren, dass Fettsäuren, die nach Spaltung der Triglyceride in Lipoproteinen durch die LPL von kultivierten Makrophagen, eine derartig hohe Konzentration erreichen würden, dass Endothelzellen Apoptose erleiden. Dieses Ergebnis würde demnach darauf hindeuten, dass physiologische Lipoproteine, Zellen und die durch Makrophagen synthetisierte LPL eine ausreichende Fettsäurekonzentration am Endothel erzeugen könnten, um über die PP2C den programmierten Zelltod auszulösen.

Zweites Ziel der Experimente bestand in der Untersuchung der Auswirkungen einer Ölsäure-reichen Diät *in vivo*. Das Endothel im Organismus ist eine komplexe einlagige Zellstruktur, die alle Blutgefäße auskleidet, von den Kapillaren über die Venen bis zu den Arterien. Experimente in der Zellkultur können nur bedingt die realen Bedingungen am Gefäßsystem simulieren, was die Notwendigkeit eines *in vivo* Versuches ausmacht. Da die Atherogenese ein langwieriger und langsamer Prozess ist, kommen Experimente an isolierten Blutgefäßen nicht in Frage.

Der Tierversuch sollte an Meerschweinchen durchgeführt werden. Diese Spezies wird in der Grundlagenforschung weltweit zur Untersuchung der Atherogenese verwendet. Im Vergleich zu anderen Nagetieren weisen Meerschweinchen bezüglich des Lipidmetabolismus Ähnlichkeiten zum Menschen auf und eignen sich daher gut als Atherosklerosemodell (Fernandez und Volek, 2006).

Ziel des Versuchsvorhabens war die Untersuchung der atherosklerotischen Läsionsentstehung nach Verabreichung einer fettreichen Diät. Dafür sollten die Tiere vermehrt mit Ölsäure-reichen Triglyceriden (Glycerol-Trioleat) gefüttert werden. Ähnlich konzipierte Fütterungsversuche an diesen Tieren wurden in der Literatur bereits beschrieben (Cryer *et al.*, 1978; Mattacks *et al.*, 2002). Um störende protektive Einflüsse der weiblichen Sexualhormone auf das Endothel zu vermeiden, sollte dieses Experiment an männlichen Meerschweinchen durchgeführt werden.

4.2 Untersuchungen in der Zellkultur

Die Expression der beiden PP2C-Isoformen sowie dem Substrat Bad in den Zellen ist die Voraussetzung für unsere Hypothese. Ungesättigte Fettsäuren mit besonderer Struktur aktivieren die PP2C, die wiederum das proapoptotische Bad dephosphorylieren kann. Das Verschieben des Phosphorylierungsstatus dieses Bcl-2-Familienmitglieds zu Gunsten des dephosphorylierten Bad führt zu einer Abnahme von freien antiapoptotischen Proteinen in der Zelle, wodurch deren zellschützende Eigenschaften verloren gehen und wie bereits beschrieben, Apoptose ausgelöst werden kann.

Es konnte gezeigt werden, dass PP2Cα, PP2Cβ sowie Bad in HUVECs und THP-1-Zellen exprimiert werden. Mit Hilfe der Immunzytochemie wurden PP2Cβ und Bad im Zytosol der untersuchten Zellen im gleichen Kompartiment kolokalisiert nachgewiesen, was eine Interaktion dieser Proteine möglich macht.

4.2.1 Apoptoseinduktion in Endothelzellen

Fettsäuren mit bestimmter Struktur können die PP2C aktivieren und induzieren Apoptose in Endothelzellen. Es zeigte sich, dass Ölsäure den apoptotischen Zelltod in HUVECs auslösen kann. Den gleichen toxischen Effekt zeigten Linolsäure, eine Omega-6-Fettsäure sowie DHA, eine Omega-3-Fettsäure, in diesem Konzentrationsbereich (Hufnagel *et al.*, 2005). Diese Lipide konnten ebenfalls die PP2C *in vitro* aktivieren (Klumpp *et al.*, 1998). Dagegen zeigten die Elaidinsäure, das *trans*-Isomer der Ölsäure, die gesättigte Stearinsäure sowie der Ölsäuremethylester keine schädigenden Eigenschaften und aktivierten die PP2C nicht (Hufnagel *et al.*, 2005).

Die Fettsäurekonzentrationen für die Apoptoseinduktion in der Zellkultur lagen für Neuronen bei ≥ 100 µM Ölsäure im serumfreien Medium (Klumpp *et al.*, 2002b; Grzeschik, 2003; Schwarz, 2004), während für Endothelzellen Konzentrationen ≥ 200 µM in 2% FCS-haltigem Medium notwendig waren (Hufnagel *et al.*, 2005). Die Schwellenkonzentration konnte durch Reduktion des Serumanteils im Kulturmedium weiter bis auf ≥ 100 µM gesenkt werden. Dieser Effekt ist auf eine mehr oder weniger spezifische Fettsäurebindungskapazität der Proteine im zugesetzten Serum zurückzuführen. So besitzt das bereits erwähnte Albumin mehrere Bindestellen für Fettsäuremoleküle. Ölsäure bindet mit hoher Affinität an diese Strukturen und wird somit dem „System“ entzogen (Bhattacharya *et al.*, 2000; Choi, J. K. *et al.*, 2002a). Die zellprotektiven Effekte von Serumzusätzen beruhen also auf einer erhöhten

Bindung der Fettsäure an Proteinstrukturen im Medium mit einer daraus resultierenden Erniedrigung der freien Fettsäurekonzentration.

Die Fettsäure-induzierte Apoptose setzte schlagartig bei einer bestimmten Konzentration ein. Man kann den Verlauf der Schädigung mit dem alles oder nichts Prinzip vergleichen. Bis zur Schwellenkonzentration haben die Zellen die Fettsäureinkubation sehr gut vertragen, es bildeten sich lediglich Vakuolen-artige Lipidtropfen im Zytosol aus, die im Lichtmikroskop sichtbar waren. Beim Überschreiten einer bestimmten Konzentration wurde meistens ein Großteil im Zellverband durch Apoptose geschädigt. Somit war es schwierig bis unmöglich eine bestimmte Apoptoserate der Zellen im mittleren oder unteren Bereich durch Einhalten bestimmter Versuchsbedingungen zu bekommen. Für die Untersuchung zellprotektiver Substanzen sollte eine Schädigung jedoch eine nicht zu hohe Apoptoserate aufweisen, was den schützenden Effekt eventuell verschleiern würde. Deswegen wurden zwei weitere Schädigungsmodelle für die Zellkultur etabliert.

Staurosporin, ein mikrobieller Inhaltsstoff mit starker, jedoch unspezifischer inhibitorischer Potenz auf Proteinkinasen, ist ein Alkaloid, das relativ selektiv Apoptose auslösen kann. Eine Behandlung der Endothelzellen mit diesem Apoptoseinduktor im Konzentrationsbereich zwischen 50 bis 300 nM für 5 bis 21 h erhöhte signifikant die Zahl toter Zellen konzentrations- und zeitabhängig. Bereits nach einer Behandlung mit 50 µM Staurosporin für 5 h konnte eine moderate Apoptoserate im Bereich von etwa 20% erreicht werden.

Eine weitere relativ schonende Methode Apoptose auszulösen ist der Entzug des Serumanteils im Kulturmedium der Zellen, auch Serumdeprivation genannt. Die Entfernung des essentiellen Protein-, Nährstoffanteils und vor allem der protektiven Wachstumsfaktoren führt zu einer Minderversorgung der Zellen, die daraufhin aufhören zu proliferieren, einen Wachstumsstop erleiden und mit der Zeit langsam apoptotisch absterben.

Es wurden zwei unterschiedliche Arten von serumfreien Medien verwendet. Neben dem OptiMEM wurde das normale Endothelzellmedium, jedoch ohne das Serum-enthaltende *supplement pack*, eingesetzt. Es zeigte sich, dass ein Entzug des Serums die Zellen erst nach etwa 48 h signifikant schädigen konnte. Dabei erwies sich das serumfreie Endothelzellmedium als die bessere Variante im Vergleich zum OptiMEM. Hier setzte die Schädigung der Zellen weniger schlagartig ein und war dadurch besser steuerbar. Möglicherweise beinhaltet das Medium einige für Endothelzellen günstige Inhaltstoffe, die im OptiMEM nicht vorhanden sind. Da die genaue Rezeptur der beiden kommerziell erhältlichen Medien nicht bekannt ist, kann man an dieser Stelle leider nur spekulieren.

Der Vorteil der Staurosporinschädigung war die kurze Behandlungsdauer, während die Serumdeprivation zwar eine lange Inkubationszeit benötigte, dabei aber sehr gut steuerbar war.

4.2.2 Untersuchungen zur Protektion von Endothelzellen

Ginkgo biloba Inhaltsstoffe

In dieser Arbeit sollten nicht nur schädigende Agenzien betrachtet werden, sondern auch untersucht werden, ob bestimmte Substanzen die Endothelzellen zu schützen in der Lage waren. Wenn die Fettsäure-induzierte Apoptose der Endothelzellen eine Relevanz in der Atherogenese hat, könnten diese Stoffe einer Atherosklerose-Entwicklung präventiv entgegenwirken.

Ginkgo biloba, der Ginkgobaum, ist die älteste lebende Baumart der Welt. Ginkgoinhaltsstoffe sind seit Jahrhunderten ein wichtiger Bestandteil der traditionellen chinesischen Medizin, und in den letzten Jahren haben sie als Phytopräparate und Nahrungsergänzungsmittel weltweit breiten Absatz gefunden. Zu den postulierten Wirkungen der Ginkgo biloba-Auszüge gehören die Verbesserung der Gedächtnisleistung, die Steigerung der Blutzirkulation und eine Verzögerung der Alzheimer-Demenz. Die Terpenlactone, Ginkgolide und Bilobalid sind die wichtigsten Wirkstoffe des Blattextraktes EGb 761 der Firma Schwabe. In vielen *in vitro* sowie *in vivo* Untersuchungen konnten neuroprotektive Effekte von Ginkgo belegt werden (Ahlemeyer und Krieglstein, 2003; Kurz und Van Baelen, 2004; Massieu *et al.*, 2004). Weiterhin ist bekannt, dass die Terpenlactone einen antagonistischen Effekt an PAF-Rezeptoren (*platelet-activating factor-receptors*) aufweisen und dadurch ihren Blutgerinnungshemmenden sowie neuroprotektiven Effekt erzielen. Zusätzlich scheinen die Inhibition am Glycin-Rezeptor sowie der Einfluss auf periphere Benzodiazepin-Rezeptoren für die neuronale Wirkung verantwortlich zu sein. Des Weiteren werden den Ginkgo-Wirkstoffen auch antioxidative Eigenschaften nachgesagt (Stromgaard und Nakanishi, 2004).

Interessanterweise beinhaltet die Arzneipflanze auch Ginkgolsäuren, welche die PP2C aktivieren und Apoptose in Neuronen und Endothelzellen auslösen (Ahlemeyer *et al.*, 2001b; Hufnagel, 2005). Der Molekülbau dieser Substanzen passt hervorragend zu der zuvor beschriebenen Struktur-Wirkungs-Beziehung der PP2C-Aktivatoren. Sie beinhalten eine lange lipophile ungesättigte, *cis*-konfigurierte Kette, die mit einem Salicylsäurerest verbunden ist. Übrigens werden die toxischen Ginkgolsäuren aus dem Extrakt entfernt, um Vergiftungen auszuschließen.

In der vorliegenden Arbeit wurde unter anderem als Nebenprojekt untersucht, ob der Gesamtextrakt EGb 761, aber auch die einzelnen Inhaltsstoffe, eine Endothelzell-protektive Potenz aufweisen. Dazu wurden HUVECs mit Ölsäure sowie den Ginkgo-Wirkstoffen in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Ölsäure-induzierte Schädigung durch EGb 761, Ginkgolid A, Ginkgolid B sowie Bilobalid konzentrationsabhängig und signifikant reduziert werden konnte.

Diese Ergebnisse unterstreichen die zuvor publizierten Daten, wo ein neuroprotektiver Effekt beschrieben wurde (Defeudis, 2002; Ahlemeyer und Krieglstein, 2003; Boonkaew und Camper, 2005). Es scheint, als ob die Ginkgo-Wirkstoffe allgemein zellprotektive Eigenschaften aufweisen und somit auch Endothelzellen vor Apoptose schützen können. Der Einsatz dieser Phytopharmaka ist zur Vorbeugung einer endothelialen Dysfunktion gerechtfertigt. Möglicherweise weisen diese Stoffe eine direkte Interaktion mit der PP2C auf, indem sie z.B. die Bindung der Fettsäuren an das Enzym verhindern. Über diese Aussage kann aber nur spekuliert werden, da dieser Hypothese nicht weiter nachgegangen wurde.

Die durchgeführten Untersuchungen bekräftigen die Rolle der Ginkgo biloba-Wirkstoffe in der Therapie degenerativer Erkrankungen wie Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson sowie Atherosklerose.

Humane Lipoproteine

Lipide, zu denen Cholesterol und seine Ester, Fettsäuren, Triglyceride, Phospholipide sowie lipophile Vitamine zählen, können aufgrund ihrer schlechten Löslichkeit nur eingeschränkt im Blut transportiert werden. Sie werden entweder gebunden an Proteinen, wie etwa Albumin, oder als mizellare, proteinhaltige Komplexe von Gewebe zu Gewebe befördert. Diese letztgenannten Strukturen werden als Lipoproteine bezeichnet und weisen eine differenzierte Lipidzusammensetzung, Dichte, Partikelgröße sowie Funktion auf. Ferner ist ihre Rolle in der Atherogenese unterschiedlich und zum Teil konträr. So ist das cholesterolreiche LDL ein unabhängiger Risikofaktor für die Atheroskleroseentstehung während das proteinreiche HDL ein schützender Faktor ist (Lusis, 2000).

Es sollte am Zellkulturmodell untersucht werden, ob einzelne Lipoproteinfraktionen aus dem menschlichen Blut in der Lage sind die Apoptoseinduktion in Endothelzellen durch ungesättigte Fettsäuren zu reduzieren.

Wie bereits in früheren Experimenten im Arbeitskreis von Prof. Dr. Dr. Krieglstein demonstriert werden konnte, zeigten native Lipoproteinfraktionen keinen schädlichen Effekt auf die Endothelzellen (Hufnagel *et al.*, 2005). In der vorliegenden Arbeit wurden HUVECs

jedoch mit Ölsäure und zusätzlich den isolierten Lipidfraktionen VLDL, LDL und HDL inkubiert. Ölsäure verursachte eine massive Zellschädigung, die durch LDL im Konzentrationsbereich bis 150 mg/dl nicht beeinflusst wurde. Dagegen wiesen Zellen, die simultan mit 100 mg/dl VLDL behandelt wurden, eine leicht reduzierte Apoptoserate auf. Der deutlichste zellprotektive Effekt konnte beim HDL beobachtet werden. Physiologische Konzentrationen des Lipoproteins (50 mg/dl) reduzierten die Zahl apoptotischer Zellen bis auf Kontrollniveau.

In der Literatur ist viel über die günstigen Eigenschaften des HDL publiziert worden. Der Proteinanteil dieser Partikel ist etwa gleich hoch wie der Lipidanteil, wodurch sie in der Lage sind eine hohe Menge an freien Lipiden aus peripheren Geweben aufzunehmen und zurück zur Leber zu transportieren. Dieser reverse Transport, vor allem des Cholesterols aus atherosklerotischen Läsionen, ist einer der entscheidenden protektiven Faktoren von HDL (Assmann und Gotto, 2004). Weiterhin zeigen die Sphingolipide der HDL-Partikel einen antioxidativen, vasodilatativen sowie einen Endothel-schützenden Effekt auf. Der antiapoptotische Einfluss dieser Stoffe scheint über eine Aktivierung der Proteinkinase B (Akt) abzulaufen, die wiederum das proapoptotische Bad zu phosphorylieren vermag (Nofer *et al.*, 2001). Akt ist der funktionelle Gegenspieler der PP2C, während die Kinase das Bad phosphoryliert und damit das Überleben der Zelle garantiert, führt die Dephosphorylierung des Proteins durch die Phosphatase zum apoptotischen Zelltod. Dieser Mechanismus erklärt die reduzierte Apoptoserate in HUVECs nach einer Kombinationsbehandlung mit HDL und Ölsäure. Es ist aber auch nicht auszuschließen, dass die Ölsäure unspezifisch an das Lipoprotein binden kann und sich dadurch die relative freie Konzentration reduziert. Weiterhin kann man vermuten, dass der beobachtete schwach protektive Effekt der VLDL-Fraktion allein auf dieser Interaktion mir der Fettsäure zurückzuführen ist.

Zur Untersuchung dieser Hypothese sollte die Lipidaufnahme in die Endothelzellen nach einer Behandlung mit Lipoproteinen und Ölsäure mittels Nilblau-Färbung überprüft werden.

Es zeigte sich, dass eine Inkubation der HUVECs durch natives VLDL bzw. LDL zu einer starken Färbung der Zellen führte. Es ist bekannt, dass Endothelzellen diese Lipoproteine über entsprechende Rezeptoren aufnehmen können (van Berkel *et al.*, 1995; Niemeier *et al.*, 1996; Goudriaan *et al.*, 2004). Dagegen führte die Alleininkubation mit HDL zu keiner messbaren Lipidakkumulation in den Zellen. Nach einer simultanen Ölsäurebehandlung mit VLDL, LDL und HDL waren die HUVECs deutlich mit Lipiden beladen. Doch während die durch VLDL und LDL behandelten Zellgruppen zum großen Teil

geschädigt waren, zeigten HDL-inkubierte Zellen zwar eine starke Färbung aber keine apoptotische Morphologie. Dieses Experiment belegte, dass der protektive Effekt der HDL-Fraktion nicht nur durch eine Bindungsfähigkeit der schädlichen Ölsäure zustande kommen kann, sondern andere, vorher erwähnte, schützende Mechanismen zugrunde liegen.

Docosahexaensäure, eine Omega-3 Fettsäure

DHA ist eine essentielle Fettsäure, die als Bestandteil von Phospholipiden eine sehr hohe Konzentration im Gehirn und vor allem in der Retina aufweist. Diese Fettsäure ist für die Entwicklung dieser Organe sehr wichtig. So zeigten Laboraffen während einer Fütterung mit DHA-freien Futter Sehschwäche, kognitive Probleme und stereotype Verhaltensweisen auf (SanGiovanni und Chew, 2005).

Omega-3-Fettsäuren haben allgemein einen guten Ruf als gesunde, protektive Stoffe. Ernährungswissenschaftler empfehlen heutzutage eine hohe Zufuhr dieser Lipide. So soll fetter Fisch, der Hauptlieferant der Omega-3-Fettsäuren, mehrmals die Woche konsumiert werden. Dabei ist die Rolle dieser Fettsäuren in der Pathogenese gar nicht einfach zu beantworten, und viele Empfehlungen basieren nicht auf fundierten wissenschaftlichen Erkenntnissen. Es gibt Studien, die zu belegen scheinen, dass vor allem Eicosahexaensäure sowie DHA marinen Ursprungs eine schützende Funktion auf das kardiovaskuläre System aufweisen und sogar neuroprotektiv agieren können (Calon *et al.*, 2004; Ruxton *et al.*, 2004; Akbar *et al.*, 2005; Marszalek und Lodish, 2005; SanGiovanni und Chew, 2005). Die beobachteten Effekte der Omega-3-Fettsäuren kommen durch Einwirkung auf die Membranfluidität und Ionenkanäle zustande (Akbar *et al.*, 2005; Jude *et al.*, 2006). Weiterhin konkurrieren Omega-3-Fettsäuren kompetetiv mit den Omega-6-Derivaten in der Prostaglandin- sowie Leukotriensynthese. Dieser Vorgang führt zu einem anderen Produktprofil der antiinflammatorischen, vasodilatierenden und antithrombotischen Mediatoren (Simopoulos, 2002). Im Gegensatz dazu wurden aber auch ungünstige, potentiell atherogene Eigenschaften der mehrfach ungesättigten Fettsäuren beschrieben. So zeigen diese leicht oxidierbaren Stoffe bei ungenügender Antioxidantienzufuhr auch toxische Effekte auf und können somit die Entwicklung der endothelialen Dysfunktion begünstigen (Tsimikas und Reaven, 1998; Staprans *et al.*, 2005).

Es sollte ebenfalls untersucht werden, ob DHA in der endothelialen Zellkultur über protektive Eigenschaften verfügt und HUVECs vor apoptotischer Schädigung schützen kann. Dazu wurden die Zellen zunächst durch den Kinasehemmstoff Staurosporin bzw. durch Serumentzug moderat geschädigt. Eine Vorbehandlung der Zellen mit DHA in niedrigen

Konzentrationen führte zu einer Reduktion der Apoptoserate in HUVECs. Während diese Konzentration im serumhaltigen Medium bei 50 µM lag, wiesen Endothelzellen im serumfreien Milieu bereits bei 1-10 µM eine signifikant reduzierte Apoptoserate auf. Mit Hilfe der Nilblau-Färbung konnte die Lipidaufnahme in den Zellen detektiert werden. HUVECs, die mit DHA im serumfreien oder serumhaltigen Kulturmedium inkubiert wurden, zeigten eine unterschiedliche Fettsäureaufnahme bei gleicher DHA-Konzentration. Diese Messungen belegen erneut, dass die freie ungebundene Menge der Fettsäure von dem Serumgehalt des Mediums abhängt und deswegen der protektive Effekt je nach Serummenge im Kulturmedium bei unterschiedlichen Fettsäurekonzentrationen beobachtet werden konnte.

Zuletzt sollte untersucht werden, ob die Vorbehandlung von Endothelzellen durch DHA einer Apoptoseinduktion durch Ölsäure entgegenwirken kann. Dies war nicht der Fall. Im Gegenteil: HUVECs, die durch Ölsäure allein geschädigt wurden, zeigten eine niedrigere Apoptoserate als diejenigen, welche zusätzlich mit DHA behandelt wurden. Dieser Effekt lässt sich aber am einfachsten durch eine gesteigerte Aktivierung der PP2C durch Ölsäure und DHA erklären. Beide Fettsäuren sind in der Lage die Phosphatase zu aktivieren, was letztendlich zu einer additiven Verstärkung der Apoptoseinduktion führt. Die Frage, die sich nun stellt ist, ob die beobachtete Zellprotektion der DHA spezifisch oder, ob es ein allgemeiner Effekt der ungesättigten Fettsäuren ist?

Zur Klärung dieser Frage wurde weiterhin untersucht, ob Ölsäure ebenfalls, in niedriger Konzentration die Endothelzellen vor Apoptose schützen kann. Die Ergebnisse belegen jedoch, dass eine Vorinkubation der HUVECs mit Ölsäure für 24 h einer Apoptoseinduktion durch Staurosporin bzw. Serumentzug nichts entgegen zu setzten vermochte. Die Protektion der DHA scheint also nicht als ein allgemeiner für alle Fettsäuren zutreffender Effekt zu sein, sondern ist ein spezifischer für diese Omega-3-Fettsäure.

Abschließend kann man sagen, dass DHA in niedrigen Konzentrationen durchaus potentiell günstige Eigenschaften auf das Endothel zeigte, während höhere Konzentrationen der Fettsäure die PP2C zu aktivieren vermochten und Apoptose in HUVECs auslösten. Wie Paracelsus bereits erkannte, entscheidet auch hier die Menge zwischen der Arznei und dem Gift. Die zugrundeliegenden Mechanismen der protektiven Wirkung dieser Fettsäure müssen noch genauer erforscht werden.

4.2.3 Apoptoseinduktion in HUVECs durch physiologische Lipide, freigesetzt durch Lipoproteinlipase von Makrophagen

Wie bereits erwähnt, konnten die Arbeitskreise von Herrn Prof. Dr. Dr. Krieglstein und Frau Prof. Dr. Klumpp in vorherigen Experimenten zeigen, dass Endothelzellen durch isolierte ungesättigte, bzw. mit Hilfe einer bakteriellen Lipase aus Lipoproteinen freigesetzten, Fettsäuren geschädigt werden. Des Weiteren zeigten die *in vitro* isolierten Fettsäuren aus humanen Lipoproteinen die Fähigkeit zur PP2C-Stimulierung (Hufnagel *et al.*, 2005). Fettsäuren kommen jedoch im Organismus nicht einzeln und frei vor wie in der Petrischale. Sie sind im Körper fast vollständig in veresterter Form in Phospholipiden sowie Triglyceriden zu finden und dadurch, wie erwähnt bzw. auch gezeigt, für die Zellen völlig harmlos. Nur ein geringer Teil der Fettsäuren ist unverestert, ein noch geringerer Anteil ist ungebunden und wirklich frei.

Ein großer Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigte sich mit der Etablierung eines möglichst Physiologie-nahen Modells in der Zellkultur, um zu zeigen, dass am Endothel solch hohe Fettsäurekonzentrationen erreicht werden, die die Apoptose in den Zellen auslösen können. Dazu sollte die von humanen Makrophagen produzierte LPL als Werkzeug während der Lipidspaltung verwendet werden. Die Lipide, eingesetzt in sowohl physiologischen wie pathologischen Konzentrationen, sollten also nicht exogen durch Zugabe einer Lipase gespalten werden, sondern endogen von der Makrophagen-LPL. Ich möchte diesen Denkansatz im Folgenden näher erläutern:

LPL ist das wichtigste Enzym zur Spaltung von Fettsäuren aus Triglyceriden im Blut (Kapitel 1.3.3). Der physiologische Wirkort dieses Proteins ist die luminale Seite des Endothels, wo es an hochgeladene Heparansulfatproteoglykane (HSPG) nichtkovalent bindet. Man weiß aber auch bereits, dass LPL nicht in Endothelzellen exprimiert wird. Die Synthese des kapillären Enzyms findet dagegen im Parenchymgewebe um die Kapillaren statt, also in Muskel- und Fettzellen. Diese Zellen benötigen ja auch eine entsprechend hohe Fettsäuremenge zur Energiegewinnung und Membranbildung. Dagegen erfolgt die Produktion der LPL in großen gesunden arteriellen Blutgefäßen in glatten Muskelzellen der Media. In sogenannten *fatty streaks* der Arterien, welche durch eine Lipid- und Leukozytenansammlung in der Intima charakterisiert und bereits im Kleinkindesalter vorhanden sein können, erfolgt die wesentliche Synthese der LPL in Makrophagen (Yla-Herttuala *et al.*, 1991; O'Brien *et al.*, 1992). Weiterhin ist bekannt, dass synthetisierte LPL von den entsprechenden Zellen sezerniert und von der basalen zur apikalen Seite des Endothels transloziert wird und dort enzymatisch aktiv ist (Braun und Severson, 1992a). Triglyceridreiche Lipoproteine wie die

Chylomikronen und VLDL binden über das Apo E an den endothelialen VLDL-Rezeptor, welcher mit der LPL an der äußeren Membran interagiert. Nach einer Aktivierung der Lipase durch Apo C-II kommt es zur enzymatischen Hydrolyse der Triglyceride und Freisetzung der Fettsäuren, die von Endothelzellen aufgenommen werden und in tiefer liegende Gewebe weitertransportiert, wieder verestert und gelagert werden.

Unsere Fragestellung beschäftigte sich also damit, ob die Menge der Fettsäuren aus Lipoproteinen, die durch die endothelständige LPL gespalten werden, so hoch ist, dass Apoptose in Endothelzellen ausgelöst werden kann. Wenn das unter Zellkulturbedingungen durch Einsatz von humanen Endothelzellen, Makrophagen und Lipoproteinen simuliert werden könnte, wäre dies ein Schritt näher an die physiologischen Verhältnisse im Organismus. Eine Einschränkung wäre jedoch die Tatsache, dass es in der Zellkultur keinen Sog-artigen Fettsäureabtransport gibt, welcher in Blutgefäßen des Organismus von der apikalen Seite des Endothels zu den tiefer liegenden glatten Muskelzellen herrscht. Zwar ist dieser Transport in Arterien sicherlich nicht so stark ausgeprägt wie in Kapillaren, jedoch sicherlich relevant.

Die experimentelle Aufgabe zur Simulation der beschriebenen, Physiologie-angepassten Fettsäurefreisetzung in der Zellkultur sollte folgendermaßen aussehen.

Expression der Lipoproteinlipase

Als erstes war die Expression der LPL zu überprüfen. Makrophagen allgemein sind dafür bekannt, dass sie während ihrer Differenzierungszeit aus Monozyten hohe Mengen der Lipase produzieren und sezernieren (Chait *et al.*, 1982; Auwerx *et al.*, 1988). Diese kann dann von Endothelzellen aufgenommen werden.

Die durchgeführten Experimente zur Untersuchung der LPL-Expression auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR bestätigten die in der Literatur gefundenen Befunde (Chait *et al.*, 1982; Lindqvist *et al.*, 1983). HUVECs und THP-1-Monozyten wiesen keine LPL-mRNA auf, dagegen war LPL in THP-1-Makrophagen präsent. Die Induktion der Differenzierung erfolgte durch Phorbolester (PMA), der eine Umwandlung von Monozyten zu Makrophagen induziert (Dory, 1993). Als nächstes wurde erforscht wie die zeitliche Expression der Lipase in THP-1-Zellen nach Zugabe von PMA war. Auf mRNA-Ebene konnte gezeigt werden, dass bereits nach etwa 7 h Differenzierungszeit eine deutliche und schlagartige Zunahme der LPL-mRNA messbar war.

Untersuchungen auf Proteinebene erfolgten mit dem monoklonalen Anti-LPL Antikörper 5D2, der freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Brunzell (University of

Washington, USA) zur Verfügung gestellt wurde. Kommerziell erhältliche Antikörper gegen die LPL lieferten äußerst unspezifische und daher unbefriedigende Ergebnisse. Dieser Antikörper wird weltweit sehr häufig eingesetzt und ist gegen die bovine Form der LPL gerichtet, die eine hohe Homologie zur humanen Sequenz aufweist (Chang *et al.*, 1998). Leider ist auch dieser Antikörper nicht sehr spezifisch und lieferte beim Immunoblotting viele Stör-Banden. Auf der Höhe der humanen und bovinen LPL, bei 55 kDa, konnte jedoch ein deutliches Signal detektiert werden. Diese Bande wurde mit Hilfe eines kommerziell erworbenen Kontrollproteins durch die Western Blot-Analyse verifiziert. Die Expression des LPL-Proteins in THP-1-Zellen nach Zugabe von PMA stieg nach etwa 9 h schlagartig an, erreichte im Zeitfenster zwischen 9 und 24 h ihr Maximum und verringerte sich zu späteren Zeitpunkten wieder deutlich.

Immunzytochemische Aufnahmen von THP-1-Makrophagen und HUVECs mit Hilfe des Anti-LPL Antikörpers zeigten eine sehr starke Färbung der Phagozyten, wogegen Endothelzellen kaum gefärbt waren. Dies konnte besonders deutlich in einer Kokultur beider Zellarten direkt nebeneinander demonstriert werden. Zwar ist dieser Befund mit den bekannten Publikationen zu vereinbaren, eine sichere Aussage kann aus diesem Experiment jedoch nicht gemacht werden. Der Grund dafür liegt in der mangelnden Spezifität des Antikörpers im Immunoblot. Es kann zwar trotzdem sein, dass in der Immunzytochemie andere Bindungsverhältnisse für den Antikörper herrschen. Diese Aussage ist jedoch rein spekulativ und kann deshalb nicht wissenschaftlich gewertet werden.

Sehr interessant ist die Tatsache, dass LPL in großen Mengen im Kulturmedium sich differenzierender THP-1-Zellen mittels Western Blotting detektiert werden konnte. Bereits 10 h nach Zugabe von PMA wurde ein deutliches Signal im Zellmedium gemessen. Die sezernierten Spiegel der LPL sind hoch gewesen, wenn man bedenkt, dass sie bereits mit einer relativ unempfindlichen Detektionsmethode gemessen werden konnten und das Medium in der Petrischale für die Zellen im Grunde ein nahezu unendlich großes Extrazellulärvolumen darstellt. Alle durchgeführten Expressionsanalysen der LPL in THP-1-Zellen konnten die bereits publizierten Daten zu dieser Fragestellung bestätigen (Auwerx *et al.*, 1988).

Translokation der Lipoproteinlipase

Die nächste Aufgabe bestand in der Demonstration der Translokation der Lipase von den kultivierten Makrophagen zu den Endothelzellen. Um diesen Vorgang experimentell zu verifizieren, sollte die von THP-1-Zellen produzierte LPL in das Zellmedium freigesetzt und anschließend von getrennt gezüchteten Endothelzellen aufgenommen werden, um dort

spezifisch zu binden. Der Transfer der Lipase zwischen den separaten Zellschichten der Makrophagen und Endothelzellen würde demnach über das Zellmedium erfolgen.

Um den Kontakt der Endothelzellen mit PMA-haltigen Medium von THP-1-Zellen zu vermeiden, wurde der Überstand der sich differenzierenden THP-1-Zellen 6 h nach Zugabe gewechselt. Dieser Schritt beeinflusste die weitere Differenzierung der Zellen sowie den Expressionsverlauf der LPL nicht.

Zur Untersuchung der Translokation wurden Endothelzellen mit dem LPL-reichen, PMA-freien Kulturmedium der THP-1-Makrophagen inkubiert. Dabei wurde sowohl die Differenzierungsdauer der Makrophagen als auch die Behandlungsdauer der Endothelzellen mit diesem Medium variiert. Nach der Inkubation wurden die HUVECs mehrmals gewaschen, um unspezifisch bindende LPL zu entfernen. Das gesammelte Zelllysat und die Lipase-Spiegel wurden anschließend mittels Western Blotting analysiert. Es zeigte sich während der Auswertung, dass der 5D2-Antikörper in Endothelzellen eine Bande bei 55 kDa, entsprechend der LPL, anzeigte. Die Intensität dieses Signals war bei den nativen als auch bei allen behandelten Endothelzellgruppen unverändert. Die unbehandelten Zellen können jedoch wie erwähnt, keine LPL exprimieren, weshalb die Frage berechtigt erscheint, welches Protein auf der gleichen Höhe wie die LPL in Endothelzellen zu einem Signal im Western Blot geführt hat? Höchstwahrscheinlich ist das Protein die endotheliale Lipase (EL), welche, wie der Name verrät, in Endothelzellen exprimiert wird. EL ist erst 1999 entdeckt worden, weist eine hohe Homologie zur LPL auf (44%) und erscheint im Immunoblot ebenfalls wie LPL bei 55 kDa (Hirata *et al.*, 1999; Jaye *et al.*, 1999; Choi, S. Y. *et al.*, 2002b). Beide Enzyme sind, neben der hepatischen Lipase und Pankreaslipase, Mitglieder der Lipase-Superfamilie (Hasham und Pillarisetti, 2006). Die EL unterscheidet sich jedoch von den anderen Lipasen, denn sie weist keine enzymatische Präferenz für Triglyceride auf. Dagegen ist die phospholipolytische Aktivität des Enzyms besonders charakteristisch. Das Verhältnis zwischen der Triglyceridase- zur Phospholipase-Aktivität ist bei EL mit 0,65 im Vergleich zur LPL mit 139,9 sehr gering (Choi, S. Y. *et al.*, 2002b). Somit scheint EL keine wichtige Rolle im Metabolismus von triglyceridreichen Lipoproteinen wie Chylomikronen und VLDL zu spielen, wogegen der Stoffwechsel der HDL-Fraktionen durch das Enzym stark beeinflusst wird (Ishida *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2003).

Das Signal im Western Blot bei 55 kDa erwies sich als störend und machte die weitere Arbeit entsprechend schwierig. Wie bereits erwähnt, war die Intensität der Bande bei 55 kDa nicht sichtbar verändert. Daraufhin wurde, durch variieren der Belichtungszeit des Fotopapiers, versucht, die Intensität der bekannten Störbande bei unbehandelten HUVECs

gerade so schwach zu halten, dass kein Signal sichtbar war. Entsprechend müsste eine im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen erkennbare Bande bei Endothelzellen, die mit dem Makrophagenmedium inkubiert wurden, zunehmen. Die Differenz des Signals in LPL-behandelten Zellen zu dem Signal der unbehandelten Zellen sollte dann der Menge der translozierten LPL in Endothelzellen entsprechen. Jedoch konnte nach einer Behandlung der HUVECs mit dem Makrophagenmedium kein Unterschied der Bandenstärke bei 55 kDa detektiert werden. Die Mengen der tranlozierten Lipase scheinen so gering gewesen zu sein, dass sie mit dem wenig empfindlichen Immunoblot nicht nachgewiesen werden konnten.

So musste, um diese Fragestellung zu klären, ein anderer Weg beschritten werden. Hierbei wurden Endothelzellen und THP-1-Zellen als separate Zellschichten, jedoch im gleichen Kompartiment kokultiviert. Nach unterschiedlicher Differenzierungszeit der Makrophagen bzw. einer unterschiedlichen Behandlungsdauer der Endothelzellen in der Kokultur, wurden HUVECs aus dem System entfernt und die LPL-Spiegel, wie zuvor beschrieben, mittels Western Blotting analysiert. Auch hier wurde durch Verändern der Belichtungszeit des Fotopapiers die Bande der EL so „eingestellt“, dass sie gerade unsichtbar war. Im Vergleich zu dieser Kontrolle konnte in kokultivierten Endothelzellen eine leichte, jedoch deutliche Zunahme des Signals bei 55 kDa detektiert werden. Es wurde aber auch klar, dass die Menge der translozierten Lipase relativ gering war.

Jedoch ging es uns in der Fragestellung nicht nur darum, die Translokation des Enzyms zu zeigen, vielmehr sollte ebenfalls demonstriert werden, dass die translozierte LPL-Menge an isolierten Endothelzellen ausreichen würde, um Triglyceride aus Lipoproteinen zu spalten und dabei soviel Fettsäuren freizusetzen, dass die beschriebene Konzentrationsschwelle zur Apoptoseinduktion überschritten werden kann. Doch bis zur Aufklärung dieser Fragestellung mussten noch einige weitere grundlegende Untersuchungen durchgeführt werden.

Apoptoseinduktion durch Fettsäuren, freigesetzt durch Lipoproteinlipase

Es ist bereits gezeigt worden, dass einzelne ungesättigte aber auch die aus Lipoproteinen isolierten Fettsäuren in der Lage waren, Apoptose in Endothelzellen durch eine Aktivitätsstimulation der PP2C zu verursachen (Hufnagel *et al.*, 2005; Schwarz *et al.*, 2006). Eine genaue Vorhersage der ungebundenen Fettsäurekonzentration im Körper ist, wie bereits erwähnt, im Grunde nicht möglich und wahrscheinlich analytisch kaum nachzuweisen. Die einzige Möglichkeit die beobachteten Ergebnisse unter physiologischen Bedingungen zu betrachten besteht darin, ein Modell zu kreieren, das in etwa realen Verhältnissen des

Gefäßsystems entspricht. Zur Lösung des Problems war zu belegen, dass Triglyceride aus Lipoproteinen von der endogenen LPL, sezerniert von kultivierten humanen Makrophagen, hydrolysiert werden können und zwar in einer so großen Menge, dass die PP2C aktiviert und Endothelzellen geschädigt werden könnten.

VLDL ist, wie zuvor erklärt, die neben den Chylomikronen Triglycerid-reichste Lipidfraktion des Blutes und beinhaltet somit auch die meisten Fettsäuren. VLDL-Partikel weisen weiterhin eine besonders hohe Affinität zum VLDL-Rezeptor auf und können durch das gekoppelte Apo C-II die LPL aktivieren (Schrecker und Greten, 1979; Cryer, 1981; Takahashi *et al.*, 2003; Goudriaan *et al.*, 2004).

Natives VLDL in physiologischer Konzentration beeinflusste die Vitalität der Endothelzellen nicht negativ. Es konnte weiterhin bereits gezeigt werden, dass durch die Zugabe einer bakteriellen Lipase zum Medium dieser Zellen HUVECs signifikant geschädigt wurden (Hufnagel *et al.*, 2005). Der gleiche Effekt konnte durch exogene Zugabe der bovinen LPL beobachtet werden. Diese Ergebnisse sind zwar eindeutig und belegen, dass Fettsäuren aus Lipoproteinen in der Lage sind die Zellen zu schädigen, es ist jedoch nicht klar, ob die Fettsäurefreisetzung *in vivo* ebenfalls solche Ausmaße erreichen kann.

In den vorigen Orientierungsexperimenten lag der Fokus auf der Freisetzung der Fettsäuren aus den Lipoproteinen. Die physiologische Konzentration der LPL im Organismus hat zunächst nicht interessiert. Da nun sichergestellt war, dass die Lipasen *in vitro* die Fettsäuren aus den Lipoproteinfraktionen freisetzen können und diese wiederum in der Lage waren die endotheliale Apoptose auszulösen, sollte im Folgenden gezeigt werden, dass LPL, nun freigesetzt von kultivierten humanen Makrophagen, den gleichen apoptotischen Effekt in Endothelzellen hervorrufen kann. Das wäre ein Beleg dafür, dass menschliche Makrophagen in Nachbarschaft zu den Endothelzellen eine derartig große LPL-Menge synthetisieren könnten, um eine ausreichend hohe Konzentration von freien Fettsäuren zu erzeugen, so dass die Gefäßzellen wirklich geschädigt werden könnten. Es ist aber auch klar, dass kultivierte Endothelzellen in der Petrischale Lipide aufnehmen und speichern, jedoch nicht wieder abgeben können. Die Lipide persistieren sozusagen in den Zellen und sind nicht dem physiologischen Sog des subendothelialen Gewebes ausgesetzt.

Native THP-1-Zellen wurden für 12 h differenziert und exprimierten zu diesem Zeitpunkt LPL im Zellmedium. Es wurde bereits gezeigt, dass die Aktivität der LPL, die sich im Laufe des Differenzierungsprozesses von Monozyten zu Makrophagen verändert, jetzt ihren maximalen Wert erreicht (Auwerx *et al.*, 1988). Dieses LPL-reiche Kulturmedium wurde entnommen, mit VLDL im physiologischen Bereich versetzt und auf die

Endothelzellen gegeben. Nach 30 h wiesen die so behandelten HUVECs bereits apoptotische Kernmorphologie auf, während die Kontrollgruppen demonstrierten, dass VLDL bzw. das Makrophagenmedium für sich allein die Zellen nicht zu schädigen vermochten. Das war ein wichtiges Indiz dafür, dass physiologische Mengen der Makrophagen-LPL eine ausreichend hohe Triglyceridase-Aktivität aufweisen, um so hohe Fettsäuremengen zu erzeugen, dass die in unmittelbarer Nachbarschaft lokalisierten Endothelzellen apoptotisch zugrunde gehen können.

Um diese These zu verdeutlichen, sollten die nächsten Experimente in der separaten Kokultur von HUVECs und THP-1-Zellen stattfinden. Hierbei befanden sich die voneinander getrennt kultivierten einlagigen Zellschichten im gleichen Kompartiment und in der gleichen Kulturschale. Der Vorteil dieser Konstruktion war die Tatsache, dass die Zellen gesondert ausgesät wurden und entsprechend leicht analysiert werden konnten. Weiterhin war durch dieses System die Möglichkeit gegeben, dass LPL von THP-1-Zellen in das gemeinsame Zellmedium abgegeben werden und von dort aus die Endothelzellschicht erreichen konnte. HUVECs sowie die THP-1-Zellen ließen sich problemlos miteinander kokultivieren und wurden in ihrer Vitalität nicht beeinflusst. Die Zugabe von physiologischen VLDL-Konzentrationen in dieses System führte jedoch nach kurzer Zeit zur Apoptose von Endothelzellen. Die Schädigung der HUVECs in der Kokultur mit VLDL erfolgte bereits nach 14 h wesentlich schneller als in der Monokultur mit dem Makrophagenmedium und dem Lipoprotein nach 30 h. Dies lässt sich folgendermaßen erklären: Die LPL im Makrophagenmedium wird mit der Zeit mehr oder weniger spezifisch abgebaut und degradiert, dies konnte man auch durch Messungen mittels Immunoblotting im Zellmedium nachweisen. Die reduzierte Lipasemenge kann entsprechend nicht mehr mit der gleichen Aktivität die Triglyceride spalten, was das Erreichen der Fettsäureschwellenkonzentration für die Apoptoseinduktion und somit auch die Schädigung hinauszögert. Dagegen wird LPL in der Kokultur fortwährend von THP-1-Zellen neu synthetisiert. Entsprechend ist über die Behandlungszeit im Zellmedium der Kokultur mehr aktive LPL, da sie ständig nachproduziert wird. Die Spaltung der Triglyceride sowie die Schädigung der Endothelzellen erfolgte demnach wesentlich schneller.

Im nächsten experimentellen Schritt wurde der Einfluss der VLDL-Konzentration während der Schädigung von kokultivierten Endothelzellen untersucht. Bereits 10 mg/dl VLDL reichten aus, um signifikant Apoptose der HUVECs in der Kokultur auszulösen. Ferner konnte gezeigt werden, dass die Zelldichte der THP-1-Zellen und entsprechend die Menge der sezernierten LPL einen entscheidenden Einfluss auf die Apoptoserate der

kokultivierten Endothelzellen hatte. Erst ab einer Dichte von $5x10^5$ Zellen pro Schale konnte ein schädigender Effekt nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse belegen, dass das Ausmaß der Apoptose in kultivierten Endothelzellen weniger von der Konzentration der Lipoproteine, sondern vielmehr von der Menge der Lipase abhing. Die Triglyceride in Form von hoher VLDL-Konzentration mussten schließlich gespalten werden, was entsprechend von der LPL-Aktivität abhängig und geschwindigkeitslimitierend war.

Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass auch unter physiologischen Bedingungen immense, toxische Fettsäurekonzentrationen durch die Makrophagen-LPL entstehen könnten. Die Daten zeigen aber nicht, dass die am Endothel gebundene LPL dafür verantwortlich ist. Daher sollte ferner noch analysiert werden, ob die translozierte Menge des Enzyms, die am Endothel bindet, auch allein für eine Spaltung der schädlichen Fettsäuremengen ausreichen würde. Wie bereits diskutiert, konnte nach Kokultivierung der HUVECs mit THP-1-Makrophagen eine Zunahme des LPL-Proteins in den Endothelzellen detektiert werden. Das Ziel war zu überprüfen, ob die zuvor kokultivierten HUVECs so viel translozierte Lipase aufgenommen haben, um entsprechend hohe Fettsäurenmengen aus Triglyceriden freizusetzen. Wenn das demonstriert werden könnte, dann wäre es ein deutliches Indiz dafür, dass auch im arteriellen Gefäßsystem ähnliche Konzentrationen an Fettsäuren durch die luminale LPL entstehen können.

Für die Untersuchung dieser Fragestellung erfolgte eine Kokultivierung der HUVECs mit sich differenzierenden THP-1-Zellen unter den gleichen Bedingungen wie bei der zuvor durchgeführten Messung zur LPL-Translokation. Nach einer entsprechenden Inkubation der Endothelzellen wurde das Medium sowie die THP-1-Zellen aus dem System entfernt und die Zellen gewaschen. Nun erfolgte die Zugabe von VLDL im physiologischen Bereich. Nach einer Behandlungszeit von 48 h waren diese Zellgruppen jedoch, anders als erhofft, nicht signifikant geschädigt. Während Kontroll-Endothelzellen in der Kokultur apoptotisch waren, zeigten HUVECs, die nicht mehr im direkten Verbund mit den THP-1-Zellen standen, keine erhöhte Apoptoserate.

Dieses Ergebnis machte deutlich, dass die translozierte Menge der Lipase nicht ausreichte, um entsprechend hohe Fettsäuremengen freizusetzen, die wiederum die PP2C aktivieren und Apoptose auslösen könnten. Jedoch heißt das nicht zwangsläufig, dass der beschriebene Mechanismus im Gefäßsystem keine Rolle spielt. LPL wird mit der Zeit proteolytisch abgebaut und hat eine kurze Halbwertszeit (Saxena *et al.*, 1990; Obunike *et al.*, 1996). Im vaskulären System jedoch wird das Enzym ständig neu synthetisiert und ersetzt somit die verlorengegangene Lipase am Endothel. Dieser Enzym-Nachschub ist in der

Zellkultur nicht vorhanden gewesen, da man die HUVECs aus dem Verbund mit THP-1-Zellen entfernt hatte. Wenn also die translozierte Lipasemenge nach einer gewissen Zeit inaktiviert und abgebaut wurde, kann auch entsprechend keine Fettsäurehydrolyse und demnach keine Apoptose ausgelöst werden.

Unklar ist zudem, ob es einen chemotaktischen Stimulus zur Aufnahme der LPL im Gefäßsystem gibt, der in den Zellkulturexperimenten fehlte und entsprechend die Lipaseaufnahme einschränkte. Die Translokation des Enzyms von den exprimierenden Zellen durch das Endothel hindurch auf die luminale Seite kann nicht ungerichtet und unspezifisch allein durch Diffusion erfolgen. Bekannt ist weiterhin, dass Endothelzellen nur begrenzte LPL-Mengen aufnehmen können, da die entsprechenden Bindestellen an der Zelloberfläche (HSPG) nur in einem limitierten Rahmen exprimiert werden (Obunike *et al.*, 2001). Unter Umständen ist auch hier eine Ursache für die geringe translozierte LPL-Masse zu suchen. Möglicherweise lässt sich die von uns verfolgte Hypothese mit nur zwei Zellarten in der Zellkultur nicht beantworten, wenn man bedenkt wie komplex die vaskuläre Situation *in vivo* ist.

Verifikation der Ergebnisse durch Inhibition und Herunterregulation der LPL

Um zu verifizieren, dass die LPL für die Hydrolyse der Triglyceride aus VLDL zu Apoptose-auslösenden Fettsäurekonzentrationen verantwortlich ist, sollte durch Einsatz eines Lipaseinhibitors die Rolle des Enzyms näher analysiert werden. Die Hemmung der Lipase sollte zu einer reduzierten Hydrolyserate der Lipide und somit zu einer verminderten Zahl apoptotischer Endothelzellen führen.

Zu diesem experimentellen Zweck wurde der spezifische Lipaseinhibitor Orlistat verwendet (Abb. 4.2-1). Der als Antiadipositum verwendete Wirkstoff wird im Fertigarzneimittel Xenical™ eingesetzt und bewirkt durch Hemmung der Pankreaslipase eine verringerte Lipidresorption im Darm (Hadvary *et al.*, 1991; Sternby *et al.*, 2002). Dabei ist die Hemmung jedoch nicht nur auf dieses Enzym beschränkt. Die Mitglieder der Lipase-Familie, zu denen neben LPL und Pankreaslipase die hepatische Lipase zählt, weisen alle eine hohe Homologie im Bereich des aktiven Zentrums der Serin-Esterase auf und werden ebenfalls spezifisch inhibiert (Lookene *et al.*, 1994). Per os eingenommen, wird Orlistat jedoch nicht resorbiert, wirkt dadurch nur lokal auf die Pankreaslipase und zeigt keine unerwünschten systemischen Effekte an anderen Lipasen.

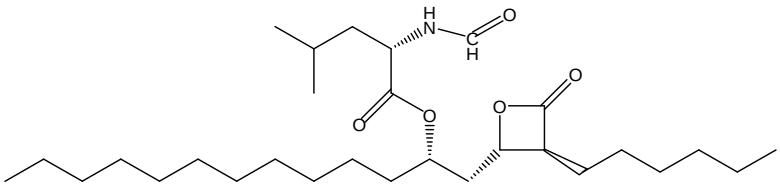


Abb. 4.2-1: Strukturformel von Orlistat

Zur Überprüfung des Einflusses von Orlistat auf die enzymatische Aktivität der LPL wurden, wie vorher beschrieben, Endothelzellen mit VLDL und exogener LPL bzw. Makrophagenmedium behandelt. Die freigesetzten Fettsäuren aktivierten die PP2C und induzierten Apoptose in diesen Zellen. Die simultane Inkubation der Zellgruppen mit Orlistat in unterschiedlichen Konzentrationen vermochte die Apoptoserate signifikant und konzentrationsabhängig zu verringern. Bereits in der Konzentration von 4 µM konnte Orlistat die Schädigung signifikant reduzieren. In der Literatur ist die enzymatische IC_{50} für die Pankreaslipase mit etwa 300 nM beschrieben (Bisogno *et al.*, 2006). Diese Beobachtungen belegen, dass die Lipase für die Fettsäurefreisetzung und indirekt für die Apoptoseinduktion verantwortlich ist.

Zur weiteren Überprüfung sollte mit Hilfe der RNAi die Expression des LPL-Proteins in sich differenzierenden THP-1-Zellen herunterreguliert werden. Eine verminderte Expression des Proteins sollte entsprechend die Menge der freigesetzten Fettsäuren aus VLDL-Triglyceriden reduzieren und somit ebenfalls die endotheliale Apoptoserate senken.

Wie bereits bekannt, ist die Expression der LPL in THP-1-Zellen nach Zugabe von PMA nicht konstant. Sie erreicht ein Maximum nach etwa 12 bis 24 h und flacht dann wieder ab. Aus diesem Grunde wurden die zuvor beschriebenen Schädigungsexperimente mit VLDL in diesem Zeitfenster durchgeführt. Das experimentelle Ziel bestand darin, die Proteinmenge in dieser kurzen Phase zu reduzieren. Das Versuchsvorhaben war nicht einfach zu realisieren, denn die LPL-Expression war, wie gezeigt, bereits nach einer sehr kurzen Differenzierungszeit der THP-1-Zellen maximal und reduzierte sich sehr schnell auf einen niedrigen Spiegel. Eine weitere Komplikation war die relativ hohe Zelldichte der THP-1-Zellen für eine ausreichende LPL-Synthese. Bei geringerer Zellzahl pro Schale konnte keine entsprechende Freisetzung der Fettsäuren und Apoptoseinduktion in Endothelzellen beobachtet werden. Bei einer zu hohen Dichte der Zellen war die Schädigung zwar gesichert, dafür war die Transfektionsrate mit siRNA und demzufolge die Herunterregulation des Proteins eingeschränkt. Es mussten also mehrere Parameter bei der Lipofektion der THP-1-Zellen variiert werden, bis der Protein-*Knockdown* effektiv beobachtet werden konnte. So

wurden, neben der Transfektionszeit im Bezug auf die PMA-Zugabe, die Konzentrationen des Transfektionsreagenz Oligofectamin und siRNA mehrmals verändert, bis im Western Blot eine deutliche Expressionsminderung der LPL-Menge festgestellt werden konnte. Dies war der Fall, wenn die Transfektion simultan mit der PMA-Zugabe erfolgte. Sowohl im Zelllysat wie auch im Kulturmedium der THP-1-Zellen war die LPL nach Behandlung mit siRNA im vorher beschriebenen Intervall nach Zugabe von PMA deutlich reduziert.

Nachdem das RNAi-System etabliert worden war, wurde nun untersucht, ob die Expressionsreduktion der LPL in THP-1-Makrophagen eine Auswirkung auf die Apoptoserate kokultivierter Endothelzellen nach Behandlung mit VLDL hatte. Dazu erfolgte zunächst die Transfektion der THP-1-Zellen mit siRNA. Nach entsprechender Kokultivierung von Endothelzellen mit den transfizierten Makrophagen und Zugabe von VLDL, wurde das Ausmaß der Apoptose in HUVECs nachgeprüft. Dabei wurde deutlich, dass die Apoptoserate dieser Endothelzellen im Vergleich zu Kontrollgruppen ohne siRNA-Inkubation, signifikant reduziert wurde. Das bewies letztendlich, dass die LPL der Makrophagen für die Spaltung der Triglyceride und indirekt für die Apoptoseinduktion in HUVECs verantwortlich war.

Die Reduktion der apoptotischen Zellen erfolgte nicht auf Kontrollniveau. Dafür könnte es mehrere Erklärungsansätze geben: Zunächst erfolgte die Herunterregulation des Proteins nur zu einem bestimmten Teil und keineswegs vollständig, somit blieb immer noch genug Lipase übrig, um Fettsäuren freizusetzen und somit Zelltod auszulösen. Weiterhin war das Ausmaß des *Knockdowns* im Zellmedium der THP-1-Zellen wesentlich geringer ausgeprägt als im Zelllysat, was man im Western Blot auch deutlich sehen konnte. Letztendlich kann man auch nicht sagen, dass eine bestimmte Proteinexpressionsreduktion entsprechend eine proportionale enzymatische Aktivitätsminderung des Proteins mit sich bringt.

Das Resümee

Es konnte bereits in vorangegangenen Arbeiten gezeigt werden, dass ungesättigte bzw. isolierte Fettsäuren aus Lipoproteinen in der Lage sind die PP2C zu aktivieren und dadurch Apoptose in kultivierten Endothelzellen zu induzieren (Hufnagel *et al.*, 2005). Es war nur nicht klar, ob dieser Mechanismus auch im Gefäßsystem ablaufen könnte. *In vivo* sind die Resorptionsprozesse der Lipide nicht starr wie in der Zellkultur, vielmehr herrscht dort ein kontinuierlicher Abtransport der Lipide aus dem Endothel in tieferliegende Gewebeschichten. Ferner ist ebenfalls nicht gewiss, ob am Endothel solch hohe Fettsäurekonzentrationen entstehen können. Wenn überhaupt, ist nur die Gesamtkonzentration dieser Lipide im Blut

feststellbar. Die freie, ungebundene Menge ist jedoch experimentell schwer zu erfassen. Doch selbst wenn man diese Konzentration vorhersagen könnte, ist es mit isolierten Fettsäuren nicht möglich *in vivo* Bedingungen nachzuahmen.

Das hier vorgestellte Modell zur Überprüfung dieser Fragestellung sollte nicht die Konzentrationsfrage der Fettsäuren lösen, vielmehr war die Intention zu zeigen, dass durch physiologische Mengen der LPL aus humanen Makrophagen solch große Mengen an Fettsäuren entstehen können, die wiederum zu einer Schädigung des Endothels führen könnten. Dies ist auch gelungen, VLDL in Kombination mit LPL-reichem Kulturmedium von Makrophagen induzierte Apoptose in HUVECs. Diese Schädigung konnte durch Inhibition und Herunterregulation der LPL reduziert werden, was gleichzeitig das Enzym für die Freisetzung der Lipide verantwortlich macht. Jedoch war es nicht möglich zu belegen, dass die an Endothelzellen translozierte Menge der LPL für eine ausreichend hohe Fettsäurespaltung zur Apoptoseinduktion in der Lage war.

Die Ergebnisse zeigen aber auf einfache Art und Weise, dass die Kombination von Makrophagen, HUVECs und triglyceridreichen Lipoproteinen zum Zelluntergang der Endothelzellen führen kann. Makrophagen produzieren die größte Menge an LPL in atherosklerotischen Plaques, die wiederum Fettsäuren freisetzen und somit Apoptose induzieren kann. Frühe Läsionen, die sogenannten *fatty streaks*, welche bereits im Kleinkindalter entstehen können, weisen bereits eine beträchtliche Menge an migrierten Makrophagen und LPL auf (Restrepo und Tracy, 1975; O'Brien *et al.*, 1992; Goldberg, 1996). Somit könnten bereits im jungen Alter ähnliche Vorgänge in Arterien stattfinden, die in den beschriebenen Experimenten nachgestellt wurden. Makrophagen würden hohe Lipasemengen produzieren, was eine erhöhte Fettsäurefreisetzung am Endothel mit sich bringen würde. Entsprechend könnte das über eine Aktivierung der PP2C zu einer verstärkten Apoptoserate dieser Zellen führen. Dies hätte eine Permeabilitätserhöhung zur Folge und steuerte somit zu einem *circulus vitiosus*: Eingewanderte Makrophagen steigerten aufgrund der selbst-produzierten LPL die Durchlässigkeit des Endothels weiter. Dieser Vorgang würde wiederum zu einer verstärkten Migration von Monozyten und LDL in die Intima führen, wodurch die LPL-Bildung weiter erhöht werden könnte und so weiter.

Weiterhin ist bekannt, dass Diabetiker, die aufgrund eines blockierten Kohlenhydratstoffwechsel eine hohe Triglycerid- und Fettsäurekonzentration im Blut haben, zusätzlich eine erhöhte Expression und Aktivität der LPL in Makrophagen aufweisen (Sartippour *et al.*, 1998; Sartippour und Renier, 2000; Mead *et al.*, 2002; Beauchamp *et al.*, 2004; Phillips *et al.*, 2005; Pulinilkunnil und Rodrigues, 2006). Patienten mit einer

homozygoten familiären Hypercholesterolämie weisen auch eine gesteigerte Syntheserate an LPL in großen Gefäßen auf, was ebenfalls mit einer hohen Atheroskleroseprogression korreliert (Beauchamp *et al.*, 2002). Unsere Hypothese könnte erklären, warum diese Menschen eine hohe Inzidenz atherosklerotischer Erkrankungen aufweisen, denn eine hohe LPL-Menge in Kombination mit erhöhten Triglyceridwerten könnte nach bekanntem Mechanismus zur endothelialen Apoptose führen, dem initialen Schritt in der Atherogenese (Choy *et al.*, 2001). Diese Hypothese unterstützend, existieren Berichte von LPL-defizienten Mäusen, die zwar eine massive Hyperlipoproteinämie, jedoch keine erhöhte Atheroskleroserate aufweisen (Semenkovich *et al.*, 1998).

In der Literatur sind weitere Eigenschaften der LPL beschrieben, welche eine Atherosklerose begünstigen. So kann die Endothel-ständige LPL als Adhäsionsmolekül für Monozyten fungieren und die Migration von LDL in die Intima beschleunigen (Obunike *et al.*, 1997; Zimmermann *et al.*, 2001; Phillips *et al.*, 2005; Loeffler *et al.*, 2006). Daneben fördert die Lipase die Bildung von proatherogenen VLDL-Remnants, die von Makrophagen phagozytiert werden können (Zilversmit, 1995).

Zusammengefasst deuten die hier vorgestellten Ergebnisse daraufhin, dass das von Makrophagen produzierte hydrolytische Enzym LPL beträchtlich hohe Fettsäuremengen freisetzen kann, die wiederum nach Aktivierung der PP2C zur Apoptose von Endothelzellen führen und die Atherogenese initieren könnten. Der Beweis konnte trotz eindeutiger Ergebnisse in der Zellkultur jedoch nicht demonstriert werden, da die Physiologie nicht 100%ig nachgeahmt werden kann. Dieser sollte mit Hilfe eines *in vivo* Versuches erbracht werden.

4.3 Untersuchungen *in vivo*

Die Frage, die zu Beginn erneut gestellt werden muss, lautet: Können im Organismus überhaupt so hohe Fettsäurekonzentrationen am Endothel entstehen, die dann zur Apoptoseinduktion führen? Diese Frage konnte auch mit den ausführlich beschriebenen Zellkulturmodellen nicht genau beantwortet werden. Kultivierte Endothelzellen können, wie bereits erwähnt, im Gegensatz zu vaskulären Zellen, Fettsäuren nicht in tiefere Gewebeschichten abgeben. Die Fettsäuremenge im lebenden Organismus ist variabler und dynamischer als in den festen Strukturen des Zellversuches. Da die

Atheroskleroseentwicklung ein langwieriger, langsamer Prozess ist, kamen isolierte Arterien oder Organe zur Untersuchung nicht in Frage. Diese Gewebe würden ebenfalls über keinen Fettsäuresog der naheliegenden Zellen verfügen.

Weiterhin sollte ein anderes, in der Klinik bereits bekanntes Phänomen untersucht werden. Mediziner konnten schon seit langer Zeit beobachten, dass ischämische Atherosklerose-bedingte Erkrankungen in den westlichen Industrienationen am Herzen wesentlich häufiger vorkommen als an anderen Geweben wie z.B. dem Gehirn. Dies kann einfach anhand von Todesstatistiken belegt werden. Letale Herzinfarkte treten im Durchschnitt etwa 20 Jahre früher auf als tödliche Infarkte am Hirn (Abb. 4.3-1). Der Grund dafür liegt in einer beschleunigten Atheroskleroseentwicklung an den Herzarterien im Vergleich zu zerebralen Arterien (Schäfer *et al.*, 2005). Der kausale Zusammenhang dieser Beobachtungen konnte jedoch bisher nicht erörtert werden. Lange Zeit wurde vermutet, dass Koronarien am Herzen einer ständigen mechanischen Belastung durch die Herzbewegung stand halten müssten und somit wesentlich mehr beansprucht werden. Gleichzeitig weiß man aber auch, dass Atherosklerose an den Arterien der Fußsohlen, die schließlich ebenfalls ständig mechanisch belastet werden, nicht vermehrt auftritt.

Im Jahre 2006 gelang es den Arbeitskreisen von Herrn Prof. Dr. Dr. Krieglstein, Frau Prof. Dr. Klumpp und Herrn Prof. Dr. Schäfer jedoch das Rätsel zu lösen. Es wurde daraufhin die Marburger Hypothese zur Herzinfarktprogression erstellt (Hufnagel *et al.*, 2006): Das Herz bezieht seine Energie zu etwa 70% aus Fettsäuren, dagegen kann das Gehirn nur Glukose metabolisieren. Somit ist einleuchtend, dass Koronararterien permanent hohen Fettsäurekonzentrationen ausgesetzt sind, die wiederum die PP2C der arteriellen Endothelzellen aktivieren könnten, um dadurch letztendlich Apoptose in diesen Zellen auszulösen. Der erhöhte Fettsäurebedarf des Herzens, mit der Folge der vermehrten endothelialen Apoptose, wäre also der Grund für die dort vorkommende Atherosklerose und die damit verbundenen Volkskrankheiten koronare Herzkrankheit und Myokardinfarkt. Das Herz würde also bei einem Infarkt Opfer seines eigenen Energiebedarfs werden.

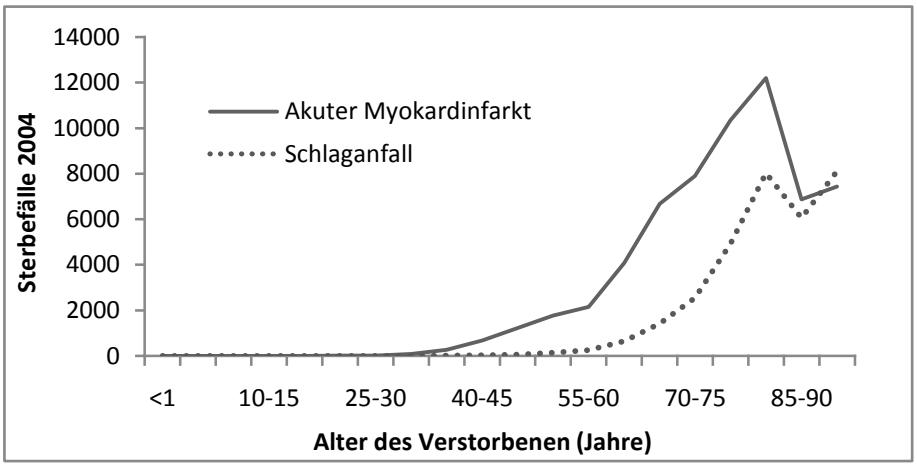


Abb. 4.3-1: Sterbefälle mit Myokardinfarkt oder Schlaganfall als Ursache

Quelle: Todesursachen in Deutschland 2004. Statistisches Bundesamt.

Das Atherosklerosemodell in vivo

In der Literatur werden verschiedene Modelle zur Atheroskleroseentstehung am intakten Versuchstier angewandt. Neben Kaninchen und Apo E-*Knockout*-Mäusen sind Meerschweinchen eine häufig verwendete Spezies zur Untersuchung des Lipoproteinmetabolismus und der Atherogenese. Der große Vorteil bei der Verwendung von Meerschweinchen liegt in ihrem Lipidstoffwechsel, der dem humanen sehr ähnlich ist. So ist die Verteilung des Cholesterols in LDL und HDL sowie das Vorhandensein der Lecithin-Acyltransferase, des Cholesterolester-Transferproteins und der LPL ein wichtiges Kriterium für den Einsatz dieser Versuchstiere (Ha und Barter, 1982; Camps *et al.*, 1990a; Fernandez, 2001). Ein weiterer Vorteil ist, dass Meerschweinchen als Pflanzenfresser relativ schnell atherosklerotische Läsionen nach einer entsprechenden Fett- bzw. Cholesterol-reichen Diät entwickeln (Rath und Pauling, 1990; Bersenev *et al.*, 2003; West *et al.*, 2003; Zern *et al.*, 2003). Zudem sind diese Tiere wie Menschen auf eine exogene Vitamin C-Versorgung angewiesen (Sauberlich, 1994). Aufgrund dieser Tatsachen sollte das Meerschweinchen zur Überprüfung unserer Hypothese herangezogen werden.

Zur Durchführung des Experiments sollten drei Meerschweinchengruppen mit jeweils 20 Tieren mit unterschiedlichen Diäten gefüttert und nach einem Zeitraum von fünf Monaten die Entwicklung der atherosklerotischen Läsionen am arteriellen Gefäßsystem der Tiere untersucht werden. Die Kontrollgruppe sollte ein fettreduziertes Futter bekommen, während die beiden Behandlungsgruppen eine jeweils Olivenöl- bzw. Ölsäure-reiche Diät erhalten

sollten. Olivenöl enthält etwa 76% Ölsäure und ist Bestandteil der sogenannten mediterranen Kost, die einen günstigen Einfluss auf die Atherogenese zu haben scheint (Kok und Kromhout, 2004). Da diese Aussage bezüglich unserer Ergebnisse widersprüchlich ist, sollte untersucht werden, ob dieser protektive Effekt des Öls wirklich auf der Ölsäure basiert oder eventuell auch andere sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, allen voran die antioxidativen Polyphenole, für die vermutete schützende Wirkung verantwortlich gemacht werden können (Lamuela-Raventos *et al.*, 2004). Alle Diäten sollten kein zugesetztes Cholesterol enthalten, um den alleinigen Ölsäureeffekt auf die Gefäße zu untersuchen.

Nach unserer Hypothese müsste also diese Ölsäure-reiche Kost die PP2C aktivieren und entsprechend zu einer hohen endothelialen Apoptoserate führen. Durch diesen Mechanismus sollten die Meerschweinchen eine vereinfachte und beschleunigte Atherombildung aufweisen.

Nach der Versendung des Genehmigungsantrages zur Versuchsdurchführung an das Regierungspräsidium Gießen wurde jedoch ein wesentlicher Teil des Fütterungsversuches bürokratisch abgelehnt. Die entsprechende Erlaubnis beschränkte sich nur auf zwei statt wie vorgesehen drei Gruppen der Tiere. Es durften nur die Trioleat- und die fettarmgefütterten Gruppen untersucht werden. Die wichtige Gruppe, die das Olivenöl-reiche Futter bekommen sollte und somit die Realität wiederspiegeln würde, konnte demnach nicht untersucht werden.

Diäten und der Fütterungsverlauf

Die Herstellung der beiden bilanzierten, synthetisch hergestellten Diäten erfolgte durch die Firma Altromin. Während das Kontrollfutter lediglich 0,3% Fett enthielt, lag der Fettanteil im Trioleat-angereicherten Futter bei 25%. Energetisch gesehen stellten Kohlenhydrate mit 71% im Vergleich zu 28% des Fettfutters den dominanten Nährstoffanteil des Kontrollfutters dar. Dagegen war der Anteil der Fettkalorien im mit Trioleat-angereicherten Futter mit 58% sehr hoch. Aufgrund des hohen Triglyceridgehaltes wies das fettreiche Futter eine etwa 50% höhere Kilokaloriendichte auf als die Kontrolldiät. Die Anteile der essentiellen Nährstoffe und Vitamine waren bei beiden Diäten gleich.

Zu Versuchszwecken wurden männliche Dunkin-Hartley-Meerschweinchen im Alter von 7-9 Wochen und einem Initialgewicht von 350-450 g verwendet. Die Versuchsdauer war auf 150 Tage beschränkt. Weibliche Tiere kamen nicht in Frage, denn es ist bekannt, dass Sexualhormone vom Estrogentyp einen protektiven Schutz vor Atherosklerose und endothelialer Apoptose bilden, der in diesem Experiment aber nicht erwünscht war (Dimmeler *et al.*, 1998; Subah Packer, 2007).

Zweimal pro Woche wurden die Tiere gewogen und der Futterkonsum protokolliert. Es stellte sich heraus, dass Meerschweinchen aus der Kontrollgruppe wesentlich mehr Futter verzehrten als Versuchstiere der Fettgruppe. Nach der Einberechnung der Energiedichte fiel jedoch auf, dass beide Gruppen in etwa die gleiche Kilokalorienmenge von etwa 100 kcal pro Tag zu sich nahmen. Eine entsprechende Beobachtung konnte am Verlauf der Körpergewichtsentwicklung gemacht werden. Im Zeitraum des Fütterungsversuches lagen die Durchschnittsmassen der einzelnen Meerschweinchengruppen sehr eng beieinander und waren am Versuchsende nicht signifikant unterschiedlich. Die Tiere besitzen scheinbar einen inneren Regulations-Mechanismus zur Einhaltung eines bestimmten Gewichtes und somit einer entsprechenden Energieaufnahme, der auch von anderen wissenschaftlichen Gruppen beobachtet wurde (Fernandez *et al.*, 1995b). Im Laufe der fünf Monate dauernden Fütterungszeit verstarben sechs der 40 Tiere.

Blutuntersuchungen, makroskopische sowie mikroskopische Gewebeveränderungen

Es ist erwiesen, dass das Lipoproteinprofil einen Einfluss auf die Atheroskleroseentstehung hat. So ist das cholesterolreiche LDL ein wichtiger proatherogener Faktor bei der Entstehung von Lipidablagerungen im arteriellen Strombett. Der funktionelle Antagonist HDL dagegen ermöglicht den reversiblen Cholesteroltransport zur Leber und korreliert negativ mit der Atherogenese. VLDL besteht vor allem aus endogenen Triglyceriden der Leber, wogegen die Chylomikronen exogene Lipide aus der Nahrung transportieren.

Während des Versuches wurde den Meerschweinchen zweimal Blut entnommen. Die erste Blutentnahme erfolgte nach 45 Tagen. Hier wurde bereits deutlich, dass die Tiere verhältnismäßig niedrige Cholesterolkonzentrationen aufwiesen. Diese lagen beim Gesamtcholesterol bei etwa 40-50 mg/dl. Der HDL-Anteil lag bei sehr niedrigen 5-10 mg/dl, entsprechend höher war das LDL-Cholesterol mit etwa 40 mg/dl. Triglyceride waren ebenfalls nicht erhöht mit etwa 80-100 mg/dl. Die gemessenen Werte der beiden Gruppen zeigten keinen signifikanten Unterschied in den Lipidparametern und entsprachen der natürlichen physiologischen Konzentration (Fernandez, 2001). Bei der finalen Blutuntersuchung nach 150 Tagen Fütterung mit den entsprechenden Diäten wurde deutlich, dass mit Trioleat-gefütterte Meerschweinchen im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöhte Cholesterolwerte aufwiesen. Die HDL- und vor allem die LDL-Werte waren um mehr als das Doppelte gestiegen. Diese Beobachtungen deuteten auf Veränderung des Lipidmusters hin, jedoch lagen die Cholesterolkonzentrationen, trotz einer Erhöhung, bei den Trioleat-Tieren bei relativ niedrigen 80-90 mg/dl. Ähnliche Beobachtungen konnten bereits mit

Meerschweichen gemacht werden, die mit einer gesättigten Fettsäure-angereicherten Diät gefüttert wurden (Fernandez *et al.*, 1995b).

Bei der Triglyceridanalyse konnte wie zuvor kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen detektiert werden. Dieses Phänomen war zunächst nicht verständlich, denn die konsumierten Triglyceride aus der Nahrung sollten schließlich auch im Blut der Tiere messbar sein. Wenn man jedoch bedenkt, dass eine kohlenhydratreiche Nahrungsweise der Kontrollgruppe zu einer entsprechenden Synthesesteigerung von endogenen Triglyceriden in der Leber und somit zu einer Erhöhung des VLDL-Anteils im Blut führt, wogegen die gemessenen Triglyceride der Trioleatgruppe hauptsächlich exogener Natur aus Chylomikronen stammen, wird klar, dass beide Diäten zu einer Niveau-Erhöhung des Triglyceridanteils führen (Fernandez *et al.*, 1995a; Merkel *et al.*, 2001).

Die Obduktion der Meerschweinchen am Versuchsende zeigte deutliche morphologische Veränderungen auf. Die mit Trioleat-gefütterten Tiere wiesen eine sehr stark erhöhte Menge an subkutanem Fettgewebe im Vergleich zu den Kontrolltieren auf. Die Verteilung des Fettes war besonders im Nacken ausgeprägt, während Kontrolltiere kaum Fettgewebe gebildet hatten. Diese Beobachtung war nicht unbedingt erwartet worden. Schließlich nahmen beide Versuchstiergruppen in etwa die gleiche Kalorienmenge auf und zeigten keinen Unterschied in der Körpergewichtsentwicklung. Es ist zwar bekannt, dass eine kalorienreiche Ernährungsweise mit Adipositas und erhöhtem subkutanen Fettgewebe korreliert, welche Mechanismen dafür verantwortlich sind, ist jedoch nicht genau geklärt (Prentice und Jebb, 2003). Außerdem waren große Blutgefäße wie Aorten und Carotiden der mit Fett-gefütterten Tiere von einer lipidreichen, bindegewebsartigen Matrix umgeben. Diese widerstandfähige Schicht war sehr fest am Gewebe verankert, entsprechend wurde die Präparation der Arterien erschwert. Des Weiteren war die Leber dieser Tiere deutlich vergrößert, wies eine Muskatnusszeichnung sowie Gelbfärbung auf, was auf eine pathologische Veränderung hindeutet.

Die arteriellen Gefäße

Nach dem beschriebenen Zeitraum von fünf Monaten sollte natürlich auch untersucht werden, ob sich in den arteriellen Blutgefäßen Läsionen gebildet haben.

Die Untersuchung der Aorten zeigte, dass die mit Trioleat-gefütterten Tiere eine Reduktion der elastischen Fasern vom muskulären Typ aufwiesen. Die Elastinstruktur war weniger geordnet und deutlich degradiert. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass diese Gefäße an Elastizität eingebüßt haben und dies sich entsprechend negativ auf den arteriellen

Blutdruck ausgewirkt haben könnte. Aufgrund fehlender Messungen kann hier jedoch nur spekuliert werden. Weiterhin konnte eine starke Lipidakkumulation in der Adventitia und Media beobachtet werden. Dies deutet daraufhin, dass in den Gefäßen und somit auch in Endothelzellen die Fettsäurekonzentrationen hoch waren und die Fettsäure-induzierte Apoptose stattgefunden haben könnte. Warum die Fettablagerungen vor allem an der Adventitia und nicht im subendothelialen Raum auftraten, ist unklar.

Leider konnten weder in den Aorten noch in den Koronarien der Herzschnitte atherosklerotische Veränderungen festgestellt werden. Auch eine Intimaverdickung wurde an diesen Gefäßen nicht beobachtet. Was könnte der Grund dafür sein, dass trotz Ölsäure-reicher Diät keine Läsionen entstanden sind? Eine mögliche Erklärung wäre, dass die niedrigen Cholesterolkonzentrationen der Tiere nicht ausreichend waren, um die Plaquebildung zu induzieren. Wie bereits beschrieben, lagen die LDL-Werte der Trioleat-gefütterten Tiere am Ende des Fütterungsversuches mit durchschnittlich 75 mg/dl zwar deutlich über denen der Kontrollgruppe mit 27 mg/dl, aber man kann spekulieren, dass diese LDL-Konzentrationen nicht ausreichend waren, um die Atherombildung zu induzieren. In der Literatur sind Patientenfälle mit reduzierten Cholesterolwerten bekannt, die trotz massiver Risikofaktoren wie Hypertonie, Rauchen, Übergewicht und Bewegungsmangel keine Atherosklerose entwickelten (Steinberg, 2005). Es muss aber betont werden, dass die Diäten bewusst ohne Cholesterolzusatz eingesetzt wurden, um eben nur den Ölsäureeffekt zu fokussieren.

Möglicherweise war aber auch die Behandlungszeit zu kurz, um Effekte am arteriellen Blutgefäßsystem festzustellen. Wenn man jedoch bedenkt wie krankhaft verändert die Gewebe der behandelten Tiere waren, allen voran die Leber und die später beschriebenen Herzen, erscheint eine Erweiterung des Versuchszeitraums als ebenfalls fraglich.

Auch wenn keine Läsionen messbar waren, kann dennoch eine vermehrte Apoptoserate der Endothelzellen stattgefunden haben.

Das Herzgewebe

Eine weitere wichtige makroskopische Veränderung konnte an den Herzen der Tiere beobachtet werden. Das Herzgewebe der Trioleat-Meerschweinchen war wesentlich zäher, härter und unelastischer als das der Kontrolltiere. Gleichzeitig konnte eine signifikante Reduktion der Herzmassen in der Trioleat-gefütterten Gruppe festgestellt werden. Diese Herzen waren auch in ihrer Größe messbar kleiner. Die Vermutung lag nahe, dass die Veränderungen am Herzmuskel mit der PP2C und der zugefütterten Ölsäure zu tun haben könnten.

Das Herz bezieht seine Energie in Ruhe zum größten Teil aus Fettsäuren, wogegen z.B. das Gehirn fast ausschließlich einfache Kohlenhydrate verbraucht. Wenn am Herzen und an Herzkranzgefäßen ein so gewaltiger Fettsäuretransport stattfindet, dann ist die Frage gestattet, ob diese Lipide die PP2C in Herzmuskelzellen und im Endothel der Koronarien stimulieren könnten, wodurch diese Zellen Apoptose erleiden würden.

Durch die Beobachtung an den Herzen könnte man annehmen, dass der von uns aufgestellte hypothetische Mechanismus zur endothelialen Apoptoseinduktion womöglich auch auf Kardiomyozyten übertragbar ist. Diese hochaktiven Zellen sind auf hohe Fettsäuremengen angewiesen und zeigen entsprechend einen starken Lipidmetabolismus auf. Es könnte theoretisch sein, dass diese Zellen aufgrund des Überangebots der Ölsäure aus der Nahrung ebenfalls apoptotisch zugrunde gehen. Damit könnte die reduzierte Herzgröße der Tiere erklärt werden, schließlich können sich ausdifferenzierte Kardiomyozyten nicht mehr teilen. Diese Betrachtungsweise wird durch histologische Untersuchungen zusätzlich unterstützt. Herzgewebeschnitte von mit Trioleat-gefütterten Tieren wiesen einen unregelmäßigen, inhomogenen Strukturaufbau der Muskelzellen mit großen interzellulären Lücken zwischen den Myozyten im Vergleich zu den Kontrolltieren auf. Nach Rücksprache mit Frau Priv. Doz. Dr. Weißen-Plenz, die die histologischen Untersuchungen an diesen Geweben durchgeführt hat, kann es sich bei dieser Matrix jedoch nicht um Bindegewebe handeln.

Weiterhin konnte eine massive Lipideinlagerung im Herzmuskelgewebe und in den Herzmuskelzellen beobachtet werden. Dies belegt weiterhin, dass am Herzen sehr hohe Fettsäurekonzentrationen geherrscht haben.

Zur weiteren Untersuchung dieser Theorie wurde die durchschnittliche Zelldichte im Herzgewebe analysiert. Es zeigte sich, dass die untersuchten mit Trioleat-gefütterten Meerschweinchen eine durchschnittlich reduzierte Zellzahl pro Fläche im Vergleich zu Kontrolltieren aufwiesen. Dies ist ein deutliches Zeichen dafür, dass dort Zellen durch Apoptose eliminiert worden sind.

Zusätzlich wurde in den Herzsektionen zur Untersuchung des Zelltodes die bewährte TUNEL-Methode angewendet. Das Prinzip dieser Färbung beruht auf einer Markierung von fragmentierter DNA in geschädigten Zellen. Die Ergebnisse belegen klar, dass Herzmuskelzellen von mit Trioleat-gefütterten Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren eine vermehrte Zahl toter Zellen mit gespaltener Nukleinsäure aufwiesen. Jedoch kann mit der TUNEL-Färbung nicht klar zwischen Apoptose und Nekrose differenziert werden, da bei beiden Todesarten DNA-Bruchstücke entstehen (Kylarova *et al.*, 2002). Man muss an dieser

Stelle jedoch anmerken, dass es eher unwahrscheinlich ist, dass die Herzmuskelzellen nekrotisch geschädigt wurden.

Die zuletzt genannten Ergebnisse, die Reduktion der Herzmasse und –größe sowie die histologischen Veränderungen belegen, dass Herz-Myozyten der Trioleat-Gruppe geschädigt wurden. Es konnte ferner mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gezeigt werden, dass Meerschweinchen die PP2C sowie Bad exprimieren. Somit ist es möglich, dass die exogen zugeführte Ölsäure die Phosphatase aktiviert und somit Apoptose in den Kardiomyozyten ausgelöst hat. Die Lipidablagerungen im Herzen der mit Trioleat-gefütterten Meerschweinchen belegen weiterhin, dass die Fettsäurekonzentration dort sehr hoch und eine Aktivierung der PP2C in den Zellen wahrscheinlich war.

Aufgrund des präparativen Aufwandes konnten bis zur Fertigstellung dieser Arbeit nur 6 Herzen analysiert werden (n=3), was eine statistische Aussage zum derzeitigen Punkt nicht möglich macht. Zur Absicherung der hier vorgestellten Ergebnisse müssen noch mehr Organe untersucht werden.

Zur weiteren Überprüfung der Hypothese, bei der Herzmuskelzellen durch die Ölsäure aus der Nahrung apoptotisch werden, müsste ferner gezeigt werden, dass kultivierte Kardiomyozyten durch Zugabe von Ölsäure ähnlich wie Endothelzellen apoptotisch zugrunde gehen können. Dies wäre letztendlich der Beweis, dass die von uns aufgestellte Hypothese zur Fettsäure-induzierten Apoptose nicht nur in Endothelzellen sondern auch in Kardiomyozyten ihre physiologische Relevanz hat. Dazu konnten bereits erste Untersuchungen an primären murinen Kardiomyozyten durchgeführt werden. Expressionsanalysen auf Proteinebene belegten die Präsenz von PP2C und Bad in diesen Zellen. Jedoch stehen die Zellkulturversuche noch aus.

Zusammenfassend belegen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die Fettsäure-induzierte Apoptose mit einer Beteiligung der PP2C nicht nur in der Zellkultur sondern auch *in vivo* ihre Relevanz hat. Scheinbar spielen die beschriebenen Mechanismen eine Rolle in der Atherogenese und in der Entwicklung von Herzmuskelerkrankungen. Diese pathologischen Veränderungen könnten präventiv durch Hemmung der PP2C-Aktivierung bzw. der Fettsäurefreisetzung aus Lipoproteinen therapeutisch behandelt werden.

5 Zusammenfassung

Die endotheliale Dysfunktion, ausgelöst durch einen apoptotischen Untergang von Endothelzellen, ist nach derzeitigem Kenntnisstand der initiale Schritt der Atherosklerose. Zwar ist der Verlauf dieser progressiven Erkrankung relativ gut aufgeklärt, jedoch steht zurzeit immer noch keine kausale Therapie zur Verfügung. Die einzige Möglichkeit, die pathologische Entwicklung zu behandeln, liegt in der Reduktion der Risikofaktoren wie Hyperlipoproteinämie, arterielle Hypertonie und Diabetes mellitus.

Vorangegangene Arbeiten der Arbeitskreise von Frau Prof. Dr. Klumpp und Prof. Dr. Dr. Krieglstein haben gezeigt, dass die Proteinphosphatase 2C (PP2C) durch bestimmte ungesättigte Fettsäuren, wie z.B. Ölsäure, in ihrer Aktivität stimuliert werden kann. Gleichzeitig wurde das proapoptotische Protein Bad, ein Mitglied der Bcl-2-Familie, als Substrat dieses Enzyms identifiziert. Eine Dephosphorylierung von Bad durch Phosphatasen verursacht den apoptotischen Zelltod. Die gleichen Fettsäuren sind ferner in der Lage, Apoptose in kultivierten endothelialen Zellen (HUVECs) auszulösen. Diese auffallende Korrelation konnte mit Hilfe der RNA Interferenz (RNAi) kausal belegt werden und machte deutlich, dass die PP2C an der Fettsäure-induzierten Apoptose beteiligt ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Fettsäuren aus humanen Lipoproteinfraktionen, isoliert mit Hilfe einer Lipase, in der Lage waren sowohl Apoptose in kultivierten Endothelzellen auszulösen als auch die PP2C *in vitro* zu aktivieren.

Diese Ergebnisse sind eindeutig und deuten daraufhin, dass ungesättigte Fettsäuren auch im Organismus zur apoptotischen Schädigung des Endothels führen können, doch weiß man nicht, ob solch hohe Fettsäuremengen *in vivo* erreicht werden. Zwar ist die Gesamtkonzentration der nicht-veresterten Fettsäuren im Blut relativ hoch, die größte Masse der Lipide befindet sich jedoch entweder gebunden an Albumin oder in Lipoproteinen. Somit kann die freie, ungebundene Menge der Fettsäuren nicht durch eine einfache Messung bestimmt werden.

Zur Lösung dieser Frage sollte im Großteil der Arbeit ein der Physiologie nahes Zellkulturmodell etabliert werden, das die vaskulären Verhältnisse möglichst authentisch simuliert. Lipoproteinlipase (LPL) ist das zentrale Enzym im Lipidmetabolismus, das für die Freisetzung von freien Fettsäuren aus Triglyceriden der Lipoproteine verantwortlich ist. In frühen atherosklerotischen Läsionen, den sogenannten *fatty streaks*, die bereits im Kleinkindesalter vorkommen können, produzieren Makrophagen den größten Teil der LPL, die von Endothelzellen aufgenommen und an der luminalen Seite des Gefäßes spezifisch

gebunden wird, um enzymatisch aktiv zu sein. Theoretisch könnte die LPL eine hohe Fettsäurekonzentration im Endothel erzeugen, die ausreichen würde, um die Zellen zu schädigen.

Um diesen Vorgang nachzuahmen, wurde zunächst nachgewiesen, dass kultivierte THP-1-Zellen LPL exprimieren und in das Medium abgeben. Des Weiteren konnte demonstriert werden, dass VLDL-Triglyzeride von der LPL im Medium der THP-1-Zellen hydrolysiert werden und dabei große Mengen an Fettsäuren entstehen, die in der Lage waren Apoptose in HUVECs zu induzieren, während VLDL im normalen Kontrollmedium für die Zellen unschädlich war. Weiterhin konnte nach einer Kokultivierung der HUVECs mit THP-1-Makrophagen demonstriert werden, dass Endothelzellen durch Zugabe von VLDL in physiologischer Konzentration massiv geschädigt wurden. Die beobachtete Apoptoseinduktion konnte durch Hemmung der LPL mit Orlistat, einem spezifischen Lipaseinhibitor, sowie durch eine Herunterregulation des Enzyms in THP-1-Zellen mit siRNA signifikant reduziert werden. Diese Ergebnisse belegen, dass die LPL für die Fettsäurefreisetzung aus Lipoproteinen und indirekt für die Apoptoseinduktion verantwortlich ist.

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen konnte sichergestellt werden, dass die von Makrophagen synthetisierte LPL nach einer Kokultivierung der HUVECs mit sich differenzierenden THP-1-Zellen an Endothelzellen spezifisch binden kann. Es konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, dass die dabei translozierte Lipase-Menge nach einer Inkubation der isolierten HUVECs mit VLDL zu einer Schädigung der Zellen führt.

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Folge einer fettreichen Ernährung an Meerschweinchen untersucht werden. Dazu wurden Dunkin-Hartley-Meerschweinchen für fünf Monate mit speziellen Diäten gefüttert. Dabei erhielt die Behandlungsgruppe ein mit Ölsäure angereichertes Futter (25% Glycerol-Trioleat), während Kontrolltiere eine fettreduzierte Diät bekamen. Im Laufe der 150 d dauernden Fütterungszeit wurde kein Unterschied des Körpergewichts bzw. des Kilokalorienkonsums der Tiere in den beiden Gruppen festgestellt.

Nach Obduktion konnten massive Veränderungen an den Organen der Versuchstiere beobachtet werden. Dabei zeigten die mit Trioleat-gefütterten Tiere eine pathologische Lebervergrößerung und eine erhöhte Menge an subkutanem Fettgewebe. Des Weiteren wiesen diese Meerschweinchen im Vergleich zu Kontrolltieren eine signifikante Reduktion des Herzgewichts und der –größe auf. Die Vermutung lag nahe, dass Herzmuskelzellen nach Aktivierung der PP2C durch Ölsäure aus der Nahrung apoptotisch zugrunde gingen. Mit der

histologischen TUNEL-Färbung konnte eine vermehrte Apoptoserate in Herzmuskelzellen der mit Trioleat-gefütterten Meerschweinchen detektiert werden.

Weiterhin konnten massive Lipidablagerungen im Herzgewebe sowie im Bereich der Media bzw. Adventitia in den Arterien der Behandlungsgruppe festgestellt werden. Dagegen konnte man keine atherosklerotischen Läsionen in den Aorten und Koronarien erkennen. Der Grund für die fehlende Plaquebildung lag vermutlich in den niedrigen Blut-Cholesterolkonzentrationen. Zwar waren die Lipidparameter der mit Trioleat-gefütterten Tiere im Vergleich zu Kontrollen signifikant erhöht, die Gesamtcholesterolwerte lagen jedoch bei 80 mg/dl.

In kleineren Projekten wurden ferner auch die Endothelzell-schützenden Eigenschaften von Docosahexaensäure (DHA), den isolierten Lipoproteinklassen sowie den Inhaltstoffen von Ginkgo biloba untersucht. DHA konnte die Apoptoserate der durch Staurosporin bzw. Serumentzug geschädigten HUVECs im Konzentrationsbereich von 1 bis 50 µM signifikant reduzieren. Diesen protektiven Effekt zeigten auch isoliertes HDL bzw. die einzelnen Komponenten von Ginkgo biloba nach einer Schädigung der Endothelzellen mit Ölsäure.

Zusammenfassend belegen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die Fettsäure-induzierte Apoptose mit einer Beteiligung der PP2C nicht nur in der Zellkultur sondern auch *in vivo* ihre Relevanz hat. Scheinbar spielen die beschriebenen Mechanismen eine Rolle in der Atherogenese und in der Entwicklung von Herzmuskelerkrankungen. Diese pathologischen Veränderungen könnten präventiv durch Hemmung der PP2C-Aktivierung bzw. der Fettsäurefreisetzung aus Lipoproteinen therapeutisch behandelt werden.

6 Literaturverzeichnis

.

Abdu TA, Elhadd T, Pfeifer M, Clayton RN (2001): Endothelial dysfunction in endocrine disease. *Trends Endocrinol Metab* 12: 257-65.

Ahlemeyer B, Junker V, Huhne R, Krieglstein J (2001a): Neuroprotective effects of NV-31, a bilobalide-derived compound: evidence for an antioxidative mechanism. *Brain Res* 890: 338-42.

Ahlemeyer B, Krieglstein J (2003): Neuroprotective effects of Ginkgo biloba extract. *Cell Mol Life Sci* 60: 1779-92.

Ahlemeyer B, Selke D, Schaper C, Klumpp S, Krieglstein J (2001b): Ginkgolic acids induce neuronal death and activate protein phosphatase type-2C. *Eur J Pharmacol* 430: 1-7.

Akbar M, Calderon F, Wen Z, Kim HY (2005): Docosahexaenoic acid: a positive modulator of Akt signaling in neuronal survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 10858-63.

Akdis CA, Blaser K, Akdis M (2004): Apoptosis in tissue inflammation and allergic disease. *Curr Opin Immunol* 16: 717-23.

Alaupovic P, Lee DM, McConathy WJ (1972): Studies on the composition and structure of plasma lipoproteins. Distribution of lipoprotein families in major density classes of normal human plasma lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 260: 689-707.

Alberghina L, Colangelo AM (2006): The modular systems biology approach to investigate the control of apoptosis in Alzheimer's disease neurodegeneration. *BMC Neurosci* 7 Suppl 1: S2.

Amri EZ, Teboul L, Vannier C, Grimaldi PA, Ailhaud G (1996): Fatty acids regulate the expression of lipoprotein lipase gene and activity in preadipose and adipose cells. *Biochem J* 314: 541-6.

Andersson R, Wang X (1998): Patterns of pancreatic cell death: apoptosis versus oncosis. *Pancreas* 17: 281-8.

Antonsson B (2001): Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family "killer-proteins" and their victim the mitochondrion. *Cell Tissue Res* 306: 347-61.

Antonsson B, Martinou JC (2000): The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res* 256: 50-7.

Artwohl M, Graier WF, Roden M, Bischof M, Freudenthaler A, Waldhausl W, Baumgartner-Parzer SM (2003): Diabetic LDL triggers apoptosis in vascular endothelial cells. *Diabetes* 52: 1240-7.

Assmann G, Gotto AM, Jr. (2004): HDL cholesterol and protective factors in atherosclerosis. *Circulation* 109: 8-14.

Auwerx JH, Deeb S, Brunzell JD, Peng R, Chait A (1988): Transcriptional activation of the lipoprotein lipase and apolipoprotein E genes accompanies differentiation in some human macrophage-like cell lines. *Biochemistry* 27: 2651-5.

Babaev VR, Patel MB, Semenkovich CF, Fazio S, Linton MF (2000): Macrophage lipoprotein lipase promotes foam cell formation and atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *J Biol Chem* 275: 26293-9.

Badellino KO, Rader DJ (2004): The role of endothelial lipase in high-density lipoprotein metabolism. *Curr Opin Cardiol* 19: 392-5.

Bae J, Hsu SY, Leo CP, Zell K, Hsueh AJ (2001): Underphosphorylated BAD interacts with diverse antiapoptotic Bcl-2 family proteins to regulate apoptosis. *Apoptosis* 6: 319-30.

Bajaj M, Suraamornkul S, Romanelli A, Cline GW, Mandarino LJ, Shulman GI, DeFronzo RA (2005): Effect of a sustained reduction in plasma free fatty acid concentration on intramuscular long-chain fatty Acyl-CoAs and insulin action in type 2 diabetic patients. *Diabetes* 54: 3148-53.

Bantel H, Schulze-Osthoff K (2003): Apoptosis in hepatitis C virus infection. *Cell Death Differ* 10 Suppl 1: S48-58.

Bao Q, Shi Y (2007): Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ* 14: 56-65.

Barford D (1996): Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases. *Trends Biochem Sci* 21: 407-12.

Beauchamp MC, Letendre E, Renier G (2002): Macrophage lipoprotein lipase expression is increased in patients with heterozygous familial hypercholesterolemia. *J Lipid Res* 43: 215-22.

Beauchamp MC, Michaud SE, Li L, Sartippour MR, Renier G (2004): Advanced glycation end products potentiate the stimulatory effect of glucose on macrophage lipoprotein lipase expression. *J Lipid Res* 45: 1749-57.

Ben-Zeev O, Ben-Avram CM, Wong H, Nikazy J, Shively JE, Schotz MC (1987): Hepatic lipase: a member of a family of structurally related lipases. *Biochim Biophys Acta* 919: 13-20.

Benedict MA, Hu Y, Inohara N, Nunez G (2000): Expression and functional analysis of Apaf-1 isoforms. Extra Wd-40 repeat is required for cytochrome c binding and regulated activation of procaspase-9. *J Biol Chem* 275: 8461-8.

Bersenev AV, Klimenko ED, Kobozeva LP, Michunskaya AB, Onishchenko NA, Pozdnyakov OM (2003): Dyslipidogenic microangiopathy in guinea pigs at early stages of atherogenesis. *Bull Exp Biol Med* 136: 117-9.

Bessesen DH, Robertson AD, Eckel RH (1991): Weight reduction increases adipose but decreases cardiac LPL in reduced-obese Zucker rats. *Am J Physiol* 261: E246-51.

Bevilaqua LR, Cammarota M, Dickson PW, Sim AT, Dunkley PR (2003): Role of protein phosphatase 2C from bovine adrenal chromaffin cells in the dephosphorylation of phospho-serine 40 tyrosine hydroxylase. *J Neurochem* 85: 1368-73.

Bhattacharya AA, Grune T, Curry S (2000): Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin. *J Mol Biol* 303: 721-32.

Bisogno T, Cascio MG, Saha B, Mahadevan A, Urbani P, Minassi A, Appendino G, Saturnino C, Martin B, Razdan R, Di Marzo V (2006): Development of the first potent and specific inhibitors of endocannabinoid biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* 1761: 205-12.

Blanchette-Mackie EJ, Masuno H, Dwyer NK, Olivecrona T, Scow RO (1989): Lipoprotein lipase in myocytes and capillary endothelium of heart: immunocytochemical study. *Am J Physiol* 256: E818-28.

Blanco M, Rodriguez-Yanez M, Sobrino T, Leira R, Castillo J (2005): Platelets, inflammation, and atherothrombotic neurovascular disease: the role of endothelial dysfunction. *Cerebrovasc Dis* 20 Suppl 2: 32-9.

Bliska JB (1995): Crystal structure of the Yersinia tyrosine phosphatase. *Trends Microbiol* 3: 125-7.

Bombeli T, Karsan A, Tait JF, Harlan JM (1997): Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant. *Blood* 89: 2429-42.

Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A (2003): Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 168-75.

Boonkaew T, Camper ND (2005): Biological activities of Ginkgo extracts. *Phytomedicine* 12: 318-23.

Boren J, Olin K, Lee I, Chait A, Wight TN, Innerarity TL (1998): Identification of the principal proteoglycan-binding site in LDL. A single-point mutation in apo-B100 severely affects proteoglycan interaction without affecting LDL receptor binding. *J Clin Invest* 101: 2658-64.

Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF (1998): Decreased lesion formation in CCR2-/- mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* 394: 894-7.

Bork P, Brown NP, Hegyi H, Schultz J (1996): The protein phosphatase 2C (PP2C) superfamily: detection of bacterial homologues. *Protein Sci* 5: 1421-5.

Boyle JJ (1999): Vascular smooth muscle cell apoptosis in atherosclerosis. *Int J Exp Pathol* 80: 197-203.

Brar GA, Kiburz BM, Zhang Y, Kim JE, White F, Amon A (2006): Rec8 phosphorylation and recombination promote the step-wise loss of cohesins in meiosis. *Nature* 441: 532-6.

Braun JE, Severson DL (1992a): Regulation of the synthesis, processing and translocation of lipoprotein lipase. *Biochem J* 287: 337-47.

Braun JE, Severson DL (1992b): Tissue-specific regulation of lipoprotein lipase. *CMAJ* 147: 1192.

Braun JE, Severson DL (1993): Release of lipoprotein lipase from cardiac myocytes by low-molecular weight heparin. *Lipids* 28: 59-61.

Breckenridge DG, Germain M, Mathai JP, Nguyen M, Shore GC (2003): Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene* 22: 8608-18.

Bredt DS, Hwang PM, Snyder SH (1990): Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* 347: 768-70.

Calon F, Lim GP, Yang F, Morihara T, Teter B, Ubeda O, Rostaing P, Triller A, Salem N, Jr., Ashe KH, Frautschy SA, Cole GM (2004): Docosahexaenoic acid protects from dendritic pathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Neuron* 43: 633-45.

Camps L, Gafvels M, Reina M, Wallin C, Vilaro S, Olivecrona T (1990a): Expression of lipoprotein lipase in ovaries of the guinea pig. *Biol Reprod* 42: 917-27.

Camps L, Reina M, Llobera M, Bengtsson-Olivecrona G, Olivecrona T, Vilaro S (1991): Lipoprotein lipase in lungs, spleen, and liver: synthesis and distribution. *J Lipid Res* 32: 1877-88.

Camps L, Reina M, Llobera M, Vilaro S, Olivecrona T (1990b): Lipoprotein lipase: cellular origin and functional distribution. *Am J Physiol* 258: C673-81.

Canagarajah BJ, Khokhlatchev A, Cobb MH, Goldsmith EJ (1997): Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* 90: 859-69.

Carneheim C, Nedergaard J, Cannon B (1988): Cold-induced beta-adrenergic recruitment of lipoprotein lipase in brown fat is due to increased transcription. *Am J Physiol* 254: 155-61.

Chait A, Iverius PH, Brunzell JD (1982): Lipoprotein lipase secretion by human monocyte-derived macrophages. *J Clin Invest* 69: 490-3.

Chang SF, Reich B, Brunzell JD, Will H (1998): Detailed characterization of the binding site of the lipoprotein lipase-specific monoclonal antibody 5D2. *J Lipid Res* 39: 2350-9.

Cheng A, Kaldis P, Solomon MJ (2000): Dephosphorylation of human cyclin-dependent kinases by protein phosphatase type 2C alpha and beta 2 isoforms. *J Biol Chem* 275: 34744-9.

Cheng J, Ogawa K, Kuriki K, Yokoyama Y, Kamiya T, Seno K, Okuyama H, Wang J, Luo C, Fujii T, Ichikawa H, Shirai T, Tokudome S (2003): Increased intake of n-3

polyunsaturated fatty acids elevates the level of apoptosis in the normal sigmoid colon of patients polypectomized for adenomas/tumors. *Cancer Lett* 193: 17-24.

Ching YP, Kobayashi T, Tamura S, Hardie DG (1997): Specificity of different isoforms of protein phosphatase-2A and protein phosphatase-2C studied using site-directed mutagenesis of HMG-CoA reductase. *FEBS Lett* 411: 265-8.

Choi JK, Ho J, Curry S, Qin D, Bittman R, Hamilton JA (2002a): Interactions of very long-chain saturated fatty acids with serum albumin. *J Lipid Res* 43: 1000-10.

Choi SY, Hirata K, Ishida T, Quertermous T, Cooper AD (2002b): Endothelial lipase: a new lipase on the block. *J Lipid Res* 43: 1763-9.

Choy JC, Granville DJ, Hunt DW, McManus BM (2001): Endothelial cell apoptosis: biochemical characteristics and potential implications for atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol* 33: 1673-90.

Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM, Stern DM (1998): Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 91: 3527-61.

Clarke PG, Clarke S (1996): Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomena. *Anat Embryol (Berl)* 193: 81-99.

Cohen GM (1997): Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 326: 1-16.

Cohen P (1994): The discovery of protein phosphatases: from chaos and confusion to an understanding of their role in cell regulation and human disease. *Bioessays* 16: 583-8.

Cohen P (2000a): The regulation of protein function by multisite phosphorylation--a 25 year update. *Trends Biochem Sci* 25: 596-601.

Cohen P (2000b): The regulation of protein function by multisite phosphorylation-a 25 year update. *Trends Biochem Sci* 25: 596-601.

Cohen P (2001): The role of protein phosphorylation in human health and disease. The Sir Hans Krebs Medal Lecture. *Eur J Biochem* 268: 5001-10.

Cohen P, Cohen PT (1989): Protein phosphatases come of age. *J Biol Chem* 264: 21435-8.

Cohen P, Holmes CF, Tsukitani Y (1990): Okadaic acid: a new probe for the study of cellular regulation. *Trends Biochem Sci* 15: 98-102.

Cohen P, Klumpp S, Schelling DL (1989): An improved procedure for identifying and quantitating protein phosphatases in mammalian tissues. *FEBS Lett* 250: 596-600.

Cohen RA (1995): The role of nitric oxide and other endothelium-derived vasoactive substances in vascular disease. *Prog Cardiovasc Dis* 38: 105-28.

Collins RG, Velji R, Guevara NV, Hicks MJ, Chan L, Beaudet AL (2000): P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp Med* 191: 189-94.

Condorelli F, Salomoni P, Cotteret S, Cesi V, Srinivasula SM, Alnemri ES, Calabretta B (2001): Caspase cleavage enhances the apoptosis-inducing effects of BAD. *Mol Cell Biol* 21: 3025-36.

Cregan SP, MacLaurin JG, Craig CG, Robertson GS, Nicholson DW, Park DS, Slack RS (1999): Bax-dependent caspase-3 activation is a key determinant in p53-induced apoptosis in neurons. *J Neurosci* 19: 7860-9.

Cryer A (1981): Tissue lipoprotein lipase activity and its action in lipoprotein metabolism. *Int J Biochem* 13: 525-41.

Cryer A, Kirtland J, Jones HM, Gurr MI (1978): Lipoprotein lipase activity in the tissues of guinea pigs exposed to different dietary fats from conception to three months of age. *Biochem J* 170: 169-72.

Das AK, Helps NR, Cohen PT, Barford D (1996): Crystal structure of the protein serine/threonine phosphatase 2C at 2.0 A resolution. *EMBO J* 15: 6798-809.

Das UN (2000): Beneficial effect(s) of n-3 fatty acids in cardiovascular diseases: but, why and how? *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 63: 351-62.

Datta SR, Katsov A, Hu L, Petros A, Fesik SW, Yaffe MB, Greenberg ME (2000): 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Mol Cell* 6: 41-51.

Daugas E, Susin SA, Zamzami N, Ferri KF, Irinopoulou T, Larochette N, Prevost MC, Leber B, Andrews D, Penninger J, Kroemer G (2000): Mitochondrio-nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis. *FASEB J* 14: 729-39.

Davidson MH (2006): Mechanisms for the hypotriglyceridemic effect of marine omega-3 fatty acids. *Am J Cardiol* 98: 27i-33i.

Deanfield J, Donald A, Ferri C, Giannattasio C, Halcox J, Halligan S, Lerman A, Mancia G, Oliver JJ, Pessina AC, Rizzoni D, Rossi GP, Salvetti A, Schiffrin EL, Taddei S, Webb DJ (2005): Endothelial function and dysfunction. Part I: Methodological issues for assessment in the different vascular beds: a statement by the Working Group on Endothelin and Endothelial Factors of the European Society of Hypertension. *J Hypertens* 23: 7-17.

Defeudis FV (2002): Bilobalide and neuroprotection. *Pharmacol Res* 46: 565-8.

Denecker G, Dooms H, Van Loo G, Vercammen D, Grooten J, Fiers W, Declercq W, Vandenabeele P (2000): Phosphatidyl serine exposure during apoptosis precedes release of cytochrome c and decrease in mitochondrial transmembrane potential. *FEBS Lett* 465: 47-52.

Desdouits F, Siciliano JC, Nairn AC, Greengard P, Girault JA (1998): Dephosphorylation of Ser-137 in DARPP-32 by protein phosphatases 2A and 2C: different roles in vitro and in striatonigral neurons. *Biochem J* 330: 211-6.

Dimmeler S, Hermann C, Zeiher AM (1998): Apoptosis of endothelial cells. Contribution to the pathophysiology of atherosclerosis? *Eur Cytokine Netw* 9: 697-8.

Dobiasova M, Frohlich JJ (1999): Advances in understanding of the role of lecithin cholesterol acyltransferase (LCAT) in cholesterol transport. *Clin Chim Acta* 286: 257-71.

Dombradi V, Krieglstein J, Klumpp S (2002): Regulating the regulators. Conference on protein phosphorylation and protein phosphatases. *EMBO Rep* 3: 120-4.

Domin WS, Chait A, Deeb SS (1991): Transcriptional activation of the lipoprotein lipase gene in macrophages by dexamethasone. *Biochemistry* 30: 2570-4.

Dong ZM, Chapman SM, Brown AA, Frenette PS, Hynes RO, Wagner DD (1998): The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest* 102: 145-52.

Doolittle MH, Ben-Zeev O, Elovson J, Martin D, Kirchgessner TG (1990): The response of lipoprotein lipase to feeding and fasting. Evidence for posttranslational regulation. *J Biol Chem* 265: 4570-7.

Dory L (1993): Post-transcriptional regulation of apolipoprotein E expression in mouse macrophages by phorbol ester. *Biochem J* 292: 105-11.

Dunnigan MG (1968): The use of Nile blue sulphate in the histochemical identification of phospholipids. *Stain Technol* 43: 249-56.

Dusting GJ, Moncada S, Vane JR (1979): Prostaglandins, their intermediates and precursors: cardiovascular actions and regulatory roles in normal and abnormal circulatory systems. *Prog Cardiovasc Dis* 21: 405-30.

Dworak M (2006): Die Proteinphosphatase 2C - Aktivierung durch Fettsäuren und die Bedeutung für die endotheliale Apoptose. Dissertation, Universität Münster.

Eastman A (1995): Survival factors, intracellular signal transduction, and the activation of endonucleases in apoptosis. *Semin Cancer Biol* 6: 45-52.

Eguchi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y (1997): Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer Res* 57: 1835-40.

Eitel K, Staiger H, Brendel MD, Brandhorst D, Bretzel RG, Haring HU, Kellerer M (2002): Different role of saturated and unsaturated fatty acids in beta-cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 299: 853-6.

Ek P, Pettersson G, Ek B, Gong F, Li JP, Zetterqvist O (2002): Identification and characterization of a mammalian 14-kDa phosphohistidine phosphatase. *Eur J Biochem* 269: 5016-23.

Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S (1998): A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391: 43-50.

Enerback S, Gimble JM (1993): Lipoprotein lipase gene expression: physiological regulators at the transcriptional and post-transcriptional level. *Biochim Biophys Acta* 1169: 107-25.

Fabian MA, Biggs WH, 3rd, Treiber DK, Atteridge CE, Azimioara MD, Benedetti MG, Carter TA, Ciceri P, Edeen PT, Floyd M, Ford JM, Galvin M, Gerlach JL, Grotzfeld RM, Herrgard S, Insko DE, Insko MA, Lai AG, Lelias JM, Mehta SA, Milanov ZV, Velasco AM, Wodicka LM, Patel HK, Zarrinkar PP, Lockhart DJ (2005): A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors. *Nat Biotechnol* 23: 329-36.

Fadeel B, Orrenius S (2005): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J Intern Med* 258: 479-517.

Farrow SN, Brown R (1996): New members of the Bcl-2 family and their protein partners. *Curr Opin Genet Dev* 6: 45-9.

Feitelson MA (1998): Hepatitis B x antigen and p53 in the development of hepatocellular carcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 5: 367-74.

Feletou M, Vanhoutte PM (2006): Endothelial dysfunction: a multifaceted disorder (The Wiggers Award Lecture). *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291: H985-1002.

Fernandez ML (2001): Guinea pigs as models for cholesterol and lipoprotein metabolism. *J Nutr* 131: 10-20.

Fernandez ML, Abdel-Fattah G, McNamara DJ (1995a): Differential effects of simple vs. complex carbohydrates on VLDL secretion rates and HDL metabolism in the guinea pig. *Biochim Biophys Acta* 1256: 31-8.

Fernandez ML, Sun DM, Montano C, McNamara DJ (1995b): Carbohydrate-fat exchange and regulation of hepatic cholesterol and plasma lipoprotein metabolism in the guinea pig. *Metabolism* 44: 855-64.

Fernandez ML, Volek JS (2006): Guinea pigs: A suitable animal model to study lipoprotein metabolism, atherosclerosis and inflammation. *Nutr Metab (Lond)* 3: 17.

Ferrari D, Pinton P, Szabadkai G, Chami M, Campanella M, Pozzan T, Rizzuto R (2002): Endoplasmic reticulum, Bcl-2 and Ca^{2+} handling in apoptosis. *Cell Calcium* 32: 413-20.

Ferrer I (2006): Apoptosis: future targets for neuroprotective strategies. *Cerebrovasc Dis* 21 Suppl 2: 9-20.

Fesik SW (2005): Promoting apoptosis as a strategy for cancer drug discovery. *Nat Rev Cancer* 5: 876-85.

Fink SL, Cookson BT (2005): Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun* 73: 1907-16.

Fiscella M, Zhang H, Fan S, Sakaguchi K, Shen S, Mercer WE, Vande Woude GF, O'Connor PM, Appella E (1997): Wip1, a novel human protein phosphatase that is induced in response to ionizing radiation in a p53-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 6048-53.

Flajolet M, Rakhilin S, Wang H, Starkova N, Nuangchamnong N, Nairn AC, Greengard P (2003): Protein phosphatase 2C binds selectively to and dephosphorylates metabotropic glutamate receptor 3. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 16006-11.

Folkman J, D'Amore PA (1996): Blood vessel formation: what is its molecular basis? *Cell* 87: 1153-5.

Forrester JS, Makkar R, Shah PK (2005): Increasing high-density lipoprotein cholesterol in dyslipidemia by cholesteryl ester transfer protein inhibition: an update for clinicians. *Circulation* 111: 1847-54.

Fredrickson DS, Gordon RS, Jr. (1958): The metabolism of albumin-bound C14-labeled unesterified fatty acids in normal human subjects. *J Clin Invest* 37: 1504-15.

Fried SK, Russell CD, Grauso NL, Brolin RE (1993): Lipoprotein lipase regulation by insulin and glucocorticoid in subcutaneous and omental adipose tissues of obese women and men. *J Clin Invest* 92: 2191-8.

Fueger PT (2005): Glucose phosphorylation as a barrier to muscle glucose uptake. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 32: 314-8.

Fukunaga K, Kobayashi T, Tamura S, Miyamoto E (1993): Dephosphorylation of autophosphorylated Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase II by protein phosphatase 2C. *J Biol Chem* 268: 133-7.

Gao T, Furnari F, Newton AC (2005): PHLPP: a phosphatase that directly dephosphorylates Akt, promotes apoptosis, and suppresses tumor growth. *Mol Cell* 18: 13-24.

Gee CE, Mansuy IM (2005): Protein phosphatases and their potential implications in neuroprotective processes. *Cell Mol Life Sci* 62: 1120-30.

Gehringer MM (2004): Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: a dualistic response. *FEBS Lett* 557: 1-8.

Gerhard GT, Duell PB (1999): Homocysteine and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 10: 417-28.

Gimbrone MA, Jr. (1999): Vascular endothelium, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Am J Pathol* 155: 1-5.

Gjertsen BT, Doskeland SO (1995): Protein phosphorylation in apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1269: 187-99.

Goldberg IJ (1996): Lipoprotein lipase and lipolysis: central roles in lipoprotein metabolism and atherogenesis. *J Lipid Res* 37: 693-707.

Goldstein JL, Brown MS (1984): Progress in understanding the LDL receptor and HMG-CoA reductase, two membrane proteins that regulate the plasma cholesterol. *J Lipid Res* 25: 1450-61.

Gonzalez A, Ravassa S, Lopez B, Loperena I, Querejeta R, Diez J (2006): Apoptosis in hypertensive heart disease: a clinical approach. *Curr Opin Cardiol* 21: 288-94.

Goudriaan JR, Espirito Santo SM, Voshol PJ, Teusink B, van Dijk KW, van Vlijmen BJ, Romijn JA, Havekes LM, Rensen PC (2004): The VLDL receptor plays a major role in chylomicron metabolism by enhancing LPL-mediated triglyceride hydrolysis. *J Lipid Res* 45: 1475-81.

Graves JD, Krebs EG (1999): Protein phosphorylation and signal transduction. *Pharmacol Ther* 82: 111-21.

Green DR, Reed JC (1998): Mitochondria and apoptosis. *Science* 281: 1309-12.

Greenwood MR (1985): The relationship of enzyme activity to feeding behavior in rats: lipoprotein lipase as the metabolic gatekeeper. *Int J Obes* 9 Suppl 1: 67-70.

Griendling KK, FitzGerald GA (2003): Oxidative stress and cardiovascular injury: Part II: animal and human studies. *Circulation* 108: 2034-40.

Griffin DE, Hardwick JM (1997): Regulators of apoptosis on the road to persistent alphavirus infection. *Annu Rev Microbiol* 51: 565-92.

Grimm S (2003): Programmierter Zelltod: Die Apoptose. *Chemie in Unserer Zeit* 37: 172-9.

Groener JE, van Gent T, van Tol A (1989): Effect of lipid transfer protein on plasma lipids, apolipoproteins and metabolism of high-density lipoprotein cholesteryl ester in the rat. *Biochim Biophys Acta* 1002: 93-100.

Gross A (2005): Mitochondrial carrier homolog 2: a clue to cracking the BCL-2 family riddle? *J Bioenerg Biomembr* 37: 113-9.

Gruen R, Hietanen E, Greenwood MR (1978): Increased adipose tissue lipoprotein lipase activity during the development of the genetically obese rat (fa/fa). *Metabolism* 27: 1955-66.

Grzeschik SM (2003): On the role of superoxide dismutase and protein phosphatase type-2C beta in neuronal cell death. Dissertation, Universität Marburg.

Gu L, Okada Y, Clinton SK, Gerard C, Sukhova GK, Libby P, Rollins BJ (1998): Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell* 2: 275-81.

Guegan C, Vila M, Rosoklija G, Hays AP, Przedborski S (2001): Recruitment of the mitochondrial-dependent apoptotic pathway in amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci* 21: 6569-76.

Gupta S (2001): Molecular steps of tumor necrosis factor receptor-mediated apoptosis. *Curr Mol Med* 1: 317-24.

Gupta S, Radha V, Furukawa Y, Swarup G (2001): Direct transcriptional activation of human caspase-1 by tumor suppressor p53. *J Biol Chem* 276: 10585-8.

Guthridge MA, Bellosta P, Tavoloni N, Basilico C (1997): FIN13, a novel growth factor-inducible serine-threonine phosphatase which can inhibit cell cycle progression. *Mol Cell Biol* 17: 5485-98.

Ha YC, Barter PJ (1982): Differences in plasma cholesteryl ester transfer activity in sixteen vertebrate species. *Comp Biochem Physiol B* 71: 265-9.

Hadigan C, Liebau J, Torriani M, Andersen R, Grinspoon S (2006): Improved triglycerides and insulin sensitivity with 3 months of acipimox in human immunodeficiency virus-infected patients with hypertriglyceridemia. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 4438-44.

Hadvary P, Sidler W, Meister W, Vetter W, Wolfer H (1991): The lipase inhibitor tetrahydrolipstatin binds covalently to the putative active site serine of pancreatic lipase. *J Biol Chem* 266: 2021-7.

Hanada M, Kobayashi T, Ohnishi M, Ikeda S, Wang H, Katsura K, Yanagawa Y, Hiraga A, Kanamaru R, Tamura S (1998): Selective suppression of stress-activated protein kinase pathway by protein phosphatase 2C in mammalian cells. *FEBS Lett* 437: 172-6.

Hanada M, Ninomiya-Tsuji J, Komaki K, Ohnishi M, Katsura K, Kanamaru R, Matsumoto K, Tamura S (2001): Regulation of the TAK1 signaling pathway by protein phosphatase 2C. *J Biol Chem* 276: 5753-9.

Hannon GJ (2002): RNA interference. *Nature* 418: 244-51.

Hardy S, El-Assaad W, Przybytkowski E, Joly E, Prentki M, Langelier Y (2003): Saturated fatty acid-induced apoptosis in MDA-MB-231 breast cancer cells. A role for cardiolipin. *J Biol Chem* 278: 31861-70.

Hardy S, St-Onge GG, Joly E, Langelier Y, Prentki M (2005): Oleate promotes the proliferation of breast cancer cells via the G protein-coupled receptor GPR40. *J Biol Chem* 280: 13285-91.

Harfe BD, McManus MT, Mansfield JH, Hornstein E, Tabin CJ (2005): The RNaseIII enzyme Dicer is required for morphogenesis but not patterning of the vertebrate limb. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 10898-903.

Hasham SN, Pillarisetti S (2006): Vascular lipases, inflammation and atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 372: 179-83.

Healy DA, Watson RW, Newsholme P (2003): Polyunsaturated and monounsaturated fatty acids increase neutral lipid accumulation, caspase activation and apoptosis in a neutrophil-like, differentiated HL-60 cell line. *Clin Sci (Lond)* 104: 171-9.

Heath RB, Karpe F, Milne RW, Burdge GC, Wootton SA, Frayn KN (2007): Dietary fatty acids make a rapid and substantial contribution to VLDL-triacylglycerol in the fed state. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292: 732-9.

Herzig S, Neumann J (2000): Effects of serine/threonine protein phosphatases on ion channels in excitable membranes. *Physiol Rev* 80: 173-210.

Hide WA, Chan L, Li WH (1992): Structure and evolution of the lipase superfamily. *J Lipid Res* 33: 167-78.

Hinds MG, Smits C, Fredericks-Short R, Risk JM, Bailey M, Huang DC, Day CL (2007): Bim, Bad and Bmf: intrinsically unstructured BH3-only proteins that undergo a localized conformational change upon binding to prosurvival Bcl-2 targets. *Cell Death Differ* 14: 128-36.

Hiraga A, Kikuchi K, Tamura S, Tsuiki S (1981): Purification and characterization of Mg^{2+}-dependent glycogen synthase phosphatase (phosphoprotein phosphatase IA) from rat liver. *Eur J Biochem* 119: 503-10.

Hirata K, Dichek HL, Cioffi JA, Choi SY, Leeper NJ, Quintana L, Kronmal GS, Cooper AD, Quertermous T (1999): Cloning of a unique lipase from endothelial cells extends the lipase gene family. *J Biol Chem* 274: 14170-5.

Holmberg CI, Tran SE, Eriksson JE, Sistonen L (2002): Multisite phosphorylation provides sophisticated regulation of transcription factors. *Trends Biochem Sci* 27: 619-27.

Homma H, Kurachi H, Nishio Y, Takeda T, Yamamoto T, Adachi K, Morishige K, Ohmichi M, Matsuzawa Y, Murata Y (2000): Estrogen suppresses transcription of lipoprotein lipase gene. Existence of a unique estrogen response element on the lipoprotein lipase promoter. *J Biol Chem* 275: 11404-11.

Hooper L, Thompson RL, Harrison RA, Summerbell CD, Moore H, Worthington HV, Durrington PN, Ness AR, Capps NE, Davey Smith G, Riemersma RA, Ebrahim SB (2004): Omega 3 fatty acids for prevention and treatment of cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev*: CD003177.

Hsu SY, Hsueh AJ (2000): Tissue-specific Bcl-2 protein partners in apoptosis: An ovarian paradigm. *Physiol Rev* 80: 593-614.

Huang DC, Adams JM, Cory S (1998): The conserved N-terminal BH4 domain of Bcl-2 homologues is essential for inhibition of apoptosis and interaction with CED-4. *EMBO J* 17: 1029-39.

Hufnagel B (2005): Die Rolle der Proteinphosphatase 2C in der Fettsäure-induzierten Apoptose von Endothelzellen. Dissertation, Universität Marburg.

Hufnagel B, Dworak M, Schwarz S, Kewitz T, Reinbold M, Klumpp S, Krieglstein J (2007): Inhibition of oleic acid activated protein phosphatase 2C and apoptosis in endothelial cells and macrophages. *Eingereicht*.

Hufnagel B, Dworak M, Soufi M, Mester Z, Zhu Y, Schaefer JR, Klumpp S, Krieglstein J (2005): Unsaturated fatty acids isolated from human lipoproteins activate protein phosphatase type 2Cbeta and induce apoptosis in endothelial cells. *Atherosclerosis* 180: 245-54.

Hufnagel B, Klumpp S, Maisch B, Schaefer J, Krieglstein J (2006): Ungesättigte Fettsäuren und Atherosklerose. *Deutsche Apotheker Zeitung* 1: 43-51.

Hunter T (1995): Protein kinases and phosphatases: the yin and yang of protein phosphorylation and signaling. *Cell* 80: 225-36.

Huppi K, Martin SE, Caplen NJ (2005): Defining and assaying RNAi in mammalian cells. *Mol Cell* 17: 1-10.

Hussain MM (2000): A proposed model for the assembly of chylomicrons. *Atherosclerosis* 148: 1-15.

Huuskonen J, Ehnholm C (2000): Phospholipid transfer protein in lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol* 11: 285-9.

Ingebritsen TS, Cohen P (1983a): The protein phosphatases involved in cellular regulation. 1. Classification and substrate specificities. *Eur J Biochem* 132: 255-61.

Ingebritsen TS, Cohen P (1983b): Protein phosphatases: properties and role in cellular regulation. *Science* 221: 331-8.

Ingebritsen TS, Foulkes JG, Cohen P (1983): The protein phosphatases involved in cellular regulation. 2. Glycogen metabolism. *Eur J Biochem* 132: 263-74.

Ishida T, Choi S, Kundu RK, Hirata K, Rubin EM, Cooper AD, Quertermous T (2003): Endothelial lipase is a major determinant of HDL level. *J Clin Invest* 111: 347-55.

Iverius PH, Ostlund-Lindqvist AM (1976): Lipoprotein lipase from bovine milk. Isolation procedure, chemical characterization, and molecular weight analysis. *J Biol Chem* 251: 7791-5.

Jackson RL, Morrisett JD, Gotto AM, Jr. (1976): Lipoprotein structure and metabolism. *Physiol Rev* 56: 259-316.

Janero DR, Siuta-Mangano P, Miller KW, Lane MD (1984): Synthesis, processing, and secretion of hepatic very low density lipoprotein. *J Cell Biochem* 24: 131-52.

Javitt NB (2002): Cholesterol, hydroxycholesterols, and bile acids. *Biochem Biophys Res Commun* 292: 1147-53.

Jaye M, Lynch KJ, Krawiec J, Marchadier D, Maugeais C, Doan K, South V, Amin D, Perrone M, Rader DJ (1999): A novel endothelial-derived lipase that modulates HDL metabolism. *Nat Genet* 21: 424-8.

Jimbo A, Fujita E, Kouroku Y, Ohnishi J, Inohara N, Kuida K, Sakamaki K, Yonehara S, Momoi T (2003): ER stress induces caspase-8 activation, stimulating cytochrome c release and caspase-9 activation. *Exp Cell Res* 283: 156-66.

Jin W, Millar JS, Broedl U, Glick JM, Rader DJ (2003): Inhibition of endothelial lipase causes increased HDL cholesterol levels in vivo. *J Clin Invest* 111: 357-62.

Jorgensen RA, Cluster PD, English J, Que Q, Napoli CA (1996): Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs. complex T-DNA sequences. *Plant Mol Biol* 31: 957-73.

Jude S, Roger S, Martel E, Besson P, Richard S, Bougnoux P, Champeroux P, Le Guennec JY (2006): Dietary long-chain omega-3 fatty acids of marine origin: a comparison of their protective effects on coronary heart disease and breast cancers. *Prog Biophys Mol Biol* 90: 299-325.

Kanduc D, Mittelman A, Serpico R, Sinigaglia E, Sinha AA, Natale C, Santacroce R, Di Corcia MG, Lucchese A, Dini L, Pani P, Santacroce S, Simone S, Bucci R, Farber E (2002): Cell death: apoptosis versus necrosis (review). *Int J Oncol* 21: 165-70.

Kaperonis EA, Liapis CD, Kakisis JD, Dimitroulis D, Papavassiliou VG (2006): Inflammation and atherosclerosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 31: 386-93.

Kashiwaba M, Katsura K, Ohnishi M, Sasaki M, Tanaka H, Nishimune Y, Kobayashi T, Tamura S (2003): A novel protein phosphatase 2C family member (PP2Czeta) is able to associate with ubiquitin conjugating enzyme 9. *FEBS Lett* 538: 197-202.

Kato S, Terasawa T, Kobayashi T, Ohnishi M, Sasahara Y, Kusuda K, Yanagawa Y, Hiraga A, Matsui Y, Tamura S (1995): Molecular cloning and expression of mouse mg^{2+}-dependent protein phosphatase beta-4 (type 2C beta-4). *Arch Biochem Biophys* 318: 387-93.

Kavurma MM, Bhindi R, Lowe HC, Chesterman C, Khachigian LM (2005): Vessel wall apoptosis and atherosclerotic plaque instability. *J Thromb Haemost* 3: 465-72.

Kawakami M, Murase T, Ishibashi S, Mori N, Takaku F (1986): Lipoprotein lipase in mouse peritoneal macrophages: the effects of insulin and dexamethasone. *J Biochem (Tokyo)* 100: 1373-8.

Kelekar A, Thompson CB (1998): Bcl-2-family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol* 8: 324-30.

Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV (1994): Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73: 2013-26.

Kew MC (1997): Increasing evidence that hepatitis B virus X gene protein and p53 protein may interact in the pathogenesis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 25: 1037-8.

Kikuchi K, Tamura S, Hiraga A, Tsuiki S (1977): Glycogen synthase phosphatase of rat liver. Its separation from phosphorylase phosphatase on DE-52 columns. *Biochem Biophys Res Commun* 75: 29-37.

Kim LH, Nadarajah VS, Peh SC, Poppema S (2004): Expression of Bcl-2 family members and presence of Epstein-Barr virus in the regulation of cell growth and death in classical Hodgkin's lymphoma. *Histopathology* 44: 257-67.

Kim R (2005): Unknotting the roles of Bcl-2 and Bcl-xL in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 333: 336-43.

Kirchgessner TG, Chuat JC, Heinzmann C, Etienne J, Guilhot S, Svenson K, Ameis D, Pilon C, d'Auriol L, Andalibi A, et al. (1989): Organization of the human lipoprotein lipase gene and evolution of the lipase gene family. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 9647-51.

Klumpp S, Bechmann G, Maurer A, Selke D, Krieglstein J (2003a): ATP-citrate lyase as a substrate of protein histidine phosphatase in vertebrates. *Biochem Biophys Res Commun* 306: 110-5.

Klumpp S, Cohen P, Schultz JE (1990): Okadaic acid, an inhibitor of protein phosphatase 1 in Paramecium, causes sustained Ca^{2+}-dependent backward swimming in response to depolarizing stimuli. *EMBO J* 9: 685-9.

Klumpp S, Hermesmeier J, Selke D, Baumeister R, Kellner R, Krieglstein J (2002a): Protein histidine phosphatase: a novel enzyme with potency for neuronal signaling. *J Cereb Blood Flow Metab* 22: 1420-4.

Klumpp S, Mäurer A, Zhu Y, Aichele D, Pinna LA, Krieglstein J (2004): Protein kinase CK2 phosphorylates BAD at threonine-117. *Neurochem Int* 45: 747-52.

Klumpp S, Selke D, Ahlemeyer B, Schaper C, Krieglstein J (2002b): Relationship between protein phosphatase type-2C activity and induction of apoptosis in cultured neuronal cells. *Neurochem Int* 41: 251-9.

Klumpp S, Selke D, Hermesmeier J (1998): Protein phosphatase type 2C active at physiological Mg^{2+}: stimulation by unsaturated fatty acids. *FEBS Lett* 437: 229-32.

Klumpp S, Selke D, Krieglstein J (2003b): Protein phosphatase type 2C dephosphorylates BAD. *Neurochem Int* 42: 555-60.

Klumpp S, Thissen MC, Krieglstein J (2006): Protein phosphatases types 2Calpha and 2Cbeta in apoptosis. *Biochem Soc Trans* 34: 1370-5.

Kobor MS, Greenblatt J (2002): Regulation of transcription elongation by phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 1577: 261-275.

Koh CG, Tan EJ, Manser E, Lim L (2002): The p21-activated kinase PAK is negatively regulated by POPX1 and POPX2, a pair of serine/threonine phosphatases of the PP2C family. *Curr Biol* 12: 317-21.

Kohan DE (2006): The renal medullary endothelin system in control of sodium and water excretion and systemic blood pressure. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 15: 34-40.

Kok FJ, Kromhout D (2004): Atherosclerosis-epidemiological studies on the health effects of a Mediterranean diet. *Eur J Nutr* 43 Suppl 1: I/2-5.

Komaki K, Katsura K, Ohnishi M, Guang Li M, Sasaki M, Watanabe M, Kobayashi T, Tamura S (2003): Molecular cloning of PP2Ceta, a novel member of the protein phosphatase 2C family. *Biochim Biophys Acta* 1630: 130-7.

Korbut R, Moncada S (1978): Prostacyclin (PGI2) and thromboxane A2 interaction in vivo. Regulation by aspirin and relationship with anti-thrombotic therapy. *Thromb Res* 13: 489-500.

Korn ED, Quigley TW, Jr. (1957): Lipoprotein lipase of chicken adipose tissue. *J Biol Chem* 226: 833-9.

Kostner GM (2003): Causes of vascular injury. Endothelial function, morphology and biochemistry of atherosclerosis. *Pharm in Unserer Zeit* 32: 458-63.

Krebs EG, Graves DJ, Fischer EH (1959): Factors affecting the activity of muscle phosphorylase b kinase. *J Biol Chem* 234: 2867-73.

Krieger M, Herz J (1994): Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu Rev Biochem* 63: 601-37.

Kroemer G, Reed JC (2000): Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 6: 513-9.

Kurz A, Van Baelen B (2004): Ginkgo biloba compared with cholinesterase inhibitors in the treatment of dementia: a review based on meta-analyses by the cochrane collaboration. *Dement Geriatr Cogn Disord* 18: 217-26.

Kutuk O, Basaga H (2006): Bcl-2 protein family: implications in vascular apoptosis and atherosclerosis. *Apoptosis* 11: 1661-75.

Kylarova D, Prochazkova J, Mad'arova J, Bartos J, Lichnovsky V (2002): Comparison of the TUNEL, lamin B and annexin V methods for the detection of apoptosis by flow cytometry. *Acta Histochem* 104: 367-70.

Labes M, Roder J, Roach A (1998): A novel phosphatase regulating neurite extension on CNS inhibitors. *Mol Cell Neurosci* 12: 29-47.

Lamuela-Raventos RM, Gimeno E, Fito M, Castellote AI, Covas M, de la Torre-Boronat MC, Lopez-Sabater MC (2004): Interaction of olive oil phenol antioxidant components with low-density lipoprotein. *Biol Res* 37: 247-52.

Lane DP (1992): Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358: 15-6.

Leaver HA, Rizzo MT, Whittle IR (2002): Antitumour actions of highly unsaturated fatty acids: cell signalling and apoptosis. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66: 1-3.

Lee SJ, Lee DW, Kim KS, Lee IK (2001): Effect of estrogen on endothelial dysfunction in postmenopausal women with diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 54 Suppl 2: 81-92.

Leist M, Single B, Castoldi AF, Kuhnle S, Nicotera P (1997): Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* 185: 1481-6.

Leung-Hagesteijn C, Mahendra A, Naruszewicz I, Hannigan GE (2001): Modulation of integrin signal transduction by ILKAP, a protein phosphatase 2C associating with the integrin-linked kinase, ILK1. *EMBO J* 20: 2160-70.

Li D, Wang F, Lai M, Chen Y, Zhang JF (2005): A protein phosphatase 2calpha-Ca^{2+} channel complex for dephosphorylation of neuronal Ca^{2+} channels phosphorylated by protein kinase C. *J Neurosci* 25: 1914-23.

Li MG, Katsura K, Nomiyama H, Komaki K, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K, Kobayashi T, Tamura S (2003): Regulation of the interleukin-1-induced signaling pathways by a novel member of the protein phosphatase 2C family (PP2Cepsilon). *J Biol Chem* 278: 12013-21.

Libby P (2000): Changing concepts of atherogenesis. *J Intern Med* 247: 349-58.

Libby P (2002): Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420: 868-74.

Libby P, Aikawa M (2002): Stabilization of atherosclerotic plaques: new mechanisms and clinical targets. *Nat Med* 8: 1257-62.

Lin X, Duan X, Liang YY, Su Y, Wrighton KH, Long J, Hu M, Davis CM, Wang J, Brunicardi FC, Shi Y, Chen YG, Meng A, Feng XH (2006): PPM1A functions as a Smad phosphatase to terminate TGFbeta signaling. *Cell* 125: 915-28.

Lindqvist P, Ostlund-Lindqvist AM, Witztum JL, Steinberg D, Little JA (1983): The role of lipoprotein lipase in the metabolism of triglyceride-rich lipoproteins by macrophages. *J Biol Chem* 258: 9086-92.

Lockshin RA, Williams CM (1965): Programmed Cell Death-I. Cytology of Degeneration in the Intersegmental Muscles of the Pernyi Silkmoth. *J Insect Physiol* 11: 123-33.

Loeffler B, Heeren J, Blaeser M, Radner H, Kayser D, Aydin B, Merkel M (2006): Lipoprotein lipase facilitated uptake of LDL is mediated by the LDL receptor. *J Lipid Res*.

Lookene A, Skottova N, Olivecrona G (1994): Interactions of lipoprotein lipase with the active-site inhibitor tetrahydrolipstatin (Orlistat). *Eur J Biochem* 222: 395-403.

Lookene A, Zhang L, Hultin M, Olivecrona G (2004): Rapid subunit exchange in dimeric lipoprotein lipase and properties of the inactive monomer. *J Biol Chem* 279: 49964-72.

Lord SJ, Rajotte RV, Korbutt GS, Bleackley RC (2003): Granzyme B: a natural born killer. *Immunol Rev* 193: 31-8.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-75.

Lu ZH, Mu YM, Wang BA, Li XL, Lu JM, Li JY, Pan CY, Yanase T, Nawata H (2003): Saturated free fatty acids, palmitic acid and stearic acid, induce apoptosis by stimulation of ceramide generation in rat testicular Leydig cell. *Biochem Biophys Res Commun* 303: 1002-7.

Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X (1998): Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 94: 481-90.

Lusis AJ (2000): Atherosclerosis. *Nature* 407: 233-41.

MacKeigan JP, Murphy LO, Blenis J (2005): Sensitized RNAi screen of human kinases and phosphatases identifies new regulators of apoptosis and chemoresistance. *Nat Cell Biol* 7: 591-600.

MacKintosh C, Beattie KA, Klumpp S, Cohen P, Codd GA (1990): Cyanobacterial microcystin-LR is a potent and specific inhibitor of protein phosphatases 1 and 2A from both mammals and higher plants. *FEBS Lett* 264: 187-92.

MacManus JP, Linnik MD (1997): Gene expression induced by cerebral ischemia: an apoptotic perspective. *J Cereb Blood Flow Metab* 17: 815-32.

Mamputu JC, Desfaits AC, Renier G (1997): Lipoprotein lipase enhances human monocyte adhesion to aortic endothelial cells. *J Lipid Res* 38: 1722-9.

Mamputu JC, Levesque L, Renier G (2000): Proliferative effect of lipoprotein lipase on human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 2212-9.

Mann DJ, Campbell DG, McGowan CH, Cohen PT (1992): Mammalian protein serine/threonine phosphatase 2C: cDNA cloning and comparative analysis of amino acid sequences. *Biochim Biophys Acta* 1130: 100-4.

Maravei DV, Trbovich AM, Perez GI, Tilly KI, Banach D, Talanian RV, Wong WW, Tilly JL (1997): Cleavage of cytoskeletal proteins by caspases during ovarian cell death: evidence that cell-free systems do not always mimic apoptotic events in intact cells. *Cell Death Differ* 4: 707-12.

Marchenko ND, Zaika A, Moll UM (2000): Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J Biol Chem* 275: 16202-12.

Marley AE, Kline A, Crabtree G, Sullivan JE, Beri RK (1998): The cloning expression and tissue distribution of human PP2Cbeta. *FEBS Lett* 431: 121-4.

Marszalek JR, Lodish HF (2005): Docosahexaenoic acid, fatty acid-interacting proteins, and neuronal function: breastmilk and fish are good for you. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21: 633-57.

Massieu L, Moran J, Christen Y (2004): Effect of Ginkgo biloba (EGb 761) on staurosporine-induced neuronal death and caspase activity in cortical cultured neurons. *Brain Res* 1002: 76-85.

Masters SC, Yang H, Datta SR, Greenberg ME, Fu H (2001): 14-3-3 inhibits Bad-induced cell death through interaction with serine-136. *Mol Pharmacol* 60: 1325-31.

Mattacks CA, Sadler D, Pond CM (2002): The effects of dietary lipids on adrenergically-stimulated lipolysis in perinodal adipose tissue following prolonged activation of a single lymph node. *Brit J Nutr* 87: 375-82.

Mäurer A, Wieland T, Meissl F, Niroomand F, Mehringer R, Krieglstein J, Klumpp S (2005): The beta-subunit of G proteins is a substrate of protein histidine phosphatase. *Biochem Biophys Res Commun* 334: 1115-20.

McCaffrey AP, Meuse L, Pham TT, Conklin DS, Hannon GJ, Kay MA (2002): RNA interference in adult mice. *Nature* 418: 38-9.

Mead JR, Irvine SA, Ramji DP (2002): Lipoprotein lipase: structure, function, regulation, and role in disease. *J Mol Med* 80: 753-69.

Mead JR, Ramji DP (2002): The pivotal role of lipoprotein lipase in atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 55: 261-9.

Medh JD, Fry GL, Bowen SL, Ruben S, Wong H, Chappell DA (2000): Lipoprotein lipase- and hepatic triglyceride lipase- promoted very low density lipoprotein degradation proceeds via an apolipoprotein E-dependent mechanism. *J Lipid Res* 41: 1858-71.

Meng XW, Lee SH, Kaufmann SH (2006): Apoptosis in the treatment of cancer: a promise kept? *Curr Opin Cell Biol* 18: 668-76.

Merkel M, Velez-Carrasco W, Hudgins LC, Breslow JL (2001): Compared with saturated fatty acids, dietary monounsaturated fatty acids and carbohydrates increase atherosclerosis and VLDL cholesterol levels in LDL receptor-deficient, but not apolipoprotein E-deficient, mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 13294-9.

Michaud SE, Renier G (2001): Direct regulatory effect of fatty acids on macrophage lipoprotein lipase: potential role of PPARs. *Diabetes* 50: 660-6.

Miller DK (1997): The role of the Caspase family of cysteine proteases in apoptosis. *Semin Immunol* 9: 35-49.

Montgomery MK, Xu S, Fire A (1998): RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in Caenorhabditis elegans. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 15502-7.

Mook S, Halkes Cj C, Bilecen S, Cabezas MC (2004): In vivo regulation of plasma free fatty acids in insulin resistance. *Metabolism* 53: 1197-201.

Moore F, Weekes J, Hardie DG (1991): Evidence that AMP triggers phosphorylation as well as direct allosteric activation of rat liver AMP-activated protein kinase. A sensitive mechanism to protect the cell against ATP depletion. *Eur J Biochem* 199: 691-7.

Moretti A, Weig HJ, Ott T, Seyfarth M, Holthoff HP, Grewe D, Gillitzer A, Bott-Flugel L, Schomig A, Ungerer M, Laugwitz KL (2002): Essential myosin light chain as a target for caspase-3 in failing myocardium. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 11860-5.

Mori N, Gotoda T, Ishibashi S, Shimano H, Harada K, Inaba T, Takaku F, Yazaki Y, Yamada N (1991): Effects of human recombinant macrophage colony-stimulating factor on the secretion of lipoprotein lipase from macrophages. *Arterioscler Thromb* 11: 1315-21.

Morrisett JD, Jackson RL, Gotto AM, Jr. (1977): Lipid-protein interactions in the plasma lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 472: 93-133.

Murthy V, Julien P, Gagne C (1996): Molecular pathobiology of the human lipoprotein lipase gene. *Pharmacol Ther* 70: 101-35.

Nagata S (2000): Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res* 256: 12-8.

Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R (1990): Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* 2: 279-289.

Negoro N, Kanayama Y, Haraguchi M, Umetani N, Nishimura M, Konishi Y, Iwai J, Okamura M, Inoue T, Takeda T (1995): Blood pressure regulates platelet-derived growth factor A-chain gene expression in vascular smooth muscle cells in vivo. An autocrine mechanism promoting hypertensive vascular hypertrophy. *J Clin Invest* 95: 1140-50.

Neubeck W, Wieland H, Habenicht A, Muller P, Baggio G, Seidel D (1977): Improved assessment of plasma lipoprotein patterns. III. Direct measurement of lipoproteins after gel-electrophoresis. *Clin Chem* 23: 1296-300.

Newby AC, Zaltsman AB (1999): Fibrous cap formation or destruction--the critical importance of vascular smooth muscle cell proliferation, migration and matrix formation. *Cardiovasc Res* 41: 345-60.

Newby DE, Wright RA, Labinjoh C, Ludlam CA, Fox KA, Boon NA, Webb DJ (1999): Endothelial dysfunction, impaired endogenous fibrinolysis, and cigarette smoking: a mechanism for arterial thrombosis and myocardial infarction. *Circulation* 99: 1411-5.

Nicotera P, Melino G (2004): Regulation of the apoptosis-necrosis switch. *Oncogene* 23: 2757-65.

Niemeier A, Gafvels M, Heeren J, Meyer N, Angelin B, Beisiegel U (1996): VLDL receptor mediates the uptake of human chylomicron remnants in vitro. *J Lipid Res* 37: 1733-42.

Nigg EA, Blangy A, Lane HA (1996): Dynamic changes in nuclear architecture during mitosis: on the role of protein phosphorylation in spindle assembly and chromosome segregation. *Exp Cell Res* 229: 174-80.

Nofer JR, Levkau B, Wolinska I, Junker R, Fobker M, von Eckardstein A, Seedorf U, Assmann G (2001): Suppression of endothelial cell apoptosis by high density

lipoproteins (HDL) and HDL-associated lysosphingolipids. *J Biol Chem* 276: 34480-5.

Nunez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N (1998): Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* 17: 3237-45.

O'Brien KD, Gordon D, Deeb S, Ferguson M, Chait A (1992): Lipoprotein lipase is synthesized by macrophage-derived foam cells in human coronary atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 89: 1544-50.

Obunike JC, Lutz EP, Li Z, Paka L, Katopodis T, Strickland DK, Kozarsky KF, Pillarisetti S, Goldberg IJ (2001): Transcytosis of lipoprotein lipase across cultured endothelial cells requires both heparan sulfate proteoglycans and the very low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem* 276: 8934-41.

Obunike JC, Paka S, Pillarisetti S, Goldberg IJ (1997): Lipoprotein lipase can function as a monocyte adhesion protein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 1414-20.

Obunike JC, Sivaram P, Paka L, Low MG, Goldberg IJ (1996): Lipoprotein lipase degradation by adipocytes: receptor-associated protein (RAP)-sensitive and proteoglycan-mediated pathways. *J Lipid Res* 37: 2439-49.

Ofek P, Ben-Meir D, Kariv-Inbal Z, Oren M, Lavi S (2003): Cell cycle regulation and p53 activation by protein phosphatase 2C alpha. *J Biol Chem* 278: 14299-305.

Oliveira HC, Nilausen K, Meinertz H, Quintao EC (1993): Cholesteryl esters in lymph chylomicrons: contribution from high density lipoprotein transferred from plasma into intestinal lymph. *J Lipid Res* 34: 1729-36.

Olsson H, Belfrage P (1987): The regulatory and basal phosphorylation sites of hormone-sensitive lipase are dephosphorylated by protein phosphatase-1, 2A and 2C but not by protein phosphatase-2B. *Eur J Biochem* 168: 399-405.

Omura S, Sasaki Y, Iwai Y, Takeshima H (1995): Staurosporine, a potentially important gift from a microorganism. *J Antibiot (Tokyo)* 48: 535-48.

Ong JM, Kern PA (1989): Effect of feeding and obesity on lipoprotein lipase activity, immunoreactive protein, and messenger RNA levels in human adipose tissue. *J Clin Invest* 84: 305-11.

Osborne JC, Jr., Bengtsson-Olivecrona G, Lee NS, Olivecrona T (1985): Studies on inactivation of lipoprotein lipase: role of the dimer to monomer dissociation. *Biochemistry* 24: 5606-11.

Ostle AG, Holt JG (1982): Nile blue A as a fluorescent stain for poly-beta-hydroxybutyrate. *Appl Environ Microbiol* 44: 238-41.

Ouyang YB, Giffard RG (2004): Cellular neuroprotective mechanisms in cerebral ischemia: Bcl-2 family proteins and protection of mitochondrial function. *Cell Calcium* 36: 303-11.

Papahadjopoulos D, Cowden M, Kimelberg H (1973): Role of cholesterol in membranes. Effects on phospholipid-protein interactions, membrane permeability and enzymatic activity. *Biochim Biophys Acta* 330: 8-26.

Pato MD, Kerc E (1991): Regulation of smooth muscle phosphatase-II by divalent cations. *Mol Cell Biochem* 101: 31-41.

Payne AH, Hales DB (2004): Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr Rev* 25: 947-70.

Persson B, Bengtsson-Olivecrona G, Enerback S, Olivecrona T, Jornvall H (1989): Structural features of lipoprotein lipase. Lipase family relationships, binding interactions, non-equivalence of lipase cofactors, vitellogenin similarities and functional subdivision of lipoprotein lipase. *Eur J Biochem* 179: 39-45.

Pham CT, Ley TJ (1997): The role of granzyme B cluster proteases in cell-mediated cytotoxicity. *Semin Immunol* 9: 127-33.

Phenix BN, Cooper C, Owen C, Badley AD (2002): Modulation of apoptosis by HIV protease inhibitors. *Apoptosis* 7: 295-312.

Phillips C, Owens D, Collins P, Tomkin GH (2005): Low density lipoprotein non-esterified fatty acids and lipoprotein lipase in diabetes. *Atherosclerosis* 181: 109-14.

Pinton P, Rizzuto R (2006): Bcl-2 and Ca^{2+} homeostasis in the endoplasmic reticulum. *Cell Death Differ* 13: 1409-18.

Podrez EA, Febbraio M, Sheibani N, Schmitt D, Silverstein RL, Hajjar DP, Cohen PA, Frazier WA, Hoff HF, Hazen SL (2000): Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified by monocyte-generated reactive nitrogen species. *J Clin Invest* 105: 1095-108.

Pop C, Timmer J, Sperandio S, Salvesen GS (2006): The apoptosome activates caspase-9 by dimerization. *Mol Cell* 22: 269-75.

Prajapati S, Verma U, Yamamoto Y, Kwak YT, Gaynor RB (2004): Protein phosphatase 2Cbeta association with the IkappaB kinase complex is involved in regulating NF-kappaB activity. *J Biol Chem* 279: 1739-46.

Prentice AM, Jebb SA (2003): Fast foods, energy density and obesity: a possible mechanistic link. *Obes Rev* 4: 187-94.

Proia DA, Nannenga BW, Donehower LA, Weigel NL (2006): Dual roles for the phosphatase PPM1D in regulating progesterone receptor function. *J Biol Chem* 281: 7089-101.

Pulinilkunnil T, Rodrigues B (2006): Cardiac lipoprotein lipase: metabolic basis for diabetic heart disease. *Cardiovasc Res* 69: 329-40.

Quaschning T, Ruschitzka FT, Maier W, Luscher TF (2000): Role of endothelium in the etiology and therapy of atherosclerosis. *Internist (Berl)* 41: 355-62.

Raisonnier A, Etienne J, Arnault F, Brault D, Noe L, Chuat JC, Galibert F (1995): Comparison of the cDNA and amino acid sequences of lipoprotein lipase in eight species. *Comp Biochem Physiol B* 111: 385-98.

Rath M, Pauling L (1990): Immunological evidence for the accumulation of lipoprotein(a) in the atherosclerotic lesion of the hypoascorbemic guinea pig. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 9388-90.

Reed JC (2000): Mechanisms of apoptosis. *Am J Pathol* 157: 1415-30.

Reed JC, Cuddy M, Slabiak T, Croce CM, Nowell PC (1988): Oncogenic potential of bcl-2 demonstrated by gene transfer. *Nature* 336: 259-61.

Reeve JL, Duffy AM, O'Brien T, Samali A (2005): Don't lose heart--therapeutic value of apoptosis prevention in the treatment of cardiovascular disease. *J Cell Mol Med* 9: 609-22.

Renier G, Desfaits AC, Lambert A, Mikhail R (1996): Role of oxidant injury on macrophage lipoprotein lipase (LPL) production and sensitivity to LPL. *J Lipid Res* 37: 799-809.

Restrepo C, Tracy RE (1975): Variations in human aortic fatty streaks among geographic locations. *Atherosclerosis* 21: 179-93.

Rhodes N, Hicks R, Kasenally AB, Innes CL, Paules RS, Propst F (1994): v-mos-transformed cells fail to enter quiescence but growth arrest in G1 following serum withdrawal. *Exp Cell Res* 213: 210-7.

Robinson DS, Harris PM (1959): The production of lipolytic activity in the circulation of the hind limb in response to heparin. *J Exp Physiol Cogn Med Sci* 44: 80-90.

Robinson DS, Jennings MA (1965): Release of Clearing Factor Lipase by the Perfused Rat Heart. *J Lipid Res* 6: 222-7.

Rosenquist M (2003): 14-3-3 proteins in apoptosis. *Braz J Med Biol Res* 36: 403-8.

Ross R (1993): The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362: 801-9.

Rossig L, Dimmeler S, Zeiher AM (2001): Apoptosis in the vascular wall and atherosclerosis. *Basic Res Cardiol* 96: 11-22.

Rubanyi GM, Vanhoutte PM (1986): Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor. *Am J Physiol* 250: H822-7.

Rubinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, Sievers C, Yang L, Kopinja J, Rooney DL, Ihrig MM, McManus MT, Gertler FB, Scott ML, Van Parijs L (2003): A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet* 33: 401-6.

Rudin CM, Thompson CB (1997): Apoptosis and disease: regulation and clinical relevance of programmed cell death. *Annu Rev Med* 48: 267-81.

Ruvolo PP, Deng X, May WS (2001): Phosphorylation of Bcl2 and regulation of apoptosis. *Leukemia* 15: 515-22.

Ruxton CH, Reed SC, Simpson MJ, Millington KJ (2004): The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. *J Hum Nutr Diet* 17: 449-59.

Samejima K, Svingen PA, Basi GS, Kottke T, Mesner PW, Jr., Stewart L, Durrieu F, Poirier GG, Alnemri ES, Champoux JJ, Kaufmann SH, Earnshaw WC (1999): Caspase-mediated cleavage of DNA topoisomerase I at unconventional sites during apoptosis. *J Biol Chem* 274: 4335-40.

SanGiovanni JP, Chew EY (2005): The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina. *Prog Retin Eye Res* 24: 87-138.

Sartippour MR, Lambert A, Laframboise M, St-Jacques P, Renier G (1998): Stimulatory effect of glucose on macrophage lipoprotein lipase expression and production. *Diabetes* 47: 431-8.

Sartippour MR, Renier G (2000): Upregulation of macrophage lipoprotein lipase in patients with type 2 diabetes: role of peripheral factors. *Diabetes* 49: 597-602.

Sartorius U, Schmitz I, Krammer PH (2001): Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis. *Chembiochem* 2: 20-9.

Sauberlich HE (1994): Pharmacology of vitamin C. *Annu Rev Nutr* 14: 371-91.

Savill J, Fadok V (2000): Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* 407: 784-8.

Saxena U, Klein MG, Goldberg IJ (1990): Metabolism of endothelial cell-bound lipoprotein lipase. Evidence for heparan sulfate proteoglycan-mediated internalization and recycling. *J Biol Chem* 265: 12880-6.

Saxena U, Klein MG, Goldberg IJ (1991): Transport of lipoprotein lipase across endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 2254-8.

Schäfer JR, Klumpp S, Maisch B, Krieglstein J (2005): Why does atherosclerosis occur where it occurs? *Atherosclerosis* 180: 417-8.

Schrecker O, Greten H (1979): Activation and inhibition of lipoprotein lipase. Studies with artificial lipoproteins. *Biochim Biophys Acta* 572: 244-56.

Schubert S, Grunweller A, Erdmann VA, Kurreck J (2005): Local RNA target structure influences siRNA efficacy: systematic analysis of intentionally designed binding regions. *J Mol Biol* 348: 883-93.

Schwandt P. RW, Parhofer K.G. (2001): Handbuch der Fettstoffwechselstörungen. *Schattauer*, 3. Auflage.

Schwartz RS, Brunzell JD (1978): Increased adipose-tissue lipoprotein-lipase activity in moderately obese men after weight reduction. *Lancet* 1: 1230-1.

Schwarz S (2004): Die Rolle der von p53 und der Proteinphosphatase 2C in der neuronalen Apoptose. Dissertation , Universität Marburg.

Schwarz S, Hufnagel B, Dworak M, Klumpp S, Krieglstein J (2006): Protein phosphatase type 2Calpha and 2Cbeta are involved in fatty acid-induced apoptosis of neuronal and endothelial cells. *Apoptosis* 11: 1111-9.

Scow RO, Olivecrona T (1977): Effect of albumin on products formed from chylomicron triacylclycerol by lipoprotein lipase in vitro. *Biochim Biophys Acta* 487: 472-86.

Semenkovich CF, Coleman T, Daugherty A (1998): Effects of heterozygous lipoprotein lipase deficiency on diet-induced atherosclerosis in mice. *J Lipid Res* 39: 1141-51.

Semenkovich CF, Luo CC, Nakanishi MK, Chen SH, Smith LC, Chan L (1990): In vitro expression and site-specific mutagenesis of the cloned human lipoprotein lipase gene. Potential N-linked glycosylation site asparagine 43 is important for both enzyme activity and secretion. *J Biol Chem* 265: 5429-33.

Seroussi E, Shani N, Ben-Meir D, Chajut A, Divinski I, Faier S, Gery S, Karby S, Kariv-Inbal Z, Sella O, Smorodinsky NI, Lavi S (2001): Uniquely conserved non-translated regions are involved in generation of the two major transcripts of protein phosphatase 2Cbeta. *J Mol Biol* 312: 439-51.

Shah PK (2003): Mechanisms of plaque vulnerability and rupture. *J Am Coll Cardiol* 41: 15-22.

Sheikh MS, Fornace AJ, Jr. (2000): Role of p53 family members in apoptosis. *J Cell Physiol* 182: 171-81.

Shi Y (2006): Mechanical aspects of apoptosome assembly. *Curr Opin Cell Biol* 18: 677-84.

Shi YF, Szalay MG, Paskar L, Sahai BM, Boyer M, Singh B, Green DR (1990): Activation-induced cell death in T cell hybridomas is due to apoptosis. Morphologic aspects and DNA fragmentation. *J Immunol* 144: 3326-33.

Shimada M, Ishibashi S, Inaba T, Yagyu H, Harada K, Osuga JI, Ohashi K, Yazaki Y, Yamada N (1996): Suppression of diet-induced atherosclerosis in low density lipoprotein receptor knockout mice overexpressing lipoprotein lipase. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 7242-6.

Shimada M, Shimano H, Gotoda T, Yamamoto K, Kawamura M, Inaba T, Yazaki Y, Yamada N (1993): Overexpression of human lipoprotein lipase in transgenic mice. Resistance to diet-induced hypertriglyceridemia and hypercholesterolemia. *J Biol Chem* 268: 17924-9.

Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y (1999): Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 399: 483-7.

Shimokawa H, Aarhus LL, Vanhoutte PM (1987): Porcine coronary arteries with regenerated endothelium have a reduced endothelium-dependent responsiveness to aggregating platelets and serotonin. *Circ Res* 61: 256-70.

Simbulan-Rosenthal CM, Rosenthal DS, Iyer S, Boulares H, Smulson ME (1999): Involvement of PARP and poly(ADP-ribosyl)ation in the early stages of apoptosis and DNA replication. *Mol Cell Biochem* 193: 137-48.

Simopoulos AP (2002): The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother* 56: 365-79.

Simsolo RB, Ong JM, Kern PA (1993): The regulation of adipose tissue and muscle lipoprotein lipase in runners by detraining. *J Clin Invest* 92: 2124-30.

Skulachev VP (2006): Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis. *Apoptosis* 11: 473-85.

Slee EA, Adrain C, Martin SJ (2001): Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem* 276: 7320-6.

Smith JD, Trogan E, Ginsberg M, Grigaux C, Tian J, Miyata M (1995): Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 8264-8.

Smith LC, Pownall HJ, Gotto AM, Jr. (1978): The plasma lipoproteins: structure and metabolism. *Annu Rev Biochem* 47: 751-7.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150: 76-85.

Smyth MJ, O'Connor MD, Trapani JA (1996): Granzymes: a variety of serine protease specificities encoded by genetically distinct subfamilies. *J Leukoc Biol* 60: 555-62.

Staels B, Auwerx J (1992): Perturbation of developmental gene expression in rat liver by fibric acid derivatives: lipoprotein lipase and alpha-fetoprotein as models. *Development* 115: 1035-43.

Staprans I, Pan XM, Rapp JH, Feingold KR (2005): The role of dietary oxidized cholesterol and oxidized fatty acids in the development of atherosclerosis. *Mol Nutr Food Res* 49: 1075-82.

Steinberg D (2005): Thematic review series: the pathogenesis of atherosclerosis. An interpretive history of the cholesterol controversy: part II: the early evidence linking hypercholesterolemia to coronary disease in humans. *J Lipid Res* 46: 179-90.

Sternby B, Hartmann D, Borgstrom B, Nilsson A (2002): Degree of in vivo inhibition of human gastric and pancreatic lipases by Orlistat (Tetrahydrolipstatin, THL) in the stomach and small intestine. *Clin Nutr* 21: 395-402.

Stromgaard K, Nakanishi K (2004): Chemistry and biology of terpene trilactones from Ginkgo biloba. *Angew Chem Int* 43: 1640-58.

Subah Packer C (2007): Estrogen protection, oxidized LDL, endothelial dysfunction and vasorelaxation in cardiovascular disease: New insights into a complex issue. *Cardiovasc Res* 73: 6-7.

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G (1999): Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397: 441-6.

Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, Kamada N, Kataoka M, Jishage K, Ueda O, Sakaguchi H, Higashi T, Suzuki T, Takashima Y, Kawabe Y, Cynshi O, Wada Y, Honda M, Kurihara H, Aburatani H, Doi T, Matsumoto A, Azuma S, Noda T, Toyoda Y, Itakura H, Yazaki Y, Kodama T, et al. (1997): A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection. *Nature* 386: 292-6.

Tabara H, Sarkissian M, Kelly WG, Fleenor J, Grishok A, Timmons L, Fire A, Mello CC (1999): The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in C. elegans. *Cell* 99: 123-32.

Takahashi S, Sakai J, Fujino T, Miyamori I, Yamamoto TT (2003): The very low density lipoprotein (VLDL) receptor--a peripheral lipoprotein receptor for remnant lipoproteins into fatty acid active tissues. *Mol Cell Biochem* 248: 121-7.

Takekawa M, Maeda T, Saito H (1998): Protein phosphatase 2Calpha inhibits the human stress-responsive p38 and JNK MAPK pathways. *EMBO J* 17: 4744-52.

Tamura S, Toriumi S, Saito J, Awano K, Kudo TA, Kobayashi T (2006): PP2C family members play key roles in regulation of cell survival and apoptosis. *Cancer Sci* 97: 563-7.

Tan Y, Demeter MR, Ruan H, Comb MJ (2000): BAD Ser-155 phosphorylation regulates BAD/Bcl-XL interaction and cell survival. *J Biol Chem* 275: 25865-9.

Tanaka S, Tanabe Y, Tamura H, Ishii S, Shuto Y, Kamegai J, Sugihara H, Kobayashi M, Wakabayashi I, Murano T, Shirai K, Oikawa S (2002): Chylomicronemia caused by lipoprotein lipase gene mutation related to a hyper-response of insulin secretion to glucose. *Intern Med* 41: 300-3.

Tatton WG, Chalmers-Redman R, Brown D, Tatton N (2003): Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degradation. *Ann Neurol* 53 Suppl 3: S61-70; discussion S70-2.

Terasawa T, Kobayashi T, Murakami T, Ohnishi M, Kato S, Tanaka O, Kondo H, Yamamoto H, Takeuchi T, Tamura S (1993): Molecular cloning of a novel isotype of Mg^{2+}-dependent protein phosphatase beta (type 2C beta) enriched in brain and heart. *Arch Biochem Biophys* 307: 342-9.

Thornberry NA, Lazebnik Y (1998): Caspases: enemies within. *Science* 281: 1312-6.

Toborek M, Kaiser S (1999): Endothelial cell functions. Relationship to atherogenesis. *Basic Res Cardiol* 94: 295-314.

Trapani JA, Sutton VR (2003): Granzyme B: pro-apoptotic, antiviral and antitumor functions. *Curr Opin Immunol* 15: 533-43.

Travis SM, Berger HA, Welsh MJ (1997): Protein phosphatase 2C dephosphorylates and inactivates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 11055-60.

Tsimikas S, Reaven PD (1998): The role of dietary fatty acids in lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 9: 301-7.

Tsuchiya S, Kobayashi Y, Goto Y, Okumura H, Nakae S, Konno T, Tada K (1982): Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Res* 42: 1530-6.

van Berkel TJ, Fluiter K, van Velzen AG, Vogelezang CJ, Ziere GJ (1995): LDL receptor-independent and -dependent uptake of lipoproteins. *Atherosclerosis* 118 Suppl: S43-50.

van Tol A (2002): Phospholipid transfer protein. *Curr Opin Lipidol* 13: 135-9.

Vannier C, Ailhaud G (1989): Biosynthesis of lipoprotein lipase in cultured mouse adipocytes. II. Processing, subunit assembly, and intracellular transport. *J Biol Chem* 264: 13206-16.

Vannier C, Deslex S, Pradines-Figueres A, Ailhaud G (1989): Biosynthesis of lipoprotein lipase in cultured mouse adipocytes. I. Characterization of a specific antibody and relationships between the intracellular and secreted pools of the enzyme. *J Biol Chem* 264: 13199-205.

Vickers TA, Koo S, Bennett CF, Crooke ST, Dean NM, Baker BF (2003): Efficient reduction of target RNAs by small interfering RNA and RNase H-dependent antisense agents. A comparative analysis. *J Biol Chem* 278: 7108-18.

Virmani R, Burke AP, Farb A (2001): Sudden cardiac death. *Cardiovasc Pathol* 10: 211-8.

Virmani R, Farb A, Burke AP (1994): Coronary angioplasty from the perspective of atherosclerotic plaque: morphologic predictors of immediate success and restenosis. *Am Heart J* 127: 163-79.

von Eckardstein A, Nofer JR, Assmann G (2001): High density lipoproteins and arteriosclerosis. Role of cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21: 13-27.

Wada T, Penninger JM (2004): Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene* 23: 2838-49.

Wang CS, Hartsuck J, McConathy WJ (1992): Structure and functional properties of lipoprotein lipase. *Biochim Biophys Acta* 1123: 1-17.

Wang HG, Pathan N, Ethell IM, Krajewski S, Yamaguchi Y, Shibasaki F, McKeon F, Bobo T, Franke TF, Reed JC (1999): Ca^{2+}-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* 284: 339-43.

Wang MY, Unger RH (2005): Role of PP2C in cardiac lipid accumulation in obese rodents and its prevention by troglitazone. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: 216-21.

Wang Y, Santini F, Qin K, Huang CY (1995): A Mg^{2+}-dependent, Ca^{2+}-inhibitable serine/threonine protein phosphatase from bovine brain. *J Biol Chem* 270: 25607-12.

Waterhouse PM, Wang MB, Lough T (2001): Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* 411: 834-42.

Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ (2001): Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 292: 727-30.

Weigel NL (1996): Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. *Biochem J* 319: 657-67.

Wenk J, Trompeter HI, Pettrich KG, Cohen PT, Campbell DG, Mieskes G (1992): Molecular cloning and primary structure of a protein phosphatase 2C isoform. *FEBS Lett* 297: 135-8.

West KL, Zern TL, Butteiger DN, Keller BT, Fernandez ML (2003): SC-435, an ileal apical sodium co-dependent bile acid transporter (ASBT) inhibitor lowers plasma cholesterol and reduces atherosclerosis in guinea pigs. *Atherosclerosis* 171: 201-10.

Widmann C, Gibson S, Johnson GL (1998): Caspase-dependent cleavage of signaling proteins during apoptosis. A turn-off mechanism for anti-apoptotic signals. *J Biol Chem* 273: 7141-7.

Wolever TM, Mehling C (2003): Long-term effect of varying the source or amount of dietary carbohydrate on postprandial plasma glucose, insulin, triacylglycerol, and free fatty acid concentrations in subjects with impaired glucose tolerance. *Am J Clin Nutr* 77: 612-21.

Wong H, Schotz MC (2002): The lipase gene family. *J Lipid Res* 43: 993-9.

Wood DE, Newcomb EW (1999): Caspase-dependent activation of calpain during drug-induced apoptosis. *J Biol Chem* 274: 8309-15.

Yang E, Korsmeyer SJ (1996): Molecular thanatopsis: a discourse on the Bcl-2 family and cell death. *Blood* 88: 386-401.

Yang E, Zha J, Jockel J, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ (1995): Bad, a heterodimeric partner for Bcl-XL and Bcl-2, displaces Bax and promotes cell death. *Cell* 80: 285-91.

Yin XM, Oltvai ZN, Korsmeyer SJ (1994): BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* 369: 321-3.

Yla-Herttuala S, Lipton BA, Rosenfeld ME, Goldberg IJ, Steinberg D, Witztum JL (1991): Macrophages and smooth muscle cells express lipoprotein lipase in human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 10143-7.

Zern TL, West KL, Fernandez ML (2003): Grape polyphenols decrease plasma triglycerides and cholesterol accumulation in the aorta of ovariectomized guinea pigs. *J Nutr* 133: 2268-72.

Zha J, Harada H, Osipov K, Jockel J, Waksman G, Korsmeyer SJ (1997): BH3 domain of BAD is required for heterodimerization with BCL-XL and pro-apoptotic activity. *J Biol Chem* 272: 24101-4.

Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ (1996): Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell* 87: 619-28.

Zhang YQ, Herman B (2006): ARC protects rat cardiomyocytes against oxidative stress through inhibition of caspase-2 mediated mitochondrial pathway. *J Cell Biochem* 99: 575-88.

Zhu Y, Schwarz S, Ahlemeyer B, Grzeschik S, Klumpp S, Krieglstein J (2005): Oleic acid causes apoptosis and dephosphorylates Bad. *Neurochem Int* 46: 127-35.

Zilversmit DB (1979): Atherogenesis: a postprandial phenomenon. *Circulation* 60: 473-85.

Zilversmit DB (1995): Atherogenic nature of triglycerides, postprandial lipidemia, and triglyceride-rich remnant lipoproteins. *Clin Chem* 41: 153-8.

Zimmermann R, Panzenbock U, Wintersperger A, Levak-Frank S, Graier W, Glatter O, Fritz G, Kostner GM, Zechner R (2001): Lipoprotein lipase mediates the uptake of glycated LDL in fibroblasts, endothelial cells, and macrophages. *Diabetes* 50: 1643-53.

Lebenslauf

Name	Michael Reinbold
Geburtsdatum	25. Juli 1977
Geburtsort	Kischinew, Moldavien
Staatsangehörigkeit	deutsch
Eltern	Dr. Anton Reinbold Alla Reinbold, geb. Ostaschko
Schule	
1984 - 1989	Allgemeine, russische Schule in Kischinew, Moldavien
1989 - 1994	Solgrabenschule in Bad Nauheim
1994 - 1998	Burggymnasium in Friedberg 06/1998 Abitur
Grundwehrdienst	
1998 - 1999	Transportbataillon in Limburg/Diez
Studium	
10/1999	Immatrikulation im Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg
09/2001	Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung, Marburg
10/2003	Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung, Marburg
Praktikum	
11/2003- 04/2004	Taunusapotheke Bad Nauheim (1. Halbjahr)
05/ 2004-10/2004	Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. Krieglstein (2. Halbjahr)
Approbation	
01/2005	Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung, Marburg
01/2007	Approbation als Apotheker

Berufliche Tätigkeit

05/2004 – 10/2006	wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Philipps-Universität Marburg. Anfertigung einer Promotionsarbeit unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. J. Krieglstein
ab 11/2006	wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für pharmazeutische und medizinische Chemie an der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster. Fortsetzung der Promotionsarbeit unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. J. Krieglstein