

Aus dem Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof.Dr.med. Peter C. Weber

**Einfluss verschiedener ungesättigter Fettsäuren und
oxidierter Metabolite auf die Regulation der Apoptose in
primären humanen Endothelzellen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Claudia Alexandra Vosseler
aus Stuttgart
2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof.Dr.med. P.C. Weber

Mitberichterstatter: Prof.Dr.med. C. Keller
Prof.Dr.med. S. Endres

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr.rer.hum.biol. W. Erl

Dekan: Prof.Dr.med.Dr.h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 11.11.2004

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Stand der Forschung	3
2.1	Die Rolle des Endothels bei der Arteriosklerose	3
2.2	Apoptose	5
2.2.1	Apoptose - der physiologische Zelltod	5
2.2.2	Endothelzellapoptose	8
2.3	Mehrfach ungesättigte Fettsäuren	10
2.3.1	n-6 Fettsäuren und Metabolite der Oxidation - Effekte auf das Endothel	11
2.3.2	n-3 Fettsäuren und ihre protektive Wirkung auf das Endothel	14
3	Fragestellung	16
4	Material und Methoden	18
4.1	Material	18
4.1.1	Geräte, Arbeitsmittel und Kits	18
4.1.2	Chemikalien und Reagenzien, Antikörper	19
4.2	Medien und Lösungen	21
4.3	Kultur primärer Endothelzellen aus Nabelschnurvenen	24
4.4	Bestimmung von Zellzahl und -vitalität	24
4.4.1	Trypanblau-Ausschlußtest	24
4.4.2	MTT-Test	24
4.5	Durchflusszytometrie	25
4.5.1	Prinzip	25
4.5.2	Bestimmung der Apoptose	25
4.5.2.1	Annexin V-Färbung	25
4.5.2.2	Bestimmung der DNA-Fragmentierung	26
4.5.2.3	Messung der Caspase-3-Aktivierung	26
4.5.3	Detektion reaktiver Sauerstoffspezies	27
4.6	Molekularbiologische Methoden	27
4.6.1	Real-time RT-PCR	27
4.6.1.1	Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion und der Reversen Transkriptase	27
4.6.1.2	RNA-Isolierung und DNase	28
4.6.1.3	Spezifische Oligonucleotide, Parameter für die RT-PCR und Auswertung	28

4.6.2	<i>TransAMTM Transcription Factor Assay Kits</i>	29
4.7	Proteinbiochemische Methoden	29
4.7.1	Extraktion von Gesamtprotein	29
4.7.2	Extraktion von Protein aus Zytosol und Nukleus	30
4.7.3	Messung der Proteinkonzentration	30
4.7.4	Nachweis von Proteinen mittels SDS-PAGE und Western Blot	30
4.7.5	Messung des intrazellulären GSH-Gehalts	31
4.7.6	Statistische Auswertung	32
5	Ergebnisse	33
5.1	Effekte von Cyclopentenon-Prostaglandinen auf HUVECs	33
5.1.1	Einfluss der Cyclopentenon-Prostaglandine auf die Vitalität von Endothelzellen	33
5.1.2	Apoptoseinduktion durch verschiedene Cyclopentenon-Prostaglandine in HUVECs	34
5.1.3	Effekte von Cyclopentenon in HUVECs	34
5.2	Apoptoseinduktion durch das Lipidperoxidationsprodukt 4-Hydroxynonenal	37
5.2.1	Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von HNE in Endothelzellen	37
5.2.1.1	Einfluss auf Zellvitalität und Zellzahl	37
5.2.1.2	Apoptoseinduktion durch HNE	37
5.2.1.3	Aktivierung von Caspasen	39
5.2.2	Effekte von HNE auf die ROS-Produktion sowie den intrazellulären Glutathiongehalt	39
5.2.3	Effekte von HNE auf verschiedene Kinasen in HUVECs	40
5.3	Einfluss von n-6 und n-3 Fettsäuren auf die HNE-induzierte Apoptose	42
5.3.1	Effekte ungesättigter Fettsäuren auf die HNE-induzierte Apoptose humaner Endothelzellen	42
5.3.2	Effekte der n-6 Fettsäure AA und der n-3 Fettsäure DHA auf den intrazellulären GSH-Gehalt	45
5.3.3	Einfluss der Fettsäuren auf den Caspase-Inhibitor c-IAP-1 in HUVECs	47
5.3.4	Einfluss der Fettsäuren auf den Transkriptionsfaktor NF- κ B	48
5.3.5	Aktivierung der Proteinkinase Akt durch DHA	48
6	Diskussion	50
6.1	Vergleichende Untersuchung verschiedener Cyclopentenon-Prostaglandine	50
6.1.1	Einfluss der Cyclopentenon-Prostaglandine auf Zellvitalität und Apoptoseinduktion	51
6.1.2	Einfluss der Molekularstruktur von Cyclopentenon-Prostaglandinen auf die Fähigkeit Apoptose in HUVECs zu induzieren	51
6.2	Untersuchung der HNE-induzierten Effekte in humanen Endothelzellen	52
6.2.1	Konzentrations- und Zeitkinetik von HNE in konfluenten HUVECs	54
6.2.2	Induktion von oxidativem Stress durch HNE	55
6.2.3	Einfluss von HNE auf verschiedene Kinasen	56

6.3	Vergleichende Untersuchung der Arachidonsäure sowie Docosahexaensäure in HUVECs	58
6.3.1	Einfluss der Fettsäuren auf die HNE-induzierte Apoptose	58
6.3.2	Unterschiedlicher Einfluss beider Fettsäuren auf den HNE-induzierten oxidativen Stress	59
6.3.3	Expression des Caspase-Inhibitors c-IAP-1	59
7	Zusammenfassung	62
	Literaturverzeichnis	64
A	Eigene Publikationen	76
B	Danksagungen	78
C	Lebenslauf	79

Abbildungsverzeichnis

2.1	Schematische Darstellung der zur Apoptose führenden Signalwege	6
2.2	Endothelzellapoptose	9
2.3	n-6 und n-3 Fettsäuren. Schematischer Überblick	10
2.4	Bildung und Struktur der verwendeten PGs und CyPGs	12
2.5	Chemische Struktur des Lipidperoxidationsprodukts 4-Hydroxynonenal	13
4.1	Auswertung der FACS-Messungen - Beispiele	26
5.1	15d-PGJ ₂ reduziert die Zellvitalität humaner Endothelzellen	33
5.2	Effekte verschiedener Cyclopentenon-Prostaglandine auf die MTT-Aktivität in HUVECs	34
5.3	Einfluss verschiedener Cyclopentenon-Prostaglandine auf die Apoptoseinduktion in HUVECs	35
5.4	Vergleich der Wirkung von Cyclopentenon, 15d-PGJ ₂ sowie 9,10-J ₂ auf die mitochondriale Aktivität	36
5.5	Cyclopentenon induziert Apoptose in HUVECs	36
5.6	Zeit- und konzentrationsabhängige Wirkung von HNE auf HUVECs	38
5.7	Konzentrationsabhängige Apoptoseinduktion durch HNE	38
5.8	HNE aktiviert Caspase-3	39
5.9	Zeitabhängige Veränderung des intrazellulären Redoxgleichgewichts durch HNE	40
5.10	Einfluss von HNE auf Aktivierung und Inhibierung der MAP-Kinasen	41
5.11	HNE hemmt die Aktivierung von Akt	41
5.12	Einfluss ungesättigter Fettsäuren auf die Apoptoseinduktion durch HNE	42
5.13	DHA hemmt die Apoptoseinduktion durch HNE in HUVECs	43
5.14	DHA verringert den HNE-induzierten Anstieg der PI-positiven Zellen	44
5.15	Bestimmung der aktiven Caspase-3 nach HNE-Behandlung	45
5.16	DHA verhindert den HNE-induzierten Anstieg der Superoxidanionen	46
5.17	DHA erhöht den intrazellulären GSH-Gehalt	46
5.18	DHA erhöht sowohl die c-iap-1 mRNA als auch die c-IAP-1 Proteinexpression in humanen Endothelzellen	47
5.19	Einfluss der Fettsäuren auf das NF- κ B System	48
5.20	Effekt beider Fettsäuren auf die Proteinkinase Akt	49
6.1	Zusammenfassendes Schema der Ergebnisse der Cyclopentenon-Prostaglandine	53
6.2	Schematische Darstellung der untersuchten Effekte des Lipidperoxidationsprodukts HNE	57

6.3	Schema der protektiven Effekte der DHA gegenüber HNE-induzierter Endothelzellapoptose	61
-----	---	----

Tabellenverzeichnis

1.1	Risikofaktoren der Arterioskleroseentstehung	1
2.1	Mögliche Ursachen einer Endotheldysfunktion	4
2.2	Morphologische und biochemische Unterschiede zwischen Apoptose und Nekrose	5
2.3	Mögliche Mechanismen der protektiven Wirkung der n-3 Fettsäuren	15
4.5	Optimierte Zusammensetzung des Reaktionsansatzes	29
4.6	Protokoll der real-time RT-PCR	29
5.1	Einfluss der Vorbehandlung mit AA bzw. DHA auf die GSH-Reduktion durch HNE	46

Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
Apaf-1	<i>apoptotic protease-activating factor-1</i>
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CAD	<i>caspase-activated deoxyribonuclease</i>
cDNA	komplementäre DNA
COX	Cyclooxygenase
CyPGs	Cyclopentenon-Prostaglandine
DISC	<i>death inducing signaling complex</i>
DHA	Docosahexaensäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
dNTPs	Nucleosidtriphosphate
ECGM	Endothelzellmedium
EPA	Eicosapentaensäure
ERK	<i>extracellular signal-related kinase</i>
EtOH	Ethanol
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (<i>fluorescence-activated cell sorting</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FCS	Fötale Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
GSH	Glutathion
h	Stunde(n)
HNE	4-Hydroxynonenal
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horse radish peroxidase</i>)
HUVECs	<i>human umbilical vein endothelial cells</i> humane Endothelzellen aus Nabelschnurvenen
IAPs	<i>inhibitor of apoptosis proteins</i>
I κ B α	<i>inhibitorκBα</i>
JNK	<i>c-jun amino terminal kinase</i>
kDa	Kilodalton
LA	Linolsäure
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
MAPKs	<i>mitogen-activated protein kinases</i>
min	Minute(n)

Abkürzungsverzeichnis

mRNA	<i>messenger RNA</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NF- κ B	<i>nuclear factor-κB</i>
O ₂ ⁻	Superoxidanionen
OA	Ölsäure
oxLDL	oxidierte LDL-Partikel
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PARP	Poly(ADP-Ribose)Polymerase
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBS -/-	PBS ohne Calcium und Magnesium
PBS +/-	PBS mit Calcium und Magnesium
PCR	Polymerasekettenreaktion
pd(N) ₆	Hexamere
PI3K	Phosphatidylinositol 3-OH-Kinase
PGs	Prostaglandine
15d-PGA ₁	15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin A ₁
15d-PGA ₂	15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin A ₂
PGD ₂	Prostaglandin D ₂
15d-PGD ₂	15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin D ₂
15d-PGJ ₂	15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J ₂
9,10-J ₂	9,10-dehydro-15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J ₂
PNPP	4-Nitrophenylphosphat
PS	Phosphatidylserin
PUFA	mehrfach ungesättigte Fettsäuren
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription mit anschliessender PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
SMCs	Glatte Gefäßmuskelzellen
TBS/T	Tris-gepufferte Salzlösung mit 0,1% Tween 20
TNF α	<i>Tumor necrosis factor-α</i>
U/min	Umdrehungen pro Minute
XIAP	<i>X-linked IAP</i>

1 Einleitung

Dank des medizinischen Fortschritts in den letzten 100 Jahren spielen Infektionserkrankungen als Todesursache in den westlichen Industrienationen nur noch eine untergeordnete Rolle. Stattdessen stehen Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems an erster Stelle der Todesursachen in Deutschland¹ sowie anderer westlicher Nationen (Lusis 2000). Die Arteriosklerose, eine krankhafte Veränderung der Arterienwände mit Lipideinlagerungen, stellt bei den meisten Herz-Kreislaferkrankungen die zugrundeliegende Erkrankung dar. Epidemiologische Studien konnten in den letzten Jahrzehnten eine Reihe von Risikofaktoren für die Arterioskleroseentstehung identifizieren (Lusis 2000). Neben unveränderlichen, genetischen Faktoren gehören durch den persönlichen Lebensstil geprägte Faktoren dazu, wie Bewegungsmangel und Übergewicht (Tab. 1.1).

RISIKOFAKTOREN	
unbeeinflussbare	beeinflussbare
Alter	Rauchen
männliches Geschlecht	Hypertonie
familiäre Prädisposition	Diabetes mellitus
	Hypercholesterinämie/ Hyperlipoproteinämie
	Übergewicht
	Bewegungsmangel

Tabelle 1.1: Risikofaktoren der Arterioskleroseentstehung

Die Ernährung ist ein zentraler Bestandteil des persönlichen Lebensstils und beeinflusst eine Reihe der aufgeführten Risikofaktoren. Eine hyperkalorische Ernährung begünstigt sowohl die Entstehung eines Übergewichts als auch die Entwicklung einer Hypercholesterinämie oder eines Diabetes mellitus. Umgekehrt kann eine ausgewogene Ernährung sowie eine Reduktion des Körpergewichts im Rahmen einer kalorienreduzierten Diät diese Risikofaktoren günstig beeinflussen.

Epidemiologische Studien in den 70-er und 80-er Jahren haben gezeigt, dass die verringerte Mortalität an Herz-Kreislaferkrankungen in Bevölkerungsgruppen wie den Inuit mit einer erhöhten Aufnahme an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, insbesondere n-3 Fettsäuren korreliert ist (Dyerberg et al. 1975). Zahlreiche Folgestudien konnten einen protektiven Effekt einer erhöhten n-3 Fettsäureaufnahme sowohl für die Primär- als auch die Sekundärprävention kardiovaskulärer Erkrankungen zeigen. Der genaue Mechanismus ist dabei noch weitgehend ungeklärt. Ein möglicher Wirkmechanismus wird in der verbesserten Endothelfunktion gesehen, die

¹<http://www.destatis.de>

1 Einleitung

in Studien mit einem erhöhten n-3 Fettsäure-Plasmaspiegel korreliert war (Leeson et al. 2002, Khan et al. 2003).

Die Bedeutung des Endothels für die Arterioskleroseentstehung ist mittlerweile unbestritten (Ross 1999). Das Endothel bildet die Grenze zwischen Blut und Gefäßwand und ist kontinuierlich potentiell schädlichen Substanzen ausgesetzt, die zu einer Verletzung bzw. Fehlfunktion führen können. Die Induktion von Apoptose stellt dabei eine mögliche Reaktion des Endothels dar (vgl. Kapitel 2.2). Die Messung der Endothelfunktion erlaubt eine Prognose über die Wahrscheinlichkeit eines späteren Auftretens etwa eines Myokardinfarkts oder eines Schlaganfalls (Widlansky et al. 2003). Interventionen, die zu einer Verbesserung der Endothelfunktion führen, können auch das Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse reduzieren.

Ein Schutz von Endothelzellen gegenüber Verletzung und Apoptose könnte daher zum Erhalt der Endothelfunktion und einer verringerten Mortalität an Herz-Kreislaufkrankungen beitragen. Ziel dieser Arbeit war daher zum einen die Untersuchung der Apoptoseinduktion in humanen Endothelzellen durch verschiedene Fettsäuremetabolite und zum anderen die mögliche Modulation einer derartigen Schädigung durch hochungesättigte Fettsäuren.

2 Stand der Forschung

2.1 Die Rolle des Endothels bei der Arteriosklerose

Arteriosklerose

Der Begriff Arteriosklerose bezeichnet eine Erkrankung der Intima arterieller Blutgefäße, die durch eine lokale Veränderung der Intima mit Lipid- und Bindegewebsansammlungen gekennzeichnet ist. Arteriosklerotische Veränderungen der Gefäßwand entstehen insbesondere in der Aorta, den Koronar- sowie Gehirnarterien (Ross 1999, Lusis 2000). Die typische Lokalisation arteriosklerotischer Läsionen ist vermutlich durch eine veränderte Hämodynamik bedingt. Eine unphysiologische Scherbelastung wie etwa durch turbulenten Fluss oder einen niedrigen ($< 4 \text{ Dynes/cm}^2$) bzw. hohen ($> 70 \text{ Dynes/cm}^2$) Scherdruck begünstigt die Entstehung einer Endotheldysfunktion, die als erster Schritt der Arterioskleroseentstehung angesehen wird (Stone et al. 2003).

Die Entstehung der Arteriosklerose ist ein multifaktorieller Prozess, in dem sich die Veränderungen der Gefäßwand über viele Jahre hinweg vollziehen. Die frühesten beobachtbaren Schädigungen der Gefäße sind „fatty streaks“, die durch Akkumulation von Cholesterin-überladenen Makrophagen, den sogenannten Schaumzellen, im subendothelialen Raum entstehen. Diese Veränderungen können bereits im ersten Lebensjahrzehnt in der Aorta, später auch in anderen Arterien, beobachtet werden. Durch weitere Ansammlung nekrotischer Makrophagen sowie Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen (*smooth muscle cells*; SMCs) entwickelt sich ein Plaque, der durch einen lipidreichen nekrotischen Kern und eine ihn umgebende fibröse Schicht aus SMCs gekennzeichnet ist (Lusis 2000).

Die häufigste Ursache für einen akuten Arterienverschluss mit den bekannten Folgen eines Myokardinfarktes bzw. eines Schlaganfalls ist ein Aufbrechen eines arteriosklerotischen Plaques. Die dadurch bedingte Exposition extravaskulärer Matrix sowie des pro-thrombotischen Lipidmaterials führt zur Bildung eines Thrombus.

Endothel

Das Endothel kleidet alle Blutgefäße des Körpers wie eine Tapete aus und fungiert als semi-permeable Grenzschicht zwischen Blut und umgebendem Gewebe. Die einlagige Schicht aus Endothelzellen wird von $1-6 \times 10^{13}$ Zellen geformt, die zusammen etwa die Masse von 1 kg aufweisen und eine Fläche von $1-7 \text{ m}^2$ bedecken (Cines et al. 1998). Das Endothel ist ein vielseitiges Organ, welches für die Regulation des Blutdrucks und der vaskulären Homöostase unersetzlich ist (Cines et al. 1998, Sumpio et al. 2002). Ein ruhendes Endothel besitzt eine anti-thrombotische, anti-adhäsive Oberfläche und sezerniert vasoaktive Substanzen, die unter anderem die Plättchenaggregation sowie das Wachstum von SMCs hemmen und gefäßerweiternd wirken.

2 Stand der Forschung

Nach der „*response-to-injury*“-Hypothese kommt dem Endothel eine zentrale Rolle bei der Arteriogenese zu (Ross 1999). An erster Stelle einer Kaskade von Ereignissen steht dabei eine Verletzung bzw. Dysfunktion des Endothels. Tab. 2.1 zeigt mögliche Auslöser einer solchen Fehlfunktion des Endothels. Unabhängig von der Ursache führt die Fehlfunktion zu einer erhöhten Adhäsionsmolekülexpression sowie Permeabilität des Endothels und Verlust der antikoagulativen Eigenschaften (Ross 1999, Shimokawa 1999). Diese „Aktivierung“ zieht die Adhäsion und Transmigration von Monozyten sowie Adhäsion von Thrombozyten nach sich, weswegen die Arteriosklerose als chronische Entzündung angesehen wird (Steinberg 2002).

- erhöhte LDL-Spiegel
- modifiziertes LDL
- freie Radikale
- erhöhte Homocysteinspiegel im Plasma
- Infektion mit Chlamydien, sowie Herpes- oder Zytomegalieviren

Tabelle 2.1: Mögliche Ursachen einer Endotheldysfunktion

2.2 Apoptose

2.2.1 Apoptose - der physiologische Zelltod

Komplexe Organismen wie der Mensch erhalten die Gewebshomöostase durch ein Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und Apoptose aufrecht. Der Begriff Apoptose wurde von **Kerr et al. (1972)** geprägt, die das Phänomen als Erste benannt haben und setzt sich aus den beiden griechischen Wörtern $\alpha\pi\omicron$ (apo=weg) und $\pi\tau\omicron\sigma\iota\sigma$ (ptosis=Fall) zusammen. Die Apoptose wird auch als programmierter Zelltod bezeichnet und stellt die physiologische Form des Zelltodes dar, die für die Elimination überzähliger, geschädigter oder mutierter Zellen verantwortlich ist. Eine Fehlregulation der Apoptose wird in verschiedenen Krankheiten beobachtet, insbesondere bei der Tumorentstehung sowie Autoimmunerkrankungen (**Kaufmann & Hengartner 2001**).

Von der pathologischen Form des Zelltods, der Nekrose, unterscheidet sich die Apoptose sowohl morphologisch als auch biochemisch. Tabelle 2.2 zeigt eine Zusammenstellung wichtiger Unterschiede.

	APOPTOSE	NEKROSE
Stimuli	physiologisch oder pathologisch	pathologisch
Zellmorphologie	Schrumpfung	Anschwellen
Chromatinkondensation	ja	nein
Energieabhängigkeit	ja	nein
Asymmetrie der Zellmembran	aufgehoben	intakt
DNA-Fragmentierung	zwischen den Nukleosomen DNA-Leiter (200 bp)	zufällige Aufspaltung („DNA-Schmier“)
Entzündungsreaktion	nein	ja

Tabelle 2.2: Morphologische und biochemische Unterschiede zwischen Apoptose und Nekrose

Signaltransduktionswege der Caspasen-Aktivierung

Signale zur Apoptose einzelner Zellen werden sowohl durch exogene Faktoren (z.B. UV-Strahlung) als auch durch endogene Faktoren (z.B. $\text{TNF}\alpha$) vermittelt. Darüberhinaus können viele Faktoren, die zu oxidativem Stress führen, Apoptose induzieren. Unabhängig von der Art des Apoptosestimulus münden alle aktivierten Signalwege in einen gemeinsamen Endweg der Apoptose, die Aktivierung der Caspasen (Cysteiny-Aspartasen). Die Aktivierung der Caspasen führt zur Spaltung einer ganzen Reihe von Zielproteinen, wodurch Proteine, die für die Ausführung der Apoptose notwendig sind, wie etwa DNasen, aktiviert werden. Proteine, die ein Zellüberleben fördern, wie etwa die für die DNA-Reparatur zuständige Poly(ADP-ribose)Polymerase (PARP), werden dagegen durch Spaltung inaktiviert (**Kaufmann & Hengartner 2001**). Caspasen liegen als inaktive Enzyme im Zytosol vor und können über zwei Signalwege aktiviert werden (vgl. Abb. 2.1):

1.) Sogenannte Todesrezeptoren rekrutieren nach Aktivierung verschiedene Adaptermoleküle zu einem *death inducing signaling complex (DISC)*, durch den Caspase-8 aktiviert wird. Caspase-8 wiederum kann direkt Caspase-3 aktivieren oder durch Spaltung des pro-

2 Stand der Forschung

apoptotischen Proteins Bid den zweiten Signalweg aktivieren.

2.) Der zweite, Rezeptor-unabhängige Signalweg beruht auf der Freisetzung von Cytochrom C sowie anderer pro-apoptotischer Proteine aus den Mitochondrien. Cytochrom C, Apaf-1 und die Procaspase-9 formen das sogenannte Apoptosom, durch das Caspase-9 aktiviert wird, welche wiederum Caspase-3 aktivieren kann.

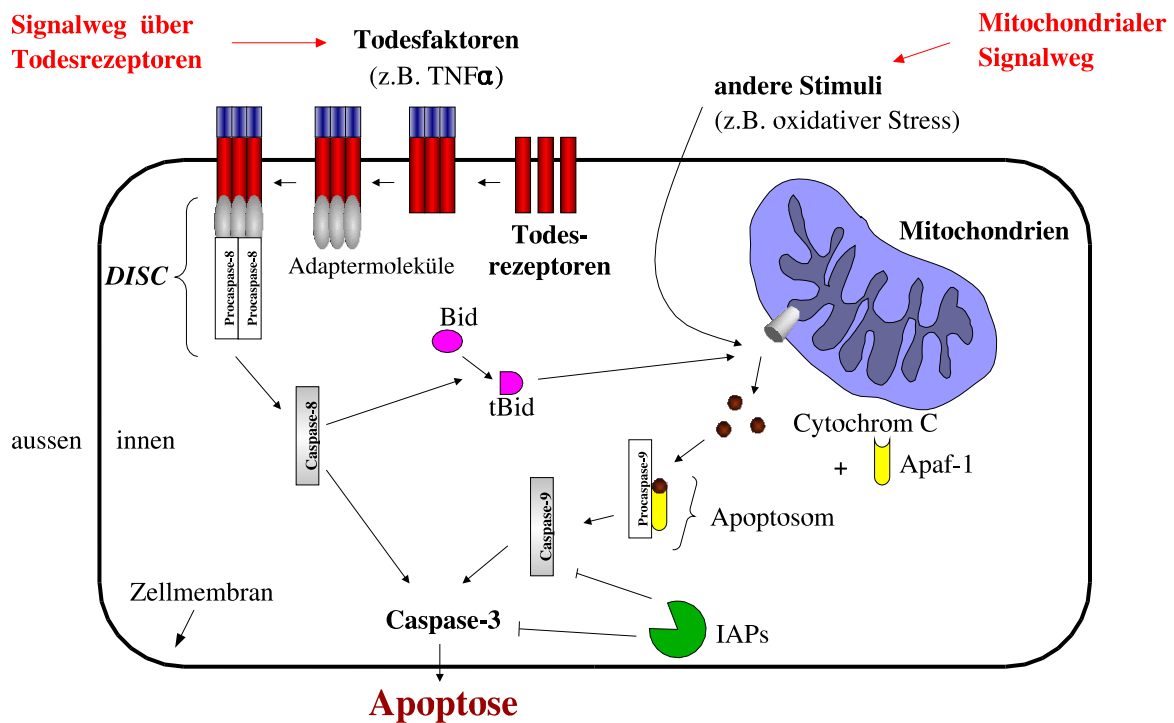


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der an der Apoptoseinduktion über Mitochondrien oder Todesrezeptoren beteiligten Signalwege. Liganden-aktivierte Todesrezeptoren vermitteln durch Rekrutierung verschiedener Adaptermoleküle zum *death inducing signaling complex* (DISC) die Aktivierung der Caspase-8. Aktive Caspase-8 kann entweder direkt Caspase-3 aktivieren oder durch Spaltung des pro-apoptotischen Proteins Bid, das die Cytochrom C-Freisetzung aus den Mitochondrien fördert, einen zweiten, Rezeptor-unabhängigen Signalweg initiieren. Der mitochondriale Signalweg (auf der rechten Seite dargestellt) ist durch die Freisetzung von Cytochrom C und anderer pro-apoptotischer Proteine aus den Mitochondrien gekennzeichnet. Freigesetztes Cytochrom C bildet mit dem *apoptotic protease-activating factor-1* (Apaf-1) und der Procaspase-9 das Apoptosom, wodurch Caspase-9 aktiviert wird, welche wiederum Caspase-3 aktivieren kann. Die Caspase-Inhibitoren der *inhibitor of apoptosis protein* (IAPs)-Familie sind in der Lage, bereits aktivierte Caspasen durch direkte Interaktion zu hemmen und dadurch die Apoptose zu verhindern.

Regulation der Apoptose

Der komplexe Vorgang der Apoptose wird durch eine Vielzahl pro- und anti-apoptotischer Proteine reguliert. Dazu zählen spezielle Proteine wie etwa die Proteine der Bcl-2-Familie, die

sowohl pro- als auch anti-apoptotische Mitglieder hat. Vermutlich durch Oligomerisierung pro-apoptotischer Mitglieder wie tBid und Bax kommt es zur Bildung von Poren in den Mitochondrienmembranen (Kuwana et al. 2002), die groß genug für die Freisetzung von Cytochrom C und anderer pro-apoptotischer Proteine sind (Kluck et al. 1997, Ferri & Kroemer 2001, Wei et al. 2001). Anti-apoptotische Bcl-2-Proteine wie das Bcl-2 selbst sind in der Lage, ihre pro-apoptotischen Verwandten zu binden und damit zu inaktivieren (Yang et al. 1997, Kluck et al. 1997).

Weitere wichtige Proteinfamilien, die in die Regulation der Apoptose involviert sind und im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, sollen im folgenden kurz vorgestellt werden.

Inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) IAPs sind die größte bekannte Gruppe endogener Caspase-Inhibitoren. Sie sind durch eine oder mehrere *Baculovirus IAP repeat (BIR)*-Domänen charakterisiert (LeBlanc 2003). Bislang konnten 8 verschiedene IAPs in Säugetieren nachgewiesen werden. *X-linked IAP (XIAP)*, c-IAP-1, c-IAP-2 sowie *neuronal IAP* sind in der Lage Caspase-3, -7 und -9 durch direkte Interaktion zu hemmen (Deveraux et al. 1997, Maier et al. 2002, Roy et al. 1997). Daneben enthalten fünf verschiedene IAPs, darunter XIAP, c-IAP-1 und c-IAP-2 eine RING-Domäne, welche die proteasomale Degradierung sowohl des IAP als auch des Zielproteins durch Ubiquitynierung katalysiert (Salvesen & Duckett 2002).

Die Expression der IAPs kann auf Transkriptionsebene reguliert werden. Dies dient wahrscheinlich als eine Art Sicherungsmechanismus, um eine irrtümliche Caspasenaktivierung zu verhindern (LeBlanc 2003). Sowohl verschiedene Formen des Zellstresses als auch Wachstumsfaktoren können die IAP-Expression induzieren. Der dafür verantwortliche Transkriptionsfaktor ist noch nicht identifiziert. Ein möglicher Kandidat ist der Transkriptionsfaktor *Nuclear factor- κ B* (NF- κ B), dessen Aktivierung mit einer verstärkten Expression der IAPs korreliert ist. Die Überexpression des NF- κ B-Inhibitors *I κ B α* in humanen SMCs führte zu einer Reduktion der *iap-1* mRNA-Expression (Erl et al. 1999). In HL60-Zellen wurde sowohl die Aktivierung von NF- κ B als auch der Proteinkinase Akt und eine anschließende verstärkte Expression von c-IAP-1, c-IAP-2 und XIAP beobachtet (LeBlanc 2003).

Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) MAPKs koordinieren eine Vielzahl zellulärer Mechanismen wie Gentranskription, Proteinsynthese, Zellzyklus, Zelltod und Differenzierung. Die Aktivität der MAPKs wird durch eine dreigliedrige Kaskade reguliert, die aus einer MAPK, einer MAPK-Kinase sowie einer MAPK-Kinase-Kinase besteht. In Säugetieren sind bislang vier unterschiedlich regulierte MAPK-Familien beschrieben, ERK-1/2 (*extracellular signal-related kinases*), JNK1/2/3 (*c-jun amino terminal kinases*), die p38-Proteine sowie *big MAPK-1*. Die Regulation der MAPKs ist sehr komplex, da MAPK-Kinasen mehrere MAPK und MAPK-Kinasen-Kinasen unterschiedliche MAPK-Kinasen aktivieren können (Chang & Karin 2001, Kyriakis & Avruch 2001).

Die Aktivierung der drei MAPK-Familien hat unterschiedliche Effekte auf die Apoptoseinduktion. ERKs werden insbesondere durch Wachstumsfaktoren aktiviert, fördern die Zellproliferation sowie anti-apoptotische Signalwege und hemmen pro-apoptotische Signalwege (Chang & Karin 2001, Hoefen & Berk 2002). Die MAPKS JNK und p38 werden durch verschiedene Formen des Stresses aktiviert. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von p38 in Endothelzellen in den Prozess der Apoptose involviert ist, da eine Hemmung der p38-Aktivierung durch spezifische Inhibitoren die Endothelzellapoptose reduzieren konnte (Yilmaz et al. 2003,

Ali et al. 2004). Die Rolle von JNK in der Regulation der Apoptose ist noch unvollständig verstanden. Wurde zunächst die Aktivierung von JNK als ein rein pro-apoptotisches Signal gewertet (Xia et al. 1995, Lei & Davis 2003), liegen vermehrt Hinweise auf eine anti-apoptotische Funktion der JNK-Aktivierung vor (Lin 2003). Die Rolle von JNK in der Regulation der Apoptose scheint damit wesentlich komplexer zu sein als bisher angenommen. Es wird vermutet, dass die Aktivierung von JNK eine Apoptose-modulierende Rolle in Abhängigkeit vom Zelltyp und der Art des Stimulus spielt (Lin 2003).

Die Proteinkinase Akt Akt ist eine Serin-Threonin-Kinase, die durch verschiedene Wachstumsfaktoren und Zytokine aktiviert wird (Shiojima & Walsh 2002). Als Mitglied der Phosphatidylinositol 3-OH-Kinase (PI3K) regulierten Proteine wird Akt nach Rekrutierung an die Plasmamembran durch Phosphorylierung an Threonin 308 und Serin 473 aktiviert (Shiojima & Walsh 2002, Franke et al. 2003). Akt selbst ist eine multifunktionelle Kinase, die verschiedenste Proteine durch Phosphorylierung aktiviert oder hemmt. Zu den Substraten gehören Proteine der Apoptoseregulation wie Bad und Procaspase-9, Proteine der Zellzyklusregulation wie p21^{WAF} und die Nitritoxidsynthase (Franke et al. 2003).

Die zentrale Rolle der Proteinkinase Akt in der Regulation der Endothelzellvitalität konnte in zahlreichen Studien gezeigt werden. Verschiedenste Stimuli wie Insulin, laminarer Scherstress, Östrogen oder reaktive Sauerstoffspezies aktivieren den PI3K-Akt-Signaltransduktionsweg, wodurch die Induktion von Apoptose gehemmt werden konnte (Shiojima & Walsh 2002). Als distale Effektoren der anti-apoptotischen Wirkung einer Akt-Aktivierung wurden neben der Inaktivierung von Bad und der Procaspase-9, die erhöhte Expression des Caspase-8-Inhibitors *FLICE-inhibitory protein* (Skurk et al. 2004) sowie anti-apoptotischer Proteine wie Survivin (Dan et al. 2004) und c-IAP-1 (Gagnon et al. 2003) beschrieben.

Nuclear factor- κ B (NF- κ B) Der Transkriptionsfaktor NF- κ B wird durch zahlreiche Stimuli wie etwa Zytokine oder verschiedene Formen des Zellstress aktiviert. NF- κ B ist ein Dimer, das aus verschiedenen Vertretern der Rel/NF- κ B-Familie wie etwa p65 und p50 gebildet wird (Wang et al. 2002, Kucharczak et al. 2003). In unstimulierten Zellen liegen die Homo- und Heterodimere des NF- κ B als inaktiver NF- κ B/I κ B-Komplex im Zytosol vor. Die schnelle, transiente Aktivierung des Transkriptionsfaktors erfolgt durch Phosphorylierung des I κ B-Proteins, wodurch NF- κ B freigesetzt wird, in den Zellkern transloziert und dort die Transkription verschiedener Proteine aktiviert, die in die Immunantwort, Entzündung, Proliferation und Überleben der Zellen involviert sind (Kucharczak et al. 2003).

2.2.2 Endothelzellapoptose

Ruhende Endothelzellen bilden eine geschlossene Zellschicht, einen sogenannten *monolayer*, und erhalten dadurch eine Barriere zwischen Blutbestandteilen und extravaskulärem Gewebe aufrecht. Durch seine einzigartige Stellung ist das Endothel einer Vielzahl mit dem Blut zirkulierender Faktoren ausgesetzt. Diese können zu einer Aktivierung wie auch zu einer Schädigung des Endothels führen. Eine mögliche Folge solch einer Endothelschädigung ist die Apoptose der Zelle (Abb. 2.2).

Ein *in vivo* Beweis für einen direkten Zusammenhang zwischen Endothelzellapoptose und Arteriosklerose steht noch aus. Vielmehr haben zahlreiche deskriptive Studien und *in vitro* Ex-

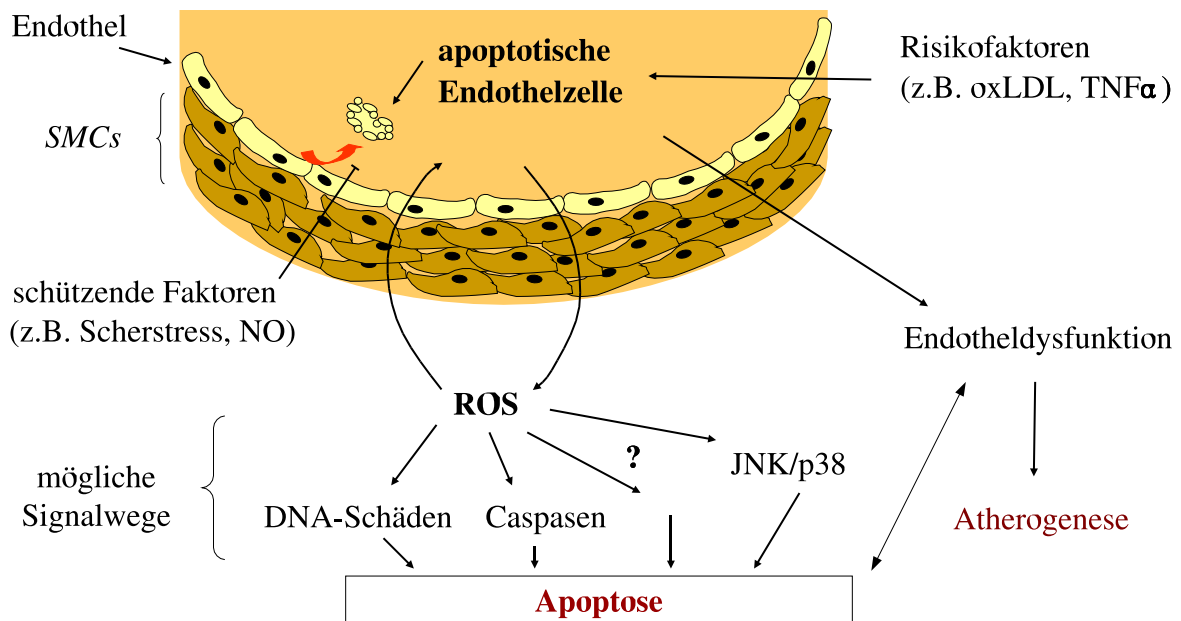


Abbildung 2.2: Endothelzellapoptose. Das Endothel ist als Barriere zwischen Blutbestandteilen und dem extrazellulären Gewebe mit den *smooth muscle cells* (SMCs) kontinuierlich verschiedensten Faktoren ausgesetzt. Zu diesen zählen oxidierte LDL-Partikel (oxLDL) und TNF α , die zu oxidativem Stress und der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) führen und Apoptose in Endothelzellen induzieren können. Schützende Faktoren, wie der laminare Scherstress oder Nitritoxid (NO) sind in der Lage sowohl den oxidativen Stress zu reduzieren als auch die Endothelzellapoptose zu verhindern. Die Apoptose von Endothelzellen kann zur Dysfunktion des Endothels führen, welche als initialer Schritt der Arteriogenese angesehen wird.

perimente eine Fülle von Hinweisen für eine mögliche Beteiligung der Endothelzellapoptose bei der Initiation der Arteriosklerose ergeben (Dimmeler et al. 2002). Wie bereits Caplan & Schwartz (1973) zeigen konnten, ist an Stellen der Gefäßwand, an denen bevorzugt arteriosklerotische Läsionen auftreten, ein erhöhter Endothelzellumsatz zu finden. Da ein gesundes Endothel *in vivo* nur eine sehr geringe Replikationsrate von 0,1% pro Tag aufweist (Cines et al. 1998), könnte dies auf ein erhöhtes Zellsterben durch Apoptose zurückzuführen sein (Hansson et al. 1985). Diese Gefäßabschnitte weisen eine Veränderung der Hämodynamik wie eine niedrige Scherbelastung oder eine turbulente Strömung auf, die mit dem Auftreten apoptotischer Endothelzellen in Zusammenhang stehen (Tricot et al. 2000). Ein laminarer Scherstress übt dagegen einen protektiven Effekt auf Endothelzellen aus und ist in der Lage, Endothelzellapoptose in *in vitro* Experimenten zu verhindern (Dimmeler et al. 1996). Wie weitere *in vivo* und *in vitro*-Studien zeigen konnten, haben Risikofaktoren der Arterioskleroseentstehung einen Einfluss auf die Apoptoseinduktion in Endothelzellen. Mit dem Alter steigt auch die Sensitivität von Endothelzellen gegenüber Apoptosestimuli (Hoffmann et al. 2001, Asai et al. 2000). Andere pro-atherogene Substanzen wie etwa oxidierte LDL-Partikel, Angiotensin II, Hypoxie oder pro-inflammatorische Zytokine sind in der Lage *in vitro* Apoptose in Endothelzellen zu induzieren (Rössig et al. 2001).

2 *Stand der Forschung*

Eine derartige Schädigung des Endothels kann zu Veränderungen seiner vaskulären Eigenschaften führen (Ross 1999). Eine verringerte Endothelzellzahl kann darüberhinaus den Verlust der Endothelintegrität bedeuten. Die Konsequenzen sind ein vereinfachter Übertritt und Ablagerung von Lipiden sowie Monozyten in den extravaskulären Raum sowie die Induktion der Muskelzellproliferation (Choy et al. 2001). Zusätzlich verliert das Endothel seine anti-koagulativen Eigenschaften. Es konnte gezeigt werden, dass apoptotische Zellen pro-koagulativ sind und die Adhäsion nicht-aktivierter Thrombozyten fördern können (Bombeli et al. 1997, 1999). Die Schädigung des Endothels mit der möglichen Folge der Endothelapoptose könnte daher einen initialen Schritt in der Arterioskleroseentstehung darstellen (vgl. Abb 2.2).

2.3 Mehrfach ungesättigte Fettsäuren

Fettsäuren gehören neben den Aminosäuren und den Kohlenhydraten zu den Grundbausteinen des Lebens. Fettsäuren fallen im wesentlichen drei Aufgaben zu:

- Sie dienen als Energielieferant und -speicher.
- Sie sind essentielle Membranbausteine.
- Hochungesättigte Fettsäuren dienen als Ausgangssubstanzen für die Eicosanoidsynthese.

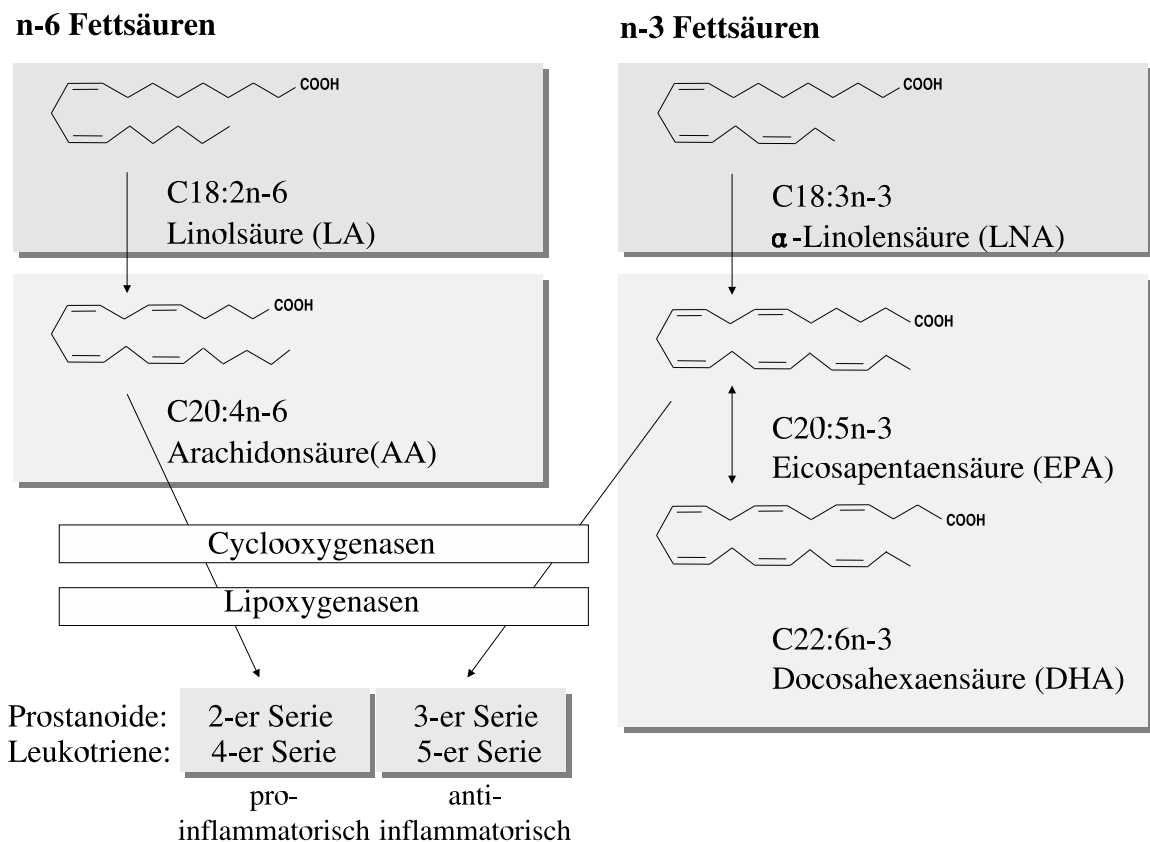


Abbildung 2.3: n-6 und n-3 Fettsäuren. Schematischer Überblick über die Bildung beider Fettsäuregruppen. Links dargestellt sind die n-6 Fettsäuren mit ihren Hauptvertretern LA und AA, welche über verschiedene Zwischenprodukte aus LA synthetisiert wird. Rechts sind die n-3 Fettsäuren mit ihren Hauptvertretern LNA, EPA und DHA dargestellt. Links unten ist die Synthese der Eicosanoide aus AA und EPA zusammengefasst, die durch Cyclooxygenasen und Lipoxygenasen katalysiert wird.

Zu den mehrfach ungesättigten Fettsäuren (*PUFAs*=*polyunsaturated fatty acids*) werden Fettsäuren mit zwei oder mehr Doppelbindungen gezählt. Die weitere Unterteilung erfolgt aufgrund der Stellung der ersten Doppelbindung nach der Methylgruppe. N-6 Fettsäuren haben die erste Doppelbindung am Kohlenstoffatom 6, n-3 Fettsäuren bereits am Kohlenstoffatom 3 (Abb. 2.3).

2 Stand der Forschung

Die Stammfettsäuren beider Gruppen, Linolsäure (n-6) sowie α -Linolensäure (n-3), zählen zu den essentiellen Fettsäuren, die der Mensch aufgrund eines Enzymmangels nicht selber synthetisieren kann. Aus diesen können durch enzymkatalysierte Elongation sowie Desaturierung die hochungesättigten Fettsäuren wie Arachidonsäure (AA) und Docosahexaensäure (DHA) gebildet werden.

Während die Zusammensetzung der Proteine genetisch determiniert ist, variiert das Fettsäuremuster der Membranlipide und spiegelt die Fettsäurezusammensetzung der Nahrung wider. Insbesondere Eicosapentaensäure (EPA)- sowie DHA-Spiegel sind durch die Nahrung beeinflussbar und werden vermehrt sowohl in Phospholipide als auch in Triglyzeride des Fettgewebes eingebaut (Muskiet et al. 2004). Der AA-Spiegel dagegen scheint reguliert zu sein, da durch eine erhöhte AA-Zufuhr der Gehalt z.B. im Plasma oder dem Fettgewebe nur schwer beeinflusst werden kann.

Dies ist besonders in Hinblick auf die Synthese der Eicosanoide von Interesse (Weber 1987), die eine wichtige Rolle beim Entzündungsgeschehen, der Kontrolle des Blutdrucks und der Thrombozytenaggregation spielen. Die vorwiegend aus AA sowie EPA gebildeten Eicosanoide haben dabei gänzlich unterschiedliche Wirkungen (vgl. Abb. 2.3). Ein Großteil der Wirkungen sowohl der n-6 als auch der n-3 Fettsäuren wird auf den Einfluss auf die Eicosanoidsynthese zurückgeführt (Leaf & Weber 1988). Da beide Fettsäuregruppen um die gleichen Enzyme konkurrieren, kann insbesondere durch eine erhöhte Zufuhr von n-3 Fettsäuren die Synthese zugunsten der weniger aktiven n-3 Eicosanoide beeinflusst werden.

2.3.1 n-6 Fettsäuren und Metabolite der Oxidation - Effekte auf das Endothel

Der wichtigste Vertreter der n-6 Fettsäuren ist die AA, deren biologische Effekte zum Großteil auf die durch verschiedene Oxygenasen gebildeten Eicosanoide zurückgeführt werden (Brash 2001). Daneben konnte gezeigt werden, dass AA NAD(P)H-Oxidasen aktivieren sowie Ionenkanäle beeinflussen kann. Eine Akkumulation von AA scheint die Proliferation zu hemmen und Apoptose zu initiieren (Brash 2001).

Oxidationsmetabolite der n-6 Fettsäuren

Cyclopentenon-Prostaglandine

Prostaglandine (PGs) bilden eine Familie strukturell verwandter Moleküle, die von verschiedensten Zellen in Reaktion auf eine Vielzahl extrinsischer Stimuli gebildet werden. Als autokrine und parakrine Botenstoffe sind sie in verschiedene homöostatische Vorgänge involviert. PGs werden auf dem Cyclooxygenase (COX)-Weg aus hochungesättigten Fettsäuren, insbesondere AA, gebildet. Nach enzymatischer Freisetzung aus Membranphospholipiden katalysieren COX die Bildung des instabilen Zwischenprodukts PGG₂ aus AA, welches anschließend zu PGH₂ umgewandelt wird (Abb. 2.4). PGH₂ wird in Abhängigkeit von Zelltyp und Art des Stimulus zu verschiedenen PGs wie etwa PGD₂, PGE₂, PGE₁, Prostacyclin oder Thromboxan A₂ umgewandelt.

Innerhalb dieser Familie bilden die Prostaglandine der A- und J-Reihe die sogenannten Cyclopentenon-Prostaglandine (CyPGs). Diese Untergruppe ist durch eine α,β -ungesättigte Carbo-

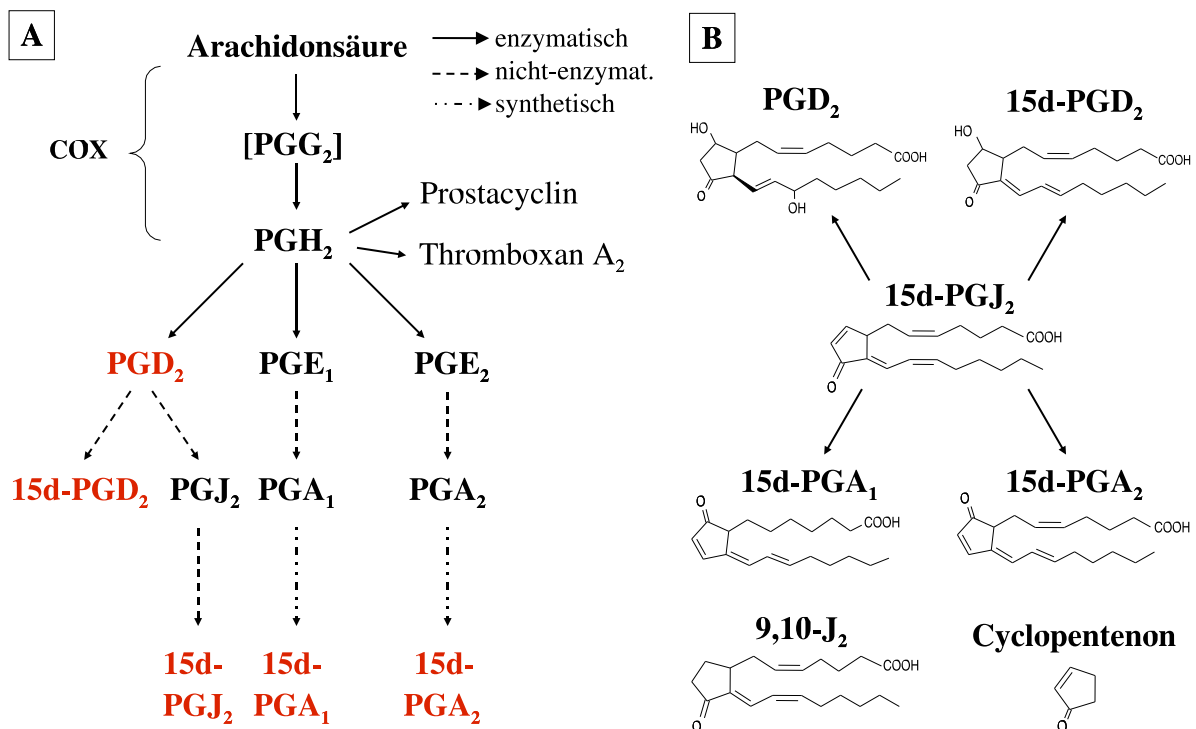


Abbildung 2.4: Bildung und Struktur der verwendeten PGs und CyPGs. **A** Die Biosynthese der PGs erfolgt durch enzymatische Umwandlung der AA in PGH₂, aus dem abhängig von der Art der Zelle und des Stimulus die PGs synthetisiert werden, welche wiederum die Ausgangssubstanzen für die CyPGs bilden. **B** zeigt die Strukturformeln der verwendeten PGs und CyPGs sowie das synthetische Derivat 9,10-J₂ und das Cyclopentenon.

nylgruppe im Cyclopentenonring charakterisiert. PGJ₂, PGA₁ und PGA₂ werden durch Dehydrierung des Cyclopentanringes aus PGD₂, PGE₁ sowie PGE₂ gebildet und konnten bereits *in vivo* nachgewiesen werden (Straus & Glass 2001). Besonderes Interesse hat ein nicht-enzymatisch gebildeter Metabolit des PGJ₂, das 15-deoxy-Δ^{12,14}-PGJ₂ (15d-PGJ₂), gefunden. Erstmals 1995 als endogener Ligand des nukleären Hormonrezeptors Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor γ (PPARγ) identifiziert (Forman et al. 1995), deuten Studien zunehmend auf zusätzliche Effekte des 15d-PGJ₂ hin. Zu diesen zählen entzündungshemmende Effekte wie die Reduktion der NF-κB-Aktivierung (Straus et al. 2000, Cernuda-Morollon et al. 2001), die Hemmung der Produktion pro-inflammatorischer Zytokine (Jiang et al. 1998) sowie eine Verminderung der Leukozyten-Endothelzellinteraktion (Jackson et al. 1999). Im Gegensatz dazu zeigt eine wachsende Studienzahl pro-inflammatorische Effekte von CyPGs, insbesondere des 15d-PGJ₂. So induziert 15d-PGJ₂ oxidativen Stress (Kondo et al. 2001, Li et al. 2001) sowie Apoptose in verschiedenen Zellen inklusive Endothelzellen (Bishop-Bailey & Hla 1999, Levonen et al. 2001). Zusätzlich stimuliert 15d-PGJ₂ die Bildung von Interleukin-8 (Fu et al. 2002) und aktiviert humane Eosinophile (Monneret et al. 2002).

Einige Studien konnten zeigen, dass von verschiedenen getesteten PGs das 15d-PGJ₂ die stärksten Effekte auf die Zellvitalität ausübt (Bishop-Bailey & Hla 1999, Kondo et al. 2001,

Li et al. 2001). Erste Untersuchungen an Endothelzellen hatten bestätigt, dass CyPGs unterschiedlich stark die Zellvitalität reduzieren und die Expression von Adhäsionsmolekülen nach TNF α -Stimulation hemmen (Zernecke et al. 2003).

4-Hydroxynonenal - ein Lipidperoxidationsprodukt

4-Hydroxynonenal (HNE) ist ein Hauptprodukt der Lipidperoxidation von n-6 Fettsäuren wie LA oder AA (Esterbauer et al. 1991). Die Bildung von HNE aus diesen Fettsäuren wird durch verschiedene Enzyme katalysiert, aber auch nicht-enzymatische Wege werden vermutet (Schaur 2003). HNE ist ein α,β -ungesättigter Aldehyd und mit seinen drei funktionellen Gruppen ein hochreaktives Molekül (Abb. 2.5), welches mit Thiol- und Aminogruppen von Proteinen reagiert und DNA sowie RNA durch Adduktbildung schädigt.

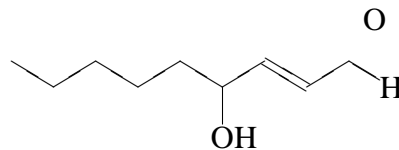


Abbildung 2.5: Chemische Struktur des Lipidperoxidationsprodukts 4-Hydroxynonenal

Eine wachsende Zahl von Studien deutet darauf hin, dass Aldehyde, die endogen durch Lipidperoxidationsprozesse gebildet werden, für die pathophysiologischen und zellschädigenden Effekte des oxidativen Stresses verantwortlich sind. Derartige Prozesse laufen bei entzündlichen und oxidativen Vorgängen ab, wie sie bei der Bildung arteriosklerotischer Läsionen vermutet werden (Esterbauer et al. 1991, Uchida et al. 1999). Es wird angenommen, dass die oxidative Modifikation von LDL-Partikeln für die Entstehung der Schaumzellen aus Makrophagen verantwortlich ist. Palinski et al. (1989) konnten eine oxidative Modifikation von LDL-Partikeln *in vivo* nachweisen. HNE wurde als eines der Lipidperoxidationsprodukte in oxidierten LDL-Partikeln identifiziert (Esterbauer et al. 1987). Der Nachweis HNE-modifizierter Epitope in arteriosklerotischen Läsionen LDL-Rezeptor-defizienter Kaninchen (Palinski et al. 1989) konnte unter anderem in Läsionen der menschlichen Aorta bestätigt werden (Uchida et al. 1995, Itakura et al. 2000).

Als lipophile Substanz kann HNE in Plasmamembranen akkumulieren und dabei vermutlich Konzentrationen im milli-molaren Bereich erreichen (Schaur 2003). Neben extrazellulären Quellen wie oxidierten LDL-Partikeln, wird HNE durch intrazelluläre oxidative Prozesse gebildet und wirkt als Mediator des oxidativen Stresses. Daneben konnte HNE als physiologische Komponente des Blutplasmas nachgewiesen werden. In gesunden Probanden konnte ein mittlerer Plasmaspiegel von 0,65 μM HNE bei Frauen und 0,78 μM bei Männern gemessen werden (Strohmaier et al. 1995). Selley (1997) konnte darüberhinaus zeigen, dass verschiedene Erkrankungen wie Parkinson den Plasmaspiegel auf bis zu 6 μM HNE erhöhen können.

Die biologischen Effekte von HNE sind vielfältig und abhängig von der eingesetzten Konzentration. Konzentrationen über 100 μM induzieren akute und unspezifische zytotoxische Effekte, Konzentrationen unter 1 μM üben vermutlich physiologische Effekte aus (Esterbauer et al. 1991). Die meisten bisher publizierten Untersuchungen wurden in Abhängigkeit des verwendeten Zellmodells mit Konzentrationen zwischen 1 und 100 μM HNE durchgeführt. Die toxischen

Effekte des HNE werden in erster Linie mit seiner Fähigkeit, Apoptose zu induzieren, in Verbindung gebracht (Liu et al. 2000, Haynes et al. 2001, Ji et al. 2001, Uchida 2003). Herbst et al. (1999) und Levonen et al. (2001) konnten zeigen, dass HNE in Konzentrationen von 10-20 μM Apoptose in HUVECs induzieren kann. Der genaue Mechanismus ist noch unbekannt, aber als mögliche Wege der Apoptoseinduktion wurden der Einstrom extrazellulären Calciums (Kruman & Mattson 1999, McConnell & Raess 2002), die Aktivierung der MAPK JNK (Parola et al. 1998) sowie die Depletion des intrazellulären GSH-Pools (Kruman et al. 1997) vorgeschlagen. Daneben ist HNE in der Lage den Transkriptionsfaktor NF- κB (Page et al. 1999, Hattori et al. 2001) sowie die Proteindegradierung durch das Proteasom (Okada et al. 1999, Hyun et al. 2002) zu hemmen.

2.3.2 n-3 Fettsäuren und ihre protektive Wirkung auf das Endothel

Die wichtigsten Vertreter der n-3 Fettsäuren sind EPA und DHA. Erstere ist aufgrund der in Abbildung 2.3 bereits dargestellten Eigenschaft als Vorläufersubstanz der Eicosanoide von Bedeutung. DHA ist sowohl für Nervenzellen als auch Photorezeptoren essentiell und hat zudem protektive Effekte gegenüber Herz-Kreislaufkrankungen auf die näher eingegangen werden soll.

Die Verbindung zwischen n-3 Fettsäuren und kardiovaskulären Erkrankungen wurde erstmals Mitte der 70-er Jahre von den dänischen Forschern Bang und Dyerberg hergestellt, die eine relativ niedrige Mortalität grönländischer Inuit trotz fettreicher Ernährung beobachteten (Dyerberg et al. 1975) und dies auf die an n-3 Fettsäuren reiche Ernährung zurückführten. Die zahlreichen seitdem durchgeführten Studien konnten diese Beobachtungen zum Teil bestätigen. Sowohl einige prospektive Studien (Kromhout et al. 1985, Daviglus et al. 1997) als auch einige Interventionsstudien (Burr et al. 1989, GISSI-Prevenzione Investigators 1999) konnten eine inverse Korrelation zwischen Fisch- oder Fischölverzehr und der Mortalität für koronare Herzkrankheiten zeigen. Allerdings konnten einige Studien keinen protektiven Effekt feststellen (Ascherio et al. 1995, Morris et al. 1995, Guallar et al. 1999). Die Bedeutung einer erhöhten n-3 Fettsäurezufuhr für die Sekundärprävention konnte von einer kürzlich durchgeführten Meta-Analyse untermauert werden. In klinischen Interventionsstudien an Patienten mit bestehender koronarer Herzkrankheit konnte ein erhöhter Fisch- oder Fischöl-Verzehr die Gesamtmortalität verringern (Bucher et al. 2002).

Der Einfluss der n-3 Fettsäuren auf die Arteriosklerose ist weniger gut dokumentiert. Die Studie von von Schacky et al. (1999) konnte zeigen, dass eine Supplementation mit n-3 Fettsäuren zu einem signifikanten Rückgang der Plaqueprogression sowie einer signifikanten Regression des Plaquegewebes führte. Thies et al. (2003) beobachteten in ihrer Studie eine erhöhte Stabilität arteriosklerotischer Plaques. Die Fischölsupplementation führte zu einem Einbau der n-3 Fettsäuren in bestehende Plaques, was mit einer geringeren Wahrscheinlichkeit für eine dünne fibröse Kappe und damit der Rupturgefahr assoziiert war.

Leeson et al. (2002) konnten in ihrer Studie an jungen Erwachsenen zwischen 20 und 28 Jahren zeigen, dass der Verzehr von Fisch und Fischöl nicht nur für die Sekundärprävention von Bedeutung ist. Von den jungen Probanden wurde der Plasmaspiegel an n-3 Fettsäuren und die Funktion des Endothels bestimmt. Insbesondere diejenigen, die rauchten oder erhöhte Insulin-, Glucose- oder Triglyzeridspiegel aufwiesen, also Faktoren, die mit einer Endotheldysfunktion in Verbindung gebracht werden, war der n-3 Plasmagehalt positiv mit einer verbesserten Vaso-

2 Stand der Forschung

dilatation assoziiert.

Die für die arterioprotektiven Effekte der n-3 Fettsäuren verantwortlichen Mechanismen sind noch nicht mit Sicherheit bekannt. Im Zellkulturmodell konnten protektive Effekte der DHA auf humane Endothelzellen und deren Funktion gezeigt werden (Brown & Hu 2001). De Caterina et al. (1994) und Weber et al. (1995) konnten unabhängig voneinander zeigen, dass DHA die Zytokin-induzierte Adhäsionsmolekülexpression und die damit verbundene Interaktion zwischen Monozyten und Endothelzellen reduzieren konnte. In einer weiteren Arbeit von Crosby et al. (1996) konnte DHA die Aktivität der Glutathionperoxidase induzieren. Tabelle 2.3 zeigt eine Zusammenfassung möglicher Mechanismen.

-
- verringern die Empfindlichkeit des Herzens gegenüber Arrhythmien
 - anti-thrombotisch
 - anti-arteriosklerotisch
 - anti-inflammatorisch
 - verbessern die Endothelfunktion
 - senken den Blutdruck
 - verringern die Triglyzeridkonzentration
-

Tabelle 2.3: Mögliche Mechanismen der protektiven Wirkung der n-3 Fettsäuren. Modifiziert nach (Kris-Etherton et al. 2002, Din et al. 2004).

3 Fragestellung

In bisherigen Studien konnte gezeigt werden, dass Fettsäuren vielfältige Wirkungen auf das kardiovaskuläre System ausüben und insbesondere in der Pathogenese von Herz-Kreislauferkrankungen wie der Arteriosklerose eine wichtige Rolle spielen. Dabei sind die Wirkmechanismen nur unvollständig verstanden. Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die Wirkungen ungesättigter Fettsäuren auf das Endothel als ein wichtiges Organ des vaskulären Systems zu untersuchen.

Die Arbeit hat zwei Schwerpunkte:

1. Effekte auf Apoptoseprozesse durch Fettsäuremetabolite in humanen Endothelzellen
2. Modulation der Apoptoseinduktion und mögliche Inhibition durch hochungesättigte Fettsäuren.

Diese zellulären Vorgänge sowie mögliche Signaltransduktionswege sollten näher charakterisiert werden. Folgenden Fragestellungen wurde im einzelnen nachgegangen:

- Sind Fettsäuremetabolite als hochreaktive Substanzen in der Lage, Apoptose in humanen Endothelzellen zu induzieren?
Zwei verschiedene Klassen von Fettsäuremetaboliten wurden dazu untersucht: zum einen die Cyclopentenon-Prostaglandine und zum anderen das Lipidperoxidationsprodukt HNE.
 - Welche molekulare Struktur ist für die Apoptoseinduktion durch 15d-PGJ₂ verantwortlich?
Wie bereits in Abschnitt 2.3.1 dargestellt, gehört 15d-PGJ₂ zu den Cyclopentenon-Prostaglandinen, einer Unterfamilie der Prostaglandine. Diese sind durch eine Doppelbindung im Cyclopentenonring charakterisiert, die für die biologische Wirkung der Cyclopentenon-Prostaglandine verantwortlich sein soll. Im Widerspruch dazu stehen Beobachtungen, dass die Vertreter der Familie sich in ihrer Wirkung etwa auf die Zellvitalität stark unterscheiden. Es sollte daher untersucht werden, welche molekulare Struktur für die Effekte von 15d-PGJ₂ verantwortlich ist.
 - Welche Effekte übt HNE, ein Hauptprodukt der Lipidperoxidation, auf humane Endothelzellen aus?
Auf chemischer Ebene sind die Wirkungen von HNE auf unterschiedliche Zellbestandteile zum größten Teil gut charakterisiert. Bisherige Studien haben gezeigt, dass HNE in verschiedenen Zellen, inklusive Endothelzellen, Apoptose induzieren kann. Der genaue Mechanismus ist noch wenig erforscht, vor allem über den Mechanismus der Apoptoseinduktion in humanen Endothelzellen ist wenig bekannt.

3 Fragestellung

Daher sollte die Apoptoseinduktion durch HNE in HUVECs genauer charakterisiert werden, insbesondere für eine spätere Verwendung von HNE als Modellsubstanz zur Induktion von Apoptose.

- Welchen Einfluss haben verschiedene ungesättigte Fettsäuren auf die durch HNE induzierte Apoptose in Endothelzellen?

Ungesättigte Fettsäuren werden bereits seit längerem auf ihren Einfluss auf Herz-Kreislauferkrankungen untersucht. In epidemiologischen Studien sowie Tiermodellen und in Interventionsstudien am Menschen konnten Effekte von Fettsäuren auf das Gefäßsystem nachgewiesen werden. Zahlreiche Studien haben einen protektiven Effekt von n-3 Fettsäuren auf Erkrankungen des Gefäßsystems gezeigt. Ein Einfluss hochungesättigter Fettsäuren auf die Apoptoseinduktion in Endothelzellen ist wenig untersucht und sollte in primären humanen Endothelzellen studiert werden.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Geräte, Arbeitsmittel und Kits

Geräte

FACScan	Becton Dickinson, Heidelberg
GeneQuant II	Amersham Biosciences, Freiburg
iCycler	Bio-Rad, München
Mini-PROTEAN 3 Elektrophoresekammer	Bio-Rad, München
Mini Transferkammer	Bio-Rad, München
Heraeus Multifuge 3	Kendro, Hanau
Zentrifuge MR1822	Jouan, Fernwald
Sterilbank Gelaire	Flow Laboratories, Meckenheim

Arbeitsmittel

27 GA ³ / ₄ -Nadeln	Becton Dickinson, Heidelberg
Hybond-C Super Pure Nitrozellulosemembranen	Amersham Biosciences, Freiburg
Hyperfilm ECL	Amersham Biosciences, Freiburg
Ready-To-Go TM RT-PCR Beads	Amersham Biosciences, Freiburg
SuperSignal West Pico	Pierce, Rockford, USA
Chemiluminescent Substrate	

Kits

AquaPure RNA Isolationskit	Bio-Rad, München
DC Protein Assay	Bio-Rad, München
Glutathione Assay Kit	Calbiochem, Bad Soden
RQ1 RNase-free DNase	Promega, Mannheim
TransAM TM NFκB p65	Active Motif, Rixensart, Belgien
Transcription Factor Assay Kit	

4.1.2 Chemikalien und Reagenzien, Antikörper

Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid/Bisacrylamid, 30% Lösung	Sigma, Seelze
Albumin, Bovin (BSA)	Sigma, Seelze
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma, Seelze
Annexin V-FITC	BD Pharmingen, Heidelberg
Aprotinin	Sigma, Seelze
Benzamidinhydrochloridhydrat	Sigma, Seelze
Bromphenolblau	Sigma, Seelze
1-Butanol	Merck, Darmstadt
α -Chymotrypsin	Sigma, Seelze
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, Seelze
Dithiotreitol (DTT)	Sigma, Seelze
EDTA	Sigma, Seelze
Ethanol abs.	Merck, Darmstadt
Formaldehyd (37%)	Sigma, Seelze
Glutathion, reduziert	Sigma, Seelze
Glycerol	Sigma, Seelze
β -Glycerophosphat	Sigma, Seelze
Glycin	Roth, Karlsruhe
HEPES	Sigma, Seelze
Hydroethidin (HE)	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Leupeptin	Sigma, Deisenofen
Magnesiumchlorid	Sigma, Seelze
2-Mercaptoethanol	Sigma, Seelze
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma, Seelze
Magermilchpulver	Reformhaus
Methanol	Merck, Darmstadt
Molekulargewichtsmarker (Low Range)	Bio-Rad, München
4-Nitrophenylphosphat	Sigma, Seelze
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdeoxycholat	Sigma, Seelze
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Bio-Rad, München
Natriumfluorid	Sigma, Seelze
Natriumorthovanadat	Sigma, Seelze
Nonident P40	Boehringer Mannheim
Pepstatin A	Sigma, Seelze
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Seelze
meta-Phosphorsäure	Fluka, Seelze
2-Propanol (Isopropanol)	Merck, Darmstadt
Propidiumjodid (PI)	Sigma, Seelze

RNase A	Boehringer Mannheim
Saponin	Sigma, Seelze
Salzsäure (37%)	Merck, Darmstadt
SYBR Green I	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Tetramethylethylenediamin (TEMED)	Bio-Rad, München
Tris pur	Biomol, Hamburg
Tris-HCl	Serva, Heidelberg
Triton X-100	Sigma, Seelze
Trypanblau	Sigma, Seelze
Tween 20	Bio-Rad, München

Testsubstanzen

2-Cyclopenten-1-on	Fluka, Seelze
Fettsäuren	Cayman Chemicals
Arachidonsäure (AA)	über
Docosahexaensäure (DHA)	Alexis Deutschland,
Linolsäure (LA)	Grünberg
Ölsäure (OA)	
4-Hydroxynonenal	Cayman Chemicals
Prostaglandine	Cayman Chemicals
15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin A ₁ (15d-PGA ₁)	
15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin A ₂ (15d-PGA ₂)	
15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin D ₂ (15d-PGD ₂)	
15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J ₂ (15d-PGJ ₂)	
9,10-dehydro-15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J ₂ (9,10-J ₂)	
Prostaglandin D ₂ (PGD ₂)	

Antikörper für Western Blot und Durchflusszytometrie

Die Antikörper wurden bei 4°C aufbewahrt, Antikörper von Cell Signaling bei -20°C. Die Verdünnung der Primär- sowie Sekundärantikörper erfolgte in 5% Milch. Polyklonale Antikörper von Cell Signaling mit Ausnahme des Caspase-3-Antikörpers wurden in 1% BSA in TBS/T verdünnt.

Western Blot

<i>Primärantikörper</i>		Inkubationsdauer	Temperatur	Verdünnung
p-Akt	Cell Signaling	üN	4°C	1:1000
p-c-jun	Santa Cruz	üN	4°C	1:500
p-ERK	Santa Cruz	üN	4°C	1:500
p-I κ B α	Cell Signaling	üN	4°C	1:2000
p-p38	Cell Signaling	üN	4°C	1:1000
Akt	Cell Signaling	üN	4°C	1:1000

4 Material und Methoden

β -Aktin	Sigma	1 h	RT	1:5000
Caspase-3	Cell Signaling	üN	4°C	1:1000
ERK	Santa Cruz	1 h	RT	1:1000
I κ B α	Santa Cruz	1 h	RT	1:1000
p38	Santa Cruz	1 h	RT	1:1000
PARP	Santa Cruz	1 h	RT	1:1000
Sekundärantikörper		beide 1 h bei RT; 1:2000		
goat anti-rabbit IgG-HRP		Cell Signaling		
goat anti-mouse IgG-HRP		Amersham		

Die Antikörper für die Durchflusszytometrie wurden in PBS +/+ mit 1% FCS verdünnt.

Durchflusszytometrie

Primärantikörper		Inkubations- dauer	Temperatur	Verdünnung
Caspase-3	Pharmingen	45 min	4°C	1:40
Sekundärantikörper		45 min bei 4°C; 1:100		
goat anti-rabbit IgG-FITC		Santa Cruz		

4.2 Medien und Lösungen

Medien, Lösungen und Puffer

Collagen G	Biochrom, Berlin
Endothelial Cell Growth Medium (ECGM)	PromoCell, Heidelberg
Fötale Kälberserum (FCS)	Sigma, Seelze
Phenolrotfreies DMEM/F-12	Gibco, Karlsruhe
Phosphat gepufferte Salzlösungen (PBS):	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
PBS ohne Calcium und Magnesium (PBS -/-)	
PBS mit Calcium und Magnesium (PBS +/+)	
Trypsin-EDTA (1X)	Sigma, Seelze

Sofern nicht anders angegeben, wurden die Lösungen mit aqua bidest. als Lösungsmittel hergestellt.

Lösungen für die Durchflusszytometrie

Bindungspuffer		PI-Lösung	in PBS +/+
HEPES	10 mM	Triton X-100	0,1%
NaCl	140 mM	RNase A	10 μ g/ml
CaCl ₂	2,5 mM	PI	20 μ g/ml
Lagerung: 4°C		Lagerung: 4°C	

Lösungen für die Proteinextraktion

Gesamtproteinextraktion

Für die Gesamtextraktion wurden zwei verschiedene Puffer verwendet:

- Lysepuffer A erhält die Enzymaktivität. Kurz vor Verwendung wurden verschiedene Zusätze und Inhibitoren zugegeben.
- Lysepuffer B wurde speziell für den Nachweis phosphorylierter Proteine verwendet.

Lysepuffer A		Zusätze			
HEPES	25 mM	β -Glycerophosphat	20 mM	Leupeptin	2,5 μ g/ml
NaCl	300 mM	Benzamidin	10 mM	Pepstatin	1,7 μ g/ml
MgCl ₂	1,5 mM	PNPP	10 mM	Aprotinin	20 μ g/ml
EDTA	0,2 mM	Natriumorthovanadat	0,3 mM	PMSF	1 mM
Triton X-100	0,5%	DTT	2 mM		
Glycerol	10%				
Lagerung: 4°C		Lagerung: -20°C			

Lysepuffer B

Tris-HCl	50 mM	EDTA	2 mM
Natriumdeoxycholat	1%	DTT	1 mM
NaF	50 mM	SDS	0,1%
Natriumorthovanadat	5 mM	PMSF	1 mM
NaCl	150 mM	Aprotinin	40 μ g/ml
Triton X-100	1%		
Lagerung: 4°C			

Puffer für die Proteinextraktion aus Zytosol und Nukleus

Hypotonischer Puffer		Lysepuffer	
HEPES	10 mM	HEPES	10 mM
KCl	10 mM	KCl	10 mM
MgCl ₂	1,5 mM	MgCl ₂	1,5 mM
PMSF	1 mM	Nonident P40	0,4%
Proteaseinhibitormix		Proteaseinhibitormix	
Lagerung: 4°C		Lagerung: 4°C	

KCl-Puffer für die Extraktion nukleärer Proteine

	0,6 M KCl-Puffer	0,02 M KCl-Puffer
HEPES	20 mM	20 mM
KCl	0,6 M	0,02 mM
MgCl ₂	1,5 mM	1,5 mM
Glycerol	22%	22%
EDTA	0,2 mM	0,2 mM
Proteaseinhibitormix		
Lagerung: 4°C		

4 Material und Methoden

Lösungen und Gele für SDS-PAGE

Tris-Lösungen	Lower Tris	Upper Tris
Tris	90,9 g	6,06 g
20% SDS	10 ml	2 ml
mit aqua bidest. auffüllen auf:	500 ml	100 ml
pH mit konz. HCl einstellen auf:	8,8	6,8
Lagerung: 4°C		Lagerung: 4°C

Probepuffer	für 10 ml
Upper Tris	5,0 ml
Glycerol	2,0 ml
SDS	0,8 g
0,5% Bromphenolblau	1,0 ml
Lagerung: -20°C	

Gele	Trenngel		Sammelgel
	10%	15%	3%
aqua bidest.	4,1 ml	3,1 ml	2,5 ml
Lower Tris	2,5 ml	2,5 ml	-
Upper Tris	-	-	1,25 ml
Acrylamid	3,33 ml	4,33 ml	0,5 ml
APS	60,0 µl	60 µl	30,0 µl
TEMED	3,75 µl	3,75 µl	5,0 µl
Aufbewahrung fertiger Gele: 4°C; max. 1 Woche			Lagerung: 4°C

10X Elektrophoresepuffer	für 2 l	Transferpuffer	für 1 l
Tris	60 g	Tris	3,03 g
Glycin	288 g	Glycin	14,4 g
20% SDS	100 ml	Methanol	200 ml
Lagerung: RT		bei 4°C kühlen	

Lösungen für den Western Blot

Tris-gepufferte Kochsalzlösung TBS/T	
Tris	10 mM
NaCl	167 mM
Tween 20	0,1%
Lagerung: RT	

Lösungen für die Antikörper			
Milch		BSA-Lösung	
Magermilchpulver	5%	BSA	1%
in TBS/T		in TBS/T	
Lagerung: 4°C			

4.3 Kultur primärer Endothelzellen aus Nabelschnurvenen

Isolation

Humane Endothelzellen wurden aus Nabelschnurvenen in Anlehnung an die Methode von [Jaffe et al. \(1973\)](#) isoliert. Die Nabelschnüre wurden bis zur Präparation bei 4°C aufbewahrt. Die Präparation erfolgte nach einer Kürzung beider Nabelschnurenden um ca. 1 cm durch Einführen einer Kanüle in die Vene. Mittels zweier Arterienklemmen wurde ein Ende um die Kanüle verschlossen und die Nabelschnur vertikal aufgehängt. Über einen Sterilfilter wurde die Vene mit PBS ++ von Blutresten gereinigt und mit α -Chymotrypsin gespült. Zur enzymatischen Ablösung wurde die Vene am unteren Ende verschlossen, mit α -Chymotrypsin gefüllt und für 20 min bei 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden mittels Zentrifugation pelletiert und in eine kollagenisierte Zellkulturflasche in 10 ml ECGM kultiviert. Nach 3-5 h wurden nicht adhärenente Zellen und Erythrozyten durch Spülen entfernt und frisches Medium zugegeben. Die weitere Kultur erfolgte wie unten beschrieben.

Kultivierung und Passage

Die isolierten Zellen waren in der Regel nach 7-9 Tagen konfluent und wurden im Verhältnis von 1:4 bzw. 1:5 passagiert. Hierzu wurden die Zellen zwei Mal mit PBS -/- gewaschen und mit Trypsin/EDTA-Lösung bedeckt. Das Ablösen der Zellen wurde mikroskopisch überprüft, die Zellen in ein 50 ml Röhrchen überführt und abzentrifugiert (5 min bei 1000 U/min, RT). Das Zellpellet wurde in vorgewärmten ECGM resuspendiert und auf bereits kollagenisierte Flaschen verteilt. Die Zellen wurden in der Regel nach Erreichen der Konfluenz in Passage 2 verwendet.

4.4 Bestimmung von Zellzahl und -vitalität

4.4.1 Trypanblau-Ausschlußtest

Der Trypanblau-Ausschlußtest stellt eine einfache und schnelle Methode dar, um vitale von nicht vitalen, membrangeschädigten Zellen zu unterscheiden und gleichzeitig die Zellzahl zu ermitteln. Der Farbstoff Trypanblau kann nicht in Zellen mit intakter Membran eindringen, diese Zellen bleiben ungefärbt, während er durch geschädigte Plasmamembranen diffundiert. Tote Zellen erscheinen daher lichtmikroskopisch blau-violett. Dazu wurden jeweils 50 μ l Trypanblau-Lösung mit dem gleichen Volumen Zellsuspension gemischt und einige Tropfen in eine Neubauerzählkammer pipettiert. Die Auswertung erfolgte an einem Lichtmikroskop. Es wurden vier Großquadrate mit je sechzehn Kleinquadraten ausgezählt.

4.4.2 MTT-Test

Der MTT-Test ist eine einfache Methode zur Erfassung der Zellvitalität. Der gelbe Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) wird durch die mitochondriale Dehydrogenase zu Formazin umgesetzt. Formazin formt blau-violette Kristalle in den Zellen, die durch Lyse der Zellen freigesetzt und photometrisch gemessen werden.

Die Zellen wurden dazu in einer 24-Well-Platte ausplattiert und nach Behandlung für 2 h in phenolrotfreiem DMEM mit 0,5% FCS und 0,5 mg/ml MTT bei 37°C inkubiert. Das Medium wurde vorsichtig entfernt und die Zellen in 0,04 M HCl-Isopropanol lysiert. Die Messung erfolgte in einer Mikrotiterplatte bei 570 nm mit einer Referenzmessung bei 690 nm. Die Veränderung der mitochondrialen Aktivität wurde in Prozent der Kontrolle angegeben.

4.5 Durchflusszytometrie

4.5.1 Prinzip

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Erfassung verschiedener physikalischer Parameter von Zellen, während diese in einem Flüssigkeitsstrom einen Laserstrahl passieren. Als Parameter werden neben der relativen Partikelgröße und relativen Granularität auch die relative Fluoreszenzintensität erfaßt. Die Entwicklung geeigneter, mit einem fluoreszierenden Farbstoff gekoppelter Antikörper ermöglicht die Detektion sowohl von Oberflächenmolekülen als auch den Nachweis intrazellulärer Proteine.

Die Messungen wurden an einem FACScan der Firma Becton Dickinson durchgeführt. Die zu analysierende Zellpopulation wurde durch die Parameter Partikelgröße sowie Granularität identifiziert und zur Messung der Fluoreszenzeigenschaften herangezogen. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung der *Cell Quest* Software. Die Analyse der Annexin V-positiven Zellen erfolgte in der *dot blot*-Darstellung durch Einteilung der drei verschiedenen Populationen in Quadranten (Abb. 4.1A). Sowohl der subG1-Peak (Abb. 4.1B) als auch der Prozentsatz der aktiven Caspase-3 (Abb. 4.1C) wurden durch Setzen eines Markers auf die positive Population in *histogram blots* analysiert.

4.5.2 Bestimmung der Apoptose

4.5.2.1 Annexin V-Färbung

Die Verwendung von FITC-gekoppeltem Annexin V beruht auf der hochspezifischen Bindung des Proteins Annexin V an das Phospholipid Phosphatidylserin. Dieses Phospholipid befindet sich in gesunden Zellen ausschließlich auf der Innenseite der Plasmamembran. In einem frühen Stadium der Apoptose kommt es zu einer Translokation des Phosphatidylserins an die Außenseite der Membran, wo es mittels Annexin V-FITC detektiert werden kann. Um ein Signal durch membrangeschädigte Zellen zu vermeiden, wurde eine Doppelfärbung mit Propidiumjodid (PI) durchgeführt. PI ist eine Substanz, die durch Interkalation in die DNA fluoresziert, aber in Zellen mit einer intakten Plasmamembran nicht eindringen kann. Apoptotische Zellen sind daher die Zellen, die Annexin V-positiv, aber PI-negativ sind, während es sich bei PI-positiven Zellen um nekrotische oder sekundär nekrotische Zellen handelt.

Für die Durchführung der Annexin V-Färbung wurden die Zellen nach Behandlung mit der Testsubstanz unter Verwendung von Trypsin/EDTA geerntet (vgl. Kapitel 4.3). Wichtig war die Beachtung einer kurzen Verweilzeit des Trypsins auf den Zellen, um eine Schädigung der Plasmamembran zu vermeiden. Die Zellen wurden mit Annexin V-FITC in Bindungspuffer sowie PI-Lösung für 30 min bei 37°C inkubiert und danach im FACScan analysiert.

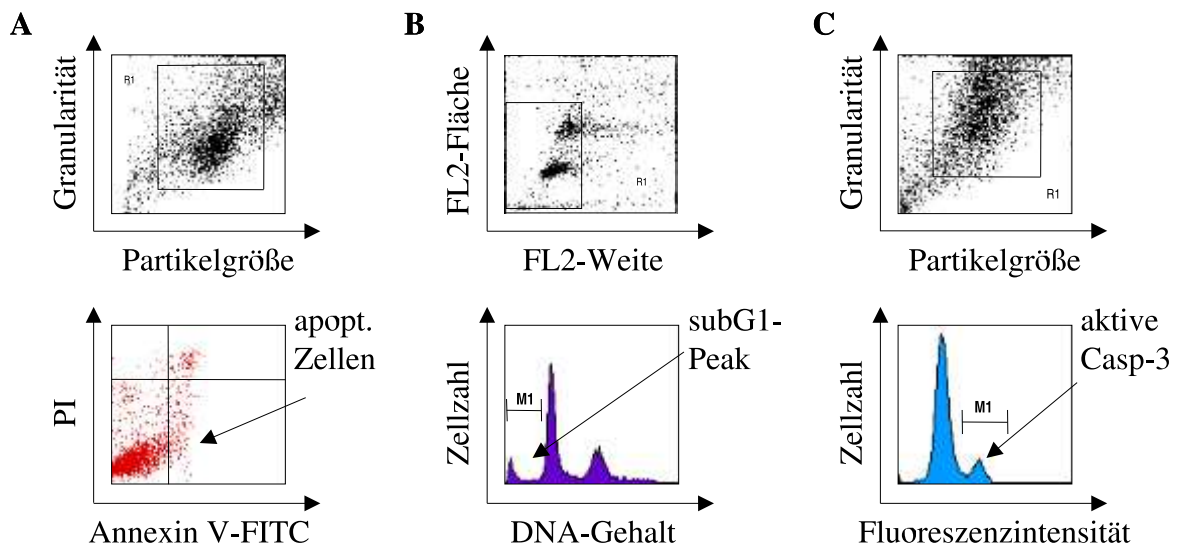


Abbildung 4.1: Auswertung der FACS-Messungen - Beispiele. **A** *Dot blot*-Auswertung der Annexin V-positiven/ PI-negativen Zellen. **B** Ermittlung des subG1-Peaks in der *histogram blot*-Darstellung. **C** Aktive Caspase-3 wurde durch Setzen eines Markers (M1) in der *histogram blot*-Analyse quantifiziert.

4.5.2.2 Bestimmung der DNA-Fragmentierung

Die Fragmentierung der DNA stellt ein typisches Merkmal apoptotischer Zellen dar. Während eines späten Stadiums der Apoptose kommt es zur Degradierung der DNA durch Caspase-aktivierte DNasen und der Entstehung charakteristischer, 200 bp großer DNA-Fragmente. Durch Färbung der DNA mittels PI kann diese Degradierung im Durchflusszytometer gemessen werden.

Dazu wurden die Zellen geerntet (vgl. Kapitel 4.3) und in eiskaltem Methanol für mindestens 30 min bei 4°C fixiert und permeabilisiert. Nach einem Waschschrift zur Entfernung des Methanols wurden die Zellen für 1 h bei 37°C mit PI-Lösung inkubiert und anschließend im FACScan analysiert.

4.5.2.3 Messung der Caspase-3-Aktivierung

Die Caspase-3 gehört zu den Cystein-Aspartat-Proteasen, die während der Apoptose aktiviert werden. In gesunden Zellen liegt das Enzym als inaktives Protein vor und wird durch Abspaltung der Prodomäne aktiviert. Die Bestimmung der Caspase-3-Aktivierung gehört zu den klassischen Apoptoseparametern. Sie kann unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers und anschließender durchflusszytometrischer Analyse bestimmt werden.

Dazu wurden Zellen nach Behandlung geerntet und auf eine Mikrotiterplatte verteilt. Die Fixierung der Zellen erfolgte in 1% Formalin für 10 min bei 4°C. Nach zweimaligem Waschen mit PBS++ (1% FCS) wurden die Zellen in 1% Saponin in PBS-/- (2% FCS) permeabilisiert. Vor Inkubation des Primärantikörpers wurde erneut zweimal gewaschen. Die Zellen wurden 45 min mit dem Primärantikörper bei 4°C inkubiert und erneut zweimal gewaschen. Der Sekundäranti-

körper wurde wie der Primärantikörper verwendet. Danach erfolgte die durchflusszytometrische Analyse der aktiven Caspase-3 im FACScan.

Daneben besteht die Möglichkeit, die Aktivierung der Caspase-3 durch Messung der Spaltung der Procaspase in die aktive Caspase oder die Spaltung eines Zielproteins der Caspase zu erfassen. Die Poly(ADP-ribose)Polymerase (PARP) ist ein solches Zielprotein und die Detektion ihrer Spaltung eine häufig verwendete Methode des Nachweises einer Caspase-3-Aktivierung.

Sowohl die Bestimmung der 17 kDa großen aktiven Caspase-3 als auch der PARP-Spaltung erfolgte im Western Blot (vgl. Kapitel 4.7.4). Die verwendeten Antikörper können sowohl die Procaspase-3 oder das intakte PARP-Protein als auch die jeweiligen Spaltprodukte detektieren.

4.5.3 Detektion reaktiver Sauerstoffspezies

Reaktive Sauerstoffspezies wurden mit Hilfe eines für Superoxidanionen empfindlichen Farbstoffs, Hydroethidin, gemessen. Hydroethidin wird durch Superoxidanionen gespalten. Das entstehende Ethidium, welches sich als interkalierende Substanz in die DNA einlagert und dann fluoresziert, kann im FACScan detektiert werden.

Die Messung der Superoxidanionenproduktion wurde parallel zur Annexin V-Messung durchgeführt. Nach der Ernte wurde dazu ein Teil der Zellen mit 2 μ M Hydroethidin für 15 min im Brutschrank inkubiert und im Anschluss sofort im FACScan analysiert.

4.6 Molekularbiologische Methoden

4.6.1 Real-time RT-PCR

4.6.1.1 Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion und der Reversen Transkriptase

Das Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*=PCR) beruht auf der Amplifikation des nachzuweisenden Gens mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase. Diese amplifiziert unter Verwendung spezifischer Oligonukleotide (Primer), Puffer und Nukleotide das nachzuweisende Gen in einer PCR-Maschine. Der Reaktionsansatz durchläuft dabei eine bestimmte Anzahl von Zyklen, die aus einem Denaturierungsschritt zum Trennen der DNA-Doppelstränge, einem Annealingschritt bei dem die Primer an die DNA binden und einem Elongationsschritt besteht. Im letzten Schritt werden die Primer von der DNA-Polymerase verlängert, bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt, die dem Ausgangsmaterial exakt gleicht.

Die real-time RT-PCR wurde in einem iCycler von Bio-Rad unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green I durchgeführt. SYBR Green I fluoresziert nach Interkalation in doppelsträngige DNA. Die Emission bei 480 nm wurde mittels einer CCD-Kamera gemessen.

Für den Nachweis von mRNA-Transkripten wurde vor der Durchführung der PCR aus der isolierten RNA mit Hilfe der reversen Transkriptase die für die eigentliche PCR notwendige cDNA synthetisiert. Als Primer wurden hierfür Hexamere verwendet. Beide Schritte wurden im gleichen Reaktionsansatz durchgeführt. Die eigentliche PCR wurde nach einer 30-minütigen reversen Transkription bei 42°C durchgeführt.

4.6.1.2 RNA-Isolierung und DNase

HUVECs wurden in Petrischalen ausgesät und nach Erreichen der Konfluenz für 4 h mit 20 μ M AA bzw. DHA behandelt. Die Zellen wurden durch Abkratzen geerntet, in ein 15 ml-Röhrchen überführt und abzentrifugiert (5 min bei 1000 U/min; 4°C).

Die weitere RNA-Isolierung erfolgte unter Verwendung des AquaPure RNA Isolation Kit der Firma BioRad und wurde gemäß dem beiliegenden Protokoll durchgeführt. Die RNA wurde in 80 μ l Hydrationslösung gelöst und bis zum DNA-Verdau bei -20°C aufbewahrt.

Der enzymatische Verdau verbliebener DNA-Reste erfolgte durch den RQ1 RNase-free DNase Kit von Promega. Im Anschluss wurde die RNA-Konzentration in einem GeneQuant II-Gerät durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt. Die RNA-Lösung wurde dazu 1:20 mit DEPC-Wasser verdünnt. Die RNA wurde bis zur Verwendung in der PCR bei -80°C gelagert.

4.6.1.3 Spezifische Oligonucleotide, Parameter für die RT-PCR und Auswertung

Für die Bestimmung der IAP-1 mRNA Expression wurden folgende Oligonukleotide als Primer verwendet:

IAP-1 (Gordon et al. 2002)	vorwärts	5'-TGT TGG GAA TCT GGA GAT GA-3'
	rückwärts	5'-CGG ATG AAC TCC TGT CCT TT-3'
β -Aktin	vorwärts	5'-AGA GAT GGC CAC GGC TGC TT-3'
	rückwärts	5'-ATT TGC GGT GGA CGA TGG AG-3'

Für die Durchführung wurden Ready-To-GoTM RT-PCR Beads der Firma Amersham Biosciences verwendet, die in lyophilisierter Form bereits die *Taq* DNA-Polymerase, dNTPs sowie die Moloney Murine Leukemia Virus (M-MuLV) Reverse Transkriptase enthalten. Die Beads wurden in DEPC-Wasser gelöst und pd(N)₆ für die reverse Transkription, Primer, Magnesium und SYBR Green I zugesetzt. Die Konzentrationen der einzelnen Bestandteile sind in Tabelle 4.5 zusammengefasst. Die Amplifikation wurde für die IAP-1 mRNA sowie das *Housekeeping*-Gen, β -Aktin, optimiert. Das Protokoll ist in Tabelle 4.6 dargestellt.

Die anschließende Messung der Schmelzkurve diente der Identifikation der spezifischen Spitzen („peaks“) sowohl der IAP-1 als auch der β -Aktin mRNA.

Die Auswertung erfolgte nach Abschluss der Amplifikation durch Abzug der Basiszyklen und die Bestimmung der Ct-Werte. Die relative Expression der IAP-1 mRNA wurde wie folgt berechnet:

$$\Delta Ct = Ct (IAP-1) - Ct (\beta\text{-Aktin})$$

$$\Delta (\Delta Ct) = \Delta Ct (\text{Behandlung}) - \Delta Ct (\text{Kontrolle})$$

4 Material und Methoden

Substanz	Konzentration
Taq DNA-Polymerase	~ 2 Einheiten
dNTPs	200 μ M
Reverse Transkriptase	keine Angabe
Tris-HCl	10 mM
KCl	60 mM
Magnesium	2,5 mM
pd(N) ₆	2,5 μ g
Primer	150 nM
SYBR Green I	0,1 X
RNA	100 ng
Endvolumen: 50 μ l	

Tabelle 4.5: Optimierte Zusammensetzung des Reaktionsansatzes

	Zeit	Temp.
reverse Transkription	30 min	42°C
Zyklen: 45		
Denaturierung	20 sec	95°C
Annealing	30 sec	60°C
Elongation	20 sec	72°C
finale Elongation	10 min	42°C

Tabelle 4.6: Protokoll der real-time RT-PCR

4.6.2 TransAMTM Transcription Factor Assay Kits

Die Verwendung des *TransAMTM Transcription Factor Assay Kits* bietet eine einfache und schnelle Möglichkeit, Ergebnisse aus einem *electrophoretic mobility shift assay* zu verifizieren und zu quantifizieren. Daneben stellt der Kit als nicht-radioaktive Methode eine elegante Alternative für den *electrophoretic mobility shift assay* dar.

Die Versuche wurden gemäß der beiliegenden Anleitung durchgeführt. Die Methode beruht auf der Immobilisierung der spezifischen Oligonukleotide in Mikrotiterplatten. Gebundene und damit aktivierte Transkriptionsfaktoren wurden mit Hilfe spezifischer Antikörper markiert. Die Detektion erfolgte durch einen HRP-gekoppelten Sekundärantikörper als kolorimetrische Reaktion, deren Endprodukte bei 450 nm sowie einer Referenzmessung bei 690 nm im Mikrotiterplattenreader gemessen wurden.

4.7 Proteinbiochemische Methoden

4.7.1 Extraktion von Gesamtprotein

HUVECs wurden in Petrischalen ausgesät und nach Erreichen der Konfluenz mit den Testsubstanzen inkubiert. Die Ernte erfolgte durch Abschaben und Überführung in ein gekühltes 15 ml-Röhrchen. Das durch Zentrifugation (5 min bei 1000 U/min; RT) gewonnene Zellpellet wurde in 1 ml eiskaltem PBS +/- resuspendiert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und erneut abzentrifugiert (1 min bei 2000 g, 4°C). Für die Zellyse wurden die Zellpellets in 200-300 μ l Lysepuffer A oder B kräftig resuspendiert und anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. Die Proteine wurden durch Zentrifugieren (10 min bei 14.000 U/min; 4°C) von Membranresten getrennt und in neue Reaktionsgefäße überführt. Die Aufbewahrung der Proteinextrakte erfolgte bei -80°C.

4.7.2 Extraktion von Protein aus Zytosol und Nukleus

Für die Proteinextraktion aus Zytosol und Nukleus wurden in der Regel Zellen aus zwei Petrischalen pro Ansatz verwendet. Bei nur einer Petrischale pro Ansatz wurden die Puffermengen halbiert. Die Ernte erfolgte analog zur Gesamtextraktion (vgl. Kapitel 4.7.1). Die Zellen wurden in 100 μl hypotonischem Puffer gewaschen, abzentrifugiert (1 min bei 2000 g, 4°C), in 300 μl Lysepuffer über einen Reaktionsgefäßständer gezogen und für 10 min auf Eis inkubiert. Die zytosolischen Proteine wurden nach Abzentrifugieren (1 min bei 8000 g, 4°C) als Überstand gewonnen und in neue Reaktionsgefäße überführt. Die verbliebenen Pellets wurden in je 1 ml 0,02 M KCl Puffer für 15 min auf Eis inkubiert, um das Glycerol in die Pellets eindringen zu lassen. Nach erneutem Abzentrifugieren (1 min bei 8000 g, 4°C) wurde der Überstand vollständig verworfen und jedes Pellet in 80 μl 0,3 M KCl-Puffer (41 μl 0,02 M + 39 μl 0,6 M KCl-Puffer) durch Vortexen resuspendiert. Anschließend wurde 30-60 min auf Eis inkubiert, die nukleären Extrakte durch Zentrifugation (15 min bei 8000 g, 4°C) gewonnen und ebenfalls in neue Reaktionsgefäße überführt. Alle Extrakte wurden bei -80°C aufbewahrt.

4.7.3 Messung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Bio-Rad DC Protein Assay bestimmt. Die Eichgerade wurde unter Verwendung des jeweiligen Lysepuffers aus einer BSA-Stammlösung mit der Konzentration von 50 mg/ml hergestellt. Sowohl für die Proben als auch die Eichgerade wurden Doppelwerte bestimmt. Die Durchführung erfolgte gemäß dem beiliegenden Protokoll unter Verwendung von je 5 μl Probe bzw. Standard in einer Mikrotiterplatte. Der fertige Ansatz wurde für 15 min bei RT inkubiert und die Absorption bei 690 nm im Photometer gemessen. Die Eichgerade diente zur Berechnung der Proteinkonzentration.

4.7.4 Nachweis von Proteinen mittels SDS-PAGE und Western Blot

Die elektrophoretische Trennung von Proteingemischen in einem SDS-Gel, das Blotten auf eine Membran sowie die anschließende Detektion der Proteine mit spezifischen Antikörpern, der Western Blot, gehört zu den klassischen Methoden der Proteinanalyse. Man macht sich dabei die Tatsache zu Nutze, dass die meisten Proteine an die Seife SDS (Sodiumdodecylsulfat) binden und damit negativ geladene SDS-Protein-Komplexe bilden. Daneben denaturiert SDS die Proteine und verhindert Protein-Protein-Interaktionen, so dass sich die SDS-Protein-Komplexe alleine durch ihre Größe unterscheiden und während der Elektrophorese zum Pluspol wandern. Die poröse Polyacrylamidmatrix trennt dabei die Proteine wie ein Molekularsieb nach ihrem Molekulargewicht auf. Nach dem „Blotten“ auf eine Nitrozellulosemembran können die Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen werden.

Elektrophorese und Transfer

Für die Auftrennung der Proteingemische wurden 10 % (15 %) Trenngele verwendet, die eine gute Auftrennung von Proteinen mit einem Molekulargewicht im Bereich von 30-120 kDa (10-60 kDa) ermöglichen. Die Proteinextrakte wurden durch Zusatz von Probepuffer im Verhältnis 1:5, sowie einem 5-10-minütigem Kochen bei 90°C vorbereitet. In der Regel wurden

4 Material und Methoden

20-30 μg Protein in jede Geltasche pipettiert. Ein vorgefärbter Molekulargewichtsmarker wurde zur Kontrolle der Elektrophorese und des Transfers verwendet. Die Elektrophorese wurde in einer Mini-PROTEAN 3 Elektrophoresekammer, einem vertikalen System für den parallelen Lauf zweier Gele, bei 200 V für etwa 45 min bei RT durchgeführt.

Im Anschluss wurden die Proteine in einer Mini Trans-Blot Kammer auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Transfer erfolgte bei 100 V für 1 h bei 4°C.

Western Blot

Nach dem Proteintransfer wurden die freien Bindungsstellen der Membranen durch Inkubation in Milch (1 h bei RT) abgesättigt. Die Inkubation der Membranen mit dem Primärantikörper erfolgte nach einem einmaligen Waschschrift mit TBS/T. Die Membranen wurden danach mit TBS/T gewaschen (3 x) und anschließend mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Dieser ist mit einer Peroxidase markiert, die die Oxidation von Luminol katalysiert. Für die Detektion wurden die Membranen erneut 3 x gewaschen und für ca. 1 min mit dem SuperSignal West Pico Chemilumineszenz Substrat von Pierce, einer Mischung aus Luminol und einem Peroxidpuffer, behandelt. Die entstehende Chemilumineszenz wurde über Exposition eines Films gemessen.

4.7.5 Messung des intrazellulären GSH-Gehalts

Für die Messung des GSH in HUVECs wurden diese in 25 cm² Flaschen ausgesät und behandelt. Die Ernte erfolgte routinemäßig mittels Trypsin/ETDA. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren (5 min bei 1000 U/min, RT) pelletiert und in eiskaltem PBS +/- resuspendiert. Davon wurden 50 μl für die Bestimmung der Zellzahl entnommen (vgl. Kapitel 4.4.1), die restliche Zellsuspension erneut abzentrifugiert (5 min bei 300 g, 4°C), der Überstand abgenommen und das abgenommene Volumen notiert. Pellets wurden an dieser Stelle in der Regel bei -80°C eingefroren.

Die Lyse der Zellen erfolgte in 5% meta-Phosphorsäure, die vor jedem Versuch frisch angesetzt wurde. Die Zellen wurden dazu in je 200 μl meta-Phosphorsäure resuspendiert und 20 x durch eine 27GA³/₄-Nadel gezogen. Die Lysate wurden abzentrifugiert (10 min bei 3000 g, 4°C) und die Überstände in neue 1,5 ml Reaktionsgefäße pipettiert.

Für die Messung des GSHs wurde der Glutathione Assay Kit von Calbiochem verwendet. Das Protokoll wurde für die Verwendung einer Mikrotiterplatte modifiziert. Für die quantitative Bestimmung des GSH wurde eine Eichgerade erstellt. 60 μl pro Probe bzw. Standard wurde pro Well in die Mikrotiterplatte pipettiert. Aus den im Kit vorhandenen Reagenzien wurde eine Mischung hergestellt. Dabei wurden für jede Probe je 10 μl Reagenz 1, 10 μl Reagenz 2 sowie 120 μl Puffer 3 angesetzt und insgesamt 140 μl zu jeder Probe zugegeben. Nach einer 10-minütigen Inkubation im Dunkeln bei RT erfolgte die Messung der Absorption bei 405 nm.

Die Auswertung erfolgte anhand der Eichgerade unter Berücksichtigung des Volumens und der eingesetzten Zellzahl und wurde in nmol GSH/10⁶ Zellen angegeben.

4.7.6 Statistische Auswertung

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert \pm *standard error of the mean* von mindestens drei Versuchen dargestellt und mit Hilfe des gepaarten *Student's t-Tests* oder des *Mann-Whitney-Tests* ausgewertet. Abweichungen wurden in den Bildunterschriften angegeben. Unterschiede mit einem *p*-Wert kleiner als 0,05 wurden als signifikant betrachtet.

5 Ergebnisse

5.1 Effekte von Cyclopentenon-Prostaglandinen auf HUVECs

Erste Untersuchungen mit PGs hatten gezeigt, dass die einzelnen Substanzen sich in Bezug auf ihre Effekte auf humane Endothelzellen stark unterscheiden. 15d-PGJ₂ hatte die stärksten Effekte auf die Vitalität von HUVECs (vgl. 2.3.1). Für eine Analyse der für die unterschiedliche biologische Aktivität zugrundeliegenden Ursache, wurden verschiedene PGs und strukturell eng verwandte Substanzen mit dem Hauptvertreter 15d-PGJ₂ verglichen (Abb. 2.4B).

5.1.1 Einfluss der Cyclopentenon-Prostaglandine auf die Vitalität von Endothelzellen

Zunächst wurde der Einfluss der ausgewählten Substanzen auf die Zellvitalität untersucht. Die Zellen wurden dazu für 24 h mit 10 oder 20 μ M der PGs inkubiert und die Zellzahl mittels Trypanblau-Ausschlusstest bestimmt. Außer 15d-PGJ₂ zeigte keine der getesteten Substanzen einen Einfluss auf die Zellvitalität (Abb. 5.1). Übereinstimmend zeigte die Untersuchung der mitochondrialen Aktivität mittels MTT-Test eine Reduktion durch 15d-PGJ₂. Die übrigen Substanzen zeigten auch hier keinen Effekt (Abb. 5.2).

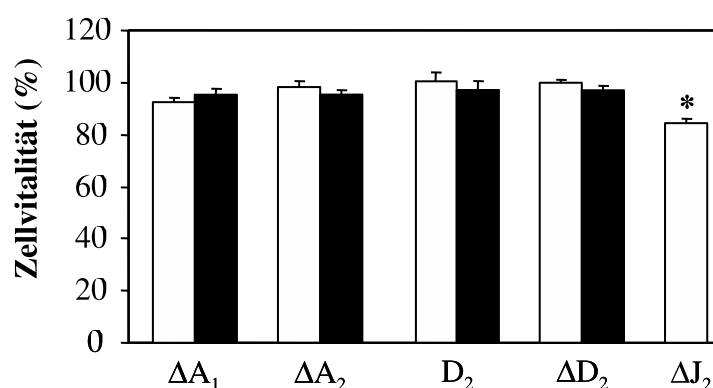


Abbildung 5.1: 15d-PGJ₂ reduziert die Zellvitalität humaner Endothelzellen. HUVECs wurden für 24 h mit 10 μ M (weiße Balken) oder 20 μ M (schwarze Balken) PGs (15d-PGA₁(ΔA_1), 15d-PGA₂(ΔA_2), PGA₂(D_2), 15d-PGD₂(ΔD_2) sowie 15d-PGJ₂ (ΔJ_2)) behandelt und die Zellvitalität mittels Trypanblau-Ausschlusstest bestimmt (n=3; *p \leq 0,05).

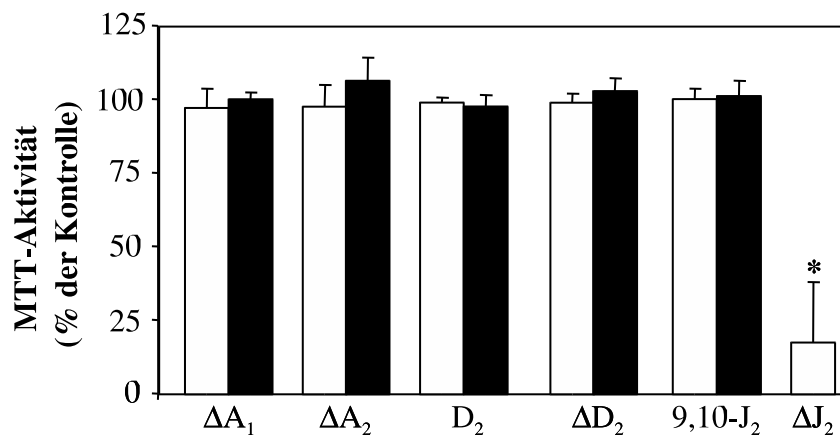


Abbildung 5.2: Effekte verschiedener Cyclopentenon-Prostaglandine auf die MTT-Aktivität in HUVECs. Die Zellen wurden für 24 h mit 10 μM (weiße Balken) oder 20 μM (schwarze Balken) PGs (vgl. Abb. 5.1) inkubiert und die mitochondriale Aktivität mittels MTT-Test bestimmt (n=3; *p \leq 0,05).

5.1.2 Apoptoseinduktion durch verschiedene Cyclopentenon-Prostaglandine in HUVECs

Als nächstes wurde der Einfluss der Testsubstanzen auf die Apoptoseinduktion in HUVECs untersucht. Der Prozentsatz der Annexin V-positiven/PI-negativen Zellen wurde als Marker für ein frühes Stadium der Apoptose gemessen. Die 15d-PGJ₂-behandelten Zellen zeigten eine erhöhte Annexin V-Bindung (Abb. 5.3A). Zusätzlich wurde ein deutlicher Anstieg der Zellen im subG1-Peak, einem Marker der späten Apoptose, detektiert (Abb. 5.3B). Im Gegensatz dazu zeigten die anderen Testsubstanzen, mit Ausnahme des PGD₂, keine erhöhte Annexin V-Bindung. Der subG1-Peak war durch keine der anderen Testsubstanzen erhöht, ein Hinweis darauf, dass sich die PGD₂-behandelten Zellen alle in einem frühen Stadium der Apoptose befanden. 9,10-J₂, ein Derivat des 15d-PGJ₂, dem im Vergleich zu 15d-PGJ₂ die Doppelbindung im Cyclopentenon-Ring fehlt, zeigte keinerlei Effekt auf die Zellvitalität oder die Apoptoseinduktion.

5.1.3 Effekte von Cyclopentenon in HUVECs

Der in den bisherigen Versuche erfolgte Vergleich von 15d-PGJ₂ mit seinem Derivat 9,10-J₂ hatte gezeigt, dass die Doppelbindung der Ringstruktur für die Effekte des 15d-PGJ₂ auf Zellvitalität und Apoptoseinduktion essentiell ist. Um den Einfluss dieser Ringstruktur genauer zu charakterisieren, wurden zusätzliche Experimente mit der Ringstruktur allein, dem Cyclopentenon, durchgeführt.

Die drei Substanzen 15d-PGJ₂, 9,10-J₂ und Cyclopentenon wurden zunächst in ihrer Wirkung auf die Zellvitalität von HUVECs im MTT-Test verglichen. Dabei wurden unterschiedliche Konzentrationen für die einzelnen Substanzen verwendet: 0,125 bis 5 μM Cyclopentenon, 5 und 10 μM 15d-PGJ₂ sowie 10 und 20 μM 9,10-J₂. Bereits 1 und 5 μM Cyclopentenon reduzierten innerhalb von 24 h die MTT-Aktivität auf nahezu 0% (Abb. 5.4).

5 Ergebnisse

In weiteren Experimenten sollte untersucht werden, ob die beobachtete leichte Reduktion der Zellvitalität durch geringere Cyclopentenon-Konzentrationen wie etwa $0,5 \mu\text{M}$ auf Induktion von Apoptose zurückzuführen ist. Der Prozentsatz apoptotischer Zellen wurde nach 24-stündiger Behandlung von HUVECs mit $0,25$ und $0,5 \mu\text{M}$ Cyclopentenon bestimmt. Wie Abb. 5.5 zeigt, induzierte Cyclopentenon konzentrationsabhängig Apoptose in humanen Endothelzellen.

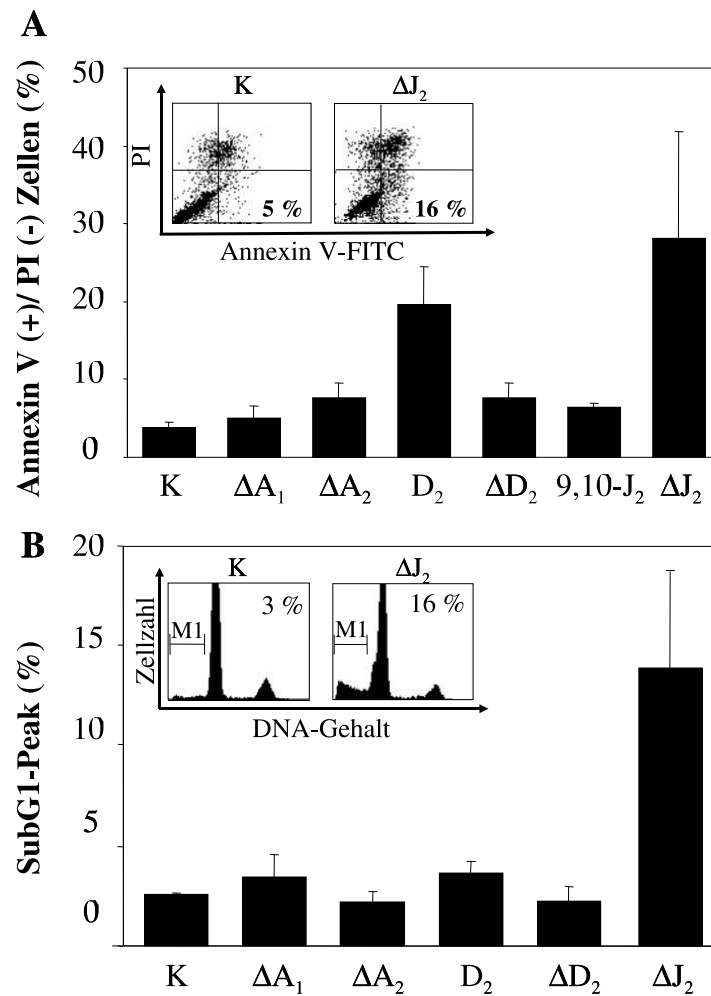


Abbildung 5.3: Einfluss verschiedener Cyclopentenon-Prostaglandine auf die Apoptoseinduktion in HUVECs. Die Zellen wurden für 24 h mit $0,1\%$ EtOH (K) oder $20 \mu\text{M}$ der verschiedenen PGs bzw. $10 \mu\text{M}$ 15d-PGJ_2 behandelt. **A** Die Analyse der apoptotischen Zellen erfolgte durch Messung der Annexin V-positiven/ PI-negativen Zellen im Durchflusszytometer (siehe Insert rechter unterer Quadrant, $n=3$). **B** Für die durchflusszytometrische Bestimmung des subG1-Peaks wurden die Zellen mit PI-Lösung gefärbt. Dargestellt ist der Prozentsatz der Zellen im subG1-Bereich (siehe Insert M1, $n=3$). * $p \leq 0,05$.

5.1 Effekte von Cyclopentenon-Prostaglandinen auf HUVECs

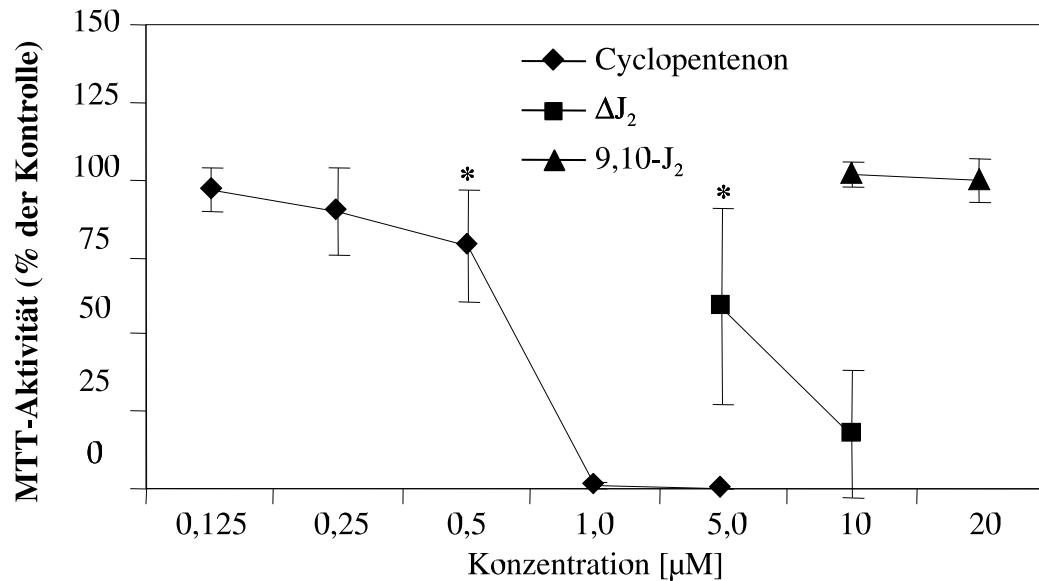


Abbildung 5.4: Vergleich der Wirkung von Cyclopentenon, 15d-PGJ₂ sowie 9,10-J₂ auf die mitochondriale Aktivität. HUVECs wurden für 24 h in den angegebenen Konzentrationen behandelt und die MTT-Aktivität bestimmt. Die Kontrolle wurde als 100% definiert (n=3; *p ≤ 0,05).

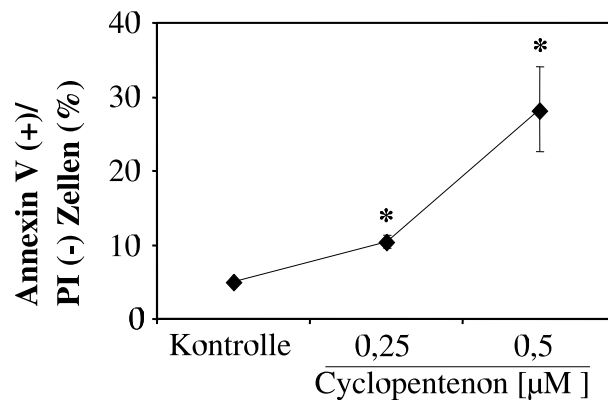


Abbildung 5.5: Cyclopentenon induziert Apoptose in HUVECs. Der Prozentsatz der Annexin V-positiven und PI-negativen Zellen wurde nach 24 h Inkubation mit 0,25 und 0,5 µM Cyclopentenon bestimmt (n=3; *p ≤ 0,05).

5.2 Apoptoseinduktion durch das Lipidperoxidationsprodukt 4-Hydroxynonenal

Als Produkt der Autoxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren konnte HNE sowohl in oxidierten LDL-Partikeln als auch arteriosklerotischen Läsionen nachgewiesen werden. In dieser Arbeit sollte HNE in seiner Wirkung auf HUVECs näher charakterisiert und eine effektive Konzentration zur Apoptoseinduktion gefunden werden.

5.2.1 Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Wirkung von HNE in Endothelzellen

5.2.1.1 Einfluss auf Zellvitalität und Zellzahl

Aufgrund der bekannten Reaktivität des HNE wurde zunächst eine Konzentrationskinetik zur Wirkung von HNE auf die Zellvitalität und Zellzahl mittels Trypanblau-Ausschlusstest durchgeführt. HNE reduzierte konzentrationsabhängig die Gesamtzellzahl, wobei nur für die Konzentrationen 10-30 μM HNE auch eine Zeitabhängigkeit bestand (Abb. 5.6A). Dagegen zeigte die Zahl der toten Zellen sowohl einen deutlichen konzentrationsabhängigen als auch einen zeitabhängigen Anstieg nach HNE-Behandlung (Abb. 5.6B). Die Inkubation mit 30-50 μM HNE führte nach 24 h zu nahezu 100% toten Zellen. Dies spiegelt sich in der Zellvitalität wider (Abb. 5.6C). HNE reduzierte in konzentrations- und zeitabhängiger Weise die Zellvitalität, wobei nach 24-stündiger Behandlung insbesondere mit 40 und 50 μM HNE die Zellvitalität auf 0% sank. Die Analyse der MTT-Aktivität mit 10-30 μM HNE über insgesamt 24 h konnte diese Ergebnisse bestätigen (Abb. 5.6D). 20 und 30 μM HNE reduzierten die mitochondriale Aktivität konzentrations- sowie zeitabhängig. 10 μM HNE zeigte dagegen nur eine transiente Reduktion der mitochondrialen Aktivität.

5.2.1.2 Apoptoseinduktion durch HNE

In einem nächsten Schritt wurde die Art des durch HNE induzierten Zelltods untersucht. HUVECs wurden für 6 h mit 10-30 μM HNE behandelt und die Apoptose unter Verwendung von Annexin V-FITC im Durchflusszytometer gemessen. Alle getesteten Konzentrationen erhöhten die Zahl der apoptotischen Zellen (Abb. 5.7A), wobei 10 und 20 μM HNE einen konzentrationsabhängigen Effekt zeigten, während 30 μM HNE keine weitere Steigerung der Zahl apoptotischer Zellen induzierte. In Abbildung 5.7B sind zwei repräsentative *dot blots* für Kontrolle und 20 μM HNE dargestellt. Die Zellen unten rechts sind Annexin V-positiv/PI-negativ, also apoptotische Zellen. Neben einer deutlichen Erhöhung der apoptotischen Zellen durch 20 μM HNE ist auch ein Anstieg der nekrotischen, PI-positiven Zellen rechts oben zu sehen.

5.2 Apoptoseinduktion durch das Lipidperoxidationsprodukt 4-Hydroxynonenal

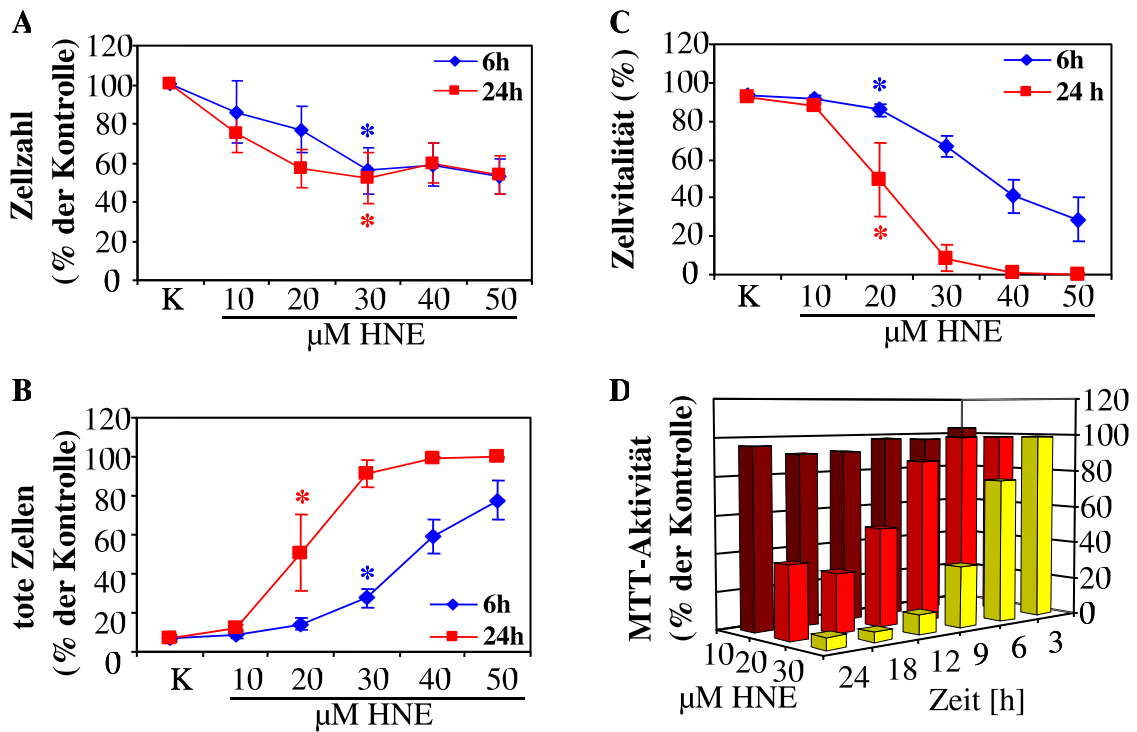


Abbildung 5.6: Zeit- und konzentrationsabhängige Wirkung von HNE auf HUVECs. **A-C** HUVECs wurden für 6 oder 24 h mit 0,1% EtOH (K) oder 10-50 μM HNE behandelt. Die Zellzahl (**A**), die Zahl der toten Zellen (**B**) sowie die Zellvitalität (**C**) wurden durch Trypanblau-Zählung ermittelt (n=4). **D** HUVECs wurden für 3-24 h mit 10-30 μM HNE behandelt und die MTT-Aktivität bestimmt (n=4). *p \leq 0,05.

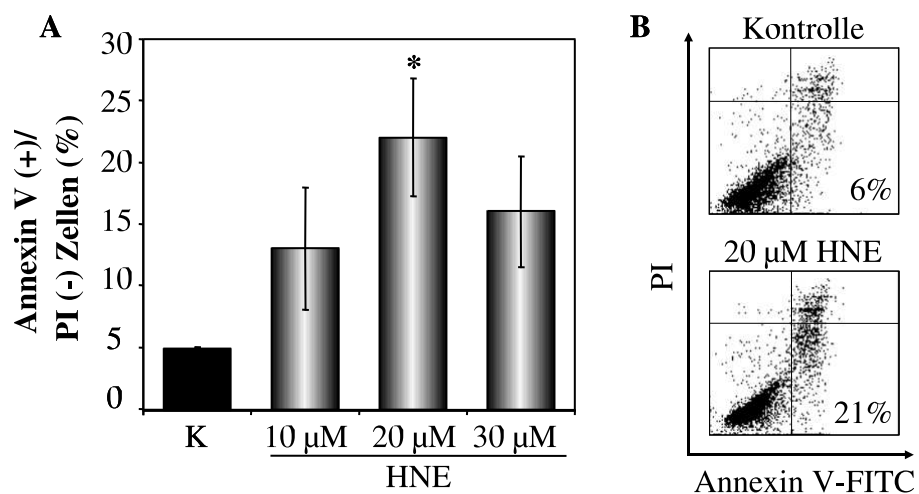


Abbildung 5.7: **A** Konzentrationsabhängige Apoptoseinduktion durch HNE. HUVECs wurden für 6 h mit 0,1% EtOH (K) oder 10-30 μM HNE behandelt und die Zahl der Annexin V-positiven/PI-negativen Zellen im Durchflusszytometer analysiert (n=3; *p \leq 0,05). **B** Auf der rechten Seite sind repräsentative *dot blots* für Kontrolle und 20 μM HNE dargestellt.

5.2.1.3 Aktivierung von Caspasen

Zur Verifizierung der Apoptoseinduktion durch HNE in humanen Endothelzellen wurde die Caspase-3-Aktivierung bestimmt. Diese zählt zu den klassischen Merkmalen der Apoptose und kann sowohl direkt im Durchflusszytometer gemessen werden als auch indirekt durch Bestimmung der Spaltung eines Zielproteins, wie etwa PARP. Für diese sowie die nachfolgenden Untersuchungen wurden HUVECs mit 20 μ M HNE behandelt. Zunächst wurde die PARP-Spaltung durch Western Blot Analyse nach 3-24 h HNE-Behandlung bestimmt. Die Behandlung mit HNE führte sehr rasch zur Apoptoseinduktion in HUVECs (Abb. 5.8A). Bereits nach 3 h war das 85 kDa große Spaltprodukt des PARP nachweisbar. Nach 6 h war das intakte PARP stark reduziert, ein Spaltprodukt aber noch zu sehen, während nach 12 und 24 h praktisch kein PARP mehr detektiert werden konnte.

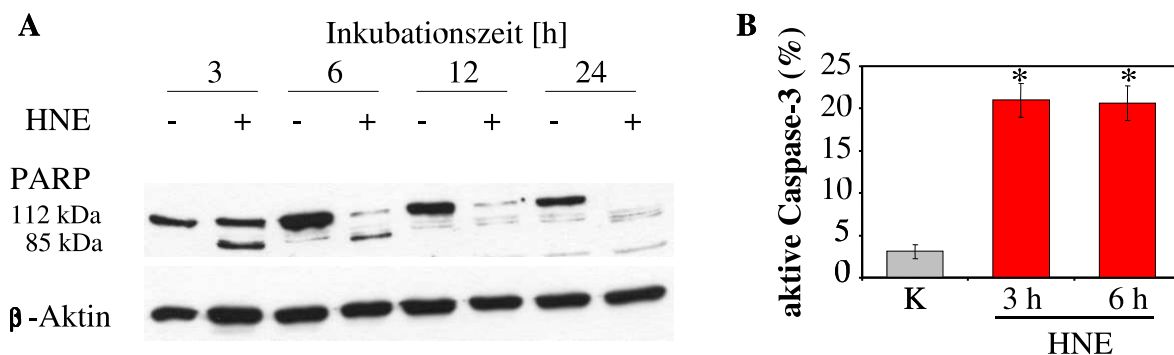


Abbildung 5.8: HNE aktiviert Caspase-3. **A** HUVECs wurden für 3-24 h mit 20 μ M HNE behandelt und das Gesamtprotein extrahiert. Der Nachweis der PARP-Spaltung erfolgte im Western Blot. Ein repräsentativer Blot aus drei Versuchen ist dargestellt. **B** Direkte Messung der aktiven Caspase-3 im Durchflusszytometer nach 3- und 6-stündiger Behandlung der Zellen mit 20 μ M HNE (n=3; *p \leq 0,05).

Dieses Ergebnis wurde durch Messung der aktiven Caspase-3 mit einem spezifischen Antikörper im Durchflusszytometer überprüft (Abb. 5.8B). HUVECs wurden für 3 und 6 h mit 20 μ M HNE behandelt und im Durchflusszytometer analysiert. Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung der aktiven Caspase-3 von $3,1 \pm 0,8\%$ auf $22,0 \pm 2,9\%$ nach 3 h und $20,6 \pm 2,0\%$ nach 6 h.

5.2.2 Effekte von HNE auf die ROS-Produktion sowie den intrazellulären Glutathiongehalt

Durch seine chemisch reaktiven Gruppen ist HNE in der Lage, mit wichtigen Zellbestandteilen zu reagieren und damit das zelluläre Redoxgleichgewicht zu beeinflussen. Für eine nähere Charakterisierung der Induktion von oxidativem Stress in HUVECs wurde eine Analyse der Superoxidanionenproduktion im Durchflusszytometer durch Hydroethidinfärbung durchgeführt. Die HNE-Behandlung führte zu einem zeitabhängigen Anstieg der Superoxidanionenproduktion von basal $7,0 \pm 0,4\%$ auf $20,2 \pm 3,6\%$ nach 6 h Behandlung (Abb. 5.9A).

Ein möglicher Schutzmechanismus von Zellen vor reaktiven Substanzen wie HNE ist die Konjugation der Moleküle mit dem zellulären Antioxidans GSH. Der dadurch verursachte Ver-

5.2 Apoptoseinduktion durch das Lipidperoxidationsprodukt 4-Hydroxynonenal

brauch des GSH kann zu einer Verschiebung des intrazellulären Redox-Gleichgewichts und daraus resultierend einer Erhöhung der Superoxidanionen führen. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurde der intrazelluläre GSH-Gehalt nach Behandlung der Zellen mit HNE analysiert. HNE induzierte innerhalb der ersten 30 min eine Reduktion des GSH-Gehalts um ca. 50% und nach 2 h auf unter 20% des Ausgangswertes (Abb. 5.9B).

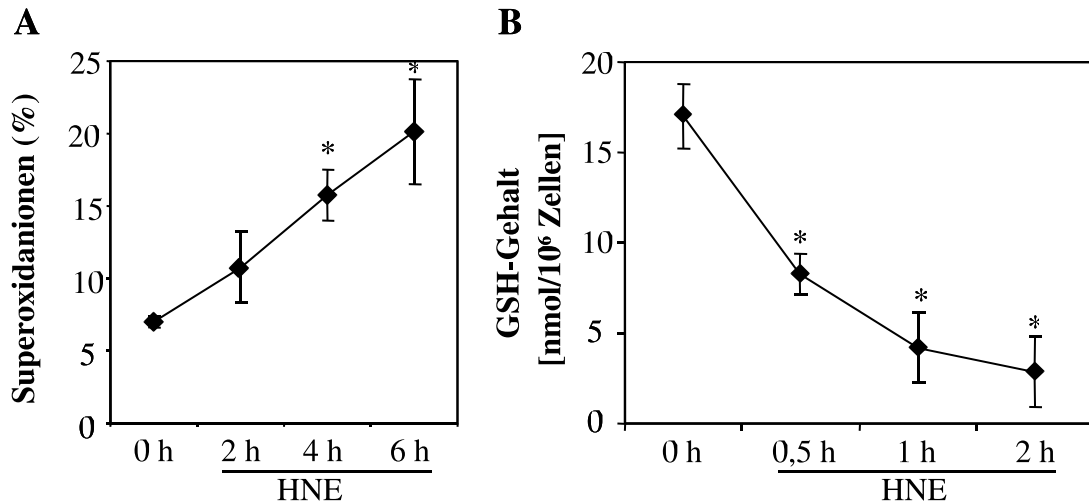


Abbildung 5.9: Zeitabhängige Veränderung des intrazellulären Redoxgleichgewichts durch HNE. **A** HUVECs wurden für 2 bis 6 h mit 20 μ M HNE behandelt und die Produktion der Superoxidanionen im Durchflusszytometer gemessen (n=3; *p \leq 0,05). **B** Der GSH-Gehalt wurde photometrisch bestimmt in Zellen, die für 0,5, 1 sowie 2 h mit 20 μ M HNE behandelt wurden (n=3; *p \leq 0,05).

5.2.3 Effekte von HNE auf verschiedene Kinasen in HUVECs

MAPKs sind Redox-sensitive Proteine und spielen bei der Apoptoseregulation durch Hemmung oder Aktivierung Apoptose-relevanter Signalwege eine wichtige Rolle. Während die Aktivierung der MAPK ERK als wachstumsstimulierendes und anti-apoptotisches Signal gilt, wird die Aktivierung sowohl der JNK als auch der p38 mit der Reaktion auf Stress und Apoptoseinduktion in Verbindung gebracht.

Die Untersuchung der MAPKs erfolgte im Western Blot. MAPKs werden durch Phosphorylierung aktiviert und durch Dephosphorylierung inaktiviert. Im Falle der JNK wurde die Phosphorylierung des Zielproteins c-jun bestimmt.

Die Behandlung mit 20 μ M HNE führte bei allen drei MAPK zu einer Aktivierung bzw. der Hemmung einer Deaktivierung. Bereits innerhalb der ersten 7,5 min induzierte HNE die Phosphorylierung von c-jun (Abb. 5.10). Die Phosphorylierung blieb über den gesamten beobachteten Zeitraum von 60 min im Vergleich zur Kontrolle erhöht. Die MAPK p38 war zum Zeitpunkt 7,5 min nach Stimulation sowohl in der Kontrolle als auch der HNE-Behandlung aktiviert. In der Kontrolle nahm die Phosphorylierung zeitabhängig ab, ein Effekt der durch HNE gehemmt wurde und so zu einer anhaltenden Aktivierung von p38 über die beobachteten 60 min führte. Ein ähnlicher Effekt konnte für die MAPK ERK beobachtet werden. Nach einer anfänglichen

5 Ergebnisse

Aktivierung in beiden Behandlungsgruppen, zeigte die Kontrolle eine kontinuierliche Abnahme der ERK-Phosphorylierung. Dies konnte durch HNE teilweise gehemmt werden.

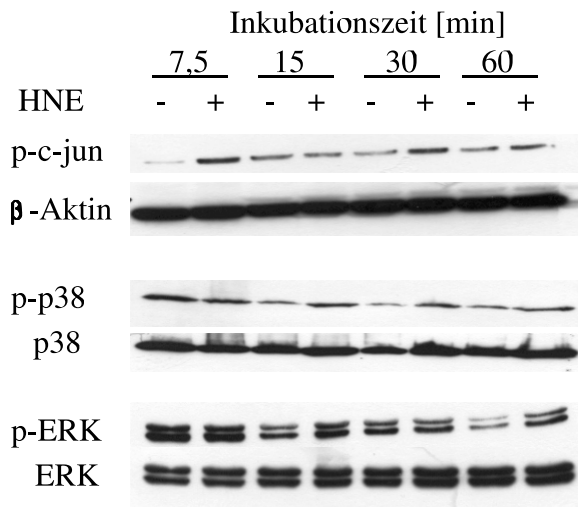


Abbildung 5.10: Einfluss von HNE auf Aktivierung und Inhibierung der MAP-Kinasen. HUVECs wurden für 7,5 bis 60 min mit 20 μ M HNE inkubiert und das Gesamtprotein extrahiert. Die Analyse der MAPK erfolgte im Western Blot. Dargestellt ist je ein repräsentativer Blot aus 3-4 Versuchen.

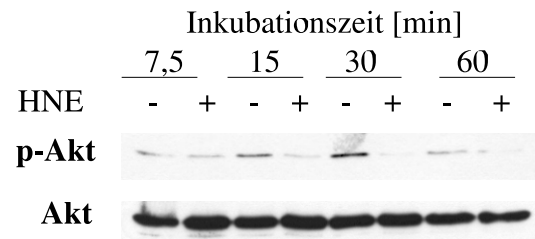


Abbildung 5.11: HNE hemmt die Aktivierung von Akt. HUVECs wurden für 7,5 bis 60 min mit 20 μ M HNE inkubiert und die Aktivierung der Proteinkinase Akt im Western Blot analysiert. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot aus drei Versuchen.

Zusätzlich wurde die Phosphorylierung der Proteinkinase Akt untersucht. Wie bereits in Abschnitt 2.2 dargestellt, ist diese Proteinkinase für ein Überleben endothelialer Zellen von großer Bedeutung und ihre Hemmung führt zu einer verstärkten Apoptoseinduktion.

Die Analyse der Akt-Phosphorylierung erfolgte analog zu den MAPKs. Die Kontrolle zeigte eine zeitabhängige, vermutlich durch den Mediumwechsel verursachte Akt-Phosphorylierung (Abb. 5.11). HNE reduzierte zu allen vier Zeitpunkten die Aktivierung der Proteinkinase im Vergleich zur Kontrolle.

5.3 Einfluss von n-6 und n-3 Fettsäuren auf die HNE-induzierte Apoptose

Ein protektiver Effekt der n-3 Fettsäuren gegenüber kardiovaskulären Erkrankungen sowie eine verbesserte Funktion des vaskulären Endothels wurde in zahlreichen Studien nachgewiesen. *In vitro* Experimente konnten einige Hinweise auf mögliche Wirkmechanismus der n-3 Fettsäuren geben, aber viele Aspekte der protektiven Wirkung sind noch unverstanden. Ein möglicher zusätzlicher Mechanismus könnte der Schutz von Endothelzellen gegenüber einer Schädigung durch Lipidperoxidationsprodukte wie z.B. dem in oxidierten LDL-Partikeln enthaltenen HNE darstellen. Ein Ziel dieser Arbeit war daher, einen möglichen Einfluss verschiedener ungesättigter Fettsäuren auf die HNE-induzierte Apoptose zu untersuchen.

5.3.1 Effekte ungesättigter Fettsäuren auf die HNE-induzierte Apoptose humaner Endothelzellen

Für eine erste Versuchsserie wurden vier verschiedene Fettsäuren ausgewählt: Ölsäure (OA), eine einfach ungesättigte n-9 Fettsäure, LA und AA als mehrfach ungesättigte n-6 Fettsäure sowie DHA als hochungesättigte n-3 Fettsäure. Konfluente HUVECs wurden für 24 h mit 20 μ M der verschiedenen Fettsäuren vorbehandelt und anschließend für weitere 24 h mit HNE stimuliert. Der Prozentsatz der Annexin V-positiven/ PI-negativen Zellen wurde im Durchflusszytometer bestimmt. Es zeigte sich, dass DHA den Anstieg der Annexin V-Bindung signifikant hemmen konnte (Abb. 5.12). Im Gegensatz dazu hatten weder die n-9 Fettsäure OA noch die beiden n-6 Fettsäuren LA und AA einen Einfluss auf die Zahl der apoptotischen Zellen nach 24 h HNE-Behandlung.

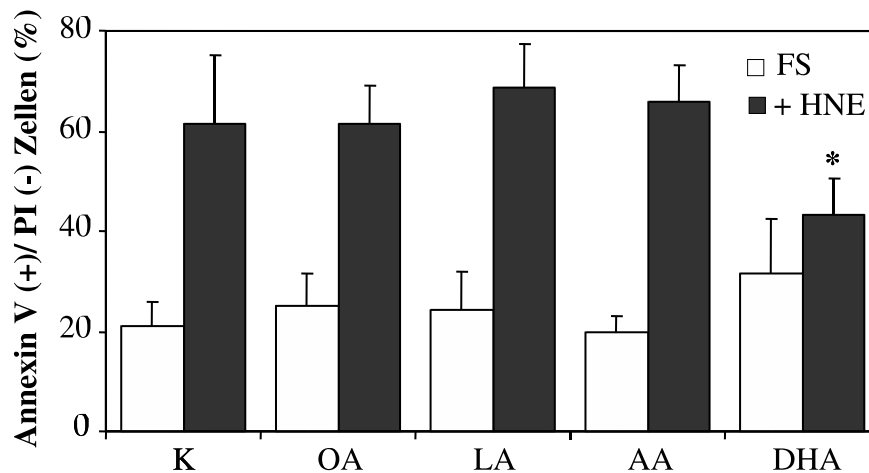


Abbildung 5.12: Einfluss ungesättigter Fettsäuren auf die Apoptoseinduktion durch HNE. HUVECs wurden für 24 h mit 0,1% EtOH (K) oder 20 μ M der jeweiligen Fettsäuren vorbehandelt. Der Prozentsatz der apoptotischen Zellen wurde nach 24-stündiger Behandlung mit 20 μ M HNE im Durchflusszytometer bestimmt (n=3; *p \leq 0,05).

5 Ergebnisse

Wie die Untersuchung der HNE-induzierten Apoptose gezeigt hatte, führt die Stimulation von HUVECs mit 20 μM HNE bereits innerhalb der ersten 6 h zu einer deutlichen Erhöhung apoptotischer Zellen (vgl. Kapitel 5.2.1.2). Daher wurde in einer zweiten Versuchsserie untersucht, ob eine Vorbehandlung der Zellen mit DHA bereits in dieser frühen Phase protektive Effekte zeigt. Die Zellen wurden nach 24-stündiger Vorbehandlung mit DHA sowie AA für 2, 4 und 6 h mit HNE stimuliert und die Annexin V-Bindung in PI-negativen Zellen analysiert. Nach 2 h war die Zahl der apoptotischen Zellen in allen Behandlungsgruppen erhöht, nach 4 und 6 h zeigten sich deutliche Unterschiede. Während die AA-Behandlung zu einer Erhöhung der apoptotischen Zellen unter HNE-Einfluss führte, konnte die DHA-Behandlung den Anteil der Annexin V-positiven Zellen nach 6 h signifikant reduzieren (Abb. 5.13A). Abbildung 5.13B zeigt exemplarisch eine FACS-Messung. Auf der linken Seite sind die Zellen zum Zeitpunkt 0 h dargestellt, auf der rechten Seite sind die Zellen für 6 h mit 20 μM HNE behandelt worden. Der unterschiedliche Anteil an Annexin V-positiven/ PI-negativen Zellen im rechten, unteren Quadranten ist deutlich zu erkennen.

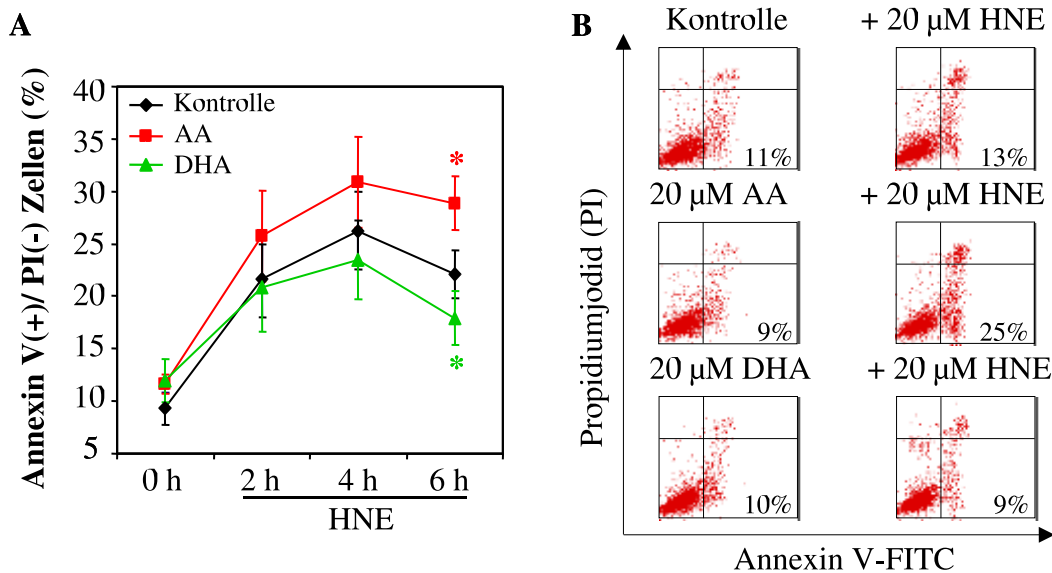


Abbildung 5.13: DHA hemmt die Apoptoseinduktion durch HNE in HUVECs. Die Zellen wurden mit 0,1% EtOH (Kontrolle) oder 20 μM AA bzw. DHA für 24 h vorbehandelt und danach mit 20 μM HNE für 2 bis 6 h stimuliert. Der Prozentsatz der apoptotischen Zellen wurde im Durchflusszytometer bestimmt. **A** Darstellung aller Messwerte ($n=5$; $*p \leq 0,05$). **B** Exemplarische Messung in der *dotplot*-Darstellung nach 0 h (links) sowie 6 h (rechts) Behandlung.

Darüberhinaus ist erkennbar, dass der Prozentsatz der apoptotischen Zellen nach einem initialen Anstieg innerhalb der ersten 4 h in allen drei Behandlungsgruppen abnimmt. Bei Betrachtung der PI-positiven Zellen (Abb. 5.14A) fällt auf, dass diese nach 4-6 h deutlich anstiegen, was durch DHA verhindert werden konnte. Die gemeinsame Erfassung der apoptotischen und nekrotischen Zellen in Abbildung 5.14B verdeutlicht, dass DHA im Gegensatz zur Kontrolle sowie AA sowohl den Anteil der apoptotischen als auch den Anteil der (sekundär) nekrotischen Zellen verringern konnte.

Um diesen protektiven Effekt der DHA-Vorbehandlung zu bestätigen, wurde ein zweiter charakteristischer Apoptoseparameter, die Aktivierung der Caspase-3, bestimmt. Abbil-

5.3 Einfluss von n-6 und n-3 Fettsäuren auf die HNE-induzierte Apoptose

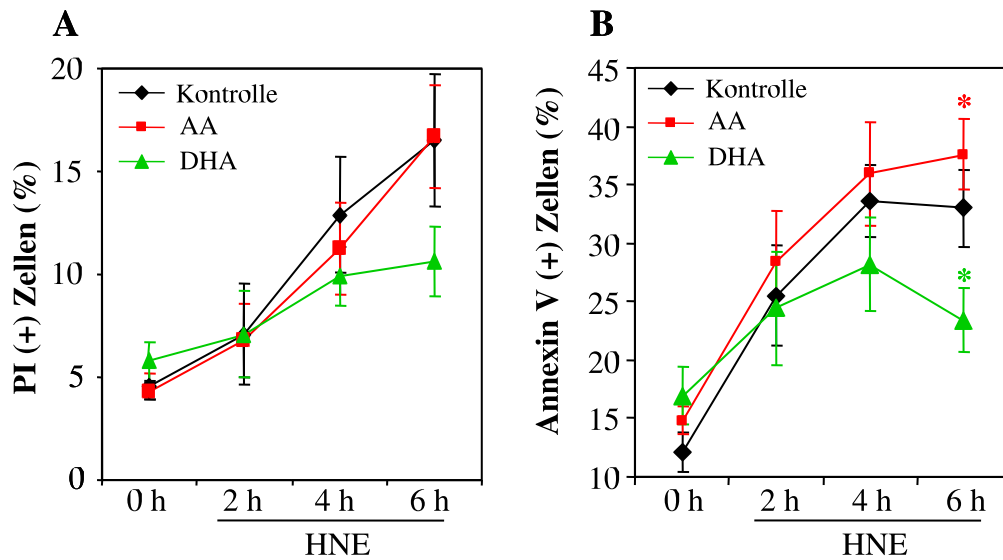


Abbildung 5.14: DHA verringert den HNE-induzierten Anstieg der PI-positiven Zellen. Die Zellen wurden mit 0,1% EtOH (Kontrolle) oder 20 μ M AA bzw. DHA für 24 h vorbehandelt und danach mit 20 μ M HNE für 2 bis 6 h stimuliert. Die Messung der PI- sowie Annexin V-positiven Zellen erfolgte im Durchflusszytometer (n=5; *p \leq 0,05). **A** PI-positive Zellen nach 2 bis 6 h Behandlung mit 20 μ M HNE. **B** Annexin V-positive Zellen ohne PI-Gegenfärbung nach 2 bis 6 h HNE-Behandlung.

Abbildung 5.15A zeigt die Messung der aktiven Caspase-3 im Durchflusszytometer nach 6-stündiger HNE-Behandlung. In allen drei Behandlungsgruppen kam es zu einer deutlichen Caspase-3-Aktivierung. Die Vorbehandlung der Zellen mit DHA konnte jedoch aktive Caspase-3 signifikant um $34 \pm 11\%$ im Vergleich zur Kontrolle verringern. Im Gegensatz dazu zeigten die AA-behandelten Zellen eine Erhöhung der aktiven Caspase-3 um $37 \pm 18\%$ im Vergleich zu HNE-Behandlung alleine. Die verringerte Caspase-3-Aktivierung nach DHA-Behandlung konnte im Western Blot bestätigt werden (Abb. 5.15B).

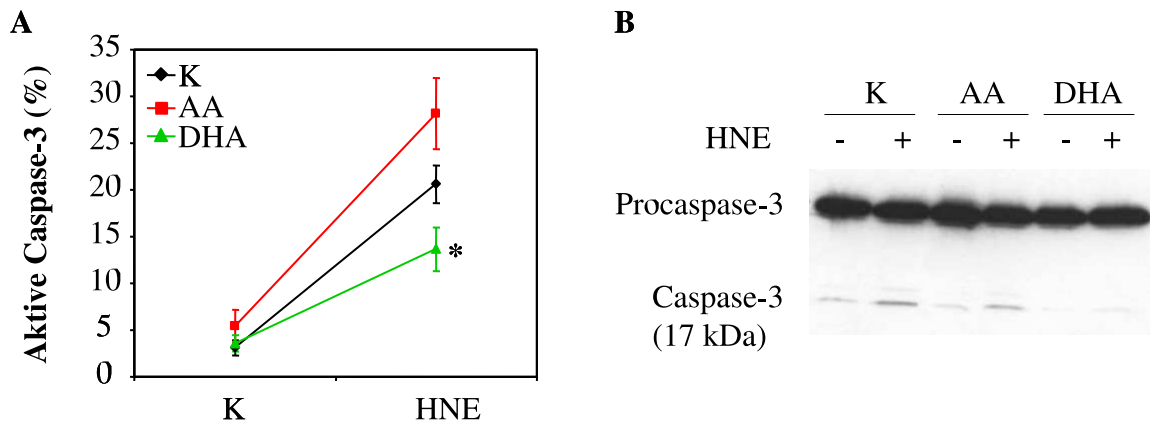


Abbildung 5.15: Bestimmung der aktiven Caspase-3 nach HNE-Behandlung. HUVECs wurden nach 24-stündiger Vorbehandlung mit 0,1% EtOH (Kontrolle) oder 20 μ M AA bzw. DHA für 6 h mit 20 μ M HNE stimuliert. **A** Die Messung der aktiven Caspase-3 erfolgte im Durchflusszytometer (n=3; *p \leq 0,05). **B** Die Detektion der Procaspase-3 sowie des aktiven Caspase-3-Fragmentes mit 17 kDa erfolgte im Western Blot. Dargestellt ist ein repräsentativer Blot aus 3 Versuchen.

5.3.2 Effekte der n-6 Fettsäure AA und der n-3 Fettsäure DHA auf den intrazellulären GSH-Gehalt

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass Fettsäuren inklusive DHA das intrazelluläre Redox-Gleichgewicht beeinflussen können (vgl. Kapitel 2.3.2). Daher könnte ein möglicher Mechanismus der reduzierten Apoptoseinduktion nach DHA-Behandlung in der Verhinderung des HNE-induzierten Anstiegs der Superoxidanionen bzw. des GSH-Abfalls sein (vgl. Kapitel 5.2.2). Zunächst wurde die Bildung der Superoxidanionen nach HNE-Stimulation in AA- bzw. DHA-vorbehandelten HUVECs bestimmt. DHA konnte den HNE-induzierten Anstieg der Superoxidanionen über den gesamten Zeitraum der HNE-Stimulation von bis zu 6 h deutlich hemmen (Abb. 5.16). AA zeigte gegenüber der Kontrolle keinen Effekt.

Die Bestimmung des intrazellulären GSH-Gehalts nach 24-stündiger Inkubation von HUVECs mit 20 μ M AA bzw. DHA zeigte, dass die DHA-Behandlung den GSH-Gehalt signifikant um ca. 20% im Vergleich zur Kontrolle erhöhte (Abb. 5.17). Die AA-behandelten Zellen zeigten dagegen nach 24 h einen gering (ca. -5%) erniedrigten GSH-Spiegel.

Im nächsten Schritt wurde der GSH-Gehalt in AA- bzw. DHA-behandelten HUVECs nach HNE-Inkubation analysiert. Der GSH-Gehalt wurde dafür nach 30 min sowie 2 h bestimmt, da hier der stärkste Effekt des HNE auf den GSH-Gehalt gemessen worden war (vgl. Kapitel 5.2.2). Die Analyse zeigte, dass DHA nicht in der Lage war, den HNE-induzierten Abfall des GSH-Gehalts zu verhindern (Tab. 5.1). Allerdings konnte die DHA-Behandlung den HNE-induzierten Abfall signifikant abschwächen, so dass der GSH-Gehalt sowohl nach 30 min als auch nach 2 h im Vergleich zur EtOH-Kontrolle signifikant höher war. Im Gegensatz dazu führte die Vorbehandlung der Zellen mit AA in Übereinstimmung mit den vorherigen Beobachtungen zu einem verstärkten Abfall des GSH. AA scheint damit den GSH-verringernenden Effekt des HNE zu verstärken.

5.3 Einfluss von n-6 und n-3 Fettsäuren auf die HNE-induzierte Apoptose

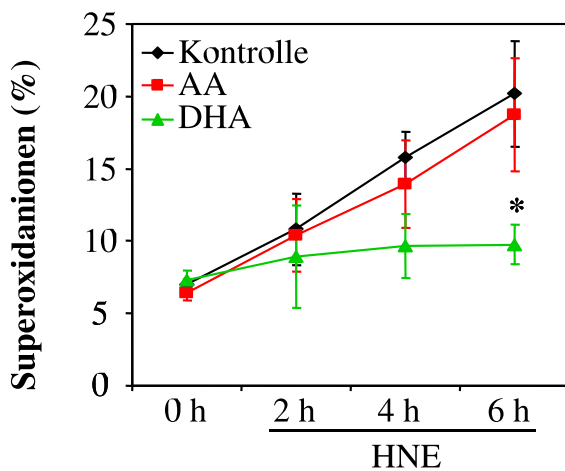


Abbildung 5.16: DHA verhindert den HNE-induzierten Anstieg der Superoxidationen. HUVECs wurden für 24 h mit 0,1% EtOH (Kontrolle) oder 20 μ M AA bzw. DHA vorbehandelt und danach mit 20 μ M HNE für 2 bis 6 h stimuliert. Superoxidationen wurden durchflusszytometrisch mittels HE-Färbung nachgewiesen (n=3; *p \leq 0,05).

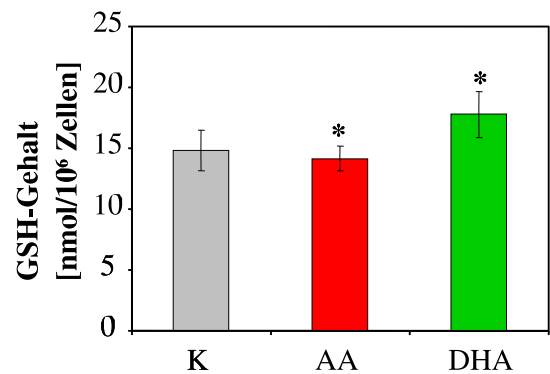


Abbildung 5.17: DHA erhöht und AA erniedrigt den intrazellulären GSH-Gehalt. HUVECs wurden für 24 h mit 0,1% EtOH (Kontrolle) oder 20 μ M AA bzw. DHA behandelt und der GSH-Gehalt photometrisch bestimmt (n=6; *p \leq 0,05).

Die 20%-ige Erhöhung des intrazellulären GSH-Gehalts durch DHA war zwar signifikant, konnte aber nicht den HNE-induzierten Abfall kompensieren. Es scheinen daher noch andere Mechanismen für den protektiven Effekt der DHA in HUVECs verantwortlich zu sein.

Vorbehandlung	GSH-Gehalt [nmol/10 ⁶ Zellen]		
	Zeitdauer der HNE-Inkubation		
	0 h	0,5 h	2 h
Kontrolle	14,8 \pm 1,6	7,7 \pm 1,7	3,8 \pm 1,9
AA	14,1 \pm 1,0 *	5,9 \pm 1,5 *	2,2 \pm 1,10 *
DHA	17,8 \pm 1,9 * [†]	8,6 \pm 2,0 * [†]	6,2 \pm 2,3 * [†]

Tabelle 5.1: Einfluss der Vorbehandlung mit AA bzw. DHA auf die GSH-Reduktion durch HNE. HUVECs wurden für 24 h mit 0,1% EtOH (Kontrolle) oder 20 μ M AA bzw. DHA vorbehandelt und anschliessend für 30 min oder 2 h mit 20 μ M HNE stimuliert. Der GSH-Gehalt wurde photometrisch bestimmt (MW \pm SEM; n=3-6; *p \leq 0,05 versus Kontrolle; [†]p \leq 0,05 versus AA).

5.3.3 Einfluss der Fettsäuren auf den Caspase-Inhibitor c-IAP-1 in HUVECs

Eine weitere Möglichkeit zur Reduktion der Apoptoseinduktion stellt die Hemmung der Caspase-3-Aktivierung nach HNE-Behandlung dar (vgl. Kapitel 5.3.1). Die Proteine der IAP-Familie sind als endogene Caspaseinhibitoren in der Lage, aktivierte Caspasen durch direkte Interaktion zu hemmen.

Um einen möglichen Einfluss sowohl der DHA als auch der AA auf den endogenen Caspase-3-Inhibitor c-IAP-1 zu untersuchen, wurde die Expression auf mRNA und auf Proteinebene bestimmt. Für die Analyse der *c-iap-1* mRNA wurden die Zellen für 4 h mit 20 μ M der Fettsäuren inkubiert und die Gesamt-RNA isoliert. Die Bestimmung der relativen mRNA-Expression erfolgte mittels real-time RT-PCR bezogen auf die mRNA von β -Aktin. Es zeigte sich, dass DHA die *c-iap-1* mRNA nach 4 h Inkubation signifikant erhöhte (Abb. 5.18A), während AA keinen Einfluss hatte. Die Expression des c-IAP-1-Proteins wurde nach 24 h Behandlung untersucht. Wie Abb. 5.18B zeigt, führte die DHA-Behandlung zu einer Erhöhung der c-IAP-1-Proteinexpression. AA hatte keinen Einfluss auf die c-IAP-1 Expression.

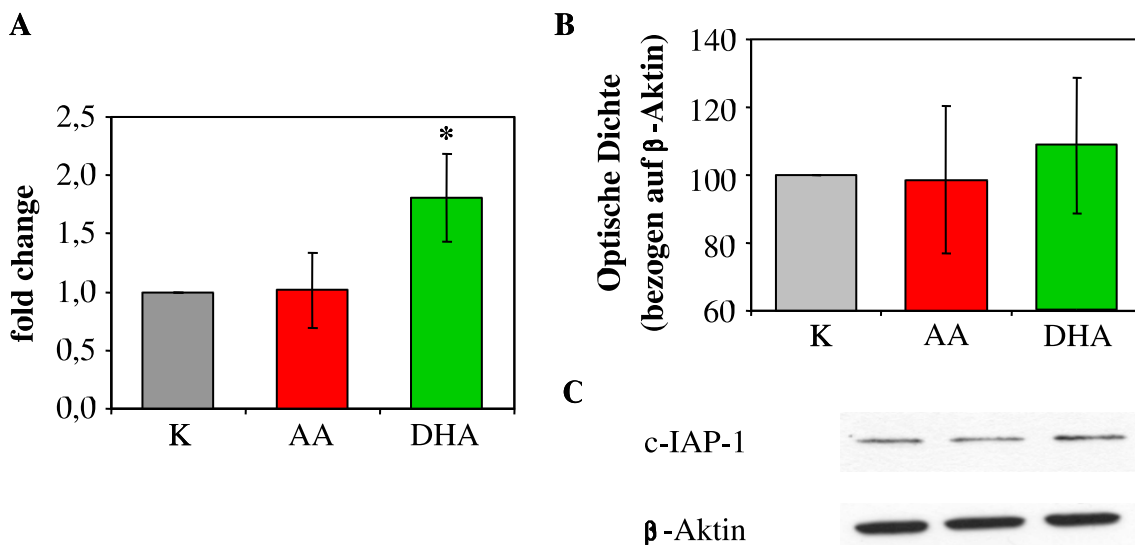


Abbildung 5.18: DHA erhöht sowohl die *iap-1* mRNA als auch die c-IAP-1 Proteinexpression in humanen Endothelzellen. **A** HUVECs wurden für 4 h mit 20 μ M AA bzw. DHA inkubiert und die Gesamt-RNA isoliert. Die Bestimmung der relativen Expression der *c-iap-1* mRNA von Behandlung zu Kontrolle (0,1% EtOH) erfolgte mittels real-time RT-PCR (n=7; *p \leq 0,05). **B+C** Die Bestimmung des c-IAP-1 Proteins erfolgte nach 24-stündiger Behandlung der Zellen mit 0,1% EtOH (K) oder 20 μ M AA bzw. DHA im Western Blot (n=7). **B** Darstellung aller Daten nach Messung der optischen Dichte. **C** Dargestellt ist ein exemplarischer Blot aus 7 Versuchen.

5.3.4 Einfluss der Fettsäuren auf den Transkriptionsfaktor NF- κ B

Über die transkriptionelle Kontrolle der IAP-Proteine ist noch wenig bekannt. Es wird angenommen, dass der Transkriptionsfaktor NF- κ B in die Regulation involviert ist (vgl. Kapitel 2.2). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass AA in der Lage ist NF- κ B zu aktivieren. Dagegen ist eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors durch DHA nicht beschrieben.

Die Bestimmung der NF- κ B-Aktivierung erfolgte mit Hilfe des TransAMTM Transcription Factor Assay Kits, durch den die Bindung des NF- κ B-Heterodimers p50/p65 an die DNA gemessen wurde. Die dafür benötigten Kernextrakte wurden nach 15, 30, 60 und 120 min Behandlung von HUVECs mit 20 μ M AA bzw. DHA gewonnen. Die Messungen ergaben ein sehr uneinheitliches Bild (Abb. 5.19). Während sich nach 15 min eine erhöhte p65-Bindung sowohl durch AA als auch durch DHA andeutet, war nach 30 min die p65-DNA-Bindung sowohl nach AA- als auch nach DHA-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle erniedrigt. Auch nach 60 sowie 120 min zeigte sich kein eindeutiger Effekt einer AA- oder DHA-Behandlung auf die p65-DNA-Bindung.

Die Analyse der I κ B α -Phosphorylierung, die den Aktivierungsschritt des NF- κ B-Systems darstellt, zeigte ein ähnlich uneinheitliches Bild (Abb. 5.19B). Eine Beteiligung des NF- κ B-Systems an der DHA-induzierten Erhöhung der c-IAP-1-Expression scheint damit unwahrscheinlich.

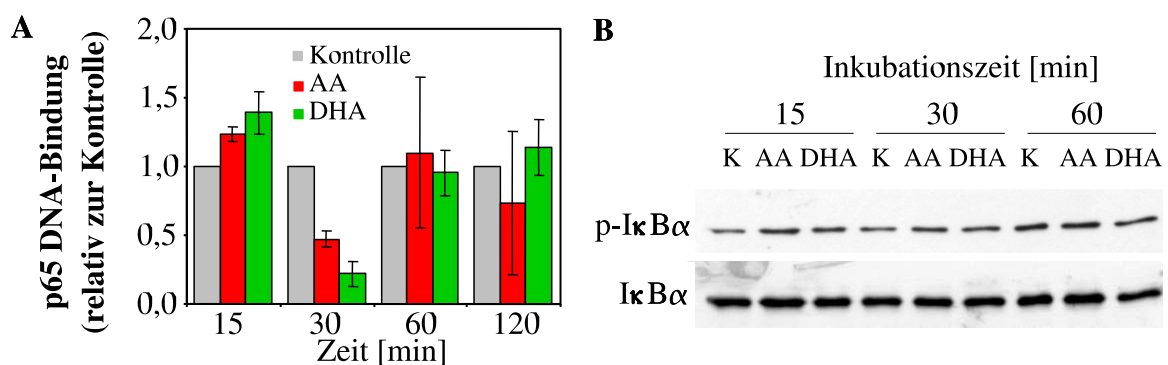


Abbildung 5.19: Einfluss der Fettsäuren auf das NF- κ B-System. **A** HUVECs wurden für 15, 30, 60 sowie 120 min mit 0,1% EtOH (Kontrolle) oder 20 μ M AA bzw. DHA inkubiert und die nukleären Proteine extrahiert. Die Messung der NF- κ B-Aktivierung erfolgte durch Bestimmung der Bindung von p65 an die spezifische DNA-Sequenz (n=2-3). **B** HUVECs wurden für 30, 60 und 120 min mit 0,1% EtOH (K) oder 20 μ M AA bzw. DHA inkubiert und die Gesamtproteine extrahiert. Die Bestimmung der I κ B α -Phosphorylierung erfolgte im Western Blot. Dargestellt ist ein Blot aus 3 Versuchen.

5.3.5 Aktivierung der Proteinkinase Akt durch DHA

Einige Studien konnten zeigen, dass die Proteinkinase Akt in die Kontrolle der Expression der IAP-Proteine involviert ist, wobei der genaue Mechanismus noch ungeklärt ist (vgl. Kapitel 2.2). Um einen ersten Eindruck zu bekommen, ob Akt auch in die DHA-induzierte Expression des c-IAP-1 in HUVECs involviert sein könnte, wurde die Aktivierung der Proteinkinase Akt im Western Blot untersucht.

5 Ergebnisse

Erste Ergebnisse deuten darauf hin, dass DHA in der Lage ist, die Proteinkinase Akt bereits nach 30 min zu aktivieren (Abb. 5.20). Dieser Effekt war auch nach 60 min noch deutlich und erst nach 120 min hatte die Akt-Phosphorylierung in den DHA-behandelten Zellen das Niveau der Kontrolle erreicht.

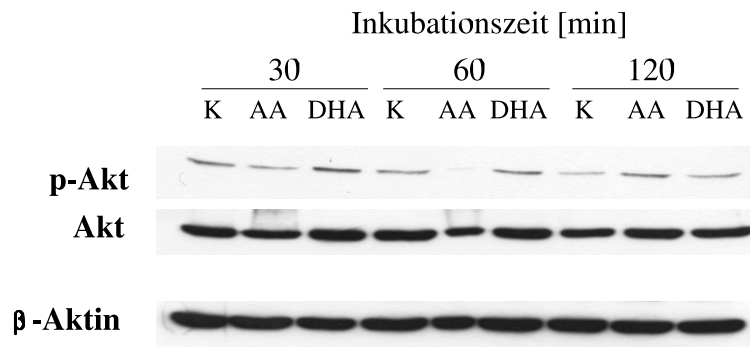


Abbildung 5.20: Effekt beider Fettsäuren auf die Proteinkinase Akt. HUVECs wurden für 30, 60 und 120 min mit 20 μ M AA bzw. DHA inkubiert und das Gesamtprotein extrahiert. Die Bestimmung der Akt-Phosphorylierung erfolgte im Western Blot. Dargestellt ist ein exemplarischer Blot aus 3 Versuchen.

6 Diskussion

Für alle Versuche dieser Arbeit wurden primäre humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene verwendet. Die Zellen wurden erst nach Erreichen der Konfluenz mit den verschiedenen Testsubstanzen behandelt, um der *in vivo*-Situation eines ruhenden *monolayer* möglichst nahe zu kommen. Alle eingesetzten Testsubstanzen lagen in Ethanol gelöst vor und wurden in vorgewärmtem Zellkulturmedium auf die gewünschte Zielkonzentration verdünnt. Da Ethanolkonzentrationen über 0,1% Apoptose in HUVECs induzieren können (Liu et al. 2002), wurde diese maximale Konzentration nicht überschritten. Die Kontrollzellen wurden der gleichen Ethanolmenge ausgesetzt wie die mit Testsubstanz behandelten Zellen.

6.1 Vergleichende Untersuchung verschiedener Cyclopentenon-Prostaglandine

Die Substanzgruppe der CyPGs hat aufgrund der starken biologischen Effekte seines bekanntesten Vertreters 15d-PGJ₂, einem endogenen Liganden des Transkriptionsfaktors PPAR γ (Forman et al. 1995), große Aufmerksamkeit erlangt. 15d-PGJ₂ wird auf nicht-enzymatischem Wege aus der Vorläufersubstanz PGD₂ gebildet. Es konnte nicht nur gezeigt werden, dass aktivierte Makrophagen 15d-PGJ₂ an Entzündungsherden freisetzen, sondern 15d-PGJ₂ konnte darüber hinaus in Schaumzellen arteriosklerotischer Plaques nachgewiesen werden (Shibata et al. 2003). Aufgrund seiner Eigenschaft als PPAR γ -Ligand wurde zunächst davon ausgegangen, dass 15d-PGJ₂ seine Effekte ausschließlich über Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors ausübt. Zahlreiche Studien der letzten Jahre konnten hingegen alternative Signalwege des 15d-PGJ₂ zeigen (Kondo et al. 2001, Shibata et al. 2003). Neben anti-inflammatorischen Effekten durch Hemmung von NF- κ B (Straus et al. 2000), Reduktion der Adhäsionsmolekülexpression (Zernecke et al. 2003) sowie Hemmung der Interaktion zwischen Leukozyten und Endothelzellen (Jackson et al. 1999) konnten pro-inflammatorische Wirkungen des 15d-PGJ₂-Moleküls gezeigt werden. Sowohl eine Induktion des pro-inflammatorischen Zytokins Interleukin-8 in verschiedenen Zellarten inklusive Endothelzellen (Jozkowicz et al. 2001, Bureau et al. 2002, Fu et al. 2002) als auch eine Induktion von oxidativem Stress (Kondo et al. 2001, Li et al. 2001) und Apoptose (Bishop-Bailey & Hla 1999, Levonen et al. 2001, Kondo et al. 2002) durch 15d-PGJ₂ wurde beobachtet.

Andere Vertreter der CyPGs wurden seltener und meist parallel mit 15d-PGJ₂ untersucht und übereinstimmend als weit weniger wirksam im Vergleich zu 15d-PGJ₂ beschrieben (Bishop-Bailey & Hla 1999, Bureau et al. 2002, Nencioni et al. 2002). Diese Beobachtungen konnten durch erste Untersuchungen in HUVECs bestätigt werden (Zernecke et al. 2003) und stehen damit im Widerspruch zu den Arbeiten von Rossi et al. (1996) und Straus et al. (2000). Beide Arbeitsgruppen konnten durch vergleichende Experimente zeigen, dass der Cyclopentenonring die relevante molekulare Struktur für die Effekte des 15d-PGJ₂ ist.

Ziel der Untersuchungen war deshalb ein Vergleich strukturell sehr ähnlicher CyPGs (Abb. 2.4B) mit 15d-PGJ₂, um die für die Apoptoseinduktion in humanen Endothelzellen relevante molekulare Struktur aufzuklären.

6.1.1 Einfluss der Cyclopentenon-Prostaglandine auf Zellvitalität und Apoptoseinduktion

Bereits die ersten Untersuchungen zum Einfluss der ausgewählten PGs auf die Vitalität konfluenter HUVECs zeigten deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Substanzen. Obwohl sich insbesondere die beiden synthetischen CyPGs, 15d-PGA₁ und 15d-PGA₂, nur minimal in ihrer molekularen Struktur von 15d-PGJ₂ unterscheiden, zeigten die getesteten PGs in den untersuchten Konzentrationen von 10 und 20 μ M keinerlei Effekt auf die Zellvitalität. Wie in Übereinstimmung mit Arbeiten anderer Arbeitsgruppen (Bishop-Bailey & Hla 1999, Levenon et al. 2001) gezeigt werden konnte, führte die Behandlung humaner Endothelzellen mit 10 μ M 15d-PGJ₂ zu einer deutlichen Reduktion der Zellvitalität innerhalb von 24 h.

Weiterführende Experimente hatten die Untersuchung der Effekte der ausgewählten PGs auf die Induktion von Apoptose in humanen Endothelzellen zum Ziel. Mit Ausnahme des PGD₂ zeigte keine der ausgewählten Substanzen in der Konzentration von 20 μ M einen Effekt auf die Annexin V-Bindung oder die Zellen mit einem subG1-Peak. Dagegen führte die Behandlung der Endothelzellen mit 10 μ M 15d-PGJ₂ zu der erwarteten signifikanten Zunahme der apoptotischen Zellen, sowohl in einem frühen Stadium (Annexin V-Bindung) als auch in einem späten Stadium der Apoptose (subG1-Peak). Die Behandlung der Zellen für 24 h mit PGD₂ führte zu einem Anstieg der Annexin V-positiven/PI-negativen Zellen, zeigte allerdings keinen Effekt auf die DNA-Fragmentierung. PGD₂ kann im Zellkulturmedium durch nicht-enzymatische Reaktionen in Vertreter der J-Reihe der CyPGs umgewandelt werden (Shibata et al. 2002). Dies lässt vermuten, dass die Apoptoseinduktion in HUVECs durch PGD₂-Behandlung auf die spontane Umwandlung des PGD₂ in die stärker wirksamen CyPGs der J-Reihe zurückzuführen ist und erklärt damit die beobachtete erhöhte Annexin V-Bindung. Demnach führte die nicht-enzymatische Umwandlung des PGD₂ innerhalb des beobachteten Zeitraums von 24 h zur Induktion von Apoptose, die in Form der erhöhten Annexin V-Bindung, einem Marker eines frühen Apoptosestadiums, detektiert wurde. Ein spätes Stadium der Apoptose, wie sie durch Bestimmung der DNA-Fragmentierung als Zellen mit einem subG1-Peak gemessen wurde, konnte nach 24 h (noch) nicht beobachtet werden.

6.1.2 Einfluss der Molekularstruktur von Cyclopentenon-Prostaglandinen auf die Fähigkeit Apoptose in HUVECs zu induzieren

In einigen Versuchen wurde parallel zu den CyPGs ein synthetisches Derivat des 15d-PGJ₂, das 9,10-J₂, verwendet. Dieses Derivat unterscheidet sich nur durch die fehlende Doppelbindung in der Ringstruktur von 15d-PGJ₂. Studien, welche 15d-PGJ₂ mit PGs verglichen haben, denen die Cyclopentenonstruktur fehlte oder die Doppelbindung an der „Innenseite“ des Ringes enthielten, konnten eine reduzierte Wirkung oder ein völliges Fehlen eines Effektes zeigen (Hamel et al. 2000, Nencioni et al. 2002). In der Tat konnten weder 10 noch 20 μ M 9,10-J₂ die

6.1 Vergleichende Untersuchung verschiedener Cyclopentenon-Prostaglandine

Zellvitalität im MTT-Test reduzieren. Darüberhinaus konnte keine Apoptoseinduktion durch 20 μM 9,10-J₂ beobachtet werden, wie die durchflusszytometrische Analyse der Annexin V-Färbung zeigte. Übereinstimmend konnten [Shibata et al. \(2003\)](#) in SH-SY5Y-Zellen zeigen, dass 25 μM 9,10-J₂ keinen Einfluss auf die Zellvitalität haben. Diese Ergebnisse können damit die Bedeutung der Cyclopentenonstruktur für die Apoptoseinduktion in humanen Endothelzellen durch 15d-PGJ₂ bestätigen.

Um die Rolle des Cyclopentenonrings für die Apoptoseinduktion durch 15d-PGJ₂ in humanen Endothelzellen genauer zu untersuchen, wurden die Effekte der Ringstruktur allein, des Cyclopentenon, auf HUVECs bestimmt. Der initiale Vergleich des 15d-PGJ₂ mit seinem Derivat und Cyclopentenon im MTT-Test zeigte, dass Cyclopentenon starke biologische Effekte ausübt. Bereits 1 μM Cyclopentenon reduzierte die Zellvitalität innerhalb von 24 h auf nahezu 0%. Cyclopentenon wies dabei einen engen Dosis-Wirkungsbereich in HUVECs auf, denn 0,25 μM zeigten nur einen geringen Effekt auf die mitochondriale Aktivität. Dieser direkte Vergleich zeigte, dass eine 10-fach niedrigere Konzentration des Cyclopentenon einen vergleichbaren Effekt wie 10 μM 15d-PGJ₂ ausübten. Im Widerspruch dazu stehen Untersuchungen durch [Rossi et al. \(1996\)](#) zur Induktion des *Heat Shock Protein 70* (HSP70) in einer humanen Leukämiezelllinie. In ihren Versuchen setzten die Autoren Konzentrationen von 250 bis 1000 μM Cyclopentenon ein und benötigten eine 10-fach höhere Cyclopentenon-Konzentration im Vergleich zu 15d-PGJ₂, um eine ähnlich starke Induktion des HSP70 zu sehen. [Straus et al. \(2000\)](#) konnten in ihren Untersuchungen zur Hemmung des NF- κ B in HeLa-Zellen zeigen, dass sowohl 15d-PGJ₂ als auch Cyclopentenon in der Lage waren NF- κ B zu hemmen. Allerdings war im Vergleich zu 15d-PGJ₂ eine etwa 100-fach höhere Konzentration an Cyclopentenon für einen vergleichbaren Effekt notwendig. Eine Erklärung dieser Unterschiede könnte darin liegen, dass beide Studien Zelllinien verwendet haben, die möglicherweise weniger empfindlich auf Cyclopentenon reagieren. Zudem wurden die Zellen für einen kürzeren Zeitraum behandelt.

Für die Konzentrationen 0,25 und 0,5 μM Cyclopentenon wurde durchflusszytometrisch untersucht, ob der durch Cyclopentenon verursachte Zelltod auf Induktion von Apoptose zurückzuführen ist. Die Analyse der Annexin V-Bindung zeigte, dass Cyclopentenon konzentrationsabhängig Apoptose in humanen Endothelzellen induziert.

Die Daten lassen vermuten, dass der Cyclopentenonring die essentielle molekulare Struktur für die biologischen Effekte des 15d-PGJ₂ darstellt. Da die Ringstruktur alleine noch stärkere Effekte auf die Vitalität humaner Endothelzellen ausübte, reduzieren die Seitenketten des 15d-PGJ₂-Moleküls seine Reaktivität. Im Falle der anderen verwendeten CyPGs mit einer Cyclopentenonringstruktur unterscheiden sich zum Teil die Seitenketten und in allen Molekülen die Stellung der Seitenketten im Verhältnis zum Ring. Daher scheint für die starke Reaktivität des 15d-PGJ₂ seine einzigartige Anordnung der Seitenketten zum Cyclopentenonring verantwortlich zu sein.

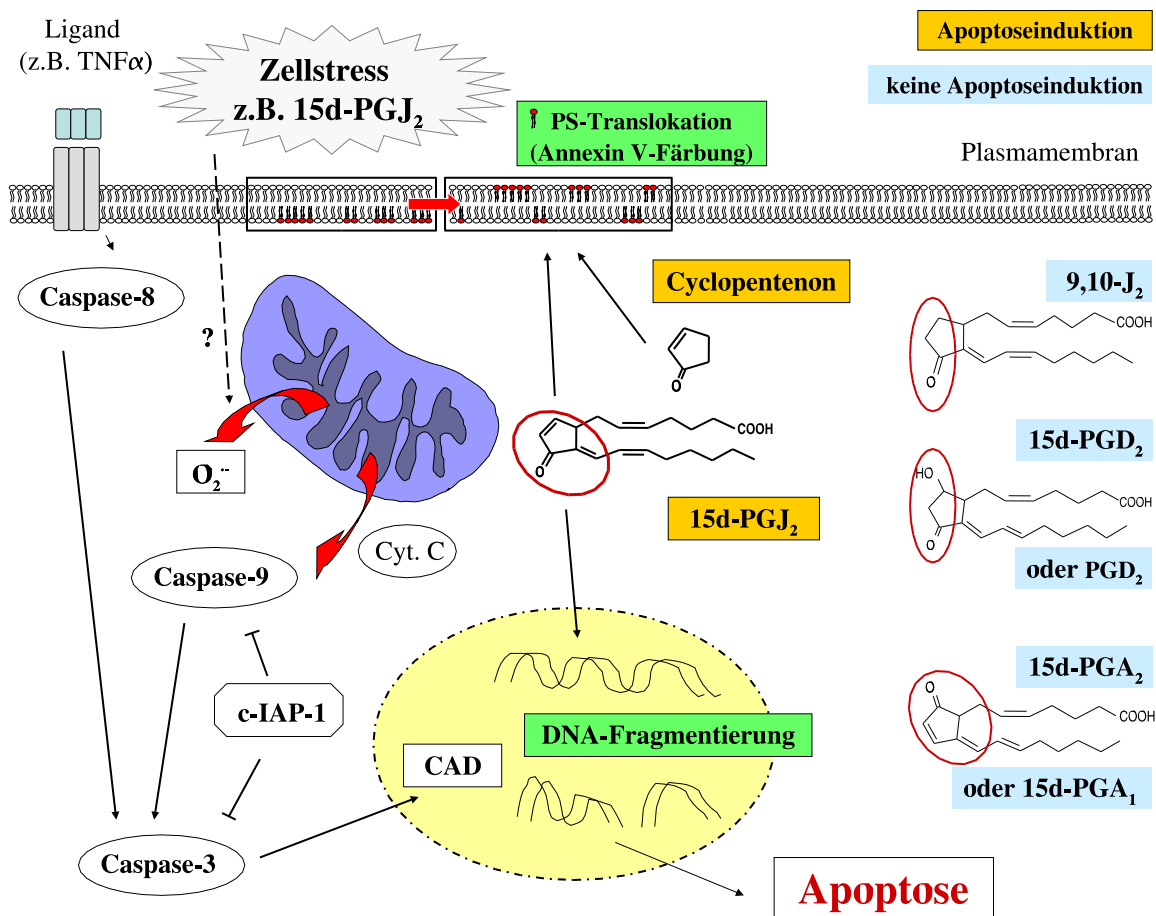


Abbildung 6.1: Zusammenfassendes Schema der Ergebnisse der Cyclopentenon-Prostaglandine. Die untersuchten Parameter sind grün unterlegt, die Unterschiede der Molekularstruktur der verwendeten Substanzen durch rote Kreise deutlich gemacht.

6.2 Untersuchung der HNE-induzierten Effekte in humanen Endothelzellen

Das α,β -ungesättigte Aldehyd HNE wird bei der Oxidation ungesättigter Fettsäuren gebildet und ist eines der Hauptprodukte der Lipidperoxidation. Esterbauer et al. (1987) konnten in *in vitro* Experimenten HNE als Autoxidationsprodukt der Fettsäuren oxidierte LDL-Partikel nachweisen. Weitere Arbeiten konnten zeigen, dass HNE-modifizierte Epitope in arteriosklerotischen Läsionen sowohl im Kaninchenmodell (Palinski et al. 1989) als auch der menschlichen Aorta vorhanden sind (Itakura et al. 2000).

Aufgrund seiner reaktiven Gruppen kann HNE vielfältige biologische Effekte ausüben. Seine überwiegend lipophilen Eigenschaften begünstigen eine Akkumulation des Aldehyds in Zellmembranen (Schaur 2003), wo es mit Membranbestandteilen reagieren und diese in ihrer Funktion beeinflussen kann. Durch seine besondere Reaktivität mit Thiol- und Aminogruppen zahl-

reicher Proteine wird angenommen, dass HNE auf eine ganze Reihe von Signaltransduktionswege Einfluss nehmen kann (Nakashima et al. 2003). Daneben wird HNE mit den meisten pathophysiologischen Effekten des oxidativen Stresses in Verbindung gebracht (Uchida 2003) und zahlreiche Studien haben die zytotoxischen Effekte des Aldehyds belegen können (Esterbauer et al. 1991). Ein Teil der zell- und gewebsschädigenden Wirkung des HNE ist daher möglicherweise auf die Induktion von Apoptose zurückzuführen.

Die Fähigkeit des HNE Apoptose zu induzieren konnte in zahlreichen Zellarten wie neuronalen Zellen (Kruman et al. 1997, Camandola et al. 2000), Kolonkarzinomzellen (Ji et al. 2001), Makrophagen (Haynes et al. 2001), aber auch VSMCs (Ruef et al. 2001) und Endothelzellen (Herbst et al. 1999, Levonen et al. 2001) nachgewiesen werden. Ebenso konnten einige Signalwege der HNE-induzierten Apoptose identifiziert werden. Dagegen ist wenig über die Apoptoseinduktion durch HNE in humanen Endothelzellen bekannt. Ziel der Untersuchungen der HNE-induzierten Apoptose war daher zum einen die Ermittlung einer effektiven Konzentration zur Apoptoseinduktion sowie geeigneter Zeitpunkte der Apoptosedetektion. Zum anderen sollte die HNE-induzierte Apoptose in primären humanen Endothelzellen charakterisiert und mögliche Signalwege identifiziert werden.

6.2.1 Konzentrations- und Zeitkinetik von HNE in konfluenten HUVECs

Die initialen Untersuchungen der Zellvitalität von HUVECs nach HNE-Behandlung zeigten, dass HNE bereits in Konzentrationen von 10 und 20 μM die Zellvitalität reduzieren konnte. Höhere Konzentrationen reduzierten sowohl die Zellvitalität als auch die Zellzahl und führten zu einem drastischen Anstieg der Zahl toter Zellen. Alle getesteten Konzentrationen verringerten zeitabhängig die Zellvitalität. Durch Messung der mitochondrialen Aktivität konnte die Zeitabhängigkeit der Wirkung für 20 und 30 μM HNE bestätigt werden. 10 μM HNE senkte nur vorübergehend die MTT-Aktivität, hatte aber einen deutlichen Effekt auf die Zellzahl im Trypanblau-Ausschlusstest gezeigt. Da die Bestimmung der Zellvitalität auf der Messung der mitochondrialen Enzymaktivität, einem indirekten Indikator der Zellvitalität beruht, könnte die Erholung des MTT-Aktivität nach 24 h auf eine gesteigerte Enzymaktivität in überlebenden Zellen zurückzuführen sein. Die zeit- und konzentrationsabhängige Reduktion der Zellvitalität durch HNE konnte übereinstimmend in anderen Zellen nachgewiesen werden (Kruman et al. 1997, Liu et al. 2000, Ji et al. 2001).

Da bei den zwei höchsten getesteten Konzentrationen nach 24 h Behandlung die Zahl toter Zellen bei 100% lag, wurde nur für die Konzentrationen 10-30 μM die Art des induzierten Zelltods untersucht. In Übereinstimmung mit den Berichten von Herbst et al. (1999) und Levonen et al. (2001) induzierte HNE nach 6 h Behandlung konzentrationsabhängig Apoptose in HUVECs, wie durch Bestimmung der Annexin V-Bindung im Durchflusszytometer gezeigt werden konnte. Während 20 μM HNE in der Lage waren die Zahl apoptotischer Zellen im Vergleich zu 10 μM HNE zu erhöhen, konnten 30 μM HNE keine weitere Steigerung der Apoptoserate induzieren. Dies ist wahrscheinlich auf den stärkeren Anstieg der PI-positiven und damit nekrotischen Zellen zurückzuführen.

Die Bestätigung der Apoptoseinduktion durch HNE erfolgte durch Messung der Caspase-3-Aktivierung sowohl im Western Blot als auch durchflusszytometrisch. Beide Methoden zeigten eindeutig, dass bereits eine 3-stündige HNE-Behandlung Caspase-3 in HUVECs aktivierte. In der Arbeit von [Usatyuk & Natarajan \(2004\)](#) konnte in Endothelzellen aus Rinderlungen nach 4-stündiger Behandlung mit 1-25 μM HNE keine Caspase-3-Aktivierung beobachtet werden. Höhere Konzentrationen, 50 und 100 μM HNE, führten dagegen zu einer signifikanten Aktivierung der Caspase-3. Kolonkarzinomzellen zeigten übereinstimmend nach 5 h Behandlung mit 60 μM HNE eine Aktivierung der Caspase-3 ([Ji et al. 2001](#)). Eine mit HUVECs vergleichbare Empfindlichkeit zeigten Jurkat T-Zellen, in denen 20 μM HNE ebenfalls nach 3 h Caspase-3 aktivierte ([Liu et al. 2000](#)).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass HNE in HUVECs zeit- und konzentrationsabhängig die Zellvitalität durch Apoptoseinduktion reduzierte. HNE zeigte unter den gewählten Testbedingungen einen engen Dosis-Wirkungsbereich, wobei 30 μM HNE die Zellvitalität nach 24 h drastisch verringerte, während 10 μM eine geringe Apoptoseinduktion zeigten. Die Verwendung von 20 μM HNE führte sowohl zu einer deutlichen Reduktion der Zellvitalität als auch einer signifikanten Apoptoseinduktion. Diese Konzentration wurde für die weiteren Untersuchungen der HNE-induzierten Apoptose sowie als Modellsubstanz zur Untersuchung des Einflusses ungesättigter Fettsäuren auf die Apoptoseinduktion verwendet (siehe Kapitel [5.3.1](#) und [6.3](#)).

6.2.2 Induktion von oxidativem Stress durch HNE

Oxidativer Stress kann einerseits zur Bildung von HNE führen, andererseits durch HNE aufgrund seiner Reaktivität mit zahlreichen Zellbestandteilen induziert werden ([Uchida 2003](#), [Usatyuk & Natarajan 2004](#)). Insbesondere die Reaktion des HNE mit dem intrazellulären Antioxidans GSH kann das zelluläre Redoxmilieu verändern und damit zahlreiche Signalwege beeinflussen. Um die durch HNE induzierten Veränderungen des Redoxgleichgewichts zu untersuchen, wurde zum einen der GSH-Gehalt bestimmt und zum anderen die Produktion der Superoxidanionen, einer Fraktion der reaktiven Sauerstoffradikale.

Die Messung der Superoxidanionen zeigte einen zeitabhängigen Anstieg über den gesamten beobachteten Zeitraum von 6 h. Bereits nach 2 h war eine vermehrte Bildung von Superoxidanionen sichtbar, die nach 4 h signifikant erhöht war und bis zu 6 h weiter anstieg. Die anschließende Bestimmung des GSH-Gehalts während der ersten 2 h der HNE-Behandlung zeigte eine rasche Reduktion des intrazellulären GSH durch HNE. Innerhalb von 30 min nach HNE-Zugabe war der GSH-Gehalt ca. 50 % reduziert und sank auf unter 20 % des Ausgangswertes nach 2 h HNE-Behandlung ab. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten einen ähnlichen Zeitverlauf der GSH-Depletion durch HNE in anderen Zellmodellen zeigen ([Liu et al. 2000](#), [Ji et al. 2001](#), [Minekura et al. 2001](#)). Die Veränderung des Redoxmilieus durch Depletion des intrazellulären GSH-Gehalts könnte für den Anstieg der Superoxidanionen verantwortlich sein. Unklar bleibt die Quelle der Superoxidanionen. Zum einen ist eine verringerte Eliminationsrate durch die verantwortlichen Enzyme denkbar, zum anderen eine verstärkte Bildung oder verstärkte Freisetzung etwa aus Mitochondrien infolge der Apoptoseinduktion.

6.2.3 Einfluss von HNE auf verschiedene Kinasen

Sowohl MAPKs als auch die Proteinkinase Akt sind in die Regulation von Proliferation und Apoptose involviert. Während eine Aktivierung der MAPK ERK und der Kinase Akt wachstumsstimulierende, anti-apoptotische Signale darstellen, wird die Aktivierung von p38 als wachstumshemmendes, pro-apoptotisches Signal angesehen (vgl. Kapitel 2.2). Die Rolle von JNK in der Apoptose scheint abhängig zu sein von der Art des Stimulus und dem betrachteten Zelltyp. Alle vier Proteinkinasen können durch oxidativen Stress in ihrer Aktivität sowie ihrem Aktivierungszustand beeinflusst werden.

Die Untersuchung der MAPKs nach HNE-Behandlung erfolgte durch Analyse der phosphorylierten Proteine und Bestimmung des Gesamtproteins im Western Blot. Alle drei MAPK wurden durch HNE in ihrer Aktivierung beeinflusst. Da die HNE-Behandlung mit einem Wechsel des Zellkulturmediums verbunden war, wurde für jeden Zeitpunkt eine Kontrolle mitgeführt, welche die gleiche Menge des Lösungsmittels Ethanol enthielt. Dabei zeigte sich, dass der Mediumwechsel die MAPKs in ihrer Aktivität beeinflusste. Der Mediumwechsel scheint dabei zu einer Hemmung der c-jun-Phosphorylierung sowie einer verstärkten Aktivierung sowohl von p38 als auch ERK zu führen. Nach 15 min waren diese Effekte bereits aufgehoben. Ein ähnlicher Einfluss des Mediumwechsels bzw. des Ethanols in der Kontrolle auf die MAPK ERK konnten Liu et al. (2002) in HUVECs demonstrieren.

Die Behandlung mit 20 μ M HNE führte zu einer raschen Induktion der c-jun-Phosphorylierung, die über den gesamten beobachteten Zeitraum bis zu 60 min erhalten blieb. Die Aktivierung der MAPK p38 blieb in den HNE-behandelten Zellen über 60 min im Vergleich zur Kontrolle erhalten. Ein vergleichbarer Einfluss war auf die MAPK ERK zu sehen. Insbesondere die Aktivierung von JNK durch HNE wurde in einigen anderen Studien beschrieben. So konnte in hepatischen Zellen (Parola et al. 1998), in neuronalen Zellen (Song et al. 2001) sowie Epithelzellen aus Rattenlebern (Uchida et al. 1999) eine Aktivierung von JNK nach HNE-Behandlung nachgewiesen werden. Die Arbeitsgruppe von Cheng et al. (2001) konnte in HL-60-Zellen die Phosphorylierung von c-jun nach 30 min beobachten. In Epithelzellen konnte zusätzlich die Aktivierung von p38 nach 30 min HNE-Behandlung gezeigt werden (Uchida et al. 1999, Kumagai et al. 2002). Daneben beobachtete die Arbeitsgruppe von Uchida et al. (1999) eine moderate Phosphorylierung von ERK nach 30-minütiger HNE-Behandlung, allerdings konnten sie keine Phosphorylierung eines Zielproteins nachweisen. Die Autoren nahmen daher an, dass HNE zwar JNK und p38, nicht aber ERK aktiviert. Da im Rahmen dieser Arbeit nur c-jun als Zielprotein von JNK untersucht wurde, kann keine Aussage über die tatsächliche Aktivität von ERK in HUVECs nach HNE-Behandlung gemacht werden.

Die Analyse der Phosphorylierung der Proteinkinase Akt zeigte ebenfalls eine Aktivierung von Akt durch den Mediumwechsel bzw. das darin enthaltene Ethanol mit einer maximalen Aktivierung nach 30 min. Dies steht in Übereinstimmung mit der Arbeit von Liu et al. (2002), die eine dosis-abhängige Aktivierung von Akt in HUVECs zeigen konnten. Diese Aktivierung wurde durch HNE vollständig gehemmt.

HNE zeigte damit einen deutlichen Effekt auf das Aktivierungsmuster der MAPK und der Proteinkinase Akt. Die Aktivierung der pro-apoptotischen Kinasen JNK und p-38 sowie die Hemmung der anti-apoptotischen Kinase Akt führt zu einer Verschiebung des Profils zugunsten

6 Diskussion

der Apoptose. Inwieweit diese Verschiebung für die Apoptoseinduktion verantwortlich ist oder diese fördert, sollte durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

Abbildung 6.2 zeigt eine schematische Darstellung der HNE-induzierten Effekte in humanen Endothelzellen.

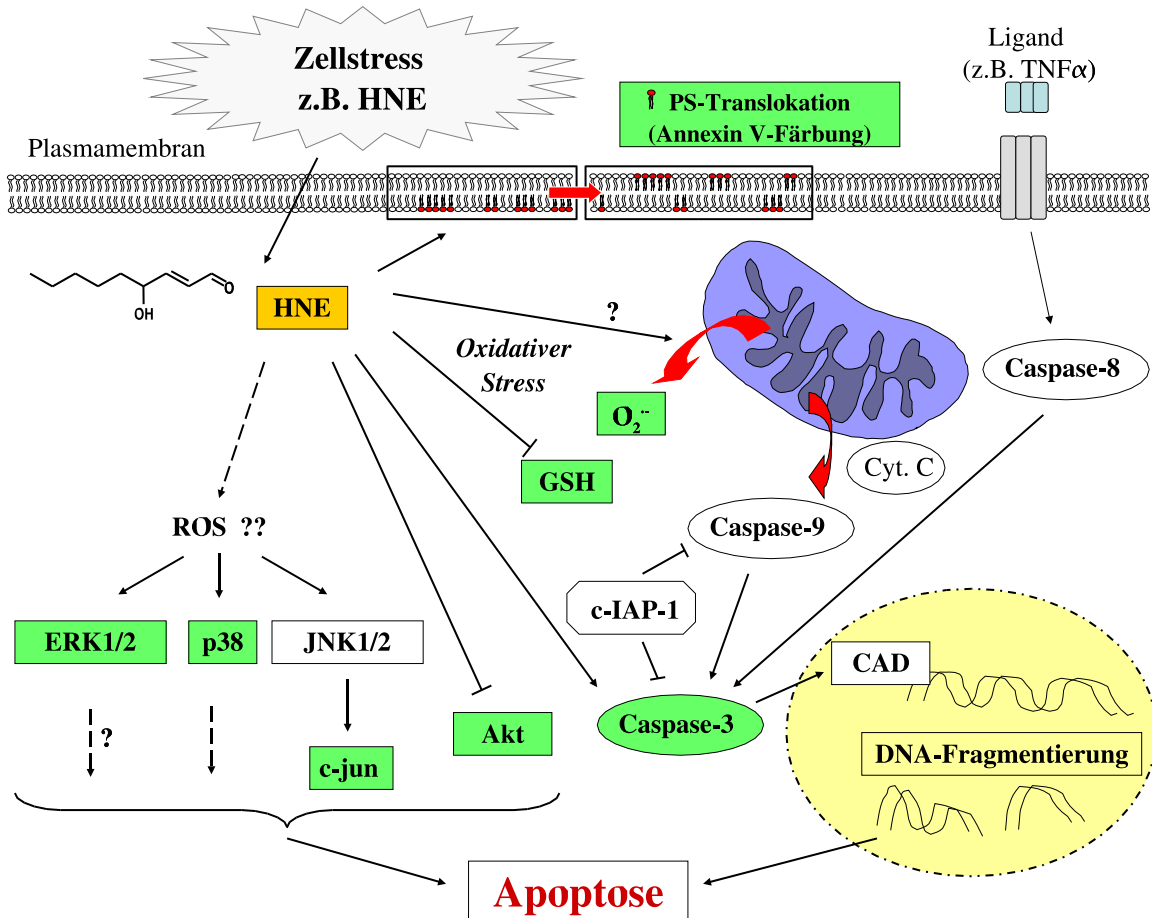


Abbildung 6.2: Schematische Darstellung der untersuchten Effekte des Lipidperoxidationsprodukts HNE. Grün unterlegt sind die untersuchten Parameter.

6.3 Vergleichende Untersuchung der Arachidonsäure sowie Docosahexaensäure in HUVECs

Der Einfluss von Nahrungslipiden sowie ihrer Zusammensetzung auf die Arteriosklerose ist unbestritten (Weber 1989, Lusic 2000). Angefangen mit den Arbeiten von Bang und Dyerberg konnten zahlreiche Studien protektive Effekte von Fischölen und ihrer wichtigsten hochungesättigten Fettsäuren, EPA und DHA, gegenüber kardiovaskulären Erkrankungen beim Menschen zeigen, die durch Arbeiten an Zellkulturmodellen weiter untermauert wurden (vgl. Kapitel 2.3.2).

Die Funktion des vaskulären Endothels konnte in verschiedenen Studien als Marker für eine Voraussage kardiovaskulärer Ereignisse identifiziert werden (Widlansky et al. 2003). Eine Dysfunktion des Endothels ist mit einem höheren Risiko für Herz-Kreislaufkrankungen assoziiert. Es konnte gezeigt werden, dass Faktoren, die das Risiko für Herz-Kreislaufkrankungen senken, die Funktion des Endothels verbessern (Widlansky et al. 2003). Zu diesen Faktoren gehören die hochungesättigten n-3 Fettsäuren, die in hypercholesterinämischen Patienten die Endothelfunktion verbessern konnten (Goodfellow et al. 2000). Aber nicht nur Patienten mit bestehenden Erkrankungen können von einer erhöhten Zufuhr an n-3 Fettsäuren profitieren. Leeson et al. (2002) konnten zeigen, dass in jungen Erwachsenen, die rauchten oder erhöhte Plasmaspiegel an Insulin, Triglyzeriden und Glucose, typische Risikofaktoren kardiovaskulärer Erkrankungen, aufwiesen, eine verbesserte Endothelfunktion signifikant mit einem höheren n-3 Fettsäure-Plasmaspiegel assoziiert war.

6.3.1 Einfluss der Fettsäuren auf die HNE-induzierte Apoptose

Die initialen Experimente hatten zum Ziel, verschiedene ungesättigte Fettsäuren auf einen möglichen Einfluss gegenüber HNE-induzierter Apoptose zu untersuchen. Sie konnten zeigen, dass die n-3 Fettsäure DHA die Apoptoseinduktion durch HNE signifikant verringern konnte. Weder Ölsäure, eine einfach ungesättigte Fettsäure noch die beiden n-6 Fettsäuren LA und AA zeigten einen Effekt auf die HNE-induzierte Apoptose nach 24 h. DHA zeigte sehr früh, bereits nach 6 h HNE-Behandlung, eine signifikante Reduktion nicht nur apoptotischer Zellen, sondern konnte darüberhinaus den Anstieg nekrotischer Zellen, zu denen auch die sekundär nekrotischen gehören, deutlich reduzieren. Ein protektiver Effekt der DHA gegenüber Stress-induzierter Apoptose wurde nur in wenigen Studien berichtet. Zwei Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass eine Vorbehandlung mit DHA Apoptose in Photorezeptoren der Ratte (Rotstein et al. 1997, 2003) und Neuro 2A-Zellen der Maus (Kim et al. 2000, Akbar & Kim 2002) hemmen konnte, wobei Photorezeptoren in Kultur auf die exogene Zufuhr von DHA angewiesen sind (Rotstein et al. 1997). Weder OA noch AA zeigten in den genannten Arbeiten einen Schutzeffekt. Kishida et al. (1998) konnten zeigen, dass DHA im Gegensatz zu OA, AA und EPA, HL-60-Zellen vor Sphingosin-induzierter Apoptose schützt.

Der Schutzeffekt der DHA in HUVECs gegenüber HNE-induzierter Apoptose konnte auf der Ebene der Caspasenaktivierung bestätigt werden. Die aktive Caspase-3 war nach 6 h HNE-Behandlung in DHA-behandelten Zellen um ca. 34 % im Vergleich zur Kontrolle reduziert. Die Bestimmung der Caspase-3 im Western Blot konnte die Reduktion bestätigen. Die Behandlung der Zellen mit AA zeigte dagegen im Durchflusszytometer eine verstärkte Aktivie-

rung der Caspase-3, die allerdings im Western Blot nicht bestätigt werden konnte. [Akbar & Kim \(2002\)](#) konnten übereinstimmend in Neuro 2A-Zellen eine Hemmung der Caspase-3 durch DHA-Vorbehandlung zeigen.

6.3.2 Unterschiedlicher Einfluss beider Fettsäuren auf den HNE-induzierten oxidativen Stress

Ein möglicher Mechanismus der Protektion durch DHA könnte eine Verhinderung der HNE-induzierten Depletion des intrazellulären GSHs darstellen. Eine 24-stündige Behandlung der Endothelzellen mit 20 μ M DHA führte zu einer signifikanten Erhöhung des GSH-Spiegels. Im Gegensatz dazu war der GSH-Gehalt nach AA-Behandlung signifikant erniedrigt. Die Arbeitsgruppe von [Komatsu et al. \(2003\)](#) konnte in murinen Makrophagen eine deutliche Induktion von GSH nach 24-stündiger Behandlung mit DHA zeigen.

Der erhöhte GSH-Spiegel nach DHA-Vorbehandlung konnte die Endothelzellen nicht vor dem HNE-induzierten Abfall schützen, diesen allerdings signifikant verringern. Sowohl nach 30 min als auch nach 2 h HNE-Behandlung war der GSH-Gehalt gegenüber Kontrolle und AA signifikant erhöht. AA dagegen verstärkte die HNE-induzierte GSH-Abnahme.

Trotz des geringen Effektes auf den GSH-Spiegel konnte DHA im Gegensatz zu AA den Anstieg der Superoxidanionen durch HNE deutlich verringern. In RAW264-Makrophagen verhinderte DHA die Bildung intrazellulärer Peroxide ([Komatsu et al. 2003](#)). [Bechoua et al. \(1999\)](#) konnten in humanen Lymphozyten zeigen, dass DHA die durch Wasserstoffperoxid induzierte Lipidperoxidation verhindern konnte.

DHA zeigte damit einen deutlichen Einfluss auf das zelluläre Redoxgleichgewicht sowie die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies nach HNE-Behandlung. Die genaue Rolle der Superoxidanionen in der HNE-induzierten Apoptose bleibt offen und bedarf weiterer Experimente, bei denen insbesondere die Herkunft der Superoxidanionen geklärt werden sollte.

6.3.3 Expression des Caspase-Inhibitors c-IAP-1

Die anti-apoptotischen Proteine der IAP-Familie können aktivierte Caspasen hemmen (vgl. Kapitel 2.2). Eine Induktion von IAPs stellt damit einen weiteren möglichen Mechanismus der beobachteten Hemmung aktivierter Caspase-3 nach DHA-Behandlung dar. Als Vertreter der IAP-Familie wurde die Expression der mRNA und die Proteinexpression von c-IAP-1 bestimmt. DHA konnte sowohl die c-iap-1 mRNA nach 4-stündiger Behandlung als auch die Expression des c-IAP-1-Proteins nach 24 h im Vergleich zur Kontrolle erhöhen. AA zeigte weder auf mRNA- noch auf Proteinebene einen Einfluss auf c-IAP-1.

Ein Effekt von DHA auf die Expression anti-apoptotischer Proteine der IAP-Familie wurde bislang nicht beschrieben.

Die transkriptionelle Kontrolle des c-IAP-1 Expression ist noch weitgehend ungeklärt (vgl. Kapitel 2.2). Als potentieller Transkriptionsfaktor wurde bisher NF- κ B identifiziert ([Erl et al. 1999](#), [LeBlanc 2003](#)). Die Untersuchung dieses Transkriptionsfaktors nach DHA-Behandlung ergab in den bislang durchgeführten Versuchen in HUVECs kein eindeutiges Ergebnis. HUVECs zeigten eine niedrige basale NF- κ B-Aktivität. In einzelnen Versuchen deutete sich eine Aktivierung von NF- κ B durch DHA an, andere zeigten dagegen eine Hemmung. Eine Aktivierung von NF- κ B durch Fettsäuren wurde bislang nur für AA beschrieben ([Camandola](#)

6.3 Vergleichende Untersuchung der Arachidonsäure sowie Docosahexaensäure in HUVECs

et al. 1996, Stuhlmeier et al. 1997), während die n-3 Fettsäure EPA NF- κ B in der monozytären Zelllinie U937 nicht aktivierte (Camandola et al. 1996). Eine Aktivierung von NF- κ B nach Zytokinstimulation konnte dagegen übereinstimmend in Endothelzellen gezeigt werden (Weber et al. 1995, Stuhlmeier et al. 1997). Für die Identifizierung der Rolle von DHA auf die Aktivität dieses Transkriptionsfaktors sind weitere Untersuchungen notwendig.

In ihrer Arbeit an Neuro2A-Zellen konnten Kim et al. (2000) zeigen, dass eine durch DHA induzierte Aktivierung der Proteinkinase Akt für die Hemmung der Caspase-3 in neuronalen Zellen notwendig ist. In Studien an verschiedenen Zellmodellen wurde darüberhinaus gezeigt, dass die Proteinkinase Akt die Expression anti-apoptotischer Proteine der IAP-Familie reguliert (Papapetropoulos et al. 2000, Gagnon et al. 2003, Dan et al. 2004). Kim et al. (2004) konnten in Neuroblastomzellen zeigen, dass eine Hemmung der PI3K und der damit verbundenen Reduktion der Akt-Aktivität zu einer reduzierten Expression des IAP-Proteins Survivin führte, wodurch es zu einer erleichterten Apoptoseinduktion kam. Diese Studien deuten darauf hin, dass eine Aktivierung der Proteinkinase Akt durch DHA für die Induktion der c-IAP-1 Expression verantwortlich sein könnte.

Die ersten Ergebnisse der Analyse einer Akt-Phosphorylierung nach DHA-Behandlung konnten eine zeitabhängige Aktivierung von Akt durch DHA zeigen. Bereits nach 30 min war eine deutliche p-Akt-Bande nachweisbar, während AA keine Aktivierung der Proteinkinase Akt zeigte. Weitere Versuche sollen diesen Effekt bestätigen.

Eine Beteiligung des NF- κ B-Systems kann nicht ausgeschlossen werden, da Akt das NF- κ B-System aktivieren kann.

In Abbildung 6.3 sind die Effekte der n-3 Fettsäure DHA auf die HNE-induzierte Apoptose humaner Endothelzellen schematisch zusammengefasst.

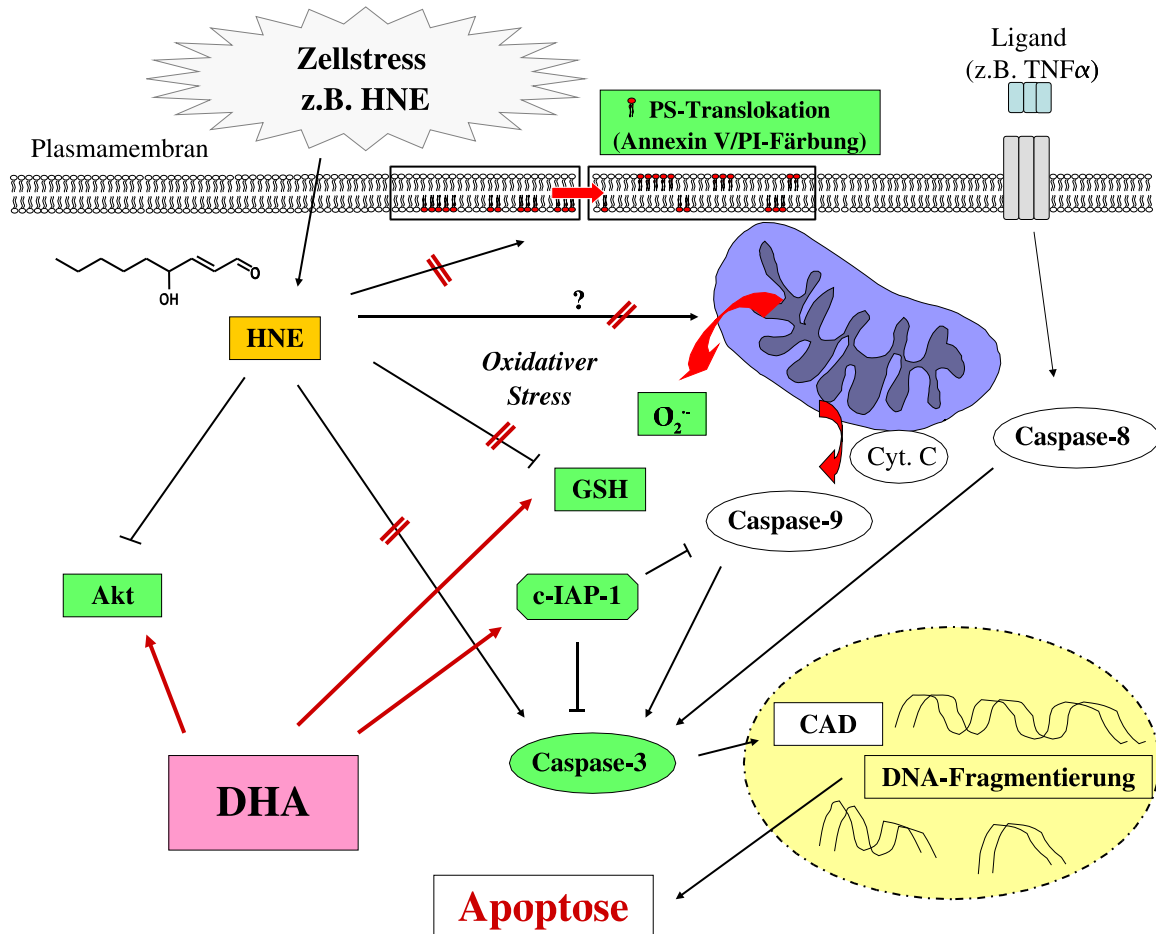


Abbildung 6.3: Schema der protektiven Effekte der DHA gegenüber HNE-induzierter Endothelzellapoptose. Die untersuchten Parameter sind grün unterlegt. Rot durchgestrichene Pfeile stellen den anti-apoptotischen Effekt der DHA dar. Rote Pfeile bedeuten eine Induktion bzw. Aktivierung des Proteins durch DHA.

7 Zusammenfassung

Apoptose in Endothelzellen wird seit längerem als Auslöser für die Entstehung arteriosklerotischer Veränderungen der Gefäßwand diskutiert. Während ein *in vivo* Beweis dafür noch aussteht, zeigten zahlreiche *in vitro* Studien, dass viele Risikofaktoren der Arterioskleroseentstehung Apoptose in humanen Endothelzellen induzieren können. Zu diesen Risikofaktoren gehören erhöhte Konzentrationen oxidierter Lipide. Fettsäuren sind Bestandteile von Zellmembranen und komplexer Lipide. Sie sind daher seit langem intensiv beforschte Substanzen, für deren Einfluss auf das Gefäßsystem es deutliche Hinweise gibt. Während n-6 Fettsäuren und insbesondere ihre oxidativen Metabolite als pro-atherogen eingestuft werden, deuten epidemiologische Studien und zunehmend auch Interventionsstudien auf einen protektiven Effekt von n-3 Fettsäuren hin.

In dieser Arbeit wurde zum einen untersucht, ob bestimmte, als atherogen angesehene Metabolite von n-6 Fettsäuren Apoptose in humanen Endothelzellen induzieren können. Der zweite Schwerpunkt der Arbeit beschäftigte sich mit der Wirkung von ungesättigten Fettsäuren auf die durch HNE ausgelöste Endothelzellapoptose.

Es konnte gezeigt werden, dass oxidierte Metabolite der n-6 Fettsäuren in der Lage sind, Apoptose in humanen Endothelzellen zu induzieren.

15d-PGJ₂, der bekannteste Vertreter der Cyclopentenon-Prostaglandine, ist ein wirkungsvoller Induktor von Apoptose in Endothelzellen. Diese Fähigkeit beruht auf seiner einzigartigen molekularen Struktur, wie in einem Vergleich mit strukturell eng verwandten Cyclopentenon-Prostaglandinen gezeigt werden konnte. Der Cyclopentenonring alleine erwies sich als hochreaktive Substanz, die bereits bei 10-fach niedrigeren Konzentrationen im Vergleich zu 15d-PGJ₂ Apoptose induzieren kann. Seitenketten scheinen diese Reaktivität zu modulieren und im Fall von 15d-PGJ₂ diese zum großen Teil zu erhalten.

Darüberhinaus konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass das Lipidperoxidationsprodukt HNE konzentrations- und dosisabhängig Apoptose in humanen Endothelzellen unterschiedlicher Herkunft induzieren kann. Die Behandlung mit HNE reduzierte innerhalb von 2 h den intrazellulären GSH-Gehalt auf etwa 20 % des Ausgangswertes. Parallel zu diesem Abfall stieg die intrazelluläre Bildung der Superoxidanionen an. Diese Veränderung im zellulären Redox-Gleichgewicht spiegelte sich auch in einem veränderten Aktivierungsprofil der MAP-Kinasen wieder.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigte sich mit der Modulation der Apoptose durch n-6 und n-3 Fettsäuren.

Die Untersuchungen zeigten, dass n-6 und n-3 Fettsäuren unterschiedliche Effekte auf die durch HNE induzierte Apoptose ausübten. Eine 24-stündige Vorbehandlung konfluenter HUVECs mit der n-3 Fettsäure DHA führte zu einer signifikanten Reduktion der HNE-

7 Zusammenfassung

induzierten Apoptose, während die Vorbehandlung mit der n-6 Fettsäure AA keinen signifikanten Effekt auf die HNE-induzierte Apoptose zeigte. Dieser Unterschied war bereits innerhalb der ersten 6 h nach HNE-Behandlung signifikant. Die Bestimmung der Superoxidanionen zeigte, dass DHA die rasche Induktion von oxidativem Stress durch HNE verhindern konnte. Zumindest zum Teil läßt sich diese Beobachtung mit der gezeigten Hochregulation des intrazellulären GSH-Spiegels durch DHA erklären. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass DHA die Aktivierung der Caspase-3 reduziert und die Expression des anti-apoptotischen Proteins und Caspaseinhibitors c-IAP-1 in HUVECs induziert. Erste Ergebnisse weisen auf eine Aktivierung der Proteinkinase Akt als möglichen Signalweg der c-IAP-1-Induktion hin.

Unsere Ergebnisse beschreiben einen möglichen neuen anti-apoptotischen Signalweg, durch den die vielfach beschriebene Endothel-protective Wirkung der n-3 Fettsäure DHA erklärt werden könnte.

Literaturverzeichnis

- Akbar, M., Kim, H.-Y. (2002): Protective effects of docosahexaenoic acid in staurosporine-induced apoptosis: Involvement of phosphatidylinositol-3 kinase pathway, *Journal of Neurochemistry* **82**, 655–665
- Ali, N., Yoshizumi, M., Tsuchiya, K., Kyaw, M., Fujita, Y., Izawa, Y., Abe, S., Kanematsu, Y., Kagami, S., Tamaki, T. (2004): Ebselen inhibits p38 mitogen-activated protein kinase-mediated endothelial cell death by hydrogen peroxide, *European Journal of Pharmacology* **485**, 127–135
- Asai, K., Kudej, R. K., Shen, Y.-T., Yang, G.-P., Takagi, G., Kudej, A. B., Geng, Y.-J., Sato, N., Nazareno, J. B., Vatner, D. E., Natividad, F., Bishop, S. P., Vatner, S. F. (2000): Peripheral vascular endothelial dysfunction and apoptosis in old monkeys, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **20**(6), 1493–1499
- Ascherio, A., Rimm, E. B., Stampfer, M. J., Giovannucci, E. L., Willett, W. C. (1995): Dietary intake of marine n-3 fatty acids, fish intake, and the risk of coronary disease among men, *New England Journal of Medicine* **332**(15), 977–983
- Bechoua, S., Dubois, M., Dominguez, Z., Goncalves, A., Nemoz, G., Lagarde, M., Prigent, A.-F. (1999): Protective effect of docosahexaenoic acid against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human lymphocytes, *Biochemical Pharmacology* **57**(9), 1021–1030
- Bishop-Bailey, D., Hla, T. (1999): Endothelial cell apoptosis induced by the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) ligand 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂, *Journal of Biological Chemistry* **274**(24), 17042–17048
- Bombeli, T., Karsan, A., Tait, J. F., Harlan, J. M. (1997): Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant, *Blood* **89**(7), 2429–2442
- Bombeli, T., Schwartz, B. R., Harlan, J. M. (1999): Endothelial cells undergoing apoptosis become proadhesive for nonactivated platelets, *Blood* **93**(11), 3831–3838
- Brash, A. R. (2001): Arachidonic acid as a bioactive molecule, *Journal of Clinical Investigation* **107**(11), 1339–1345
- Brown, A. A., Hu, F. B. (2001): Dietary modulation of endothelial function: Implications for cardiovascular disease, *American Journal of Clinical Nutrition* **73**(4), 673–686

- Bucher, H. C., Hengstler, P., Schindler, C., Meier, G. (2002): N-3 polyunsaturated fatty acids in coronary heart disease: A meta-analysis of randomized controlled trials, *American Journal of Medicine* **112**, 298–304
- Bureau, F., Desmet, C., Melotte, D., Jaspard, F., Volanti, C., Vanderplasschen, A., Pastoret, P.-P., Piette, J., Lekeux, P. (2002): A proinflammatory role for the cyclopentenone prostaglandins at low micromolar concentrations: Oxidative stress-induced extracellular signal-regulated kinase activation without NF- κ B inhibition, *Journal of Immunology* **168**, 5318–5325
- Burr, M. L., Gilbert, J. F., Holliday, R. M., Elwood, P. C., Fehily, A. M., Rogers, S., Sweetnam, P. M., Deadman, N. M. (1989): Effects of changes in fat, fish, and fibre intakes on death and myocardial reinfarction: diet and reinfarction trial (DART), *Lancet* **334**, 757–761
- Camandola, S., Leonarduzzi, G., Musso, T., Varesio, L., Carini, R., Scavazza, A., Chiarpotto, E., Baeuerle, P. A., Poli, G. (1996): Nuclear factor κ B is activated by arachidonic acid but not by eicosapentaenoic acid, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **229**(2), 643–647
- Camandola, S., Poli, G., Mattson, M. P. (2000): The lipid peroxidation product 4-hydroxy-2,3-nonenal increases AP-1-binding activity through caspase activation in neurons, *Journal of Neurochemistry* **74**, 159–168
- Caplan, B. A., Schwartz, C. J. (1973): Increased endothelial cell turnover in areas of in vivo Evans Blue uptake in the pig aorta, *Atherosclerosis* **17**, 401–417
- Cernuda-Morollon, E., Pineda-Molina, E., Canada, F. J., Perez-Sala, D. (2001): 15-Deoxy- δ 12,14-prostaglandin J2 inhibition of NF- κ B-DNA binding through covalent modification of the p50 subunit, *Journal of Biological Chemistry* **276**(38), 35530–35536
- Chang, L., Karin, M. (2001): Mammalian MAP kinase signalling cascades, *Nature* **410**, 37–40
- Cheng, J.-Z., Singhal, S. S., Sharma, A., Saini, M., Yang, Y., Awashti, S., Zimniak, P., Awashti, Y. C. (2001): Transfection of mGSTA4 in HL-60 cells protects against 4-hydroxynonenal-induced apoptosis by inhibiting JNK-mediated signaling, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **392**, 197–207
- Choy, J. C., Granville, D. J., Hunt, D. W. C., McManus, B. M. (2001): Endothelial cell apoptosis: Biochemical characteristics and potential implications for atherosclerosis, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **33**, 1673–1690
- Cines, D. B., Pollak, E. S., Buck, C. A., Loscalzo, J., Zimmerman, G. A., McEver, R. P., Pober, J. S., Wick, T. M., Konkle, B. A., Schwartz, B. S., Barnathan, E. S., McCrae, K. R., Hug, B. A., Schmidt, A.-M., Stern, D. M. (1998): Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders, *Blood* **91**(10), 3527–3561
- Crosby, A. J., Wahle, K. W. J., Duthie, G. G. (1996): Modulation of glutathione peroxidase activity in human vascular endothelial cells by fatty acids and the cytokine interleukin-1 beta, *Biochimica et Biophysica Acta* **1303**, 187–192

- Dan, H. C., Jiang, K., Coppola, D., Hamilton, A., Nicosia, S. V., Sebti, S. M., Cheng, J. Q. (2004): Phosphatidylinositol-3-OH kinase/AKT and survivin pathways as critical targets for geranylgeranyltransferase I inhibitor-induced apoptosis, *Oncogene* **23**, 706–715
- Daviglus, M. L., Stamler, J., Orencia, A. J., Dyer, A. R., Liu, K., Greenland, P., Walsh, M. K., Morris, D., Shekelle, R. B. (1997): Fish consumption and the 30-year risk of fatal myocardial infarction, *New England Journal of Medicine* **336**(15), 1046–1053
- De Caterina, R., Cybulsky, M. I., Clinton, S. K., Gimbrone, Jr, M., Libby, P. (1994): The omega-3 fatty acid docosahexaenoate reduces cytokine-induced expression of proatherogenic and proinflammatory proteins in human endothelial cells, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **14**, 1829–1836
- Deveraux, Q., Takahashi, R., Salvesen, G., Reed, J. (1997): X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases, *Nature* **388**, 300–304
- Dimmeler, S., Haendeler, J., Rippmann, V., Nehls, M., Zeiher, A. M. (1996): Shear stress inhibits apoptosis of human endothelial cells, *FEBS Letters* **399**, 71–74
- Dimmeler, S., Haendeler, J., Zeiher, A. (2002): Regulation of endothelial cell apoptosis in atherothrombosis, *Current Opinion in Lipidology* **13**, 531–536
- Din, J. N., Newby, D. E., Flapan, A. D. (2004): Omega 3 fatty acids and cardiovascular disease—fishing for a natural treatment, *British Medical Journal* **328**(7430), 30–35
- Dyerberg, J., Bang, H., Hjorne, N. (1975): Fatty acid composition of the plasma lipids in Greenland Eskimos, *American Journal of Clinical Nutrition* **28**(9), 958–966
- Erl, W., Hansson, G. K., de Martin, R., Draude, G., Weber, K. S. C., Weber, C. (1999): Nuclear factor-kappaB regulates induction of apoptosis and inhibitor of apoptosis protein-1 expression in vascular smooth muscle cells, *Circulation Research* **84**(6), 668–677
- Esterbauer, H., Jurgens, G., Quehenberger, O., Koller, E. (1987): Autoxidation of human low density lipoprotein: Loss of polyunsaturated fatty acids and vitamin E and generation of aldehydes, *Journal of Lipid Research* **28**(5), 495–509
- Esterbauer, H., Schaur, R. J., Zollner, H. (1991): Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes, *Free Radical Biology and Medicine* **11**(1), 81–128
- Ferri, K. F., Kroemer, G. (2001): Organelle-specific initiation of cell death pathways, *Nature Cell Biology* **3**, E255–E263
- Forman, B. M., Tontonoz, P., Chen, J., Brun, R. P., Spiegelman, B. M., Evans, R. M. (1995): 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma, *Cell* **83**, 803–812
- Franke, T. F., Hornik, C. P., Segev, L., Shostak, G. A., Sugimoto, C. (2003): PI3K/Akt and apoptosis: size matters, *Oncogene* **22**, 8983–8998

- Fu, Y., Luo, N., Lopes-Virella, M. F. (2002): Upregulation of interleukin-8 expression by prostaglandin D2 metabolite 15-deoxy-delta12, 14 prostaglandin J2 (15d-PGJ2) in human THP-1 macrophages, *Atherosclerosis* **160**(1), 11–20
- Gagnon, V., St-Germain, M.-E., Parent, S., Asselin, E. (2003): Akt activity in endometrial cancer cells: Regulation of cell survival through cIAP-1, *International Journal of Oncology* **23**, 803–810
- GISSI-Prevenzione Investigators (1999): Dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids and vitamin E after myocardial infarction: Results of the GISSI-Prevenzione trial (Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto miocardico), *Lancet* **354**(9177), 447–455
- Goodfellow, J., Bellamy, M. F., Ramsey, M. W., Jones, C. J. H., Lewis, M. J. (2000): Dietary supplementation with marine omega-3 fatty acids improve systemic large artery endothelial function in subjects with hypercholesterolemia, *Journal of the American College of Cardiology* **35**, 265–270
- Gordon, G. J., Appasani, K., Parcels, J. P., Mukhopadhyay, N. K., Jaklitsch, M. T., Richards, W. G., Sugarbaker, D. J., Bueno, R. (2002): Inhibitor of apoptosis protein-1 promotes tumor cell survival in mesothelioma, *Carcinogenesis* **23**, 1017–1024
- Guallar, E., Aro, A., Jimenez, F. J., Martin-Moreno, J. M., Salminen, I., van't Veer, P., Kardinaal, A. F. M., Gomez-Aracena, J., Martin, B. C., Kohlmeier, L., Kark, J. D., Mazaev, V. P., Ringstad, J., Guillen, J., Riemersma, R. A., Huttunen, J. K., Thamm, M., Kok, F. J. (1999): Omega-3 fatty acids in adipose tissue and risk of myocardial infarction: The EURAMIC Study, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **19**(4), 1111–1118
- Hamel, L., Kenney, M., Clark, K., Merkel, L., Rojas, C. (2000): Preconditioning of human smooth muscle cells via cyclopentenone prostaglandins protects against toxic effects of oxidized low-density lipoprotein, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **269**(2), 327–330
- Hansson, G., Chao, S., Schwartz, S., Reidy, M. (1985): Aortic endothelial cell death and replication in normal and lipopolysaccharide-treated rats, *American Journal of Pathology* **121**, 123–127
- Hattori, Y., Hattori, S., Kasai, K. (2001): 4-Hydroxynonenal prevents NO production in vascular smooth muscle cells by inhibiting nuclear factor- κ B-dependent transcriptional activation of inducible NO synthase, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **21**, 1179–1183
- Haynes, R. L., Brune, B., Townsend, A. J. (2001): Apoptosis in RAW 264.7 cells exposed to 4-hydroxynonenal: Dependence on cytochrome c release but not p53 accumulation, *Free Radical Biology and Medicine* **30**, 884–894
- Herbst, U., Toborek, M., Kaiser, S., Mattson, M. P., Hennig, B. (1999): 4-Hydroxynonenal induces dysfunction and apoptosis of cultured endothelial cells, *Journal of Cellular Physiology* **181**, 295–303

- Hoefen, R. J., Berk, B. C. (2002): The role of MAP kinases in endothelial activation, *Vascular Pharmacology* **38**, 271–273
- Hoffmann, J., Haendeler, J., Aicher, A., Rossig, L., Vasa, M., Zeiher, A. M., Dimmeler, S. (2001): Aging enhances the sensitivity of endothelial cells toward apoptotic stimuli: Important role of nitric oxide, *Circulation Research* **89**(8), 709–715
- Hyun, D.-H., Lee, M.-H., Halliwell, B., Jenner, P. (2002): Proteasomal dysfunction induced by 4-hydroxy-2,3-*trans*-nonenal, an end-product of lipid peroxidation: A mechanism contributing to neurodegeneration?, *Journal of Neurochemistry* **83**, 360–370
- Itakura, K., Oya-Ito, T., Osawa, T., Yamada, S., Toyokuni, S., Shibata, N., Kobayashi, M., Uchida, K. (2000): Detection of lipofuscin-like fluorophore in oxidized human low-density lipoprotein: 4-Hydroxy-2-nonenal as a potential source of fluorescent chromophore, *FEBS Letters* **473**, 249–253
- Jackson, S. M., Parhami, F., Xi, X. P., Berliner, J. A., Hsueh, W. A., Law, R. E., Demer, L. L. (1999): Peroxisome proliferator-activated receptor activators target human endothelial cells to inhibit leukocyte-endothelial interaction, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **19**, 2094–2104
- Jaffe, E. A., Nachman, R. L., Becker, C. G., Minick, C. R. (1973): Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins, *Journal of Clinical Investigation* **52**, 2745–2756
- Ji, C., Amarnath, V., Pietenpol, J. A., Marnett, L. J. (2001): 4-Hydroxynonenal induces apoptosis via caspase-3 activation and cytochrom c release, *Chemical Research in Toxicology* **14**, 1090–1096
- Jiang, C., Ting, A. T., Seed, B. (1998): PPAR- γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines, *Nature* **391**, 82–86
- Jozkowicz, A., Dulak, J., Prager, M., Nanobachvili, J., Nigisch, A., Winter, B., Weigel, G., Huk, I. (2001): Prostaglandin-J₂ induces synthesis of interleukin-8 by endothelial cells in a PPAR γ -independent manner, *Prostaglandins and other Lipid Mediators* **66**, 165–177
- Kaufmann, S. H., Hengartner, M. O. (2001): Programmed cell death: Alive and well in the new millennium, *Trends in Cell Biology* **11**, 526–534
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., Currie, A. R. (1972): Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *British Journal of Cancer* **26**, 139–157
- Khan, F., Elherik, K., Bolton-Smith, C., Barr, R., Hill, A., Murrie, I., Belch, J. J. F. (2003): The effects of dietary fatty acid supplementation on endothelial function and vascular tone in healthy subjects, *Cardiovascular Research* **59**, 955–962
- Kim, H.-Y., Akbar, M., Lau, A., Edsall, L. (2000): Inhibition of neuronal apoptosis by docosahexaenoic acid (22:6n-3). ROLE OF PHOSPHATIDYLSERINE IN ANTIAPOPTOTIC EFFECT, *Journal of Biological Chemistry* **275**(45), 35215–35223

- Kim, S., Kang, J., Qiao, J., Thomas, R. P., Evers, B. M., Chung, D. H. (2004): Phosphatidylinositol 3-kinase inhibition down-regulates survivin and facilitates TRAIL-mediated apoptosis in neuroblastomas, *Journal of Pediatric Surgery* **39**, 516–521
- Kishida, E., Yano, M., Kasahara, M., Masuzawa, Y. (1998): Distinctive inhibitory activity of docosahexaenoic acid against sphingosine-induced apoptosis, *Biochimica et Biophysica Acta* **1391**, 401–408
- Kluck, R. M., Bossy-Wetzel, E., Green, D. R., Newmeyer, D. D. (1997): The release of cytochrome C from mitochondria: A primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis, *Science* **275**, 1132–1136
- Komatsu, W., Ishihara, K., Murata, M., Saito, H., Shinohara, K. (2003): Docosahexaenoic acid suppresses nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in interferon- γ plus lipopolysaccharide-stimulated murine macrophages by inhibiting the oxidative stress, *Free Radical Biology and Medicine* **34**, 1006–1016
- Kondo, M., Oya-Ito, T., Kumagai, T., Osawa, T., Uchida, K. (2001): Cyclopentenone prostaglandins as potential inducers of intracellular oxidative stress, *Journal of Biological Chemistry* **276**(15), 12076–12083
- Kondo, M., Shibata, T., Kumagai, T., Oswa, T., Shibata, N., Kobayashi, M., Sasaki, S., Iwata, M., Noguchi, N., Uchida, K. (2002): 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂: The endogenous electrophile that induces neuronal apoptosis, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **99**, 7367–7372
- Kris-Etherton, P. M., Harris, W. S., Appel, L. J. (2002): Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease, *Circulation* **106**, 2747–2757
- Kromhout, D., Bosschieter, E., de Lezenne Coulander, C. (1985): The inverse relation between fish consumption and 20-year mortality from coronary heart disease, *New England Journal of Medicine* **312**(19), 1205–1209
- Kruman, I., Bruce-Keller, A. J., Bredesen, D., Waeg, G., Mattson, M. P. (1997): Evidence that 4-hydroxynonenal mediates oxidative stress-induced neuronal apoptosis, *Journal of Neuroscience* **17**, 5089–5100
- Kruman, I. I., Mattson, M. P. (1999): Pivotal role of mitochondrial calcium uptake in neural cell apoptosis and necrosis, *Journal of Neurochemistry* **72**(2), 529–540
- Kucharczak, J., Simmons, M. J., Fan, Y., Gelinas, C. (2003): To be, or not to be: NF- κ B is the answer - role of Rel/NF- κ B in the regulation of apoptosis, *Oncogene* **22**, 8961–8982
- Kumagai, T., Nakamura, Y., Osawa, T., Uchida, K. (2002): Role of p38 mitogen-activated protein kinase in the 4-hydroxy-2-nonenal-induced cyclooxygenase-2 expression, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **397**, 240–245
- Kuwana, T., Mackey, M. R., Perkins, G., Ellisman, M. H., Latterich, M., Schneiter, R., Green, D. R., Newmeyer, D. D. (2002): Bid, Bax and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane, *Cell* **111**, 331–342

- Kyriakis, J. M., Avruch, J. (2001): Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation, *Physiological Reviews* **81**(2), 807–869
- Leaf, A., Weber, P. C. (1988): Cardiovascular effects of n-3 fatty acids, *New England Journal of Medicine* **318**, 549–557
- LeBlanc, A. C. (2003): Natural cellular inhibitors of caspases, *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* **27**, 215–229
- Leeson, C. P. M., Mann, A., Kattenhorn, M., Deanfield, J. E., Lucas, A., Muller, D. P. R. (2002): Relationship between circulating n-3 fatty acid concentrations and endothelial function in early adulthood, *European Heart Journal* **23**, 216–222
- Lei, K., Davis, R. J. (2003): JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **100**, 2432–2437
- Levonen, A.-L., Dickinson, D. A., Moellering, D. R., Mulcahy, R. T., Forman, H. J., Darley-Usmar, V. M. (2001): Biphasic effects of 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ on glutathione induction and apoptosis in human endothelial cells, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **21**(11), 1846–1851
- Li, L., Tao, J., Davaille, J., Feral, C., Mallat, A., Rieusset, J., Vidal, H., Lotersztajn, S. (2001): 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ induces apoptosis of human hepatic myofibroblasts. A PATHWAY INVOLVING OXIDATIVE STRESS INDEPENDENTLY OF PEROXISOME-PROLIFERATOR-ACTIVATED RECEPTORS, *Journal of Biological Chemistry* **276**(41), 38152–38158
- Lin, A. (2003): Activation of the JNK signaling pathway: Breaking the brake on apoptosis, *BioEssays* **25**, 17–24
- Liu, J., Tian, Z., Gao, B., Kunos, G. (2002): Dose-dependent activation of antiapoptotic and proapoptotic pathways by ethanol treatment in human vascular endothelial cells, DIFFERENT INVOLVEMENT OF ADENOSINE, *Journal of Biological Chemistry* **277**, 20927–20933
- Liu, W., Kato, M., Akhand, A. A., Hayakawa, A., Suzuki, H., Miyata, T., Kurokawa, K., Hotta, Y., Ishikawa, N., Nakashima, I. (2000): 4-Hydroxynonenal induces a cellular redox status-related activation of the caspase cascade for apoptotic cell death, *Journal of Cell Science* **113**, 635–641
- Lusis, A. J. (2000): Atherosclerosis, *Nature* **407**, 233–241
- Maier, J., Lahoua, Z., Gendron, N., Fetni, R., Johnston, A., Davoodi, J., Rasper, D., Roy, S., Slack, R., Nicholson, D., MacKenzie, A. (2002): The neuronal apoptosis inhibitor protein is a direct inhibitor of caspases 3 and 7, *Journal of Neurosciences* **22**, 2035–2043
- McConnell, E. J., Raess, B. U. (2002): Intracellular Ca²⁺ homeostatic regulation and 4-hydroxynonenal-induced aortic endothelial dysfunction, *Endothelium* **9**, 45–53

- Minekura, H., Kumagai, T., Kawamoto, Y., Nara, F., Uchida, K. (2001): 4-Hydroxy-2-nonenal is a powerful endogenous inhibitor of endothelial response, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **282**, 557–561
- Monneret, G., Li, H., Vasilescu, J., Rokach, J., Powell, W. S. (2002): 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandins D₂ and J₂ are potent activators of human eosinophils, *Journal of Immunology* **168**(7), 3563–3569
- Morris, M., Manson, J., Rosner, B., Buring, J., Willett, W., Hennekens, C. (1995): Fish consumption and cardiovascular disease in the physicians' health study: A prospective study, *American Journal of Epidemiology* **142**(2), 166–175
- Muskiet, F. A. J., Fokkema, M. R., Schaafsma, A., Boersma, E. R., Crawford, M. A. (2004): Is docosahexaenoic acid (DHA) essential? Lessons from DHA status regulation, our ancient diet, epidemiology and randomized controlled trials, *Journal of Nutrition* **134**, 183–186
- Nakashima, I., Liu, W., Akhand, A. A., Takeda, K., Kawamoto, Y., Kato, M., Suzuki, H. (2003): 4-Hydroxynonenal triggers multistep signal transduction cascades for suppression of cellular functions, *Molecular Aspects of Medicine* **24**(4-5), 231–238
- Nencioni, A., Lauber, K., Grünebach, F., Brugger, W., Denzlinger, C., Wesselborg, S., Brossart, P. (2002): Cyclopentenone prostaglandins induce caspase activation and apoptosis in dendritic cells by a PPAR- γ -independent mechanism: Regulation by inflammatory and T cell-derived stimuli, *Experimental Hematology* **30**(9), 1020–1028
- Okada, K., Wangpoengtrakul, C., Osawa, T., Toyokuni, S., Tanaka, K., Uchida, K. (1999): 4-Hydroxy-2-nonenal-mediated impairment of intracellular proteolysis during oxidative stress. IDENTIFICATION OF PROTEASOMES AS TARGET MOLECULES, *Journal of Biological Chemistry* **274**(34), 23787–23793
- Page, S., Fischer, W. C., Baumgartner, B., Haas, M., Kreusel, U., Loidl, G., Hayn, M., Ziegler-Heitbrock, H. L., Neumeier, D., Brand, K. (1999): 4-Hydroxynonenal prevents NF- κ B activation and tumor necrosis factor expression by inhibiting I κ B phosphorylation and subsequent proteolysis, *Journal of Biological Chemistry* **274**, 11611–11618
- Palinski, W., Rosenfeld, M. E., Ylä-Herttuala, S., Gurtner, G. C., Socher, S. S., Butler, S. W., Parthasarathy, S., Carew, T. E., Steinberg, D., Witztum, J. L. (1989): Low density lipoprotein undergoes oxidative modification in vivo, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **86**, 1372–1376
- Papapetropoulos, A., Fulton, D., Mahboubi, K., Kalb, R. G., O'Connor, D. S., Li, F., Altieri, D. C., Sessa, W. C. (2000): Angiopoietin-1 inhibits endothelial cell apoptosis via the Akt/Survivin pathway, *Journal of Biological Chemistry* **275**(13), 9102–9105
- Parola, M., Robino, G., Marra, F., Pinzani, M., Bellomo, G., Leonarduzzi, G., Chiarugi, P., Camandola, S., Poli, G., Waeg, G., Gentilini, P., Dianzani, M. U. (1998): HNE interacts directly with JNK isoforms in human hepatic stellate cells, *Journal of Clinical Investigation* **102**, 1942–1950

- Ross, R. (1999): Atherosclerosis—an inflammatory disease, *New England Journal of Medicine* **340**, 115–126
- Rossi, A., Elia, G., Santoro, M. G. (1996): 2-Cyclopenten-1-one, a new inducer of heat shock protein 70 with antiviral activity, *Journal of Biological Chemistry* **271**(50), 32192–32196
- Rössig, L., Dimmeler, S., Zeiher, A. M. (2001): Apoptosis in the vascular wall and atherosclerosis, *Basic Research in Cardiology* **96**, 11–22
- Rotstein, N. P., Avelana, M. I., Barrantes, F. J., Roccamo, A. M., Politi, L. E. (1997): Apoptosis of retinal photoreceptors during development in vitro: Protective effect of docosahexaenoic acid, *Journal of Neurochemistry* **69**, 504–513
- Rotstein, N. P., Politi, L. E., German, O. L., Girotti, R. (2003): Protective effect of docosahexaenoic acid on oxidative stress-induced apoptosis of retina photoreceptors, *Investigative Ophthalmology and Visual Science* **44**(5), 2252–2259
- Roy, N., Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S., Reed, J. C. (1997): The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases, *EMBO Journal* **16**, 6914–6925
- Ruef, J., Moser, M., Bode, C., Kübler, W., Runge, M. S. (2001): 4-Hydroxynonenal induces apoptosis, NF- κ B-activation and formation of 8-isoprostane in vascular smooth muscle cells, *Basic Research in Cardiology* **96**, 143–150
- Salvesen, G. S., Duckett, C. S. (2002): IAP proteins: Blocking the road to death's door, *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **3**, 401–410
- Schaur, R. J. (2003): Basic aspects of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal, *Molecular Aspects of Medicine* **24**(4-5), 149–159
- Selley, M. L. (1997): Determination of the lipid peroxidation product (*E*)-4-hydroxy-2-nonenal in clinical samples by gas chromatography–negative-ion chemical ionisation mass spectrometry of the *O*-pentafluorobenzyl oxime, *Journal of Chromatography B* **691**, 263–268
- Shibata, T., Kondo, M., Osawa, T., Shibata, N., Kobayashi, M., Uchida, K. (2002): 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂. A PROSTAGLANDIN D₂ METABOLITE GENERATED DURING INFLAMMATORY PROCESSES, *Journal of Biological Chemistry* **277**(12), 10459–10466
- Shibata, T., Yamada, T., Ishii, T., Kumazawa, S., Nakamura, H., Masutani, H., Yodoi, J., Uchida, K. (2003): Thioredoxin as a molecular target of cyclopentenone prostaglandins, *Journal of Biological Chemistry* **278**, 26046–26054
- Shimokawa, H. (1999): Primary endothelial dysfunction: Atherosclerosis, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **31**, 23–37
- Shiojima, I., Walsh, K. (2002): Role of Akt signaling in vascular homeostasis and angiogenesis, *Circulation Research* **90**(12), 1243–1250

- Skurk, C., Maatz, H., Kim, H.-S., Yang, J., Abid, M. R., Aird, W. C., Walsh, K. (2004): The Akt-regulated forkhead transcription factor FOXO3a controls endothelial cell viability through modulation of the caspase-8 inhibitor FLIP, *Journal of Biological Chemistry* **279**(2), 1513–1525
- Song, B. J., Soh, Y., Bae, M.-A., Pie, J.-E., Wan, J., Jeong, K.-S. (2001): Apoptosis of PC12 cells by 4-hydroxy-2-nonenal is mediated through selective activation of the c-jun N-terminal protein kinase pathway, *Chemico-Biological Interactions* **130-132**, 943–954
- Steinberg, D. (2002): Atherogenesis in perspective: Hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime, *Nature Medicine* **8**, 1211–1217
- Stone, P. H., Coskun, A. U., Yeghiazarians, Y., Kinlay, S., Pompa, J. J., Kuntz, R. E., Feldman, C. L. (2003): Prediction of sites of coronary atherosclerosis progression: In vivo profiling of endothelial shear stress, lumen, and outer vessel wall characteristics to predict vascular behavior, *Current Opinion in Cardiology* **18**, 458–470
- Straus, D. S., Glass, C. K. (2001): Cyclopentenone prostaglandins: New insights on biological activities and cellular targets, *Medical Research Reviews* **21**, 185–210
- Straus, D. S., Pascual, G., Li, M., Welch, J. S., Ricote, M., Hsiang, C.-H., Sengchanthalangsy, L. L., Ghosh, G., Glass, C. K. (2000): 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J₂ inhibits multiple steps in the NF- κ B signaling pathway, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **97**(9), 4844–4849
- Strohmaier, H., Hinghofer-Szalkay, H., Schaur, R. J. (1995): Detection of 4-hydroxynonenal (HNE) as a physiological component in human plasma, *Journal of Lipid Mediators and Cell Signalling* **11**, 51–61
- Stuhlmeier, K. M., Kao, J. J., Bach, F. H. (1997): Arachidonic acid influences proinflammatory gene induction by stabilizing the Inhibitor- κ B α /Nuclear factor- κ B (NF- κ B) complex, thus suppressing the nuclear translocation of NF- κ B, *Journal of Biological Chemistry* **272**(39), 24679–24683
- Sumpio, B. E., Timothy Riley, J., Dardik, A. (2002): Cells in focus: Endothelial cell, *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **34**, 1508–1512
- Thies, F., Garry, J. M. C., Yaqoob, P., Rerkasem, K., Williams, J., Shearman, C. P., Gallagher, P. J., Calder, P. C., Grimble, R. F. (2003): Association of n-3 polyunsaturated fatty acids with stability of atherosclerotic plaques: A randomized controlled trial, *Lancet* **361**, 477–485
- Tricot, O., Mallat, Z., Heymes, C., Belmin, J., Leseche, G., Tedgui, A. (2000): Relation between endothelial cell apoptosis and blood flow direction in human atherosclerotic plaques, *Circulation* **101**(21), 2450–2453
- Uchida, K. (2003): 4-Hydroxy-2-nonenal: A product and mediator of oxidative stress, *Progress in Lipid Research* **42**, 318–343

- Uchida, K., Itakura, K., Kawakishi, S., Hiai, H., Toyokuni, S., Stadtman, E. R. (1995): Characterization of epitopes recognized by 4-hydroxy-2-nonenal specific antibodies, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **324**, 241–248
- Uchida, K., Shiraishi, M., Naito, Y., Torii, Y., Nakamura, Y., Osawa, T. (1999): Activation of stress signaling pathways by the end product of lipid peroxidation. 4-HYDROXY-2-NONENAL IS A POTENTIAL INDUCER OF INTRACELLULAR PEROXIDE PRODUCTION, *Journal of Biological Chemistry* **274**, 2234–2242
- Usatyuk, P. V., Natarajan, V. (2004): Role of mitogen-activated protein kinases in 4-hydroxy-2-nonenal-induced actin remodeling and barrier function in endothelial cells, *Journal of Biological Chemistry* **279**, 11789–11797
- von Schacky, C., Angerer, P., Kothny, W., Theisen, K., Mudra, H. (1999): The effect of dietary ω -3 fatty acids on coronary atherosclerosis. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial, *Annals of Internal Medicine* **130**, 554–562
- Wang, T., Zhang, X., Li, J. J. (2002): The role of NF- κ B in the regulation of cell stress responses, *International Immunopharmacology* **2**, 1509–1520
- Weber, C., Erl, W., Pietsch, A., Danesch, U., Weber, P. (1995): Docosahexaenoic acid selectively attenuates induction of vascular cell adhesion molecule-1 and subsequent monocytic cell adhesion to human endothelial cells stimulated by tumor necrosis factor- α , *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **15**, 622–628
- Weber, P. C. (1987): The dietary modification of the arachidonic acid cascade, *Colloque INSERM* **152**, 119–126
- Weber, P. C. (1989): Clinical studies on the effects of n-3 fatty acids on cells and eicosanoids in the cardiovascular system, *Journal of Internal Medicine* **225**, 61–68
- Wei, M. C., Zong, W.-X., Cheng, E. H.-Y., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A. J., Roth, K. A., MacGregor, G. R., Thompson, C. B., Korsmeyer, S. J. (2001): Proapoptotic BAX and BAK: A requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death, *Science* **292**, 727–730
- Widlansky, M. E., Gokce, N., Keaney, Jr, J. F., Vita, J. A. (2003): The clinical implications of endothelial dysfunction, *Journal of the American College of Cardiology* **42**, 1149–1160
- Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R. J., Greenberg, M. E. (1995): Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis, *Science* **270**, 1326–1331
- Yang, J., Liu, X., Bhalla, K., Kim, C. N., Ibrado, A. M., Cai, J., Peng, T.-I., Jones, D. P., Wang, X. (1997): Prevention of apoptosis by Bcl-2: Release of cytochrome c from mitochondria blocked, *Science* **275**, 1129–1132
- Yilmaz, A., Kliche, S., Mayr-Beyrle, U., Fellbrich, G., Waltenberger, J. (2003): p38 MAPK inhibition is critically involved in VEGFR-2-mediated endothelial cell survival, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **306**, 730–736

Literaturverzeichnis

Zernecke, A., Erl, W., Fraemohs, L., Lietz, M., Weber, C. (2003): Suppression of endothelial adhesion molecule up-regulation with cyclopentenone prostaglandins is dissociated from I κ B- α kinase inhibition and cell death induction, *FASEB Journal* **17**(9), 1099–1101

A Eigene Publikationen

1. Originalarbeiten

Vosseler, C.A., Erl, W., Weber, P.C.: 2003, *Structural requirements of cyclopentenone prostaglandins to induce endothelial cell apoptosis*, Biochemical and Biophysical Research Communications **307**, 322

Erl, W., Weber, C., Zerneck, A., Neuzil, J., **Vosseler, C.A.**, Kim, H.-Y., Weber, P.C.: 2004, *Cyclopentenone prostaglandins induce endothelial cell apoptosis independent of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ* , European Journal of Immunology **34**, 241

2. Kongressbeiträge

a) Vorträge

Vosseler, C., Essler, M., Weber, P.C., Erl, W.: „Cyclopentenone prostaglandin-induced endothelial cell apoptosis.“ 2. Symposium des DFG-Graduiertenkollegs „Vaskuläre Biologie in der Medizin“, 5.-6. Oktober 2002, Herrsching am Ammersee, Deutschland.

Vosseler, C.A., Weber, P.C., Erl, W.: „Apoptosis induction in human endothelial cells by the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal.“ Annual Meeting of the Gesellschaft für Mikrozirkulation und Vaskuläre Biologie e.V., 16.-18. Oktober 2003, München, Deutschland. *Journal of Vascular Research* **41**,99 (2004)

Vosseler, C.A., Erl, W., Weber, P.C.: „Möglicher Mechanismus der antikanzerogenen Wirkung konjugierter Linolsäuren: Induktion von Apoptose in proliferierenden humanen Endothelzellen“. 41. Wissenschaftlicher Kongress der Deutschen Gesellschaft für Ernährung, 11.-12. März 2004, Freising-Weihenstephan, Deutschland. *Proceedings of the German Nutrition Society* **6**, 36 (2004)

b) Poster

Vosseler, C.A., Weber, P.C., Erl, W.: „4-Hydroxynonenal induces oxidative stress and apoptosis in human endothelial cells.“ 4th Symposium on the Biology of Endothelial Cells, 18.-20. Juli 2003, München, Deutschland. *Angiogenesis* **5**, 338 (2002)

Vosseler, C.A., Weber, P.C., Erl, W.: „Cyclopentenone prostaglandins induce apoptosis in human endothelial cells: Requirement of the cyclopentenone ring structure.“ Annual Meeting of the Gesellschaft für Mikrozirkulation und Vaskuläre Biologie e.V., 16.-18. Oktober 2003, München, Deutschland. *Journal of Vascular Research* **41**,111 (2004)

Krump-Konvalinkova, V., Rubic, T., **Vosseler, C.**, Erl, W., Yasuda, S., Tigyi, G., Kirkpatrick, J.C., Siess, W.: „Multiple functions of sphingosine 1-phosphate receptor S1P₁ in endothelial cells.“ Annual Meeting of the Gesellschaft für Mikrozirkulation und Vaskuläre Biologie e.V., 16.-18. Oktober 2003, München, Deutschland. *Journal of Vascular Research* **41**, 110 (2004)

Vosseler, C.A., Weber, P.C., Erl, W.: „Docosahexaenoic acid protects human endothelial cells against oxidative stress.“ 74th Congress of the European Atherosclerosis Society, 17.-20. April 2004, Sevilla, Spanien. *Atherosclerosis* **5**, 63 (2004)

Vosseler, C.A., Weber, P.C., Erl, W.: „Docosahexaenoic acid prevents stress-induced apoptosis in human endothelial cells.“ 13th International Vascular Biology Meeting, 1.-5. Juni 2004, Toronto, Kanada. *Cardiovascular Pathology* **13**, S152 (2004)

Krump-Konvalinkova, V., Rubic, T., **Vosseler, C.**, Erl, W., Yasuda, S., Tigyi, G., Kirkpatrick, J.C., Siess, W.: „Multiple functions of sphingosine 1-phosphate receptor S1P₁ in endothelial cells.“ 13th International Vascular Biology Meeting, 1.-5. Juni 2004, Toronto, Kanada. *Cardiovascular Pathology* **13**, S49 (2004)

B Danksagungen

Herrn Professor Dr. Peter C. Weber danke ich für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit und den Freiraum für die Entwicklung und Verwirklichung eigener Ideen und Hypothesen. Darüber hinaus danke ich ihm für seine ständige Diskussionsbereitschaft und die kompetente wissenschaftliche Betreuung.

Ich danke Herrn Professor Dr. Wolfgang Siess für die Aufnahme in das Graduiertenkolleg 438 „Vaskuläre Biologie in der Medizin“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft und die Gewährung eines Promotionsstipendiums.

Herrn Dr. Wolfgang Erl bin ich für die sehr gute Betreuung im Labor und die Einweisung in die Geheimnisse der Durchflusszytometrie dankbar. Außerdem war seine ständige Bereitschaft zur Diskussion von Ergebnissen, Problemen oder neuen wissenschaftlichen Erkenntnissen sehr hilfreich und wertvoll für die Durchführung dieser Arbeit.

Tina Rubic möchte ich für ihre kompetente Einführung in die Welt der RNA und PCR und ihre Geduld bei der Lösung aufgetretener Probleme der PCR-Etablierung danken. Darüber hinaus waren mir ihre Hilfe bei allen sonstigen Fragen des Labor- und Forschungsalltags sowie unsere Fachgespräche in den Mittagspausen und beim Pipettieren sehr wichtig.

Dorothea Strobach danke ich für wertvolle Diskussionen und die Solidarität beim montäglichen Sport.

Bei Brigitte Zimmer, Diana Wagner und Gabriele Berberich möchte ich mich für die exzellente Durchführung zahlreicher „Western Blots“ bedanken. Darüber hinaus war mir G.B. eine große Hilfe bei der Isolierung der Zellen und B.Z. und D.W. bin ich sehr dankbar für ihre tatkräftige Hilfe bei der PCR-Etablierung.

Allen übrigen Mitgliedern des Instituts danke ich für ihre Hilfsbereitschaft, zahlreiche fachliche Diskussionen und die freundliche Atmosphäre.

Bei den „Mädels“ des Graduiertenkollegs, Anja Trapp, Katrin Schürzinger, Melanie Antl und Simone Blattner möchte ich mich für eine schöne Zeit im und vor allem neben dem Graduiertenkolleg bedanken. Unsere Diskussionen und Eure (Labor-)Erfahrungen waren nicht nur sehr unterhaltsam, sondern auch sehr lehrreich für mich.

Meinen Eltern bin ich dankbar, dass sie mich in meiner Entscheidung zur Promotion bestärkt haben. Ohne ihre Hilfe wäre ich nicht bis hierher gekommen.

Ganz besonders möchte ich meinem Freund Christoph danken. Er war mir mit seiner Begeisterung und seinem Einsatz für die Forschung ein Vorbild und Motivation. Für seine geduldige Begleitung und Unterstützung durch alle Höhen und Tiefen der letzten drei Jahre bin ich unendlich dankbar. Darüber hinaus wäre ohne seine zuverlässige Hilfe bei der Handhabung des Satzprogrammes \LaTeX die Arbeit in ihrer vorliegenden Form nie zustande gekommen.

C Lebenslauf

Claudia Vosseler
Jakob-Sturm-Weg 8
80995 München

Geboren am 21.06.1975 in Stuttgart-Bad Cannstatt

Schule

1982-1995
6/1995
Grundschule und Gymnasium in Stuttgart-Vaihingen
Abitur

Ausbildung

1995-1997
Grundstudium der Trophologie (Ernährungswissenschaft)
Friedrich-Schiller-Universität Jena

1997-1999
Hauptstudium der Trophologie
Friedrich-Schiller-Universität Jena

1999-2001
Diplomarbeit im Fachbereich Ernährungstoxikologie
Institut für Ernährungswissenschaft
Friedrich-Schiller-Universität Jena

Thema:
Modulation der DNA-Reparatur in HT29 clone 19A-Zellen
durch β -Carotin

1/2001
Diplom

seit 2/2001
Promotion
Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten
Ludwig-Maximilians-Universität München
unter Leitung von Prof.Dr.med. Peter C. Weber