

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

**Effekte ungesättigter Fettsäuren  
auf die Apoptose  
in proliferierenden Zellen der Gefäßwand**

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

vorgelegt von  
Hyo Jung Kim  
aus Kimchun, Süd-Korea

2004

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

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

Mitberichterstatter: Prof. Dr. A. Sellmayer

Mitbetreuung durch den

Promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. biol. hum. Wolfgang Erl

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

Tag der mündlichen Prüfung: 03. 12. 2004

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	Seite
Abkürzungsverzeichnis	5
<b>A. Einleitung und Stand der Forschung</b>	7
1. Atherosklerose	7
2. Ungesättigte Fettsäuren	8
3. Apoptose	8
3.1. Apoptose: Definition und Bedeutung	8
3.2. Aktivierung von Caspasen	10
3.3. Apoptoseinduktion durch Todesdomänenliganden und Zellstress	11
4. Endothelzellen und glatte Gefäßmuskelzellen bei Atherosklerose	13
4.1. Endotheliale Dysfunktion	13
4.2. Restenose und Angiogenese	13
4.3. Glatte Gefäßmuskelzellen aus Media und Neointima	15
5. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA)	16
5.1. Metabolismus ungesättigter Fettsäuren	16
5.2. Effekte von n-3 Fettsäuren bei kardiovaskulären Erkrankungen	17
6. Stickstoffmonoxid (NO)	18
7. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)	18
8. Apoptoseregulation durch MAP Kinase p38	20
9. Tumorsuppressor Protein p53	20
10. Fragestellung	23
<b>B. Material und Methoden</b>	26
1. Chemikalien	26
2. Zellkultur	26
3. Detektion der Zellvitalität	27
Trypanblau Färbung	27
4. Detektion der Apoptose	28
Annexin-V und Propidiumjodid Färbung	28
Caspase-3 Aktivierung	29
Mitochondriales Membranpotential (MMP)	29
TUNEL Färbung	30
Zellzyklusanalyse	31
Detektion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)	31
5. Stickstoffmonoxid (NO) Messung	33
6. Western-Blot Analyse	33
7. Messung der p53 DNA Bindung	36
8. Matrigel Assay	37
9. Statistische Auswertung	38

<b>C. Ergebnisse</b>	39
1. Ungesättigte Fettsäuren und Proliferation	39
2. Apoptoseinduktion durch ungesättigte Fettsäuren	40
2.1. Einfluss verschiedener ungesättigter Fettsäuren auf Apoptose in HUVEC	40
2.2. Einfluss verschiedener ungesättigter Fettsäuren auf Apoptose in glatten Gefäßmuskelzellen	44
2.3. FKS-Konzentration und Apoptoseinduktion	48
3. Mitochondriales Membranpotential (MMP)	49
4. Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)	51
5. Einfluss von Antioxidantien bei DHA-induzierter Apoptose	54
5.1. Apoptose-Inhibition durch Vitamin E	54
5.2. Aktivierung der Caspase-3 durch DHA und Inhibition durch Vitamin E	55
6. Stickstoffmonoxid (NO) Produktion in glatten Gefäßmuskelzellen	56
7. Aktivierung der MAP Kinase p38 und DNA Fragmentierung	57
8. Phosphorylierung von p53 an Serin 15	59
9. Einfluss unterschiedlicher Fettsäuren auf Angiogenese	61
<b>D. Diskussion</b>	62
1. Apoptoseinduktion durch DHA in proliferierenden Endothel- und Muskelzellen	62
2. Mögliche Mechanismen der Apoptoseinduktion	65
Stickstoffmonoxid	65
p38 MAP Kinase	66
Tumorsuppressor Protein p53	67
3. Einfluss unterschiedlicher Fettsäuren auf Angiogenese	68
4. Mögliche Wirkung der n-3 PUFA in vivo	69
<b>E. Zusammenfassung</b>	71
<b>F. Literaturverzeichnis</b>	72
<b>G. Publikationen und Kongressbeiträge</b>	82
<b>H. Danksagung</b>	83
<b>I. Lebenslauf</b>	84

## Abkürzungsverzeichnis

AA	Arachidonsäure
AIF	<i>apoptosis inducing factor</i>
Annexin-V + / PI -	Annexin-V positive/PI negative
APAF-1	<i>apoptosis protease activating factor</i>
Caspasen	Cysteinyl Aspartat-Spezifische Proteinasen
DHA	Dokosahexaensäure
DiOC <sub>6</sub> (3)	3,3'-Dihexyloxacarbocyanin-iodide
Discs	<i>death-inducing signal complexes of death-domain -receptors</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
ECGM	<i>Endothelial Cell Growth Medium</i>
EPA	Eikosapentaensäure
ERK	Extrazelluläre Signal-regulierte Kinase
FACScan	<i>Fluorescence activated cell sorter</i>
FKS	fetales Kälberserum
HE	Hydroethidin
H <sub>2</sub> DCFDA	2'7'Dichloro-Dihydrofluorescein Diacetat
IAP	<i>inhibitor of apoptosis protein</i>
JNK	C-Jun-N-terminale Kinase
LDL	Low-density-Lipoprotein
MAP Kinase	Mitogen Aktivierte Proteinkinase
min	Minuten
MMP	Mitochondriales Membranpotential
NAC	N-Acetyl-L-Cystein
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
PARP	Poly-ADP-Ribosepolymerase
PBS (+/+)	Phosphatgepufferte isotone Kochsalzlösung mit Ca <sup>++</sup> und Mg <sup>++</sup>
PBS (-/-)	Phosphatgepufferte isotone Kochsalzlösung ohne Ca <sup>++</sup> und Mg <sup>++</sup>
PI	Propidiumjodid
PTCA	Perkutane transluminale koronare Angioplastie
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SOD	Superoxiddismutase
SODD	<i>silencers of death domains</i>
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TDT	Terminale Deoxynukleotidyl-Transferase
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP nick end labeling</i>



## A. Einleitung und Stand der Forschung

### 1. Atherosklerose

Atherosklerotische Läsionen sind das Resultat einer komplexen Interaktion von Blutbestandteilen, vornehmlich Leukozyten und Cholesterin mit der Gefäßwand, den Endothelzellen und den glatten Gefäßmuskelzellen. Diese Wechselwirkungen verursachen eine endotheliale Dysfunktion und Veränderungen der glatten Gefäßmuskelzellen in den Arterien. Der Verlauf der Atherogenese wird in mehrere Stadien eingeteilt. Das Anfangsstadium besteht aus sogenannten Fettstreifen, welche eine Akkumulation von Schaumzellen in der Intima darstellen. Die Fettstreifen gelten als reversibel. Das zweite Stadium ist durch die Umwandlung der Fettstreifen in fibröse Plaques morphologisch erfassbar. Hierbei kommt es zu einer Proliferation glatter Muskelzellen aufgrund der Stimulation durch Wachstumsfaktoren. Durch die aktiv synthetisierenden Zellen kommt es zur Fibrosierung der Plaques. Die Folge davon ist eine Lumeneinengung. Im Verlauf dieses Prozesses entstehen aus Makrophagen und glatten Gefäßmuskelzellen durch weitere Einlagerung von Cholesterin in die proliferierenden Plaques neue Schaumzellen, welche ihrerseits wiederum das Muskelzellwachstum stimulieren. Daraus entwickelt sich in einem weiteren Stadium durch die Einlagerung von Kalksalzen die komplexe atherosklerotische Läsion, was zu einer fortschreitenden Stenosierung des betroffenen Gefäßsegments führt. Dabei kommt es z.B. in den Koronararterien zu einer verminderten koronaren Flussrate mit der Folge der Entstehung ischämischer Myokardbezirke bei Situationen des erhöhten Sauerstoffbedarfes (Enos et al., 1953). Als invasive Therapiemöglichkeiten gibt es die perkutane transluminale koronare Angioplastie (PTCA), bei der durch einen Ballonkatheter das verschlossene Herzkranzgefäß wieder geöffnet wird. Die durch eine PTCA mit oder ohne Stentimplantation hervorgerufene Gefäßverletzung löst initial eine lokale Entzündungsreaktion aus (Bauriedel und Höfling 1995). Diese Reaktion könnte im weiteren Sinne der sogenannten *"response-to-injury"* Hypothese nach Ross zugeordnet werden

( Lüscher et al., 1996). Innerhalb der folgenden 6 Monate nach PTCA kann eine Restenose entstehen. (Nobuyoshi et al., 1988). Der Angiogenese kommt auch bei der Plaqueprogression und bei der Restenose durch Neointimabildung eine entscheidende Bedeutung zu (Ross et al., 2001), weil die Gefäßversorgung eines Gewebes nicht nur dessen Ernährung sicher stellt, sondern auch eine wichtige Rolle bei der Entzündungsreaktion spielt.

## 2. Ungesättigte Fettsäuren

Langkettige mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA) werden nach der Position der ersten Doppelbindung vom Methylende in drei Gruppen unterteilt: n-3, n-6 und n-9. Bei kardio-vaskulären Erkrankungen zeigten vor allem die n-3 PUFA positive Wirkungen. Dafür werden unterschiedliche Mechanismen diskutiert. So können z.B. EPA und DHA in Fischöl die durch oxidiertes Low-density-Lipoprotein (LDL) induzierte Leukozytenadhäsion an Endothelzellen in vivo vermindern (Lehr et al., 1991). Verschiedene Gruppen haben gezeigt, dass DHA die Zytokin-induzierte endotheliale Adhäsionsmolekülexpression inhibiert (De Caterina und Libby 1996, Weber et al., 1995, Mayer et al., 2002). Außerdem senken n-3 PUFA in Monozyten die Genexpression für *platelet-derived growth factor* und *monocyte chemoattractant protein-1*, die beide als relevant für die Atheroskleroseentwicklung anzusehen sind (Baumann et al., 1991). All diese Prozesse sind elementar wichtig für die Atheroskleroseprogression und unabhängig von der Höhe des Cholesterolspiegels.

## 3. Apoptose

### 3.1. Apoptose: Definition und Bedeutung

Alle Metazoen besitzen ein streng kontrolliertes Programm zur Beseitigung überflüssiger oder unerwünschter Zellen, die Apoptoseinduktion. Apoptose ist ein physiologisches, phylogenetisch konserviertes Programm des regulierten Zelltodes. Der Verlust von Zellen ist ein normaler Vorgang bei der Embryogenese in Geweben und Organen der Metazoen (Raff,

1992). Diese Apoptose ist von Nekrose, einem katastrophenartigen Zelltod mit vollständigem Zusammenbruch intrazellulärer Homöostase und Regulation, abgegrenzt worden (Kerr et al., 1972). Interaktionen bei der Regulation von Zellzyklus und Apoptoseaktivierung sind gut untersucht. Fehler in der Apoptoseregulation sind bei Autoimmunerkrankungen, Virusinfektionen und Krebs identifiziert worden (Thompson, 1995). Eine Vielzahl an Regulationsschritten sind an der Apoptose beteiligt. Dabei sind drei typische Merkmale apoptotischer Zellen besonders hervorzuheben (Wyllie et al., 1980):

- Kernschrumpfung mit Chromatinkondensation und enzymatischer Desoxyribonukleinsäure (DNS)-Fragmentierung. An der DNS-Spaltung und der Chromatinkondensation sind die Degradation der Lamine A, B und C, welche eine wichtige Rolle beim Aufbau der Chromatinstruktur und der Kernmembran spielen, durch Caspasen beteiligt (Orth et al., 1996, Rao et al., 1996). Die Poly-ADP-Ribosepolymerase (PARP), ein latent aktives Kernenzym, wird an Stellen mit Schäden oder Brüchen der DNS-Doppelhelix aktiviert und ist beteiligt an der Inaktivierung der nukleären Endonukleasen (DNase) durch Ribosylierung. Bei Apoptose kommt es zur Spaltung der PARP und Aktivierung der Endonukleasen durch Poly-ADP-Ribose-Glykohydrolasen. Im Gegensatz dazu kommt es beim zellulären Zusammenbruch durch Nekrose zu einer Autolyse aller Chromatinstrukturen ohne bestimmte Fragmentgröße.
- Translokation des Phosphatidylserin von der Membraninnenseite zur Membranaußenseite. Die Translokation des Phosphatidylserin ist ein früher Prozess bei der Apoptose (Wyllie et al., 1980). Durch Spaltung des Zytoskelettproteins Fodrin, welches an der Verankerung von Phosphatidylserin in der Membraninnenseite beteiligt ist (Vanags et al., 1996) und durch  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Aktivierung von Scramblase, welche Membranlipide unordentlich verteilt (Williamson et al., 1995), und durch Peroxidation des Phosphatidylserin (Fabisiak et al., 1997) wird die Translokation bewirkt. Diese Positionsänderung von Phosphatidylserin löst die Erkennung und Endozytose apoptotischer Zellen durch Phagozyten aus (Fadok et al., 1998, Fadok et al., 1992).

- Zellschrumpfung und Bildung von Apoptosekörperchen (*apoptotic bodies*).

Bei der Zellschrumpfung während der Apoptose erfolgt die Proteolyse des Zytoskeletts und des Zytosol überwiegend durch das Ubiquitin-Proteasom-System. Neben dem Proteasomsystem sind auch die Calpainisoformen am apoptotischen Zytosolabbau beteiligt (Ciechanover 1994, Squier et al., 1994).

### 3.2. Aktivierung von Caspasen

Als Caspasen (*cysteiny aspartate-specific proteinase*) werden Proteinase mit Cystein nahe am enzymatischen Zentrum und mit einer absoluten Spezifität zur Substratspaltung nach Aspartat bezeichnet. Die Caspasen liegen im Zytosol als inaktive Procaspasen vor. Die Aktivierung erfolgt durch proteolytische Spaltung der Procaspase und die Heterodimerisierung der abgespaltenen Untereinheiten zu zwei großen und zwei kleinen Untereinheiten. Diese Spaltung der Procaspasen erfolgt an bestimmten Aspartaten mit hoher Spezifität durch aktive Caspasen, durch Autoaktivierung der Caspasen und teilweise durch Granzym B aus zytolytischen Lymphozyten (Salvesen 1997, Thornberry und Lasebnik 1998). Bei den Initiatorcaspasen genügt die Oligomerisierung mehrerer ungespaltener Procaspasen zur autoproteolytischen Aktivierung als Initialschritt zur proteolytischen Aktivierung hochaktiver Effektorcaspasen (Yang et al., 1998). Nach Funktion und Struktur können folgende Gruppen von Caspasen unterschieden werden (Chang und Yang 2000):

Funktion	Initiator Caspase : Caspase 2,8,9,10
	Effektor Caspase : Caspaes 3,6,7
	Inflammatorische Caspase : Caspase 1,4,5,11,12,13,14
Struktur	Caspase mit "caspase recruitment domain" (CAD) Bindungsstellen : Caspase 1,2,4,5,9,11,12,13
	Caspase mit "death effector domain" (DED) Bindungsstellen : Caspase 8,10

Die Caspaseinhibitoren CrmA (Ray et al., 1992), p35 (Xue und Horvitz 1995) oder “*inhibitor of apoptosis protein (IAP)*” (Uren et al., 1996, Uren und Vaux 1997) können den Ablauf der Caspasenkaskade verhindern.

Analysen von Mäusen mit *knock out* bestimmter Caspasen zeigen, dass der Ablauf des Apoptoseprogramms selbst innerhalb einer Spezies je nach Apoptosestimulus und Zelltyp an die Existenz unterschiedlicher Caspasen gebunden ist (Kuida et al., 1998, Kuida et al., 1996). Das Caspase Netzwerk ist redundant vielfältig angelegt und besteht aus einem wohlabgestimmten und vielfältig regulatorisch gesicherten Zusammenwirken der Caspasen (Martin und Green 1995).

### 3.3. Apoptoseinduktion durch Todesdomänenliganden und Zellstress

Die Autoaktivierung der Initiatorcaspasen (Procaspase 2,8,9 oder 10) erfolgt durch ihre Aggregation. Diese Aktivierung erfolgt im “Apoptosom” (Signalkomplex an den Mitochondrien) oder in den “Discs” (*death-inducing signalcomplexes of death-domain - receptors*). Mitochondrien sind an der Apoptose durch Aktivierung der Caspasen (Marzo et al., 1998a und b) und durch Freisetzung verschiedener Signalproteine beteiligt (Han et al., 1997, Han et al., 1999, Han et al., 1998, Steemans et al., 1998). Bei der Signalübertragung durch Todesdomänenrezeptoren kommt es zur Bindung eines apoptotischen Liganden an die Todesdomänenrezeptoren, einer Trimerisierung der Rezeptoren, einer Komplexierung mit Todesdomänen der Rezeptoren, einer Verdrängung von SODD (“*silencers of death domains*” (Song et al., 1994), einer Rekrutierung der “Discs” und einer Bindung von anderen Signalelementen und Initiatorcaspasen (Ashkenazi und Dixit 1998, Wallach et al., 1998). Eine Aktivierung der Mitochondrien ist sehr wichtig für Apoptoseinduktion durch Zellschädigung. Die Schädigung erhöht eine Depolarisation der Mitochondrien Innenmembran, so dass proapoptotische Faktoren aus der Intermembran freigesetzt werden und es zu einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials kommt (Kroemer

et al., 1997). An den Mitochondrien wird die Caspasenkaskade reguliert durch einen “Apoptosom” genannten Signalkomplex (Hengartner 1997), welcher durch anti-apoptische Proteine der Bcl-2 Familie an der äußeren Mitochondrienmembran verankert ist. APAF-1 (*apoptosis protease activating factor*) ist der entscheidende Mediator der Aktivierung von Initiatorcaspasen (Zou et al., 1997). Für diese APAF-1-mediierte Aktivierung ist aus dem Intermembranären Raum der Mitochondrien freigesetztes Cytochrom C erforderlich (Bossy-Wetzel et al., 1998, Kluck et al., 1997a und b). Die Freisetzung von Cytochrom C aus dem intermembranären Raum wird ermöglicht durch Depolarisierung der mitochondrialen Innenmembran, hervorgerufen durch Störungen der mitochondrialen Funktion (Skulachev 1998), durch Signalproteine, welche auf die Mitochondrien einwirken (Han et al., 1997, Han et al., 1999, Han et al., 1998, Steemans et al., 1998), durch proapoptische Proteine der Bcl-Familie, wie Bak, Bax, Bad, und andere (Möröy und Zoernig 1996, Sedlak et al., 1995) und durch Rückwirkung bereits aktivierter Caspasen auf die Mitochondrien (Marzo et al., 1998a, Marzo et al., 1998b). Diese Depolarisation mündet in der ”*permeability transition*”, der Öffnung eines Megaporenkomplexes, welche zur Aufhebung der Kompartimentierung und zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) führt (Marchetti et al., 1996). Mit der apoptotischen Freisetzung von Cytochrom C aus dem Intermembranären Raum werden auch mehrere Procaspasen (Susin et al., 1999a) und der zu den Kernveränderungen beitragende AIF (*apoptosis inducing factor*) freigesetzt (Susin et al., 1999b).

## 4. Endothelzellen und glatte Gefäßmuskelzellen bei Atherosklerose

### 4.1. Endotheliale Dysfunktion

Die endotheliale Dysfunktion ist assoziiert mit veränderten antikoagulativen und anti-inflammatorischen Eigenschaften des Endothels, einer gestörten Kontrolle vaskulären Wachstums und einer Dysregulation des vaskulären Gefäßumbaus (Gimbrone 1995).

Risikofaktoren der Atherosklerose wie Bluthochdruck, Hypercholesterinämie, Diabetes und Rauchen sind wichtige Ursachen für eine endotheliale Dysfunktion (Cai und Harrison 2000).

Die Entstehung der Atherosklerose ist die Reaktion auf eine Schädigung des Endothels.

Verletzungen des Endothels können durch metabolische Schädigungen oder mechanische Belastungen auftreten.

### 4.2. Restenose und Angiogenese

Neben den allgemein akzeptierten kardiovaskulären Risikofaktoren Diabetes mellitus, Rauchen, Dyslipidämie und der arteriellen Hypertonie sind zellbiologische Prozesse der Gefäßwand bei der Entstehung der Atherosklerose zunehmend in den Mittelpunkt wissenschaftlicher Untersuchungen gerückt. Von entscheidender Bedeutung ist hierbei vor allem die Zusammensetzung der artherosklerotischen Plaques. Erfolgt eine Erosion oder Plaqueruptur, kann eine Stabilitätseinbuße resultieren, welche mit einer lokal erhöhten Thrombogenität verbunden ist. Zur Prävention dieser dramatischen klinischen Ereignisse besteht die Möglichkeit zur Entfernung gefährdeter Läsionen durch Angioplastie (Davies 1997).

Die perkutane transluminale koronare Angioplastie (PTCA) bietet die Möglichkeit der Behandlung koronarer Gefäßverengungen durch seit Erstanwendung deutlich verbesserte Kathedertechniken (Detre et al., 1987). Bei PTCA kommt es zur Ruptur der Plaques mit Verletzung der Intima und Media zum Teil in Form von Dissektionen (Baughman et al., 1981, Castaneda-Zuniga et al., 1980, Farb et al., 1990). Diese Verletzungen können zu einer

Restenosierung im behandelten Gefäßsegment führen.

Der Restenoseverlauf erfolgt in drei Stufen. In der ersten Stufe kommt es aufgrund der Gefäßwandelastizität der Dilatation zu Rückstellbewegungen, welche als "*elastic recoil*" bezeichnet werden. Zusätzlich ist eine lokale Thrombusbildung in den ersten 14 Tagen beobachtet worden (Ip et al., 1991, Forrester et al., 1991). Die Produktion extrazellulärer Matrix, die Bildung von Proteoglykan in der Intima und ein verstärktes Plaquewachstum erfolgt in dieser Phase (Forrester et al., 1991, Komatsu et al., 1998, Glagov et al., 1987). Die zweite Stufe zwei bis 12 Wochen nach dem Eingriff ist assoziiert mit einer gesteigerten Replikation und Matrixsynthese. Mitogene Faktoren führen nicht nur zur Proliferation und Migration von Fibroblasten und Gefäßwandmyozyten aus der Media in die Intima, sondern auch zur konsekutiven Expression von Protoonkogenen wie c-myc, c-fos, c-myb (Casscells 1992, Machnig et al., 1997, Libby et al., 1992, Bauriedel und Höfling 1995). Die letzte Stufe mündet im Abbau von Proteoglykanen bzw. einem endgültigen Umbau der zellulären Matrix. Deshalb wird sie als pathologischer Gefäßumbau bezeichnet (Mintz et al., 1996, Asakura et al., 1998, Grewe et al., 2000).

Alle Zellen benötigen Nährstoffe um ihren Stoffwechsel aufrecht zu halten. Die Nährstoffversorgung und der Abtransport von Stoffwechselprodukten werden durch das Blutgefäßsystem bewerkstelligt. Aus bereits bestehenden Kapillaren und Venolen kommt es zur Angiogenese, dem Prozess der Blutgefäßneubildung. Im Verlauf der Angiogenese kommt es zum Abbau der extrazellulären Matrix bereits bestehender Endothelzellen, zur Proliferation und Migration der Endothelzellen und zur Bildung von Kapillaren (Carmeliet und Collen 1998). Die Angiogenese setzt nicht nur bei physiologischen, sondern auch pathologischen Ereignissen ein. Zu den physiologischen Ereignissen der Angiogenese gehören das embryonale Wachstum, die Wundheilung und der Zyklus der Frauen. Demgegenüber sind Tumor, Atherosklerose, chronische Entzündungen (rheumatische Arthritis, Crohn'sche Krankheit), Diabetes mellitus (diabetische Retinopathie), Endometriose und Adipositas

mögliche pathologische Ereignisse mit Angiogenese (Griffioen und Molema 2000). In atherosklerotischen Läsion spielt Angiogenese eine Rolle bei der Plaqueexpansion und Restenose. Plaques benötigen die Kapillaren für Wachstum. Die Gefäßneubildung in der Restenose ist nötig für die Entwicklung, Erhaltung und Expansion der Neointima. In atherosklerotischen Plaques und in der Neointima der Restenose entspringt sie aus der Adventitia (Moulton 2001, Fuchs et al., 2001).

#### 4.3. Glatte Gefäßmuskelzellen aus Media und Neointima

Eine erhöhte Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen wird sowohl bei Atherosklerose als auch bei Restenose nach Angioplastie beobachtet (Rivard und Andreas 2000). Eine Schädigung der Endothelzellen stimuliert die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen und proliferierende glatte Gefäßmuskelzellen bilden eine Matrix aus Bindegewebe, infiltrierende Monozyten differenzieren zu Makrophagen, welche Lipide aufnehmen und oxidieren und so zu lipidreichen Schaumzellen in der Läsion werden. Dadurch entsteht ein atherosklerotischer Plaque. Zusätzlich stimulieren modifizierte LDL und Angiotensin II das Wachstum glatter Gefäßmuskelzellen und die Produktion extrazellulärer Matrix, wodurch eine Ausbildung der fibrotischen Läsionen weiter gefördert wird (Griendling et al., 1994).

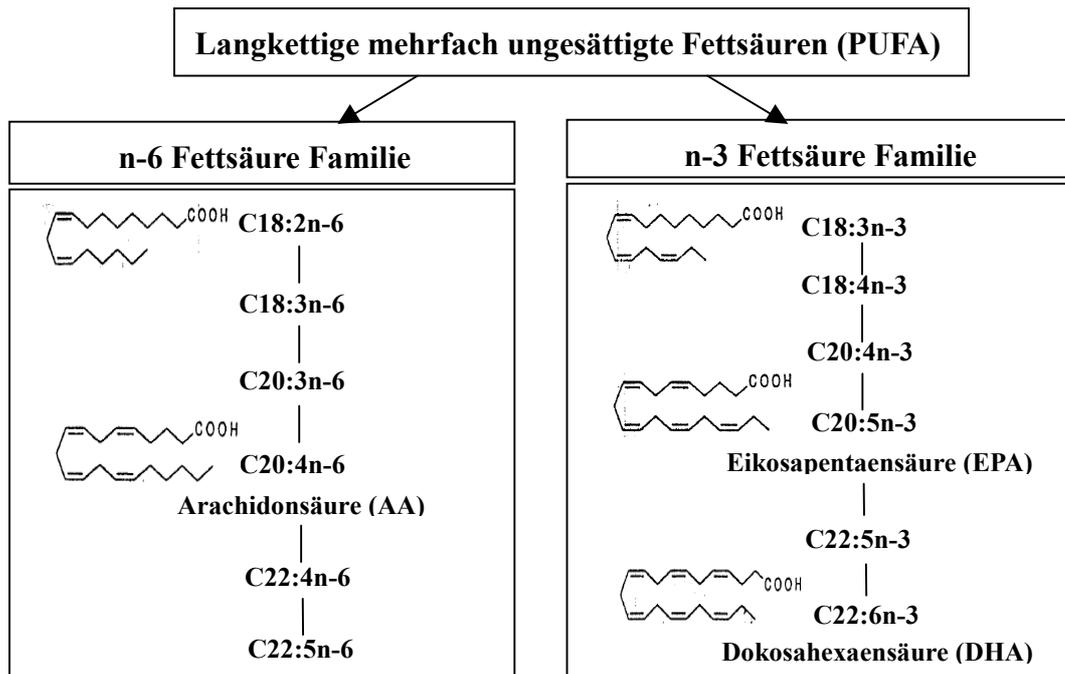
Nach erfolgreicher PTCA kommt es in bis zu 35% der Patienten zu einer symptomatischen Restenose. Die Anwendung von Stents reduziert diese Rate auf 19% (Mercado et al., 2001). Die Einbringung des Stent führt zu Endothelverletzung und einer Ablagerung von Blutplättchen und Fibrin in der verletzten Region. (Indolfi et al., 2000). Aktivierte Blutplättchen exprimieren Adhäsionsmoleküle, welche an den zirkulierenden Leukozyten durch Rezeptoren anheften (Welt und Rogers 2002). Die Migration der Leukozyten in das Gewebe wird durch Zytokine aus vaskulären Muskelzellen und residenten Leukozyten vermittelt. Wachstumsfaktoren werden von Blutplättchen, Leukozyten und glatten

Gefäßmuskelzellen gebildet. Diese Substanzen induzieren die Proliferation und Migration der glatten Gefäßmuskelzellen (Indolfi et al., 2003). Die glatten Gefäßmuskelzellen verändern sich von einem kontraktilen Phänotyp in einen synthetischen Phänotyp (Dedifferenzierung) und migrieren von der Media in die Intima, wodurch sich die Neointima ausbildet (Sata et al., 2002). Initial stellt diese Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen einen Heilungsprozess dar, der aber bei verzögerter Reendothelialisierung über das Ziel hinaus schießt und so zu einer Wiederverengung (Restenose) der betroffenen Gefäße führen kann.

## 5. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA)

### 5.1. Metabolismus ungesättigter Fettsäuren

n-3-, n-6- und n-9-Fettsäuren gehören zu den PUFA und werden nach der Position der ersten Doppelbindung von der Methylgruppe unterteilt. Der Vorläufer der n-3-Fettsäuren ist  $\alpha$ -Linolensäure (C18:3n-3) und der Vorläufer der n-6-Fettsäuren ist Linolsäure (C18: 2n-6). Säugerorganismen können die Vorläufer langkettiger n-3- und n-6-Fettsäuren nicht synthetisieren, weil ihnen das Enzymsystem zur Einführung einer Doppelbindung zwischen dem 9. Kohlenstoffatom und dem Methylende fehlt. Der Säugerorganismus kann durch Doppelbindungen, Kettenverlängerung und  $\beta$ -Oxidation die höhermolekularen und hoch ungesättigten Metabolite Eikosapentaensäure (EPA, C20:5n-3) und Dokosahexaensäure (DHA, C22: 6n-3) aus der  $\alpha$ -Linolensäure (C18:3n-3), und Arachidonsäure (AA, C20: 4n-6) aus der Linolsäure (C18: 2n-6) bilden (Abb.1). n-3-Fettsäuren kommen in größeren Mengen in Meeresfischen wie Hering, Lachs und Makrele vor, sowie in geringeren Menge in Süßwasserfischen wie Karpfen, Forelle, Barsch und Schleie (Täufe et al., 1993). Produziert werden sie von Plankton, von wo sie sich über die Nahrungskette im Fisch anreichern.



**Abb.1.** Stoffwechsel der n-3 und n-6 Fettsäuren

## 5.2. Effekte von n-3 Fettsäuren bei kardiovaskulären Erkrankungen

Die n-3-Fettsäuren gewinnen zunehmendes Interesse, da sie offensichtlich Risikofaktoren und damit Herz-Kreislauf-Erkrankungen entgegenwirken. Hauptrisikofaktoren der Arteriosklerose sind der Nikotinabusus, die Hyperlipidämie, die Diabetes Mellitus, die arterielle Hypertonie, ein Überwiegen prothrombotischer Faktoren und die erhöhte Oxidierbarkeit von LDL. n-3-Fettsäuren führten zu einer signifikanten Reduktion der Triglyzerid-Spiegel im Serum (Harris 1989, Malle und Kostner 1993), der Verringerung prothrombotischer Faktoren und einer Verlängerung der Blutungszeit (Saynor und Gillot 1992, Shahar et al., 1993). Die verminderte Plättchenaggregation und Vasokonstriktion wird u.a. auf die verringerte Synthese des proaggregatorischen und vasokonstriktorischen Thromboxans A<sub>2</sub> aus AA zurückgeführt (Siess et al., 1980). Außerdem inhibieren die n-3-Fettsäuren sowohl die Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle und die Adhäsion von Monozyten und neutrophilen Granulozyten an Endothel, als auch die Expression wachstumskorrelierter Gene sowie die Proliferation von glatten Muskelzellen und Fibroblasten (Weber et al., 1995, Fernandes et al., 1994, Sellmayer et al., 1996, Shiina et al., 1993).

## 6. Stickstoffmonoxid (NO)

Stickstoffmonoxid (NO) ist eines der Reaktionsprodukte des L-Argininmetabolismus. NO ist ein kurzlebiges, gasförmiges Molekül. Zunächst wird das Zwischenprodukt L-Hydroxyarginin aus Arginin und molekularem Sauerstoff gebildet, das dann durch Sauerstoff zu L-Citrullin und NO umgewandelt wird. An diesen beiden Prozessen sind Tetrahydrobiopterin und NADPH beteiligt (Marletta 1994, Andrew und Mayer 1999). Die Enzyme für die NO-Produktion sind die NO-Synthasen: die neuronale NO-Synthase (nNOS, NOS I), die induzierbare NO-Synthase (iNOS, NOS II) und die endotheliale NO-Synthase (eNOS, NOS III). Die neuronale und die endotheliale NO-Synthase sind konstitutiv exprimierte Enzyme, und die induzierbare NO-Synthase wird durch inflammatorische Prozesse nach Stimulation mit Zytokinen (z.B. IL-8, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) oder Neuropeptid induziert (Nathan und Hibbs 1991). NO ist sowohl in regulatorische Mechanismen wie Superoxid/Radikalfänger, der Aktivierung der Guanylatzyklase, der Inaktivierung eingedrungener Pathogene wie auch in zytotoxische Mechanismen wie Peroxynitritbildung, Zerstörung von Zink-Schwefel-Cluster, Inaktivierung von Eisen-enthaltenden Enzymen und Inhibierung der Ribonukleotidreduktase involviert (Bruch-Gerharz et al., 1998).

## 7. Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind eine Gruppe von Molekülen, die molekularen Sauerstoff und seine Derivate in allen aeroben Zellen umfasst. Eine übermäßige Produktion von ROS, die das Maß der endogenen antioxidativen Mechanismen übersteigt, wird mit Prozessen in Zusammenhang gebracht, im Verlauf derer biologische Makromoleküle wie DNA, Proteine, Kohlenhydrate und Lipide oxidiert werden. Dieser Zustand wird als oxidativer Stress bezeichnet. Es häufen sich Befunde, dass oxidativer Stress eine wichtige Rolle in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen spielt. Zur Familie der ROS gehören

das Superoxidanion ( $O_2^-$ ), das Hydroxylradikal ( $HO^\cdot$ ), Stickstoffmonoxid ( $NO^\cdot$ ) und Lipidradikale. Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ), Peroxynitritanion ( $ONOO^-$ ) und hypochlorische Säure ( $HOCl$ ) sind zwar selbst keine freien Radikale, tragen aber zum oxidativen Stress bei. Eine Art ROS kann durch verschiedene Radikal-Kettenreaktionen andere Arten der ROS produzieren (Cai und Harrison 2000). Die NADH/NADPH-Oxidase, die Xanthin-Oxidase und die NO-Synthase gehören zu den Enzymen, die für die Bildung der ROS verantwortlich sein können. Die NADH/NADPH-Oxidase befindet sich in der Membran und katalysiert die Bildung von  $O_2^-$  aus molekularem Sauerstoff ( $O_2$ ) und NADPH.  $O_2^-$  kann die p42/p44 Mitogen Aktivierte Proteinkinase (MAP Kinase) aktivieren (Baas und Berk 1995). Um eine Schädigung durch ROS zu verhindern besitzen Zellen schützende Enzyme wie z.B. Superoxiddismutase (SOD). Die SOD setzt intrazelluläres  $O_2^-$  zu  $H_2O_2$  und  $O_2$  um. Auch die Glutathionperoxidase (Gpx) spielt eine wichtige Rolle beim Schutz der Zellen gegen Oxidantien. Sie reduziert Peroxide und benutzt Glutathion (GSH) als Reduktionsmittel. Aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren in Zellmembranen können durch Radikalenreaktionen Fettsäureperoxyradikale entstehen, welche zytotoxische und mutagene Eigenschaften besitzen (Herbst et al., 1999) und eine Dysfunktion oder ein Absterben der Zellen verursachen können (Bolli 1998). Geringe Mengen an ROS können eine Rolle als Signalmoleküle spielen (Finkel 1998). So zeigten z.B.  $OH^\cdot$  nicht nur hypertrophe, sondern auch apoptotische Effekte in vaskulären glatten Muskelzellen (Griendling und Harrison 1999). Als Reaktion auf Verletzungen kann in Blutgefäßen und im Myokard die Produktion von ROS (Berk 1999) erhöht sein. ROS spielt eine wichtige Rolle in frühen Phasen der Atherosklerose bei der endothelialen Dysfunktion (Cai und Harrison 2000). Außerdem besteht ein Zusammenhang zwischen der Bildung von ROS Entzündungsreaktionen und viralen Infektionen (Speir et al., 1996). ROS können direkte zelluläre Schädigungen verursachen (Masutani 2000), die Mitose stimulieren (Greene et al., 2000), als intrazelluläre Signalmoleküle fungieren (Finkel 2000) oder auch vasoprotektives NO abfangen (Cai und Harrison 2000).

## 8. Apoptoseregulation durch MAP Kinase p38

Mitogen Aktivierte Proteinkinase (MAP Kinase) ist beteiligt an der Signalweiterleitung in zellulären Programmen wie Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Zelltod. Die Balance zwischen Phosphorylierung und Dephosphorylierung kontrolliert die MAP Kinase Aktivität. Zur Subfamilie der MAP Kinase gehören Extrazelluläre Signal-regulierte Kinase (ERK), C-Jun-N-terminale Kinase (JNK) und p38. ERK 1/2, JNK oder p38 werden durch die MAP Kinase-Kinase aktiviert, welche durch Phosphorylierung an Serin/Threonin Resten aktiviert wird. Die aktivierte MAP Kinase kann Transkriptionsfaktoren kontrollieren, welche Proliferation, Differenzierung und Apoptose beeinflussen. Die Aktivierung von JNK und von p38 wird durch zellulären Stress ausgelöst, und ERK 1/2 Aktivierung wird durch Wachstumsfaktoren induziert (Johnson und Lapadat 2002, Takahashi und Berk 1998).

## 9. Tumorsuppressor Protein p53

p53 ist ein Tumorsuppressor Protein, welches antiproliferative und proapoptotische Funktionen ausüben kann. Zellulärer Stress wie DNA Schädigung, Hypoxie oder oxidierte Proteine können p53 unter anderem durch Inhibition der p53 Degradierung aktivieren. Unter normalen Bedingungen wird p53 inaktiviert, indem es durch die Interaktion mit MDM2 zu einem ständigen Proteinabbau kommt. MDM2 blockiert als negativer Regulator des p53 die transkriptionelle Aktivierungsdomäne von p53 und begünstigt die Ubiquitinierung und die Proteasom-vermittelte Degradierung.

p53 führt zu antiproliferativen und pro-apoptotischen Reaktionen durch eine Kombination von Genaktivierungen (z.B. p21<sup>waf1</sup> und Bax), Genunterdrückung (z.B. IGF-II und bcl-2) und direkte Interaktionen zwischen Proteinen (z.B. Helicase und Caspase) (Lohrum und Vousden 2000, Gottlieb und Oren 1998, Sheikh und Forance 2000). Eine Phosphorylierung kann an unterschiedlichsten Serinresten des p53 erfolgen und verschiedene Kinasen sind an dieser Phosphorylierung beteiligt. p53 kann an Serin 15 und Serin 37 durch *ataxia-telangiectasia*

*mutated protein, ataxia-telangiectasia Rad3-related protein* und *DNA-dependent protein kinase* phosphoryliert werden, und diese Phosphorylierungen beeinträchtigen die Fähigkeit von MDM2 an p53 zu binden (Shieh et al., 1997, Tibbetts et al., 1999). Chk2 und Chk1 können das Serin 20 phosphorylieren, was die Tetramerisierung, Stabilität und Aktivierung des p53 verbessert (Shieh et al., 1999, Hirao et al., 2000). Eine Phosphorylierung an Serin 392 wird *in vivo* und durch CAK *in vitro* ausgelöst, und beeinflusst die Wachstumsunterdrückung, die DNA Bindung und die Transkriptionsaktivierung des p53 (Lu et al., 1997, Kohn 1999, Hao et al., 1996, Lohrum und Scheidtmann 1996). Außerdem gibt es Phosphorylierungsstellen an Serin 6 und 9 (Knippschild et al., 1997) und 46. Die Phosphorylierung an Serin 46 ist wichtig für Apoptoseinduktion (Oda et al., 2000). Ein Verlust der p53 Funktion kann Tumor Progression und Chemoresistenz induzieren. p53 kann Apoptose durch Transkriptionsabhängige wie auch -unabhängige Mechanismen auslösen (Fridman und Lowe 2003).



## 10. Fragestellung

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass die n-3 PUFA DHA Apoptose in glatten Gefäßmuskelzellen induziert (Diep et al., 2000) und das Tumorwachstum im Mausmodell reduzieren kann (Rose und Connolly 1999). Es war dagegen nicht bekannt, ob DHA in Endothelzellen oder in glatten Gefäßmuskelzellen der Intima Apoptose auslösen kann. Das Ziel dieser Untersuchungen war, Erkenntnisse über den Einfluss mehrfach ungesättigter Fettsäuren auf Wachstum und Proliferation in Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen zu gewinnen. Insbesondere war die Frage interessant, ob durch Behandlung der Zellen mit n-3 Fettsäuren Apoptose induziert werden kann (Abb.2).

Folgende Fragen wurden bearbeitet:

**1. Welche Auswirkung haben die PUFA AA, EPA oder DHA auf Proliferation und Apoptose in Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen?**

Hierzu wurden Veränderungen in der Zellzahl, der Morphologie, den Zellmembranen, im Zellzyklus und im DNS Gehalt untersucht.

**2. Besteht eine Beziehung zwischen Apoptoseinduktion und Zelldichte?**

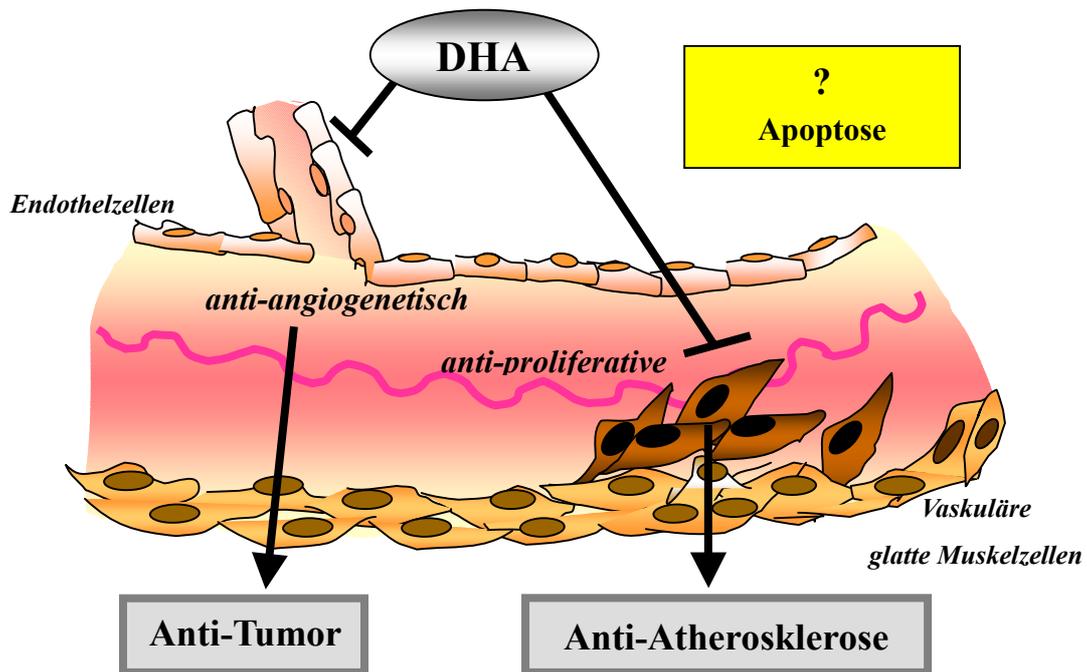
Zur Stimulation wurden proliferierende und konfluente Zellen verwendet. Diese unterschiedlichen zellulären Zustände könnten bei niedriger Dichte als Modell für endotheliale Proliferation (Angiogenese) oder bei hoher Zelldichte für intaktes Endothel, wie auch als Modell für normale Media oder Intima- bzw. Neointima-Entstehung im Gefäßlumen betrachtet werden.

**3. Welcher Mechanismus ist für die durch PUFA ausgelösten Effekte verantwortlich?**

Die NO Produktion, MAP Kinasen und das Tumorsuppressor Protein p53 beeinflussen die Apoptose in vaskulären Zellen. Deshalb wurde die Produktion von NO in glatten Gefäßmuskelzellen und die Phosphorylierung der MAP Kinase sowie des p53 gemessen.

#### 4. Inhibiert DHA die Angiogenese?

Im Matrigel Assay sollte in vitro untersucht werden, ob durch DHA eine Inhibition der Angiogenese induziert werden kann.



### Abb. 2. Vaskuläre Zellen und Atherosklerose

Bei Atherosklerose und Restenose spielen Proliferation und Apoptose in Gefäßwandzellen eine wichtige Rolle. Eine Endothelverletzung durch Apoptose kann zur Migration und Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen aus der Media führen und so die Intimabildung auslösen. Dokosahexaensäure (DHA) zeigte in zahlreichen Studien eine protektive Wirkung bei kardiovaskulären Erkrankungen. Diese Wirkung könnte auf die anti-proliferativen Eigenschaften der DHA gegenüber glatten Gefäßmuskelzellen zurückgeführt werden. Außerdem bewirkte DHA in einem Maustumor-Modell eine Verringerung der Tumorgröße. Dieser Effekt könnte durch anti-angiogenetische Effekte der DHA erklärt werden. Da nicht bekannt war, ob DHA Apoptose in Endothelzellen oder in glatten Gefäßmuskelzellen der Intima induziert, wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluß unterschiedlicher ungesättigter Fettsäuren auf Proliferation und Apoptose in Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen untersucht.

## B. Material und Methoden

### 1. Chemikalien

Die Fettsäuren AA, EPA und DHA wurden von Cayman Chemical erworben und in EtOH gelöst. Aliquots wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt und vor Verwendung aufgetaut. Bei Stimulation wurde eine Konzentration des Lösungsmittels Ethanol von maximal 0,1% verwendet. Der p38 MAP Kinase Inhibitor SB203580 und der MAP Kinase Kinase Inhibitor PD98059 (Alexis) wurden in Dimethyl Sulfoxide (DMSO) gelöst und die maximale DMSO Konzentration lag ebenfalls bei 0,1%. N-Acetyl-L-Cystein (NAC) und L-Ascorbinsäure (Vitamin C) wurden in PBS(-/-) oder *Endothelial Cell Growth Medium* (ECGM) gelöst.  $\alpha$  - Tocopherol (Vitamin E) wurde in EtOH gelöst. Alle übrigen Reagenzien waren von Sigma Chemical Company.

### 2. Zellkultur

Kultur der Endothelzellen aus humanen Umbilikalvenen (HUVEC)

Die HUVEC Isolation erfolgte nach einer Methode von Jaffe (1973). Die Nabelschnur wurde in PBS (+/+) gewaschen und ein ca. 15cm langes Stück in einem Halter eingespannt. Mit 10 ml PBS (+/+) wurde die Vene durchspült um eventuell vorhandenes Blut zu entfernen. Um die HUVEC abzulösen wurden 10 ml einer 0,1%  $\alpha$ -Chymotrypsin-Lösung eingespritzt und die Nabelschnur im Brutschrank bei  $37^{\circ}\text{C}$  für 30 min inkubiert. Nach der Inkubation wurden die in  $\alpha$ -Chymotrypsin gelösten Zellen in einen Behälter mit 5 ml fetalem Kälberserum (FKS) aufgefangen. Die Vene wurde mit 20 ml PBS (+/+) nach gespült. Die gesammelten Zellen wurden bei 800 Umdrehungen pro Minute (RPM) für 8 min zentrifugiert und dann der Überstand abgesaugt. Die Zellen wurden in 10 ml ECGM resuspendiert und in eine kollagenisierte T-75 Zellkulturflasche (SARSTEDT) gegeben. Nach ca. 2 Stunden wurde das Medium gewechselt um eventuell vorhandene Blutzellen oder nicht adhärente Zellen zu

entfernen. Am nächsten Tag wurde das Medium noch einmal gewechselt. Ein Mediumwechsel wurde anschließend alle 2 Tage bis zur Konfluenz durchgeführt. Je nach Ausbeute der Isolierung dauerte die Zellkultur 3-7 Tage bis zur Konfluenz. Konfluente Zellen wurden mit 10 ml PBS (+/+) zweimal gewaschen und mit Trypsin-EDTA abgelöst. Nach Zentrifugation wurden die Zellen im Verhältnis von 1:4 bis 1:6 verteilt und weiter kultiviert. Für Untersuchungen wurden  $5 \times 10^3$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  in kollagenisierte Zellkulturflaschen verteilt und 2,5 Tage (für proliferierende Zellen) oder 5 Tage lang (für konfluente Zellen) wachsen lassen.

### Isolierung und Kultivierung von Media und Intima Gefäßmuskelzellen

Glatte Gefäßmuskelzellen der Media und Intima wurden aus Rattenaorta und Rattenkarotis isoliert. Die Karotis von sechs Wochen alten männlichen Sprague-Dawley Ratten wurde durch einen Ballonkatheter verletzt und zwei Wochen später entnommen. Aus selektiv geerntetem Intimagewebe wurden durch Collagenaseverdau Zellen isoliert und kultiviert. Zellen aus der Aorta wurden durch Explantattechnik gewonnen. Intimazellen wurden von P7 bis P14 und Mediazellen wurden von P4 bis P14 für Versuche verwendet. Pro Zellkulturflasche wurden  $1 \times 10^6$  Zellen ausgesät und in DMEM/F-12 Medium (10% FKS) kultiviert, und vor Erreichen der Konfluenz weiterpassagiert. Zur Durchführung der Experimente wurden die Zellen in T-25 Zellkulturflaschen in Zellkulturplatten oder in 10 cm Petrischalen mit einer Dichte  $10 \times 10^3$  Zellen (Media) oder  $7,5 \times 10^3$  Zellen (Intima) ausgesät. Bei einigen Versuchen wurde die Serumkonzentration vor Stimulation der Zellen von 10% auf 1%, 0,1% oder 0% reduziert.

### 3. Detektion der Zellvitalität

#### Trypanblau Färbung

Der Trypanblau Test unterscheidet lebende und tote Zellen. Die Zellen wurden mit PBS(-/-) gespült, mit Trypsin-EDTA abgelöst und durch Zentrifugation gesammelt. 50  $\mu\text{l}$  Trypanblau

und 50 µl Zellsuspension wurden gemischt und in einer Neubauer Kammer gezählt. Tote Zellen färben sich durch Aufnahme des Farbstoffs blau, während lebende Zellen den Farbstoff ausschließen und so ungefärbt bleiben.

#### 4. Detektion der Apoptose

##### Annexin-V und Propidiumjodid Färbung

Annexin V ist ein spezifischer Marker für apoptotische Zellen. Bei Apoptose wird das nach außen translozierte Phosphatidylserin von Annexin-V gebunden. FITC markiertes Annexin-V bindet  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig Phosphatidylserin und diese Bindung kann durch FACS Analyse quantifiziert werden. Dabei wurden die Zellen mit Propidiumjodid (PI) gegengefärbt. Tote Zellen mit zerstörter Zellmembran lassen PI durch. Deshalb lassen sich apoptotische Zellen und nekrotische Zellen als Annexin-V positive/PI negative (Annexin-V + / PI -) Zellen und Annexin-V positive/PI positive Zellen unterscheiden. Der prozentuale Anteil dieser unterschiedlichen Zustände wurde durch Auswertung der FL-1 Histogramme nach Ausschluss PI-positiver (PI +) Zellen oder in FL-1/FL-2 Punkteplots im FACS identifiziert.

##### Lösungen

PBS (+/+) mit 1% FKS

Annexin-V Lösung (BD Pharmingen)

Verdünnung im Verhältnis von 1:400 in PBS (+/+)

Propidiumjodid (PI, Sigma) Lösung

Verdünnung im Verhältnis von 1:10 in PBS (+/+)

##### Durchführung

Die Zellen wurden in 50 ml Röhrchen gesammelt und in 100 µl PBS (+/+) mit 1% FKS resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden in 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und in 20 µl Annexin-V Lösung gemischt. Nach einer 20 bis 30 minütigen Inkubation bei 37°C wurden die Zellen in 500 µl PBS (+/+) gewaschen und abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 µl PBS (+/+) mit 1% FKS mit 10 µl PI Lösung resuspendiert.

## Caspase-3 Aktivierung

### Lösungen

2% Formaldehydlösung(37% Formalin, Sigma) in PBS (+/+)

1% Saponin (Sigma) Lösung in PBS (+/+)

### Durchführung

Am Ende der Stimulationszeit wurde der Medienüberstand in 50 ml Röhrchen gesammelt und die an der Zellkulturflasche haftenden Zellen wurden zwei mal mit PBS (-/-) gewaschen, mit Trypsin-EDTA abgelöst und alles zusammen zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in PBS (++) mit 1% FKS resuspendiert, im Verhältnis 1:1 mit 2% Formaldehydlösung verdünnt und für 10 min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in PBS (+/+) wurden die Zellen in PBS (+/+) mit 1% FKS aufgenommen und im Verhältnis 1:10 mit 1% Saponin Lösung für 8 min permeabilisiert, gewaschen und zentrifugiert. Jeweils 50 µl Zellsuspension in PBS (+/+) mit 1% FKS wurde in einer 96-Well Platte mit 1 µl Primärantikörper auf Eis inkubiert. Nach einer Stunde wurden die Zellen drei mal gewaschen und 100 µl Zellsuspension wurden mit 0,5 µl FITC-markiertem Sekundärantikörper versetzt. Die Inkubation der Proben wurde für 45 min auf Eis durchgeführt. Danach wurden die Zellen in PBS (+/+) gewaschen, in 100 µl kaltem PBS (+/+) resuspendiert und mit 100 µl 2% Formaldehydlösung fixiert. Die Messung erfolgte in einem Durchflusszytometer (FACScan, Becton Dickinson, Heidelberg).

## Mitochondriales Membranpotential (MMP)

Eine Reduktion des Mitochondrien Membranpotentials (MMP) ist eine mögliche Reaktion auf Apoptose. Mitochondrien mit normalem MMP lagern den Farbstoff 3,3'-

Dihexyloxycarbocyanin-Jodid (DiOC<sub>6</sub>(3) (Molecular Probes) bedingt durch die

Ladungsdifferenz verstärkt in ihrer Membran ein. Bei Apoptoseinduktion kommt es zu einer Abnahme des MMP, was sich in einer reduzierten Färbung darstellt. Die Messung des MMP durch DiOC<sub>6</sub>(3) Färbung erfolgte im Durchflusszytometer.

### Durchführung

Die Zellen wurden mit Trypsin-EDTA geerntet, zentrifugiert und in 100 µl PBS (+/+) mit 1% FKS resuspendiert. Nach Zugabe von 10 µl 1:1000 verdünnter DiOC<sub>6</sub>(3) Lösung wurden die Zellen für 15 min bei 37°C inkubiert und anschließend sofort analysiert. Die Auswertung erfolgte über FL-1 Histogramme.

### TUNEL Färbung

Mit dem TUNEL (*TdT-mediated dUTP nick end labeling*)-Assay können apoptotische Zellen anhand ihrer fragmentierten DNA nachgewiesen werden. Während der Apoptose kommt es zum Abbau der DNA durch Caspase-aktivierte DNAsen (CAD). Terminale Deoxynukleotidyl-Transferase (TdT) hängt an die 3'-OH-Fragmentenden der DNA fluoreszenzmarkierte Nukleotide (dUTP-FITC) an, wodurch die markierten apoptotischen Zellen im FACS gemessen und quantifiziert werden können. Für die TUNEL Färbung wurde der *In-Situ Cell Death Detection Kit* (Roche) verwendet.

### Durchführung

Nach Waschen mit PBS(-/-), Ablösung mit Trypsin-EDTA und Zentrifugation wurden die Zellen in 100 µl PBS (+/+) mit 1% FKS resuspendiert und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Zur Fixierung wurden zur Zellsuspension 100 µl 4% Formaldehydlösung zugegeben, für 10 min bei RT (Raumtemperatur) inkubiert und zweimal in 200 µl PBS (+/+) gewaschen. Zur Permeabilisierung wurden 100 µl 0,1% Triton Lösung dazugegeben und für 2 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen in PBS (+/+) gewaschen und in 100 µl PBS (+/+) mit 1% FKS aufgenommen. Die Proben wurden jeweils auf drei Vertiefungen einer 96-well Platte verteilt (ungefärbte Kontrolle, Kontrolle nur mit Färbelösung und gefärbte Probe mit Färbelösung plus TUNEL-Enzym). Die Zellen wurden in 50 µl TUNEL Reaktionsmischung (*Enzyme Solution* und *Label Solution*) für die negative Kontrolle, für die positive Kontrolle und eigene Proben resuspendiert und 1 Stunde lang bei 37 °C inkubiert.

Nach zweimal Waschen mit 200 µl PBS (+/+) wurden Zellen im FACScan analysiert.

### Zellzyklusanalyse

Propidiumjodid (PI) ist ein Fluoreszenzfarbstoff der in die DNA interkaliert, wodurch sich die Menge an DNA in einer Zellen quantifizieren lässt. Dadurch können zum einen Zellen unterschieden werden, deren Gehalt an DNA im klassischen Zellzyklus variiert. Zusätzlich lassen sich damit aber auch Zellen messen, die durch Apoptosevorgänge eine reduzierte DNA Menge enthalten. Dabei unterscheidet man die klassischen Phasen G0/G1, S oder G2/M und die sogenannte sub-G1 Phase, bei der die Zellen weniger als einen kompletten Satz an DNA enthalten (hypodiploid).

### Lösungen

0,1% Triton-X 100 in PBS (+/+) mit 10 µg/ml DNAase-freier RNAase und 20 µg/ml PI

### Durchführung

Nach Stimulation wurden die Zellen zusammen mit dem Medienüberstand in einem 15 ml Röhrchen geerntet und 8 min bei 800 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl PBS mit 1% FKS resuspendiert und in ein 1,5 ml Eppendorfgesäß versetzt, mit 1,9 ml eiskaltem Methanol für 30 min bei 4°C fixiert, mit 500 µl PBS (+/+) mit 1% FKS zweimal gewaschen und maximal 24 Stunden bei 4°C gelagert. Nach Zentrifugation wurde das Pellet in 200 µl PI-Lösung für 1 Stunde bei 37°C in FACS-Röhrchen inkubiert und anschließend im FACScan gemessen. Die Instrumenteneinstellung war durch einen *DNA Quality Control Kit* (Becton Dickinson) optimiert und der Doubletendiskriminationsmodus war aktiviert.

### Detektion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Messung der Superoxidanionen-Bildung mit Hydroethidin:

Die Superoxidanionen-Bildung wurde durch die Oxidation von Hydroethidin (HE) zu Ethidium gemessen. HE dringt in lebende Zellen ein und wird durch Superoxidanion zu

Ethidium oxidiert. Ethidium interkaliert in die zelluläre DNA und fluoresziert nach Anregung. Deshalb kann das gebildete Ethidium im Durchflusszytometer detektiert werden.

#### Lösungen

2 mM Hydroethidinlösung (Molecular Probes)  
Verdünnung im Verhältnis von 1:1000 in PBS (+/+)

#### Durchführung

Die Zellen wurden trypsiniert, zentrifugiert und in 100 µl PBS (+/+) mit 1% FKS resuspendiert. Anschließend wurden 10 µl HE Lösung (Endkonzentration 2 µM) dazugegeben und für 15 min bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Proben sofort durchflusszytometrisch erfasst. Die Auswertung erfolgte über eine Histogrammdarstellung der FL-2 Daten mit Angabe des prozentualen Anteils HE-positiver (HE +) Zellen.

Detektion anderer ROS durch H<sub>2</sub>DCFDA:

Da HE nur Superoxidanionen detektieren kann, wurde ein zusätzlicher Farbstoff eingesetzt, mit dessen Hilfe ein breiteres Spektrum an Sauerstoffradikalen messbar ist. Das nach Reaktion mit Sauerstoff im grünen Bereich fluoreszierende 2',7'-Dichloro-Dihydrofluorescein Diacetat (H<sub>2</sub>DCFDA) ist für eine Detektion reaktiver Sauerstoffspezies wie Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Hydroxylradikal (HO<sup>•</sup>), Peroxylradikal (HOO<sup>•</sup>) und Peroxynitritanion (ONOO<sup>•</sup>) geeignet.

#### Lösungen

3 mM H<sub>2</sub>DCFDA Lösung (Molecular Probes) in DMSO

#### Durchführung

Die Zellen pro Vertiefung in einer 24-well-Platte wurden mit jeweils 200 µl Zellkulturüberstand für die Untersuchung verwendet. Dazu wurden 100 µl einer 1:100 verdünnten 30 mM H<sub>2</sub>DCFDA Lösung in Medium (Endkonzentration 10 µM) gegeben, die Suspension leicht geschüttelt, bei 37°C für 30 min inkubiert und mittels Fluoreszenz Reader

bei 500 nm Anregungswellenlänge und 540 nm Emissionswellenlänge gemessen.

## 5. Stickstoffmonoxid (NO) Messung

Das zellulär gebildete NO diffundiert leicht aus den Zellen heraus und wird extrazellulär schnell in seine Folgeprodukte Nitrit (NO<sub>2</sub>) und Nitrat (NO<sub>3</sub>) oxidiert, die spektrophotometrisch quantifizierbar sind (Griess Reaktion).

### Durchführung

Die Zellen wurden mit oder ohne DHA und IL-1 $\beta$ , LPS oder einer Kombination von LPS + IFN- $\gamma$  in DMEM/F12 (ohne Phenolrot) mit 1% FKS für 48 Stunden inkubiert. Jeweils 100  $\mu$ l Überstand und 100  $\mu$ l Griess-Reagenz (Sigma) wurden gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Dabei entsteht ein rotvioletter Farbstoff, dessen Absorption bei 570 nm bestimmt wurde. Die NO-Menge errechnet sich anhand einer Eichkurve aus Natriumnitrit (von 0 bis 20  $\mu$ M NaNO<sub>2</sub>). Für die Proteinbestimmung der Gesamtzellen wurden die Zellen in PBS (-/-) gewaschen in 200  $\mu$ l 1% SDS gelöst und im Kühlschrank für 10 min inkubiert. Mittels Protein Assay Kit wurde die Proteinmenge gemessen und die Ergebnisse auf das Gesamtprotein in mg bezogen.

## 6. Western-Blot Analyse

### Gesamtproteinextraktion

Die Zellen wurden in 10 cm Petrischalen gesplittet und im entsprechenden Medium kultiviert. Nach der jeweiligen Stimulation wurden die Zellen mit eiskaltem PBS (+/+) gewaschen und abgekratzt. Alle schwimmenden und adhärenen Zellen wurden zusammen geerntet und in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge (1000 g, 5 min) zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und mit 1 ml kaltem PBS (+/+) resuspendiert und in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Nach nochmaligem Waschen wurden die Zellen 30 min auf Eis in 100  $\mu$ l Lysepuffer (Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O 50 mM, NaF 50 mM, NaCl 50 mM, EDTA 5 mM, EGTA 5 mM, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 2 mM, HEPES 10 mM und PMSF 1 mM) inkubiert, anschließend

zentrifugiert und der Überstand wurde bis zur Verwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### Bestimmung der Proteinkonzentration

Als Eichkurve wurden verschiedene Konzentrationen des Serumalbumins (0,3 bis 5 mg/ml) verwendet. Jeweils 5  $\mu\text{l}$  Standard oder Probe wurden in einer 96-well Platte vorgelegt und 25  $\mu\text{l}$  Reagenzmischung A und S (Biorad), und 200  $\mu\text{l}$  Reagenz B (Biorad) in jedes Well dazugegeben. Im Photometer wurde die Platte geschüttelt und dann 15 min bei RT inkubiert. Die Absorption wurde bei 690 nm gemessen.

#### SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

10% ige Polyacrylamidminigele wurden für die Versuche benutzt. Die Proteinextrakte wurden in Probenpuffer aufgenommen und 5 min bei  $95^{\circ}\text{C}$  erhitzt. Die Proteine wurden auf das Gel aufgetragen und mit Laufpuffer für 45 min bei 200 V aufgetrennt.

#### Transfer, Blockierung und Inkubation mit Antikörper

Die Proteine wurden in Transferpuffer vom Gel auf Nitrocellulosemembranen (Amersham Biosciences) bei 100 mA für 1 Stunde übertragen. Um die Transfereffizienz zu überprüfen wurde eine Färbelösung (Novaco, Eltec) benutzt. Um unspezifische Bindung zu blockieren wurde die Membran mit Blockierungspuffer eine Stunde bei RT inkubiert und 3 mal mit Tris-gepufferte Kochsalzlösung (TBS) gewaschen. Am Schluss wurde die Membran eine Stunde oder über Nacht bei RT oder  $4^{\circ}\text{C}$  jeweils mit einer Verdünnung des primären Antikörpers in Albuminlösung (p-38, p53, p-p53) oder Blockierungspuffer inkubiert. Danach wurde die Membran 3 mal für 5 min mit TBS-Lösung gewaschen und mit dem sekundären Antikörper in Blockierungspuffer 1 bis 2 Stunden inkubiert und gewaschen.

## Puffer und Lösungen

Lower Tris (4x, pH 8,8) : 90,9 g Tris (Biomol)  
10 ml 2% SDS (Bio-Rad)  
auf 500 ml H<sub>2</sub>O

Upper Tris (4x, pH 6,8) : 6,06 g Tris  
2 ml 20% SDS  
auf 100 ml

Sammelgel (10%): 2,5 ml Lower Tris (4x)  
4,1 ml H<sub>2</sub>O  
3,33 ml Acrylamid (Sigma)  
62,5 µl 10% APS (Bio-Rad)  
3,75 µl TEMED (Bio-Rad)

Trenngel (3%): 1,25 ml Upper Tris (4x)  
3,25 ml H<sub>2</sub>O  
0,5 ml Acrylamid  
5 µl TEMED  
30 µl 10% APS

Probenpuffer : 3,12 ml 1 M Tris- HCl pH 6.8  
1 g SDS  
2.5 ml β-Mercaptoethanol  
0.5 ml 1% Bromphenolblau (Riedel-deHaen)  
2 ml 50% Glycerol (Fluka)  
auf 10 ml H<sub>2</sub>O

Laufpuffer (10x) : 30 g Tris (Biomol)  
144 g Glycin (Roth)  
50 ml 20% SDS  
auf bis 1000 ml H<sub>2</sub>O

Transferpuffer : 3,03 g  
14,4 g Glycin  
auf 800 ml H<sub>2</sub>O  
200 ml Methanol (Merck)

TBS-Lösung : 10 ml 1M Tris  
33 ml 5 M NaCl  
auf 1000 ml H<sub>2</sub>O  
0,05% Tween 20 (Sigma)

Albuminlösung : 20 ml TBS-Tweenlösung  
1,0 g BSA (Sigma)

Blockierungspuffer : 5% fettfreies Trockenmilchpulver in TBS-Lösung

## Antikörper :

	Spezies	Hersteller	Verdünnung
phospho-p38 (Thr180-Tyr182),	Rabbit	Cellsignaling	1:1000
phospho-ERK, Santacruz (E-4),	Rabbit	Santacruz,	1:1000
ERK1 (K-23),	Rabbit	Santacruz,	1:1000
phospho-c-Jun (KM-1),	Mouse	Santacruz,	1:1000
p53,	Rabbit	Cellsignaling	1:1000
p53 (1C12)	Mouse	Cellsignaling	1:2000
phospho-p53 (Ser15),	Rabbit	Cellsignaling	1:1000
β-Actin,	Mouse	Sigma,	1:1000

## Detektion der Banden

Ein Chemilumineszenz-Kit (Peroxide Solution und Enhancer Solution, Pierce) wurde für die Detektion verwendet. Die an den Sekundärantikörper gebundene Peroxidase oxidiert das Substrat Luminol, wodurch Licht freigesetzt wird. Die Exposition erfolgte mit Chemilumineszenz Film (Amersham Biosciences) je nach Protein von einigen Sekunden bis zu 30 min.

## 7. Messung der p53 DNA Bindung

### Lösungen (für 8 Well)

Komplett Lyse Puffer	DTT (DL-Dithiothreitol)	0,1 µl
	Protease Inhibitor Cocktail	0,9 µl
	Lyse Puffer	89 µl
Komplett Bindung Puffer	DTT	0,4 µl
	Poly [d(l-C)]	3,6 µl
	Bindung Puffer	356 µl
1 X Wasch Puffer	Wasser	16,2 ml
	10 X Wasch Puffer	1,8 ml
1 X Antikörper Bindung Puffer	Wasser	1,62 ml
	10 x Antikörper Bindung Puffer	180 µl
Entwickler		900 µl
Stop Lösung		900 µl

### Durchführung

Mittels eines *TransAM<sup>TM</sup> p53 Transcription Factor Assay Kit* (Active Motif, Belgien) wurde die DNA Bindungsaktivität des p53 Proteins gemessen.

Stufe 1: Bindung des p53 Proteins an seine Konsensussequenz

Je 40 µl Komplett-Bindungs Puffer pro Probe wurden in jede Vertiefung einer 96 Well-Platte gegeben. Dazu wurden 10 µg Protein der Kernextrakte pipettiert, die in Komplett-Lyse Puffer

gelöst waren. Als positive Kontrolle wurden 5 µg eines MCF-7 Kernextraktes dazu gefügt, welche in 9 µl Komplett-Lyse Puffer aufgenommen waren. Außerdem wurden 10 µl des Komplett-Lyse Puffers ohne Kernextrakte als negative Kontrolle verwendet. Nach Abdeckung mit Parafilm wurde die Platte für eine Stunde bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert und 3 mal mit 200 µl Waschpuffer gewaschen.

#### Stufe 2: Bindung des p53 Antikörpers

100 µl p53 Antikörperlösung in Bindungspuffer (1:1000) wurden zu jedem Well pipettiert und bei RT für 1 Stunde ohne Schütteln inkubiert. Danach wurde 3 mal mit 200µl 1X Waschpuffer gewaschen.

#### Stufe 3: Bindung des sekundären Antikörpers

100 µl sekundär Antikörperlösung in Bindungspuffer (1:1000) wurden in jedes Well gegeben. Nach der Inkubation bei RT für 1 Stunde ohne Schütteln wurde 4 mal mit 200 µl 1x Waschpuffer gewaschen.

#### Stufe 4: Färbereaktion

In jedes Well wurden 100 µl Entwicklerlösung gegeben und bei RT für 8 min inkubiert, bis die Lösung nach Dunkelblau umschlägt. Danach wurden 100 µl Stopplösung angesetzt, dazugegeben und nach Farbumschlag ins Gelbe innerhalb von 5 min mittels Spektrophotometer bei 450 nm gemessen.

### 8. Matrigel Assay

Matrigel<sup>TM</sup> *Basement Membrane Matrix* (Becton Dickinson) wird als Substrat für in vitro Studien zur Angiogenese benutzt. Das Matrigel ist der gelöste Extrakt aus Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Maus Sarcoma, einem Tumor, der reich an extrazellulärem Matrixprotein ist. Das Matrigel besteht vor allem aus Laminin. Daneben enthält es Kollagen IV, Heparan Sulfat Proteoglycane, Entactin, Nidogen, TGF-β, FGF, Tissue Plasminogen Aktivator und andere Faktoren, welche natürlich in dem EHS Tumor entstehen. Als Formulierung ist es in

Dulbecco's Modified Eagle's Medium mit 10 µg/ml Gentamycin gelöst. In den Versuchen wurde das Dünnschicht Verfahren mit Gelen von ca. 0,5 mm Dicke und darauf ausgesäten Zellen verwendet.

### Durchführung

Kleine Portionen von 400 µl Matrigel wurden bei –80°C gelagert und vor der Verwendung über Nacht bei 4°C aufgetaut. Das aufgetaute Matrigel wurde auf Eis in der Sterilbank mit eiskalter, steriler Pipette in basales ECGM 1:3 verdünnt. Anschließend wurde es gemischt, in 6 Vertiefungen einer 48-well Platte verteilt und bei 37°C für 30 min inkubiert. Durch Inkubation bei Temperaturen über 20°C bildet sich ein Gel. Zellen verschiedener Dichte ( $1 \times 10^5$  oder  $2 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup>) wurden mit 40 µM Fettsäurelösung in ECGM auf das Matrigel gegeben und für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen unter dem Mikroskop (20-fache Vergrößerung) fotografiert.

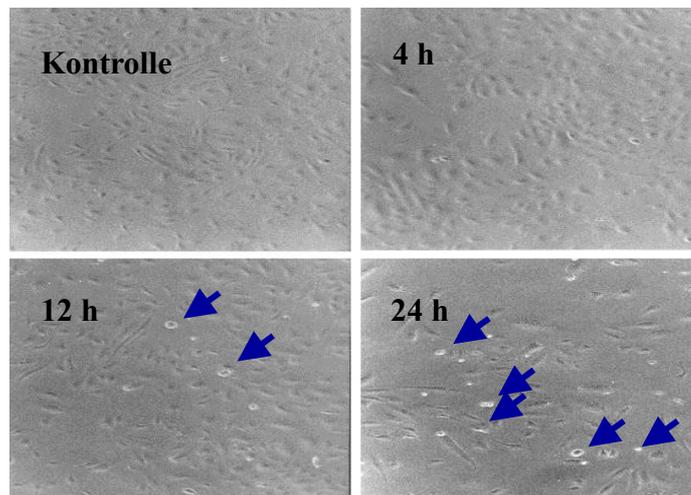
### 9. Statistische Auswertung

Alle Werte aus Mehrfachbestimmungen sind als Mittelwert±SEM (*Standard Error of the Mean*) angegeben. Vergleich zwischen zwei Gruppen wurde mit Student t-Test ausgeführt. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,05$  wurden die Unterschiede als signifikant bezeichnet (Kennzeichnung mit \*).

## C. Ergebnisse

### 1. Ungesättigte Fettsäuren und Proliferation

Da Angiogenese eine Rolle in der Plaqueprogression spielt, haben wir die Effekte unterschiedlicher Fettsäuren auf die Proliferation in Endothelzellen untersucht. Durch die Verwendung subkonfluenten HUVEC wurde sicher gestellt, dass sich die Zellen in der Proliferationsphase befanden. Eine Behandlung dieser Zellen mit DHA führte zu einer Verringerung der Proliferation bei gleichzeitigem Auftreten toter Zellen in den Kulturen. Dieser Effekt war zeitabhängig und nur bei Inkubation mit DHA (Abb. 3), nicht aber mit AA oder EPA zu beobachten (Daten nicht gezeigt).



#### **Abb. 3. Reduktion der Zellzahl durch DHA in proliferierenden HUVEC**

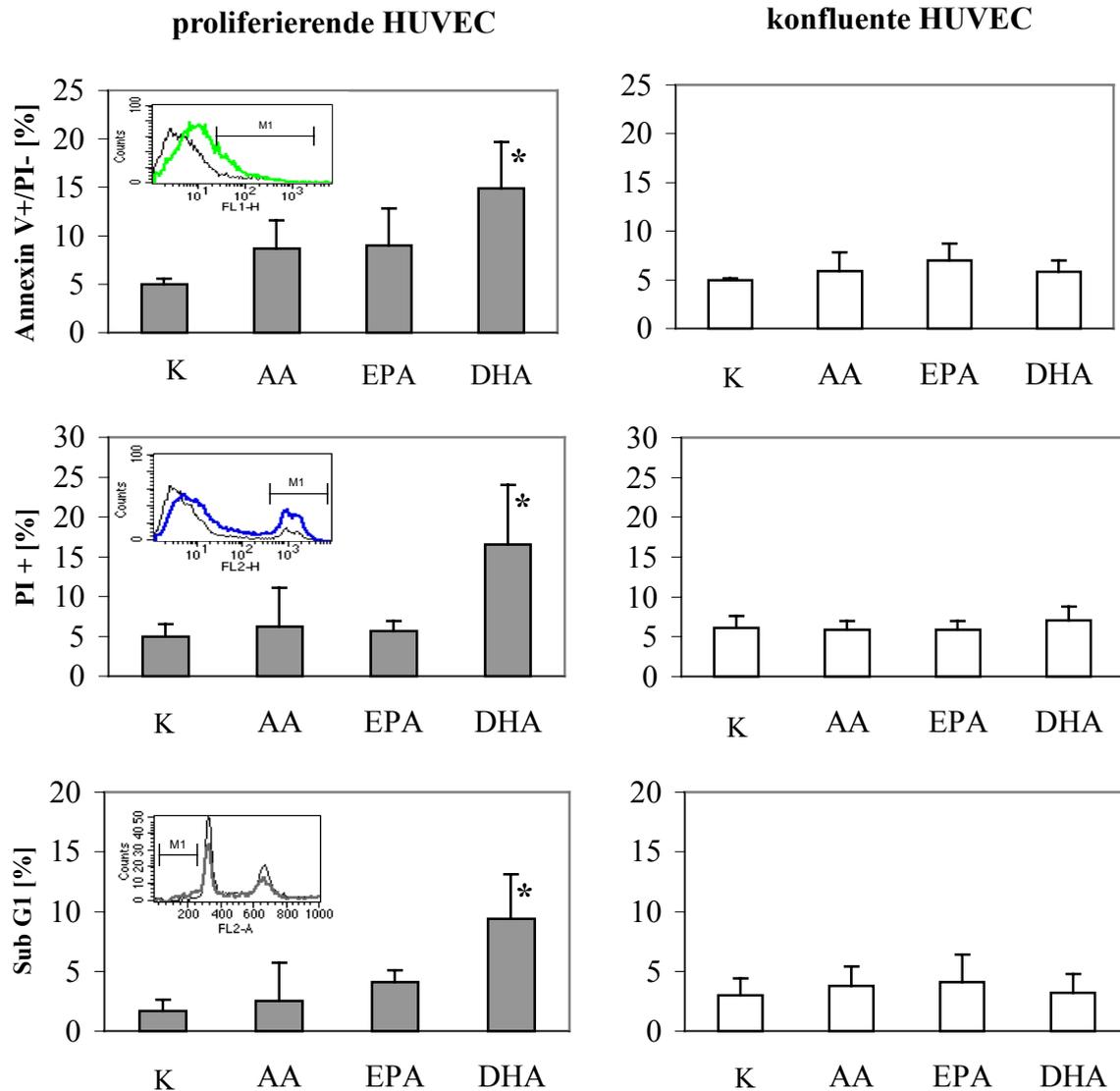
Nach Inkubation mit 40  $\mu\text{M}$  DHA für die angegebene Zeit wurden die proliferierenden HUVEC fotografiert (Vergrößerung  $\times 100$ ). Mit zunehmender Inkubationszeit wurde eine Abnahme der Zellzahl und eine Zunahme der schwebenden Zellen (Pfeile) beobachtet.

## 2. Apoptoseinduktion durch ungesättigte Fettsäuren

### 2.1. Einfluss verschiedener ungesättigter Fettsäuren auf Apoptose in HUVEC

Die Inkubation von HUVEC für 24 h mit AA oder EPA (je 40  $\mu\text{M}$ ) führte nur zu einer leicht erhöhten Bindung von Annexin V. Im Gegensatz dazu zeigten die mit DHA (40  $\mu\text{M}$ ) behandelten Zellen einen deutlichen Anstieg der AnnexinV + / PI - Fraktion, also der Zahl an Zellen in einem frühen Stadium der Apoptose. Zusätzlich wurde die Zahl der PI positiven, also der toten Zellen ermittelt. Hier zeigte sich ein ähnliches Bild wie bei der Annexin V Bindung, der Unterschied zwischen AA oder EPA und DHA war sogar noch deutlicher. Als Marker für ein relativ spätes Apoptosestadium wurde der Prozentsatz der Zellen mit reduziertem DNA Gehalt im Zellzyklus bestimmt. Die durch Caspaseaktivität hervorgerufene DNase Aktivierung führt zu einer Degradierung der DNA im Zellkern, was sich im Zellzyklus durch das Auftreten eines sogenannten sub-G1 Peaks darstellen lässt. Wie bei der Annexin V Messung beobachtet, zeigte auch hier die Inkubation mit AA oder EPA kaum Effekte (von  $1,7 \pm 0,9\%$  auf  $2,5 \pm 3,2\%$  bei AA; von  $1,7 \pm 0,9\%$  auf  $4,1 \pm 1,0\%$  bei EPA), während nach Inkubation der Zellen mit DHA der Anteil an Zellen im sub-G1 Bereich des Zellzyklus von  $1,7 \pm 0,9\%$  auf  $9,4 \pm 3,7\%$  anstieg.

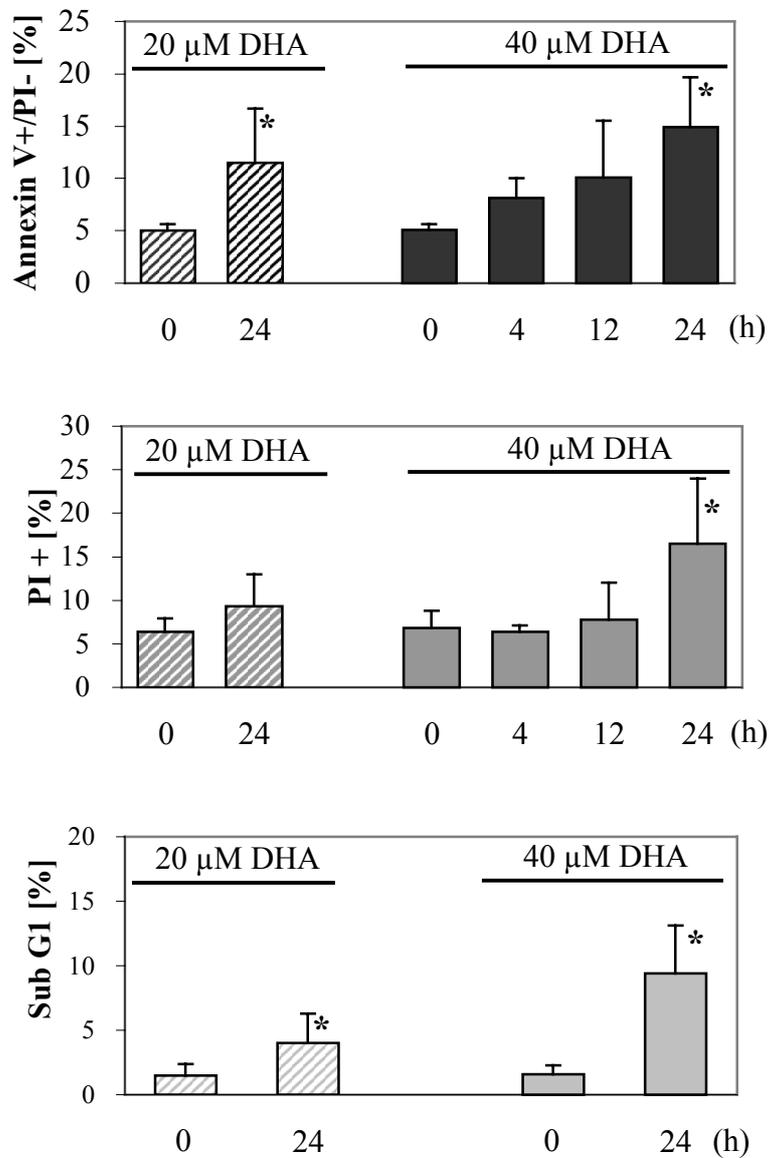
Die Inkubation von konfluenten HUVEC mit je 40  $\mu\text{M}$  AA, EPA oder DHA für 24 h zeigte keine signifikanten Effekte auf die Bindung von Annexin V, die Zahl an toten (PI positiven) Zellen, oder den Anteil der Zellen im sub-G1 Bereich des Zellzyklus. Dadurch können zum einen generelle toxische Effekte von DHA auf Endothelzellen ausgeschlossen werden. Zum anderen deuten diese Befunde darauf hin, dass eindeutige Unterschiede in der Apoptosesensitivität zwischen proliferierenden und konfluenten Endothelzellen bestehen (Abb.4).



**Abb. 4. Apoptoseinduktion durch DHA in proliferierenden HUVEC**

Jeweils  $5 \times 10^3$  Zellen/cm<sup>2</sup> wurden in eine Kulturflasche (25cm<sup>2</sup>) passagiert und für 2 Tage (proliferierende) oder 4 Tage (konfluente) kultiviert. Die Zellen wurden mit 0,1% Ethanol (K) oder je 40  $\mu$ M AA, EPA und DHA für 24 Stunden behandelt. Apoptose wurde durch den Prozentsatz an Annexin V + / PI - Zellen charakterisiert. Zur Detektion der toten Zellen wurden die PI positiven Zellen bestimmt. Außerdem wurden die Zellen mit DNA Färbelösung, welche PI, Triton-X 100 und RNase enthält gefärbt, und der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen im sogenannten sub-G1 Bereich wurde in Zellzyklusanalysen gemessen. In Beispielhistogrammen ist die jeweilige Grenzbereichmarkierung (M1) angegeben, die zur Ermittlung der Prozentzahlen verwendet wurde. n=2-8, \*p<0,05.

Eine Behandlung mit DHA induzierte Apoptose in subkonfluenten HUVEC. Um zu überprüfen, ob diese Effekte von der Konzentration und der Stimulationszeit mit DHA abhängig sind, wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an DHA (20  $\mu\text{M}$  und 40  $\mu\text{M}$ ) oder über verschiedene Zeitdauer inkubiert (Abb.5). Die Inkubation mit 40  $\mu\text{M}$  DHA für 4 bis 24 h führte zu einem kontinuierlichen Anstieg der Annexin-V Bindung. Eine Behandlung mit 20  $\mu\text{M}$  DHA führte ebenfalls zur Apoptoseinduktion, allerdings war der Effekt z.B. bei der Bindung von Annexin V nach 24 h um etwa 30% geringer als mit 40  $\mu\text{M}$ . Nach 24 h war auch der Prozentsatz PI positiver, toter Zellen erhöht, während bei kürzeren Inkubationszeiten nur die Annexin V Bindung, jedoch nicht die Zahl an toten Zellen anstieg. Ähnliche Beobachtungen wurden bei der sub-G1 Messung gemacht. Hier wurde nur der Zeitpunkt bei 24 h untersucht, weil die AnnexinV/PI Messung angedeutet hatte, dass späte Phasen der Apoptose wie eine DNA Degradierung wahrscheinlich erst zu diesem Zeitpunkt auftreten. Die Inkubation der HUVEC mit 20  $\mu\text{M}$  DHA führte zu einer Verdopplung der Zellen im sub-G1 Bereich, und 40  $\mu\text{M}$  verursachten eine 4-fach höhere Zahl an Zellen im sub-G1 Bereich im Vergleich zur Kontrolle.



**Abb. 5. Zeit- und Dosisabhängigkeit der Apoptoseinduktion durch DHA in proliferierenden HUVEC**

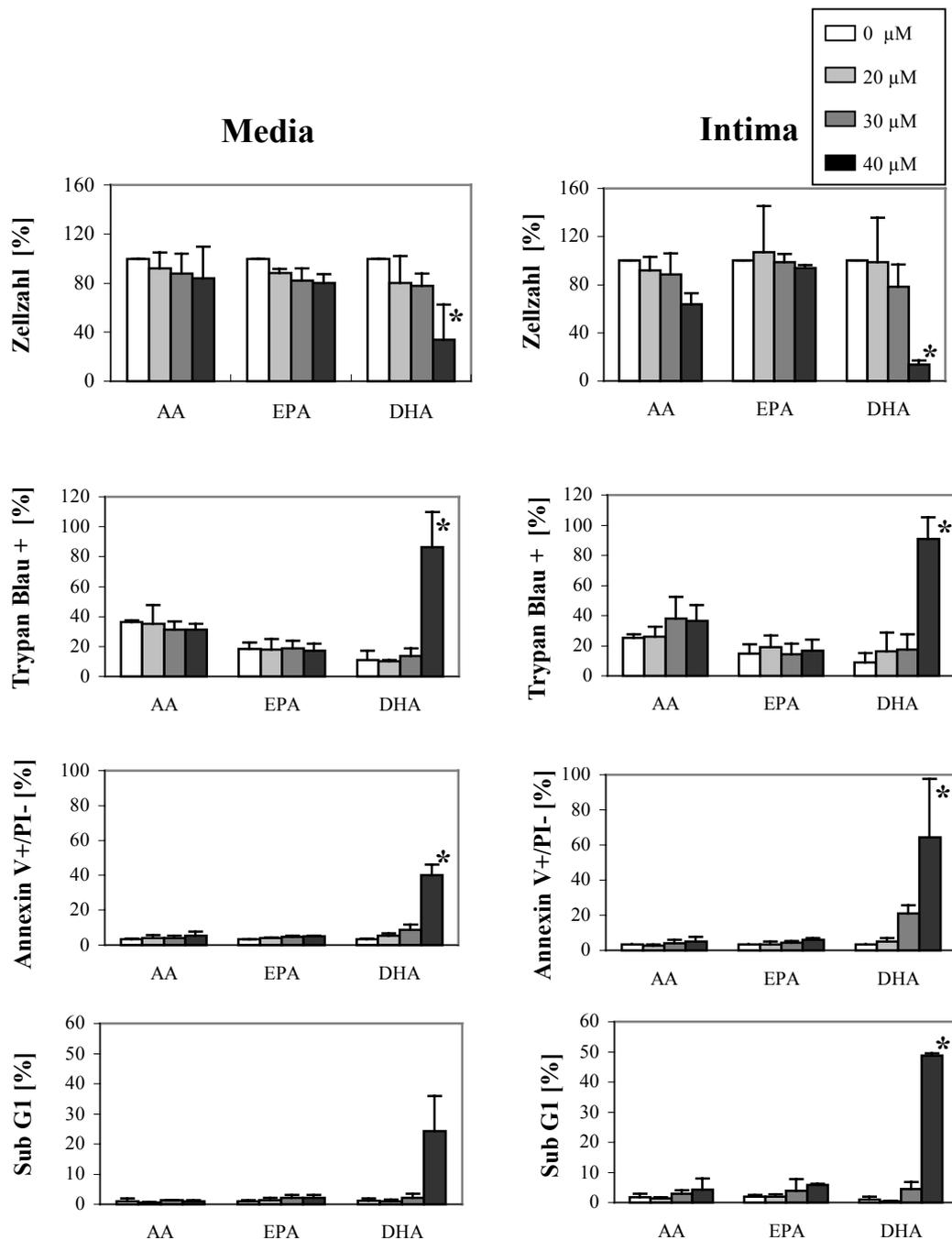
HUVEC wurden mit 20 oder 40 μM DHA für 4, 12 oder 24 h behandelt. Der Prozentanteil der apoptotischen Zellen wurde mittels Fluoreszenzhistogrammen ermittelt und ist als MW±SEM dargestellt (n=2-8, \*p<0,05).

## 2.2. Einfluss verschiedener ungesättigter Fettsäuren auf Apoptose in glatten Gefäßmuskelzellen

Glatte Gefäßmuskelzellen wurden für 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen an AA, EPA oder DHA inkubiert. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt. Während keine der untersuchten Konzentrationen von AA oder EPA weder in Media- noch in Intimazellen deutliche Effekte auf die Zahl der Zellen zeigte, wurde nach Behandlung mit DHA eine Abnahme der Zellzahl vor allem bei 40  $\mu$ M beobachtet. Bei der Trypanblaufärbung zur Bestimmung der Zellvitalität wurde dieser Befund bestätigt. DHA führte hier zu einem dramatischen Anstieg der Zahl an toten Zellen nach 24 h Behandlung. AA oder EPA zeigten dagegen kaum Wirkung.

Um zu überprüfen, ob die verringerte Zellzahl und der Anstieg an toten Zellen von Apoptose herrühren, wurde eine Annexin V Färbung durchgeführt. Nach Inkubation mit AA oder EPA gab es keine Erhöhung der Annexin-V Bindung in Media- und Intimazellen. Eine Inkubation mit DHA führte dagegen zu einem dramatischen Anstieg der Annexin V + Zellen. Die Effekte der DHA waren dosisabhängig, was vor allem bei den Intimazellen deutlich wurde.

Ähnliche Ergebnisse wie für die Annexin V Messung wurden auch bei der Bestimmung der Zellen im sub-G1 Peak des Zellzyklus erzielt. Eine Inkubation der Zellen mit AA oder EPA zeigte keinen Effekt. Die Behandlung mit DHA führte zu einer erhöhten Anzahl an Zellen mit hypodiploider DNA, vor allem in Zellen der Intima (Abb. 6).

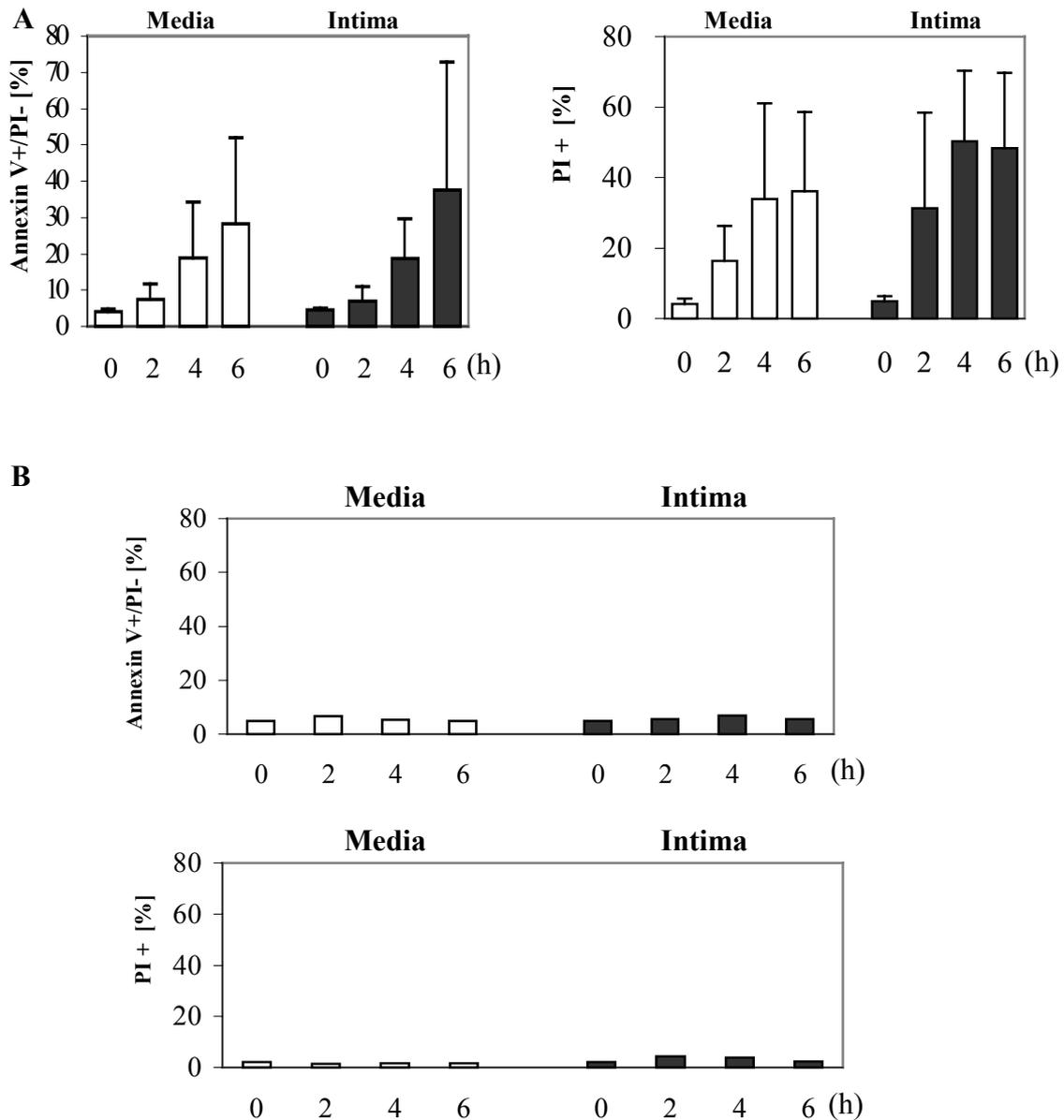


**Abb. 6. Apoptoseinduktion durch Behandlung mit DHA in glatten Gefäßmuskelzellen aus Media und Intima**

Die Zellen wurden in Kulturflaschen (25cm<sup>2</sup>) kultiviert und mit je 20, 30 oder 40 μM der verschiedenen Fettsäuren in Kulturmedium (1% FKS) für 24 h inkubiert. Anschließend wurde die Zellzahl und die Zahl an toten Zellen durch Zählung und Trypanblaufärbung ermittelt. Die Messung der Annexin V +/ PI - Zellen und des sub-G1 Bereiches erfolgte wie bei HUVEC. Dargestellt sind jeweils MW±SEM. n=2-6, \*p<0,05.

Wegen der teilweise sehr starken Effekte der DHA nach 24 h Behandlung wurde zusätzlich eine Kinetik mit kürzeren Inkubationszeiten durchgeführt. Hier zeigte sich, dass die Effekte der DHA bereits nach 4 bis 6 h Einwirkzeit zu beobachten waren (Abb. 7 A).

Die Inkubation mit AA, EPA oder DHA für 24 Stunden in glatten Gefäßmuskelzellen der Media und Intima zeigte ähnliche Effekte wie bei subkonfluenten HUVEC. Bei der Apoptoseinduktion scheinen die Intimazellen sensitiver zu reagieren als die Mediazellen. Wie sich an HUVEC gezeigt hatte, war die Reaktion der HUVEC bei Apoptoseinduktion abhängig von der Zelldichte. In glatten Muskelzellen wurde ebenfalls eine Zelldichte abhängige Apoptoseinduktion durch NF- $\kappa$ B Inhibitoren beschrieben (Erl et al., 1999). Deshalb wurde der Einfluss unterschiedlicher Zelldichte auf das Apoptoseverhalten der glatten Muskelzellen gegenüber DHA untersucht. Bei exponentiell proliferierenden glatten Muskelzellen war eine frühe zeit- und dosisabhängige Apoptoseinduktion durch DHA beobachtet worden. Eine Inkubation von glatten Muskelzellen, die in einer zehnfach höheren Dichte ( $1 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup>) ausgesät worden waren, mit 40  $\mu$ M DHA für bis zu 6 h zeigte keinerlei Veränderung der Vitalität oder Annexin V Bindung (Abb. 7 B).

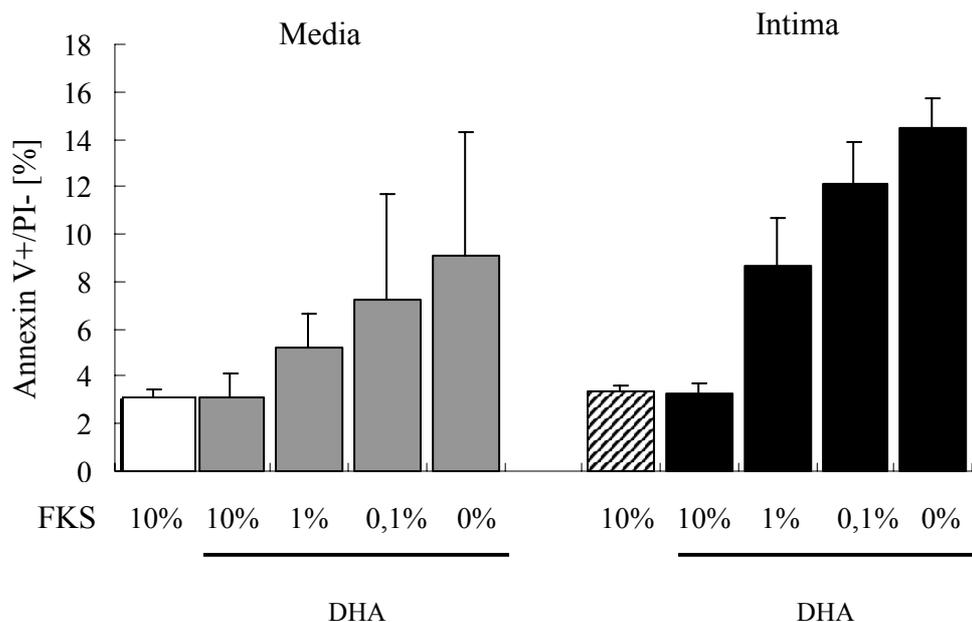


**Abb. 7. Apoptoseinduktion durch DHA in glatten Gefäßmuskelzellen aus Media und Intima ist abhängig von der Inkubationszeit und der Zelldichte**  
Für proliferierende Media- und Intimazellen (A) wurden  $1 \times 10^4$  oder  $8 \times 10^3$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät. Für hohe Zelldichte (B) wurden  $1 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup> in Kulturflaschen (25cm<sup>2</sup>) passagiert. Nach Kultivierung für 48 Stunden wurden die Zellen mit 40 µM DHA in Kulturmedium (0,1% FKS) für 2 bis 6 h inkubiert und für Annexin V oder PI Färbung verteilt. MW±SEM (A, n=2-4). Für hohe Zelldichte wurde ein Experiment durchgeführt.

### 2.3. FKS-Konzentration und Apoptoseinduktion

Serum ist ein essentieller Faktor für das Überleben und Wachstum kultivierter Zellen.

Während das Gefäßendothel unter normalen in vivo Bedingungen Serum exponiert ist, haben die glatten Gefäßmuskelzellen keinen direkten Kontakt zu Serum. Deshalb wurde der Effekt der DHA auf glatten Gefäßmuskelzellen bei unterschiedlichen Serumkonzentrationen untersucht. Es zeigte sich, dass mit abnehmender Serummenge im Kulturmedium erhöhte basale wie auch induzierte Apoptoseraten zu verzeichnen waren (Abb. 8). Wiederum schienen dabei die Intimazellen sensitiver als Mediazellen auf die Serumreduktion zu reagieren.

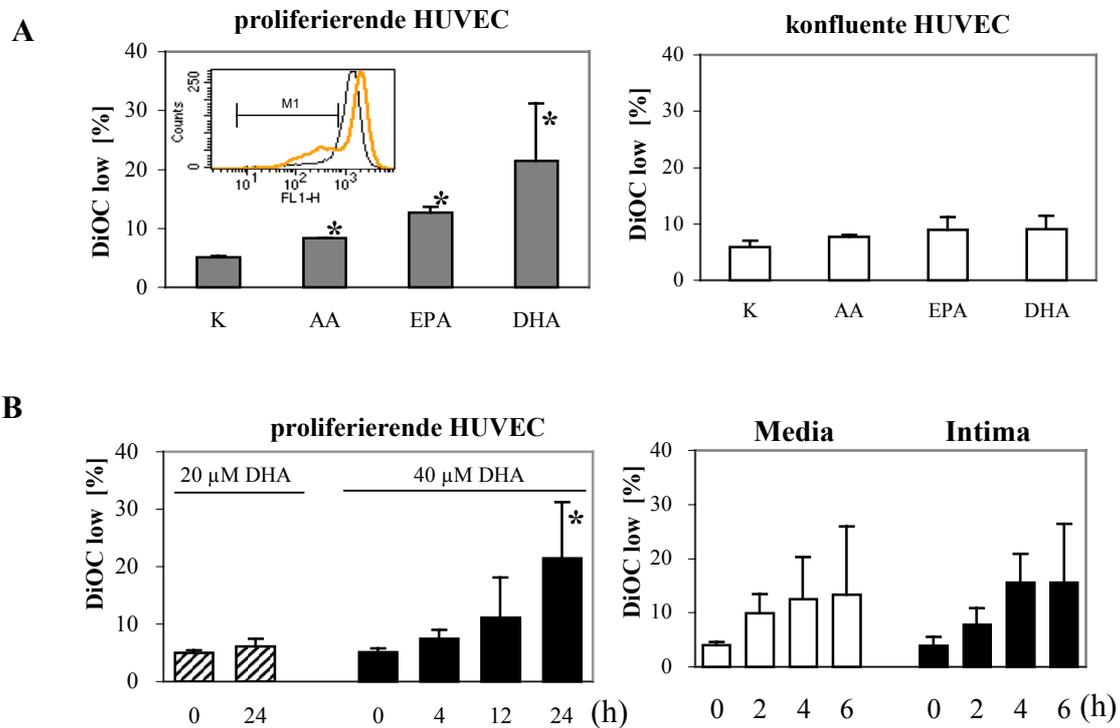


**Abb. 8. Wirkung der Konzentration von FKS auf DHA-induzierte Apoptose in glatten Gefäßmuskelzellen aus Media und Intima**

Die Zellen wurden in Medium mit den angegebenen FKS Konzentrationen mit oder ohne 20  $\mu$ M DHA für 24 h inkubiert. Die Effekte von DHA in Abhängigkeit der Serumreduktion (1%, 0,1%, 0%) wurden durch den Prozentanteil der Annexin V +/PI - Zellen im FACScan bestimmt.

### 3. Mitochondriales Membranpotential (MMP)

Eine Reduktion des MMP wurde als ein verlässlicher früher Marker für Apoptose assoziierte zelluläre Veränderungen beschrieben (Castedo et al., 1996). Deshalb wurde der Einfluss der DHA auf das MMP in Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen untersucht. Das MMP wurde durch Färbung mit dem Mitochondrien selektiven Farbstoff DiOC im Durchflusszytometer bestimmt. Während in konfluenten HUVEC die Behandlung mit allen drei Fettsäuren zu einer leichten Erhöhung des prozentualen Anteils an Zellen mit erniedrigtem MMP führte, zeigten in proliferierenden HUVEC AA oder EPA deutlich schwächere Effekte als eine Inkubation mit DHA (Abb. 9 A). Wie bei der Apoptoseinduktion war auch die Reduktion des MMP in HUVEC oder glatten Gefäßmuskelzellen zeitabhängig. Bei HUVEC wurden deutliche Effekte erst nach Inkubationszeiten von 12 bis 24 h festgestellt, während die Muskelzellen schon nach 2 bis 4 h DHA Behandlung mit einem reduzierten MMP reagierten (Abb. 9 B).



**Abb. 9. Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials durch DHA in HUVEC und glatten Gefäßmuskelzellen**

**A.** Proliferierende und konfluente HUVEC wurden mit verschiedenen Fettsäuren (AA, EPA oder DHA) für 24 Stunden inkubiert und für FACSscan Messung mit 3,3'-Dihexyloxycarbocyanin-Jodid (DiOC<sub>6</sub>(3)) gefärbt. n=2-4, \*p<0,05.

**B.** Bei verschiedenen Konzentrationen (20, 40 μM) von DHA wurden proliferierende HUVEC für die angegebenen Zeitpunkte inkubiert. Media und Intima Muskelzellen wurden mit 40 μM DHA für 2 bis 6 h inkubiert. Das Insert zeigt jeweils die Markierung der Grenzbereiche (M1) zur Ermittlung der Prozentanteile positiver Zellen. Proliferierende HUVEC: n=2-5, Muskelzellen: n=2-4, \*p<0,05.

#### 4. Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

##### Hydroethidin (HE)

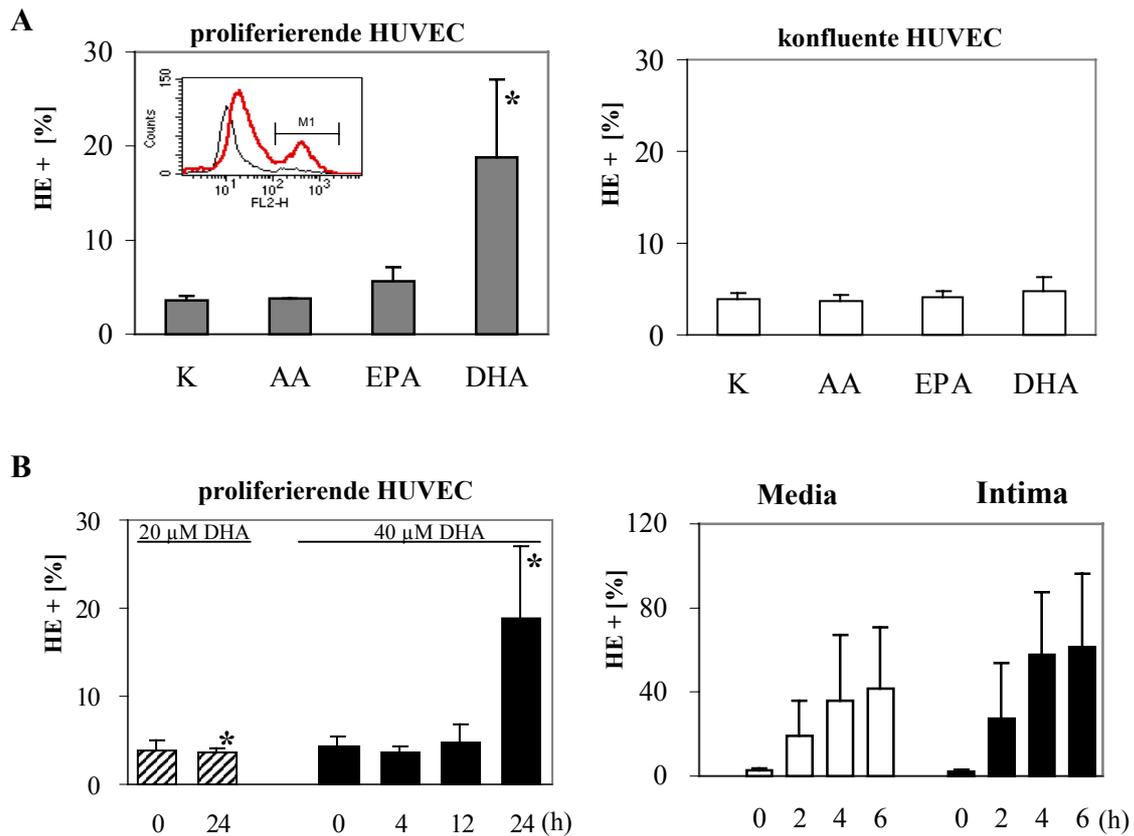
Freie Radikale spielen eine wichtige Rolle bei der Apoptose. Sowohl eine Induktion von Apoptose durch ROS, wie auch eine ROS Produktion nach Apoptoseinduktion durch andere Stimuli wurde beschrieben. Um die Bildung intrazellulärer ROS zu messen, wurden die Zellen mit HE inkubiert, welches durch Reaktion mit ROS in eine Verbindung mit erhöhter Fluoreszenz umgewandelt wird. Konfluente HUVEC zeigten keine Änderung in der ROS Produktion nach Behandlung mit 40  $\mu$ M AA, EPA oder DHA. In proliferierenden HUVEC hatte AA keinen Effekt, EPA führte zu einer leichten Erhöhung der HE Fluoreszenz von  $3,6 \pm 0,5\%$  auf  $5,6 \pm 1,5\%$  der Zellen, und DHA induzierte die Bildung von ROS in  $18,8 \pm 8,3\%$  der HUVEC nach 24 h Inkubation (Abb. 10. A).

Während in HUVEC die Radikalproduktion relativ spät einsetzte, nach 12 h Behandlung mit 40  $\mu$ M DHA war nur ein minimaler Anstieg zu beobachten, wurde in glatten Gefäßmuskelzellen ein sehr frühes Auftreten von ROS festgestellt (Abb. 10. B). Schon nach 2 h Inkubation mit DHA konnte eine 10-fach höhere Radikalproduktion im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden. Wieder reagierten Intimazellen mehr als Mediazellen.

##### 2',7'-Dichloro-dihydrofluorescein Diacetat (H<sub>2</sub>DCFDA)

Weil HE nur mit Superoxidanionen reagiert, wurde die Produktion weiterer ROS wie z.B. Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Hydroxylradikal (HO<sup>•</sup>), Peroxylradikal (HOO<sup>•</sup>) und Peroxynitritanion (ONOO<sup>-</sup>) während der Apoptose mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes DCF untersucht. Außerdem wurden die HUVEC und glatte Gefäßmuskelzellen in unterschiedlichem Kulturmedium gehalten, was sich ebenfalls auf die Radikalproduktion auswirken kann. Um vergleichbare Bedingungen zu erzeugen wurden für diese Untersuchung die HUVEC in beiden Medien und unterschiedlicher Menge an FKS mit DHA behandelt. Es zeigte sich, dass sowohl die Medienzusammensetzung als auch die FKS Konzentration auf die

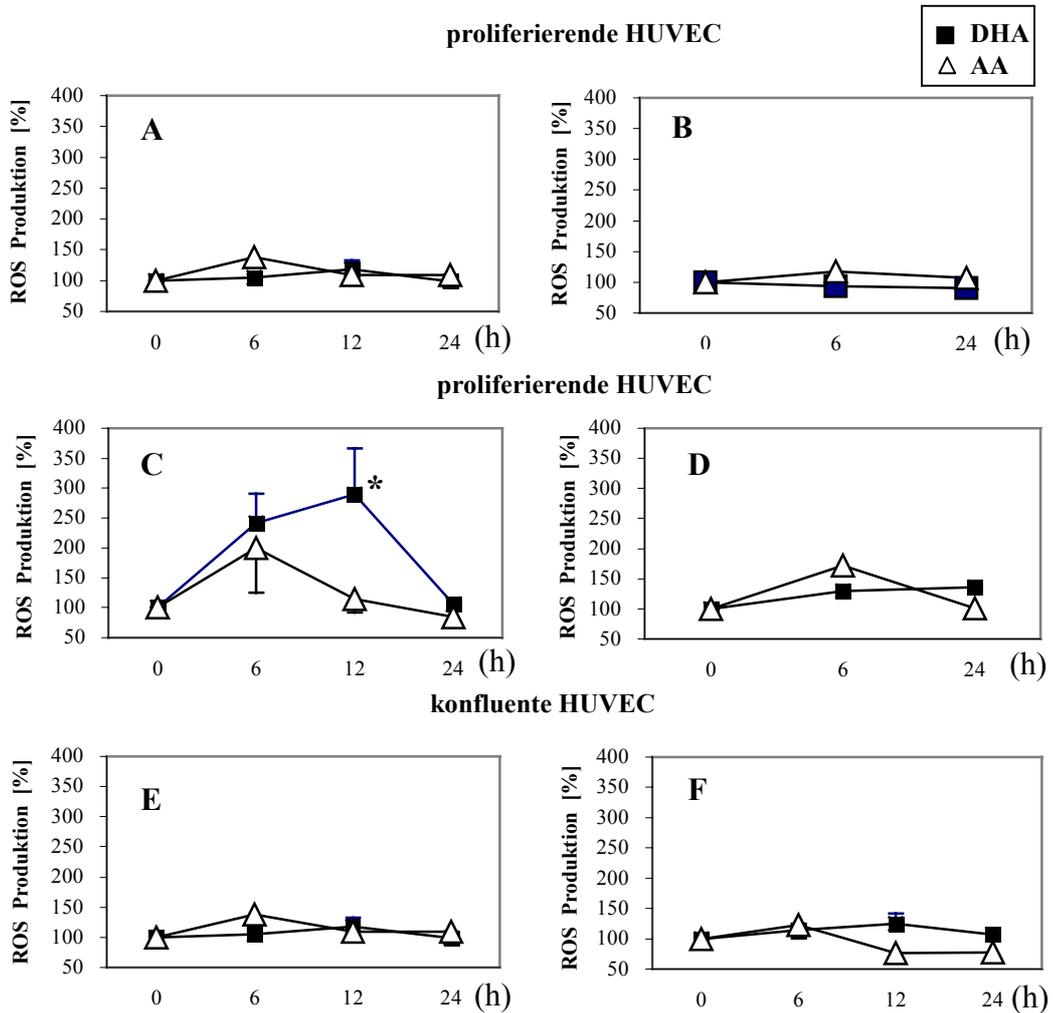
Menge der gebildeten Radikale einen Einfluss haben. In ECGM wurde keine Induktion anderer Radikale beobachtet. In DMEM wurde nur bei 0,1% FKS erhöhte DCF Fluoreszenz gefunden. Daraus lässt sich schließen, dass es in ECGM nur zur Bildung von Superoxidanionen kommt. In DMEM unter reduzierten Serumbedingungen kommt es neben der Superoxidanionenbildung auch zur Produktion anderer ROS Spezies (Abb. 11).



**Abb. 10. ROS Produktion durch DHA in HUVEC und glatten Gefäßmuskelzellen**

**A.** Dihydroethidium (HE, 2  $\mu$ M, 15 min, 37°C) wurde zur Detektion der ROS Produktion (Sauerstoffanionen) im FACScan verwendet. Die Prozentwerte für HE + Zellen wurden wieder durch Markierung der Histogramme (M1) ermittelt (siehe Insert). n=2-4, \*p<0,05.

**B.** Zeit und Dosisabhängigkeit der ROS Produktion in proliferierenden HUVEC und Muskelzellen aus Media und Intima. HUVEC: n=2-4, Muskelzellen: n=4-5, \*p<0,05.



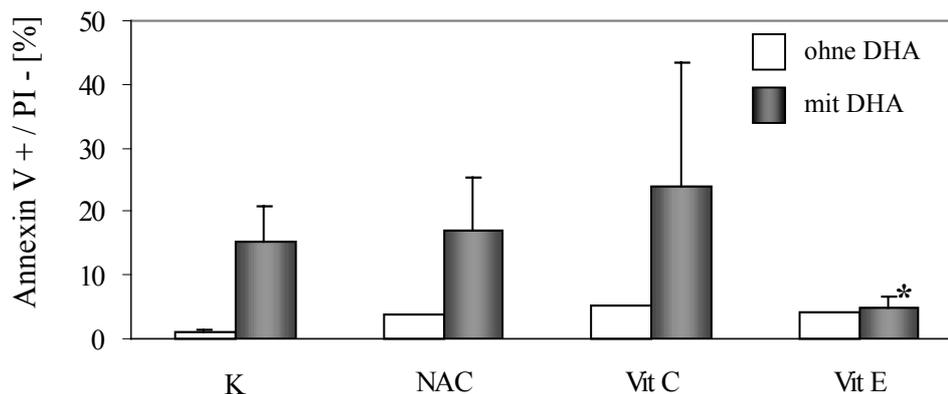
**Abb. 11. Einfluß der Mediumzusammensetzung und der FKS Konzentration auf die ROS Produktion durch DHA in HUVEC**

Proliferierende HUVEC wurden mit 40  $\mu\text{M}$  AA oder DHA in ECGM mit 2% FKS (A,E), ECGM mit 0,1% FKS (B), DMEM/ F12 mit 2% FKS (D) und DMEM/ F12 mit 0,1% FKS (C,F) für 6 bis 24 h inkubiert. Die Produktion anderer Sauerstoffradikale ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{HO}\cdot$ ,  $\text{HOO}\cdot$ ,  $\text{ONOO}\cdot$ ) durch Inkubation mit DCF (10  $\mu\text{M}$ , 30 min, 37°C) wurde im Fluoreszenzphotometer gemessen. A,C,E,F: n=3, B,D: n=1, \*p<0,05.

## 5. Einfluss von Antioxidantien bei DHA-induzierter Apoptose

### 5.1. Apoptose-Inhibition durch Vitamin E

Antioxidantien schützen den Organismus vor ROS. Weil die Induktion von Apoptose mit Radikalbildung einherging, wurde der Effekt verschiedener Antioxidantien auf die DHA-induzierte Apoptose untersucht. Eine einstündige Vorbehandlung der Zellen mit 10 mM NAC oder mit 100  $\mu$ M Vitamin C hatte keinen Einfluss auf DHA-induzierte Apoptose. Vitamin C schien die Apoptose in HUVEC basal wie auch stimuliert leicht zu erhöhen. Im Gegensatz dazu zeigte eine Vorinkubation mit 100  $\mu$ M Vitamin E eine fast 70 prozentige Reduktion der Apoptose in DHA behandelten HUVEC (Abb. 12).



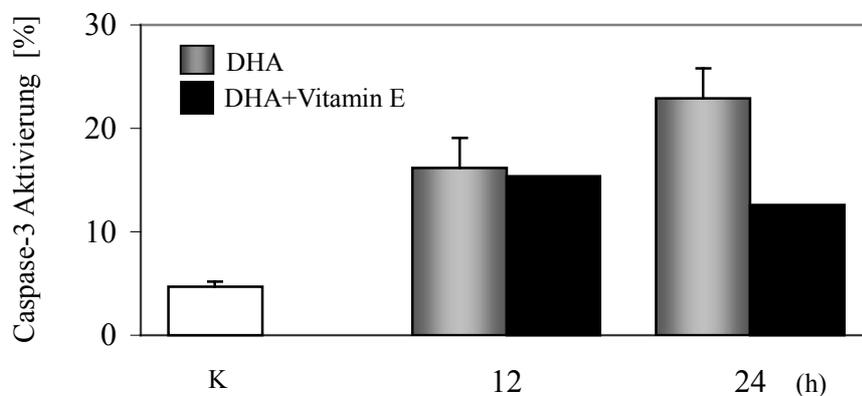
**Abb. 12. Inhibitorischer Effekt von Vitamin E bei DHA-induzierter Apoptose in proliferierenden HUVEC**

Die Zellen wurden mit 40  $\mu$ M DHA für 18 Stunden nach Vorinkubation mit 10 mM N-Acetyl-L-Cysteine (NAC), 100  $\mu$ M Vitamin C (Vit C) oder 100  $\mu$ M Vitamin E (Vit E) für 1 h behandelt und die Bindung von Annexin V im FACScan gemessen. n=2-4,

\* p<0,05. vs. K mit DHA.

## 5.2. Aktivierung der Caspase-3 durch DHA und Inhibition durch Vitamin E

Da nur Vitamin E, nicht aber andere Antioxidantien einen reduzierenden Effekt auf DHA-induzierte Apoptose ausübt, liegt die Schlussfolgerung nahe, dass Vitamin E nicht nur über antioxidative Mechanismen wirkt. Eine mögliche zusätzliche Wirkschiene des Vitamin E könnte die Inhibition der Caspasen sein (Uemura et al., 2002). Deshalb wurde die Aktivierung der Caspase-3 durch DHA gemessen. Nach 24 h Behandlung konnte in über 23% der HUVEC aktive Caspase-3 nachgewiesen werden. Eine Vorbehandlung der Zellen mit Vitamin E führte zu einer etwa 50 prozentigen Reduktion der aktivierten Caspase-3 in den Zellen (Abb. 13). Damit konnte bestätigt werden, dass Vitamin E neben der antioxidativen Wirkung durch direkte Inhibition apoptotischer Caspasen die Reduktion der DHA-vermittelten Apoptose in HUVEC bewirkt.

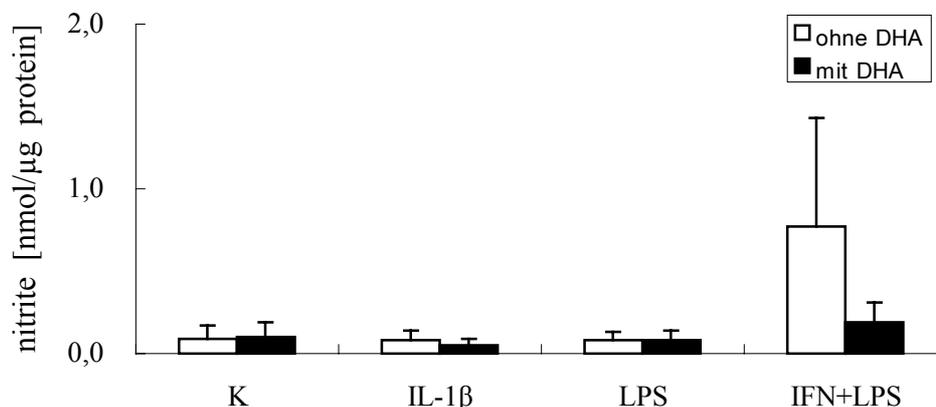


**Abb. 13. Caspase-3 Aktivierung und Effekt des Vitamin E nach Behandlung mit DHA in proliferierenden HUVEC**

Die Zellen wurden für 1 h mit oder ohne Vitamin E vorinkubiert und dann mit oder ohne DHA stimuliert. Der Prozentanteil an Zellen mit aktiver Caspase-3 und der inhibitorische Effekt des Vitamin E bei DHA-induzierter Caspase-3 Aktivierung wurden dargestellt.

## 6. Stickstoffmonoxid (NO) Produktion in glatten Gefäßmuskelzellen

Während Stickstoffmonoxid (NO) in Endothelzellen anti-apoptotische Wirkung zeigt (Dimmeler und Zeiher 1999), wurde in glatten Gefäßmuskelzellen die Induktion von Apoptose durch NO Donormoleküle wie auch eine Vermittlung der Zytokin- oder Neopterin-induzierten Apoptose über NO Produktion beschrieben (Hoffmann et al., 1998, Geng et al., 1996). Deshalb wurde die NO Produktion in Intimazellen nach DHA Stimulation gemessen. Es konnte kein Unterschied in der NO Produktion der Zellen mit DHA Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Zellen gefunden werden. Um die Sensitivität der NO Messung zu überprüfen wurden die Zellen mit IFN und LPS stimuliert. Die Kombination dieser Stimuli führte zu einem deutlichen Anstieg der NO Produktion. Überraschenderweise führte die Inkubation der Zellen mit DHA zu einer Reduktion der NO Produktion. Dieser Befund steht im Einklang mit Untersuchungen an Makrophagen, schließt aber eine Beteiligung von NO an der DHA-induzierten Apoptose aus (Abb. 14).



### Abb. 14. Effekt der DHA auf die NO Produktion in Intimazellen

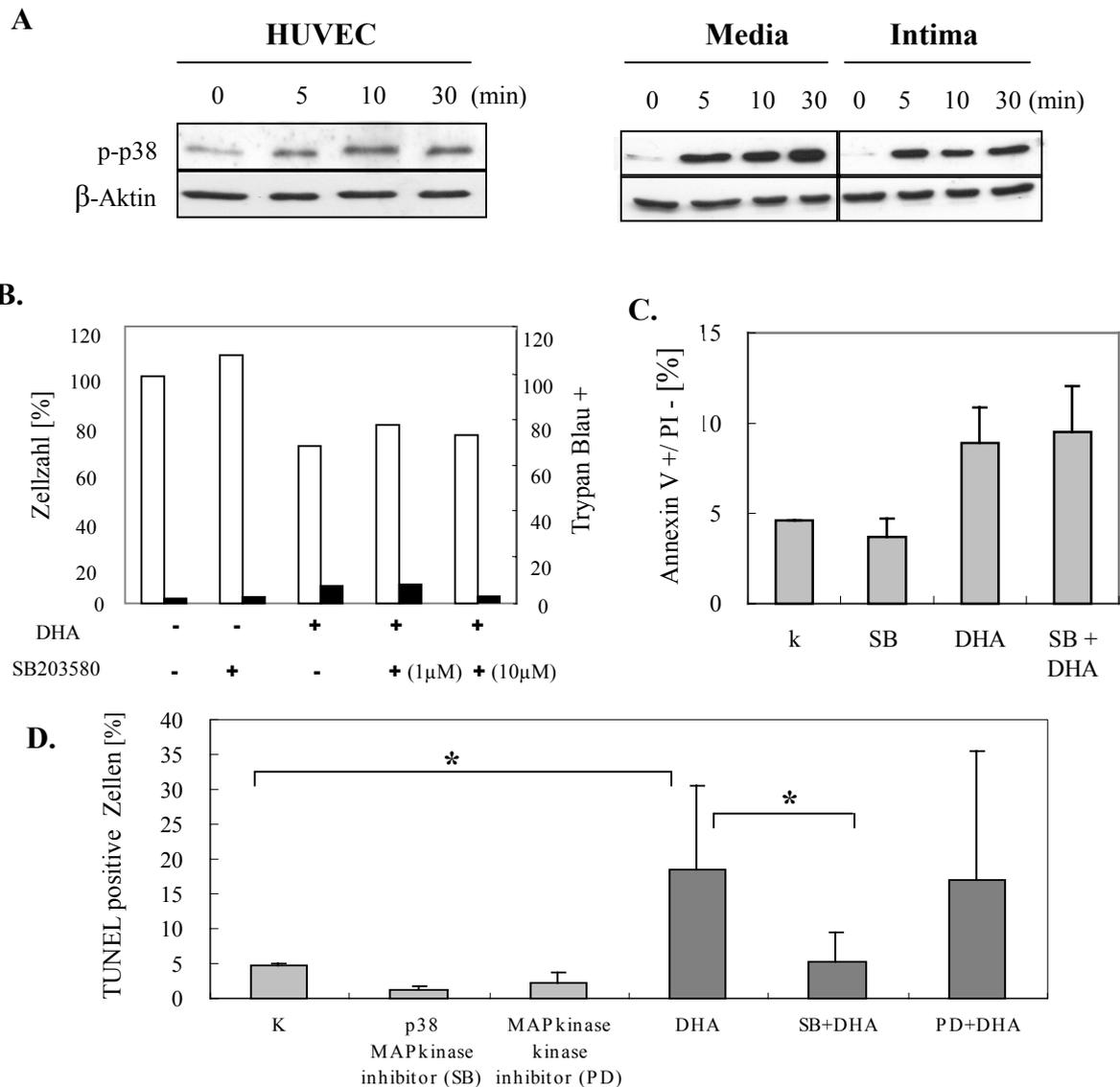
Die Zellen wurden für 3 h in DMEM/F-12 Medium mit 0,1% FKS inkubiert, und dann mit oder ohne 20  $\mu$ M DHA und IL-1 $\beta$  (1 ng/ $\mu$ l), LPS (1 mg/ml) oder einer Kombination von LPS (10 $\mu$ g/ml) + IFN- $\gamma$  (100 U/ml) für 48 h in DMEM/F-12 Medium (1% FKS) behandelt. Anschließend wurde die Produktion von NO über die Griess Reaktion gemessen. Die Daten sind dargestellt als MW $\pm$ SEM. n=3-8.

## 7. Aktivierung der MAP Kinase p38 und DNA Fragmentierung

MAP Kinase sind von essentieller Bedeutung für die Regulation elementarer zellulärer Funktionen, wie z.B. Proliferation, Differenzierung oder Apoptose. Diese Kinasen nehmen eine zentrale Rolle bei der Signaltransduktion durch Phosphorylierung ein. Die MAP Kinase p38 hemmt das Wachstum und induziert Apoptose. Das Gleichgewicht der verschiedenen MAP Kinasen scheint daher für die Zellreaktion hier zu Proliferation oder Apoptose von Bedeutung zu sein.

In Muskelzellen aus der Media war eine entscheidende Rolle der p38 MAP Kinase bei DHA-induzierter Apoptose postuliert worden (Diep et al., 2000). Deshalb wurde die p38 Aktivierung in Media- und Intimazellen nach DHA Behandlung untersucht. Phosphoryliertes p38 konnte in Media- und Intimazellen nachgewiesen werden. Die Inkubation mit DHA führte zu einer erhöhten p38 Phosphorylierung sowohl in Mediazellen, als auch in Intimazellen (Abb. 15 A). Allerdings war die p38 Phosphorylierung in den Mediazellen höher als in den Intimazellen. Da die Zellen aus der Intima konsistent mit erhöhter Apoptose nach DHA Behandlung reagierten, ist es deshalb unwahrscheinlich, dass p38 eine bedeutende Rolle bei der Apoptoseregulation der Muskelzellen durch DHA spielt.

Auch für Endothelzellen war eine Beteiligung der p38 MAP Kinase an der Apoptoseregulation durch unterschiedliche Stimuli beschrieben (Yilmaz et al., 2003, Takahashi et al., 2002). Die Behandlung von HUVEC mit DHA führte zu einer deutlichen Phosphorylierung des p38 nach 5 bis 30 min Inkubation (Abb. 15 A). Während die Wirkung des p38 Inhibitors SB203580 auf Ebene der DNA Degradierung bestätigt werden konnte (Abb. 15 D), war es nicht möglich einen Effekt dieses spezifischen Inhibitors auf die Zellvitalität oder Annexin V Bindung nachzuweisen (Abb. 15 C,D). Dies legt die Vermutung nahe, dass SB203580 mit der DNA Degradierung, nicht aber Apoptoseprozessen generell interferiert.



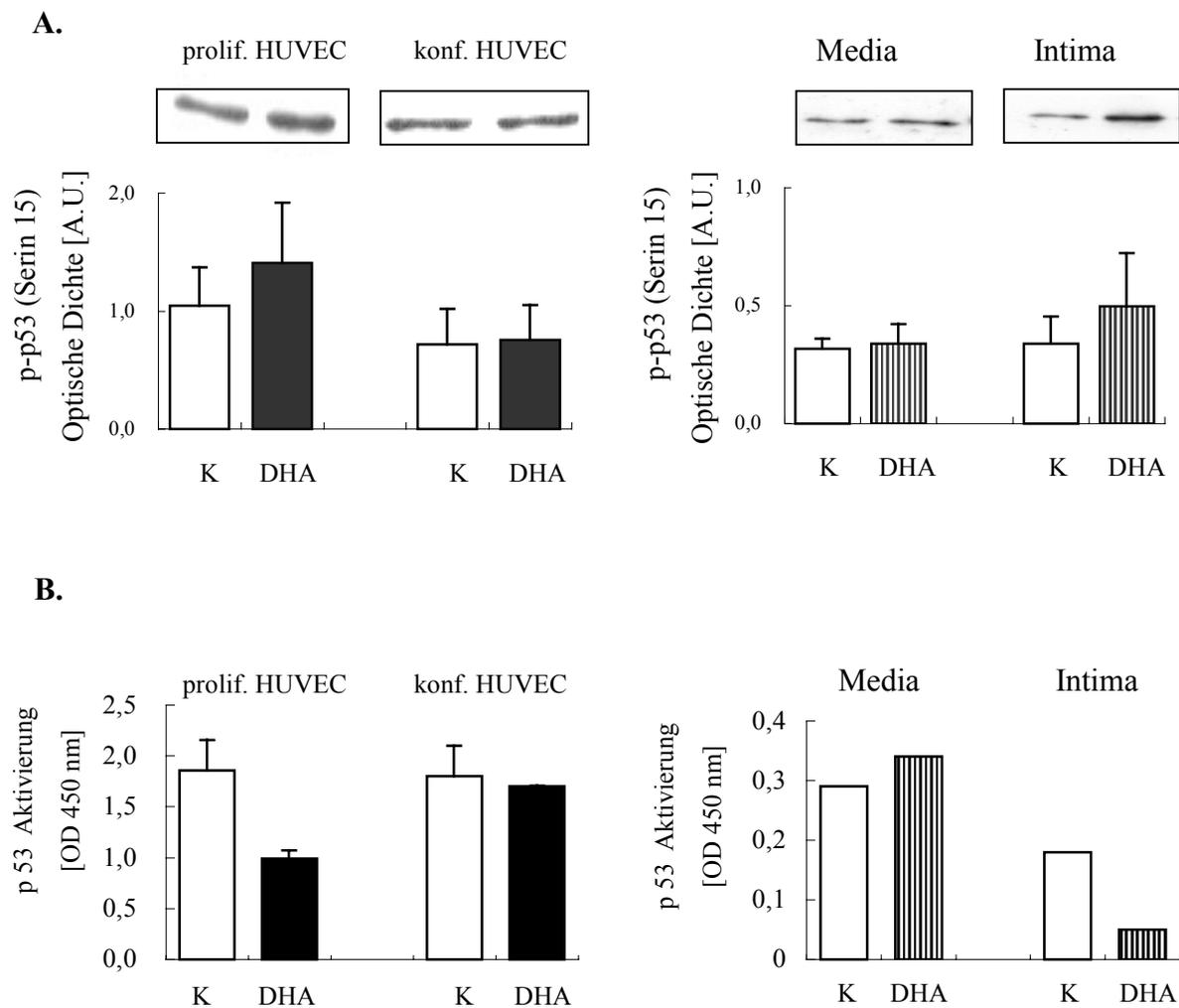
**Abb. 15. Effekte von DHA auf Aktivierung der p38 MAP Kinase und DNA Fragmentierung in proliferierenden HUVEC und glatten Gefäßmuskelzellen**

**A.** Western Blot Analyse der Phosphorylierung der p38 MAP Kinase nach Stimulation mit 40  $\mu$ M DHA in proliferierenden HUVEC und glatten Gefäßmuskelzellen. Als Kontrolle für die Proteinmenge wurde  $\beta$ -Aktin verwendet. **B.** Gesamtzellzahl (weiße Balken) und Trypanblau positive Zellen (schwarze Balken). Die Zellen wurden mit p38 MAP Kinase Inhibitor SB 203580 (1/10  $\mu$ M) für 1 h vorinkubiert und dann mit 40  $\mu$ M DHA für 14 h inkubiert. Die Gesamtzellzahl wurde als Prozent der Kontrolle dargestellt.

**C.** Bindung von Annexin-V. Die Zellen wurden mit p38 MAP Kinase Inhibitor SB 203580 (10  $\mu$ M) für 1 h vorinkubiert und dann mit 40  $\mu$ M DHA für 24 h inkubiert. **D.** TUNEL Färbung. DNA Fragmentierung mit oder ohne MAP Kinase Inhibitor wurde durch TUNEL Kit gemessen. Die Zellen wurden mit 10  $\mu$ M SB203580 (SB) oder dem MAP Kinase Kinase Inhibitor PD98059 für 1 h vorinkubiert und für 16 bis 24 h mit DHA behandelt. Der Prozentanteil TUNEL-positiver Zellen wurde im FACScan quantifiziert. n=3-6, \* p<0,05.

## 8. Phosphorylierung von p53 an Serin 15

Die Funktion des Tumorsuppressor Proteins p53 als antiproliferativer Schutzmechanismus zur Verhinderung der Vermehrung geschädigter Zellen wurde durch die in letzter Zeit mehrfach beschriebene starke proapoptotische Wirkung dieses Proteins untermauert. Wegen der widersprüchlichen Befunde bezüglich einer Beteiligung von p38 an der Apoptoseregulation in HUVEC und Muskelzellen durch DHA wurde der p53 Signalweg als ein weiterer möglicher Mechanismus untersucht. Die Inkubation mit DHA führte in proliferierenden HUVEC und in Intimazellen zu einer erhöhten Phosphorylierung des p53 an Serin 15. In konfluenten HUVEC oder in Mediazellen wurde keine Zunahme der Serin 15 Phosphorylierung durch DHA beobachtet (Abb. 16 A). Eine Phosphorylierung von p53 an Serin 15 beeinflusst die DNA Bindung und damit die Aktivität des p53. Die Bestimmung der p53 DNA Bindung mit Hilfe eines für diesen Transkriptionsfaktor spezifischen Analysesystems zeigte, dass die p53 Bindungsaktivität in DHA-behandelten proliferierenden HUVEC und Intimazellen beeinträchtigt war, während in konfluenten Endothelzellen oder Mediazellen keine Beeinflussung gefunden werden konnte (Abb. 16 B). Die erhöhte Phosphorylierung des p53 an Serin 15 und eine anschließende beeinträchtigte DNA Bindung könnte eine mögliche Erklärung für die konsistent beobachtete gesteigerte Apoptoserate in proliferierenden HUVEC und Intimazellen darstellen.



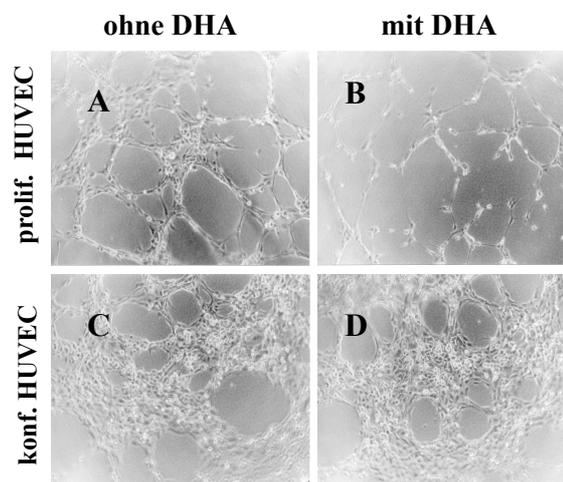
**Abb. 16. p53 Phosphorylierung an Serin 15 und p53 Aktivierung in HUVEC und glatten Gefäßmuskelzellen**

Proliferierende Endothelzellen wurden mit oder ohne 40  $\mu$ M DHA in ECGM für 2 h behandelt. Media- und Intimazellen wurden mit DHA (40  $\mu$ M) in Medium mit 0,1% FKS für 6 h inkubiert. **A.** Western Blot Analyse der p53 Phosphorylierung an Serin 15. Die Signale im Western Blot wurden im Densitometer gemessen und zur p53 Gesamtprotein oder  $\beta$ -Aktin Expression in Relation gesetzt. Die relative Expression ist in den Diagrammen dargestellt. HUVEC: n=2, Media: n=2, Intima: n=3.

**B.** DNA Bindung des p53 Proteins in HUVEC und glatten Gefäßmuskelzellen gemessen mit dem *TransAM p53 Transcription Factor Assay Kit*. Die HUVEC wurden für 2 h und die Muskelzellen für 6 h mit 40  $\mu$ M DHA stimuliert.

## 9. Einfluss unterschiedlicher Fettsäuren auf Angiogenese

Eine mögliche funktionelle Konsequenz der Apoptoseinduktion durch DHA in proliferierenden Endothelzellen ist die Inhibition der Angiogenese. Dieser Prozess kann in sogenannten Matrigelassays stimuliert werden. Hier wird der gelöste Extrakt aus Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Maus Sarcoma, einem Tumor, der reich an extrazellulärem Matrixprotein und Wachstumsfaktoren ist, als Substrat für die Endothelzellen geliert. Darauf ausgesäte HUVEC bilden ein vielfach verzweigtes Netzwerk aus, vergleichbar dem Sprossungsprozess bei der Angiogenese. Für diesen Versuch wurden höhere Zellmengen eingesetzt als in den Apoptoseversuchen, weil ein nicht unerheblicher Teil der Zellen in das Gel einwandert, und dadurch eine Art dreidimensionale Struktur entsteht. Die Zellmenge ( $1 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup>) wurde so gewählt, dass eine deutliche Netzwerkbildung auf der Geloberfläche beobachtet werden konnte. Eine gleichzeitige Inkubation mit DHA bei Passage auf das Matrigel führte zu einer deutlichen Störung der Netzwerkbildung (Abb. 17 B). Wie in den Apoptoseuntersuchungen zeigte DHA bei hoher Zelldichte ( $2 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup>) keinen Effekt.



**Abb. 17. Inhibition der Endothelnetzwerkbildung durch DHA**

Die HUVEC wurden mit oder ohne DHA (40  $\mu$ M) gemischt und in verschiedener Dichte (A und B,  $1 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup>. C und D,  $2 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup>) in Matrigelbeschichtete 24-Well Zellkulturplatten ausgesät. Nach Inkubation für 4 h zeigten die Zellen mehr oder weniger ausgeprägte Netzwerkbildung und wurden unter dem Mikroskop (x100) fotografiert.

## **D. Diskussion**

### 1. Apoptoseinduktion durch DHA in proliferierenden Endothel- und Muskelzellen

Zu Beginn der Untersuchungen war bekannt, dass DHA Apoptose in glatten Gefäßmuskelzellen aus der Media induzieren kann (Diep et al., 2000). Als verantwortlicher Mechanismus wurde die Aktivierung der p38 MAP Kinase postuliert. Der Effekt von DHA auf Endothelzellen oder glatte Gefäßmuskelzellen aus der Intima war noch nicht untersucht. Deshalb wurde zuerst die Induktion von Apoptose in HUVEC näher betrachtet. Mehrere Gruppen hatten anti-inflammatorische Effekte von DHA in konfluenten Endothelzellen nachgewiesen (Weber et al., 1995, De Caterina und Libby 1996, Mayer et al., 2002). Es wurde überprüft, ob DHA unter diesen Bedingungen Apoptose induziert. In konfluenten HUVEC zeigte DHA keinen Effekt auf die Apoptose der Zellen. Die Inkubation mit AA oder EPA dagegen führte zu einem leichten, aber nicht signifikanten Anstieg der Annexin V positiven apoptotischen Zellen. Da DHA im Tumormodell anti-angiogenetische Wirkung gezeigt hatte, wurden als nächstes subkonfluente, proliferierende HUVEC untersucht. Hier zeigte sich, dass DHA eine deutliche Apoptoseinduktion verursachte, während AA oder EPA wesentlich schwächere Effekte als DHA zeigten. Bei der Ermittlung der Zahl an toten Zellen ergab sich ein ähnliches Bild. Der Effekt der DHA war bei diesem Parameter noch stärker ausgeprägt. Die Messung der Zellen mit hypodiploider DNA durch Zellzyklusanalysen bestätigte oben genannte Befunde. Auch bei den Zellen im sub-G1 Bereich führte DHA zu einem starken Anstieg des Anteils an Zellen mit degradiertem DNA, während AA oder EPA keine signifikanten Effekte zeigten. Die konfluenten Zellen reagierten bei der PI Färbung und in der Zellzyklusanalyse praktisch nicht auf die Behandlung mit den drei verschiedenen Fettsäuren. Die Effekte von DHA in proliferierenden HUVEC waren Zeit- und Dosis-abhängig. Ein Anstieg der Zahl an toten Zellen und der Zellen im sub-G1 Bereich war nur nach 24 h Behandlung zu beobachten. Die Inkubation der Zellen mit 20 µM DHA führte zu schwächeren Effekten als 40 µM, aber immer noch zu deutlicher Apoptoseinduktion.

Die Apoptose-assoziierten Parameter, wie eine Veränderung im MMP oder in der Sauerstoffradikal-Produktion zeigten ähnliche Trends wie die Apoptoseparameter. Beim MMP wurde auch durch die Behandlung mit AA oder EPA eine leichte Reduktion beobachtet. DHA wirkte aber am stärksten. Außerdem war hier schon nach 12 h Inkubation mit DHA eine Reduktion zu beobachten, während bei den klassischen Apoptoseparametern eine Behandlung für 24 h nötig war. Die Produktion von Sauerstoffradikalen wurde nur durch DHA angeregt, während AA und EPA keine Effekte zeigten. Auch hier war ein Anstieg erst nach 24 h feststellbar. Konfluente Zellen reagierten auf keine der Fettsäuren, weder beim Membranpotential noch bei der Radikalproduktion.

Der relativ späte aber deutliche Anstieg der Radikalproduktion legte die Vermutung nahe, dass die HUVEC zwar auf DHA reagieren, die Veränderungen aber nicht detektierbar sind. Die Kultur der Zellen erfolgte in einem kommerziellen "low-serum" Medium. Im allgemeinen zeichnen sich diese Medien, vor allem für die Endothelzellkultur durch einen hohen Anteil an Antioxidantien aus. Deshalb wurden die Versuche zur Radikalproduktion in einem anderen Medium und unter reduzierten Serumbedingungen durchgeführt. Dies brachte folgende Erkenntnisse. 1) In Endothelzellmedium hat eine Reduktion des Serums keinen Effekt. 2) In DMEM führt die Serumreduktion zu einem dramatischen Anstieg der Radikalproduktion. 3) Serumzugabe verhindert diesen Anstieg. 4) In konfluenten Zellen konnte auch in DMEM mit 0,1% Serum keine Radikalproduktion durch DHA induziert werden. Daraus kann geschlossen werden, dass Endothelzellmedium protektive Substanzen enthält, dass Serum ebenfalls antioxidatives Potential besitzt, und vor allem, dass konfluente Zellen unter reduzierten Serumbedingungen in Medium frei von Antioxidantien auf DHA nicht mit Radikalproduktion reagieren.

In glatten Gefäßmuskeln führte die Behandlung mit DHA ebenfalls zu einer Zeit- und Dosis-abhängigen Apoptoseinduktion. Sowohl bei unspezifischen Parametern wie Zellzahl und Zelltod, wie auch bei den spezifischen Apoptoseparametern wie Annexin V Bindung und

DNA Degradierung reagierten die Zellen der Intima stärker als Zellen der Media. Im Unterschied zu HUVEC wurde bei den glatten Muskelzellen eine relativ rasche Apoptoseinduktion beobachtet. Dies könnte durch das unterschiedliche Inkubationsmedium erklärt werden. Bei den Muskelzellen wurde eine Abhängigkeit der DHA Wirkung vom Serumgehalt des Mediums beobachtet. Die Entfernung von Wachstumsfaktoren, was durch einen Serumentzug bewirkt wird, stellt eine etablierte Methode zur Apoptoseinduktion dar (Meredith 1993). Dabei reagieren vor allem Endothelzellen sehr sensitiv auf Serummangel (Levkau et al., 1999; Gerber HP 1998), aber auch in glatten Muskelzellen kann dadurch Apoptose ausgelöst werden (Wang W, 2003). Deshalb steht der Befund der Serum abhängigen Apoptoseinduktion durch DHA in glatten Gefäßmuskelzellen im Rahmen der Erwartungen.

In Übereinstimmung mit den Beobachtungen in HUVEC zeigte DHA in glatten Gefäßmuskelzellen hoher Dichte keine pro-apoptotischen Effekte. Dies ist in Einklang mit Befunden durch andere Apoptosestimuli in glatten Muskelzellen (Erl et al., 1999 und 2000). Dabei scheint es sich um ein generelles Phänomen zu handeln, denn hohe Zelldichte schützt auch andere Zelltypen vor Apoptose-induzierenden Reagenzien (Bar et al., 2004). Einen möglichen Mechanismus wie diese Protektion zustande kommen könnte liefert eine kürzlich erschienene Studie. Hier wurde gezeigt, dass Zell-Zell Kontakte über Cadherine die Sensitivität der Zellen hoher Dichte für p53-induzierte Apoptose deutlich verringerte, während in Zellen niedriger Dichte, die auf Apoptoseinduktion reagierten keine Zell-Zell Kontakte, sondern nur Zell-Substrat Kontakte nachgewiesen werden konnten (Bar et al., 2004).

Zwei Studien hatten gezeigt, dass auch AA Apoptose in Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen induzieren kann (Artwohl et al, 2004; Kalyankrishna et al, 2002). Hier wurde wie bei unseren Versuchen mit proliferierenden HUVEC gearbeitet. Allerdings zeigte nur die höchste getestete Konzentration von 300  $\mu$ M AA einen Effekt. An A-10 Zellen, einer

Zell-Linie aus Ratten Aorta, hatte AA ebenfalls Apoptose induziert. Allerdings nur bei einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  und unter Serumfreien Bedingungen. Diese Befunde stehen deshalb nicht in Widerspruch zu den hier präsentierten Daten, weil entweder andere Zellen untersucht wurden, oder wesentlich höhere Konzentrationen an Fettsäuren eingesetzt wurden. In der Arbeit von Kalyankrishna (2002) konnte die pro-apoptotische Wirkung der Fettsäure durch Vorbehandlung der Zellen mit Vitamin E inhibiert werden. In den vorliegenden Untersuchungen konnten die Effekte der DHA durch Vitamin E, nicht aber andere Antioxidantien wie Vitamin C oder NAC inhibiert werden. Eine mögliche Erklärung dafür könnte der Befund sein, dass Vitamin E ox-LDL-induzierte Endothelzellapoptose sowohl über antioxidative, wie auch Antioxidantien-unabhängige Wirkung inhibiert (Uemura et al., 2002). Dabei scheint vor allem ein Effekt des Vitamin E auf die Aktivierung der Caspase 3 eine Rolle zu spielen. Die Bestimmung der Caspase 3 Aktivität in DHA behandelten HUVEC mit und ohne Vitamin E bestätigte diesen Befund. Vitamin E reduzierte sowohl die Annexin V Bindung wie auch die Caspase 3 Aktivierung.

## 2. Mögliche Mechanismen der Apoptoseinduktion

### Stickstoffmonoxid

NO inhibiert die Proliferation und Migration glatter Gefäßmuskelzellen (Dusting 1995) und die Zytokin-induzierte Apoptose in glatten Muskelzellen wird teilweise durch NO-Produktion vermittelt (Hoffmann et al., 1998, Geng et al., 1996). Außerdem wurde eine Beteiligung von NO bei Ceramid-induzierter Apoptose in Mediazellen (Pilane und LaBelle 2004) und ein Anstieg im Verhältnis der Bax/Bcl-2 Proteinexpression bei NO-induzierter Apoptose gezeigt (Chae et al., 2004). Dies führte zur Cytochrom C Freisetzung aus Mitochondrien und zur Aktivierung von Caspase-3 und resultierte in Apoptose. Deshalb wurde die NO Produktion in Intima Zellen nach DHA Stimulation gemessen. Es konnte kein Unterschied in der NO Produktion der Zellen nach DHA Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Zellen gefunden

werden. Um die Sensitivität der NO Messung zu überprüfen wurden die Zellen mit IFN und LPS stimuliert. Die Kombination dieser Stimuli führte zu einem deutlichen Anstieg der NO Produktion. Überraschenderweise führte die Inkubation der Zellen mit DHA zu einer Reduktion der NO Produktion. Dieser Befund steht im Einklang mit Untersuchungen an Makrophagen (Komatsu et al., 2003, Lu et al., 1998, Jeyarajah et al., 1999) schließt aber eine Beteiligung von NO an der DHA-induzierten Apoptose aus. Im Gegensatz dazu war bei Interleukin-1-induzierter NO Produktion in Mediazellen eine verstärkende Wirkung der n-3 Fettsäuren DHA und EPA beschrieben worden (Hirafuji et al., 2002). Eine Stimulation der Zellen mit Interleukin-1 führte aber weder in Media- noch in Intimazellen zu einer erhöhten NO Bildung, und auch die gleichzeitige Behandlung der Zellen mit DHA zeigte keinen Effekt.

#### p38 MAP Kinase

Eine entscheidende Rolle bei der Apoptoseregulation wurde für die p38 MAP Kinase in Endothelzellen postuliert (Takahashi et al., 2002, Yilmaz et al., 2003). Zusätzlich war gezeigt worden, dass DHA Behandlung in glatten Gefäßmuskelzellen zu einer Phosphorylierung des p38 führt (Diep et al., 2000). Außerdem war bei all diesen Studien gezeigt worden, dass der spezifische p38 Inhibitor SB203580 in einer Reduktion der Apoptose-induzierten DNA Degradierung resultiert. Deshalb wurde die p38 Phosphorylierung in HUVEC und glatten Gefäßmuskelzellen durch Western Blot Analysen bestimmt. Die Behandlung der Zellen mit DHA führte zu einer deutlichen Phosphorylierung des p38 nach 5 bis 30 minütiger Inkubation. Allerdings zeigten die Mediazellen ein stärkeres Signal als die Intima Zellen. Deshalb liefert die Aktivierung des p38 keine Erklärung für die unterschiedliche Reaktion der beiden Zelltypen. In HUVEC wurde die Degradierung der DNA durch TUNEL Färbung gemessen. Hier zeigte der p38 Inhibitor SB203580 einen deutlichen inhibitorischen Effekt. Dieser Effekt war aber auf Ebene der Annexin V Bindung nicht nachvollziehbar. Es könnte daher vermutet werden, dass der Effekt von SB203580 nur auf DNA Ebene zu sehen ist, wie

dies auch in allen anderen Untersuchungen gezeigt ist (Takahashi et al., 2002, Yilmaz et al., 2003, Diep et al., 2000). Bei der Untersuchung der verantwortlichen Mechanismen der DHA-induzierten Apoptose war schon vermutet worden, dass neben p38 abhängigen Apoptosewegen auch p38 unabhängige Wege involviert sein könnten (Diep et al., 2000). Deshalb trägt die p38 MAP Kinase vermutlich nur indirekt zur Apoptoseinduktion durch DHA bei.

### Tumorsuppressor Protein p53

Das Tumorsuppressor Protein p53 ist entscheidend beteiligt an der Zellzykluskontrolle und scheint auch eine Rolle bei der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen nach Gefäßverletzung zu spielen. Ein Verlust der p53 Aktivität könnte zur Restenosebildung beitragen (Speir et al., 1994). Ein Transfer von Wildtyp p53 inhibiert die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen in vitro und in vivo (Yonemitsu et al., 1998). Normalerweise werden die p53 Spiegel durch Bindung an MDM2 und eine ständige Degradierung in proliferierenden Zellen niedrig gehalten. Stress Signale führen zu einer Phosphorylierung und Stabilisierung des p53 (Oren 1999). Die Phosphorylierung an Serin 15 wurde hierfür als besonders bedeutend angesehen. Allerdings wurde inzwischen gezeigt, dass die Serin 15 Phosphorylierung nicht die MDM2 Bindung beeinflusst, sondern eine p53 Transaktivierung durch Interaktion mit *cAMP response element-binding protein/binding protein p300* verursacht (Lambert et al., 1998, Dumaz und Meek 1999, Schon et al., 2002). In letzter Zeit gewinnt das Tumorsuppressor Protein p53 zudem zunehmend an Bedeutung als Apoptoseregulator (Oda et al., 2000, Gottlieb und Oren 1998, George et al., 2001). Zusätzlich wurde gezeigt, dass eine Mutation in Serin 15 die Fähigkeit von p53 zur Apoptoseinduktion schwächt (Lin et al., 2002). Weil die Befunde bezüglich der p38 Phosphorylierung keine ausreichende Erklärung für die beobachteten Effekte der DHA vor allem bei Media- und Intimazellen lieferten, wurde die Expression und Aktivierung von p53 untersucht. Western Blot Analysen zeigten keine Unterschiede bei der

p53 Gesamtproteinmenge. Im Gegensatz dazu wurden bei der Phosphorylierung des p53 an Serin 15 deutliche Unterschiede gefunden. DHA induzierte eine Phosphorylierung an Serin 15 in proliferierenden Endothelzellen und Intimazellen, aber nicht in konfluenten Endothelzellen und Mediazellen. Für die Resveratrol-induzierte Inhibition der Proliferation in glatten Gefäßmuskelzellen war gezeigt worden, dass die Serin 15 Phosphorylierung des p53 zu einer Beeinträchtigung der DNA Bindung führt (Haider et al., 2003). Außerdem war gezeigt worden, dass Resveratrol in glatten Muskelzellen Apoptose auslösen kann (Mnjoyan und Fujise 2003). Deshalb wurde die p53 DNA Bindung in HUVEC und in glatten Gefäßmuskelzellen mit und ohne DHA Behandlung mit Hilfe eines *Transcription Factor Assay Kits* gemessen. In proliferierenden HUVEC und Intima Zellen führte die Behandlung mit DHA zu einer reduzierten p53 DNA Bindung. In konfluenten HUVEC oder in Mediazellen war die DNA Bindung unverändert oder sogar leicht erhöht. Die Befunde an Gefäßmuskelzellen der Ratte konnten an Zellen aus humanen Läsionen verifiziert werden. Daraus kann geschlossen werden, dass die Serin 15 Phosphorylierung zu einer unterschiedlichen DNA Bindungsfähigkeit des p53 führt. Diese unterschiedliche Reaktion bei der p53 Aktivierung könnte eine Erklärung für die beobachteten Unterschiede in der Apoptosesensitivität in HUVEC oder Gefäßmuskelzellen liefern.

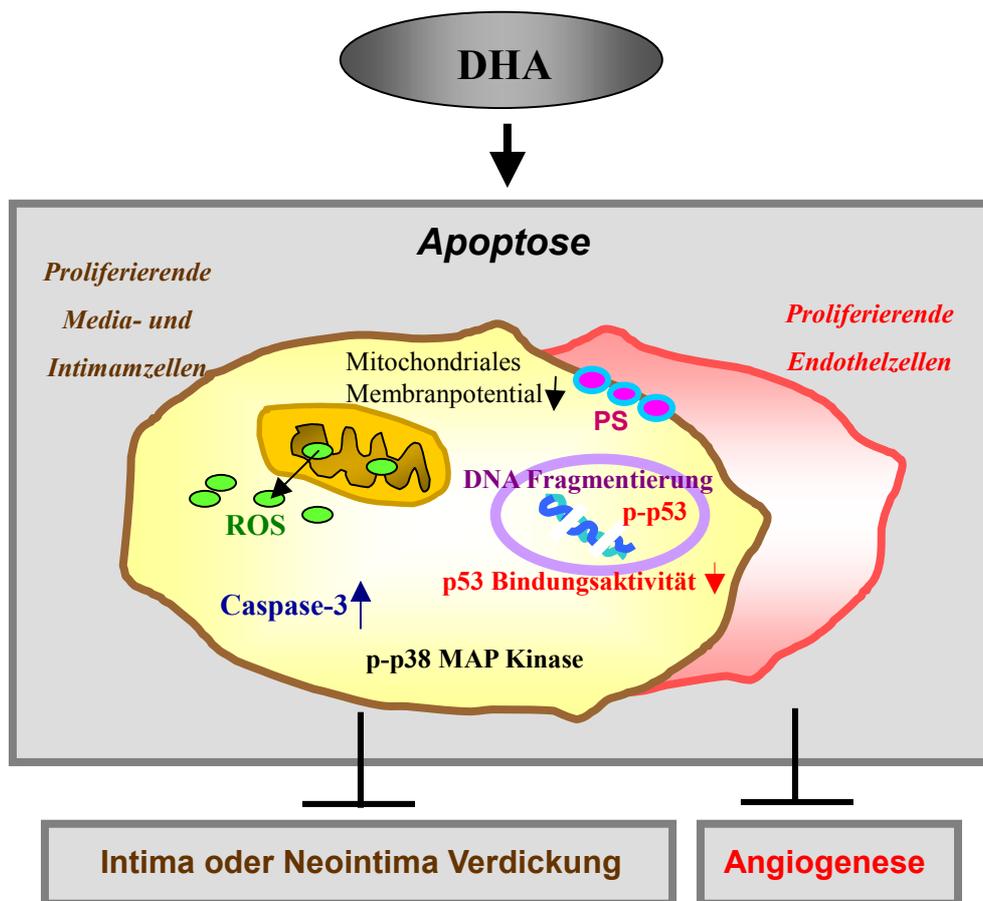
### 3. Einfluss unterschiedlicher Fettsäuren auf Angiogenese

Eine mögliche funktionelle Konsequenz der Apoptoseinduktion durch DHA in proliferierenden Endothelzellen könnte eine Inhibition der Angiogenese darstellen. Dieser Prozess wurde im Matrigelassay untersucht. HUVEC bilden auf Matrigel ein vielfach verzweigtes Netzwerk aus, vergleichbar dem Sprossungsprozess bei der Angiogenese. Eine gleichzeitige Inkubation mit DHA führte zu einer deutlichen Störung der Netzwerkbildung durch die HUVEC. Wie in den Apoptoseuntersuchungen zeigte DHA bei hoher Zelldichte keinen Effekt. Durch diesen Befund lässt sich die im Mausmodell gemachte Beobachtung

eines reduzierten Tumorwachstums durch Fütterung mit DHA erklären (Rose und Connolly 1999). DHA verhindert die Neoangiogenese im Tumorgewebe. Darüber hinaus könnte DHA eine Störung bereits beginnenden Gefäßwachstums bewirken, wodurch der verringerte Mikrogefäßanteil in den DHA behandelten Tieren erklärbar wäre.

#### 4. Mögliche Wirkung der n-3 PUFA in vivo

Die Induktion von Apoptose in Intimazellen könnte die Progression atherosklerotischer Plaques verzögern. Zusätzlich könnte die Inhibition der Angiogenese im Intimagewebe diesen Effekt verstärken (Abb. 18). Eine Aufnahme von DHA durch gesunde Ernährung oder Supplementation könnte so einen Beitrag zur Primärprävention leisten. Dabei darf aber nicht außer Acht gelassen werden, dass die Apoptoseinduktion in der Intima zu einer Destabilisierung der fibrösen Kappe führen könnte. Es wurde beschrieben, dass Makrophagen über NO Produktion in glatten Gefäßmuskelzellen Apoptose auslösen können (Boyle et al., 2002). Unsere Daten zeigen, dass die Zytokin-induzierte NO Produktion in glatten Gefäßmuskelzellen durch DHA inhibiert wird. Zusammen mit den Ergebnissen anderer Gruppen, die ähnliche Befunde für Makrophagen erstellt haben (Jeyarajah et al., 1999, Lu et al., 1998, Komatsu et al., 2003), könnte man sagen, dass DHA die Aktivierung in Muskelzellen und Makrophagen reduziert. Über die Diät zugeführte n-3 PUFA werden in atherosklerotische Läsionen eingebaut (Rapp et al., 1991). Zusätzlich wurde vor kurzem an atherosklerotischen Plaques aus der Carotis gezeigt, dass eine Supplementation mit Fischöl zu einer Stabilisierung der Plaques führt (Thies et al., 2003). Deshalb scheint der Nettoeffekt der PUFA auf die Plaquekomposition aus einer Stabilisierung vor allem durch Inhibition der Makrophagenaktivierung und –rekrutierung zu bestehen. Generell stellen sowohl die Inhibition der Makrophagen wie auch die Unterdrückung der Gefäßmuskelzellproliferation positive Wirkungen der DHA dar, die insgesamt den Verlauf der Atherosklerose günstig beeinflussen könnten.



**Abb.18. Schema der durch DHA induzierten Apoptose in proliferierenden Media und Intima Muskelzellen und Endothelzellen.**  
 Darstellung möglicher Wirkmechanismen und Folgen der DHA-induzierten Apoptose

## **E. Zusammenfassung**

In dieser Arbeit wurde der Einfluss verschiedener langkettiger mehrfach ungesättigter Fettsäuren auf Proliferation und Apoptose in humanen Endothelzellen und glatten Gefäßmuskelzellen untersucht.

Man kann Folgendes zusammenfassen:

1. DHA, aber nicht AA oder EPA, induzierte Apoptose in proliferierenden HUVEC, in proliferierenden glatten Gefäßmuskelzellen und bevorzugt in Zellen aus der Intima.
2. Die Behandlung mit DHA führte zur Reduktion des mitochondrialen Membranpotentials und zur Produktion von Superoxidanionen.
3. DHA erhöhte die Phosphorylierung der p38 MAP Kinase und des p53. Die p53 Phosphorylierung an Serin 15 führte zu einer Beeinträchtigung der DNA Bindung. Dieser Signalweg könnte eine mögliche Erklärung für die DHA-induzierte Apoptose in proliferierenden HUVEC und in glatten Gefäßmuskelzellen der Intima bieten.
4. DHA inhibierte die Angiogenese in proliferierenden Endothelzellen.

Die Apoptoseinduktion durch DHA könnte zur Antiangiogenese und Inhibition der Intima-Verdickung oder der Neointima-Entstehung beitragen.

## F. Literaturverzeichnis

Andrew PJ, Mayer B. Enzymatic function of nitric oxide synthases. *Cardiovasc Res.* 1999;43:521-531.

Artwohl M, Roden M, Waldhausl W, Freudenthaler A, Baumgartner-Parzer SM. Free fatty acids trigger apoptosis and inhibit cell cycle progression in human vascular endothelial cells. *FASEB J.* 2004;18:146-148.

Asakura M, Ueda Y, Nanto S, Hirayama A, Adachi T, Kitakaze M, Hori M, Kodama K. Remodeling of In-Stent neointima, which became thinner and transparent over 3 years. *Circulation* 1998;97:2003-2006.

Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998;281:1305-1308.

Baas AS, Berk BC. Differential activation of mitogen-activated protein kinases by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and O<sub>2</sub><sup>-</sup> in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1995;77:29-36.

Bar J, Cohen-Noyman E, Geiger B, Oren M. Attenuation of the p53 response to DNA damage by high cell density. *Oncogene* 2004;23:2128-2137.

Baughman KL, Pasternak RC, Fallon JT, Block PC. Transluminal coronary angioplasty of postmortem human hearts. *Am J Cardiol.* 1981;48:1044-1047.

Baumann KH, Hessel F, Larass I, Muller T, Angerer P, Kiefl R, von Schacky C. Dietary  $\omega$ -3,  $\omega$ -6 and  $\omega$ -9 unsaturated fatty acids and growth factor and cytokine gene expression in unstimulated and stimulated monocytes. A randomized volunteer study. *Arterioscl. Thromb Vasc Biol.* 1991;19:59-66.

Bauriedel G, Höfling B: Mechanismus der Re-Stenosierung nach Angioplastie. *Medizin im Dialog, Sonderheft Kardiologie.* 1995;08:6-13.

Berk BC. Redox signals that regulate the vascular response to injury. *Thromb Haemost.* 1999;82:810-817.

Bolli R. Oxygen-derived free radicals and postischemic myocardial dysfunction. ("stunned myocardium"). *J Am Coll Cardiol.* 1988;12:239-249.

Bossy-Wetzel E, Newmeyer DD, Green DR. Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *EMBO J.* 1998;17:37-49.

Boyle JJ, Weissberg PL, Bennett MR. Human macrophage-induced vascular smooth muscle cell apoptosis requires NO enhancement of Fas/Fas-L interactions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1624-1630.

Bruch-Gerharz D, Ruzicka T, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide in human skin: Current status and future prospects. *J Invest Dermatol.* 1998;110:1-7.

Cai H, Harrison DG. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res.* 2000;87:840-844.

Carmeliet P, Collen D. Role of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptors in vascular development. In: *Vascular growth factors and angiogenesis.* Lena Claesson-Welsh (ed). 1998;138.

Casscells W. Migration of smooth muscle and endothelial cells - critical events in restenosis. *Circulation* 1992;86:723-729.

- Castaneda-Zuniga WR, Formanek A, Tadavarthy M, Vlodaver Z, Edwards JE, Zollikofer C, Amplatz K. The mechanism of balloon angioplasty. *Radiology* 1980;135:565-571.
- Castedo M, Hirsch T, Susin SA, Zamzami N, Marchetti P, Macho A, Kroemer G. Sequential acquisition of mitochondrial and plasma membrane alterations during early lymphocyte apoptosis. *J Immunol.* 1996;157:512-521.
- Chae IH, Park KW, Kim HS, Oh BH. Nitric oxide-induced apoptosis is mediated by Bax/Bcl-2 gene expression, transition of cytochrome c, and activation of caspase-3 in rat vascular smooth muscle cells. *Clin Chim Acta.* 2004;341:83-91.
- Chang HY und Yang X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000;12:821-846.
- Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway. *Cell* 1994;79:13-21.
- Davies M. The composition of coronary artery plaques. *N Engl J Med.* 1997;336:1312-1314.
- De Caterina R, Libby P. Control of endothelial leukocyte adhesion molecules by fatty acids. *Lipids* 1996;31:57-63.
- Detre K, Costigan T, Kesley S. PTCA in 1985: NHLBL PTCA registry. *Am J Cardiol.* 1987;53:126-130.
- Diep QN, Touyz RM, Schiffrin EL. Docosahexaenoic acid, a peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  ligand, induces apoptosis in vascular smooth muscle cells by stimulation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Hypertension* 2000;36:851-855.
- Dimmeler S, Zeiher AM. Nitric oxide-an endothelial cell survival factor. *Cell Death Differ.* 1999;6:964-968.
- Dumaz N, Meek DW. Serine15 phosphorylation stimulates p53 transactivation but does not directly influence interaction with HDM2. *EMBO J.* 1999;18:7002-7010.
- Dusting GJ. Nitric oxide in cardiovascular disorders. *J Vasc Res.* 1995;32:143-161.
- Enos W.F., Holmes R.H., Beyer J. Coronary artery disease among United States soldiers killed in action in Korea. *J Am Medical Ass.* 1953;152:1090-1093
- Erl W, Hansson GK, de Martin R, Draude G, Weber KS, Weber C. Nuclear factor- $\kappa$ B regulates induction of apoptosis and inhibitor of apoptosis protein-1 expression in vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1999;84:668-677.
- Erl W, Weber C, Hansson GK. Pyrrolidine dithiocarbamate-induced apoptosis depends on cell type, density, and the presence of Cu(2+) and Zn(2+). *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000;278:1116-1125.
- Fabisiak JP, Kagan VE, Ritov VB, Johnson DE, Lazo JS. Bcl-2 inhibits selective oxidation and externalization of phosphatidylserine during paraquat-induced apoptosis. *Am J Physiol.* 1997;272:675-684.
- Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM. Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF- $\beta$ , PGE<sub>2</sub>, and PAF. *J Clin Invest.* 1998;101:890-898.
- Fadok VA, Savill JS, Haslett C, Bratton DL, Doherty DE, Campbell PA, Henson PM. Different populations of macrophages use either the vitronectin receptor or the phosphatidylserine receptor to recognize and remove apoptotic cells. *J Immunol.* 1992;149:4029-4035.

- Farb A, Virmani R, Atkinson JB, Kolodgie FD. Plaque morphology and pathologic changes in arteries from patients dying after coronary balloon angioplasty. *J Am Coll Cardiol*. 1990;16:1421-1429.
- Fernandes G, Bysani C, Venkatraman JT, Tomar V, Zhao W. Increased TGF- $\beta$  and decreased oncogene expression by  $\omega$ -3 fatty acids in the spleen delays onset of autoimmune disease in B/W mice. *J Immunol*. 1994;152:5979-5987.
- Finkel T. Oxygen radicals and signaling. *Curr Opin Cell Biol*. 1998;10:248-253.
- Finkel T. Redox-dependent signal transduction. *FEBS Lett*. 2000;476:52-54.
- Forrester JS, Fishbein M, Helfant R, Fagin J. A paradigm for the restenosis based on cell biology: clues for the development of new preventive therapies. *J Am Coll Cardiol*. 1991;17:758-769.
- Fridman JS, Lowe SW. Control of apoptosis by p53. *Oncogene* 2003;22:9030-9040.
- Fuchs S, Kornowski R, Leon MB, Epstein SE. Anti-angiogenesis: A new potential strategy to inhibit restenosis. *Int J Cardiovasc Intervent*. 2001;4:3-6.
- Geng YJ, Hellstrand K, Wennmalm A, Hansson GK. Apoptotic death of human leukemic cells induced by vascular cells expressing nitric oxide synthase in response to  $\gamma$ -interferon and tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Cancer Res*. 1996;56:866-874.
- George SJ, Angelini GD, Capogrossi MC, Baker AH. Wild-type p53 gene transfer inhibits neointima formation in human saphenous vein by modulation of smooth muscle cell migration and induction of apoptosis. *Gene Ther*. 2001;8:668-676.
- Gerber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*. 1998;273:13313-13316.
- Gimbrone MA, Jr. Vascular endothelium: an integrator of pathophysiologic stimuli in atherosclerosis. *Am J Cardiol*. 1995;75:67-70.
- Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med*. 1987;316:1371-1375.
- Gottlieb TM, Oren M. p53 and apoptosis. *Semin Cancer Biol*. 1998;8:359-368.
- Greene EL, Velarde V, Jaffa AA. Role of reactive oxygen species in bradykinin-induced mitogen-activated protein kinase and c-fos induction in vascular cells. *Hypertension* 2000;35:942-947.
- Grewe PH, Deneke T, Holt SK, Machraoui A, Barmeyer J, Muller KM. Scanning electron microscopic analysis of vessel wall reactions after coronary stenting. *Z Kardiol*. 2000;89:21-27.
- Griendling KK, Harrison DG. Dual role of reactive oxygen species in vascular growth. *Circ Res*. 1999;85:562-563.
- Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res*. 1994;74:1141-1148.
- Griffioen AW, Molema G. Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacol Rev*. 2000;52:237-268.
- Haider UG, Sorescu D, Griendling KK, Vollmar AM, Dirsch VM. Resveratrol increases serine15-phosphorylated but transcriptionally impaired p53 and induces a reversible DNA replication block in serum-activated vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol*. 2003;63:925-932.
- Han DK, Chaudhary PM, Wright ME, Friedman C, Trask BJ, Riedel RT, Baskin DG, Schwartz SM,

- Hood L. MRIT, a novel death-effector domain-containing protein, interacts with caspases and bcl-xL and initiates cell death. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:11333-11338.
- Han Z, Bhalla K, Pantazis P, Hendrickson EA, Wyche JH. Cif (Cytochrome c efflux-inducing factor) activity is regulated by bcl-2 and caspase and correlates with the activation of Bid. *Mol Cell Biol*. 1999;19:1381-1389.
- Han Z, Li G, Bremner TA, Lange TS, Zhang G, Jemmerson R, Wyche JH, Hendrickson EA. A cytosolic factor is required for mitochondrial cytochrome c efflux during apoptosis. *Cell Death Diff*. 1998;5:469-479.
- Hao M, Lowy AM, Kapoor M, Deffie A, Liu G, Lozano G. Mutation of phosphoserine 389 affects p53 function in vivo. *J Biol Chem*. 1996;271:29380-29385.
- Harris WS. Fish oil and plasma lipid and lipoprotein metabolism in humans. A critical review. *J Lipid Res*. 1989;30:785-807.
- Hengartner MO. CED-4 is a stranger no more. *Nature* 1997;388:714-715.
- Herbst U, Toborek M, Kaiser S, Mattson MP, Hennig B. 4-Hydroxynonenal induces dysfunction and apoptosis of cultured endothelial cells. *J Cell Physiol*. 1999;181:295-303.
- Hirafuji M, Machida T, Tsunoda M, Miyamoto A, Minami M. Docosahexaenoic acid potentiates interleukin-1 $\beta$  induction of nitric oxide synthase through mechanism involving p44/42 MAP Kinase activation in rat vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol*. 2002;136:613-619.
- Hirao A, Kong YY, Matsuoka S, Wakeham A, Ruland J, Yoshida H, Liu D, Elledge SJ, Mak TW. DNA damage-induced activation of p53 by the checkpoint kinase Chk2. *Science* 2000;287:1824-1827.
- Hoffmann G, Kenn S, Wirleitner B, Deetjen C, Frede S, Smolny M, Rieder J, Fuchs D, Baier-Bitterlich G, Schobersberger W. Neopterin induces nitric oxide-dependent apoptosis in rat vascular smooth muscle cells. *Immunobiology* 1998;199:63-73.
- Indolfi C, Esposito G, Stabile E, Cavuto L, Pisani A, Coppola C, Torella D, Perrino C, Di Lorenzo E, Curcio A, Palombini L, Chiariello M. A new rat model of small vessel stenting. *Basic Res Cardiol*. 2000;95:179-185.
- Indolfi C, Mongiardo A, Curcio A, Torella D. Molecular mechanisms of in-stent restenosis and approach to therapy with eluting stents. *Trends Cardiovasc Med*. 2003;13:142-148
- Ip JH, Fuster V, Israel D, Badimon L, Badimon J, Chesebro JH. The role of platelets, thrombin, and hyperplasia in restenosis after coronar angioplasty. *J Am Coll Cardiol*. 1991;17:77-88.
- Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest*. 1973;52:2745-2756.
- Jeyarajah DR, Kielar M, Penfield J, Lu CY. Docosahexaenoic acid, a component of fish oil, inhibits nitric oxide production in vitro. *J Surg Res*. 1999;83:147-150.
- Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated pathway mediated by ERK, JNK and p38 Protein Kinase. *Science* 2002;298:1911-1912.
- Kalyankrishna S, Parmentier JH, Malik KU. Arachidonic acid-derived oxidation products initiate apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 2002;70:13-29.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26:239-257.

- Kluck RM, Bossy-Wetzel E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for bcl-2 regulation of apoptosis. *Science* 1997a;275:1132-1136.
- Kluck RM, Martin SJ, Hoffman BM, Zhou JS, Green DR, Newmeyer DD. Cytochrome c activation of CPP32-like proteolysis plays a critical role in a *Xenopus* cell-free apoptosis system. *EMBO*. 1997b;16:4639-4649.
- Knippschild U, Milne DM, Campbell LE, DeMaggio AJ, Christenson E, Hoekstra MF, Meek DW. p53 is phosphorylated in vitro and in vivo by the  $\delta$  and epsilon isoforms of casein kinase 1 and enhances the level of casein kinase 1  $\delta$  in response to topoisomerase-directed drugs. *Oncogene* 1997;15:1727-1736.
- Kohn KW. Molecular interaction map of the mammalian cell cycle control and DNA repair systems. *Mol Biol Cell*. 1999;10:2703-2734.
- Komatsu R, Ueda M, Naruko T, Kojima A, Becker AE. Neointimal tissue response at sites of coronary stenting in humans. *Circulation* 1998;98:224-233.
- Komatsu W, Ishihara K, Murata M, Saito H, Shinohara K. Docosahexaenoic acid suppresses nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in interferon- $\gamma$  plus lipopolysaccharide-stimulated murine macrophages by inhibiting the oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2003;34:1006-1016.
- Kroemer G, Zamzami N, Susin SA. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol. Today*. 1997;18:44-51.
- Kuida K, Haydar TF, Kuan CY, Gu Y, Taya C, Karasuyama H, Su MS, Rakic P, Flavell RA. Reduced apoptosis and cytochrome c-mediated caspase activation in mice lacking caspase 9. *Cell* 1998;94:325-337.
- Kuida K, Zheng TS, Na S, Kuan C, Yang D, Karasuyama H, Rakic P, Flavell RA. Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature* 1996;384:368-372.
- Lambert PF, Kashanchi F, Radonovich MF, Shiekhattar R, Brady JN. Phosphorylation of p53 serine 15 increases interaction with CBP. *J Biol Chem*. 1998;273:33048-33053.
- Lehr HA, Hubner C, Finckh B, Nolte D, Beisiegel U, Kohlschutter A, Messmer K. Dietary fish oil reduces leukocyte, endothelium interaction following systemic administration of oxidatively modified low density lipoprotein. *Circulation* 1991;84:1725-1731.
- Levkau B, Scatena M, Giachelli CM, Ross R, Raines EW. Apoptosis overrides survival signals through a caspase-mediated dominant-negative NF- $\kappa$ B loop. *Nat Cell Biol*. 1999;1:227-233.
- Libby P, Schwartz D, Brogi E, Tanaka H, Clinton SK. A cascade model for restenosis. A special case of atherosclerosis progression. *Circulation* 1992;86:47-52.
- Lin HY, Shih A, Davis FB, Tang HY, Martino LJ, Bennett JA, Davis PJ. Resveratrol induced serine phosphorylation of p53 causes apoptosis in a mutant p53 prostate cancer cell line. *J Urol*. 2002;168:748-755
- Lohrum M, Scheidtmann KH. Differential effects of phosphorylation of rat p53 on transactivation of promoters derived from different p53 responsive genes. *Oncogene* 1996;13:2527-2539.
- Lohrum MA, Vousden KH. Regulation and function of the p53-related proteins: same family, different rules. *Trends Cell Biol*. 2000;10:197-202.
- Lu CY, Penfield JG, Khair-el-Din TA, Sicher SC, Kielar ML, Vazquez MA, Che L. Docosahexaenoic

acid, a constituent of fetal and neonatal serum, inhibits nitric oxide production by murine macrophages stimulated by IFN- $\gamma$  plus LPS, or by IFN- $\gamma$  plus *Listeria monocytogenes*. *J Reprod Immunol*. 1998;38:31-53.

Lu H, Fisher RP, Bailey P, Levine AJ. The CDK7-cycH-p36 complex of transcription factor IIIH phosphorylates p53, enhancing its sequence-specific DNA binding activity in vitro. *Mol Cell Biol*. 1997;17:5923-5934.

Lüscher, TF, BS Oemar, Z Yang, G Noll: Molekulare und zelluläre Mechanismen der Arteriosklerose und Restenose: Möglichkeiten der Gentherapie. *Z Kardiol*. 1996;85:495-508.

Machnig T, Zahn R, Rustige J, Godicke J, Marsalek P, Gulba D. Clinical safety using the thrombocyte aggregation inhibitor c7E3 in interventional cardiology in 520 patients. *Z Kardiol*. 1997;86:975-981.

Malle E, Kostner GM. Effects of fish oils on lipid variables and platelet indices. *Prostaglandin Leukot Essent Fatty Acids*. 1993;49:645-663.

Marchetti P, Castedo M, Susin SA, Zamzami N, Hirsch T, Macho A, Haeffner A, Hirsch F, Geuskens M, Kroemer G. Mitochondrial permeability transition is a central coordinating event of apoptosis. *J Exp Med*. 1996;184:1155-1160.

Marletta MA. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell* 1994;78:927-930.

Martin SJ, Green DR. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts. *Cell* 1995;82:349-352.

Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Susin SA, Beutner G, Brdiczka D, Remy R, Xie ZH, Reed JC, Kroemer G. The permeability pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J Exp Med*. 1998a;187:1261-1271.

Marzo I, Susin SA, Petit PX, Ravagnan L, Brenner C, Larochette N, Zamzami N, Kroemer G. Caspases disrupt mitochondrial membrane barrier function. *FEBS Lett*. 1998b;427:198-202.

Masutani H. Oxidative stress response and signaling in hematological malignancies and HIV infection. *Int J Hematol*. 2000;71:25-32.

Mayer K, Merfels M, Muhly-Reinholz M, Gokorsch S, Rosseau S, Lohmeyer J, Schwarzer N, Krull M, Suttorp N, Grimminger F, Seeger W.  $\omega$ -3 fatty acids suppress monocyte adhesion to human endothelial cells: role of endothelial PAF generation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283:811-818.

Mercado N, Boersma E, Wijns W, Gersh BJ, Morillo CA, de Valk V, van Es GA, Grobbee DE, Serruys PW. Clinical and quantitative coronary angiographic predictors of coronary restenosis: a comparative analysis from the balloon-to-stent era. *J Am Coll Cardiol*. 2001;38:645-652.

Meredith JE Jr, Fazeli B, Schwartz MA. The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Biol Cell*. 1993;4:953-961.

Mintz GS, Popma JJ, Pichard AD, Kent KM, Satler LF, Wong C, Hong MK, Kovach JA, Leon MB. Arterial remodelling after coronary angioplasty. A serial intravascular ultrasound study. *Circulation* 1996;94:35-43.

Mnjoyan ZH, Fujise K. Profound negative regulatory effects by resveratrol on vascular smooth muscle cells: a role of p53-p21(WAF1/CIP1) pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;311:546-552.

Moulton KS. Plaque angiogenesis and atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2001;3:225-233.

Möröy T, Zoernig M. Regulators of life and death: the bcl-2 gene family. *Cell Physiol Biochem*.

1996;6:312-336.

Nathan CF, Hibbs JB Jr. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol*. 1991;3:65-70.

Nobuyoshi M, Kimura T, Nosaka H, Mioka S, Ueno K, Yokoi H, Hamasaki N, Horiuchi H, Ohishi H. Restenosis after successful percutaneous transluminal coronary angioplasty: serial angiographic follow-up of 299 patients. *J Am Coll Cardiol*. 1988;12:616-623.

Oda K, Arakawa H, Tanaka T, Matsuda K, Tanikawa C, Mori T, Nishimori H, Tamai K, Tokino T, Nakamura Y, Taya Y. p53AIP1, a potential mediator of p53-dependent apoptosis, and its regulation by Ser-46-phosphorylated p53. *Cell* 2000;102:849-862.

Oren M. Regulation of the p53 tumor suppressor protein. *J Biol Chem*. 1999;274:36031-36034.

Orth K, Chinnaiyan AM, Garg M, Froelich CJ, Dixit VM. The CED-3/ICE-like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin A. *J Biol Chem*. 1996;271:16443-16446.

Pilane CM, LaBelle EF. NO induced apoptosis of vascular smooth muscle cells accompanied by ceramide increase. *J Cell Physiol*. 2004;199:310-315.

Raff MC. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 1992;356:397-400.

Rao L, Perez D, White E. Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol*. 1996;135:1441-1455.

Rapp JH, Connor WE, Lin DS, Porter JM. Dietary eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid from fish oil. Their incorporation into advanced human atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb*. 1991;11:903-911.

Ray CA, Black RA, Kronheim SR, Greenstreet TA, Sleath PR, Salvesen GS, Pickup DJ. Viral inhibitors of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 $\beta$  converting enzyme. *Cell* 1992;69:597-604.

Rivard A., Andreas V. Vascular smooth muscle cell proliferation in the pathogenesis of atherosclerotic cardiovascular disease *Histol Histopathol*. 2000;15:557-571.

Rose DP, Connolly JM. Antiangiogenicity of docosahexaenoic acid and its role in the suppression of breast cancer cell growth in nude mice. *Int J Oncol*. 1999;15:1011-1015.

Ross JS, Stagliano NE, Donovan MJ, Breitbart RE, Ginsburg GS. Atherosclerosis: a cancer of the blood vessels? *Am J Clin Pathol*. 2001;116:97-107.

Salvesen GS. Serpins and programmed cell death. New York:Plenum Press. 1997;177-183.

Sata M, Saiura A, Kunisato A, Tojo A, Okada S, Tokuhisa T, Hirai H, Makuuchi M, Hirata Y, Nagai R. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med*. 2002;8:403-409.

Saynor R, Gillot T. Changes in blood lipids and fibrinogen with a note on the effects of n-3 fatty acids in subjects receiving fish oil supplements and followed for seven years. *Lipids* 1992;27:533-538

Schon O, Friedler A, Bycroft M, Freund SM, Fersht AR. Molecular mechanism of the interaction between MDM2 and p53. *J Mol Biol*. 2002;323:491-501.

Sedlak TW, Oltvai ZN, Yang E, Wang K, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Multiple bcl-2 family members demonstrate selective dimerization with bax. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:7834-

7838.

Sellmayer A, Danesch U, Weber PC. Effects of different polyunsaturated fatty acids on growth-related early gene expression and cell growth. *Lipids* 1996;31:37-40.

Shahar E, Folsom AR, Wu KK, Dennis BH, Shimakawa T, Conlan MG, Davis CE, Williams OD. Associations of fish intake and dietary n-3 polyunsaturated fatty acids with a hypocoagulable profile. The atherosclerosis risk in communities (ARIC) study. *Atheroscler Thromb*. 1993;13:1205-1212.

Sheikh MS, Forance AJ Jr. Death and decoy receptors and p53-mediated apoptosis. *Leukemia*. 2000;14:1509-1513.

Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell* 1997;91:325-334.

Shieh SY, Taya Y, Prives C. DNA damage-inducible phosphorylation of p53 at N-terminal sites including a novel site, Ser20, requires tetramerization. *EMBO J*. 1999;18:1815-1823.

Shiina T, Terano T, Tamura Y, Yoshida S. Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid suppress the proliferation of vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 1993;104:95-103.

Siess W, Roth P, Scherer B, Kurzmann I, Bohlig B, Weber PC. Platelet-membrane fatty acids, platelet aggregation, and thromboxane formation during a mackerel diet. *Lancet* 1980;1:441-444.

Skulachev VP. Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1363:100-124.

Song HY, Dunbar JD, Donner DB. Aggregation of the intracellular domain of the type 1 tumor necrosis factor receptor defined by the two-hybrid system. *J Biol Chem*. 1994;269:22492-22495.

Speir E, Modali R, Huang ES, Leon MB, Shawl F, Finkel T, Epstein SE. Potential role of human cytomegalovirus and p53 interaction in coronary restenosis. *Science* 1994;265:391-394.

Speir E, Shibutani T, Yu ZX, Ferrans V, Epstein SE. Role of reactive oxygen intermediates in cytomegalovirus gene expression and in the response of human smooth muscle cells to viral infection. *Circ Res*. 1996;79:1143-1152.

Squier MK, Miller AC, Malkinson AM, Cohen JJ. Calpain activation in apoptosis. *J Cell Physiol*. 1994;159:229-237.

Stemans M, Goossens V, Van de Craen M, Van Herreweghe F, Vancompernelle K, De Vos K, Vandenaabeele P, Grooten J. A caspase-activated factor (CAF) induces mitochondrial membrane depolarization and cytochrome c release by a nonproteolytic mechanism. *J Exp Med*. 1998;188:2193-2198.

Sturlan S, Baumgartner M, Roth E, Bachleitner-Hofmann T. Docosahexaenoic acid enhances arsenic trioxide-mediated apoptosis in arsenic trioxide-resistant HL-60 cells. *Blood* 2003;101:4990-4997.

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Brenner C, Larochette N, Prevost MC, Alzari PM, Kroemer G. Mitochondrial release of caspase-2 and -9 during the apoptotic process. *J Exp Med*. 1999a;189:381-394.

Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999b;397:441-446.

Takahashi E, Berk BC. MAP Kinases and vascular smooth muscle function. *Acta Physiol Scand*.

1998;164:611-621.

Takahashi M, Okazaki H, Ogata Y, Takeuchi K, Ikeda U, Shimada K. Lysophosphatidylcholine induces apoptosis in human endothelial cells through a p38-mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. *Atherosclerosis* 2002;161:387-394.

Täufe, Ternes, Tunger; Zobel, *Lebensmittellexikon*, Behr's Verlag. 1993.

Thies F, Garry JM, Yaqoob P, Rerkasem K, Williams J, Shearman CP, Gallagher PJ, Calder PC, Grimble RF. Association of n-3 polyunsaturated fatty acids with stability of atherosclerotic plaques: a randomised controlled trial. *Lancet* 2003;361:477-485.

Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995;267:1456-1462.

Thornberry NA, Lasebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998;281:1313-1316.

Tibbetts RS, Brumbaugh KM, Williams JM, Sarkaria JN, Cliby WA, Shieh SY, Taya Y, Prives C, Abraham RT. A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53. *Genes Dev.* 1999;13:152-157.

Uemura M, Manabe H, Yoshida N, Fujita N, Ochiai J, Matsumoto N, Takagi T, Naito Y, Yoshikawa T.  $\alpha$ -tocopherol prevents apoptosis of vascular endothelial cells via a mechanism exceeding that of mere antioxidation. *Eur J Pharmacol.* 2002;456:29-37.

Uren AG, Pakusch M, Hawkins CJ, Puls KL, Vaux DL. Cloning and expression of apoptosis inhibitory protein homologs that function to inhibit apoptosis and/or bind tumor necrosis factor receptor-associated factors. *Prog Natl Acad Sci USA.* 1996;93:4974-4978.

Uren AG, Vaux DL. Viral inhibitors of apoptosis. *Vitam Horm.* 1997;53:175-193.

Vanags DM, Porn-Ares MI, Coppola S, Burgess DH, Orrenius S. Protease involvement in fodrin cleavage and phosphatidylserine exposure in apoptosis. *J Biol Chem.* 1996;271:31075-31085

Wallach D, Kovalenko AV, Varfolomeev EE, Boldin MP. Death-inducing functions of ligands of the tumor necrosis factor family: a Sanhedrin verdict. *Curr Opin Immunol.* 1998;10:279-288.

Wang W, Prince CZ, Hu X, Pollman MJ. HRT1 modulates vascular smooth muscle cell proliferation and apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;308:596-601.

Weber C, Erl W, Pietsch A, Danesch U, Weber PC. 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- $\alpha$ . *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:622-628.

Welt FG, Rogers C. Inflammation and restenosis in the stent era. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1769-1776.

Williamson P, Bevers EM, Smeets EF, Comfurius P, Schlegel RA, Zwaal RF. Continuous analysis of the mechanism of activated transbilayer lipid movements in platelets. *Biochemistry.* 1995;34:10448-10455.

Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.* 1980;68:251-306.

Xue D, Horvitz HR. Inhibition of the *Caenorhabditis elegans* cell-death protease CED-3 by a CED-3 cleavage site in baculovirus p35 protein. *Nature* 1995;377:248-251.

Yang X, Cang HY, Baltimore D. Autoproteolytic activation of pro-caspases by oligomerization. *Mol*

Cell 1998;1:319-325.

Yilmaz A, Kliche S, Mayr-Beyrle U, Fellbrich G, Waltenberger J. p38 MAP Kinase inhibition is critically involved in VEGFR-2-mediated endothelial cell survival. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;306:730-736.

Yonemitsu Y, Kaneda Y, Tanaka S, Nakashima Y, Komori K, Sugimachi K, Sueishi K. Transfer of wild-type p53 gene effectively inhibits vascular smooth muscle cell proliferation in vitro and in vivo. *Circ Res.* 1998;82:147-156.

Zou H, Henzel WJ, Liu X, Lutschg A, Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to *c. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 1997;90:405-413.

## G. Publikationen und Kongressbeiträge

### 1. Publikation

Erl W, Weber C, Zernecke A, Neuzil J, Vosseler CA, **Kim HJ** und Peter C. Weber. Cyclopentenone prostaglandins induce endothelial cell apoptosis independent of the peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ . Eur. J. Immunol. 2004;34:241-250.

### 2. Kongressbeiträge

#### 2.1. Poster

**Kim HJ**, Weber PC, Erl W. Induction of apoptosis in proliferating, but not in confluent human endothelial cells by n-3 fatty acids EPA and DHA. 4th Symposium on the Biology of Endothelial Cells, 18.-20. Juli 2003, München. Angiogenesis 2002;5:326.

**Kim HJ**, Weber PC, Erl W. The n-3 fatty acid DHA induces apoptosis in proliferating human endothelial cells. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Mikrozirkulation und Vaskuläre Biologie e.V., 16.-18. Oktober 2003, München. J. Vasc. Res. 2004;41:111.

Erl W, **Kim HJ**, Brandl R. Isolation, culture and characterization of vascular smooth muscle cells from human carotid lesions. 9<sup>th</sup> Annual Scandinavian Atherosclerosis Conference, 22.-25. Mai 2003, Kopenhagen, Dänemark.

#### 2.2. Vortrag

**Kim HJ**, Erl W, Weber PC. "Docosahexaenoic acid induces apoptosis in proliferating endothelial cells and in intimal smooth muscle cells" 10<sup>th</sup> Annual Scandinavian Atherosclerosis Conference 3.-6. Juni 2004, Kopenhagen, Dänemark.

## **H. Danksagung**

Ich möchte mich bedanken bei

Herrn Prof. Dr. med. Peter C. Weber für die Möglichkeit am Institut promovieren zu dürfen, die Überlassung des Themas und der wissenschaftlichen Betreuung während der gesamten Zeit meines Arbeitens.

Herrn Dr. Wolfgang Erl für die wissenschaftliche Betreuung und Hilfe, und für die Korrektur der Arbeit.

Meinen Mitdoktoranden Claudia, Tina und Mihail für die freundliche Mithilfe bei der Durchführung der Experimente.

Frau Dr. Vera Krump-Konvalinkova für die Unterstützung beim Matrigel-Assay.

Allen übrigen Mitarbeitern am Institut Gitti, Nina, Gabi und Diana für ihre technische Hilfe, die gute Atmosphäre und viel Spaß im Labor.

Besonders meinen Eltern und Geschwistern, für die Geduld und Unterstützung in den letzten Jahren.

Dem Deutschen Akademischen Austauschdienst (DAAD) für die Gewährung eines Promotionsstipendiums.

Danke !

Anschriften :

Dienstlich : Institut für Prophylaxe und Epidemiologie  
der Kreislaufkrankheiten LMU München,

Pettenkoferstr. 9, D-80336 München,

Tel.:089/5160-4370

Heimatanschrift : 879-1 Hwanggum 2-dong, Susunggu  
Taegu (706-853), Süd-Korea, Tel.: +82 (53) 762-0212

## **I. Lebenslauf**

Name: Hyo Jung Kim

Geboren: am 05.10.1971 in Kimchun, Süd-Korea

Staatsangehörigkeit: Süd-Korea

Schulausbildung: 03. 1978 - 02. 1984 Besuch der Hwanggum-Grundschule in Taegu  
03. 1984 - 02. 1987 Besuch der Susung-Mittelschule in Taegu  
03. 1987 - 02. 1990 Besuch der Junghwa-Oberschule in Taegu

Studium: 03. 1990 - 02. 1994 Studium der Germanistik an der  
Keimyung Universität in Taegu.  
Abschluss - B. A.  
03. 1997 - 01. 1999 Studium der Ernährungswissenschaft  
an der Taegu Polytechnische Fachhochschule  
Abschluss - B. Sc.  
03. 1999 - 02. 2001 Studium der Biochemie im Magisterkurs  
an der Kyungpook National Universität in Taegu  
Abschluss - M. A.

Promotion: Seit 10. 2001 Anfertigung der vorliegenden Dissertation am  
Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der  
Kreislaufkrankheiten, LMU München, unter der  
Leistung von Prof. Dr. med. Peter C. Weber