

**Atherosklerose und Apoptose:
Identifizierung von freien Fettsäuren aus enzymatisch
verändertem LDL als Auslöser der Apoptose in
humanen Endothelzellen**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Pharmazie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

von
Katrin Dersch
geb. in Marburg

Mainz, 2005

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1 Definition und Pathogenese der Atherosklerose	7
1.2 Oxidationstheorie, Scavenger-Rezeptoren.....	13
1.3 Das Mainzer Konzept: Entwicklung einer alternativen Hypothese zur Atherosklerose	16
1.4 Zusammenhang des Themas dieser Arbeit mit der Atherosklerose	19
1.5 Signalübertragung durch MAPK.....	20
1.5.1 Signalübertragung via Raf-MEK-Erk	22
1.5.2 Signalübertragung via ASK1 - p38/JNK	23
1.5.2.1 Aktivierungsmechanismus von ASK1	24
1.5.2.2 Weitere antiapoptotische Bindungspartner von ASK1	27
1.5.2.3 Proapoptotische Bindungspartner von ASK1	30
1.6 Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B	32
1.6.1 AP-1	32
1.6.2 NF- κ B.....	34
2. Fragestellung	37
3. Material und Methoden	38
3.1 Chemikalien	38
3.2 Inhibitoren	39
3.3 Reagenzien für die Behandlung von Zellen	40
3.4 Puffer und Lösungen	40
3.5 Enzyme.....	42
3.6 Marker.....	42
3.7 Transfektion / Immunpräzipitation.....	42
3.8 Antikörper	43
3.9 Kits.....	44
3.10 Plasmide.....	45
3.11 siRNA´s	46
3.12 Bakterien	46
3.13 Laborbedarfsartikel.....	46
3.14 Laborgeräte.....	47
3.15 Materialien und Medien für die Zellkultur.....	48
3.16 Allgemeine Durchführung der Proteinbestimmung	50
3.17 LDL-Präparation	50
3.18 Messung der Cholesterin-Konzentration	52
3.19 Enzymatische Modifikation von LDL.....	53
3.20 Flotieren von E-LDL: Herstellung von E-LDL(d4) und E-LDL(d10)	54
3.21 Rekonstitution von flotiertem E-LDL(d4)/(d10).....	55
3.22 Oxidation von LDL	55

3.23 Zellkulturen	58
3.24 Allgemeine Durchführung zur Gewinnung von Proben für Western Blots.....	59
3.25 Allgemeine Durchführung einer transienten Transfektion.....	59
3.25.1 Transfektion von Plasmid-DNA für Western-Blot bzw. Immunfluoreszenz-Analysen..	60
3.25.2 Transfektion von Reporterplasmiden	61
3.25.3 Transfektion von siRNAs.....	61
3.26 Allgemeine Durchführung zur Gewinnung von Proben für Immunpräzipitationen	62
3.27 Allgemeine Durchführung von Westernblots	63
3.28 Allgemeine Durchführung der Immunfluoreszenz	66
3.29 Allgemeine Durchführung der ATP-Messung.....	68
3.30 Allgemeine Durchführung der Luciferase-Messung.....	68
3.31 Caspase-Assay.....	69
3.32 Caspase-Färbung	70
3.33 Annexin-V-EGFP Assay	71
3.34 TUNEL-Assay.....	71
3.35 PARP-Fragmentierung.....	72
3.36 Oil-red O-Färbung	72
3.37 Messung des oxidative Burst.....	73
3.38 Transformation von Kompetenten Zellen	73
3.39 Minipräparation von Plasmid-DNA aus einer Bakterienkultur	74
3.40 Restriktionsverdau der Minipräps	75
3.41 Agarose-Gel-Elektrophorese.....	75
3.43 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA	76
3.44 Herstellung des Kontrollvektors pcDNA3.....	77
4. Ergebnisse	81
4.1 Enzymatisch Verändertes LDL aktiviert MAP- Kinasen.....	81
4.1.1 Erste Versuche zur ASK1-Aktivierung.....	81
4.1.1.1 Endogenes ASK1	81
4.1.1.2 Transfektion von FlagASK1.....	81
4.1.1.3 Nachweis der Transfektion mittels Immunfluoreszenz.....	82
4.1.1.4 Nachweis der Transfektion mittels Western-Blot	83
4.1.1.5 Transfektion von FlagASK1 in 293-Zellen und Aktivierung mit H ₂ O ₂	83
4.1.1.6 Transfektion von 293-bzw. HeLa-Zellen mit FlagASK1und Behandlung mit Fettsäuren und E-LDL	84
4.1.1.7 Nachweis von pp5 in Endothelzellen	85
4.1.1.8 Hemmung von pp5 mit Fumonisin B1	85
4.1.1.9 Detektion von P-ASK1 mittels anti-Phospho-Threonin Antikörper.....	86
4.1.1.10 Immunpräzipitation von FlagASK1 aus transfizierten 293-Zellen mit anti-Flag Antikörper nach Behandlung mit H ₂ O ₂ und Linolsäure	87
4.1.2 Aktivierung von MAP-Kinasen durch E-LDL und FFA.....	89
4.1.2.1 E-LDL aktiviert p38-MAP-Kinase und cJun-N-Terminal Kinase (JNK)	89
4.1.2.2 Die p38-Aktivierung durch E-LDL ist fettsäure-abhängig	91
4.1.3 E-LDL und FFA aktivieren ASK1	95
4.1.3.1 E-LDL aktiviert ASK1.....	95
4.1.3.2 Freie Fettsäuren aktivieren ASK1	96
4.1.4 Die Aktivierung von p38-MAP-Kinase durch E-LDL ist abhängig von ASK1	97

4.1.4.1	siRNA vermittelte Genausschaltung.....	97
4.1.4.2	Ausschaltung von ASK1 durch siRNAs verhindert die Aktivierung von p38-MAP Kinase durch E-LDL	99
4.2	E-LDL bzw. FFA induzieren Apoptose in Endothelzellen	101
4.2.1	E-LDL ist zytotoxisch	103
4.2.2	Oil-red O Färbung.....	104
4.2.2	Annexin-V-Färbung.....	105
4.2.3	E-LDL aktiviert Caspase-3 und -7	106
4.2.3.1	Caspase-Färbung.....	107
4.2.3.2	Caspase-Assay	108
4.2.4	Behandlung von Endothelzellen mit E-LDL oder FFA führt zu positiver TUNEL-Färbung.....	109
4.2.5	Behandlung von Endothelzellen mit freien Fettsäuren führt zur Fragmentierung von PARP	111
4.2.6	Hemmung von ASK1 bzw. p38-MAP Kinase verhindert die E-LDL-induzierte Apoptose in Endothelzellen	112
4.2.6.1	Ausschaltung von ASK1 hemmt die Caspasen-Aktivierung durch E-LDL	112
4.2.6.2	Ausschaltung von ASK1 verhindert PARP-Spaltung durch E-LDL bzw. FFA.....	113
4.2.6.3	Hemmung von p38-MAP Kinase mit SB203580 führt zu geringerem ATP-Verlust bzw. verminderter Caspasen-Aktivierung nach E-LDL Behandlung.....	113
4.3	E-LDL verursacht oxidativen Stress in Endothelzellen	116
4.3.1	Messung des <i>oxidative burst</i> mit Luminol und Cytochrom C	117
4.3.2	Messung des <i>oxidative burst</i> mit Dichlorofluorescein (DCF).....	118
4.3.3	NAC inhibiert Aktivierung von MAP-Kinasen durch E-LDL	119
4.3.3.1	Vorbehandlung mit NAC verhindert Aktivierung von ASK1 durch E-LDL	120
4.3.3.2	Vorbehandlung mit NAC verhindert Aktivierung von p38-MAP Kinase.....	121
4.4	Effekt von E-LDL auf AP1 und NF-κB	122
4.4.1	Allgemeines zu Reporterplasmiden.....	122
4.4.2	E-LDL aktiviert pAP1-Luc und hemmt pNF- κ B-Luc.....	123
4.4.3	Cotransfektion der Reporterplasmide mit FlagASK1	125
4.5	Effekte von alpha-Toxin auf MAP-Kinasen	128
4.5.1	Eigenschaften von alpha-Toxin	128
4.5.2	alpha-Toxin aktiviert die MAP-Kinasen p38, JNK und Erk in HaCat-Zellen	129
4.5.3	Schwache Aktivierung von ASK1 durch alpha-Toxin	131
4.5.4	Die p38-Aktivierung durch alpha-Toxin ist wahrscheinlich nicht unbedingt ASK1-abhängig	131
4.5.5	Die p38-Aktivierung durch alpha-Toxin ist nicht hemmbar durch Antioxidantien (NAC)..	132
5.	Diskussion	134
5.1	Freie Fettsäuren aus E-LDL induzieren Apoptose	134
5.2	Bedeutung der Apoptose von Endothelzellen für die Pathogenese der Atherosklerose	137
5.3	Verbindung der Apoptose mit der MAPK-Kaskade.....	140
5.4	Vergleich von oxidiertem LDL mit nativem bzw. E-LDL	144
5.5	Die Bedeutung von intrazellulär entstehenden ROS	147
5.5	Regulation von Transkriptionsfaktoren durch E-LDL.....	151
5.6	Wirkung von alpha-Toxin auf die MAPK-Kaskade	152
5.7	Kurzzeitige oder langanhaltende MAPK-Aktivierung.....	153
6.	Zusammenfassung und Ausblick	156
7.	Veröffentlichung von Ergebnissen dieser Arbeit	159
8.	Literaturverzeichnis	160

Abkürzungsverzeichnis

ACAT	Acetyl-CoA-Cholesterol-Acyltransferase
AIP-1	<i>ASK1-interacting protein 1</i>
Akt	<i>AKT8 virus oncogene cellular homolog</i>
ASK1	<i>apoptosis signal-regulating kinase 1</i>
Apaf-1	<i>apoptotic protease activating factor 1</i>
AP-1	<i>activating protein 1</i> (Aktivierendes Protein 1)
ATF-2	<i>activating transkription factor 2</i>
β-TrCP	<i>Beta-transducin repeat-containing protein</i>
bp	Basenpaar
CETP	<i>cholesterol ester transfer protein</i>
c-PLA2	<i>cytoplasmic phospholipase A2</i>
CRE	<i>cAMP response element</i>
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
CRP	C-reaktives Protein
Daxx	<i>Fas death domain-associated protein</i>
dsRNA	doppelstrang RNA
E-LDL	enzymatisch verändertes LDL
Erk	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
Fas	<i>TNF superfamily receptor 6</i>
FasL	<i>fasLigand</i>
FFA	<i>free fatty acids</i> (freie Fettsäuren)
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
GPCR	<i>G-protein coupled receptor</i>
Grb	<i>growth factor receptor-bound protein</i>
HAoEC	<i>human aortic endothelial cells</i> (humane Aorten-Endothelzellen)
HDL	high density lipoprotein
HMG-CoA- Reduktase	Hydroxymethyl-glutaryl-CoenzymA-Reduktase
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Markierung d. Sekundärantikörper)
HSP	<i>heat shock protein</i>
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cells</i>
IAP	<i>inhibitor of apoptosis</i>
ICAM	<i>intracellular adhesion molecule</i>
IDL	<i>intermediate density lipoprotein</i>
IκB	<i>inhibitory kappa-B</i>
IKK	<i>inhibitory kappa-B kinase</i>
IL	<i>interleukin</i>
IP	Immunpräzipitation
JNK	<i>c-Jun-N-terminal kinase</i>
LCA	<i>lesion complement activator</i> (komplement-aktivierendes Lipid aus humanen Läsionen)
LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LOX-1	<i>lectin like oxidized-LDL receptor 1</i>
LPC	Lysophosphatidylcholin
Luc	Luciferase
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>

MAPKK oder MKK	<i>mitogen activated protein kinase kinase</i>
MAPKKK	<i>mitogen activated protein kinase kinase kinase</i>
MCP-1	<i>macrophage chemoattractant protein 1</i>
M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>
MEK	<i>MAPK/Erk kinase</i>
MKK oder MAPKK	<i>mitogen activated protein kinase kinase</i>
Mo	Monozyten
Mø	Makrophagen
NAC	N-Acetyl-Cystein
NAK	<i>NF-κB-activating kinase</i>
NF-κB	<i>nuclear factor kappa-B</i>
NIK	<i>NF-κB-inducing kinase</i>
NO	<i>Nitric oxide (Stickstoffmonoxid)</i>
PARP	<i>Poly(ADP-ribose)polymerase</i>
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
pp5	Proteinphosphatase 5
RNAi	<i>RNA-interference</i>
ROS	<i>reactive oxygene species</i>
SAGE	<i>serial analysis of gene expression</i>
SCF	<i>Skp-cdc53-F-box ubiquitin ligase komplex</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
Smac	<i>second mitochondria-derived activator of caspase</i>
SOD	Superoxid-Dismutase
Sos	<i>son of sevenless guanine nucleotide exchange factor</i>
SR	<i>scavenger receptor</i>
SREBP	<i>sterol regulatory element binding protein</i>
SRF	<i>serum response factor</i>
TAK-1	<i>Transforming growth factor-β-activated kinase 1</i>
TF	Transkriptionsfaktor
Thr	Threonin
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
Traf	<i>TNF-receptor associated factor</i>
TRE	<i>Tetradecanoyl phorbol ester response element</i>
Trx	Thioredoxin
Ub	Ubiquitin
VCAM	<i>vascular cell adhesion molecule</i>
VLDL	<i>very low density lipoprotein</i>
WB	<i>Western Blot</i>

1. Einleitung

1.1 Definition und Pathogenese der Atherosklerose

Atherosklerose ist eine krankhafte Veränderung der Arterien, die mit Verhärtung, Verdickung, Elastizitätsverlust und Lichtungseinengung einhergeht (Pschyrembel Klinisches Wörterbuch, 2004). Der Begriff setzt sich aus den griechischen Wörtern „athero“ (Schleim, Brei) und „sclerosis“ (Verhärtung) zusammen und ist Synonym für „Arteriosklerose“ mit besonderer Betonung der histopathologischen Veränderungen. Komplikationen, die im Zusammenhang mit Atherosklerose auftreten, stellen die häufigste Todesursache in der westlichen Gesellschaft dar.

Atherosklerose kann als Folge einer chronischen Entzündung im subendothelialen Gewebe angesehen werden, die durch Interaktionen von modifizierten Lipoproteinen, Makrophagen, T-Zellen und Endothelzellen zustandekommt. Dieser inflammatorische Prozess kann zur Entstehung von komplexen Läsionen oder zur Bildung von Plaques führen. Durch Ruptur der Plaques und Thrombose-Bildung kommt es zu akuten klinischen Komplikationen wie Herzinfarkt oder Schlaganfall (Navab *et al.*, 1996; Ross, 1999; Steinberg, 1999).

Ein erhöhter Lipidspiegel im Blut, insbesondere ein erhöhter Cholesterinspiegel ist der bedeutendste Risikofaktor für die Entstehung der Atherosklerose, der desto stärker ins Gewicht fällt, je mehr sonstige oder genetische Risikofaktoren vorhanden sind.

Genetische Risikofaktoren	Sonstige Risikofaktoren
<ul style="list-style-type: none">▪ Erhöhte LDL und VLDL-Blutspiegel (besonders wenn LDL > 160mg/dL)▪ Geringe Mengen an HDL▪ Erhöhte Lipoproteinwerte▪ Bluthochdruck▪ Diabetes Mellitus▪ Erhöhte Homocysteinwerte▪ Metabolisches Syndrom▪ Insulinresistenz▪ Fettleibigkeit▪ Familiäre Belastung	<ul style="list-style-type: none">▪ Rauchen▪ Bewegungsmangel▪ Fettreiche Nahrung, Überernährung

Serum-Cholesterin bzw. Lipide werden, da sie wasserunlöslich sind, im Blut nicht in freier Form, sondern zusammen mit Phospholipiden gebunden an Trägerproteine als Lipoproteinpartikel transportiert. Diese Trägerproteine, von denen mehrere Typen unterschieden werden (z.B. A, B, C und E), bezeichnet man als Apolipoproteine. Die Lipoproteine werden aufgrund ihres Verhaltens bei der Ultrazentrifugation unterteilt in:

- Chylomikronen
- VLDL (*very low density lipoprotein*)
- IDL (*intermediate density lipoprotein*)
- LDL (*low density lipoprotein*)
- HDL (*high density lipoprotein*)

Während die Chylomikronen hauptsächlich die mit der Nahrung aufgenommenen Lipide transportieren, übernehmen VLDL, LDL und HDL den Transport der endogenen Lipide. Chylomikronen entstehen bei der Fettresorption in der Darmwand, gelangen dann auf dem Lymphweg ins Blut und geben nach Spaltung der Triglyceride durch die Lipoproteinlipase die Fettsäuren an das Fettgewebe zur Speicherung und an die Muskulatur als Brennstoff ab. Die verbleibenden Überreste der Chylomikronen (Remnants), die einen hohen Gehalt an Cholesterinestern besitzen, werden nun über Apolipoprotein B an einen speziellen Rezeptor (Remnant-Rezeptor), der nur in Leberzellen vorkommt, gebunden und in die Leber aufgenommen.

In der Leberzelle wird das aufgenommene Cholesterin einerseits in Gallensäuren umgewandelt, andererseits werden triglyceridreiche VLDL-Partikel, die die Apolipoproteine B-100 und E enthalten, synthetisiert und wieder in den Blutkreislauf abgegeben. Wie bei den Chylomikronen werden aus VLDL die abgespaltenen Fettsäuren von Fett- und Muskelgewebe aufgenommen, wodurch IDL entsteht. Ein Teil des IDL wird von LDL-Rezeptoren in die Leber aufgenommen, ein anderer Teil geht durch weitere Abspaltung von Triglyceriden in LDL über.

Der Hauptteil des Serum-Cholesterins wird in veresterter Form in LDL-Partikeln transportiert. Gewebszellen, die Cholesterin zum Aufbau ihrer Cytoplasmamembranen brauchen, nehmen die Partikel über LDL-Rezeptoren auf. Diese sog. Rezeptor-vermittelte Endocytose erfolgt über die Erkennung von Apo B-100 (Brown 1985). Innerhalb der Zelle kommt es zur Freisetzung des Cholesterins

durch lysosomale Enzyme (Proteasen, Cholesterinesterasen). Das in der Leber freigesetzte Cholesterin hemmt durch Blockade der Synthese des Schlüsselenzyms HMGCoA-Reduktase (Hydroxymethyl-glutaryl-CoenzymA-Reduktase) die zelleigene Neusynthese von Cholesterin und fördert gleichzeitig durch Aktivierung der ACAT (Acetyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase) die Bildung von Cholesterinestern. Außerdem wird die Neusynthese von LDL-Rezeptoren heruntergeregelt, so dass sie in verminderter Zahl auf der Zelloberfläche vertreten sind. Dieser Mechanismus stellt eine negative Rückkopplung dar die verhindert, dass die Zelle mehr Cholesterin aufnimmt als sie benötigt. Durch die geringere Zahl an LDL-Rezeptoren kann allerdings weniger LDL aus dem Kreislauf entfernt werden, was einen Anstieg des LDL-Blutspiegels zur Folge hat und die Entstehung der Atherosklerose beschleunigen kann.

Die zirkulierende Menge an LDL wird also hauptsächlich geregelt durch die Aufnahmerate über die LDL-Rezeptoren. Ein Mangel an LDL-Rezeptoren ist daher verantwortlich für die massive Akkumulation von LDL in Patienten mit homozygoter familiärer Hypercholesterinämie, die bereits im Kindesalter Herzinfarkte erleiden können (Goldstein and Brown, 1977). Bei diesen Patienten zeigte sich deutlich der Zusammenhang zwischen zu hohem LDL-Spiegel und Atherosklerose, da sie keine weiteren Risikofaktoren wie Rauchen oder Überernährung aufweisen (Brown 1985).

Bei zu geringen Serum-Cholesterin Mengen kommt es zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie SREBP (*sterol regulatory element binding protein*), die die Transkription von LDL-Rezeptor Genen und anderen an der Cholesterin-Biosynthese beteiligten Genen führen (Brown and Goldstein, 1997). Die Konzentration des LDL-Cholesterins beträgt bei der Geburt 25-30mg/dL und kann im Lauf der Zeit auf Grund von Überernährung bzw. Bewegungsmangel auf bis zu 180mg/dL ansteigen. Als Grenzwert wird eine Konzentration von 100mg/dL empfohlen (American Heart Association).

HDL, das in der Leber aus Chylomikronen gebildet wird, kann Cholesterin aus Körperzellen aufnehmen. Dieses wird durch die LCAT (Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase) verestert und dann entweder auf IDL übertragen, wodurch der Kreislauf von neuem beginnt. Anderenfalls werden die HDL-Partikel komplett von der Leber aufgenommen und dort metabolisiert.

Die Entdeckung der molekularen Mechanismen, die die Cholesterin Biosynthese und die Serum-Cholesterinspiegel kontrollieren (Goldstein and Brown, 1977), führte zur Entwicklung der Statine, einer Klasse an Cholesterin-senkenden Stoffen, die signifikant die kardiovaskuläre Mortalität von Patienten mit Hypercholesterinämie senken (Gould *et al.*, 1998). Die Statine reduzieren die Cholesterin-Werte indirekt durch Hemmung der HMG-CoA-Reduktase, die für die endogene Cholesterin-Biosynthese benötigt wird. Dies führt zur Abnahme der intrazellulären Cholesterin-Konzentration, was die Aktivierung des Transkriptionsfaktors SREBP bewirkt und eine Hochregulation der LDL-Rezeptoren zur Folge hat. Dadurch kann verstärkt LDL aufgenommen werden, was zur Senkung der zirkulierenden LDL-Level führt (Glass and Witztum, 2001).

Beginn der Atherosklerose: Schaumzellbildung

An undichten Stellen im Gefäßsystem kommt es vor allem bei einem zu hohen LDL-Blutspiegel zum Durchsickern der Partikel aus dem Blut in das subendotheliale Bindegewebe. Diese Stellen zeichnen sich aus durch hohen Druck bzw. einen langsamen oder turbulenten Blutfluss. Aus diesem Grund besteht hier eine längere Kontaktzeit zwischen Blutbestandteilen wie LDL und dem Endothel. An Stellen mit schneller, laminarer Strömung werden die Partikel rasch wieder weggespült (Glagov *et al.*, 1988). Die Menge des durchsickernden LDL ist abhängig von der Höhe des LDL-Plasmaspiegels. Bei Verletzungen des Endothels, die z.B. bei Bluthochdruck oder durch Nikotinkonsum auftreten, verstärkt sich dieser Vorgang. Hypertonie und Nikotinkonsum zählen deshalb zu den klassischen Risikofaktoren, die die Entstehung der Atherosklerose begünstigen.

Eine atherosklerotische Läsion zeigt sich zunächst als „*fatty streak*“ (Fettstreifen) unter dem Endothel von großen Arterien. Dieser wird gebildet durch Aufnahme des im subendothelialen Bindegewebe abgelagerten LDL von einwandernden Makrophagen, die sich daraufhin in Schaumzellen umwandeln. Eine solche atherosklerotische Frühläsion kann bereits in der ersten Lebensdekade entstehen und schreitet mit zunehmendem Alter fort (Stary, 1987).

Die Bildung von Schaumzellen aus Makrophagen, die große Mengen an Cholesterinestern enthalten, kennzeichnet sowohl die frühen als auch die späten atherosklerotischen Läsionen. Die aufgenommenen Cholesterinester werden in den Lysosomen der Makrophagen hydrolysiert. Freies Cholesterin kann durch die ACAT

wieder verestert werden und lagert sich in Form von Lipidtröpfchen im Cytosol der Makrophagen ab. Diese Lipidtröpfchen sind charakteristisch für die Schaumzellen und verleihen ihnen ein gelbliches Aussehen. Die Cholesterinester in diesen Tröpfchen können wiederum hydrolysiert werden, was freies Cholesterin für einen Einbau in Membranen zur Verfügung stellt.

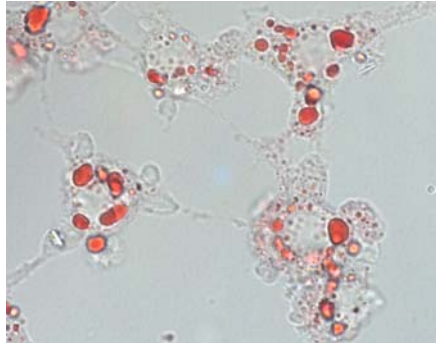


Abb. 1: Schaumzellbildung bei Makrophagen (J774-Zellen); Rotfärbung der Lipidtröpfchen mit Oil-red O.

Die Makrophagen haben zwei Möglichkeiten, überschüssiges Cholesterin wieder loszuwerden: durch enzymatische Umwandlung in löslichere Formen (Cholesterin-27-Hydroxylase) oder durch Übertragung *via* Membrantransporter auf extrazelluläres HDL. Die Funktion des HDL, als Akzeptor für Cholesterin zu dienen, ist essentiell für den *revers cholesterol transport* und erklärt, warum ein zu niedriger HDL-Spiegel (weniger als 40mg/dL) zu den Risikofaktoren für Atherosklerose zählt (Tall *et al.*, 2000).

Nach Aufnahme des freien Cholesterins wird dieses in den HDL-Partikeln durch die LCAT verestert. HDL kann Cholesterinester durch Triglyceride von anderen Lipoproteinen *via* Cholesterinester-Transfer Protein (CETP) austauschen. Alternativ kann HDL an Rezeptoren der Leber binden und Cholesterinester an die Leber zur nachfolgenden Exkretion abgeben.

Progression der Läsionen und immunologische Antworten

Bei übermäßiger Schaumzellbildung produzieren die überladenen Makrophagen eine Reihe von proinflammatorischen Cytokinen wie IL-1 β , TNF α , IL-6, MCP-1

(*macrophage chemoattractant protein 1*) und TGF- β (*transforming growth factor β*) (Reape and Groot, 1999; Peters and Charo, 2001). Auch Wachstumsfaktoren wie z.B. FGF (*fibroblast growth factor*), PDGF (*platelet-derived growth factor*), ein Mediator der Migration und Differenzierung von glatten Muskelzellen oder M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*), ein autokriner Mediator der Differenzierung von Makrophagen werden synthetisiert. Auf der Oberfläche von Endothelzellen werden zelladhäsions-Moleküle exprimiert wie z.B. VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule*) (Cybulsky und Gimbrone, 1991), E-Selektin (Dong *et al.*, 1998) und ICAM-1 (*intracellular cell adhesion molecule*) (Collins *et al.*, 2000), die für das Anheften von weiteren Monozyten an das Endothel sorgen und somit eine transendotheliale Passage ermöglichen.

Die Umwandlung der anfangs entstandenen Fettschicht in komplexere Läsionen ist charakterisiert durch die Einwanderung von glatten Muskelzellen aus der mittleren Arterienwand (Media) in den intimalen Raum. Dort können sie proliferieren und modifizierte Lipoproteine aufnehmen, was zur Schaumzellbildung beiträgt (Shanahan and Weissberg, 1999). Weiterhin synthetisieren sie extrazelluläre Matrixproteine, die zur Entwicklung von fibrinösen Kappen um die Läsionen herum führen (Ross, 1999; Steinberg, 1999). Läsionale T-Zellen können aktiviert werden und produzieren Cytokine wie IL-4, IL-10 oder $\text{INF}\gamma$ (Hansson, 1997). Diese haben sowohl pro- als auch anti-atherogene Eigenschaften. Einige Schaumzellen sterben ab, wodurch sich eine Art Narbe mit nekrotischem, zum Teil verkalktem Kern bildet (Bennett, 1999). Diese Phase symbolisiert ein chronisches Entzündungsstadium.

Neutrophile Granulozyten, die normalerweise zu den meisten inflammatorischen Antworten führen, sind in den Läsionen nicht anzutreffen.

Stabilität der Plaques und klinische Komplikationen

Neben dem Auftreten von ischämischen Reaktionen durch die Einengung der Gefäßwände kommt es hauptsächlich durch Rupturen der Plaques und Thrombosebildung zu akuten klinischen Ereignissen wie Herzinfarkt oder Schlaganfall (Davies *et al.*, 1993; Lee and Libby, 1997). Die Plaqueruptur setzt Lipide und Gewebefaktoren ins Blut frei, was die Blutgerinnungskaskade, die Plättchen-Adhäsion und die Thrombosebildung induziert. Häufig reißen Plaques mit dünnen fibrinösen Kappen, hoher Konzentration an lipidgefüllten Makrophagen und

nekrotischem Kern ein (Davies *et al.*, 1993; van der Wal *et al.*, 1994; Lee and Libby, 1997). Plaques ohne nekrotischen Kern aber mit dicken fibrinösen Kappen sind stabiler. Matrix Metalloproteinasen, die von Makrophagen sekretiert werden, wurden in Regionen von Plaque-Rupturen nachgewiesen und scheinen die Plaque-Stabilität negativ zu beeinflussen, indem sie extrazelluläre Matrixproteine abbauen (Galis *et al.*, 1994; Carmeliet, 2000).

1.2 Oxidationstheorie, Scavenger-Rezeptoren

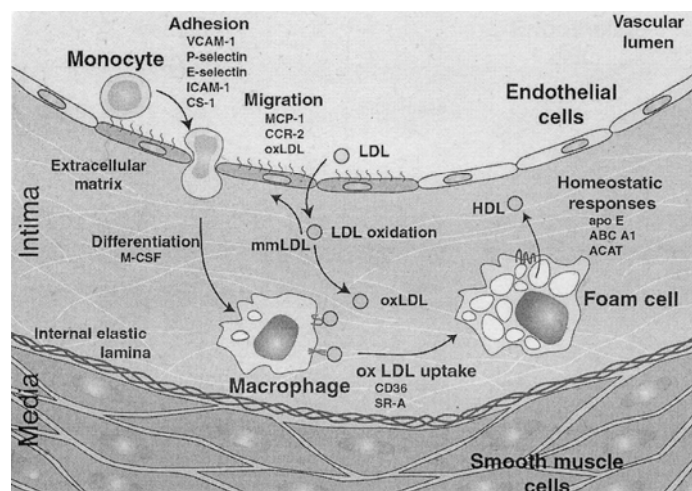
Nach der von Steinberg vor ca. 20 Jahren aufgestellten Theorie sind oxidative Veränderungen des subendothelial abgelagerten LDL der Auslöser für eine Umwandlung des Partikels in ein entzündungsauslösendes Molekül (Steinberg, 1981). Die initiale Bildung der Fettschicht, d.h. die Aufnahme des abgelagerten LDL von Monozyten, wird jener Theorie zufolge ebenfalls durch oxidative Modifikationen der Lipid- und Apolipoprotein B-Komponenten des LDL beeinflusst (Navab *et al.*, 1996; Steinberg, 1999). Die Oxidation von LDL kann einerseits nur geringe Ausmaße haben, bei welchen der Partikel noch von LDL-Rezeptoren erkannt wird (Navab *et al.*, 1996). Andererseits kommt es durch starke Oxidation zur Fragmentierung der ApoB Komponente und zur Modifizierung von Lysinresten durch oxidierte Lipide (Steinberg, 1999). Solche Partikel werden nicht von LDL-Rezeptoren erkannt, sondern von sog. *Scavenger*-Rezeptoren, die auf Makrophagen und glatten Muskelzellen vorkommen, aufgenommen.

Die *Scavenger*-Rezeptoren (dt: Aasfresser-Rezeptoren) werden definiert über ihre Fähigkeit, modifiziertes (z.B. acetyliertes oder oxidiertes) LDL per Endocytose aufzunehmen und wurden erstmalig 1979 von Goldstein beschrieben (Goldstein *et al.*, 1979). Sie besitzen eine positiv geladene Rezeptordomäne und können ein breites Spektrum an anionischen Liganden wie z.B. Phospholipide, Fettsäuren, Bakterien, LPS oder auch oxidiertes LDL binden. Über *molecular cloning* wurden bisher mindestens acht verschiedene *Scavenger*-Rezeptoren entdeckt (CD36, CD68, LOX1, SR-B1, SR-AI/AII...), die auf Makrophagen exprimiert werden (de Villiers and Smart, 1999; Greaves *et al.*, 1998). Vorallem die SR-A und CD36 Rezeptoren sind von hoher Bedeutung für die Entwicklung der Atherosklerose. Da die Expression der *Scavenger*-Rezeptoren nicht durch einen ansteigenden intrazellulären

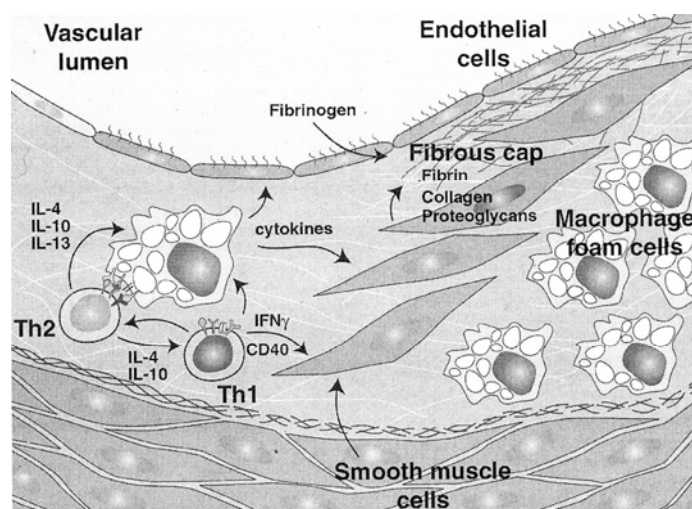
Cholesterinspiegel herunterreguliert wird wie die der LDL-Rezeptoren, kann eine unbegrenzte LDL-Aufnahme durch die Makrophagen erfolgen.

Oxidiertes LDL konnte tatsächlich in den Läsionen vor der Einwanderung von Makrophagen immunologisch nachgewiesen werden (Napoli *et al.*, 1997). Weitere Arbeiten zeigten, dass oxLDL selbst Monozyten anlocken (Steinberg, 1989) und auch die Expression von chemotaktischen Molekülen wie MCP-1 und zelladhäsions-Molekülen in Endothelzellen induzieren kann (Navab *et al.*, 1996), was *in vitro* eine transendotheliale Passage der Monozyten ermöglichte (Berliner *et al.*, 1990; Kume *et al.*, 1992).

A



B



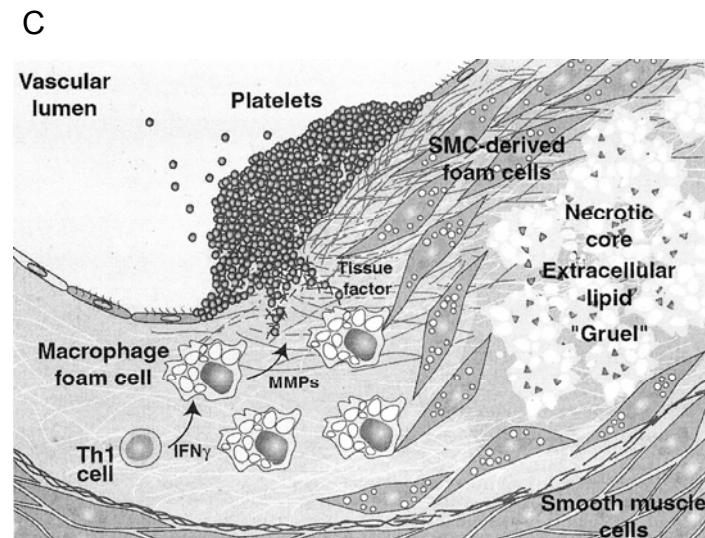


Abb. 2: Pathogenese der Atherosklerose: (A) Einwanderung von Monozyten, Differenzierung zu Makrophagen und Aufnahme von modifiziertem LDL unter Bildung von Schaumzellen; (B) Bildung von komplexen Läsionen durch Einwanderung von glatten Muskelzellen; (C) Plaque-Ruptur und Thrombus-Bildung (Quelle: Glass and Witztum, 2001).

Neben diesen für die Oxidationstheorie sprechenden Befunden gibt es auch Anzeichen, die gegen dieses Konzept gerichtet sind:

1. oxidiertes LDL kommt nur in sehr geringen Mengen (1%) in den atherosklerotischen Läsionen vor (Kuhn *et al.*, 1997)
2. Subendothelial abgelagerte LDL-Partikel bilden nach einiger Zeit größere Konglomerate, die einen hohen Gehalt an freiem Cholesterin besitzen (Kruth 1984 und 1985; Chao *et al.*, 1988; Mora *et al.*, 1987; Simionescu *et al.*, 1986; Simionescu *et al.*, 1990). Oxidiertes LDL enthält hauptsächlich verestertes Cholesterin und ändert seine Morphologie nicht (Frank and Fogelman 1989; Seifert *et al.*, 1990; Bhakdi, 1998)
3. In atherosklerotischen Läsionen findet eine Aktivierung des Komplementsystems statt (Niculescu *et al.*, 1987; Seifert *et al.*, 1989; Torzewski *et al.*, 1998). OxLDL kann jedoch kein Komplement aktivieren (Bhakdi, 1998).
4. Einige Studien in hypercholesterolämischen Tiermodellen zeigen, dass die Behandlung mit verschiedenen antioxidativen Agentien die Entwicklung der Atherosklerose verlangsamen kann (Steinberg and Witztum, 1999). Epidemiologische Daten unterstützen eine protektive Rolle für antioxidative Nahrungsergänzung bei Menschen (Jha *et al.*, 1995). Trotzdem waren bisher alle prospektiven klinischen Versuche mit antioxidativen Vitaminen

wie Vitamin E und Betacarotin in Patienten mit bestehender Atherosklerose enttäuschend (Yusuf *et al.*, 2000).

1.3 Das Mainzer Konzept: Entwicklung einer alternativen Hypothese zur Atherosklerose

Ausgehend von der Tatsache, dass in atherosklerotischen Läsionen eine Komplementaktivierung gefunden wurde, entwickelten Bhakdi *et al.* eine alternative Hypothese zur Pathogenese der Atherosklerose. Aus aortischen atherosklerotischen Läsionen wurde ein Lipid isoliert (LCA, *lipid complement activator*), das sich in der Morphologie von oxLDL unterschied und den alternativen Komplementweg direkt aktivieren konnte. Im Gegensatz dazu erfolgte keine Komplementaktivierung durch natives oder oxLDL (Seifert *et al.*, 1990).

Daraufhin wurde LDL *in vitro* mit Proteasen (Trypsin) und Cholesterinesterase behandelt. Das entstandene enzymatisch veränderte LDL (E-LDL) besaß ebenfalls die Eigenschaft, Komplement zu aktivieren. Andere Lipoproteine wie VLDL oder HDL konnten bei gleicher Behandlung nicht in komplementaktivierende Moleküle umgeformt werden (Bhakdi *et al.*, 1995). Nach Aufspaltung der ApoB-Hülle durch Trypsin kann die Cholesterinesterase die im LDL vorkommenden Cholesterinester in freie Fettsäuren und freies Cholesterin spalten. Letzteres ist wahrscheinlich für die komplement-aktivierenden Fähigkeiten des E-LDL verantwortlich, da bekannt ist, dass freies Cholesterin Komplement aktiviert (Alving *et al.*, 1977).

Eine weitere Ähnlichkeit zum LCA bestand darin, dass E-LDL auch zur Bildung von größeren Fusionspartikeln fähig war, wie sie in den Läsionen tatsächlich vorkommen. Ein Nachweis von enzymatisch verändertem LDL in frühen atherosklerotischen Läsionen gelang mit Hilfe eines Antikörpers, der selektiv E-LDL, nicht aber natives oder oxLDL erkennt. Weiterhin konnte eine Kolokalisation von E-LDL mit aktiviertem Komplement gezeigt werden (Torzewski *et al.*, 1998). Die Bindung des CRP an die Lipoproteinpartikel erfolgt über Phosphocholinreste, die erst durch die enzymatische Modifikation des LDL freigelegt werden. Mittels Immunhistochemie ergab sich eine Kolokalisation von E-LDL, CRP und C5b-9 in der Intima von frühen atherosklerotischen Läsionen (Bhakdi *et al.*, 1999).

Um die Auswirkungen der Komplementaktivierung auf die Entstehung der Atherosklerose zu untersuchen, wurden zum einen Cholesterin-Fütterungsversuche

mit Komplement-defizienten Kaninchen durchgeführt, die nach 14 Tagen deutlich weniger atherosklerotische Veränderungen zeigten als die Kontrolltiere (Schmiedt *et al.*, 1998). Zum anderen wurde in weiteren Cholesterin-Fütterungsversuchen den Tieren zusätzlich Endotoxin injiziert, das bekanntlich über Makrophagenaktivierung zur Bildung von CRP führt. Die Endotoxin-behandelten Tiere entwickelten deutlich mehr atherosklerotische Läsionen als die Kontrolltiere (Lehr *et al.*, 2001). Aus diesen beiden Studien resultierte die Annahme, dass jede Aktivierung des Komplementsystems die Entwicklung der Atherosklerose beschleunigen kann.

Nach Inkubation von Zellen mit hohen E-LDL Konzentrationen konnten Anzeichen der Apoptose festgestellt werden (Klouche *et al.*, 1998). Inkubation von Endothelzellen mit E-LDL induzierte die Expression von ICAM und P-Selektin, was zur Anlockung von Monozyten aus dem Blut in die Intima führt (Klouche *et al.*, 1999).

In weiteren Studien wurde eine Aufnahme von E-LDL über den *Scavenger*-Rezeptor von Makrophagen gezeigt, was zur Ausschüttung von MCP-1 führte. LDL wurde nicht über die *Scavenger*-Rezeptoren aufgenommen (Klouche *et al.*, 1998). Die Umwandlung von LDL in einen Ligand für den *Scavenger*-Rezeptor geschieht wahrscheinlich durch die Behandlung mit Trypsin, die eine Fragmentierung des Apolipoprotein B erzeugt. Dabei entstehen freie Amino- und Carboxylgruppen. Bei einem physiologischen pH-Wert von 7,4 sind die Aminogruppen nicht protoniert, d.h. ungeladen. Die Carboxylgruppen hingegen sind deprotoniert und daher negativ geladen, was den polyanionischen Charakter des E-LDL begründen würde, der Voraussetzung für die Bindung an den *Scavenger*-Rezeptor ist.

In den letzten Jahren wurde mittels *serial analyses of gene expression* (SAGE) der mRNAs von LDL- bzw. E-LDL-behandelten Monozyten eine deutliche Induktion der Cysteinprotease Cathepsin H durch E-LDL gefunden. Weiterhin zeigte sich eine Kolo-kalisation von E-LDL mit Cathepsin H in atherosklerotischen Läsionen. Das *in vitro* durch Modifizierung von LDL mit Cathepsin H (statt Trypsin) und Cholesterinesterase hergestellte E-LDL besitzt ebenfalls die Fähigkeit zur Schaumzellbildung. Cathepsin H stellt also eine Protease dar, die *in vivo* zur enzymatischen Modifizierung von LDL beitragen könnte (Han *et al.*, 2003).

Die Mainzer Hypothese

Nach der Mainzer Theorie erfolgt keine Oxidation des subendothelial abgelagerten LDL, sondern ein enzymatischer Umbau. Dieser ist physiologisch sinnvoll und notwendig, um LDL zum einen in ein CRP-bindendes, also komplementaktivierendes Molekül umzuwandeln und es zum anderen in ein Substrat für den *Scavenger*-Rezeptor zu überführen. Die Aktivierung des Komplementsystems kann sowohl durch freies Cholesterin als auch durch die Bindung von CRP an das enzymatisch veränderte LDL (E-LDL) erfolgen. Das E-LDL wird nun durch die über den Komplementweg angelockten Monozyten *via Scavenger*-Rezeptor aufgenommen. Die entstehenden Schaumzellen werden physiologischerweise über den HDL-abhängigen *reverse cholesterol transport* entlastet. Über diesen natürlichen Mechanismus kann also subendothelial abgelagertes LDL mit seinem unlöslichen Inhalt (Cholesterin) wieder aus den Gefäßwänden entfernt werden. Erst bei übermäßigen Mengen an „gestrandetem“ LDL und übermäßiger Schaumzellbildung ist das HDL-Transportsystem überlastet und es kommt zur Freisetzung von proinflammatorischen Cytokinen (IL-6) durch die überladenen Makrophagen. Einige Schaumzellen sterben ab und setzen das Lipid wieder frei, was erneut Komplement aktiviert. Glatte Muskelzellen wandern in den Subendothelialraum ein und der Prozess geht in die oben beschriebene chronische Entzündung über.

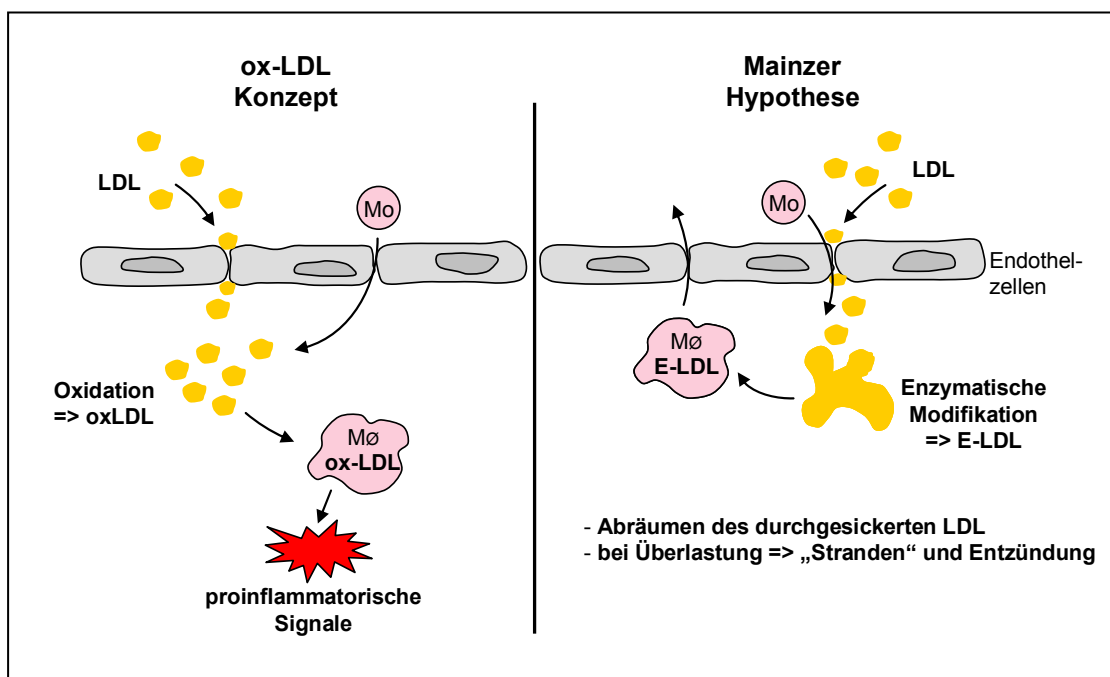


Abb. 3: Oxidationstheorie und Mainzer Hypothese

1.4 Zusammenhang des Themas dieser Arbeit mit der Atherosklerose

In der Arbeitsgruppe wurden bereits Untersuchungen über die Reaktionen von verschiedenen Zellen auf enzymatisch verändertes LDL durchgeführt. D. Fenske zeigte in seiner Arbeit anhand von *electrophoretic mobility shift assays* (EMSAs), dass E-LDL in Endothelzellen die Aktivität von verschiedenen Transkriptionsfaktoren beeinflusst. Durch Behandlung von Endothelzellen mit E-LDL kam es zu einer spezifischen Hemmung der Aktivierung von NF- κ B durch nachfolgende Stimulierung mit z.B. TNF α bei gleichzeitiger Aktivierung von AP1. Ebenso existierten bereits Daten, die eine gesteigerte IL-8 Produktion von Endothelzellen nach Behandlung mit E-LDL im Vergleich zu LDL aufweisen (Suriyaphol *et al.*, 2002).

Der interessante Befund, dass bei gleichzeitiger Hemmung von NF- κ B eine erhöhte AP-1 Aktivität auftritt, konnte bisher nicht einleuchtend begründet werden. Zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 kommt es durch Signalübertragung von extrazellulären Stimuli über die mitogen-aktivierte Protein Kinase-Kaskade (MAPK-Kaskade). *Apoptosis signal-regulating Kinase 1* (ASK1) ist eine der initialen Kinasen, die zu einer AP-1 Aktivierung führen können. Da ASK1 auch mit einer indirekten Hemmung von NF- κ B in Verbindung gebracht wird (Mochida *et al.*, 2000), lag es nahe, den Effekt von E-LDL auf dieses Enzym zu untersuchen.

Außerdem wurde in einem Western Blot Screening durch die Firma B&D die Protein Phosphatase pp5 nach Behandlung von Monozyten mit E-LDL in erhöhten Mengen gefunden. Da pp5 ein *negativ-Feedback*-Inhibitor von ASK1 ist (Morita *et al.*, 2001), deutet dieser Befund auf eine zuvorige Aktivierung von ASK1 hin. Die Tatsache dass pp5 durch Fettsäuren aktiviert wird (Ramsey and Chinkers, 2002) und E-LDL große Mengen an freien Fettsäuren (FFA) enthält, ist ein weiterer Hinweis, dass es zu einer Aktivierung von ASK1 durch E-LDL kommen könnte.

1.5 Signalübertragung durch MAPK

Mitogen-aktivierte Protein Kinasen (MAPKs) sind eine Familie von Serin/Threonin Protein Kinasen die in Eukaryoten weitverbreitet und konserviert auftreten. Sie sind bei vielen Abläufen in der Zelle wie z.B. Zell-Proliferation, Differenzierung und Zelltod beteiligt. MAPK Signal-Kaskaden sind hierarchisch organisiert in einem dreistufigen Modell: MAPKs werden phosphoryliert und aktiviert durch MAPK-Kinasen (MAPKKs), die wiederum durch MAPKK-Kinasen (MAPKKKs) phosphoryliert und aktiviert werden.

Die Aktivierung der MAPKs und MAPKKs geschieht jeweils auf gleiche Art und Weise: nach Phosphorylierung im aktiven Zentrum der Enzyme durch die übergeordnete Kinase kommt es jeweils zu einer Zunahme der katalytischen Aktivität. Die MAPKKKs können in Antwort auf diverse Stimuli jedoch durch unterschiedliche Mechanismen aktiviert werden.

Eine Möglichkeit der Aktivierung der MAPKKKs besteht in der Interaktion mit einer Familie von kleinen GTPasen und/oder anderen Protein-Kinasen, die die MAPK-Signal-Kaskade mit Zelloberflächen-Rezeptoren (Wachstumsfaktor-Rezeptoren) oder extrazellulären Signalen verbinden. Auch durch oxidativen Stress, UV-Strahlen, osmotischen Schock oder durch Stimulation der Zellen mit Cytokinen wie z.B. IL-1 oder TNF werden die MAPKKKs aktiviert.

Nach der Signalübertragung durch die MAPK-Kaskade kommt es zur Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren im Zellkern, die anschließend je nach Stimulus die Transkription von verschiedenen Zielgenen modifizieren.

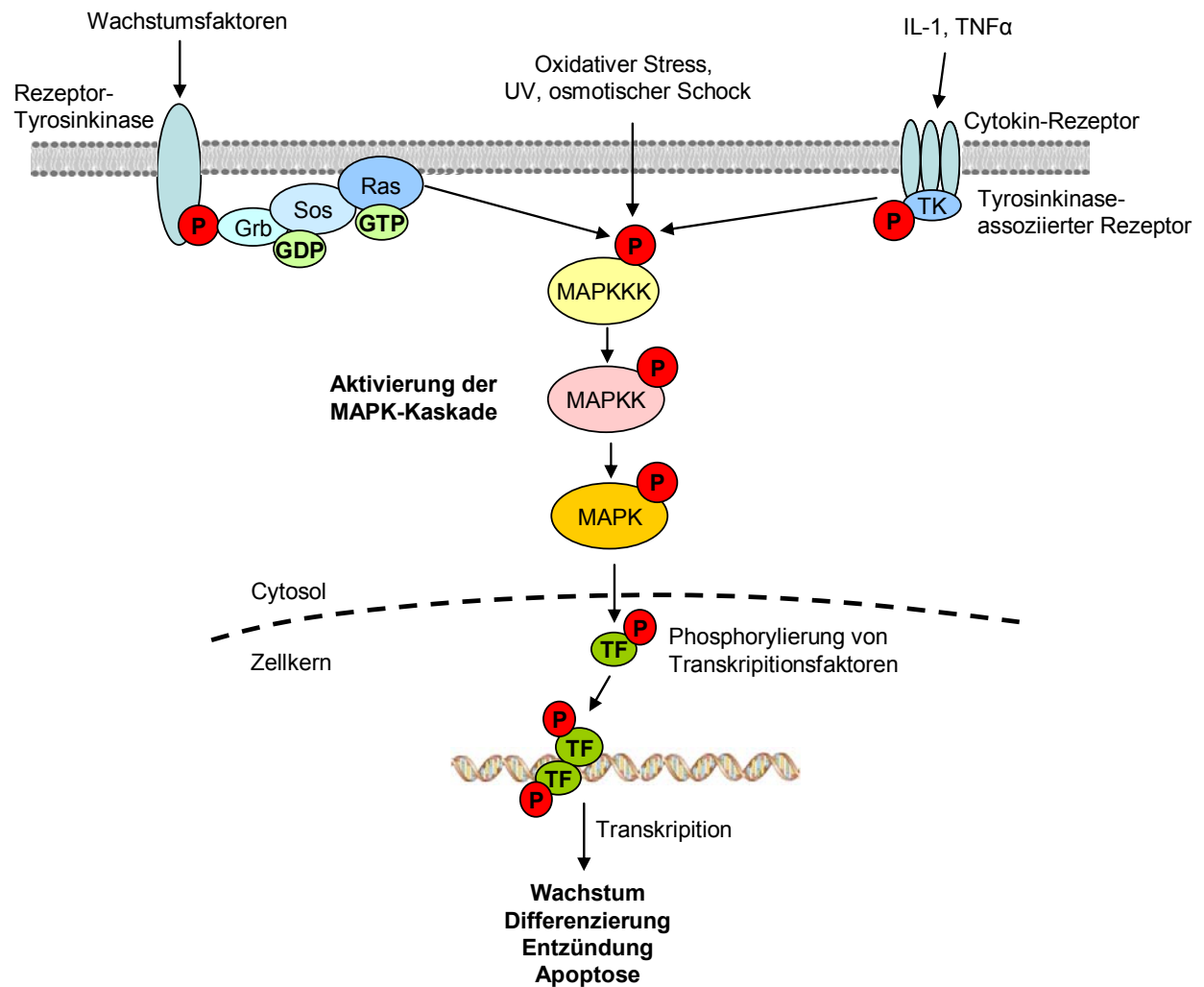


Abb. 4: Aktivierung der MAPK-Kaskade durch extrazelluläre Stimulation

Bisher identifizierte man 14 verschiedene MAPKKK in Säugetieren wie z.B. Raf, MEKKs, TAK1, MTK1, MLKs und **ASK1**.

Die MAPKs stellen Konvergenzpunkte für eine Vielzahl von der Zellmembran ausgehenden Signalen dar.

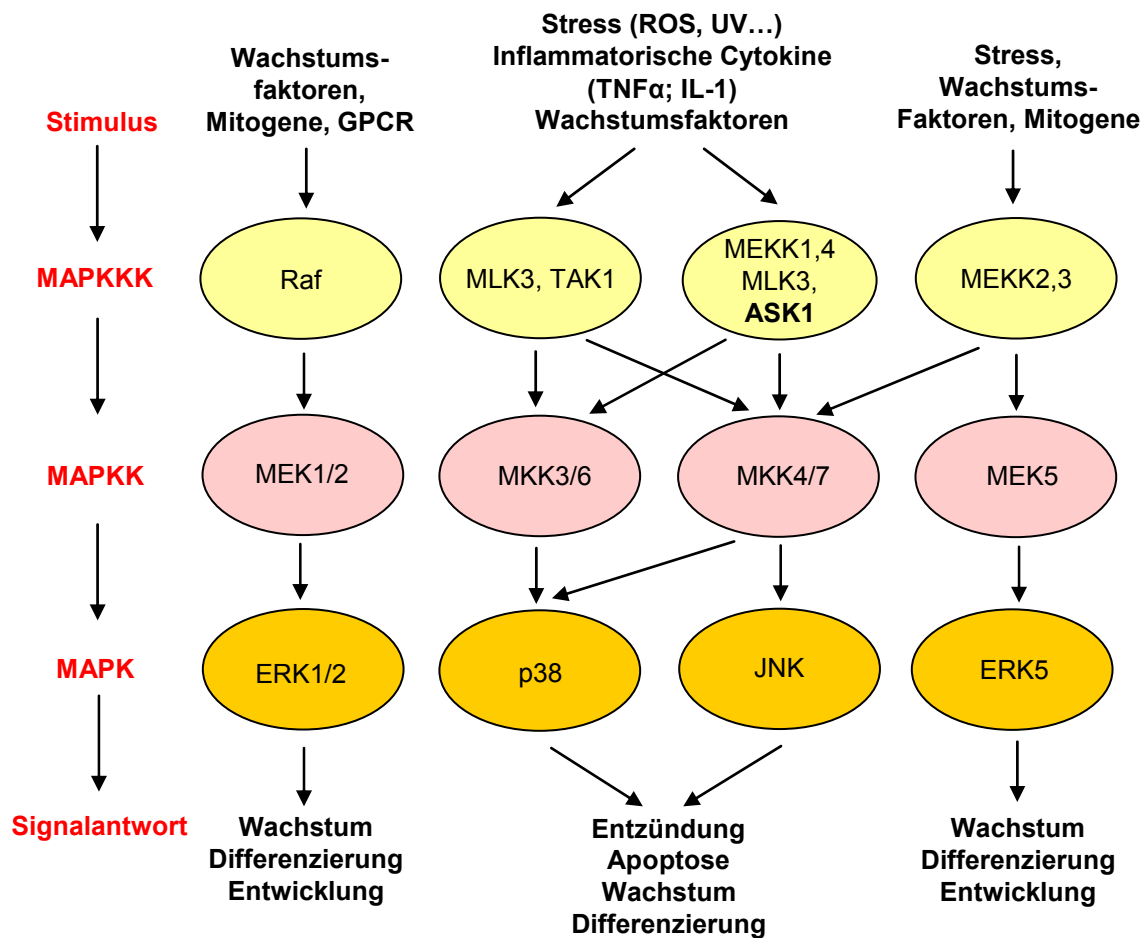


Abb. 5: MAP-Kinase Signalwege (Cell Signaling Technology, Katalog 2003)

1.5.1 Signalübertragung via Raf-MEK-Erk

Der Raf-MEK-Erk Signalweg wird gewöhnlich bei der Weiterleitung von zellspezifischen Wachstums- und Differenzierungssignalen von Rezeptor-Tyrosinkinasen und G-protein gekoppelten Rezeptoren angesprochen. Zellwachstum und -differenzierung werden bei Eukaryoten durch zahlreiche extrazelluläre Polypeptidhormone (z.B. Wachstumshormone, Cytokine) gesteuert. Die Proteinfaktoren binden als Liganden an die Rezeptoren, die eine Signalkaskade über eine Proteinphosphorylierung durch Tyrosinkinasen auslösen, wodurch es schließlich zu Effekten in der Zelle kommt.

Wachstumsfaktor-Rezeptoren

Die Rezeptor-Tyrosinkinase liegen normalerweise als Monomere vor (z.B. EGFR). Sie dimerisieren nach Bindung des Liganden und es kommt zu einer Konformationsänderung, die es der Tyrosinkinaseaktivität erlaubt, die intrazellulären Rezeptordomänen an mehreren Tyrosinresten zu autophosphorylieren. Auf diesem Weg entstehen spezifische Bindungsstellen für die Src-homologen Domänen 2 (SH2) verschiedener Signalproteine; gleichzeitig erfolgt deren Aktivierung. Zu diesen Proteinen gehören Grb und Gap, die Protein-Tyrosinkinase Src oder Protein-Tyrosinphosphatasen.

Das Grb-Protein bindet über seine SH2-Domäne an phosphorylierte Tyrosinreste des Rezeptors und wirkt als Verknüpfung zum Sos-Protein. Dieser Komplex funktioniert als GDP/GTP-Austauschfaktor und setzt GDP aus Ras-GDP frei. Somit kann Ras-GTP abdissoziieren, bindet und aktiviert die MAPKKK Raf, indem es einen Kontakt zur Membran herstellt, wo Raf durch eine Proteinkinase phosphoryliert werden kann. Durch Weiterleitung des Signals über die MAPK-Kaskade kommt es dann zur Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren im Zellkern und zur Modulation der Genexpression (s. Abb. 4).

1.5.2 Signalübertragung *via* ASK1 - p38/JNK

Die Signalübertragung *via* ASK1/p38 vermittelt Stress- und Entzündungsantworten auf Stimulantien wie Cytokine, FasLigand, ROS (*reactive oxygene species*) und TNF α . Der ASK1/JNK Weg überträgt diese Signale ebenso wie auch Wachstums- und Differenzierungssignale (Tibbles and Woodgett, 1999).

Apoptosis signal-regulating Kinase 1 (ASK1/ MAPKKK5) ist eine MAPKKK, der eine wichtige Rolle in der stress-induzierten Apoptose zukommt (Ichijo *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1996). ASK1 wird aktiviert in Antwort auf eine Vielzahl an Stress-Signalen und aktiviert MKK3 und MKK4, welche wiederum zur Phosphorylierung von p38-MAPK und JNK (c-jun-N-Terminal Kinase) führen (s. Abb. 5) (Matsuzawa and Ichijo, 2001). Eine Überexpression von ASK1 aktiviert p38 und JNK und induziert Apoptose in verschiedenen Zelltypen über eine mitochondriale Caspasen-Aktivierung (Ichijo *et al.*, 1997; Saitoh *et al.*, 1998; Tobiume *et al.*, 2002). Embryonische Fibroblasten aus

ASK1^{-/-} Mäusen sind resistent gegenüber stress-induzierter (H₂O₂, TNFα) Aktivierung von p38 und JNK und Zelltod (Tobiume *et al.*, 2001; Nishitoh *et al.*, 2002).

1.5.2.1 Aktivierungsmechanismus von ASK1

Humanes ASK1 besteht aus 1375 Aminosäuren und besitzt ein Molekulargewicht von 155kD. Im Mittelteil des Moleküls befindet sich die Kinase-Domäne mit langen flankierenden N-terminalen und C-terminalen Regionen. Innerhalb der Kinase-Domäne kommen vier Threonin-Reste vor. Thr845 wurde als aktivierende Phosphorylierungsstelle von ASK1 identifiziert (Tobiume *et al.*, 2002). Der C-Terminale Bereich des Proteins enthält eine coiled-coil Domäne. Über diese Supersekundärstruktur (Kombination von α-Helices in einer superspiralisierten Helix) kommt es zur Oligomerisierung von ASK1 (Ichijo *et al.*, 1997; Tobiume *et al.*, 2002). Am N-Terminus von ASK1 wird durch verschiedene Inhibitoren die katalytische Aktivität von ASK1 reguliert.

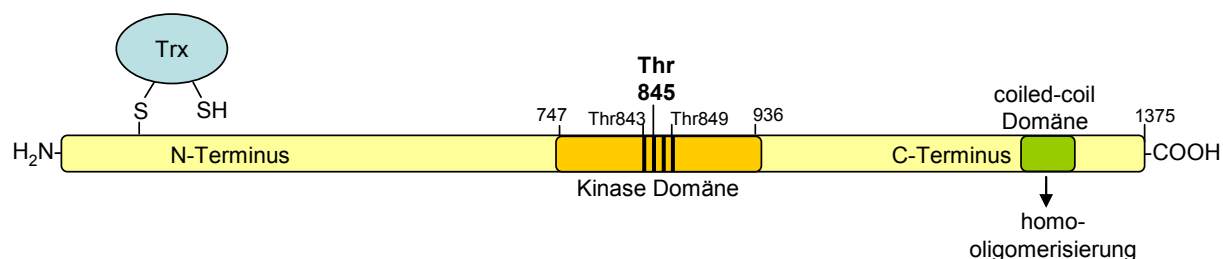


Abb. 6: Struktur von ASK1

Durch ein *yeast-two hybrid screening* wurde Thioredoxin (Trx) als Interaktionspartner von ASK1 entdeckt (Saitoh *et al.*, 1998). Trx ist ein reduktions/oxidations-reguliertes Protein und hemmt die Kinase-Aktivität von ASK1 durch direkte Bindung an die N-terminale Region von ASK1. ASK1-Mutanten, denen die N-terminale Region fehlt, sind konstitutiv aktiv (Saitoh *et al.*, 1998). Das 12kD Protein Trx besitzt eine redox-aktive Region, bei der zwei Cysteine die Sulfhydryl-gruppen zur Verfügung stellen, die für die Trx-abhängige Reduktionsaktivität entscheidend sind (Haendeler *et al.*, 2002).

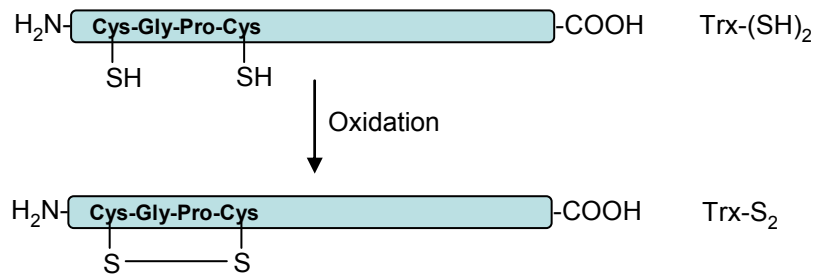


Abb. 7: Redox-Regulation von Thioredoxin

Nur die reduzierte Form Trx-(SH)₂, nicht aber die oxidierte Form Trx-S₂ bindet an ASK1. Daher hängt die Aktivität von ASK1 vom redox-Status des Trx ab (Saitoh *et al.*, 1998). Überexpression von Trx führt zu ASK1-Ubiquitinylierung und Degradation (Liu and Min, 2002).

Durch Einwirkung von ROS wie z.B. H₂O₂ wird Trx oxidiert und dissoziiert von ASK1 ab. Nun kann ASK1 aktiviert werden, indem es zunächst zu einer Oligomerisierung über die coiled-coil Domäne und darauffolgend zu einer Phosphorylierung des entscheidenden Threonins 845 in der Kinase Domäne von ASK1 kommt (Tobiume *et al.*, 2002; Saitoh *et al.*, 1998). Die Phosphorylierung des Thr845 erfolgt wahrscheinlich initial durch eine Threonin-Kinase. Eine Konformationsänderung des oligomerisierten ASK1 ermöglicht dann eine Trans-Autophosphorylierung (Tobiume *et al.*, 2002).

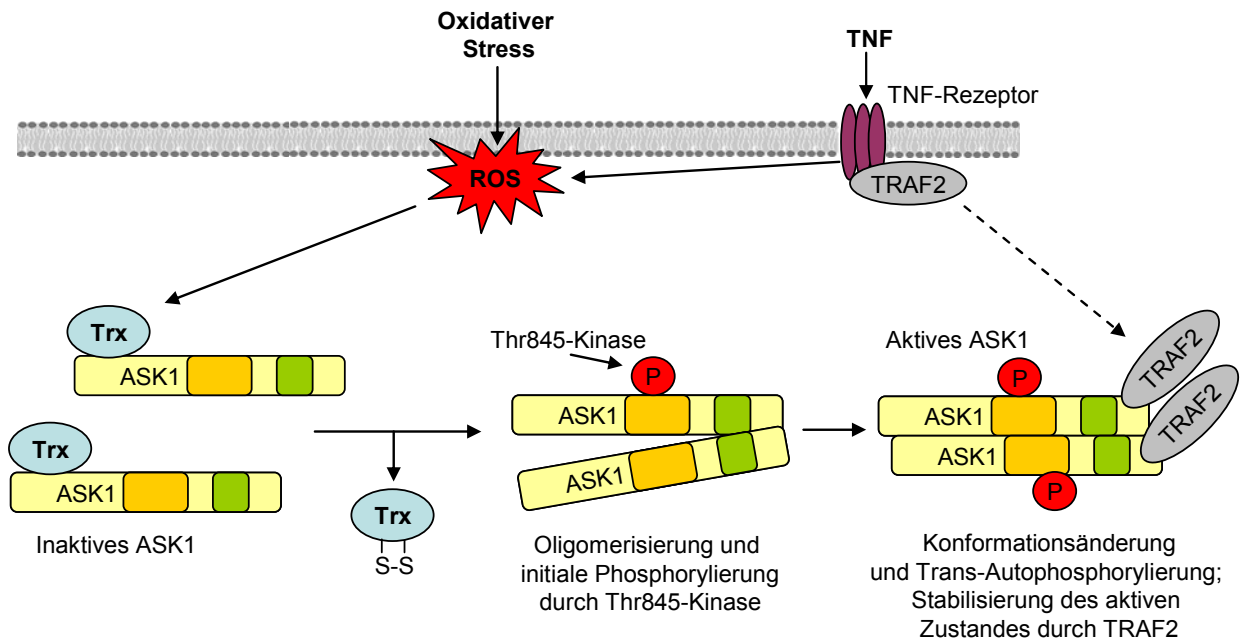


Abb. 8: Aktivierung von ASK1 durch oxidationsbedingte Freisetzung des Inhibitors Thioredoxin (Takeda *et al.*, 2003)

Das Trx-ASK1 System wird auch im TNF-Signalweg angesprochen. Nisitoh *et al.* zeigten, dass die Assoziation von ASK1 mit TNF Rezeptor-assoziierten Faktor 2 (TRAF2) notwendig für die TNF-induzierte Aktivierung von ASK1 ist (Nisitoh *et al.*, 1998). TRAF2 ist ein Adapterprotein, das den TNF-Rezeptor mit der Signalübertragung durch die MAPK-Kaskade verbindet. Da die Behandlung mit TNF oder die Überexpression von TRAF2 zur Produktion von ROS führt (Goossens *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2000), kommt es zur Dissoziation des Trx von ASK1. Das freigesetzte ASK1 bindet an TRAF2, welches die Oligomerisierung von ASK1 verstärkt und stabilisiert (Liu *et al.*, 2000).

Antioxidantien wie N-Acetyl-Cystein (NAC) können sowohl die durch oxidativen Stress bedingte als auch die TNF-induzierte Apoptose teilweise hemmen (Schulze-Osthoff *et al.*, 1994; Saitoh *et al.*, 1998).

Das Trx-ASK1 System dient also als molekularer Switch, der redox-Signale, die durch verschiedenste Arten an oxidativem Stress entstehen, in die Signalübertragung durch die MAPK-Kaskade überführt.

1.5.2.2 Weitere antiapoptotische Bindungspartner von ASK1

Neben Thioredoxin als Negativ-Regulator gibt es noch weitere Bindungspartner von ASK1, die durch Hemmung der Kinase antiapoptotisch wirken.

pp5

Die Protein (Serin/Threonin)-Phosphatase 5 (pp5) reguliert die Aktivität von ASK1, indem sie spezifisch an die aktivierte Form von ASK1 in Antwort auf dessen Aktivierung durch z.B. oxidativen Stress bindet und für die Dephosphorylierung von Thr845 sorgt. Folglich kommt es durch diese *negativ-Feedback*-Hemmung zur Deaktivierung von ASK1 (Morita *et al.*, 2001).

pp5 ist ein 58kD Protein, das hauptsächlich im Zellkern, aber auch im Cytoplasma vorkommt. Es besitzt vier Tetratricopeptid-Domänen im N-Terminus, die eine autoinhibitorische Funktion auf die Phosphatase-Aktivität von pp5 ausüben. Außerdem können damit Wechselwirkungen zu anderen Molekülen eingegangen werden. Der C-Terminus besteht aus einer Polypeptid-Kette, die die phosphorylytisch aktive Domäne enthält. Am terminalen Ende existiert eine zusätzliche autoinhibitorische Sequenz (Sinclair *et al.*, 1999).

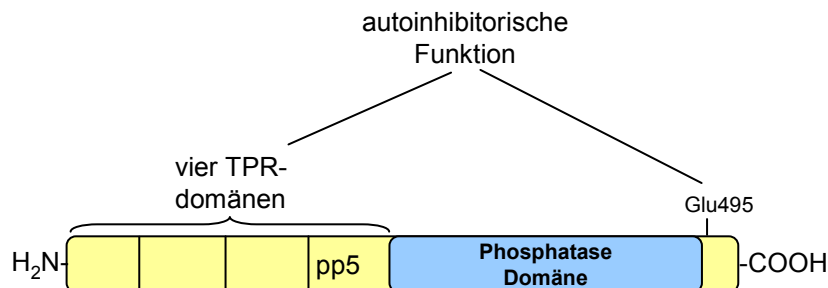


Abb. 9: Struktur von pp5

Auf Grund der autoinhibitorischen Domänen hat pp5 nur eine geringe Grundaktivität, kann aber durch mehrfach ungesättigte Fettsäuren (z.B. Linolsäure, Arachidonsäure) oder langkettige Fettsäure-CoA Ester *in vitro* bis zu 40fach aktiviert werden. Diese Aktivierung erfolgt über eine Bindung der FA an die TPR-Domänen (Ramsey and Chinkers, 2002; Skinner *et al.*, 1997; Kang *et al.*, 2001). Dieser Befund rechtfertigt

die Annahme, dass freie Fettsäuren aus E-LDL ebenfalls zu einer Aktivierung von p53 führen könnten.

Akt

ASK1 kann an Ser83 durch Akt phosphoryliert werden (s. Abb. 10), was zu einer Hemmung der Kinase-Aktivität von ASK1 führt (Kim *et al.*, 2001). Die Akt- (Protein Kinase B) Serin/Threonin-Kinasen sind entscheidende Vermittler des zellulären Überlebens (Dudek *et al.*, 1997; Franke *et al.*, 1997), da sie pro-apoptische Proteine, wie z.B. ASK1 oder auch Caspasen und Bad phosphorylieren und inhibieren. Die Proteine der Akt-Familie werden aktiviert durch Serum, Wachstumsfaktoren, Insulin oder Ca²⁺ über einen Signalweg, welcher die Phosphoinositol-3-Kinase (PI3-K) abhängige Herstellung von Phosphoinositol-triphosphat (PIP₃) benötigt. Akt wird durch Bindung von PIP₃ und anschließende zweifache Phosphorylierung aktiviert. Ebenso wie ASK1 wird auch Akt durch ROS aktiviert, d.h. die Aktivierung von ASK1 durch H₂O₂ kann durch Akt gehemmt werden (Kim *et al.*, 2001). Eine Phosphorylierung an Ser83 von ASK1 durch Akt kann erst nach Abspaltung von Trx erfolgen. Die durch Serumentzug entstehende ASK1-Aktivierung kann durch Zugabe von IGF-1 über Stimulierung des PI3-K/Akt-Signalwegs gehemmt werden.

14-3-3 Proteine

14-3-3 Proteine sind eine hochkonservierte Familie von Proteinen, die bei der Regulation von zellulärem Überleben, Apoptose oder Proliferation beteiligt sind (Aitken, 1995). 14-3-3 Proteine binden an Moleküle mit bestimmten Phosphoserin-Sequenzen wie z.B. bei ASK1 an P-Ser-967.

Nach Behandlung mit TNF kommt es zu einer Konformationsänderung des *ASK1-interacting protein 1* (AIP-1), welches daraufhin in der Umgebung von Ser-967 an ASK1 bindet und durch Dephosphorylierung von Ser-967 zu einer Abdissoziation von 14-3-3 führt. Dadurch wird die ASK1-Aktivität verstärkt, bevor es zu der bereits erwähnten TNF-vermittelten Bindung von TRAF2 an ASK1 kommt (s. Abb. 10) (Guicciardi and Gores, 2003; Zhang *et al.*, 2003).

GSTM1-1

ASK1 kann durch Hitzeschock aktiviert werden. Diese Aktivierung lässt sich im Gegensatz zur Induktion durch H_2O_2 nicht durch Antioxidantien wie NAC oder durch Überexpression von Trx antagonisieren. Hitzeschock verursacht die Dissoziation des ASK1-Inhibitors GSTM1-1 (Glutathion-S-transferase Mu1-1), führt aber nicht zur Abspaltung von Trx. Die Abdissoziation der GSTM1-1 lässt sich wie folgt erklären: GST-Proteine können kleine lipophile Moleküle wie z.B. Steroide binden, die während des Hitzeschocks freigesetzt werden könnten und mit ASK1 um die GSTM1-1-Bindung konkurrieren (Dorion *et al.*, 2002).

Park *et al.* berichten allerdings über eine Hemmung von ASK1 durch Hitzeschock *via* Bindung von *Heat shock protein 72* (HSP72) an ASK1. Eine Überexpression von HSP72 kann die H_2O_2 -induzierte Aktivierung von ASK1 und die nachfolgende MAPK-Aktivierung hemmen (Park *et al.*, 2002).

Raf-1

Die MAPKKK Raf-1 ist ein proto-oncogenes Produkt, das eine zentrale Rolle bei den am Zellwachstum beteiligten Signalwegen spielt. Raf-1 kann mit ASK1 interagieren, indem es am N-Terminus von ASK1 bindet (Chen *et al.*, 2001). Diese Interaktion ermöglicht eine Hemmung der Apoptose durch Raf-1 unabhängig vom oben beschriebenen MEK-Erk Signalweg. Die Bindung von Raf-1 an ASK1 benötigt keine vorhergehende Aktivierung von Raf-1, sondern kann auch durch kinase-defekte Raf-1 Mutanten erfolgen. Es kommen daher zwei Funktionen von Raf-1 in Betracht: die unter 1.5.1 genannte Aktivierung des MEK-Erk Signalweges über enzymatische Aktivität und die Hemmung von ASK1 über Protein-Protein-Wechselwirkungen. Die Hemmung der pro-apoptotischen Funktion von ASK1 durch Raf-1 kann Teil des Zell-Überlebens Mechanismus sein. Nach Stimulation von ASK1 durch oxidativen Stress oder TNF kann es zur Abdissoziation von Raf-1 kommen. Es ist noch unklar, über welchen Mechanismus Raf-1 ASK1 hemmt. Raf-1, das selbst ebenfalls durch Akt phosphoryliert werden kann (Zimmermann and Moelling, 1999; Rommel *et al.*, 1999), könnte zu einer Heranlockung von Akt an ASK1 und damit zur deaktivierenden Phosphorylierung von ASK1 führen (Kim *et al.*, 2001).

Interaktion mit TAK-1

ASK1 kann direkt mit der *transforming growth factor- β -activated kinase 1* (TAK1) interagieren. TAK1 ist ebenfalls eine MAPKKK, die durch verschiedene Stimuli wie TGF β , TNF, IL-1, UV oder osmotischen Schock aktiviert wird und über MKK7 bzw. MKK3/6 eine JNK- bzw. p38-Aktivierung auslösen kann (s. Abb. 5) (Yamaguchi *et al.*, 1995; Shirakabe *et al.*, 1997). TAK1 spielt eine wichtige Rolle bei der IL-1 vermittelten NF- κ B Aktivierung (Ninomiya-Tsuji *et al.*, 1999). IL-1 induziert eine Komplexbildung des Adapterproteins Traf6 mit TAK1. Die dadurch aktivierte TAK1 phosphoryliert und aktiviert die NF- κ B-*inducing kinase* (NIK), eine weitere MAPKKK. Die Aktivierung von NIK führt schließlich zur Aktivierung von NF- κ B (s. Abb. 12). Überexpression von ASK1 veranlaßt die Abdissoziation von Traf6 aus dem Komplex mit TAK1 und verhindert somit eine nachfolgende NIK- und NF- κ B-Aktivierung. Die Komplexbildung von NIK mit Traf6 wird allerdings nicht durch ASK1 beeinflusst (Mochida *et al.*, 2000).

1.5.2.3 Proapoptotische Bindungspartner von ASK1

Signalübertragung durch FasLigand

Auch bei der Signalübertragung durch FasLigand kann ASK1 beteiligt sein. Der Fas-Rezeptor gehört zur Familie der *death*-Rezeptoren. Diese Rezeptoren besitzen eine sogenannte *death domain*, eine aus 60-80 Aminosäuren bestehende cytoplasmatische Sequenz. Bindung des FasLigand an den Rezeptor führt zur Bildung eines Protein Komplexes, der als *death-inducing signaling complex* (DISC) bezeichnet wird. Daraufhin kommt es zur Auslösung der Apoptose über Caspase-8 Aktivierung (Nagata, 1999). Nach Fas-Aktivierung kann es allerdings auch über einen alternativen Signalweg zur Aktivierung des Fas-bindenden Proteins Daxx kommen (Yang *et al.*, 1997). Daxx bindet an die N-terminale Region von ASK1 und aktiviert dadurch p38 und JNK, was zur Apoptose über mitochondriale Caspasen-Aktivierung führen kann (Chang *et al.*, 1998). Die Fas-induzierte JNK und p38-Aktivierung ist in ASK1-/- Zellen gehemmt. Die Aktivierung von JNK und p38 über Daxx-ASK1 ist allerdings nicht unbedingt notwendig für die FasL-induzierte Apoptose, da hauptsächlich der Caspase-8-Weg eingeschlagen wird.

Bei der Fas-induzierten Apoptose kommt es nicht zur Generierung von ROS (Jacobson and Raff, 1995), sie ist also auch nicht hemmbar durch Antioxidantien wie

NAC. Die Caspase-8 Induktion ist durch TNF geringer als durch FasL bei gleichem Ausmaß an Apoptose, da TNF die Apoptose über Produktion von ROS induziert (Tobiome *et al.*, 2002).

Der ASK1-JNK/p38-Signalweg wird also spezifisch benötigt bei ROS-abhängigen, aber nicht bei Caspase-8-abhängigen pro-apoptotischen Signalen.

Apoptose durch ER-Stress

Bei Ansammlung von un- oder falschgefalteten Proteinen im Lumen des endoplasmatischen Retikulums (ER) kommt es zur Induktion von ER-Stress. Dies führt zur Bildung einer Reihe von molekularen Chaperonen, die das zelluläre Überleben unterstützen sollen, indem sie die Proteine neu falten. Ein übermäßiger oder langandauernder ER-Stress kann zur Apoptose der Zellen führen (Kaufman, 1999; Mori, 2000). Zu den initialen Vermittlern der ER-Stress-Antwort gehören transmembrane Serin/Threonin Kinasen wie z.B. IRE1. Akkumulation von ungefalteten Proteinen im ER induziert eine Oligomerisierung und Autophosphorylierung dieser Kinasen. Kürzlich wurde gezeigt, dass ER-Stress den ASK1-JNK Signalweg aktiviert durch die Bildung eines IRE1-TRAF2-ASK1 Komplexes. In ASK1-/- Zellen ist Aktivierung von JNK und die Induktion von Apoptose nicht möglich (Nisitoh *et al.*, 2002).

ER-Stress tritt auf bei Amyloidose, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus sowie bei neurodegenerativen Erkrankungen (Alzheimer, Parkinson).

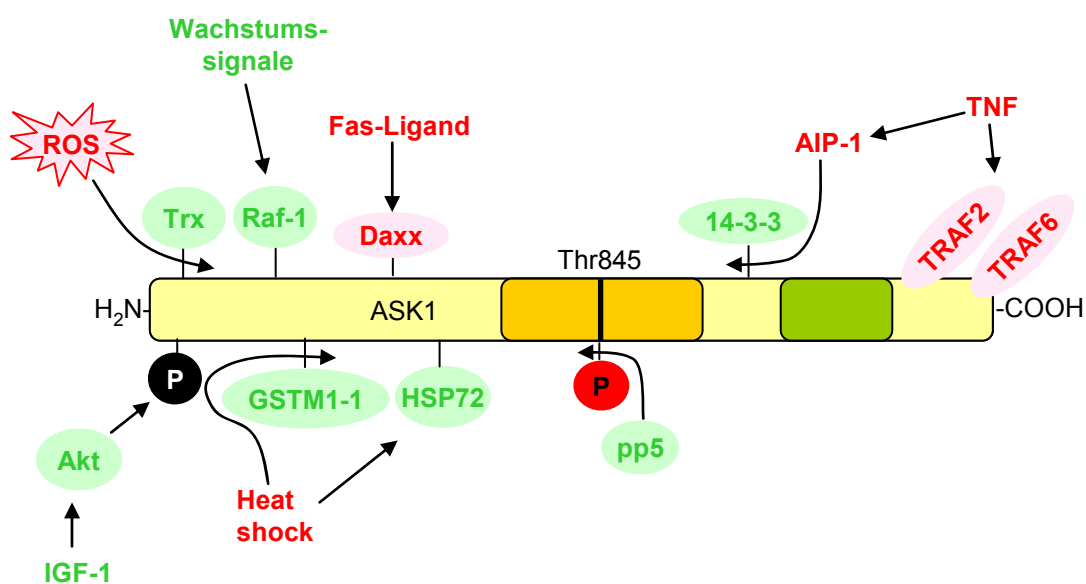


Abb. 10: Angriffspunkte einiger Bindungspartner von ASK1; rot: proapoptotische; grün: antiapoptotische

1.6 Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- κ B

Viele induzierbare Moleküle in Endothelzellen, die bei der Atherosklerose von Bedeutung sind, wie z.B. VCAM-1, ICAM-1, E-Selektin oder MCP-1 enthalten AP-1 oder NF- κ B Bindungsstellen innerhalb ihrer Promotorregionen (Neish *et al.*, 1992; Voraberger *et al.*, 1991; Degitz *et al.*, 1991). Sowohl AP-1 als auch NF- κ B können also bei der Regulation dieser Moleküle beteiligt sein (Lin *et al.*, 1996; Roebuck *et al.*, 1995; Ledebur and Parks, 1995).

1.6.1 AP-1

AP-1 (*activating protein-1*) setzt sich zusammen aus Proteinen der jun-, fos- und ATF-Familie. Die Familie der jun-Proteine bestehen aus c-jun, junD und junB; die der fos-Familie aus c-fos, fosB, fra-1 und fra-2; die der ATF-Familie aus ATF-2, ATF-3/LRF1 und BH-ATF (Vogt and Bos, 1990; Angel and Karin 1991; Karin *et al.* 1997). Typisch für die AP-1 Proteine ist der Leucin-Zipper, über den die einzelnen Mitglieder der verschiedenen Proteinfamilien dimerisieren. Es kommt zur Bildung einer Vielzahl von Homo- bzw. Heterodimeren. Homodimere entstehen aus den Proteinen der jun- oder ATF-Familie während Heterodimere aus Proteinen der Jun-Familie assoziiert mit Proteinen der ATF- oder der fos-Familie hervorgehen. fos-Proteine bilden keine Homodimere. Die Dimerisierung ist Voraussetzung für die Bindung an die DNA (Vogt, 2002).

Der Leucin-Zipper liegt in einer stark konservierten Region aus 60 Aminosäuren, der sogenannten bZIP-Region (basic Leucin-Zipper). Diese Region enthält außerdem eine basische DNA-bindende Domäne (Landschulz *et al.*, 1988), die für die sequenzspezifische Bindung an die entsprechende AP-1-*site* verantwortlich ist. Durch die Möglichkeit verschiedene Dimere zu bilden, ergibt sich eine große Anzahl verschiedener Kombinationen der AP-1 Mitglieder untereinander. Die Spezifität, mit der die Dimere an die DNA binden, ist abhängig von ihrer Zusammensetzung (Hai and Curran, 1991). jun-fos Dimere binden z.B. an eine TRE-*site* (TPA *response element*; TPA=Tetradecanoylphorbolacetat), eine AP-1 *consensus site* mit der Sequenz TGACTCA. jun-ATF Dimere binden an eine DNA-Sequenz, in der im Unterschied zur TRE-*site* noch eine weitere Base vorkommt: TGACGTCA. Diese AP-

1 *consensus site* wird als *CRE-site* (*c-AMP response element*) bezeichnet (Karin *et al.*, 1997).

AP-1 gehört zu den „*immediate early genes*“, deren mRNAs bereits kurz (Minuten) nach einem adäquaten Stimulus nachweisbar sind. Allerdings kommen die DNA-bindenden Proteine von AP-1 in unstimulierten Zellen nur in geringer Zahl vor und müssen nach Stimulation erst synthetisiert werden. Durch Aktivierung der MAPK-Kaskade z.B. nach oxidativem Stress kommt es zur Aktivierung von p38 und JNK und nachfolgend zur Phosphorylierung von bereits in der Zelle vorhandenem c-jun und ATF-2. Dadurch wird die transkriptionelle Aktivität dieses Heterodimers gesteigert und die Neusynthese von c-jun wird angeregt, da im c-jun Promotor eine *CRE-site* vorkommt, an die c-jun/ATF-2 bindet. Phosphorylierung des neugebildeten c-jun erhöht wiederum dessen transkriptionelle Aktivität (Karin, 1995). Die c-jun vermittelte Transkription wird gestoppt durch Abbau des Proteins im Proteasom nach Ubiquitinylierung (Pahl and Baeuerle, 1996).

JNK phosphoryliert und aktiviert neben c-jun und ATF-2 bevorzugt auch TCF/Elk1 (Karin, 1995; Karin and Hunter, 1995; van Dam *et al.*, 1995). Die Aktivierung von TCF-/Elk1, der zusammen mit SRF (*serum response factor*) an das SRE-Element im c-fos Promotor bindet, führt zur transkriptionellen Aktivierung von c-fos.

Allgemein führt die Phosphorylierung durch MAPK zur raschen Expression von c-jun, junB und c-fos Genen und zur anschließenden Modulation der Transkription von AP-1 Zielgenen (Karin *et al.*, 1997).

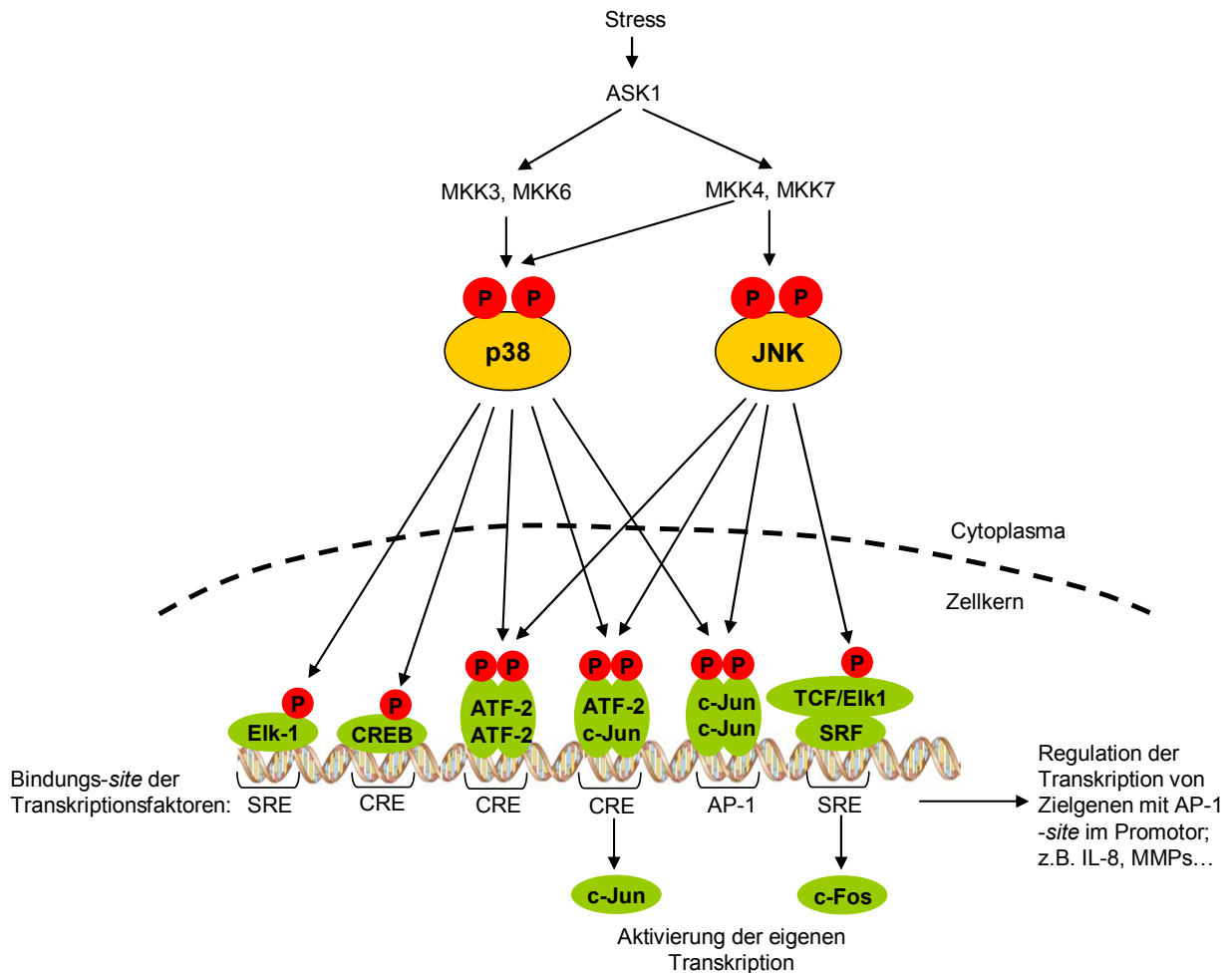


Abb. 11: Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der AP-1 Familie durch p38 bzw. JNK

Bei der Regulation der Zielgene haben die einzelnen Mitglieder von AP-1, insbesondere c-jun und JunB, auch gegenläufige Funktionen. So wird beispielsweise der Zellzyklus durch c-jun positiv und durch JunB negativ reguliert (Schreiber *et al.*, 1999; Wisdom *et al.*, 1999).

1.6.2 NF- κ B

Die *nuclear factor- κ B* (NF- κ B)/Rel Proteine funktionieren als dimere Transkriptionsfaktoren. Sie kontrollieren Gene, welche eine Vielzahl von biologischen Prozessen wie angeborene/erworbene Immunität, Entzündungen, Streß-Antworten

oder die Entwicklung von B-Zellen regulieren. Die Mitglieder der NF- κ B-Familie werden von fünf verschiedenen Genen codiert: RelA, RelB, c-Rel, NF- κ B1 und NF- κ B2. Die beiden letzteren führen zur Synthese von größeren Vorläuferproteinen, die dann in die Untereinheiten p50 und p65 gespalten werden (Perkins, 2000; Lang *et al.*, 2003). NF- κ B liegt im Cytosol in inaktivem Zustand vor, d.h. es wird komplexiert mit den inhibitorischen I κ B Proteinen (Baeuerle and Baltimore, 1988; Beg and Baldwin, 1993; Finco *et al.*, 1994). Die Aktivierung von NF- κ B erfolgt über Phosphorylierung der I κ Bs, was zur Freisetzung und nukleären Translokation von aktivem NF- κ B führt (Brown *et al.*, 1995; Brockman *et al.*, 1995; Traenckner *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1996). Die phosphorylierten I κ Bs werden erkannt und ubiquitinyliert über den SCF- β -TrCP Ubiquitin-Ligase-Komplex und anschließend im Proteasom abgebaut. Eine Aktivierung der JNK induziert die Akkumulation von β -TrCP Proteinen (*beta-transducin repeat-containing proteins*), was den Prozess der Ubiquitinylierung erleichtert.

Der entscheidende Schritt bei der I κ B-Phosphorylierung liegt in der Aktivierung des stromaufwärtsliegenden I κ B-Kinase (IKK) Komplexes, der aus zwei Untereinheiten (IKK α und IKK β) besteht. Die Phosphorylierung der IKKs kann je nach Art der extrazellulären Stimulation und Signalweiterleitung durch mehrere Kinasen erfolgen. Zu diesen Kinasen gehören die NF- κ B-*inducing kinase* (NIK) (Traencker *et al.*, 1995), die NF- κ B *activating kinase* (NAK) (Tojima *et al.*, 2000). Letztere kann durch die *transforming growth factor- β activated kinase 1* (TAK1) reguliert werden (Ninomiya-Tsuji *et al.*, 1999).

Sowohl pro- als auch anti-apoptische Gene tragen NF- κ B-sites in ihrer Promotorregion und werden je nach Zusammensetzung des NF- κ B-Dimers entsprechen reguliert.

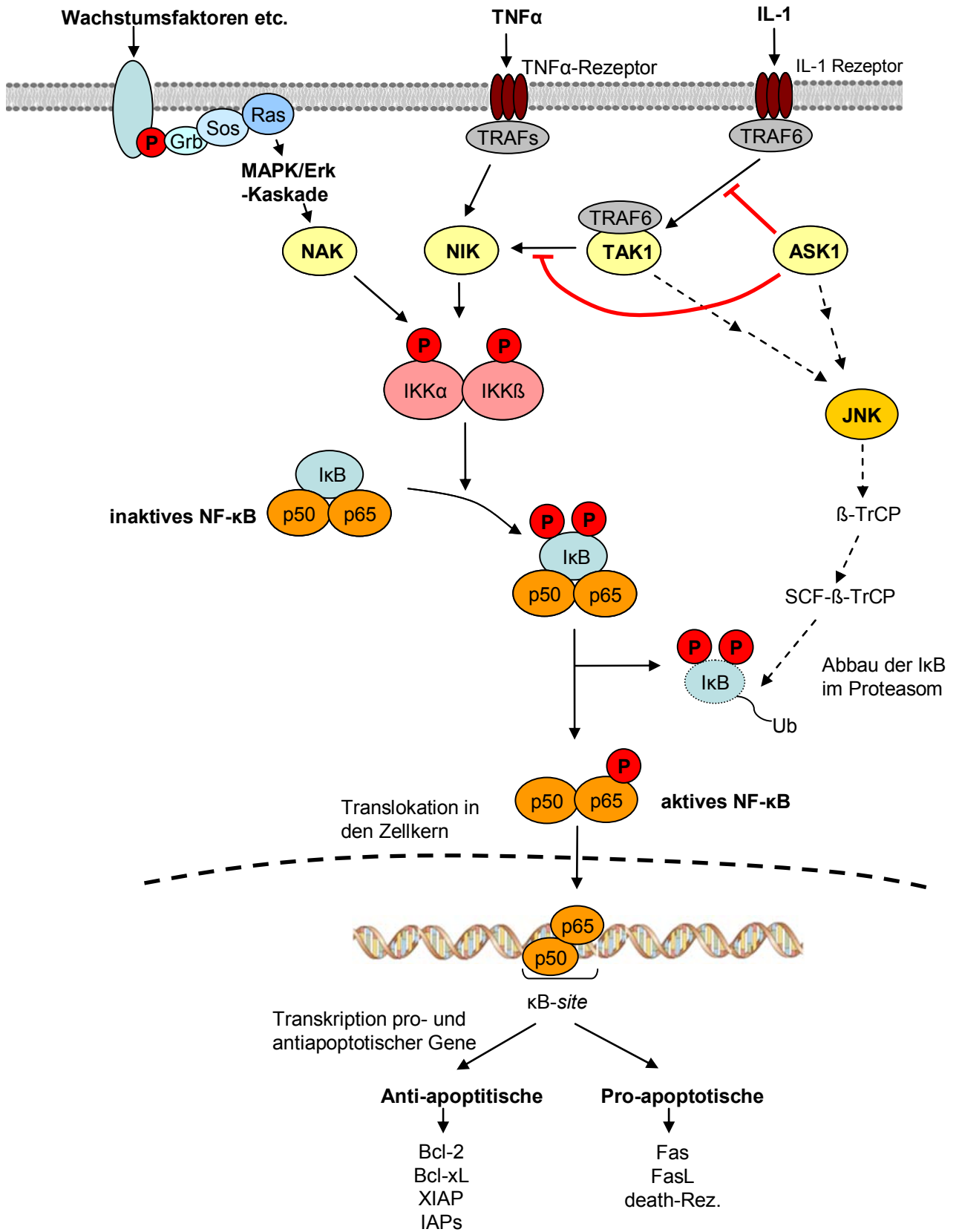


Abb. 12: NF- κ B Aktivierung durch verschiedene extrazelluläre Faktoren

2. Fragestellung

Die enzymatische Modifikation von subendothelial abgelagertem LDL ist nach der Mainzer Hypothese zur Pathogenese der Atherosklerose die Ursache für die Generierung eines proatherogenen Stimulus. Bereits bekannt ist, dass es unter Einwirkung von E-LDL in Endothelzellen zur Modulation der Aktivität von verschiedenen Transkriptionsfaktoren wie AP-1 und NF- κ B kommt.

In der vorliegenden Arbeit sollen stromaufwärts dieser Transkriptionsfaktoren gelegene Ereignisse nach Behandlung mit E-LDL untersucht werden. Über die mitogen-aktivierte Protein Kinase ASK1 kann sowohl eine Regulation von AP1 als auch von NF- κ B erfolgen. Daher lag es nahe, den Aktivierungszustand von ASK1 nach Behandlung mit E-LDL zu untersuchen. Es sollte festgestellt werden, ob E-LDL bzw. die in E-LDL enthaltenen freien Fettsäuren ASK1 aktivieren können.

Eine weitere Erkenntnis unterstützt die Frage nach dem Aktivierungszustand von ASK1: in einem Western Blot *Screening* von Monozyten, die 24 Stunden mit E-LDL behandelt wurden, fanden sich erhöhte Mengen der Proteinphosphatase pp5. pp5 ist ein *Negativ-Feedback* Inhibitor von ASK1, d.h. eine Hochregulation von pp5 könnte auf eine zuverige ASK1-Aktivierung deuten.

Die Versuche sollen größtenteils in Endothelzellen durchgeführt werden. Diese Zellen haben Kontakt sowohl zu zirkulierendem LDL als auch zu subendothelial abgelagerten LDL bzw. E-LDL. Initiale Ereignisse der Atherosklerose dürften sich also in Endothelzellen gut beobachten lassen.

3. Material und Methoden

3.1 Chemikalien

Agarose	Roth	Kaliumbromid	Roth
Acrylamid (Rotipherese-Gel)	Roth	Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Ammoniumperoxodisulfat AP	Roth	Luminol	Sigma
Ampicillin	Roth	Methanol	Roth
Aprotinin	Sigma	2-Mercaptoethanol	Roth
Bacto-Agar	BD	Natriumchlorid	Roth
Bacto-Trypton	BD	Natriumdodecylsulfat ultra pure (SDS)	Roth
Borsäure	Roth	Natriumdihydrogenphosphat	Roth
Bromphenolblau		Natrium-deoxycholat	Serva
Chloroform	Roth	Natriumfluorid	Roth
DAPI (4',6 Diamidino-2-Phenylindol)	Sigma	Natrium-orthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth	Natriumphosphat	Roth
Dichlorofluorescein-diacetat		Oil-red O	Sigma
Ethanol 99,8%	Roth	Phenylmethylsulfonylchlorid (PMSF)	Roth
Ethidiumbromid	Roth	Ponceau S	Sigma
Ethylendiamintetraessigsäure	Merck	Sucrose	Roth
Formaldehyd	Roth	Salzsäure 37%	Roth
Fotochemikalien (Entwickler und Fixierer)	Kodak	N,N,N',N'-Tetramethylendiamin (TEMED)	Roth
Glycerin wasserfrei		1,1,3,3-Tetramethoxypropan (Malondialdehyd)	Sigma-Aldrich
Glycin	Roth	Triton X-100	Roth
Humanalbumin fettsäurefrei	Sigma	Trishydroxyaminomethan (Tris) Ultra Qualität	Roth
Igepal	ICN	Tween 20	Roth
Isopropanol	Roth		

Hersteller:

Difco Laboratories, Darmstadt

Kodak, Kodak int. Biotechnologies, New Haven, USA

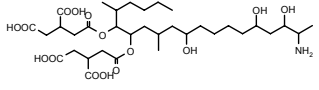
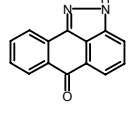
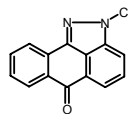
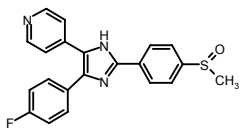
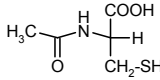
Merck Darmstadt

Sigma Deisenhofen

Roth Karlsruhe

ICN Biomedicals Inc.

3.2 Inhibitoren

Substanz	Funktion	Lösungsmittel / Stock-Konz.	Endkonz.	Artikelnr./ Hersteller
Fumonisin B1	pp5-Inhibitor (IC_{50} = 80 μ M); induziert Apoptose 	H ₂ O; 1mg/ml	200 μ M	#F-1147 Sigma
JNK/SAPK-Inhibitor-II (SP600125)	Zellpermeabler selektiver Inhibitor für JNK (IC_{50} =40nM für JNK-1/2, 90nM für JNK-3); verhindert Phosphorylierung von c-Jun; besitzt 300fach höhere Selektivität für JNK als für ERK bzw. p38 	DMSO; 1mg/ml	1 μ M	#420119 Calbiochem
JNK-Inhibitor Negativ-Kontrolle	Inhibiert JNK2 bzw. 3 erst bei viel höherer Konz. (IC_{50} =18 bzw. 24 μ M) 	DMSO; 1mg/ml	1 μ M	#420123 Calbiochem
SB203580 (p38-Inhibitor)	Bindet an ATP-Bindungsstelle von p38 und hemmt die Kinase-Aktivität 	gelöst in DMSO 1mg/ml (=2,65mM)	20 μ M	#559389 Calbiochem
NAC (N-Acetylcystein)	Antioxidanz 	H ₂ O; 0,9M; pH 7,5 mit NaOH einstellen	30mM	#A-8199 Sigma

3.3 Reagenzien für die Behandlung von Zellen

Substanz	Lösungsmittel / Stockkonz.	Endkonz.	Artikelnr./ Hersteller
Arachidonsäure (freie Säure)	Ethanol 100mg/ml	0,3µM	#181198 Calbiochem
Linolsäure, wasserlöslich	H ₂ O 10mg/ml; 30,2mg/g Methyl-β-cyclodextrin	100µM	#L-5900 Sigma
Linolsäure (freie Säure)	Ethanol	0,3µM	Sigma
Methyl-β-cyclodextrin (Cy)	H ₂ O; 100mg/ml	3,3µl Cy pro 1µl LA	#C-4555 Sigma
Ölsäure, wasserlöslich	H ₂ O; 10mg/ml; 30,4mg/g Methyl-β-cyclodextrin	100µM	#O-1257 Sigma
Sorbitol	H ₂ O; 5M	0,5M	Serva
Wasserstoffperoxid	30%	1-5mM	Roth

3.4 Puffer und Lösungen

Puffer für Agarosegele	Bestandteile	Mengenverhältnisse
Agarose-gele	0,8% (m/v) Agarose 5µg/ml Ethidiumbromid	
TBE, 5x	Tris H ₃ BO ₃ EDTA 0,5M, pH8	54g 27,5g 20ml H ₂ O ad 1l

Lysis-puffer		Mengen für 50ml
RIPA-puffer	NaCl 150mM TrisHCl pH8,0, 50mM Igepal 1% Na-deoxycholat 0,5% SDS 0,1% + <i>Inhibitoren:</i> PMSF Aprotinin Na ₃ VO ₄ NaF 50mM	5ml einer 1,5M-Lsg (4,4g/50ml) 5ml einer 500mM Lsg (6g/100ml) 0,5ml 2,5ml einer 10%-Lsg 0,5ml einer 10%-Lsg 2µl/ml einer 0,1M Isopropanol-Lsg 1,5µl einer 10%-Lsg 10µl/ml einer 100mM Lsg (0,18g/10ml) 50µl/ml einer 1M-Lsg

Probenpuffer		
Probenpuffer f. Agarosegel, 6x	40% (v/v) Glycerin 0,25% (m/v) Bromphenolblau	
Reduzierender	Tris 1M, pH 6,8	13,0ml

Probenpuffer f. WB; 2x	Glycerin 86% 2-Mercaptoethanol SDS 10% Bromphenolblau H ₂ O	11,6ml 5,0ml 20ml 1 Spatelsp. ad 100,0ml
Reduzierender Probenpuffer f. WB; 5x	Glycerin Tris 1M, pH 6,8 SDS MercaptoEtOH Bromphenolblau	10ml 6,2ml 2,0g 3,8ml 1 Spatelsp.

Puffer für Western Blots		
Blot-puffer	Tris 48mM Glycin 39mM SDS 0,0375% Methanol 20%	11,6g 5,8g 3,75ml 20% SDS 200ml 99% MeOH H ₂ O ad 1l
SDS-Laufpuffer, 10x	Tris Glycin SDS	30g 144g 10g H ₂ O ad 1l
4xTris-HCl/SDS pH 6,8	Tris SDS	6,05g 0,4g H ₂ O ad 100ml, pH 6,8 mit HCl einstellen
4xTris-HCl/SDS pH 8,8	Tris SDS	45,5g 1g H ₂ O ad 250ml, pH 8,8 mit HCl einstellen
Stripping-puffer	TBS SDS 2% β-Mercaptoethanol 100mM	80ml 16ml 10% SDS 0,7ml

Waschpuffer		
PBS, 10x	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄	80g 2g 14,4g 2,4g H ₂ O ad 1l; pH7,4 mit NaOH einstellen
TBS, 10x	Tris-HCl 100mM, pH7,4 NaCl 2M	

3.5 Enzyme

Cholesterin-Esterase	5mg; #393916; Roche
EcoR1	10U/μl; 92353020;1175084; 10000U; Roche
SuRE/Cut Buffer H for Restriction enzymes	10x buffer; 1417991; Boehringer Mannheim GmbH
T4-DNA Ligase	1U/μl; Cat# 15224-017; Life Technologies
5x T4-DNA Ligase Puffer	Part.No.: Y90001; Invitrogen Life Technologies
Trypsin	1mg/ml; Sigma
Trypsin-Inhibitor	1mg/ml; Type I-S; from Soybean, #T-9003; Sigma
Xho I	10U/μl; cat# 899194; Roche

3.6 Marker

Biotinylated protein ladder	Kit: Cat# 7727; Cell Signaling Technology
Magic marker™ Western Standard	# LC5600; Invitrogen (120;100;80;60;50;40;30;20)
Magic marker™ XP Western Standard	# LC5602; Invitrogen (220;120;100;80;60;50;40;30;20)
Roti-Mark prestained	#T852.1; Roth (245;123;77;42;30;25,4)
1kb DNA Ladder	1μg/μl; # 15615-016; Invitrogen

3.7 Transfektion / Immunpräzipitation

Lipofektin Reagent	#18292-011/-037; 1mg/ml; Invitrogen
Protein A/G Plus Agarose	#sc-2003; Santa Cruz Biotechnology

3.8 Antikörper

Antikörper gegen	Spezies	Eingesetzte Verdünnung	Hersteller
ASK1 (N19)	goat	1:500	# sc-6368; 200µg/ml; Santa Cruz Biotechnology
ASK1 C-Terminal (1356-1375)	rabbit	1:500	# B44221; 100µg/ml; Calbiochem
ASK1-F9	mouse monoclonal IgG1	1:500	# sc-5294; Santa Cruz Biotechnology
ppt/pp5	mouse	1:500	# P75520; 250µg/ml; Transduction Laboratories
Anti-Flag M2	mouse monoclonal	1:500	# F-3165; Sigma
Anti-HA clone 3BF10	rat monoclonal IgG	1:500	# 1867423; 100µg/ml; Roche
Anti-Phosphothreonine, clone 1E11 + P-Control	mouse	1:500	# 52750; Biomol
Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)	rabbit	1:1000	# 9250 (Kit); Cell Signaling Technology
SAPK/JNK	rabbit	1:1000	“
Anti-Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)	rabbit	1:1000	# 9211; Cell Signaling Technology
Anti-p38 MAPK	rabbit	1:1000	# 9212; Cell Signaling Technology
Anti-active MAPK (ERK1/2)(pTEpY)	rabbit	1:5000	# V803A; Promega
Anti-GAPDH	mouse monoclonal	1:4000	# 4300; Ambion
Anti-PARP p85 Fragment Antikörper	rabbit	1:400	# TB273; Promega

Antikörper für Immunfluoreszenz	Spezies	Eingesetzte Verdünnung	Hersteller
Cy3-conj. Affini Pure F(ab') ₂ Fragment	goat anti mouse IgG (H+L)	1:500	Min X: Hu, Bov, Hrs, Sr, Prot; Code#115-166-062; Jackson Immuno Research Lab.; Amersham International

Zweit-Antikörper für Western Blot	Eingesetzte Verdünnung	Hersteller
Donkey-anti-goat IgG-HRP	1:500	sc-2020; 200µg/ml; Santa Cruz Biotechnology
Anti-mouse IgG-HRP	1:500	Cat# sc-2005; Santa Cruz Biotechnology
Goat-anti-rat IgG-HRP	1:500	Cat# sc-2006 Santa Cruz Biotechnology
Anti-rabbit IgG-HRP	1:2000	Cat#7074; Cell signaling technology
HRP-conjugated anti-biotin antibody	1:1000	Cat #7075; Cell signaling technology

3.9 Kits

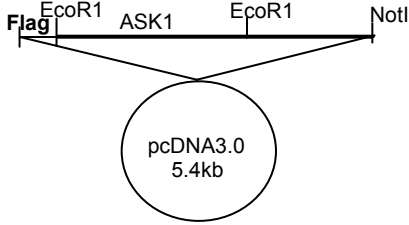
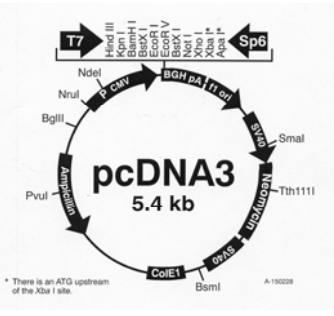
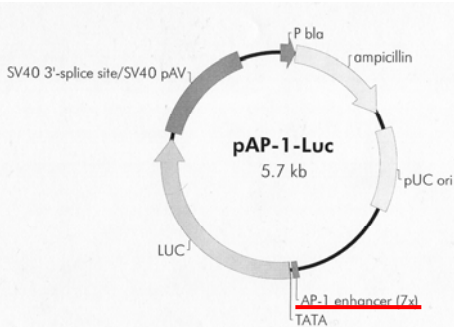
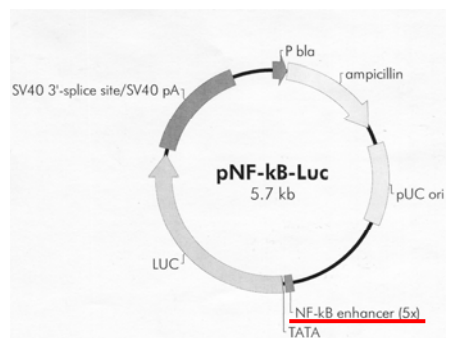
Annexin-V	BD ApoAlert™-Annexin-V-EGFP Apoptosis Kit; # 630113; BD Biosciences
ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II	# 1699695; Roche
Caspase-Assay	Caspase-Glo™ 3/7-Reagenz; Promega # G8092
CaspaTag™ Caspase-3/7 In situ Assay Kit	# APT423; Chemicon International
Chemilumineszenz Western-Blot	BM Chemiluminescence Blotting Substrate (POD); Roche; #1500708
Luciferase-Assay	# E1501; Promega
Quiaprep Spin Minipräp Kit	# 27106; Quiagen
Endo-Free® Plasmid Maxi Kit	# 12362; Quiagen
QIAEX-II Gel extraction Kit	# 20021; Quiagen
DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System	# TB235; Promega

Hersteller:

BD Biosciences; Palo Alto; USA
Chemicon International; Temecula; USA

Promega; Madison; USA
Quiagen; Hilden

3.10 Plasmide

<p>Flag-ASK1 in pcDNA3.0</p> 	<p>Maxipräp Ch-3: 2,81µg/µl (05.02.03)</p>	<p>v. Ichijo</p>
<p>HA-pp5 in pcDNA3.0</p>	<p>Maxipräp: 1,5µg/ml (30.06.03)</p>	<p>v. Ichijo</p>
<p>pcDNA3.0 Kontrollvektor</p> 	<p>Maxipräp: 0,98µg/µl (23.05.03)</p>	<p>Selbst hergestellt, aus Flag-ASK1 mit Xho I ausgeschnitten</p>
<p>pAP1-Luc</p> 	<p>Maxipräp: 1,67µg/µl (24.03.03)</p>	<p># 299078-51; Stratagene</p>
<p>pNFkB-Luc</p> 	<p>Maxipräp: 2,18µg/µl (24.03.03)</p>	<p># 219074-51; Stratagene</p>

3.11 siRNA's

Zur transienten Ausschaltung von ASK1 wurden chemisch synthetisierte siRNA's der Firma Ambion (#16804) verwendet:

siRNA#1: 5'-GGUGGCACAAGCAAGUUCUtt-3'

siRNA#3: 5'-GGUAUACAUGAGUGGAAUUt-3'

siRNA#5: 5'-GGAAUAAUUUGCCAGAAGtt-3'

sowie ein Negativ-Kontroll Oligonukleotid gegen eine nonsense-Sequenz (#4611).

Jeweils 40nmol siRNA wurden mit 400µl Wasser auf eine Konzentration von 100µM eingestellt. Die Negativ-Kontrolle lag bereits in gelöster Form vor in einer Konzentration von 50µM.

3.12 Bakterien

Subcloning Efficiency DH5α® Chemically Competent Cells E.coli; Invitrogen; # 18265-017

3.13 Laborbedarfsartikel

	Volumen	Artikelnr.	Hersteller
Eppendorf-gefäße	1,5ml	212130	Eppendorf
Flotationsröhrchen	13x51mm	5022	Konrad Beranek Laborgeräte
Küvetten (Halbmikro)	2ml	297872710	MBT
Minisart Spritzenfilter steril	0,8µm	16592	Sartorius
Multitips	12,5ml 5ml 2,5ml	147870347	MBT
Nitrocellulose- Membran	300mmx3m Porengrösse: 0,45µm	10401196	Schleicher & Schuell
PD-10 desalting workmate	Equil. Vol. 25ml Proben-Vol. 2,5ml Elutions-Vol. 3,5ml	170851-01	Amersham Biosciences
Probenröhrchen mit Schraubdeckel	1,5ml	710005	Biozym
PP-Falconröhrchen	15ml	188271	Greiner Bio-one
PP-Falconröhrchen	50ml	227261	Greiner Bio-one
Probenröhrchen PP	14ml	187261	Greiner Bio-one
Rotilabo® Spritzenfilter steril	0,22µm 0,45µm	P664.1 P665.1	Roth
Spritzen steril Luer Injekt	10ml	4606108V	B. Braun

Ultrazentrifugen-Röhrchen/Re-Seal	25x89mm	9052	Konrad Beranek Laborgeräte
Whatman-filterpapier	190mmx100m	3030690	Whatman International Ltd.
Zellschaber steril	24cm	99002	TPP

Hersteller der Labormaterialien:

Amersham Biosciences,
Uppsala/Schweden

B. Braun; Melsungen

Biozym

Greiner Bio-one; Frickenhausen

MBT; Gießen

Sartorius; Göttingen

Schleicher&Schuell

Konrad Beranek Laborgeräte

TPP; Schweiz

Whatman Ltd.

3.14 Laborgeräte

Gerät	Hersteller	Gerät	Hersteller
ATP-Messgerät/ Lumat LB 9507	Berthold Technologies	Mikroskop	Zeiss
BioDoc Analyze UV-Gerät für Agarosegele	Biometra	Mikroskop, Farbkamera	Zeiss
Brutschrank für Zellkulturen	Heraeus Instruments	pH-Meter pH320	WTW
Dispenser-Multipette 4780	Eppendorf	Pipettierhilfe „Pipetus“	Hirschman Laborgeräte
Elektrophorese-power supply	Consort 400V- 400mA AE844	Pipetten 10-1000µl	Eppendorf
Elektrophoresekammer Für Western Blots	Kreutz Labor- technik	Röntgenfilme	Fuji Fotofilm Super RX; Fujifilm
Elektrophoresekammer Für Agarosegele	Renner GmbH	Rotor VT50	Beckman
FACScan	Becton Dickinson	Rotor SW55	Beckman
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss	Schüttelwasserbad	Haake SWB25
Filmkassette	Kodak Cassette BioMax	Standzentrifuge GPKR	Beckman
Gefrierschrank -20°C	Liebherr	Sterilwerkbank	Cryo-Technik
Gefrierschrank -70°C	Heraeus	Thermomixer	Eppendorf
Glasgeräte, flaschen	Schott	Ultrazentrifuge	Beckman Coulter
Horizontalschüttler KS 10	Edmund Bühler	UV/Visible Spectro- meter Ultrospec 2000	Pharmacia Biotech
Kühlschrank	Liebherr	Vortex	Heidolph
Magnetrührer IKAMAG	Jankel und Kunkel, Staufen	Waage	Mettler
Mikro-Lumat LB 96P	Berthold	Waage, digital	Sartorius

Hersteller der Laborgeräte:

Beckmann, München	Labotec, Wiesbaden
Biometra, Göttingen	Liebherr, Ochsenhausen
Bosch, Stuttgart	Renner GmbH, Dannstadt
Cryo-Technik, Hamburg	Sartorius, Göttingen
Eppendorff	Schott, Mainz
Heraeus Instruments, Hanau	WTW, Weilheim
Kreutz Labortechnik, Reiskirchen	Zeiss, Oberkochen

3.15 Materialien und Medien für die Zellkultur

Medien für die Kultur von Eahy926, 293, Cos7, HeLa und HaCat-Zellen:

	Artikelnr. / Hersteller
D-MEM:F-12 (1:1) + GlutaMAX™I	31331-028 / Gibco
Fetales Kälber Serum (FCS), vor Gebrauch 30Min auf 56°C erhitzen um das Komplementsystem zu inaktivieren	10106-185 / Gibco
Penicillin 10000U/ml Streptomycin 10000µg/ml	15140-122 / Gibco
Trypsin/EDTA 10x	T4174 / Sigma

Medium für THP-1 Zellen

RPMI 1640 Medium ohne Glutamin	31570-047; Gibco
Glutamin 200mM 100x	25030-024; Gibco
Natrium-Pyruvat MEM 100mM	11360-039; Gibco
Hepes 1M	15630-056; Gibco
P/S; FCS	s.o.

Medium für primäre Zellen (HAoEC)

Endothelial Cell Growth Medium MV	C-22020 ; PromoCell
+ Suppelement-Mix 5% FCS 10ng/ml EGF 1µg/ml Hydrocortison 2ml ECGS/H Gentamicin/AmphotericinB	C-39225; PromoCell
Hepes BSS	C-40000; PromoCell
TNS (Trypsin Neutralizing Solution)	C-41100; PromoCell
Trypsin-EDTA	C-41000; PromoCell

Medium für die Transfektion

OptiMEM	31985-047; Gibco
---------	------------------

Medien zur Kultivierung von Bakterien

LB (Luria Bertani)-Medium	Bacto-Trypton 1% (m/v) Hefeextrakt 0,5% (m/v) NaCl 0,5% (m/v) In Wasser lösen, pH7,5 einst.; autoklavieren
LB-Agar Platten mit Ampicillin	LB-Flüssigmedium mit 1,5% (m/v) Bacto-Agar versetzen, autoklavieren. Nach Abkühlen auf ca. 50°C 100µg/ml Ampicillin zugeben und in Platten gießen.

Materialien für die Zellkultur

	Hersteller
Gewebekulturflaschen T75	Greiner Bio-One GmbH
Gewebekulturflaschen klein	Greiner Bio-One GmbH
Zellkulturplatten 6-well, 24-well, 12-well, 96-well	Nunc
Chamberslides Kunststoff/ Lab Tek Permanox 8-well	Nalge Nunc International
Chamberslides glas/ Lab Tek	Nalge Nunc International
Deckgläschen 24x24mm	Menzel-Glaser

Hersteller der Materialien für die Zellkultur:

Gibco Invitrogen

Greiner, Solingen

Menzel-Glaser, Braunschweig

PromoCell, Heidelberg

Nalge Nunc International, USA

Nunc, Dänemark

3.16 Allgemeine Durchführung der Proteinbestimmung

Der Proteingehalt in Zelllysaten bzw. LDL oder oxLDL-Proben wird mit dem Roti-Nanoquant Reagenz (Art.Nr. K880.1) durchgeführt. Die Methode basiert auf dem Bradford-test (Bindung von Coumassie an Proteine, dadurch Erhöhung des Absorptionsmaximums, Blaufärbung). Das Reagenz liegt in einer 5x konzentrierten Lösung vor und wird direkt vor Gebrauch 1:5 verdünnt.

BSA-Standardreihe

Als Stammlösung wurde eine wässrige Lösung von bovinem Serum Albumin mit der Konzentration von 10mg/ml angesetzt. Aus dieser Lösung wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt (2,5; 2; 1,5; 1 und 0,5 mg/ml). Zur Messung der Absorption wurden jeweils 10µl der Verdünnungen zu 1ml 1xRoti-Nanoquant-Reagenz in Einmal-Plastikküvetten pipettiert und gut geschüttelt. Die Inkubationszeit beträgt 5 Minuten, dann wird die Absorption bei 595nm gemessen.

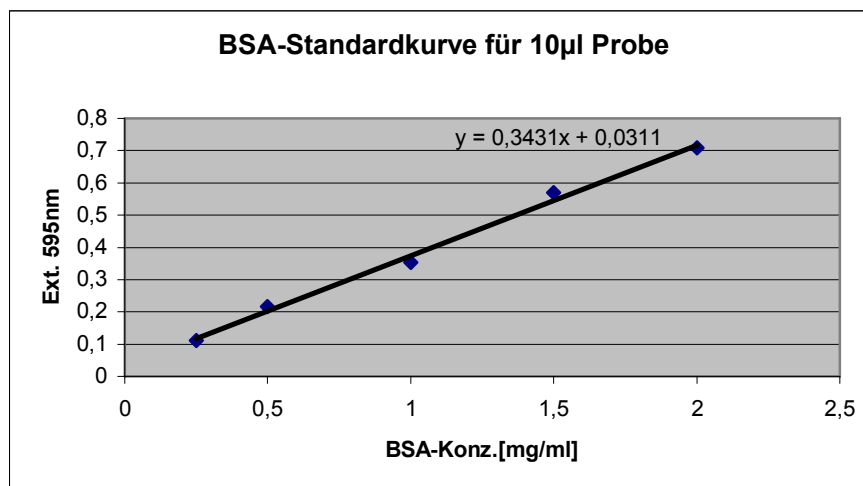


Abb. 13: BSA-Standard Kurve

Der Proteingehalt in Zelllysaten lässt sich ermitteln, indem 10µl Probe zu 1ml 1x Roti-Nanoquant Reagenz gegeben werden. Die Proteinkonzentration in der Probe kann direkt aus der BSA-Standardkurve abgelesen werden.

3.17 LDL-Präparation

Die LDL-Präparationsmethode basiert auf der Methode der sequenziellen Ultrazentrifugation über einen Kaliumbromid-Gradienten. Das Verfahren wurde erstmals von Havel et al (Havel, 1955) beschrieben.

Das zu verarbeitende Plasma stammt von nicht-lipämischen Spendern zwischen 18 und 65 Jahren, die frei von Herzkreislauf- sowie Stoffwechselerkrankungen sind und sich keiner medikamentösen Behandlung unterziehen.

Für die Isolierung von LDL aus Plasma werden ausschließlich autoklavierte Puffer und Lösungen verwendet. Die Präparation findet unter aseptischen Bedingungen statt, um eine Kontamination v.a. mit LPS-produzierenden Bakterien zu vermeiden.

Das Volumen der frischen Plasmakonzentrate wird in einem sterilen 500ml Standzylinder gemessen. Von dieser Menge wird zur Dichtebestimmung eine Probe von 1ml entnommen (Plasma-Probe).

Dem Plasma wird nun 0,3265g KBr / ml zugefügt und wiederum wird eine 1ml Probe entnommen (Plasma-KBr-Probe). Das Volumen im Standzylinder wird nochmals abgelesen und durch 16 dividiert, da die Menge auf 16 Ultrazentrifugen-Röhrchen verteilt werden soll (z.B.: total 300ml/16=18,7ml pro Röhrchen).

Im nächsten Schritt werden die Ultrazentrifugenröhrchen mit der Light KBr-Lösung befüllt, deren Volumen wie folgt ausgerechnet wird: Plasma-KBr-Menge pro Röhrchen wird vom Gesamtvolumen eines Röhrchens subtrahiert (z.B. 40ml-18,7ml = 21,3ml Light KBr-Lsg.).

Diese Light KBr-Lösung wird nun mit dem schwereren Plasma-KBr unterschichtet. Die Röhrchen werden anschließend mit einem speziellen Zuschweissgerät (Beckmann) verschlossen. Bei 45000rpm und 10°C werden die Proben über Nacht (mind. 16h) zentrifugiert (Ultrazentrifuge L60; Rotor VT 50; Beckmann), wobei sich die Lipidfraktion am oberen Röhrchenrand ansammelt.

Am nächsten Tag kann die LDL-Fraktion mit einer 5ml Spritze abgenommen werden. Das Volumen der isolierten Fraktion 1, von dem wieder eine 1ml-Probe (LDL-KBr-Probe1) entnommen wird, wird in einem 250ml Standzylinder gemessen.

Die bisher entnommenen 1ml-Proben werden ausgewogen und ergeben die Dichtewerte in g/ml.

Mit diesen Dichte-Werten ist es nun möglich die KBr-Menge [g] zu berechnen, die nötig ist um die LDL-Fraktion 1 wieder auf die Dichte von schwererem Plasma einzustellen.

Rechnung: Plasma-KBr-Dichte minus Plasma-Dichte = Z
Plasma-KBr-Dichte minus LDL-KBr-Dichte = Y

$$\frac{0,3265 * Y}{Z} = \dots g / ml * VolumenFraktion1 = KBrMenge[g]$$

Der Wert Z gibt die Dichteerhöhung an, die durch Zugabe von 0,3265g KBr / ml Plasma entsteht.

In 8 Ultrazentrifugenröhrchen wird wie oben beschrieben die Light-KBr Lösung mit dem schweren LDL-KBr unterschichtet und mindestens 16h zentrifugiert (Zentrifuge und Rotor wie im Schritt 1). Die Lipidphase sammelt sich wieder am oberen Rand der Zentrifugenröhrchen.

Aus der gesammelten LDL-Fraktion 2 wird wieder eine 1ml Probe entnommen (LDL-KBr-Probe2) und dann die Menge an KBr errechnet, die nötig ist um die Fraktion 2 auf die Dichte von 1,15 einzustellen (Sollwert).

Rechnung:

$$\frac{(1,15 - Dichte_{LDL-Fraktion2}) * 0,3265}{Z} = \dots g / ml * VolumenFraktion2 = KBrMenge[g]$$

Z stellt wiederum die Dichteerhöhung dar, die durch Zugabe von 0,3265g KBr / ml Plasma entsteht.

In vier Ultrazentrifugenröhrchen wird nun eine KBr-Lösung mit der Dichte von 1,15g/ml mit dem LDL-KBr der Fraktion 2 unterschichtet und mindestens 16h zentrifugiert.

Nach dieser dritten und letzten Zentrifugation wird die Lipidphase wie gehabt gesammelt. Sie wird unter sterilen Bedingungen in einen Dialyseschlauch überführt und in 5l Dialysepuffer gegeben. Zum Schutz gegen oxidative Veränderungen ist im Dialysepuffer EDTA enthalten. Am selben Tag wird der Dialysepuffer noch einmal gewechselt.

An den drei folgenden Tagen muss der Dialysepuffer täglich einmal ausgetauscht werden. Anschließend wird das Dialysat durch einen 0,45µm Filter sterilfiltriert.

Die Bestimmung der Cholesterin-Konzentration des LDL erfolgt photometrisch (s.u.), das Lipid wird nun bei 4°C gelagert.

Puffer und Lösungen:

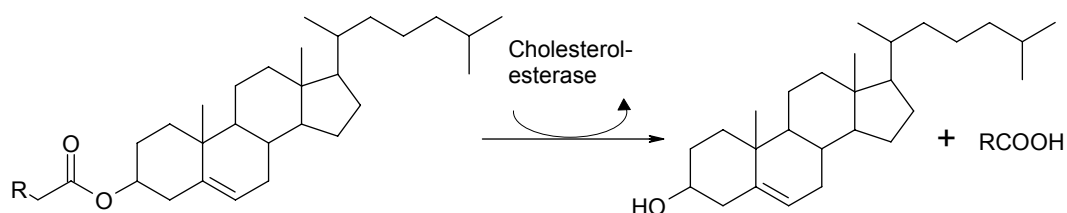
Light KBr-Lösung: 9g KBr auf 1l aqua dest. 20 ml verwerfen 20 ml 5% EDTA pH 7.0 hinzufügen	KBr-Lösung (Dichte: 1,15g/ml): 38,4g auf 200ml aqua dest. 5ml verwerfen 5ml 5% EDTA pH 7.0 hinzufügen
Dialysepuffer 44g NaCl 3g Tris-Base 0,465g EDTA * 2 H ₂ O ca. 4500ml aqua dest. hinzufügen pH auf 7,3-7,4 mit konzentrierter HCl einstellen auf 5l aqua dest. auffüllen	5% EDTA pH 7.0 12,5g EDTA 100ml aqua dest. pH 7.0 mit NaOH einstellen Mit aqua dest. auf 250ml auffüllen

3.18 Messung der Cholesterin-Konzentration

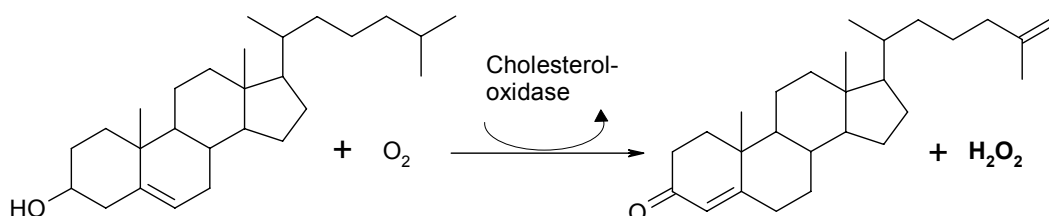
Die Messung des Cholesteringehalts in LDL bzw. E-LDL erfolgt mit dem Chol-reagenz der Firma Roche (#2016630).

Das Chol-reagenz enthält Cholesterinesterase, -oxidase, Peroxidase, 4-Aminophenazon und Phenol. 10µl LDL werden zu 1ml Reagenz pipettiert und 15 Min inkubiert. Dann folgt Messung der Absorption bei 546nm. Der Cholesteringehalt wird nach Firmenprotokoll berechnet.

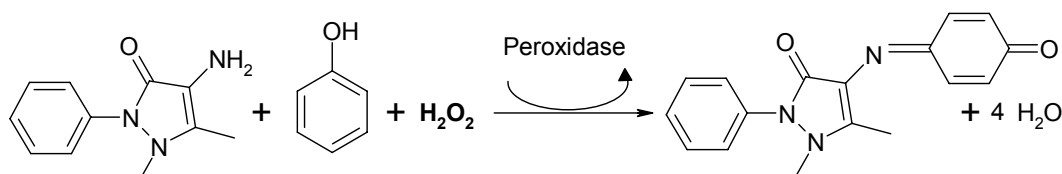
Die Methode basiert auf der Bestimmung von Δ^4 -Cholestenon nach enzymatischer Spaltung der Cholesterinester des LDL durch die Cholesterinesterase, Umsetzung des Cholesterins durch die Cholesterin-oxidase im reaktionsspezifischen Schritt und nachfolgender Bestimmung des hierbei entstehenden Wasserstoffperoxids.



Spaltung der Cholesterinester durch die Cholesterinesterase zu freiem Cholesterin und freien Fettsäuren



Die Cholesterinoxidase setzt Cholesterin mit Sauerstoff um zu Cholest-4-en-3-on und Wasserstoffperoxid



Das gebildete Wasserstoffperoxid reagiert mit 4-Aminophenazon und Phenol zu einem roten Farbstoff (4-(p-benzochinon-monoimino)-phenazon).

Die Farbintensität ist direkt proportional zur Cholesterin-Konzentration und kann photometrisch bestimmt werden.

3.19 Enzymatische Modifikation von LDL

Bei der enzymatischen Modifikation wird LDL zu E-LDL umgesetzt. 1ml LDL (Konz.: 3-5mg/ml) wird mit 6,7µl Trypsin (Konz.: 1mg/ml, Sigma) versetzt und über Nacht bei 37°C und leichtem Schütteln inkubiert. Hierbei wird die Proteinhülle des LDL aufgespalten. Am nächsten Tag wird die Reaktion durch Zugabe von 3,3µl Trypsininhibitor (Konz.: 1mg/ml, Sigma) gestoppt.

Nun werden 20µl Cholesterinesterase (Konz.: 2mg/ml) zugegeben und wieder über Nacht bei 37°C inkubiert. Bei dieser Reaktion werden die Cholesterinester in freies Cholesterin und freie Fettsäuren gespalten. Hierbei soll eine deutliche Trübung der Probe auftreten. Blieb diese aus, z.B. auf Grund von KBr-Resten im LDL wegen unzureichender Dialyse, wurden die Proben nicht verwendet. Das entstandene E-LDL wird auch als TC-LDL bezeichnet (Trypsin-Cholesterinesterase).

3.20 Flotieren von E-LDL: Herstellung von E-LDL(d4) und E-LDL(d10)

Der hohe Anteil an freien Fettsäuren verleiht dem E-LDL seine starke Toxizität. Durch Zusatz von fettsäurefreiem Humanalbumin und anschließender Flotation können die freien Fettsäuren aus E-LDL bzw. LDL entfernt werden. Somit reduziert sich die cytotoxische Wirkung des E-LDL.

Das Albumin wird in zwei verschiedenen Konzentrationen zugesetzt: 4% (m/v) und 10% (m/v). Bei letzterer Konzentration werden die freien Fettsäuren fast vollständig entfernt. Die entstehenden Lipoprotein-Präparationen werden als E-LDL(d4) bzw. E-LDL(d10) bezeichnet.

Die Inkubation mit Albumin erfolgt über 1 Stunde bei 37°C. Um das Albumin mit den gebundenen Fettsäuren wieder aus dem E-LDL zu entfernen, werden die Proben flotiert, d.h. es erfolgt eine Zentrifugation in einem Saccharose-Dichtegradient. Dabei sammelt sich das Lipid auf Grund seiner geringeren Dichte als Albumin an der Oberfläche der Flüssigkeit und kann dort abpipettiert werden.

Um den Dichtegradient herzustellen werden zunächst 0,6g Saccharose pro ml LDL zugegeben. Diese fast gesättigte Lösung wird in ein 5ml Ultrazentrifugenröhrchen gegeben und mit 2,5ml einer 25%-Saccharose/PBS-Lösung überschichtet. Dann wird nochmals überschichtet mit 500ml PBS. Hierbei ist jeweils darauf zu achten, dass sich die Schichten nicht mischen, so dass ein dreiphasiges System entsteht.

Zentrifugiert wird für E-LDL 4h bei 20°C und 35.000rpm. Bei höherer Umdrehungszahl bzw. niedrigerer Temperatur wird die flotierte Lipidphase zu fest und kann nur schwer abpipettiert werden. Bei der Flotation von LDL beträgt die Zentrifugationsdauer 16h.

Nach der Zentrifugation wird die Lipidphase, die sich als schmale Schicht an der Flüssigkeitsoberfläche gesammelt hat, abpipettiert und in ein Eppendorfröhrchen gegeben. Hierbei ist darauf zu achten, dass nicht zu viel der Saccharoselösung mit überführt wird. Falls die Lipidphase zu konzentriert abgenommen wurde, kann sie mit PBS verdünnt werden. Der Cholesteringehalt wird wie oben beschrieben gemessen.

3.21 Rekonstitution von flotiertem E-LDL(d4)/(d10)

Um einen Fettsäure-abhängigen Effekt von E-LDL bzw. flotiertem E-LDL(d4)/(d10) auf Zellkulturen zu verdeutlichen, werden die mittels Albumin entzogenen Fettsäuren wieder dazugegeben. In diesem Fall wurde nur mit Linolsäure rekonstituiert, da diese den Hauptanteil der freien Fettsäuren im E-LDL darstellt.

Zunächst wird die Differenz im Linolsäuregehalt zwischen E-LDL und E-LDL(d4) bzw. (d10) ermittelt. Dann wird ausgerechnet, welche Mengen an Linolsäure (freie Säure, Sigma) der jeweiligen Probe zugesetzt werden muss, um den Ausgangsgehalt zu erreichen.

	Linolsäure-Gehalt [nmol LA/mg Cholesterin]	Differenz [nmol]	Zusatz Linolsäure zu 1mg (Chol.) E-LDL(d4) bzw. E-LDL(d10)
E-LDL	1277		
E-LDL(d4)	479	798	0,25µl
E-LDL(d10)	38	1239	0,39µl

Berechnung: molekulare Masse LA = 280,4g
 1nmol / 280,4ng
 798nmol / x
 x = 223,76µg
 = 0,224mg

 d(LA) = 0,9 => 1ml / 900mg
 x / 0,224mg
 x = 0,00025ml
 = 0,25µl => zu 1mg (Cholesterin) E-LDL(d4)
 geben

Nach Zugabe der jeweiligen Menge Linolsäure werden die Proben 1 Stunde bei 37°C und leichtem Schütteln im Thermoblock inkubiert.

3.22 Oxidation von LDL

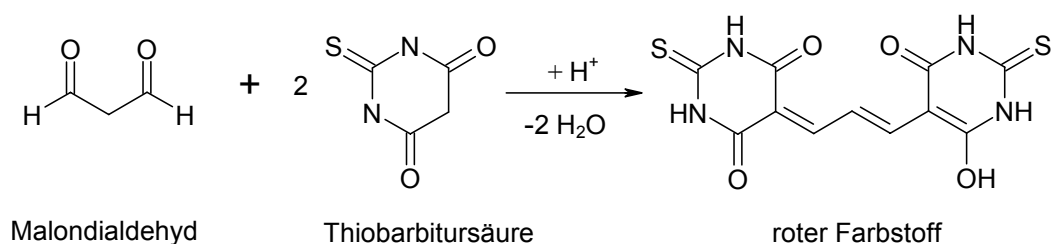
Zur Oxidation von LDL wird zunächst das im LDL enthaltene EDTA entfernt. Hierzu wird 1ml LDL über eine PD10-Säule gegeben und mit PBS eluiert. Die LDL-Fraktion soll möglichst konzentriert aufgefangen werden (nur die gelbe Hauptfraktion wird weiterverwendet), um zu große Verdünnungseffekte zu vermeiden. Diese wird nun in ein well einer 6-well Zellkulturplatte überführt, um eine große Oberfläche für die Oxidation zu erhalten. Als Oxidationsmittel wird Kupfersulfat in einer Endkonzentration von 25µM verwendet. Dazu wird eine 1M Stammlösung hergestellt, die vor Gebrauch 1:100 verdünnt wird. 2,5µl dieser Verdünnung werden zu 1ml LDL gegeben.

Inkubiert wird über Nacht bei 37°C im Brutschrank. Am nächsten Tag sollte die Probe hellgelb bis weißlich und trüb aussehen. Um das Kupfersulfat wieder aus dem LDL

zu entfernen wird die Probe nochmals über eine PD10-Säule gereinigt. Wieder wird nur die trübe Hauptfraktion möglichst konzentriert aufgefangen.

Überprüfung der Oxidation mittels TBAR-Methode

Bei der Oxidation von LDL bzw. Fettsäuren entstehen Malondialdehyd-Bruchstücke, die mit Thiobarbitursäure zu einem roten Polymethin-Farbstoff kondensieren. Diese Malondialdehyd-Bruchstücke werden als Thiobarbiturat-reaktive Substanzen bezeichnet (TBARs). Die Bestimmung der TBARs wurde nach dem Protokoll von Morel *et al.* durchgeführt (Morel *et al.*, 1983).



Für den TBAR-Assay wird in 1,5ml Schraubdeckelgefäßen folgender Reaktionsansatz hergestellt:

- 60µl Probe (LDL bzw. oxLDL, Standard oder PBS für Blank)
- + 0,6ml 20%ige Trichloressigsäure
- + 0,6ml 1% Thiobarbitursäure (gelöst in 0,5N NaOH)

Durch die Trichloressigsäure werden die vorhandenen Proteine ausgefällt. Die Proben werden nun 45 Minuten bei 95°C im Thermoblock gekocht. Darauf folgt eine Zentrifugation bei 10.000rpm für 20 Minuten. Die Absorption der Proben wird bei 532nm bestimmt.

Der Gehalt an Thiobarbiturat-reaktiven Substanzen im LDL bzw. oxLDL wird anhand einer Malondialdehyd-Standardkurve bestimmt.

Zur Erstellung der Standardkurve wird aus Malondialdehyd (Sigma; M=164,2g; d=0,997) eine 1M Stammlösung hergestellt: 1,64ml /10ml H₂O. Diese wird weiter verdünnt, um die jeweils benötigte Menge zu 1,2ml Reaktionsansatz (0,6ml TCA + 0,6ml Thiobarbitursäure) zu geben damit die gewünschten Endkonzentrationen von 10µM bis 10nM erreicht werden.

Endkonz.	Zusatz der jew. Verdünnung zu 1,2ml Ansatz	Verdünnung der Stammlsg.
10µM	1,2µl	1:100 (=> 10mM)
5µM	6µl	1:1000 (=> 1mM)
2,5µM	3µl	„
1µM	1,2µl	„
0,5µM	6µl	1:10.000 (=> 100µM)
0,25µM	3µl	„
0,01µM	1,2µl	„

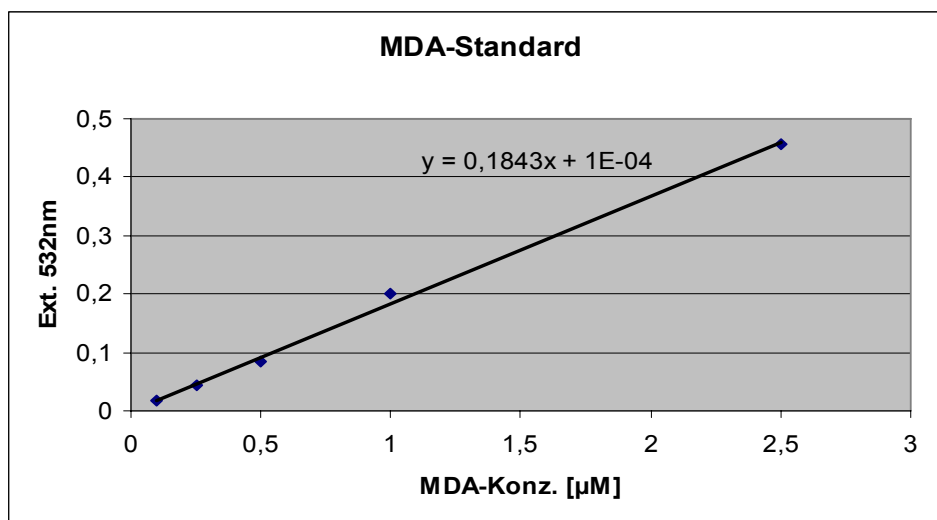


Abb. 14: MDA-Standardkurve

TBAR-gehalt in LDL, oxLDL und E-LDL:

	Ext. 532nm	MDA- Konz. [µM]	Protein mg/ml	Cholesterin mg/ml	Tbars [nmol]/mg Protein	Tbars [nmol]/mg Cholesterin
LDL	0,004	0,39	1,77	6,95	0,22	0,06
ox-LDL	0,116	12,54	1,32	1,71	9,50	7,34
E-LDL	0,008	0,82	3,09	5,6	0,27	0,15

LDL und E-LDL enthalten keine Thiobarbiturat-reaktiven Substanzen. OxLDL jedoch weist einen deutlichen Gehalt an TBARs auf (9,5 nmol/mg Protein).

3.23 Zellkulturen

Die Behandlung von Zellkulturen fand an einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank der Klasse II statt (Lamina Flow). Es wurden nur sterile Materialien bzw. autoklavierte Flüssigkeiten verwendet.

Eahy926, 293, Cos7, HeLa, HaCat –Zellen:

Die Zellen werden in DMEM kultiviert. Das Medium enthält 10% FCS und Pen/Strep. Zur Kultur werden T75 Flaschen verwendet. Bei Erreichen von Konfluenz werden die Zellen im Verhältnis 1:4 bzw. je nach Bedarf geteilt.

Die Zellen werden im Brutschrank kultiviert bei einer Temperatur von 37°C und 5% CO₂.

Passagieren der Zellen

Beim Teilen der Zellen wird zunächst das Medium abpipettiert und die Zellen mit 10ml PBS gewaschen. Dieser Waschschrift muss gründlich durchgeführt werden, denn verbleibende Mediumreste würden die folgende Trypsinreaktion stören. Nach Entfernen des PBS werden 1-3ml Trypsin/EDTA-Lösung in die Flasche gegeben und die Zellen kurz im Brutschrank inkubiert. Nach wenigen Minuten lösen sie sich vom Boden ab. Es werden 10ml FCS-haltiges Medium dazugegeben um das Trypsin zu inaktivieren.

2,5 ml der Zellsuspension werden in eine neue Zellkulturflasche gegeben. Nach Zugabe von 15ml Medium werden die Zellen weiterkultiviert. Alle Flüssigkeiten wurden vor Behandlung der Zellen auf 37°C erwärmt.

Aussäen von Zellen für einen Versuch

Zur Vorbereitung eines Versuches werden die Zellen am Vortag in Zellkulturplatten ausgesät und adhären über Nacht in Medium mit FCS. Um am nächsten Tag 90-100% Konfluenz zu erhalten, werden z.B. 6×10^5 Zellen pro well in eine 6-well Platte gegeben.

Zellkulturplatte	Anzahl Zellen pro well für 100% Konfluenz	Anzahl Zellen pro well für 50% Konfluenz (z.B. für Transfektion)	Volumen
6-well	6×10^5	$2-3 \times 10^5$	3ml
24-well	3×10^5	$1-1,5 \times 10^5$	500µl
96-well	2×10^4	1×10^4	100µl
2-well Chamberslide	4×10^5	$1-2 \times 10^5$	1ml
8-well Chamberslide	5×10^5	-	250µl

THP-1 Zellen

Die THP-1 Zellen werden in RPMI 1640 -Medium (Zusätze: 10% FCS, 20mM HEPES, 2mM Glutamin, Pen/Strep) kultiviert und ca. jeden dritten Tag geteilt. Die Zellkulturflaschen werden stehend gelagert.

Humane Aorten-Endothelzellen (HAoEC)

Die HAoECs wurden nach Anleitung der Firma PromoCell kultiviert. Kurz vor Erreichen von Konfluenz wurden die Zellen geteilt.

3.24 Allgemeine Durchführung zur Gewinnung von Proben für Western Blots

Zur Proteinanalyse mittels Western Blot wurden am Vortag des Experiments 6×10^5 Zellen in 6-well Platten ausgesät, so dass am Tag der Behandlung 90-100% Konfluenz vorlag.

Behandlung von Zellen mit Lipoproteinen oder alpha-Toxin

Die Behandlung mit E-LDL, oxLDL und LDL erfolgte in 1ml normalem Medium mit einer Endkonzentration von 100µg/ml. Alpha-Toxin wurde in einer Konzentration von 200ng/ml zugegeben.

Ernten der Zellen

Nach der Behandlung wurde das Medium abgezogen und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Dann wurden 100µl 2x Probenpuffer zugegeben, die Zellen mit einem Zellscraper abgekratzt, in ein beschriftetes Eppendorfröhrchen überführt und 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Die Aufbewahrung der Proben erfolgte bei -20°C.

3.25 Allgemeine Durchführung einer transienten Transfektion

Transiente Transfektionen wurden mittels Lipofektin® (Invitrogen) durchgeführt. Lipofektin ist eine 1:1 Mischung zweier kationischer Lipide. Die negativ geladene Plasmid-DNA lagert sich in die Fächerstruktur des Liposoms ein und kann so in Form eines Lipid-DNA Komplexes durch die Zellmembranen transportiert werden.

Die Transfektion wurde zunächst in verschiedenen Zellkulturlinien durchgeführt. Die Transfektionseffizienzen waren sehr starken Schwankungen unterlegen. Am besten transfizieren ließen sich 293-, HeLa- und Cos7-Zellen. Bei den 293 Zellen bestand allerdings das Problem, dass sie sich sehr schnell von der Zellkulturplatte ablösten und es zu starken Zellverlusten kam. Dies war natürlich keine gute Voraussetzung für eine Western-Blot Analyse. Infolge dessen wurden nur noch Cos7 Zellen verwendet, welche während des gesamten Versuchs adhärent blieben.

3.25.1 Transfektion von Plasmid-DNA für Western-Blot bzw. Immunfluoreszenz-Analysen

Bei der Vorbereitung eines Transfektionsversuchs wurden die Zellen so ausgesät, dass am Tag der Transfektion 50% Konfluenz vorlag. Die Zellen durften nicht dichter ausgesät werden, da sie erst 48h nach Transfektion behandelt und geerntet wurden. Zur späteren Analyse in Western-Blots wurde in 6-well Zellkulturplatten transfiziert, für die Durchführung von Immunfluoreszenz-Analysen in 2-well Chamberslides.

Die Transfektion wurde entsprechend dem Firmenprotokoll durchgeführt. Als serumfreies Medium diente OptiMEM.

Mengenverhältnisse für einen Transfektionsansatz:

	Lösung A Plasmid-DNA	Lösung B Lipofektin	Gesamt- volumen
6-well Zellkulturplatte	1-2µg in 100µl OptiMEM	10µl in 100µl OptiMEM	1ml
2-well Chamberslide	0,5µg in 50µl OptiMEM	5µl in 50µl OptiMEM	0,5ml

Zunächst wird die entsprechende Menge Plasmid-DNA in 100 bzw. 50µl OptiMEM gegeben. Für die Durchführung von mehr als einer Transfektion wird ein Vielfaches dieses Ansatzes hergestellt (Lösung A).

Dann wird die entsprechende Menge Lipofektin in 100 bzw. 50µl OptiMEM gegeben. Auch hier wird je nach Anzahl der Transfektionen ein Vielfaches dieser Lösung angesetzt (Lösung B). Diese Mischung muss 45 Minuten bei Raumtemperatur stehen bleiben, damit sich das Lipofektin entfalten kann.

Währenddessen werden die zu transfizierenden Zellen einmal mit serumfreiem Medium (OptiMEM) gewaschen.

Anschließend werden Lösung A und B gemischt und zusammen 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In diesem Schritt lagert sich die Plasmid-DNA in die Liposomen ein. Zu diesem Transfektionsgemisch werden pro Ansatz 800 bzw. 400µl OptiMEM gegeben. Nach vorsichtigem Mischen wird jeweils 1ml (6-well Platten) bzw. 0,5ml (Chamberslides) der Mischung pro well auf die Zellen gegeben.

Die Zellen werden nun über Nacht (16-24h) im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wird das Medium gewechselt und 3ml normales DMEM (10% FCS, P/S) pro well zugegeben. 48h nach Transfektion haben die Zellen genügende Mengen des Proteins exprimiert, sie können jetzt behandelt bzw. fixiert werden.

3.25.2 Transfektion von Reporterplasmiden

Für die Transfektion der Reporterplasmide pNF- κ B-Luc und pAP1-Luc wurden 24-well Zellkulturplatten verwendet. $1-1,5 \times 10^5$ Zellen (Eahy926 bzw. J774-Zellen) wurden pro well ausgesät, so dass am Tag der Transfektion 50% Konfluenz vorlag. Als Transfektionsmittel diente ebenfalls Lipofektin. Transfiziert wurde 400ng Reporterplasmid pro well unter Verwendung von 1 μ l Lipofektin in einem Gesamtvolumen von 300 μ l. Bei den Cotransfektionsversuchen wurde zusätzlich 80ng FlagASK1, HA-pp5 oder Kontroll-plasmid (pcDNA3) zugegeben. Dadurch kommt ein Verhältnis von Reporterplasmid zu FlagASK1 von 5:1 zustande. Je nach Anzahl der Transfektionen wurden Vielfache der Lösung A und B angesetzt. Die Herstellung des Transfektionsgemisches entspricht der obigen Beschreibung.

Mengenverhältnisse für einen Transfektionsansatz (24-well Platten):

	Lösung A	Lösung B	Gesamt- volumen
Einfache Transfektion	400ng Reporter 25 μ l OptiMEM	1 μ l Lipofektin / 25 μ l OptiMEM	300 μ l
Cotransfektion	400ng Reporter +80ng FlagASK1 25 μ l OptiMEM	1 μ l Lipofektin 25 μ l OptiMEM	300 μ l

Die Zellen wurden ebenfalls über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und 500ml DMEM (10% FCS, P/S) zugeben. 16 oder 48h nach Transfektion konnten die Zellen behandelt werden. Anschließend erfolgte Luciferase-Messung (s.u.).

3.25.3 Transfektion von siRNAs

A) Cotransfektion mit FlagASK1

Für die transiente Ausschaltung von ASK1 wurden chemisch synthetisierte siRNA's der Firma Ambion bestellt. Deren Funktion wurde mittels Cotransfektion mit FlagASK1 im Western Blot überprüft. Die Transfektion fand in 6-well Zellkulturplatten statt. Als Transfektionsmittel wurde Lipofektin verwendet.

Transfiziert wurde 100ng FlagASK1 alleine sowie 100ng FlagASK1 mit der jeweiligen siRNA bzw. Negativ-Kontrolle in einer Endkonzentration von 100nM. Weiterhin wurde 100ng FlagASK1 mit einem Mix der siRNAs #1, 3 und 5 in einer Gesamtkonzentration von 100nM transfiziert, um zu sehen, ob sich mehrere gleichzeitig eingesetzte siRNAs in ihrer Wirkung verstärken.

Folgende Mengen wurden transfiziert:

	Stock-Lösung	Transfizierte Menge	Endkonzentration in 1ml Volumen
FlagASK1	2,81mg/ml Maxipräp	6µl 1:100 Verd.	100ng/ml
siRNA#1, 3, 5 einzeln	je 100µM	je 1µl	100nM
siRNA# 1, 3, 5 zusammen	je 100µM	je 0,33µl	insgesamt 100nM
Negativ-Kontrolle	50µM	2µl	100nM

Lösung A besteht aus 100ng FlagASK1 mit/ohne siRNA's und 180µl OptiMem. Die Lösung B setzt sich aus 1µl Lipofektin und 20µl OptiMem zusammen, hiervon wird ein Vielfaches hergestellt. Das Gesamtvolumen beträgt 1ml.

Der weitere Verlauf der Transfektion entspricht der oben genannten Beschreibung. Die Zellen werden 48h nach Transfektion geerntet.

B) Transfektion ohne FlagASK1

Western-Blot p38:

Die Transfektion der siRNA's alleine wurde ebenfalls mit einer Endkonzentration von 100nM durchgeführt. Die drei siRNA's werden zu gleichen Teilen gemischt, d.h. 0,33µl jeder einzelnen siRNA für einen 1ml Ansatz.

Caspase-Assay:

In einem Volumen von 100µl pro well in 96-well platten wurden die siRNA's als Mix mit einer Endkonzentration von 100nM transfiziert.

3.26 Allgemeine Durchführung zur Gewinnung von Proben für Immunpräzipitationen

Um eine Immunpräzipitation durchzuführen wurden die Zellen in T75-Zellkulturflaschen ausgesät, so dass am Tag der Behandlung 90-100% Konfluenz vorlag. Die Behandlung erfolgte in 10ml Medium. Nach der Behandlung wurde das Medium abpipettiert und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Hierbei war es wichtig, das PBS vollständig wieder zu entfernen, um Verdünnungseffekte auszuschließen. Nach Zugabe von 600µl Lysispuffer (z.B. RIPA-puffer, s.o.) wurden die Flaschen 10 Minuten auf Eis gelegt. Die lysierten Zellen wurden sodann in ein Eppendorfröhrchen überführt und 10 Minuten bei 10000rpm und 4°C zentrifugiert. 600µl des Zellüberstands wurden in neue Eppendorfröhchen pipettiert (Lagerung der

Proben während dem Pipettieren auf Eis). Aus diesem Zellüberstand kann nun die Präzipitation des gewünschten Proteins stattfinden.

Um zu überprüfen, ob jeweils gleiche Mengen des zu präzipitierenden Proteins im Lysat vorhanden sind, werden 50µl jeder Lysat-probe mit 10µl 5xProbenpuffer versetzt und 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Außerdem kann auch eine Proteinbestimmung der Lysat-proben erfolgen.

Durchführung der Immunpräzipitation

Nach Lyse der Zellen und Zentrifugation (s.o.) wurde zunächst ein Preclearing durchgeführt. Dazu wurden 1µg des jeweiligen antigens (beliebiger mouse-oder rabbit-Antikörper) sowie 10µl Protein A/G Plus Agarose zu 600µl Lysat gegeben und 30Minuten bei 4°C geschüttelt. Dieser Schritt dient dazu, Substanzen aus dem Lysat zu entfernen, die sich an das Antigen bzw. die Agarose-Matrix binden und die eigentliche Präzipitation stören würden.

Nach Zentrifugation bei 10000rpm und 4°C werden 550µl Überstand in ein neues Eppendorfröhrchen überführt. Daraus wird nun das gewünschte Protein präzipitiert.

Zunächst wird 1µg Antikörper gegen das Protein hinzugegeben (eine Probe wird ohne Zugabe des ersten Antikörpers weiterbehandelt; = negativ-Kontrolle der Präzipitation). Die Lysate werden 1h bei 4°C unter Schütteln inkubiert.

20µl Protein A/G Plus Agarose werden pro Lysat hinzugefügt. Die Präzipitation erfolgt nun über Nacht bei 4°C und Schütteln.

Am nächsten Tag werden die Proben für 5 Minuten zentrifugiert bei 5000rpm, 4°C. Die Pellets werden nun 2x mit Lysis-puffer und 2x mit PBS gewaschen, wobei zwischendurch die Zentrifugation wie oben wiederholt wird. Nach dem letzten Zentrifugieren wird das PBS vollständig entfernt und die Pellets in 60µl 2x Probenpuffer aufgenommen. Nach 5 Minuten denaturieren bei 95°C werden die Proben bei -20°C gelagert.

3.27 Allgemeine Durchführung von Westernblots

Der Western Blot ist ein spezifischer Nachweis von Antikörpern durch deren Bindung an elektrophoretisch aufgetrennte Proteine.

Die Proteine werden im elektrischen Feld in Gegenwart des anionischen Detergens SDS (Natriumdodecyl-Sulfat) nach Molekularmasse aufgetrennt. Dabei binden die Proteine SDS zu negativ-geladenen SDS-Protein-Komplexen mit konstantem Ladungs-zu Masse Verhältnis (1,4g SDS/g Protein in 1% SDS-Lösungen). SDS denaturiert die Proteine - besonders nach vorheriger Reduktion mit Mercaptoethanol (Probenpuffer) - und unterbindet Protein-Protein-Wechselwirkungen (Quartärstrukturen). Die Protein-SDS-Komplexe wandern im elektrischen Feld in Richtung Pluspol.

Als Gelelektrophoresesystem wird ein Polyacrylamid-Gel in Tris-Puffern verwendet. Polyacrylamid bildet ein Gel, das chemisch inert und ungeladen ist. Ein Sammelgel (Tris-Puffer pH 6,8; 3% Acrylamid) überschichtet ein Trenngel (Tris-Puffer pH 8,8; 7,5-10% Acrylamid).

Für die Analyse von Proteinen bis zu 100kD (z.B. p38, JNK...) wurde ein 10%-Acrylamidgel verwendet, für größere Proteine bis 200kD (z.B. ASK1) ein 7,5%-Acrylamidgel.

Rezeptur für die Herstellung von Trenn-und Sammelgel:

	Sammelgel	Trenngel	
		7,5%	10%
Tris-Glycin-Puffer 4x	1,25ml (pH 6,8)	1,9ml (pH 8,8)	1,9ml (pH 8,8)
Acrylamid	0,65ml	1,9ml	2,5ml
Aqua dest.	3,1ml	3,75ml	3,1ml
AP	30µl	30µl	
TEMED	7,5µl	15µl	

Nach Mischen von Puffer, Acrylamid und Wasser wird zunächst das Ammoniumperoxodisulfat (AP) zugesetzt. AP bildet in Wasser gelöst freie Radikale, die das Acrylamid aktivieren und auf diese Weise zur Polymerisierung beitragen. Das im nächsten Schritt zugegebene TEMED funktioniert als Katalysator.

Zuerst wird das Trenngel gegossen und mit einer 50% Isopropanol-lösung überschichtet, um eine gerade Oberfläche zu bekommen. Nach 20min ist die Polymerisierung vollendet. Das Isopropanol wird mit Wasser gewaschen. Auf gleiche Art wie das Trenngel wird die Sammelgel-Mischung mit AP und TEMED versetzt und über das Trenngel gegossen. Je nach Anzahl der Proben wird ein entsprechender Kamm (8, 10, 12 oder 13 Taschen) eingesetzt. Das Sammelgel sollte mindestens 30 Minuten polymerisieren, bevor der Kamm wieder entfernt wird. Das Gel wird nun in die Gelelektrophoreseapparatur eingebaut.

Vor dem Auftragen auf das Gel müssen die Proben 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht werden. Da die Zellen komplett in Probenpuffer aufgenommen wurden, kommt es zu einer schleimigen Konsistenz auf Grund von DNA bzw. RNA-Bestandteilen. Durch das Aufkochen wird diese vermindert und es kommt nicht zu verzerrten Banden.

Eine Zuordnung des Molekulargewichtes erfolgt durch einen Marker wie z.B. Magic-Marker (Invitrogen), Roti-Mark (*prestained*), oder ein biotinylierter Marker (Cell Signaling Technology).

Nachdem sich alle Proben auf dem Gel befinden wird für ca. 60Min ein elektrisches Feld von 20mA erzeugt.

Blotten

Die aufgetrennten Proteine werden nun aus dem Gel auf die Nitrocellulose-Membran, eine Protein-bindende Membran, transferiert, wobei dieser Transfer wiederum in einem elektrischen Feld abläuft.

Man tränkt drei Whatman-Filterpapierchen mit dem Blot-Puffer, überschichtet diese mit der Nitrocellulosemembran, darüber folgt das Gel und schließlich weitere drei getränkte Whatman-Filterpapiere. Nun wird je nach Größe des zu untersuchenden Proteins eine Spannung für 60 Minuten angelegt wodurch die getrennten Proteine aus dem Gel wandern und durch nichtkovalente Kräfte auf der Membran fixiert werden.

Proteingröße	milliAmpere (für 1 Membran)	Zeit
40-60 kD (z.B. p38, JNK, pp5, ERK,)	60mA	60 Min
80-100 kD (p85-PARP-Fragment)	80mA	60 Min
150 kD (z.B. ASK1)	120mA	60 Min

Wenn zwei Membranen gleichzeitig geblottet wurden, verdoppelt sich die anzulegende Stromstärke.

Als Kontrolle für den Blot-Vorgang wird eine Ponceau-rot-Färbung durchgeführt, die alle auf die Membran geblotteten Proteine anfärbt. Dies ist auch eine Kontrolle für das gleichmäßige Auftragen der Proben bzw. den gleichmäßigen Proteingehalt der Proben. Die angefärbten Membranen wurden kurzzeitig in Kopierfolie eingeschlagen und fotokopiert.

Blocken

Bevor nun der Antikörper gegen das zu untersuchende Protein angewendet wird, müssen erst alle unspezifischen Bindungsstellen auf der Nitrocellulose-Membran abgesättigt werden. Dies geschieht durch Inkubation der Membran in einer 5% Milchpulver/TBST-Lösung für 1h unter Schütteln.

Inkubation mit dem Primär-Antikörper

Die Membran wird mit dem spezifischen Antikörper in der jeweils benötigten Verdünnung (s.o.) in einer 5%-BSA/TBST-Lösung über Nacht bei 4°C und leichtem Schütteln inkubiert. Darauf folgt 3x waschen für je 10 Minuten in TBST.

Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper

Der zweite Antikörper, der sich gegen die jeweilige Spezies des ersten Antikörpers richtet, wird in der entsprechenden Verdünnung in 0,1% Milchpulver/TBST hergestellt. Bei Verwendung des biotinylierten Markers wird zusätzlich ein anti-Biotin-HRP Antikörper in einer 1:1000 Verdünnung hinzugefügt. Die Inkubation erfolgt 1h bei Raumtemperatur unter Schütteln. Anschließend wird die Membran wieder 3x für 10 Minuten gewaschen in TBST.

Entwicklung

Für die Entwicklung der Western Blots wurde das BM chemiluminescence Blotting Substrate (POD) von Roche verwendet. Die Peroxidase des zweiten Antikörpers katalysiert die Oxidation von Luminol unter Freisetzung von Licht.

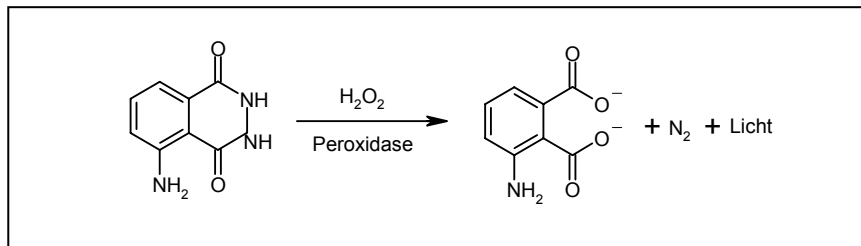


Abb. 15: Chemilumineszenz-Reaktion

Die Entwicklung der Filme (Kodak) fand unter Rotlicht statt, verwendet wurden Entwickler und Fixierer ebenfalls von Kodak.

Stripping

Viele der Western-Blots zeigen nach E-LDL Behandlung verschiedene MAP-Kinasen im aktivierten, d.h. phosphoryliertem Zustand. Um zu beweisen, dass im Vergleich zu unbehandelten Zellen gleich viel Protein in jeder Probe vorhanden war, wurde ein Stripping des Blots vorgenommen und die Membran anschließend mit dem Antikörper gegen die unphosphorylierte MAP-Kinase inkubiert.

Hierfür gab man ca. 30ml Stripping-Puffer auf die Membran, die dann 30Min im 50°C warmen Wasserbad geschüttelt wurde. Das im Puffer enthaltene Mercaptoethanol entfernt die Antikörper von der Membran. Nach 2x waschen mit TBST für je 15 Min wurde die Membran wieder 1Stunde geblockt mit Milchpulver (s.o.). Anschließend konnte erneut Inkubation mit dem ersten Antikörper – jetzt gegen die unphosphorylierte MAP-Kinase – stattfinden.

Quantifizierung der Banden in Western Blots

Für die Quantifizierung der Banden wurde das BioDoc Analyse-Programm von Biometra verwendet.

3.28 Allgemeine Durchführung der Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz-Experimente wurden in *2-well* oder *8-well* chamberslides durchgeführt.

Die Anzahl der auszusäenden Zellen pro well richtete sich danach, ob die Zellen transfiziert werden sollten oder nicht (s.o.). Die Zellen adhärten über Nacht und wurden am nächsten Tag behandelt/transfiziert. Beim Aussäen war zu beachten, ein zusätzliches *well* mitzuberechnen, das als Kontrolle der Färbung nur mit dem zweiten Antikörper alleine inkubiert werden soll.

Fixieren der Zellen

Das Fixieren von Zellen kann mit organischen Lösungsmitteln (Methanol, Ethanol) durchgeführt werden. Hierbei wird den Zellen Wasser entzogen. Eine weitere Fixiermethode stellt das „*cross-linking*“ mit Formaldehyd dar, wobei Verknüpfungen zwischen Proteinen entstehen und somit die Struktur fixiert wird. Hierbei bleibt normalerweise die Zellstruktur besser erhalten als bei der Fixierung mit Methanol,

allerdings müssen die Zellen noch durch Zugabe eines nichtionischen Detergenz (z.B. TritonX-100) oder durch Methanol permeabilisiert werden.

Es wurden beide Methoden ausprobiert; die besten Ergebnisse lieferte die Fixierung mit Methanol und anschließender Behandlung der Zellen mit TritonX-100.

Nach der Behandlung der Zellen in normalem Medium wurden die Zellen zunächst 1x mit PBS gewaschen. Anschließend wurden sie für 7 Minuten fixiert in Methanol bei Raumtemperatur. Nach wiederholtem waschen mit PBS wird eine 0,1% TritonX-100/PBS-Lösung für 7 Minuten auf die Zellen gegeben. Anschließend wurde wieder mit PBS gewaschen.

Blocken der Zellen

Um unspezifische Anlagerung sowohl des ersten als auch des zweiten Antikörpers an Zellproteine zu minimieren, werden die Zellen 1h in einer 3%-BSA/PBS Lösung geblockt. 500µl dieser Lösung werden pro well eines 2-well Chamberslides hinzugegeben. Das Blocken erfolgt bei Raumtemperatur und leichtem Schütteln.

Inkubation mit erstem Antikörper

Die Zugabe des ersten Antikörpers erfolgt in einer 1:500 Verdünnung in 1%-BSA/PBS. Die Zellen wurden 1h unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen, die als Kontrolle der Färbung nur mit dem zweiten Antikörper alleine behandelt werden sollten, wurden mit 1ml der 1%-BSA/PBS Lösung versehen. Nach der Inkubation wurde 2x mit je 1ml PBS gewaschen.

Inkubation mit zweitem Antikörper

Der zweite Antikörper wurde in einer 1:500 Verdünnung (in PBS) eingesetzt. Die Inkubation erfolgte 1h im Dunklen unter leichtem Schütteln. Danach wurde wieder 2x mit je 1ml PBS gewaschen.

DAPI-Färbung der Zellkerne

Um die Zellkerne anzufärben bzw. den Anteil der transfizierten Zellen zur Gesamtzellzahl bestimmen zu können, wurde eine DAPI-Färbung durchgeführt. DAPI (4', 6-Diamidino-2-Phenylindol) wird in einer Endkonzentration von 1µg/ml (in PBS) eingesetzt. Dieser Farbstoff lagert sich an die DNA im Zellkern an.

Anschließend werden die Zellen wieder 2x mit PBS gewaschen.

Eindecken der Zellen

Das PBS des letzten Waschschrtes wird vollständig entfernt. Das Plastik-Oberteil der Chamberslides wird entfernt. Nach kurzem Antrocknen der Zellen wird ein Tropfen Fluopräp aufgetragen und ein Deckgläschen aufgelegt. Die fertigen Präparate werden im Dunkeln gelagert, um ein Ausbleichen der Färbung zu verhindern.

Mikroskopiert wird an einem Fluoreszenz-Mikroskop von Zeiss.

3.29 Allgemeine Durchführung der ATP-Messung

ATP-Messungen wurden durchgeführt, um den zytotoxischen Effekt von E-LDL auf Zellkulturen zu verdeutlichen und zu quantifizieren. Durch Vorinkubation mit dem p38-Inhibitor SB203580 sollte gezeigt werden, dass der zytotoxische Effekt abhängig ist von p38.

In 96-well Zellkulturplatten wurden Eahy926-Zellen mit 90-100% Konfluenz ausgesät (2×10^4 Zellen pro well). Sie adhärten über Nacht. Am nächsten Tag wurden die Zellen zunächst 2h vorinkubiert mit dem p38-Inhibitor SB203580 ($20 \mu\text{M}$). Als Kontrolle diente die entsprechende Menge DMSO. Dann folgte die Behandlung mit $100 \mu\text{g/ml}$ E-LDL, oxLDL und LDL in serumfreiem Medium für 1h. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Wiederum erfolgte Zugabe von SB bzw. DMSO. Anschließend wurde das Medium abgezogen und $100 \mu\text{l}$ DMEM mit 1% FCS pro well hinzugefügt. Wiederum wurde SB bzw. DMSO zugesetzt und nun 3 Stunden inkubiert. Es wurden jeweils Doppelwerte angesetzt, die in mindestens 3 Wiederholungen bestätigt wurden.

Nach der Behandlung wurde das Medium abgezogen und die Zellen mit $100 \mu\text{l}$ 1% TritonX-100 *in situ* lysiert durch kräftiges Auf- und Niederpipettieren. Der ATP-Gehalt wurde sofort mittels Luciferase-Assay ermittelt.

Dabei legte man $150 \mu\text{l}$ Wasser in ATP-röhrchen vor und gab $10 \mu\text{l}$ Zelllysate und $10 \mu\text{l}$ ATP-Substrat (ATP-Bioluminescence Assay Kit; Roche CLS II) hinzu. Nach kurzem vortexen wurde sofort gemessen (10s Integrations-modus, Berthold-Lumat LB 9507).

Dieser Assay basiert auf der ATP-Abhängigkeit der Luciferase-katalysierten Oxidation von Luciferin. Mit dieser Methode können schon extrem geringe Mengen an intrazellulärem ATP detektiert werden.

3.30 Allgemeine Durchführung der Luciferase-Messung

Eahy926- bzw. J774-Zellen wurden wie oben beschrieben mit den Reporterplasmiden pNF κ B-Luc und pAP1-Luc transfiziert. 24h bzw. 48h nach Transfektion wurden die Zellen über Nacht behandelt mit $75-100 \mu\text{g/ml}$ E-LDL bzw. LDL.

Nach Absaugen des Mediums mit einer Wasserstrahlpumpe und 1x waschen mit PBS gab man $200 \mu\text{l}$ Cell Culture Lysis Reagent (aus Kit; 1:5 in Wasser verdünnen) pro well dazu. Nach 5 Minuten Inkubation auf der Schüttelbank wurden die Lysate in Eppen-dorfröhrchen überführt und 3 Minuten bei 10000rpm zentrifugiert.

Zur Messung der Luciferaseaktivität wurde in ATP-röhrchen $100 \mu\text{l}$ Luciferase-Substrat vorgelegt. Dazu wurden $10-20 \mu\text{l}$ des Zelllysats gegeben, kurz gevortext und sofort gemessen (10s Integrations-modus; Berthold Lumat LB 9507). Es ist wichtig, die Schüttelzeiten bei jeder Probe gleich zu halten, denn die Luciferaseaktivität lässt schon nach kurzer Zeit stark nach.

Für einen Blank-wert wurde entsprechend mit 10 oder $20 \mu\text{l}$ Lysispuffer verfahren.

Folgende Reaktion läuft bei der Luciferase-Messung ab:

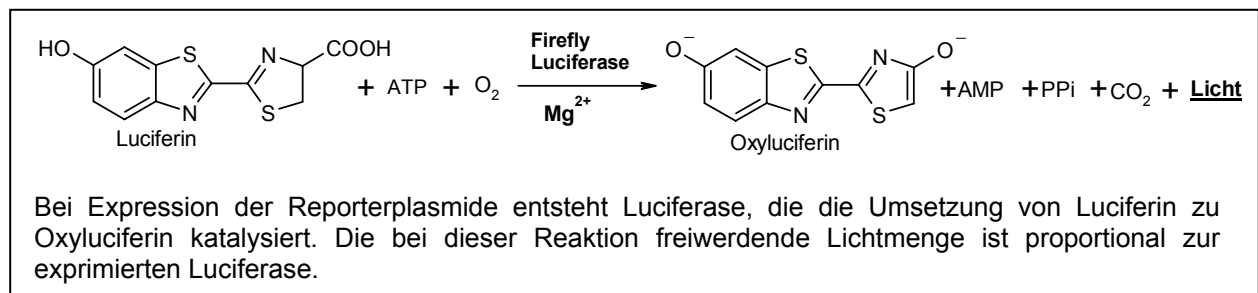


Abb. 16: Luciferase-Assay

3.31 Caspase-Assay

Dieser Assay diente dazu, die Aktivierung von Caspase 3/7 in Endothelzellen durch E-LDL in Abhängigkeit von p38 zu zeigen.

Das Protokoll der Behandlung mit SB, E-LDL und LDL und der anschließenden Inkubation in DMEM mit 1% FCS entspricht dem der ATP-Messung (s.o.).

Es wurden immer so viele Zellen ausgesät, dass aus der einen Hälfte der Caspase-Assay durchgeführt werden konnte bzw. von der anderen Hälfte der ATP-Gehalt ermittelt werden konnte.

Nach der 3h-Inkubation in DMEM mit 1%FCS wurden 100µl Caspase-Glo™3/7-Reagenz (Promega) pro well zugegeben und 1h bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Insgesamt befinden sich jetzt 200µl Flüssigkeit in jedem well. Davon werden zur Chemilumineszenz-Messung 180µl in eine schwarze 96-well Zellkulturplatte überführt. Die Messung erfolgt im 10s-Integrationsmodus mit einem Berthold-Luminometer.

Der Caspase-Glo™3/7- Assay mißt die Aktivität der Caspasen 3 und 7, die eine Tetrapeptid-sequenz Z-DEVD von einem prälumineszierenden Substrat abspalten. Das freigesetzte Produkt (Aminoluciferin) dient wiederum als Substrat für die Luciferase, die es in der folgenden Reaktion zu einem chemilumineszierenden Endprodukt umsetzt. Die Lumineszenz ist proportional zu der Höhe der Caspase-Aktivität.

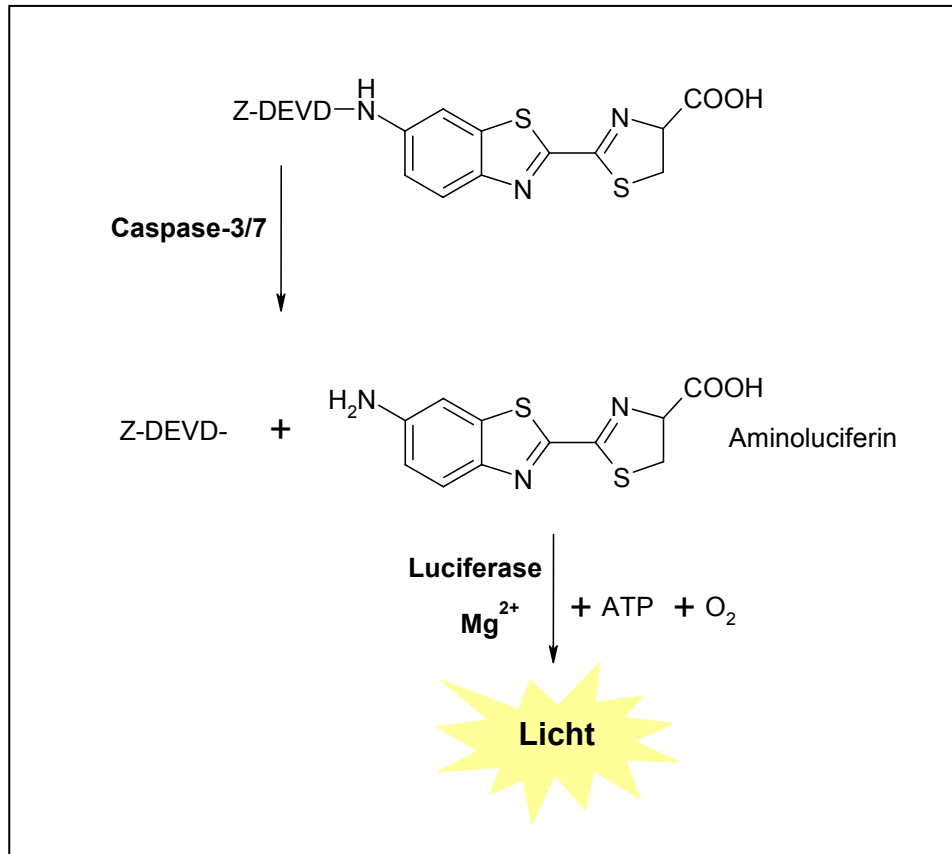


Abb. 17: Caspase-Assay

3.32 Caspase-Färbung

Die Caspase-Färbung wurde mit dem Chemicon CaspaTag Caspase-3/7 in situ Assay Kit (#APT423) durchgeführt.

Dieser Assay basiert auf **Fluorochromen Inhibitoren** von **Caspasen** (FLICA). Diese Inhibitoren sind zellpermeabel und nicht cytotoxisch. In der Zelle bindet der Inhibitor kovalent an eine reaktive Cystein-Stelle der aktivierten Caspase und produziert eine grüne Fluoreszenz. Hierbei wird eine weitere Aktivierung der Caspase verhindert. Ungebundener Farbstoff wird beim Waschen wieder entfernt. Das grüne Fluoreszenz-Signal dient als direkter Messwert der Menge an aktivierter Caspase 3 und 7 in der Zelle zum Zeitpunkt der Zugabe des Inhibitors.

Ca. 4×10^5 HaCat bzw. Eahy926-Zellen wurden in 6-well Zellkulturplatten auf Deckgläschen ausgesät. Sie adhärten über Nacht in normalem Medium. Am nächsten Tag fand die Behandlung statt mit 100µg/ml E-LDL (10 Minuten). Nach der Behandlung wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen. Daraufhin verdünnte man das FLICA-Caspase-Substrat 1:150 in Medium und pipettierte 50µl direkt auf die Deckgläschen. Das Substrat wurde deshalb so sparsam eingesetzt, weil es sehr teuer ist. Nach 1h Inkubation im Brutschrank wurde 2x gewaschen und die Zellen in Methanol fixiert.

Die folgenden Schritte der Inkubation mit p38-Antikörper bzw. DAPI-Färbung entsprechen dem Immunfluoreszenz-Protokoll (s.o.).

3.33 Annexin-V-EGFP Assay

Mittels Annexin-V Färbung wird ein früher Schritt zur Apoptose untersucht, in dem man einen Positionswechsel von Phosphatidylserin (PS) in der Zellmembran detektiert. In nicht-apoptotischen Zellen ist Phosphatidylserin nur an der Innenseite der Zellmembran lokalisiert. Kurz nach Induktion der Apoptose wandert PS zur äußeren Membranschicht. Exponiertes Phosphatidylserin kann nun mittels Annexin-V, einem 35,8-kDa Protein mit hoher Affinität zu PS, detektiert werden. Die Markierung von Annexin-V mit EGFP erlaubt eine Auswertung mit dem Fluoreszenz-Mikroskop.

5×10^4 Eahy926-Zellen werden pro well in 8-well Chamberslides ausgesät. Sie adhären über Nacht in normalem Medium. Am nächsten Tag findet die Behandlung mit E-LDL bzw. LDL (200 μ g/ml) statt. Die Inkubationsdauer beträgt 10 Minuten. Anschließend wird einmal mit Medium gewaschen. Das Medium wird abgenommen und die Zellen 1x mit Binding-Puffer (aus dem Kit) gewaschen. 250 μ l Binding-Puffer werden anschließend auf die Zellen gegeben. Pro well werden 5 μ l Annexin-V-EGFP (BD ApoAlert-Annexin-V) zugesetzt und es erfolgt 15 Minuten Inkubation im Dunklen bei RT.

Danach werden die Zellen 2x mit Binding-Puffer gewaschen und 5 Minuten in 2%-Formaldehyd/PBS fixiert. Durch Behandlung mit 1 μ g/ml DAPI in PBS (4 Minuten Inkubation) werden die Zellkerne angefärbt. Es erfolgt noch 1x waschen mit PBS, dann können die Zellen nach kurzem antrocknen mit Fluopräp eingedeckt werden.

3.34 TUNEL-Assay

Zur Detektion von apoptotischen Zellen nach Behandlung mit E-LDL wurde das DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System verwendet. Bei diesem Assay wird die fragmentierte DNA von apoptotischen Zellen gemessen. Hierbei markiert man die 3'-OH Enden von DNA-Strangbrüchen mit Fluorescein-12-dUTP. Dieser Schritt wird katalysiert von der rekombinanten Terminal Deoxynucleotidyl Transferase (rTdT). TUNEL bedeutet TdT-mediated dUTP Nick-End Labeling.

Eahy926-zellen wurden in Chamberslides ausgesät und für 16h mit 75 μ g/ml E-LDL, LDL, oxLDL und 0,3 μ M Linolsäure (freie Säure) behandelt. Die Fixierung der Zellen und die Markierung der DNA-Fragmente wurden entsprechend dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Direkt nach Durchführung des Assays wurden die Proben mittels Fluoreszenz-Mikroskopie analysiert.

3.35 PARP-Fragmentierung

Ein weiteres Merkmal von apoptotischen Zellen ist die Spaltung der poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) durch Caspasen. PARP ist ein DNA-bindendes protein welches DNA-Strangbrüche erkennt und zu der Basen-Excision Reparatur beiträgt. Durch Spaltung kann es nicht mehr seine DNA Reparatur Funktion ausüben. Obwohl eine PARP-Fragmentierung nicht unbedingt zum Fortschreiten der Apoptose nötig ist, kann sie zur Irreversibilität der Apoptose beitragen.

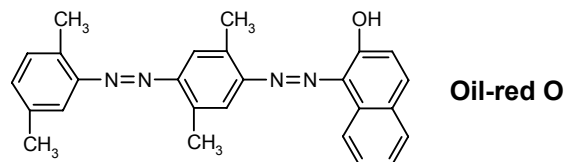
In Cos7-Zellen wurde untersucht, ob die Hemmung von ASK1 mit siRNAs die Zellen vor der Spaltung von PARP durch E-LDL bzw. Linolsäure retten kann.

In 6-well platten wurden 2×10^5 Zellen ausgesät und mit 100nM siRNA-Mix transfiziert. 48h nach Transfektion wurden die Zellen behandelt mit 100-150µg/ml E-LDL und 0,3µM Linolsäure (freie Säure) für 16h. Anschließend wurden die Zellen geerntet in 100µl 2x Probenpuffer. 25µl Probe wurde mittels Western-Blot analysiert.

Als Kontrolle für gleiches Auftragen wurde nach Stripping der Membran mit GAPDH-Antikörper inkubiert.

3.36 Oil-red O-Färbung

Bei der Oil-red O –Färbung handelt es sich um die Einlagerung eines lipidlöslichen Farbstoffes in intrazelluläre Lipidtröpfchen.



Eahy926-Zellen werden in 2-well Chamberslides ausgesät und am folgenden Tag für 10 Minuten behandelt mit 100µg/ml E-LDL(d4) bzw. LDL. Anschließend wird 3x mit PBS gewaschen und weitere 30 Minuten in normalem Medium inkubiert. Nach nochmals 3x waschen mit PBS werden die Zellen für 30 Minuten fixiert in 10% Formaldehyd/PBS. Anschließend erfolgt 1h Färbung mit dem Oil red-O Reagenz (1 Spatelspitze Oil red-O Pulver in 10ml 60%-Isopropanol-Lösung geben, 15 Minuten im Wasserbad erwärmen bis eine dunkelrote Lösung mit Bodensatz entsteht. Anschließend 1x filtrieren durch einen 0,8µm Filter, dann ein weiteres Mal durch einen 0,45µm Filter).

Die Zellen werden nun nochmals vorsichtig mit PBS gewaschen, kurz angetrocknet und dann eingedeckt mit Fluopräp. Die Rotfärbung der Lipidtröpfchen wird mit dem Farbmikroskop aufgenommen.

3.37 Messung des *oxidative Burst*

Unter *Oxidative Burst* versteht man die schnelle Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) in Zellen. *Oxidative Burst* -Messungen wurden in Endothelzellen nach Behandlung mit E-LDL durchgeführt. Hierfür eignete sich der zellpermeable Fluorescein-Farbstoff (2',7'-Dichlorodihydrofluorescein-diacetat), welcher sich mittels FACS-Analysen in oxidiert Form nachweisen lässt.

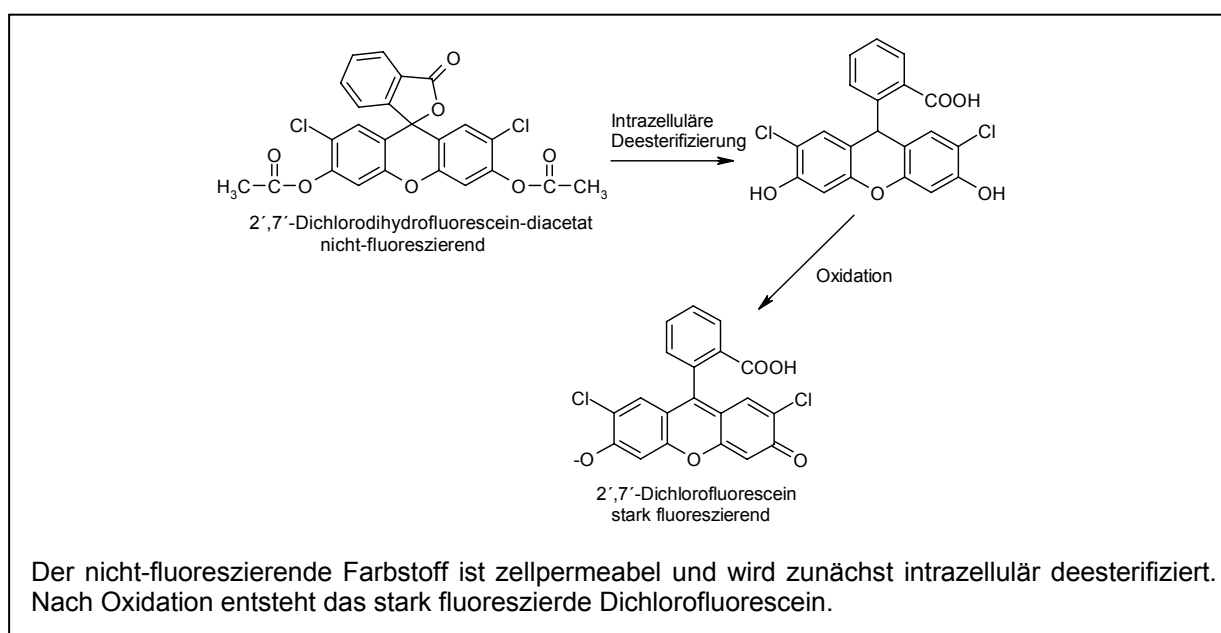


Abb. 18: Dichlorofluorescein (DCF)

FACS-Analyse

Eahy926-Zellen wurden mit 90-100% Konfluenz in 6-well Zellkulturplatten ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte Zugabe des Fluorescein-Farbstoffs. Dieser lag in einer Konzentration von 25µM vor und wurde in einer 1:5000 Verdünnung eingesetzt (Endkonzentration 5nM). Nach 5 Minuten Inkubation der Zellen wurde mit E-LDL, E-LDL(d4), E-LDL(d10), oxLDL und LDL behandelt für 10 Minuten (50-200µg/ml). Nach Abnahme des Mediums wurden die Zellen 1x mit PBS gewaschen. Dann erfolgte Trypsinisierung mit 300µl 1xTrypsin/EDTA-Lösung. Sobald sich die Zellen ablösten wurden sie in 1ml Medium aufgenommen und 5 Minuten bei 5000rpm abzentrifugiert. Die Pellets wurden in 2%-Formaldehyd/FACS-Puffer fixiert. Zur Analyse der Proben im FACS wurde der FL1-H Modus verwendet.

3.38 Transformation von Kompetenten Zellen

Um ein Plasmid zu vervielfältigen wird es zunächst in Bakterien transformiert, diese dann vermehrt und schließlich das Plasmid wieder aus der Kultur extrahiert (Mini- und Maxi-Präp).

Für die Transformation werden als kompetente Zellen DH5 α TM subcloning efficiencyTM chemically competent cells, E.coli verwendet (Invitrogen # 44-0098).

Die Transformation wurde entsprechend dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Die Bakterien wurden zunächst auf Eis aufgetaut. Dann pipettierte man 25 μ l der Zellen in vier Eppendorfröhrchen (auf Eis). Die restlichen Zellen wurden in einem Ethanol/Trockeneisbad wieder eingefroren.

Das Plasmid wurde in zwei verschiedenen Konzentrationen zugegeben (1ng und 10ng). Weiterhin benötigte man eine negativ-Kontrolle (Wasser) und eine positiv-Kontrolle (pUC19-control DNA; 500pg). Bei der Zugabe von Plasmid bzw. Kontrolle war es wichtig, sehr vorsichtig zu pipettieren und die Zellen nicht zu schütteln. Sie sind kompetent, d.h. haben Poren in der Zellwand und würden sonst zerstört werden. Die Mischungen inkubierten nun 30 Minuten auf Eis.

Daraufhin folgte ein Hitzeschock für 20 Sekunden in einem 37°C warmen Wasserbad und anschließend 2 Minuten Inkubation auf Eis. Bei diesem Schritt werden die Poren in der Zellwand der Bakterien geschlossen.

Je 300 μ l vorgewärmtes LB-Medium (ohne Ampicillin) wird pro Ansatz hinzugefügt. Nun erfolgte eine Inkubation im Schüttel-Inkubator bei 37°C für 1 Stunde. Während dieser Zeit exprimieren die Bakterien, die das Plasmid aufgenommen haben, das Enzym β -Lactamase, welches für die Selektion auf Ampicillin-haltigen Agarplatten benötigt wird.

Anschließend werden je 100 μ l der Bakteriensuspension auf Agarplatten (100 μ g/ml Ampicillin) ausgebreitet und über Nacht bei 37°C kultiviert.

Ergebnis der Transformation

Bei beiden Plasmid-Ansätzen sollten viele kleine Kolonien zu beobachten sein. Der Ansatz mit Wasser darf keine Kolonien enthalten. Bei der Positiv-Kontrolle müssen Kolonien zu finden sein.

3.39 Minipräparation von Plasmid-DNA aus einer Bakterienkultur

Die Minipräparation dient zur Überprüfung der Transformation. Mehrere Kolonien werden untersucht. Ist das gewünschte Plasmid in einer der Kolonien enthalten, so wird diese anschließend für eine Maxipräparation verwendet.

Die Präparation wurde mit dem Quiapräp Spin Minipräp Kit analog dem Herstellerprotokoll durchgeführt.

In 2 sterilen Reagenzgläsern wird je 5ml LB-Medium (100 μ g/ml Ampicillin) gegeben. Pro Reagenzglas wird eine Kolonie von der Agarplatte zugesetzt. Die Kultivierung der Bakterien erfolgt über Nacht im Schüttel-Inkubator bei 37°C.

Zur Extraktion der Plasmide aus der Bakterienkultur siehe Herstellerprotokoll.

3.40 Restriktionsverdau der Minipräps

Bei der Transformation von FlagASK1 sollte abgesichert werden, dass es sich bei der extrahierten Plasmid-DNA tatsächlich um FlagASK1 handelt. Deshalb wurde von den beiden Minipräps ein Restriktionsverdau mit EcoR1 durchgeführt. Laut Karte von FlagASK1 (s.o.) soll hierbei ein Bruchstück von ca. 3000bp herauschneidbar sein.

Ansatz für den Restriktionsverdau:

Minipräp	10µl
Puffer H (10x)	2,5µl
EcoR1	1µl (=10U)
Wasser	12,5µl (ad 25,0)

Die Substanzen werden in Eppendorfröhrchen gemischt und 1 Stunde bei 37°C inkubiert (Thermoblock). Anschließend erfolgte Deaktivierung des Enzyms bei 60°C für 20 Minuten.

3.41 Agarose-Gel-Elektrophorese

Ein 0,8% Agarose-Gel wurde hergestellt in dem 0,4g Agarose in 50ml TBE-Puffer erhitzt wurden. Nach Abkühlen auf ca. 50°C gab man 5µg/ml Ethidiumbromid hinzu. Das Gel wurde nun in die Kammer gegossen.

Zum Auftragen auf das Gel wurden 15µl des Restriktionsverdaus mit 3µl 6x Probenpuffer gemischt. Als Marker diente ein 1kb Marker (Invitrogen).

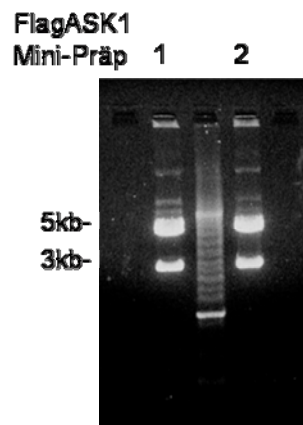


Abb. 19: FlagASK1 Minipräp

Die Auswertung des Gels zeigt, dass der Restriktionsverdau funktioniert hat. Es ist ein Fragment von ca. 3000bp zu sehen. Bei den Plasmiden handelt es sich also mit Sicherheit um FlagASK1. Dieses soll nun in größerem Maßstab aus den Bakterien isoliert werden (Maxi-Präp).

3.43 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA

Für die Maxi-Präparation von Plasmiden wurde das Quiagen® Plasmid Purification Endo-Free™ Plasmid Maxi Kit verwendet. Es gewährleistet eine einfache und zugleich endotoxinfreie Isolierung.

In einem großen Erlenmeyerkolben werden 100ml LB-Medium (100mg/ml Ampicillin) gegeben. Dann gibt man 100µl der Minipröp-Kultur hinzu und inkubiert über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator.

Am nächsten Tag wird von der Kultur 2x 1ml abgenommen und davon eine Glycerin-Kultur angelegt (800µl Bakterienkultur + 200µl steriles Glycerin). Der Rest der Kultur wird in zwei 50ml Falcons überführt und 45 Minuten bei 2000rpm zentrifugiert. Aus den Pellets wird das Maxi-Pröp analog dem Firmenprotokoll durchgeführt (siehe Quiagen-Protokoll).

Im letzten Schritt der Präparation, nach Ausfällen der DNA mit Isopropanol, wurde die gesamte Flüssigkeitsmenge auf sterile Eppendorfröhrchen verteilt, um keine erneute Kontamination mit Bakterien zu bekommen. Diese wurden dann 30 Minuten bei 4°C und 13000rpm zentrifugiert. Beim Waschen mit 70%-Ethanol wurden die Pellets in einem Röhrchen gesammelt und nochmals 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend ließ man sie an der Luft trocknen, bevor sie schließlich in 50µl Wasser aufgenommen wurden.

Hierfür wurde kein TE-Puffer verwendet, da die Proben evtl. sequenziert werden sollten. Für eine Sequenzierung müssen sie in Wasser gelöst sein.

Gehaltsbestimmung der Maxi-Präps

Um den DNA-Gehalt zu ermitteln werden 2µl Maxi-Pröp zu 198µl Wasser gegeben. Die optische Dichte wird bei 260nm gegen Wasser bestimmt.

Entsprechend der folgenden Formel für doppelsträngige DNA konnte die Konzentration ermittelt werden:

$$\frac{OD_{260} * 50^{1)} * 100^{2)}}{1000} = \dots \mu\text{g} / \mu\text{l Plasmid-DNA}$$

1) Multiplikationsfaktor: 50 für doppelstrang DNA

2) Verdünnungsfaktor für die Messung: 1:100

Die Lagerung der Maxi-Präps erfolgt bei -20°C.

Überprüfung der Maxi-Präps

Um zu kontrollieren, ob die Maxi-Präparation erfolgreich war, kann ebenso wie bei den Mini-Präps ein Restriktionsverdau bzw. eine Agarose-Gelelektrophorese erfolgen (s.o.)

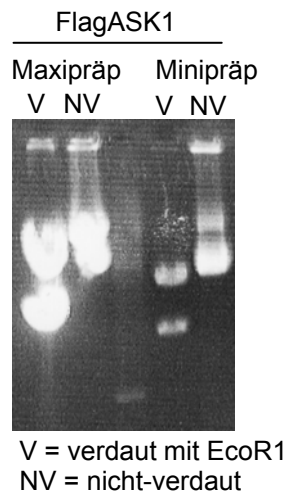


Abb. 20: FlagASK1 Mini-und Maxipräp

Sequenzierung

Zur zusätzlichen Kontrolle wurde das FlagASK1 Maxipräp zur Sequenzierung (Firma Genterprise, Mainz) geschickt. Eine „short run“ Ansequenzierung von beiden Seiten stimmte mit der ASK1 Sequenz überein.

3.44 Herstellung des Kontrollvektors pcDNA3

Als Kontrolle für die Transfektion von FlagASK1 sollte ein leerer Vektor dienen. Dieser wurde mittels Restriktionsverdau mit Xho I aus FlagASK1 hergestellt. Xho I schneidet ASK1 bei der Base 217 und am Ende. Der Flag-Terminus sowie der Anfang von ASK1 bleiben also im Vektor enthalten. Die katalytische Domäne von ASK1 wird allerdings herausgeschnitten.

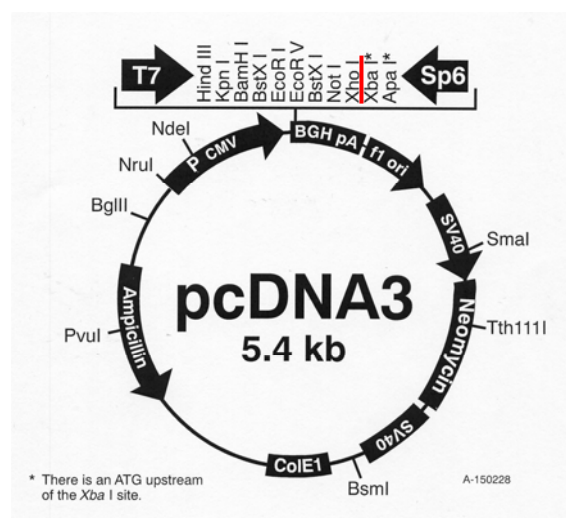


Abb. 21: Vektor-Karte von pcDNA3 (Invitrogen)

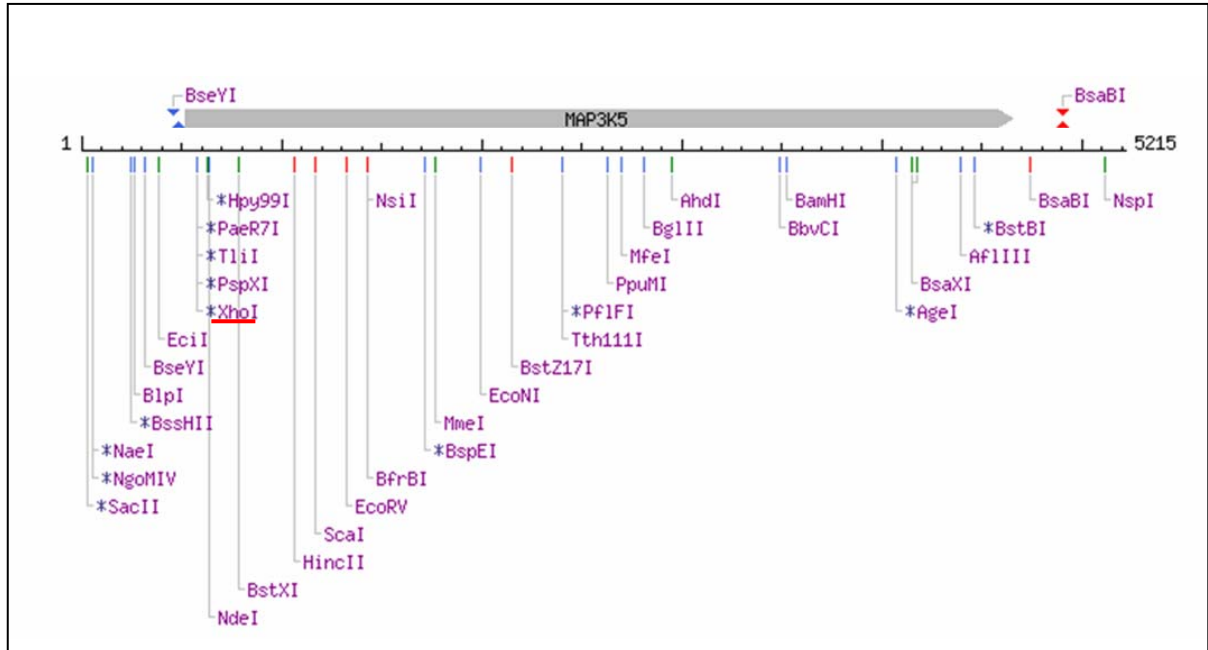


Abb. 22: Restriktionskarte von ASK1 (Quelle: NEBcutter)

Ansatz für den Restriktionsverdau

FlagASK1-Maxipräp	0,5µl (1,4µg)
Puffer H	2,5µl
Xho I	1µl (=10U)
Wasser	21µl (ad 25,0)

- ⇒ 1h bei 37°C inkubieren (Thermoblock)
- ⇒ 20 Minuten bei 65°C inaktivieren

Agarose-Gelelektrophorese

In einem 0,8% Agarose-Gel werden die herausgeschnittenen Fragmente von dem offenen Vektor getrennt. Dieser wird herausgeschnitten.

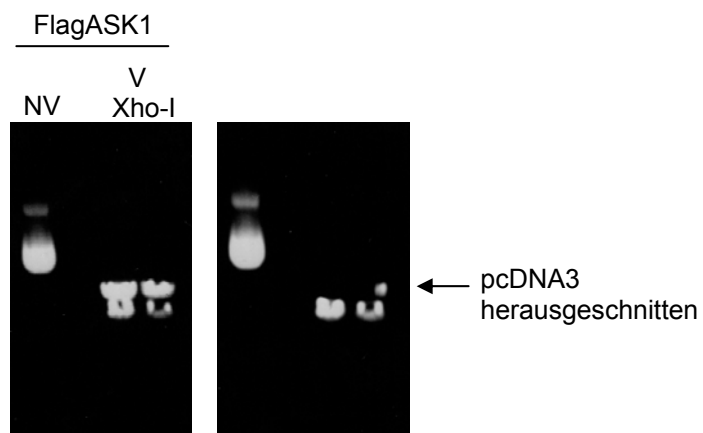


Abb. 23: Trennung des offenen Vektors vom FlagASK-Insert

Extraktion von DNA aus Agarosegel-Banden

Die Extraktion der DNA-Banden aus dem Agarosegel fand mit dem QIAEX-Kit statt. Die ausgeschnittenen Banden werden in ein Eppendorfröhrchen gegeben und gewogen. Hinzugefügt wird das 3-fache Volumen an QX1-Puffer und das 2-fache Volumen an Wasser. Nach Zusatz von 15µl QIAEX-II wird 10 Minuten bei 50°C inkubiert und alle 2 Minuten gevortext, um das QIAEX-II in Suspension zu halten. Die Pellets werden abzentrifugiert, gewaschen und kurz an der Luft getrocknet. Nach Zugabe von 20µl Wasser wird 5 Minuten bei 50°C inkubiert. Hierbei löst sich die DNA von der Matrix ab. Nach Abzentrifugieren wird der Überstand in ein neues Eppendorfröhrchen gegeben. Im Überstand enthalten ist jetzt der offene Vektor. Die Bestimmung der DNA-Konzentration ergibt 0,08µg/µl.

Ligation

Bei der Ligation wird der offene pcDNA3-Vektor geschlossen.

Gelextrakt	3µl (~240ng)
5x Ligase-puffer	4µl
T4-DNA-Ligase	2µl
Wasser	11µl (ad 20,0)

⇒ Inkubation über Nacht in Eiswasser (4-8°C)

Transformation

Die Transformation wird entsprechend der obigen Beschreibung durchgeführt mit 2µl Ligationsansatz. Am nächsten Tag waren 2 Kolonien zu sehen. Positiv- und Negativ-Kontrolle wurden gleichzeitig durchgeführt und waren in Ordnung.

Minipräparation und Agarosegelelektrophorese von pcDNA3

Von beiden Kolonien wurde je eine Minipräparation durchgeführt, die anschließend mittels Agarose-gelelektrophorese untersucht wurden. Zur weiteren Kontrolle wurde nochmals ein Restriktionsverdau der Minipräps mit Xho I durchgeführt. Hierbei durfte nun kein Fragment mehr rausschneidbar sein.

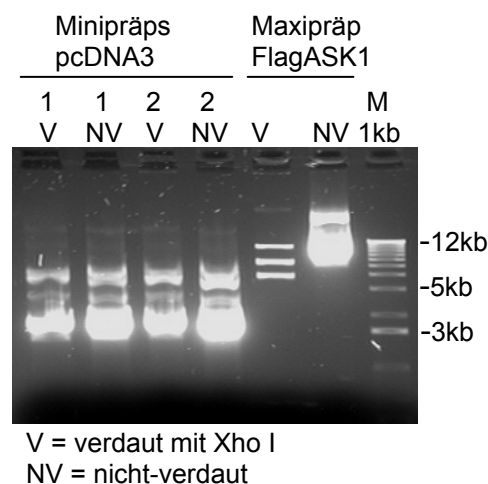


Abb. 24: Minipräp pcDNA3

Maxi-Präp

Anschließend wurde eine Maxi-Präparation von pcDNA3 durchgeführt.

Der Verdau mit Xho I zeigt, dass es nicht mehr möglich ist, aus pcDNA3 ein Fragment herauszuschneiden. Die Herstellung des Kontrollvektors ist somit gelungen.

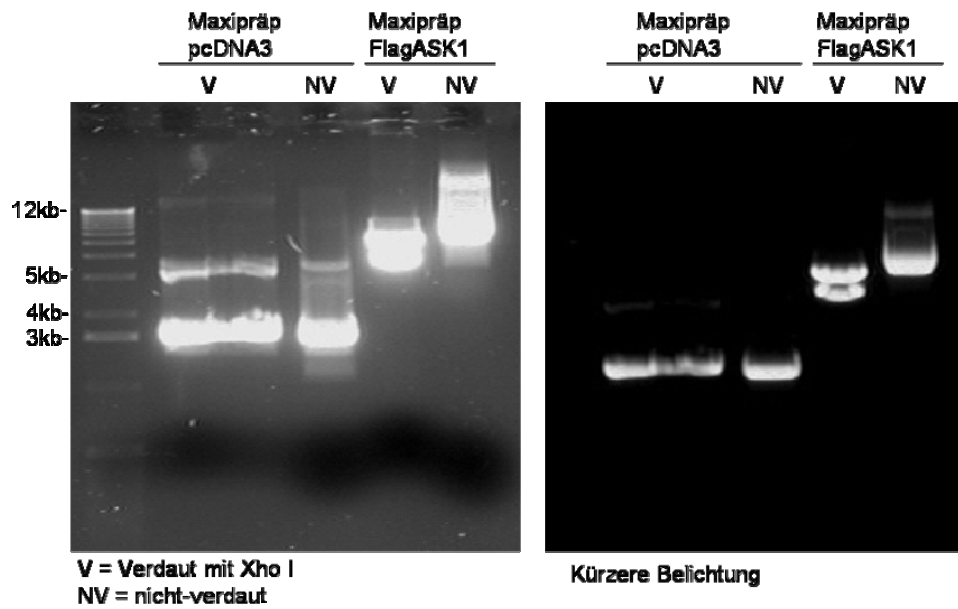


Abb. 25: Maxipräp pcDNA3

4. Ergebnisse

4.1 Enzymatisch Verändertes LDL aktiviert MAP- Kinasen

4.1.1 Erste Versuche zur ASK1-Aktivierung

4.1.1.1 Endogenes ASK1

Zu Beginn der Arbeit sollte zunächst der Effekt von Fettsäuren auf die MAPKKK ASK1 untersucht werden. Es ist bekannt, dass ASK1 bereits nach 5 Minuten durch H_2O_2 aktiviert wird und dieser Zustand je nach Stärke des Stimulus ca. 15-30 Minuten anhält, bevor eine Deaktivierung durch den ASK1-Inhibitor pp5 erfolgt (Morita *et al.*, 2001).

In den ersten Versuchen wurden also Endothelzellen für 10 Minuten mit Linolsäure (wasserlöslicher Komplex von LA in Methyl- β -Cyclodextrin) behandelt. H_2O_2 diente als Positiv-Kontrolle, Methyl- β -Cyclodextrin als Negativ-Kontrolle für die Behandlung mit Linolsäure. Mittels Western Blot sollte eine Aktivierung von ASK1 anhand einer Bande bei etwas höherem Molekulargewicht (Phospho-ASK1) zu sehen sein, denn zum Zeitpunkt dieser Versuche war noch kein Antikörper gegen Phospho-ASK1 (Thr845) käuflich zu erwerben.

Es wurden mehrere Antikörper gegen ASK1 getestet (anti-ASK1-N19 goat; anti-ASK1-CTerminal rabbit; anti-ASK1-F9 mouse; Santa Cruz Biotechnology) und bei keinem waren überhaupt ASK1-Banden zu sehen. Anscheinend war endogenes ASK1 also in so geringen Mengen vorhanden, dass man es nicht direkt im Western Blot oder mittels Immunfluoreszenz detektieren konnte.

4.1.1.2 Transfektion von FlagASK1

Um also eine Aktivierung von ASK1 durch E-LDL bzw. Fettsäuren zeigen zu können musste ASK1 in Zellen überexprimiert werden. Von der Arbeitsgruppe Ichijo bekamen wir einen Vektor, der FlagASK1 in pcDNA3.0 enthielt. Das Flag-tag befindet sich am N-Terminus von ASK1 und besteht aus 7 Aminosäuren. Es stellt eine Markierung dar, die die zusätzliche Detektion des abgelesenen Proteins mit einem anti-Flag Antikörper erlaubt.

Um FlagASK1 zu vervielfältigen wurden kompetente Bakterien (DH5 α E-coli) mit dem Vektor transformiert. Aus Über-Nacht-Kulturen dieser Zellen extrahierte man die Plasmide (Mini-/Maxi-Präparation). Eine Identitätskontrolle für FlagASK1 stellte der Verdau mit EcoR1 dar. Hierbei ließ sich ein ca. 3kb-Fragment aus dem Vektor ausschneiden (siehe Material und Methoden). Zusätzlich wurde das Maxi-Präp zur Sequenzierung (Firma Genterprise) geschickt. Eine „short-run“ Ansequenzierung des Vektors stimmte mit der ASK1-Sequenz überein.

4.1.1.3 Nachweis der Transfektion mittels Immunfluoreszenz

FlagASK1 wurde zunächst in Endothelzellen (Eahy926) überexprimiert. 48h nach Transfektion wurde die Effizienz mittels Immunfluoreszenz überprüft. Hierbei zeigte sich, dass diese bei Endothelzellen sehr gering war. Nur ca. 1% der Zellen waren transfiziert (Abb. 26A).

Auf gleiche Art transfizierte 293-Zellen zeigten bessere Ergebnisse. Die Effizienz betrug hier 5-10% (Abb. 26B).

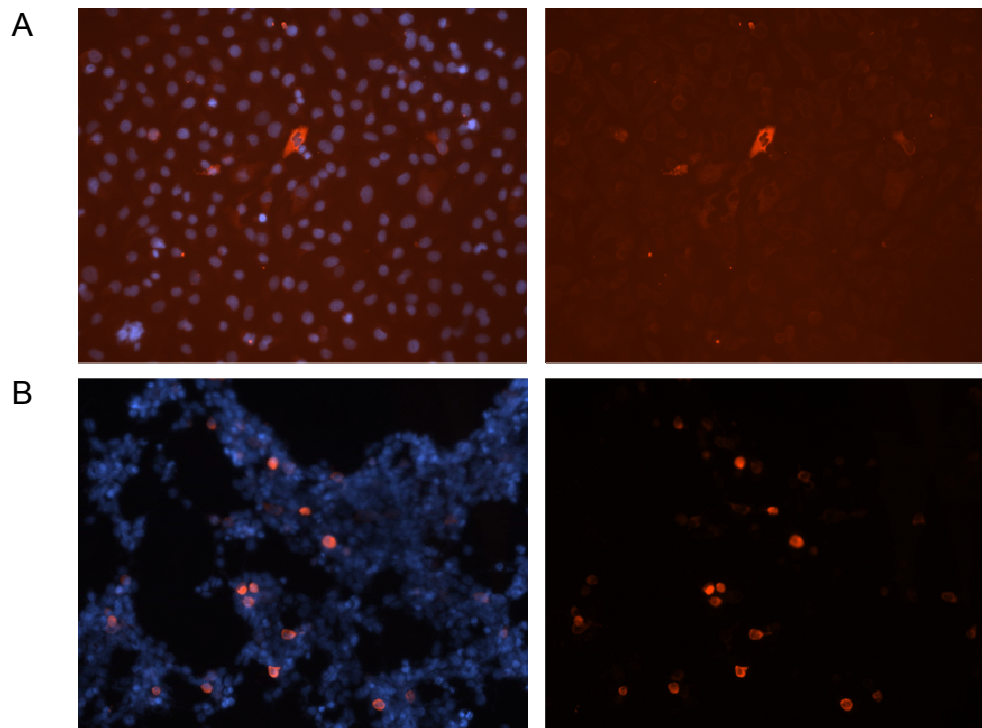


Abb. 26: Transfektion von Eahy926-Zellen (A) bzw. 293-Zellen (B) mit 2 μ g/ml FlagASK1; Immunfluoreszenz 48h nach Transfektion mit anti-Flag-mouse/anti-mouse-Cy3; linke Bilder: DAPI-Färbung der Zellkerne + Cy3-Filter; rechte Bilder: nur Cy3-Filter.

4.1.1.4 Nachweis der Transfektion mittels Western-Blot

Als weitere Überprüfung der Transfektion wurde von Endothel- und 293-Zellen ein Western Blot (WB) durchgeführt. Bei den 293-Zellen erkennt man eine deutliche FlagASK1- Bande (155kD), die bei den Endothelzellen fehlt. Auf Grund der besseren Transfektionsrate wurden also für die weiteren Transfektions-Experimente 293-Zellen verwendet.

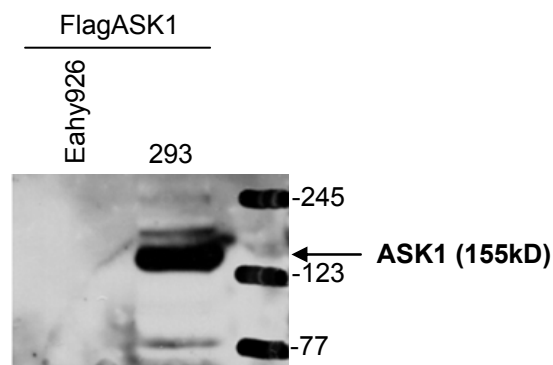


Abb. 27: Eahy926- bzw. 293-Zellen wurden mit 2µg FlagASK1 transfiziert. WB 48h nach Transfektion: anti-Flag-mouse/anti-mouse-HRP

4.1.1.5 Transfektion von FlagASK1 in 293-Zellen und Aktivierung mit H₂O₂

Nun sollte in transfizierten 293-Zellen eine ASK1 Aktivierung gezeigt werden. Zunächst wurde nur H₂O₂ als Positiv-Kontrolle eingesetzt, die Behandlungsdauer betrug 10 Minuten. Im Western-Blot ist bei H₂O₂-Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Zellen eine etwas höhere und auch stärkere ASK1-Bande zu sehen sowie eine zusätzliche schwache Bande darunter. Nicht-transfizierte Zellen zeigen keine Banden. Diese höhere Bande auf eine ASK1-Phosphorylierung zurückzuführen ist allerdings nicht eindeutig möglich, da dieser Befund sich nicht reproduzierbar darstellen ließ.

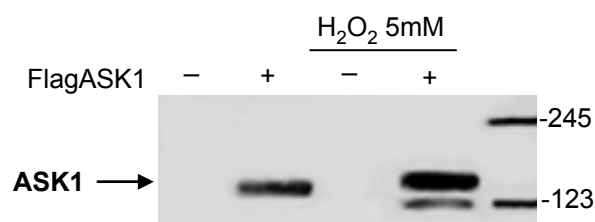


Abb. 28: +/- FlagASK1-transfizierte 293-Zellen wurden 48h nach Transfektion für 10Min mit H₂O₂ 5mM behandelt; WB: anti-Flag-mouse/anti-mouse-HRP

4.1.1.6 Transfektion von 293-bzw. HeLa-Zellen mit FlagASK1 und Behandlung mit Fettsäuren und E-LDL

In transfizierten 293- bzw. HeLa-Zellen sollte nun der Effekt von Fettsäuren und E-LDL auf ASK1 untersucht werden. HeLa-Zellen wiesen eine vergleichbare Transfektionseffizienz wie 293-Zellen auf und besaßen außerdem den Vorteil, dass sie sich bei der Transfektion nicht so leicht von den Zellkulturplatten ablösten wie 293-Zellen.

Die Auswertung der Western Blots zeigt, dass nach Behandlung mit E-LDL teilweise stärkere Banden auftraten (s. Abb. 29A), die sich aber in Wiederholungsversuchen nicht bestätigen ließen. Auch in der Laufhöhe sah man keine Unterschiede, was auf eine Phosphorylierung von ASK1 hätte deuten können.

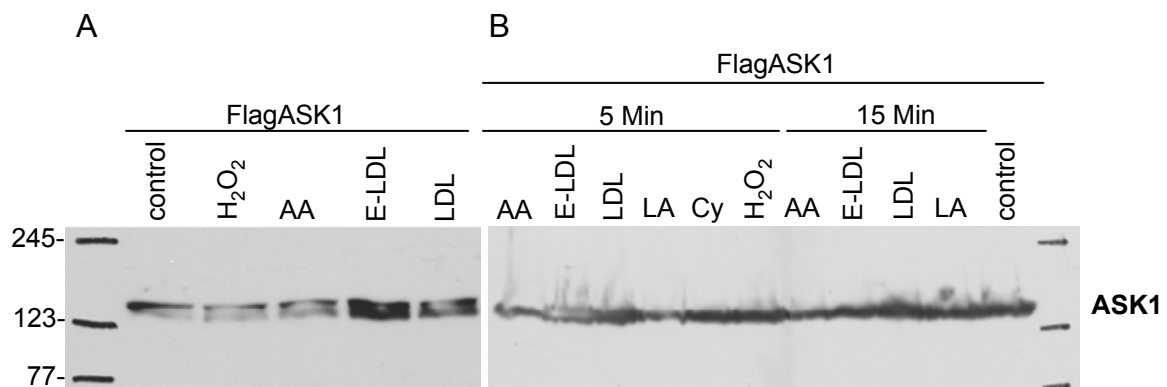


Abb. 29: mit FlagASK1 transfizierte HeLa-Zellen (A) bzw. 293-Zellen (B); Behandlung mit H₂O₂ 5mM; FA 10µg/ml; E-LDL bzw. LDL 100µg/ml; WB: anti-ASK1-F9-mouse/anti-mouse-HRP

Aus diesen Western-Blots wurde ersichtlich, dass es auf diese Art nicht möglich war, eine ASK1-Aktivierung zu zeigen. Weder eine stärkere Bande noch eine höhere Bande konnten eindeutig einer ASK1-Phosphorylierung zugeordnet werden.

Infolge dessen sollte nun die Rolle von pp5 im Zusammenhang mit der ASK1 – Aktivierung näher untersucht werden.

4.1.1.7 Nachweis von pp5 in Endothelzellen

Ein von der Firma B&D durchgeführtes Western Blot Screening ergab eine deutliche Zunahme der pp5-Menge in Monozyten nach 24h Behandlung mit E-LDL. In Endothelzellen sollte dieser Befund nun wiederholt gezeigt werden. Hierbei konnte allerdings keine verstärkte pp5-Bande nach FA- bzw. E-LDL-Behandlung nachgewiesen werden.

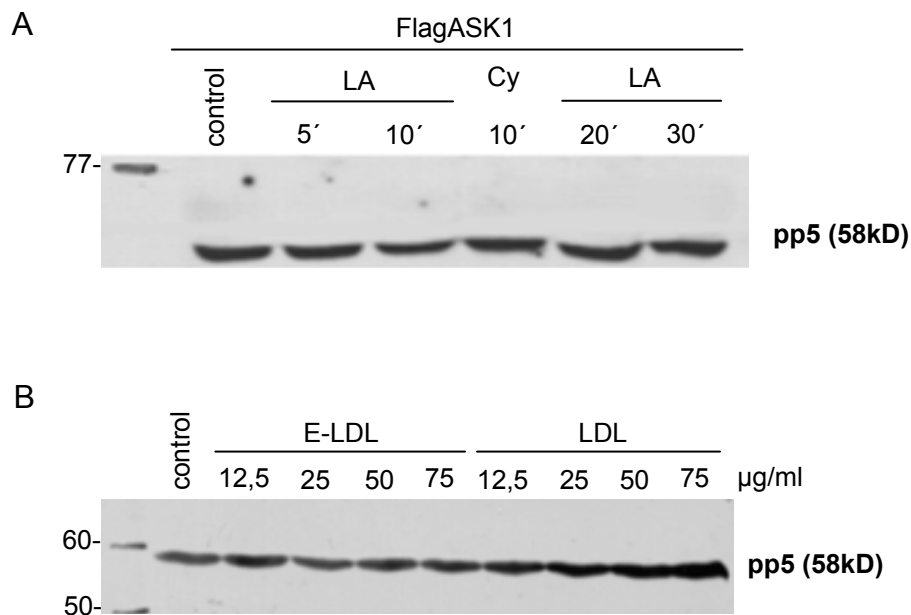


Abb. 30: Endothelzellen wurden (A) mit LA 20µM bzw. Cy für 5 – 30 Min behandelt; (B) mit 12,5-75µg/ml E-LDL bzw. LDL für 24h; WB: anti-pp5-mouse/anti-mouse-HRP

4.1.1.8 Hemmung von pp5 mit Fumonisin B1

Da durch Behandlung mit E-LDL bzw. FA alleine keine deutlich verstärkte oder höhere ASK1-Bande reproduzierbar darzustellen war, sollte nun versucht werden, durch Hemmung von pp5 einen besseren Erfolg zu erzielen. Wie oben beschrieben bindet pp5 an aktiviertes ASK1 und funktioniert somit als *negativ-Feedback*-Inhibitor. Eine ASK1-Phosphorylierung durch E-LDL bzw. FA könnte also demzufolge im Western Blot nur sehr kurz bzw. gar nicht zu sehen sein, da pp5 schon nach 5-15 Minuten an ASK1 binden und eine Dephosphorylierung auslösen kann.

Als pp5-Inhibitor fand Fumonisin B1 (FB1) Verwendung. Dieses Pilzgift weist strukturelle Ähnlichkeiten zu Sphingolipiden auf. Die Hemmung von pp5 kommt wahrscheinlich durch eine Interaktion von FB1 mit den TPR-Domänen von pp5 zustande (Fukuda *et al.*, 1996). Dadurch wird dessen Phosphatase-Aktivität vermindert. ASK1 würde also nicht mehr durch pp5 dephosphoryliert werden und sollte somit länger aktiv sein.

Mit FlagASK1 transfizierte 293-Zellen wurden zunächst für 20 Minuten mit FB1 (200µM) vorbehandelt bevor dann die Inkubation mit H₂O₂ (5mM, 5Min) erfolgte.

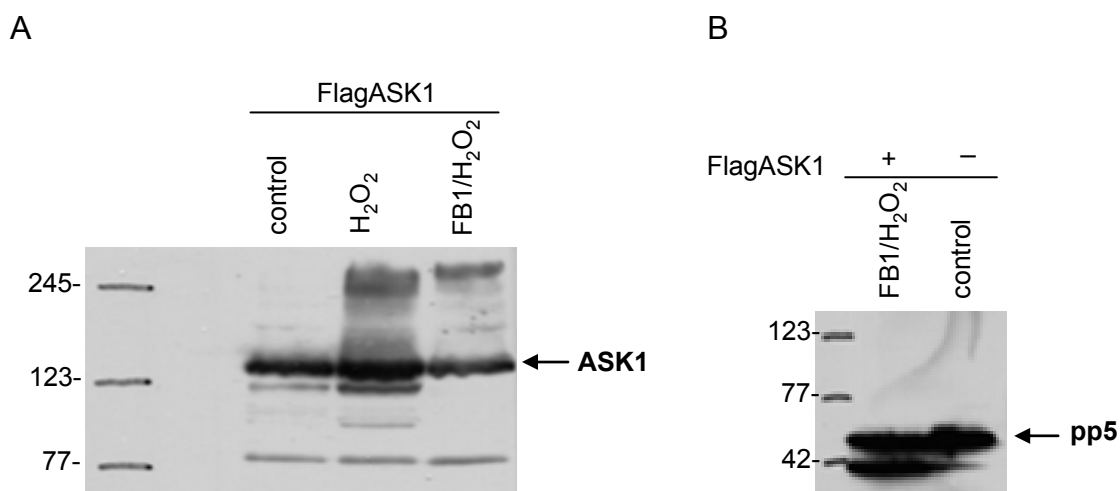


Abb. 31: Mit FlagASK1 transfizierte 293-Zellen wurden 48h nach Transfektion für 20 Minuten mit FB1 (200µM) vorbehandelt, dann folgte Behandlung mit H₂O₂ 5mM; (A) WB: anti-Flag-mouse; (B) WB: anti-pp5-mouse

Trotz Hemmung von pp5 ist keine verstärkte ASK1-Bande nach Aktivierung mit H₂O₂ zu sehen, sondern sogar ein schwächeres Signal (s. Abb. 31A, rechte Spur). Vorbehandlung von 293-Zellen mit FB1 erzeugt eine weitere Bande im Western-Blot mit pp5 (s. Abb. 31B).

4.1.1.9 Detektion von P-ASK1 mittels anti-Phospho-Threonin Antikörper

Die unter Abb. 31 beschriebenen Proben wurden erneut auf ein Gel aufgetragen und der Western Blot mit einem anti-Phospho-Threonin Antikörper (Biomol) entwickelt.

Es ist keine Phospho-Threonin Bande bei 155kD zu sehen, die auf phosphoryliertes ASK1 hätte deuten können. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass der Antikörper die spezifische Phosphorylierungsstelle von ASK1 nicht erkennt.

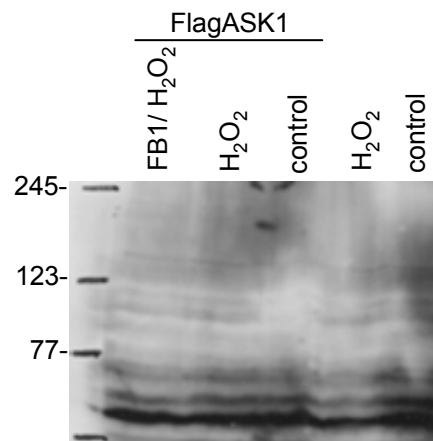


Abb. 32: mit FlagASK1 transfizierte 293-Zellen; WB: anti-Phospho-Threonin-mouse/anti-mouse-HRP

4.1.1.10 Immunpräzipitation von FlagASK1 aus transfizierten 293-Zellen mit anti-Flag Antikörper nach Behandlung mit H₂O₂ und Linolsäure

Da der Western Blot in Abb. 32 eine hohe Hintergrund-Färbung zeigt, sollte FlagASK1 nun durch Präzipitation aus dem Zelllysate extrahiert werden. Dies ermöglicht, größere Mengen des präzipitierten Proteins im Western Blot aufzutragen und gleichzeitig einen geringeren Hintergrund zu erhalten. Weiterhin bietet sich hierbei die Möglichkeit, copräzipitierte Proteine wie z.B. pp5 zu detektieren.

293-Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit FlagASK1 transfiziert um genügend Zelllysate für die Präzipitation zu erhalten. Die Behandlung der Zellen erfolgte mit LA (10 µg/ml). H₂O₂ und Methyl-β-Cyclodextrin dienten als Positiv- bzw. Negativ-Kontrollen. Ein weiterer Kontroll-Ansatz wurde ohne 1. Antikörper durchgeführt. Die Präzipitation erfolgte mit einer Protein A/G Plus Agarose Matrix.

In Abb. 33A zeigt der obere Blot, dass aus jeder Probe gleich viel FlagASK1 präzipitiert wurde und dass auch zuvor relativ gleiche Mengen FlagASK1 in den Zelllysaten vorhanden war. Die Präzipitation ohne 1. Antikörper ergab wie gewünscht keine ASK1-Bande.

Nach erneutem Auftragen der Proben auf ein zweites Gel und Inkubation mit dem Phospho-Threonin-Antikörper konnten allerdings keine Phospho-spezifischen Banden bei 155kD, die auf P-ASK1 deuten könnten, nachgewiesen werden. Dass

der Antikörper im Prinzip funktioniert, sieht man an der Phospho-Control Bande einer Probe der Firma Biomol (Abb. 33A, unterer Blot).

Der pp5-Western-Blot der gleichen Immunpräzipitate zeigte, dass tatsächlich bei Behandlung mit H_2O_2 und LA mehr pp5 copräzipitiert wurde (Abb. 33B). D.h. bei diesen beiden Proben könnte ASK1 aktiviert worden sein und in Folge dessen kam es zur vermehrter Bindung von pp5 an ASK1.

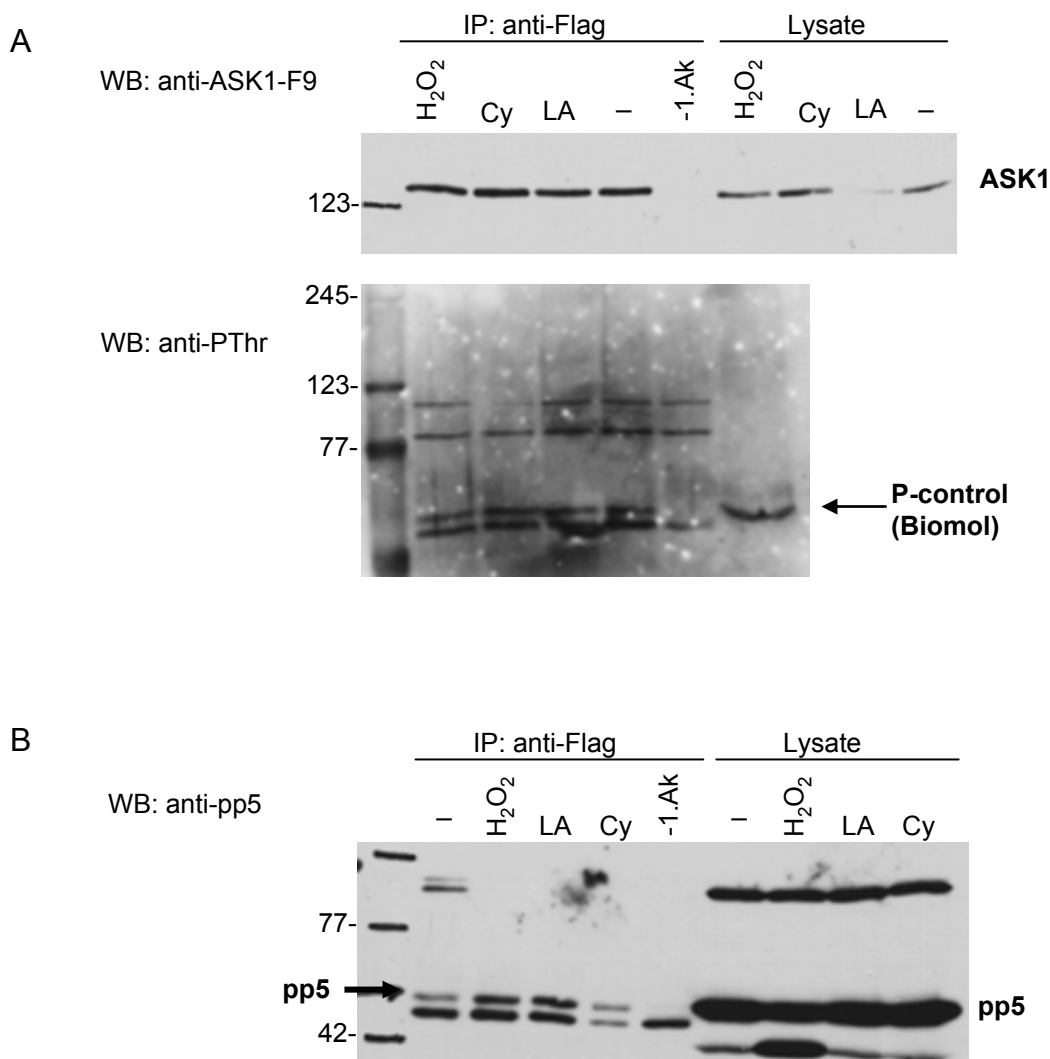


Abb. 33: IP anti-Flag aus transfizierten 293-Zellen nach Behandlung mit Linolsäure (10 μ g/ml), H_2O_2 5mM und Cy für 15 Minuten. (A) oberer Blot: links präzipitiertes FlagASK1, rechts FlagASK1-Mengen in den Zelllysaten vor der Präzipitation; unterer Blot: anti-Phospho-Threonin Ak; (B) links: Co-präzipitiertes pp5; rechts: pp5-Mengen in den Zelllysaten vor der Präzipitation.

4.1.2 Aktivierung von MAP-Kinasen durch E-LDL und FFA

4.1.2.1 E-LDL aktiviert p38-MAP-Kinase und cJun-N-Terminal Kinase (JNK)

Da es sich als schwierig herausstellte, eine ASK1-Aktivierung mit den verfügbaren Methoden zu zeigen, wurden stromabwärts von ASK1 liegende MAP-Kinasen als Untersuchungsobjekt ausgewählt. Es sollte festgestellt werden, ob E-LDL bzw. freie Fettsäuren (FFA) p38-MAP Kinase bzw. c-Jun-N-Terminal Kinase (JNK) aktivieren können.

P38-MAP-Kinase und JNK (oder auch SAPK = *stress activated protein kinase*) sind sogenannte „Stress induzierte Kinasen“, die durch Zytokine und zellulären Stress wie osmotischer Schock, Hitzeschock, UV-Bestrahlung, oxidativen Stress oder alkylierende Agenzien aktiviert werden. Die Aktivierung von JNK wird von den stromaufwärts liegenden Kinasen MKK4 und 7 reguliert, wobei MKK4 auch p38 phosphorylieren kann. P38 wird von MKK3 und MKK6 aktiviert (s. Abb.2) (Whitmarsh and Davis, 1996). Diese MKKs können alle durch ASK1 aktiviert werden.

Um p38 bzw. JNK in den aktiven Zustand zu überführen muss eine zweifache Phosphorylierung an einer Tripeptidsequenz Thr-X-Tyr im aktiven Zentrum der Kinasen erfolgen. JNK wird durch drei Gene codiert. Die JNK1 und JNK2-Gene werden allgegenwärtig exprimiert, JNK3 nur in bestimmten Gebieten wie z.B. im Gehirn. Durch alternatives *Splicing* kommt es zur Bildung von zehn verschiedenen JNK-Isoformen (Gupta *et al.*, 1996). Es werden Proteine mit und ohne C-terminaler Verlängerung exprimiert (46kD und 54kD Isoformen), die Funktion dieser *Splice*-Varianten ist jedoch unklar.

Primäre Aorten-Endothelzellen (HAoEC, Abb. 34A) bzw. EaHy926-Zellen (Abb. 34 B, C) wurden mit 100µg/ml E-LDL, LDL und oxLDL behandelt. Als Positiv-Kontrolle wurde Sorbitol (osmotischer Schock) verwendet.

Erstaunlicherweise trat schon nach 10Min Behandlung eine starke p38-Aktivierung durch E-LDL ein (Abb. 34 A, B). Bei unbehandelten Zellen (control) war keine Bande zu erkennen. Behandlung mit LDL und oxLDL führte jeweils zu einer gleich schwachen p38-Aktivierung. Nach E-LDL Behandlung wurde eine 2,5-fach stärkere p38-Phosphorylierung im Vergleich zu LDL erreicht (Mittelwert der Quantifizierung von 3 Western Blots).

Eine Aktivierung von JNK durch E-LDL zeigte sich erst nach 30Min, also später als die p38-Aktivierung (Abb. 34 C). Behandlung mit LDL oder oxLDL führte nicht zu einer JNK-Aktivierung.

Die Kinetik der p38- bzw. JNK- Phosphorylierung durch E-LDL zeigt, dass das Maximum jeweils nach 2h erreicht ist. Im Gegensatz zur lang anhaltenden p38-Phosphorylierung ist die JNK-Aktivierung nur sehr kurz. Nach 4 und 6h sind hier nur noch sehr schwache Banden zu erkennen (Abb. 34 C).

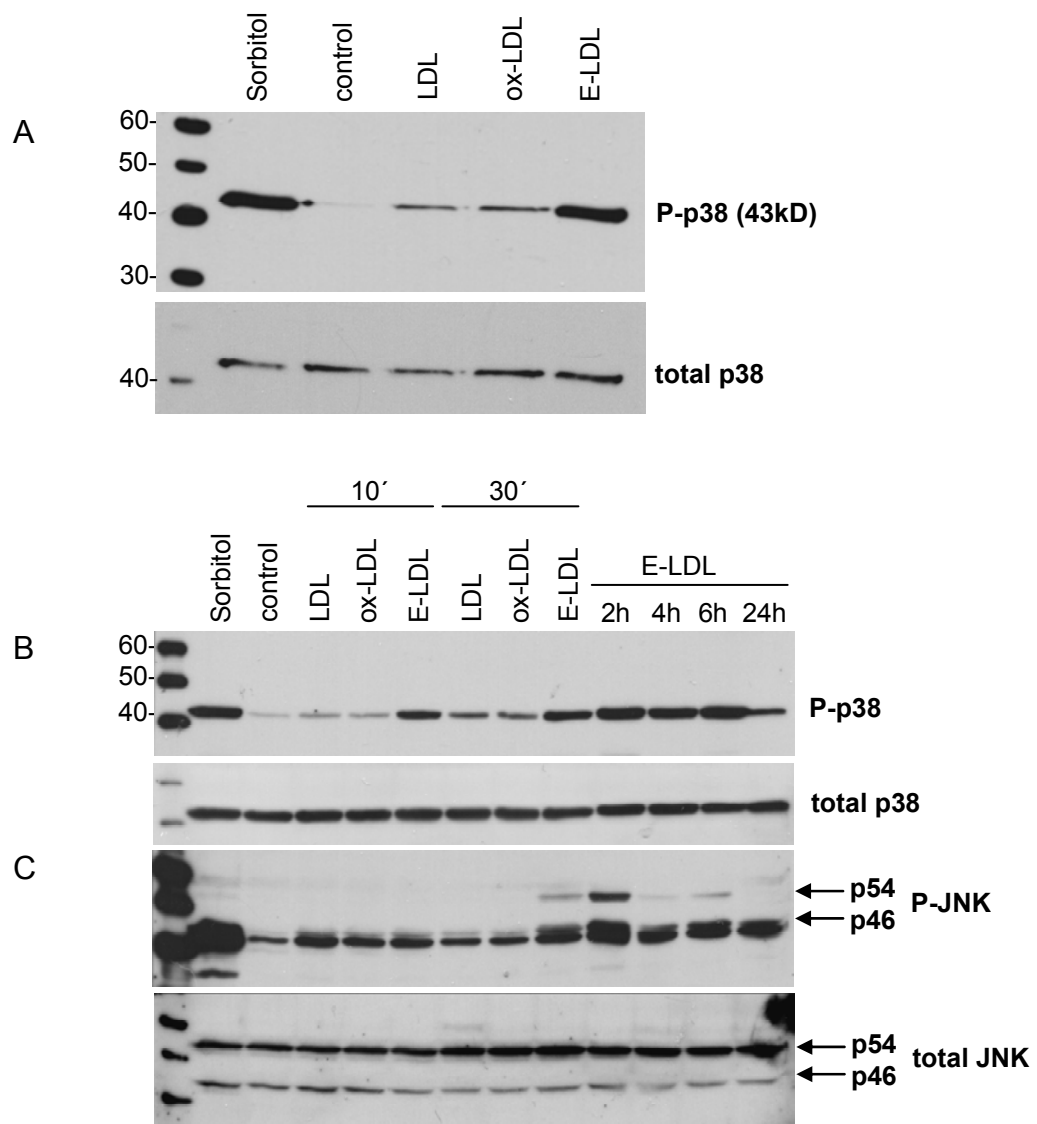


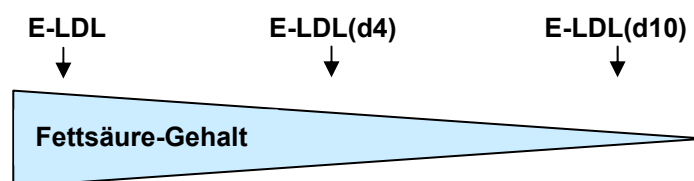
Abb. 34: Behandlung von HAoEC (A) bzw. Eahy926-Zellen (B,C) für 10' bis 24h mit 100µg/ml der Lipoproteine; positiv-Kontrolle: Sorbitol 0,5M, 10'; (A,B): oberer Blot zeigt p38-Phosphorylierung; unterer Blot: gesamtes p38; (C): oberer Blot zeigt JNK-Phosphorylierung, unterer Blot gesamte JNK.

Die schnelle p38-Aktivierung entsprach zunächst nicht unseren Erwartungen, denn bisher gingen wir davon aus, dass E-LDL als Partikel von den Zellen aufgenommen wird. Da dies ein langsamer Vorgang ist, rechneten wir erst zu einem späteren Zeitpunkt mit der Aktivierung der MAP-Kinasen. Im Folgenden sollte nun der Grund für diese frühzeitige p38-Phosphorylierung identifiziert werden.

Da die Behandlung von Eahy926-zellen mit E-LDL zu gleichen Ergebnissen führte wie die der primären Endothelzellen, wurden für die folgenden Experimente nur noch Eahy926-Zellen verwendet, da diese leichter zu handhaben sind.

4.1.2.2 Die p38-Aktivierung durch E-LDL ist fettsäure-abhängig

Da E-LDL im Vergleich zu LDL einen hohen Anteil an freien Fettsäuren besitzt, lag es nahe zu überprüfen, ob diese für die schnelle p38-Phosphorylierung zuständig sind. Durch Flotieren von E-LDL oder LDL nach Inkubation mit 4 bzw. 10% Albumin kann man die Fettsäuren aus den Partikeln entfernen. Die resultierenden Lipoprotein-Präparationen werden mit E-LDL(d) oder LDL(d) bezeichnet. Der Zusatz von 4% Albumin (E-LDL(d4)) reduziert den Fettsäuregehalt von E-LDL um 50%, die Zugabe von 10% Albumin (E-LDL(d10)) um 90%. Auch in LDL sind geringe Mengen an freien Fettsäuren vorhanden, diese werden ebenfalls bei der Herstellung von LDL(d10) entfernt (siehe Material und Methoden).



Die nach Behandlung mit E-LDL auftretende starke p38-Phosphorylierung konnte durch E-LDL mit reduziertem Fettsäuregehalt verringert werden. Inkubation von Endothelzellen mit E-LDL(d10) resultierte in einer 40% schwächeren p38-Aktivierung im Vergleich zu E-LDL. Auf gleiche Art hergestelltes LDL(d10) führte ebenfalls zu einer geringeren p38-Phosphorylierung als natives LDL. Hier reduzierte sich das P-p38 Signal um 70%. Dies spricht dafür, dass sich die schwache Aktivierung von p38

durch LDL ebenfalls auf die in LDL vorhandenen freien Fettsäuren zurückführen lässt. Zusätzlich konnte durch Behandlung der Endothelzellen mit Linolsäure (als wasserlöslicher Komplex in Methyl- β -Cyclodextrin) alleine eine p38-Aktivierung gezeigt werden. Als Kontrolle für die Behandlung mit Linolsäure diente der Carrier Methyl- β -Cyclodextrin.

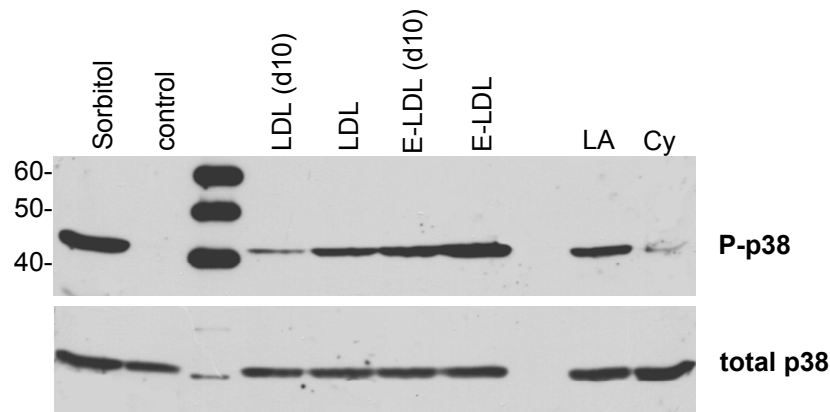


Abb. 35: Endothelzellen wurden für 10 Minuten behandelt mit 100 μ g/ml der entsprechenden Lipoproteine bzw. 100 μ M Linolsäure. Positiv-Kontrolle: Sorbitol 0,5M; negativ-Kontrolle: Methyl- β -Cyclodextrin. Der obere Blot zeigt p38-Phosphorylierung (anti-Phospho-p38-rabbit/anti-rabbit-HRP); der untere Blot zeigt gesamtes p38.

Nun sollten verschiedene im E-LDL enthaltene Fettsäuren auf ihre Fähigkeit, p38 zu aktivieren, untersucht werden. Neben Linolsäure wurden Arachidonsäure und Ölsäure getestet. Bei allen FFA ergab sich bereits nach 10Min Behandlung eine schnelle p38-Phosphorylierung, die nach 1h wieder abklang (s. Abb. 36). Der Grund für diese im Vergleich zu E-LDL (s. Abb. 34 B) nur kurzzeitige p38-Aktivierung könnte auf der geringeren Wirkung der Fettsäure/Methyl- β -Cyclodextrin Komplexe beruhen. Dass Fettsäuren in ihrer freien Form auch tatsächlich längerfristige Auswirkungen auf Endothelzellen haben, wird im Folgenden noch gezeigt.

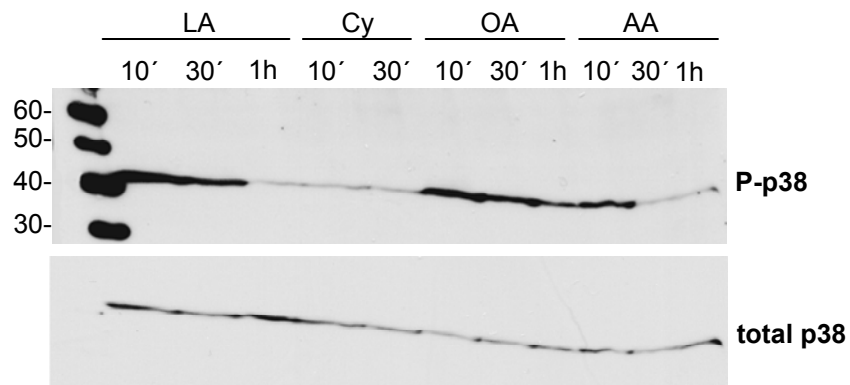


Abb. 36: Endothelzellen wurden für 10-60 Minuten behandelt mit 100 μ M Linolsäure (LA), Ölsäure (OA) und Arachidonsäure (AA). Als negativ-Kontrolle diente Methyl- β -cyclodextrin (Cy). Der obere Blot zeigt die p38-MAP Kinase Phosphorylierung, der untere Blot gesamtes p38.

Um einen weiteren Beweis dafür zu liefern, dass die Fähigkeit von E-LDL, p38 zu aktivieren, tatsächlich auf dem Gehalt an freien Fettsäuren beruht, wurden Rekonstitutions-Experimente durchgeführt. Zu flotiertem E-LDL (d4) und E-LDL d(10) gab man die entsprechende Menge Linolsäure hinzu, so dass wieder die ursprüngliche Linolsäure-Konzentration des E-LDL erreicht wurde. Diese Proben wurden mit R E-LDL (d4 bzw. d10) bezeichnet.

Nach Behandlung von Endothelzellen mit den jeweiligen Lipoproteinen zeigte sich, dass die Rekonstitution von flotiertem E-LDL sogar zu einer stärkeren p38-Phosphorylierung als E-LDL führte.

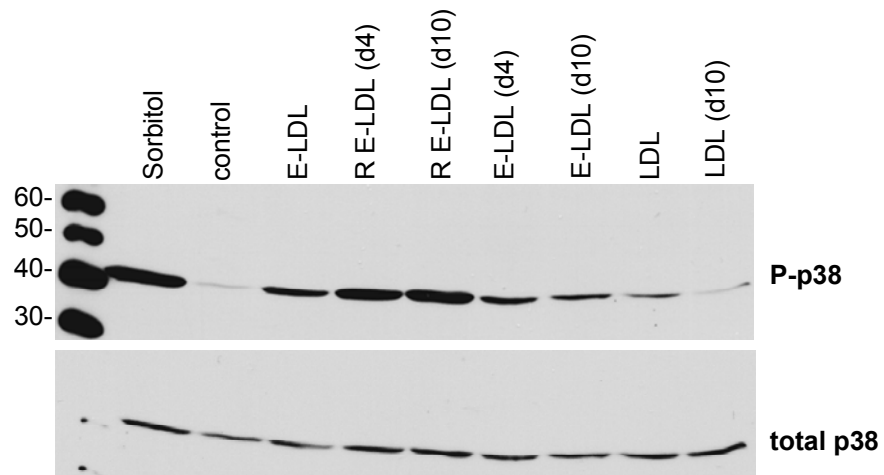


Abb. 37: Eahy926-Zellen wurden für 10Min mit 100 μ g/ml der entsprechenden Lipoproteine behandelt. Oberer Blot: p38-Phosphorylierung; Unterer Blot: gesamtes p38.

Aus diesen Experimenten wird deutlich, dass nicht die Aufnahme von E-LDL als Partikel für die schnelle Aktivierung der MAP-Kinasen verantwortlich ist, sondern dass wahrscheinlich die im E-LDL enthaltenen freien Fettsäuren innerhalb von 10 Minuten durch die Zellmembran „springen“ und Reaktionen in der Zelle auslösen.

4.1.3 E-LDL und FFA aktivieren ASK1

Mittlerweile stellte uns die Arbeitsgruppe Ichijo einen anti-Phospho-ASK1 (Thr845) Antikörper zur Verfügung, mit dem es nun möglich war, direkt die ASK1 Phosphorylierung zu zeigen. Wiederum musste in transfizierten Zellen gearbeitet werden, weil auch dieser Antikörper die geringen Mengen an endogenem P-ASK1 nicht erkennt. Da die 293-Zellen den Nachteil hatten, sich sehr schnell von den Zellkulturplatten abzulösen, was zu ungleichen Konzentrationen in den Proben führte, wurden für diese Experimente transfizierte Cos7 Zellen verwendet. Hier konnte ebenfalls eine gute Transfektionseffizienz erreicht werden.

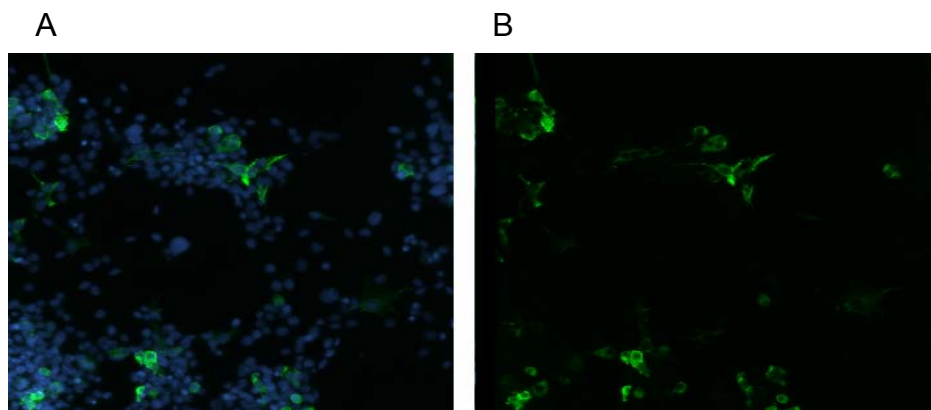


Abb. 38: Überprüfung der Transfektionsrate von Cos7-Zellen: Cos7-Zellen wurden mit 1µg/ml HA-pp5 transfiziert. Nach 48h erfolgte Immunfluoreszenz mit anti-HA-rat/anti-rat-FITC Antikörpern; (A) DAPI + FITC-Färbung; (B) nur FITC-Färbung

4.1.3.1 E-LDL aktiviert ASK1

FlagASK1 wurde in Cos7-Zellen transfiziert und diese für 10 Minuten mit den verschiedenen Lipoproteinen behandelt. Als Positiv-Kontrolle diente H_2O_2 , welches zu einer starken ASK1-Aktivierung führt. Auch durch E-LDL ist eine deutliche ASK1 Phosphorylierung zu sehen. Diese ist fast 9mal stärker im Vergleich zu LDL. Mit abnehmendem Gehalt an Fettsäuren im LDL bzw. E-LDL nimmt auch die Stärke der ASK1-Phosphorylierung ab. Durch E-LDL(d10) reduziert sich das Signal um ca. 50% im Vergleich zu E-LDL. Auch durch LDL(d10) wird das ohnehin schon schwache LDL-Signal weiter vermindert.

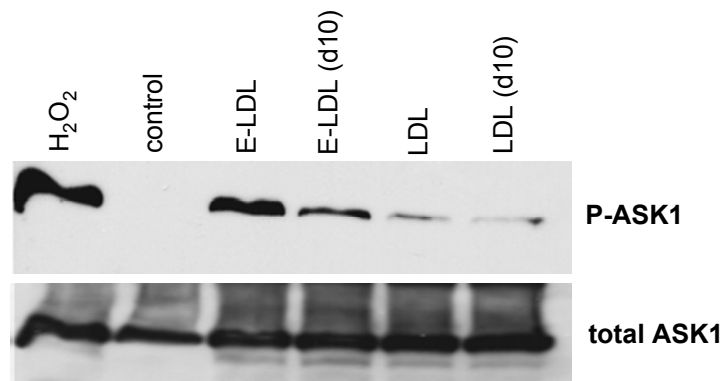


Abb. 39: Mit FlagASK1 transfizierte Cos7-Zellen wurden für 10 Minuten mit 100µg/ml der entsprechenden Lipoproteine behandelt. Positiv-Kontrolle: H₂O₂ 5mM. Oberer Blot: anti-Phospho-ASK1-rabbit/anti-rabbit-HRP; Unterer Blot: gesamtes ASK1.

4.1.3.2 Freie Fettsäuren aktivieren ASK1

Mit FlagASK1 transfizierte Cos7-Zellen wurden mit den verschiedenen Fettsäuren bzw. dem Carrier Methyl-β-Cyclodextrin als Kontrolle behandelt. Im Western Blot ist eine deutliche Aktivierung von ASK1 durch die Fettsäuren zu sehen. Die Quantifizierung der P-ASK1-Banden zeigte eine 3,3fache Zunahme der ASK1-Phosphorylierung durch LA und OA und eine 6fache Zunahme durch AA im Vergleich zur Kontrolle Methyl-β-Cyclodextrin.

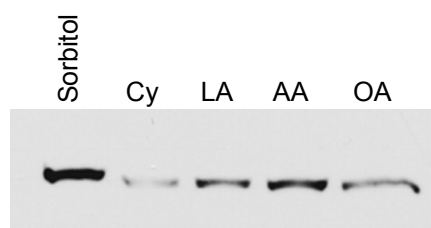


Abb. 40: Cos7-Zellen wurden mit 1µg/ml FlagASK1 transfiziert und für 10 Min mit Fettsäuren (100µM) bzw. Methyl-β-Cyclodextrin (Cy) behandelt. Positiv-Kontrolle: Sorbitol 0,5M. WB: anti-Phospho-ASK1-rabbit/anti-rabbit-HRP

4.1.4 Die Aktivierung von p38-MAP-Kinase durch E-LDL ist abhängig von ASK1

Nun sollte die Frage geklärt werden, ob die p38-MAP-Kinase Aktivierung durch E-LDL eine vorhergehende ASK1-Aktivierung benötigt. Um diese Abhängigkeit von ASK1 zu zeigen, musste ASK1 ausgeschaltet werden. Daraufhin sollte es nicht mehr möglich sein, p38 durch Behandlung mit E-LDL zu aktivieren.

4.1.4.1 siRNA vermittelte Genausschaltung

Die transiente Ausschaltung von ASK1 wurde mittels RNA-Interferenz (RNAi) erreicht. Mit dieser relativ neuen Methode gelingt auf einfache Art und Weise eine posttranskriptionale Gensuppression durch kurze, zur mRNA des Zielgens komplementäre doppelsträngige RNA-Stücke (dsRNA). Die Prozesse, die dabei intrazellulär ablaufen, sind zur Zeit noch nicht vollständig geklärt.

Entdeckt wurde die RNA-Interferenz in Pflanzen (Jorgensen 1990) und nachfolgend auch in *C. elegans* (Fire *et al.*, 1998), indem eine unerwartete Suppression von Genen durch eingeschleuste homologe Gene auftrat. Dieses Phänomen wurde als PTGS (*post-transkriptional gene silencing*) bezeichnet. In Insektenzellen identifizierte man wenig später kurze RNA-Bruchstücke als Auslöser der Gensuppression (Yang *et al.*, 2000; Elbashir *et al.*, 2001a). Daraufhin gelang dann die Übertragung des Prozesses auf Säugetierzellen (Caplen *et al.*, 2001; Elbashir *et al.*, 2001b).

Die Zellen werden im ersten Schritt entweder mit kurzen doppelsträngigen RNA-Stücke, den sog. siRNAs (*small interfering RNAs*) transfiziert, oder die dsRNA wird als längeres Molekül eingeschleust und anschließend von einem *Dicer* (RNase III-Enzyme) in kurze Fragmente prozessiert. Diese 19-21 bp-Fragmente sind komplementär zur mRNA des Zielgens. In der Zelle lagern sie sich in den sog. „*RNA-induced silencing complex*“ (RISC) ein (Hammond *et al.*, 2000). Dabei kommt es zur Aktivierung des RISC, der dann wahrscheinlich nur noch einen RNA-Strang enthält. Dieser Proteinkomplex lagert sich mit Hilfe der einsträngigen siRNA an die mRNA des Zielgens an und spaltet diese.

Zur Ausschaltung von ASK1 wurden drei chemisch synthetisierte siRNA's der Firma Ambion verwendet. Diese bestehen jeweils aus 19bp und liegen bereits in doppelsträngiger Form vor. Als Kontrolle dient eine unspezifische Negativ-Kontroll

siRNA, die gegen eine Nonsense Sequenz gerichtet ist. Die spezifischen Oligonukleotide sind zu drei verschiedenen Bereichen der mRNA von ASK1 komplementär:

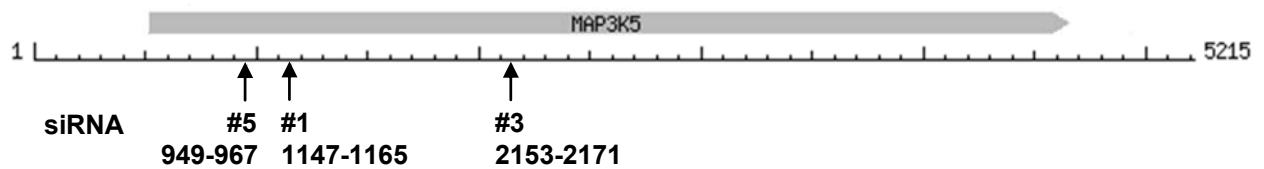


Abb. 41: Angriffspunkte der spezifischen siRNA's an der mRNA von ASK1

Um die Funktion der siRNA's zu überprüfen wurden sie einzeln und als Mix jeweils zusammen mit FlagASK1 cotransfiziert in Cos7-Zellen. Die Negativ-Kontroll siRNA wurde ebenfalls mit FlagASK1 cotransfiziert. Hierbei war keine Hemmung von ASK1 zu beobachten. siRNA #3 zeigte eine bessere Hemmung von ASK1 als siRNA #1 und #5. Am besten geeignet schien ein Mix der drei siRNA's, hier war die ASK1-Bande am schwächsten exprimiert.

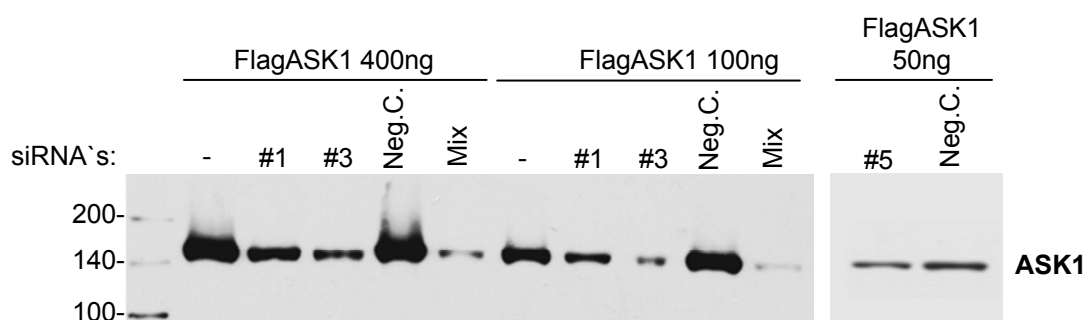


Abb. 42: Hemmung von ASK1 durch siRNA's; Cotransfektion von FlagASK1 (400, 100 bzw. 50ng) mit den einzelnen siRNA's (jew. 100nM), Negativ-Kontroll siRNA (100nM) und siRNA-Mix (insgesamt 100nM). Western Blot: 48h nach Transfektion mit anti-ASK1-F9-mouse/anti-mouse-HRP Antikörpern

4.1.4.2 Ausschaltung von ASK1 durch siRNAs verhindert die Aktivierung von p38-MAP Kinase durch E-LDL

Cos7-Zellen wurden mit einem Mix der drei siRNA's bzw. der Negativ-Kontroll siRNA transfiziert. Nach Behandlung mit E-LDL wurde die p38-Phosphorylierung im Western-Blot untersucht. Es zeigte sich, dass bei Transfektion der Negativ-Kontroll siRNA eine uneingeschränkte p38-Aktivierung durch E-LDL möglich war. Diese war bei Transfektion der siRNAs nicht zu sehen. Hierdurch geht hervor, dass bei Ausschaltung von ASK1 die MAP-Kinase p38 nicht durch E-LDL aktivierbar ist. ASK1 wird also für die p38-Aktivierung benötigt.

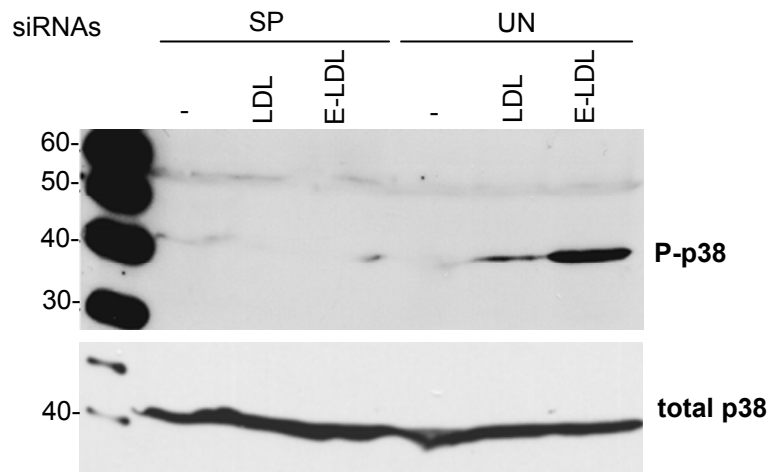


Abb. 43: Transfektion von Cos7-Zellen mit 100nM spezifischem siRNA-Mix (SP) bzw. 100nM unspezifischer Negativ-Kontroll siRNA (UN). 48h nach Transfektion wurde für 10 Minuten mit 100µg/ml E-LDL bzw. LDL behandelt. Oberer Blot: p38-Phosphorylierung; Unterer Blot: gesamtes p38.

Folgender Zusammenhang kann nun aus den bisher ermittelten Ergebnissen hergestellt werden:

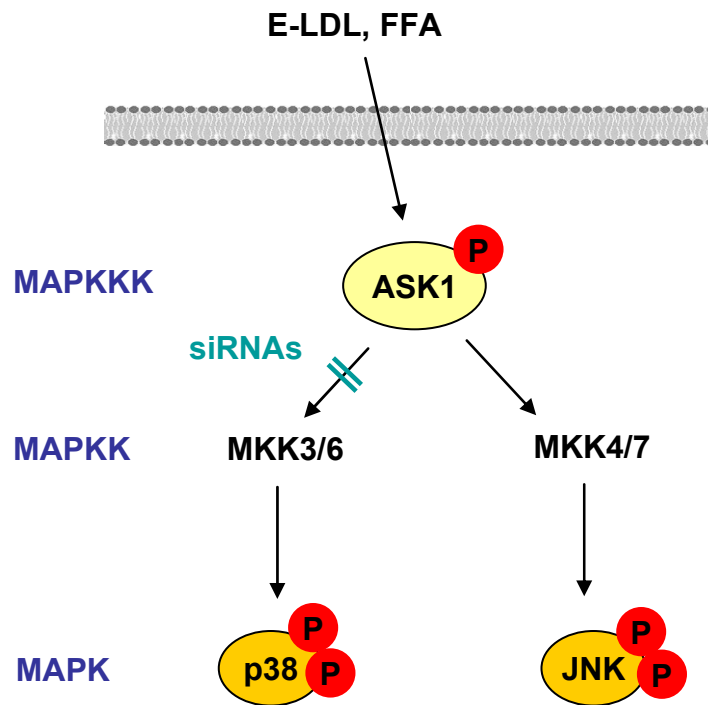


Abb. 44: E-LDL und FFA aktivieren die MAP-Kinase Kaskade

Nach Behandlung von Endothelzellen mit E-LDL bzw. FFA konnte bereits nach 10 Minuten eine ASK1-Aktivierung gezeigt werden. Via MKK3/6 bzw. MKK4/7 kommt es zu einer Phosphorylierung von p38 bzw. JNK. Die E-LDL induzierte p38-Aktivierung konnte durch Ausschaltung von ASK1 mittels RNAi verhindert werden.

4.2 E-LDL bzw. FFA induzieren Apoptose in Endothelzellen

Unter 4.1 wurde gezeigt, dass Behandlung von Endothelzellen mit E-LDL zur Aktivierung der MAP-Kinase Kaskade (ASK1, p38, JNK) führt. Bei Stimulation dieses Signalweges kann es zur Apoptose der Zellen kommen (Ichijo *et al.*, 1997; Saitoh *et al.*, 1998). Im Folgenden sollte daher untersucht werden, ob tatsächlich nach Behandlung mit E-LDL apoptotische Veränderungen der Endothelzellen auftreten.

Der Zelltod spielt bei der Embryogenese, Weiterentwicklung und Fortpflanzung langlebiger mehrzelliger Organismen eine wesentliche Rolle (Gluecksmann, 1951; Lockshin and Zakeri, 2001). Der Begriff „programmierter Zelltod“ wurde 1964 eingeführt und beinhaltet, dass der während der Entwicklung auftretende Zelltod nicht zufällig passiert, sondern einer Reihe von kontrollierten Schritten folgt, die zur lokalen und zeitlich begrenzten Selbstzerstörung führen (Lockshin, 1964).

Der Begriff „Apoptose“ wurde 1972 geprägt um die morphologischen Prozesse, die zur kontrollierten zellulären Selbstzerstörung führen, zu beschreiben (Kerr *et al.*, 1972).

Die Apoptose ist die häufigste Form des programmierten Zelltodes und besteht aus einer Abfolge von biochemischen und morphologischen Veränderungen. Zunächst schrumpfen die apoptotischen Zellen, zeigen Deformationen und verlieren den Kontakt zu benachbarten Zellen. Das Chromatin kondensiert und die Zelle wird schließlich fragmentiert in kompakte, membranumschlossene Strukturen, die apoptotische Körperchen genannt werden. Sie enthalten das Cytosol, das kondensierte Chromatin und Zellorganellen. Die apoptotischen Körperchen werden von Makrophagen phagozytiert, was eine sichere und nicht-entzündliche Entfernung der zellulären Reste erlaubt (Saraste and Pulkki, 2000).

Im Gegensatz dazu kommt es beim Zelltod durch Nekrose zu einer Zerstörung der Zellmembran. Die nekrotischen Zellen schwellen an und platzen, was zur unkontrollierten Freisetzung der Zellbestandteile führt. Dies resultiert in der Schädigung von benachbarten Zellen und einer starken Entzündung im umliegenden Gewebe (Leist and Jaattela, 2001).

Die Apoptose kann durch verschiedene extrazelluläre und intrazelluläre Faktoren ausgelöst werden, wie z.B. durch Bindung von Liganden an Zelloberflächen-Rezeptoren (FasL, TNF α), durch DNA-Schäden, die durch Defekte im Mechanismus

der DNA-Reparatur zustande kommen können, durch Behandlung der Zellen mit cytotoxischen Substanzen oder ionisierenden Strahlen, durch einen Mangel an Überlebens-Signalen (z.B. Wachstumsfaktoren) oder durch entwicklungsbedingte Zelltod-Signale.

Durch diese Signale wird eine Kaskade von Cystein-abhängigen-Aspartat-spezifischen Proteasen (Caspasen) induziert, die die Apoptose einleiten (Bratton, 2000). Nach Aktivierung von Initiator-Caspasen kommt es zur Spaltung und Aktivierung der stromabwärtsgelegenen Effektor-Caspasen (Caspase-3, -6 und -7), die wiederum zur Spaltung von cytoskelett- und nukleären Proteinen (Lamin A, PARP) führen und die Apoptose induzieren (Earnshaw *et al.*, 1999).

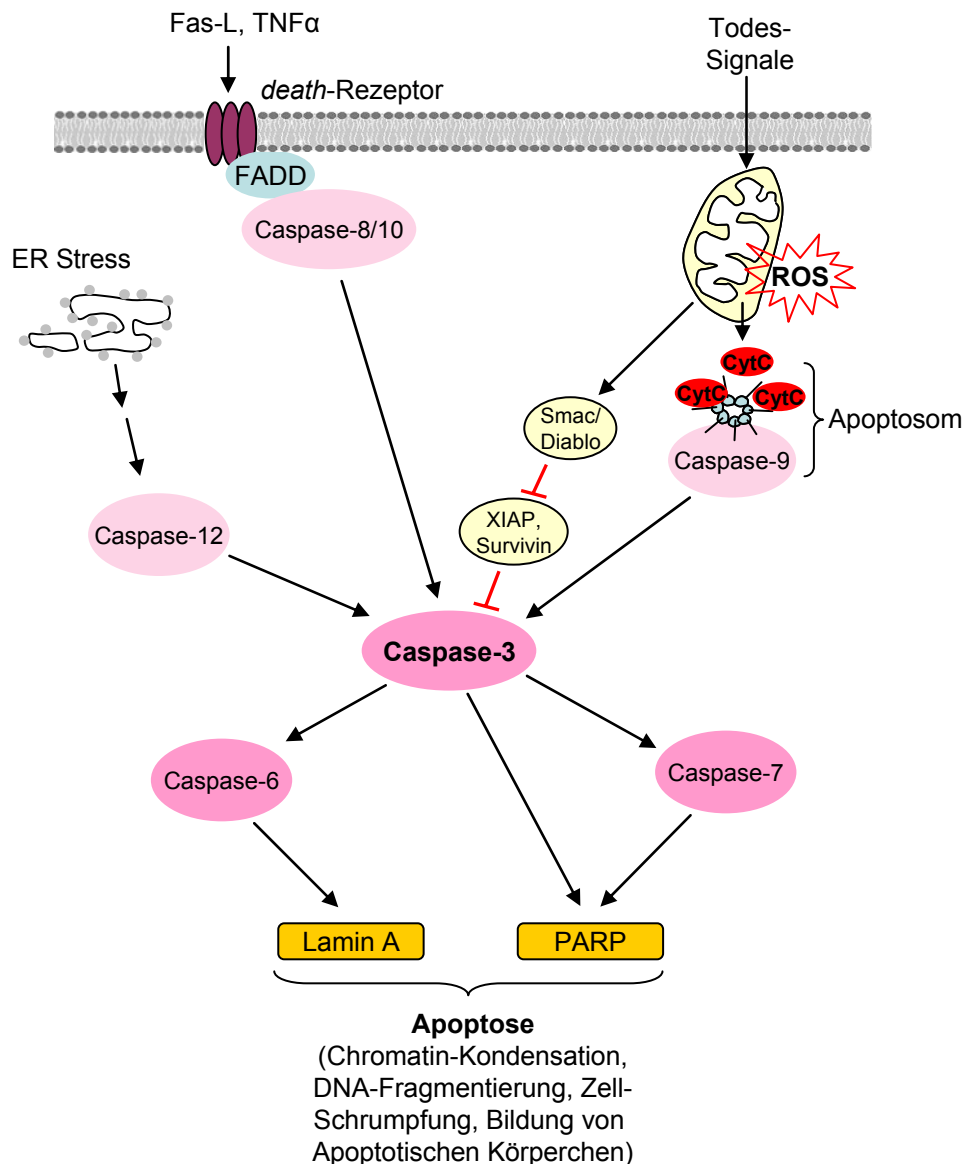


Abb. 45: Induktion von Apoptose über Caspasen-Aktivierung

Zur Familie der *Inhibitor of Apoptosis* Proteinen (IAP) gehören u.a. XIAP (*X-chromosome-linked inhibitor of apoptosis protein*) und Survivin, die an Caspasen binden und diese inaktivieren können (Deveraux *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1998). IAPs können ihre eigene und auch nach Bindung an Caspasen deren Ubiquitylierung katalysieren, was zur Degradation durch das Proteasom führt (Huang *et al.*, 2000). Diese direkte Hemmung der Caspasen durch die IAPs ist von hoher Bedeutung angesichts der Tatsache, dass die Caspasen-Kaskade irreversibel abläuft, sobald sie induziert wird. Sie muß also präzise reguliert werden, um unangebrachten Zelltod zu verhindern. Smac/Diablo ist ein mitochondriales Protein, das nach mitochondrialem Stress ins Cytoplasma freigesetzt wird und mit den Caspasen um die Bindung von IAPs konkurriert. Durch Interaktion von Smac/Diablo mit IAPs wird deren inhibitorischer Effekt auf die Caspasen aufgehoben (Du *et al.*, 2000).

4.2.1 E-LDL ist zytotoxisch

Zunächst wurden ATP-Messungen nach Behandlung von Endothelzellen mit E-LDL durchgeführt, um die zytotoxischen Eigenschaften von E-LDL, LDL und oxLDL zu untersuchen. Sowohl bei primären Endothelzellen (HAoEC, Abb. 46A) als auch bei Eahy926-Zellen (Abb. 46B) zeigte sich nach Behandlung mit LDL oder oxLDL kein bemerkenswerter ATP-Verlust. Zu einer deutlichen Abnahme des intrazellulären ATP-Gehalts kam es jedoch nach Behandlung mit E-LDL.

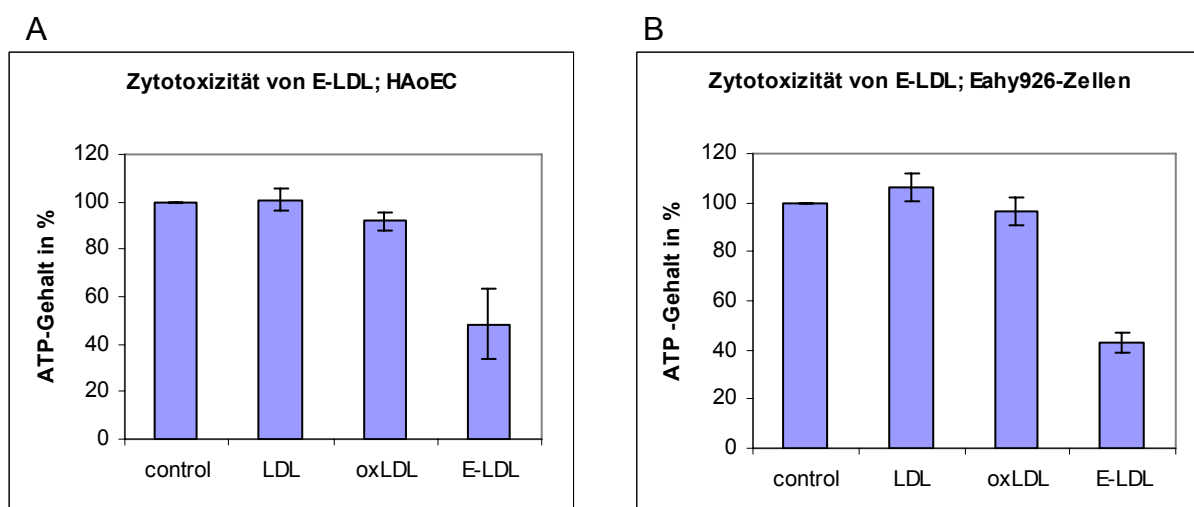


Abb. 46: HAoEC (A) bzw. Eahy926-Zellen (B) wurden 1h mit 100µg/ml der entsprechenden Lipoproteine in serumfreiem Medium behandelt. Dann folgte 3h Inkubation in Medium mit 1% FCS und anschließend ATP-Messung. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte (+/-SE) von 3 unabhängigen Experimenten.

In einem Dose-response Experiment zeigte sich sehr deutlich, dass die Abnahme des intrazellulären ATP-Gehalts proportional ist zur eingesetzten Dosis E-LDL.

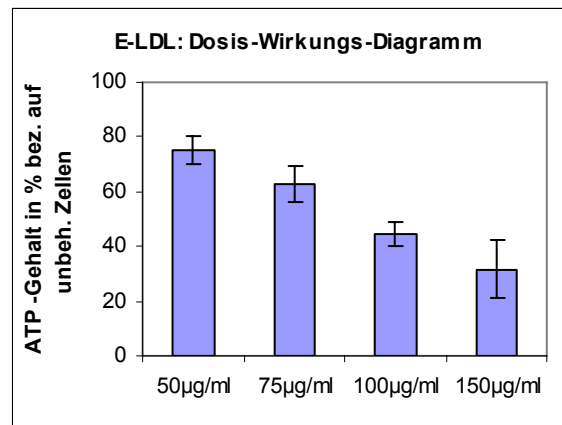


Abb. 47: Eahy926-Zellen wurden für 1h behandelt mit 50-150µg/ml E-LDL in serumfreiem Medium. Dann folgte 3h Inkubation in Medium mit 1% FCS und anschließend ATP-Messung. Angegeben sind die Mittelwerte (+/-SE) von drei unabhängigen Experimenten.

4.2.2 Oil-red O Färbung

Oil-red O ist ein lipidlöslicher Farbstoff, mit dem man Lipidablagerungen in der Zelle anfärben kann. Diese Methode wurde verwendet um zu untersuchen, welche intrazellulären Veränderungen nach Behandlung mit E-LDL bzw. LDL auftreten. Hierfür wurden Endothelzellen mit E-LDL(d4) oder LDL für 10 Minuten behandelt. Nach dreimaligem Waschen und weiteren 30 Minuten Inkubation in reinem Medium wurden die Zellen fixiert und anschließend mit dem Farbstoff versetzt.

Es ist deutlich zu erkennen, dass sich bei den Zellen, die mit E-LDL(d4) behandelt wurden, viele Lipidtröpfchen anfärben lassen (Abb. 48A). Bei LDL-behandelten Zellen sind nur sehr wenige, kleine Tröpfchen zu erkennen (Abb. 48B), die auch bei unbehandelten Zellen auftreten. Die Behandlungsdauer betrug nur 10 Minuten, d.h. innerhalb dieser kurzen Zeit werden Bestandteile des E-LDL von Zellen aufgenommen.

Bei Zugabe von Fettsäuren (LA, OA oder AA) können ebenfalls schon nach 10 Min Behandlung viele Lipidtröpfchen angefärbt werden (Daten hier nicht gezeigt). Dies spricht dafür, dass es die freien Fettsäuren sind, die von E-LDL auf die Zellen übertragen werden und sich intrazellulär in Lipidtröpfchen ablagern.

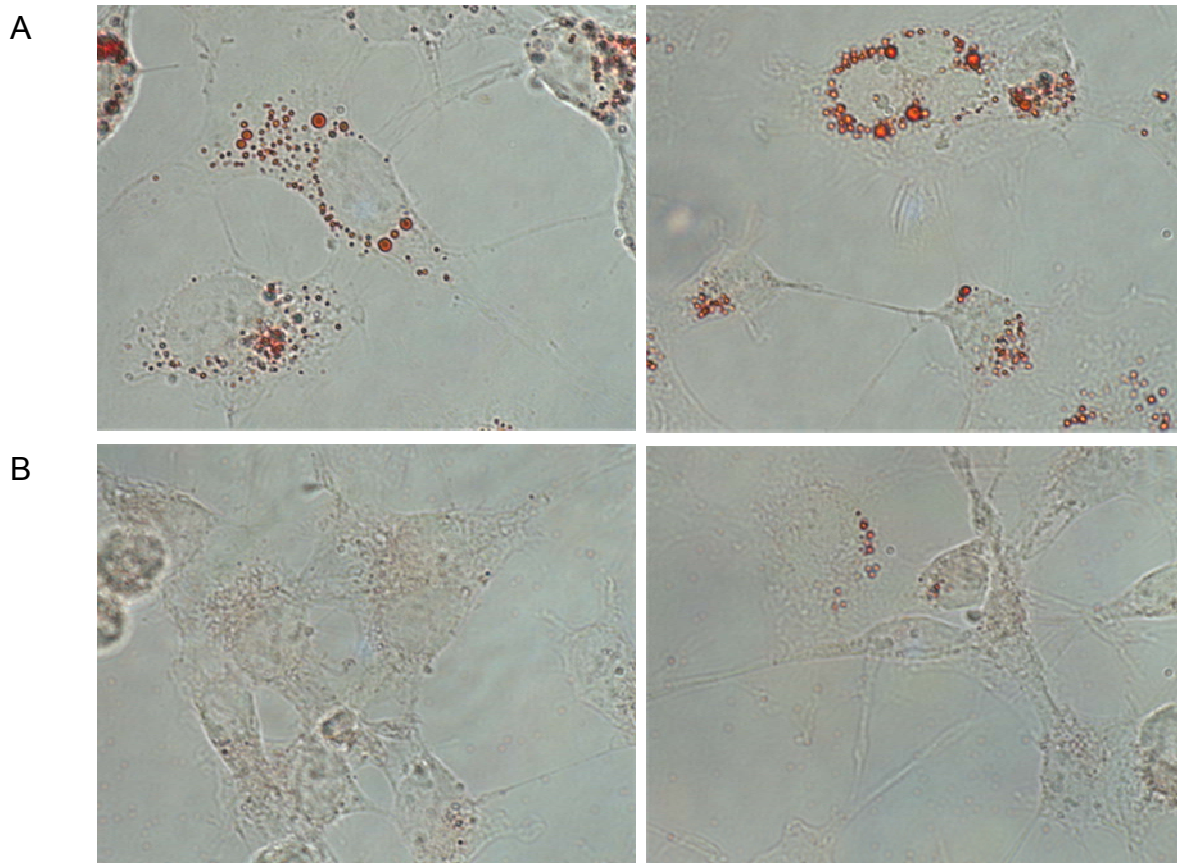


Abb. 48: Eahy926-Zellen wurden für 10 Min mit 100 μ g/ml E-LDL(d4) (A) und LDL (B) behandelt. Nach weiteren 30 Min Inkubation in reinem Medium wurden die Zellen fixiert und mit Oil-red O angefärbt. Fotos: 100x Vergrößerung

4.2.2 Annexin-V-Färbung

Behandlung von Endothelzellen mit E-LDL führt schon nach 10 Minuten zu einer positiven Annexin-V-Färbung, d.h. Phosphatidylserin, das bei nicht-apoptotischen Zellen nur an der Innenseite der Zellmembran lokalisiert ist, ist zur Außenseite der Membran gewandert, wo es von Annexin-V gebunden wird. Die GFP-Markierung des Annexin erlaubt eine Analyse mittels Fluoreszenzmikroskopie.

Bei E-LDL behandelten Zellen sieht man deutliche Grünfärbungen entlang der Zellmembran von an Phosphatidylserin gebundenem Annexin. Diese treten bei Behandlung mit LDL nicht auf.

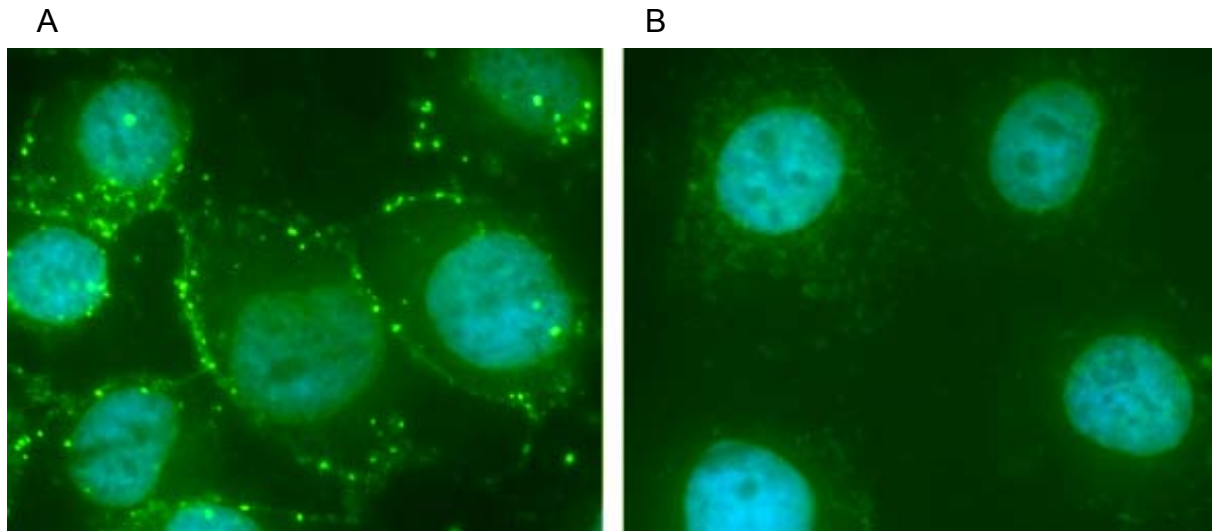


Abb. 49: Eahy926-Zellen wurden für 10 Minuten behandelt mit 200µg/ml E-LDL (A) bzw. LDL (B). Anschließend wurde die Annexin-V-Färbung inkl. DAPI-Färbung durchgeführt.

4.2.3 E-LDL aktiviert Caspase-3 und -7

Bei der Induktion der Apoptose spielt die Aktivierung von Caspasen eine wichtige Rolle. Caspasen sind Cystein-Proteasen, die bei Aktivierung durch proapoptotische Signale zu einer Spaltung von cytoskelett- oder nukleären Proteinen führen. Die katalytische Aktivität der Caspasen hängt ab von einer bestimmten Cystein-Stelle in einer hochkonservierten pentapeptid-Sequenz im aktiven Zentrum der Enzyme. Die Caspasen werden in der Zelle zunächst in ihrer inaktiven Form als pro-Caspasen synthetisiert, die am N-Terminus eine pro-Domäne gefolgt von einer großen und kleinen Untereinheit tragen. Bei der Aktivierung kommt es zur Spaltung der pro-Caspasen zwischen den beiden Untereinheiten und zur Entfernung der pro-Domäne. Ein Heterotetramer bestehend aus zwei großen und zwei kleinen Untereinheiten bildet dann die aktive Caspase.

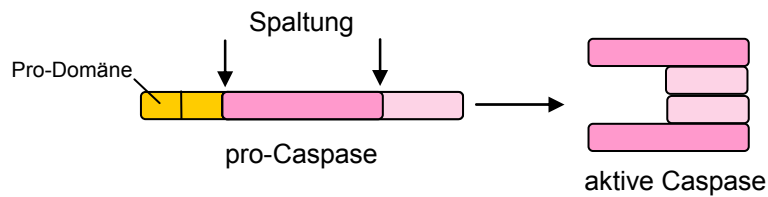


Abb. 50: Aktivierung der pro-Caspasen

Die pro-apoptotischen Caspasen können in zwei Gruppen eingeteilt werden, die Initiator-Caspasen (pro-Caspasen-2,-8,-9,-10) und die Effektor-Caspasen (pro-Caspasen-3,-6,-7). Während die Effektor-Caspasen nur kurze pro-Domänen besitzen, tragen die Initiator-Caspasen lange pro-Domänen, die entweder *death effektor* Domänen (pro-Caspase-8,-10) oder *caspase-recruitment* Domänen (pro-Caspase-2,-9) enthalten. Über diese pro-Domänen binden die Initiator-Caspasen an *death inducing signaling* Komplexe. Diese entstehen bei der Aktivierung von Zelloberflächen-Todesrezeptoren (z.B. Fas-Rezeptor; extrinsischer Apoptose-Signalweg) oder werden durch intrazelluläre Signale (Störung der mitochondrialen Funktion; intrinsischer Apoptose-Signalweg) gebildet (Sartorius *et al.*, 2001).

In Endothelzellen sollte nun eine Aktivierung von Effektor-Caspasen-3/-7 nach Behandlung mit E-LDL festgestellt werden. Als Methoden hierfür kamen zum einen die Fluoreszenz-Mikroskopie von einzelnen Zellen und zum anderen ein Chemilumineszenz-Assay einer gesamten Zellpopulation in Frage.

4.2.3.1 Caspase-Färbung

Die Caspase-Färbung beruht auf der Bindung eines zellpermeablen, fluoreszenzmarkierten Inhibitors an die bereits aktive Caspase-3/7. Liegen die Caspasen in nicht-aktiver Form vor, so kann keine Bindung des Inhibitors erfolgen und er wird beim Waschen wieder entfernt.

Nach Behandlung von Endothelzellen mit E-LDL ist eine deutliche Caspasen-Aktivierung zu erkennen (grün fluoreszierende Zellen, Abb. 51A). Bei LDL und

oxLDL- behandelten Zellen trat keine Grünfärbung auf, d.h. hier fand keine Caspasen-Aktivierung statt und es kam nicht zur Bindung des Inhibitors.

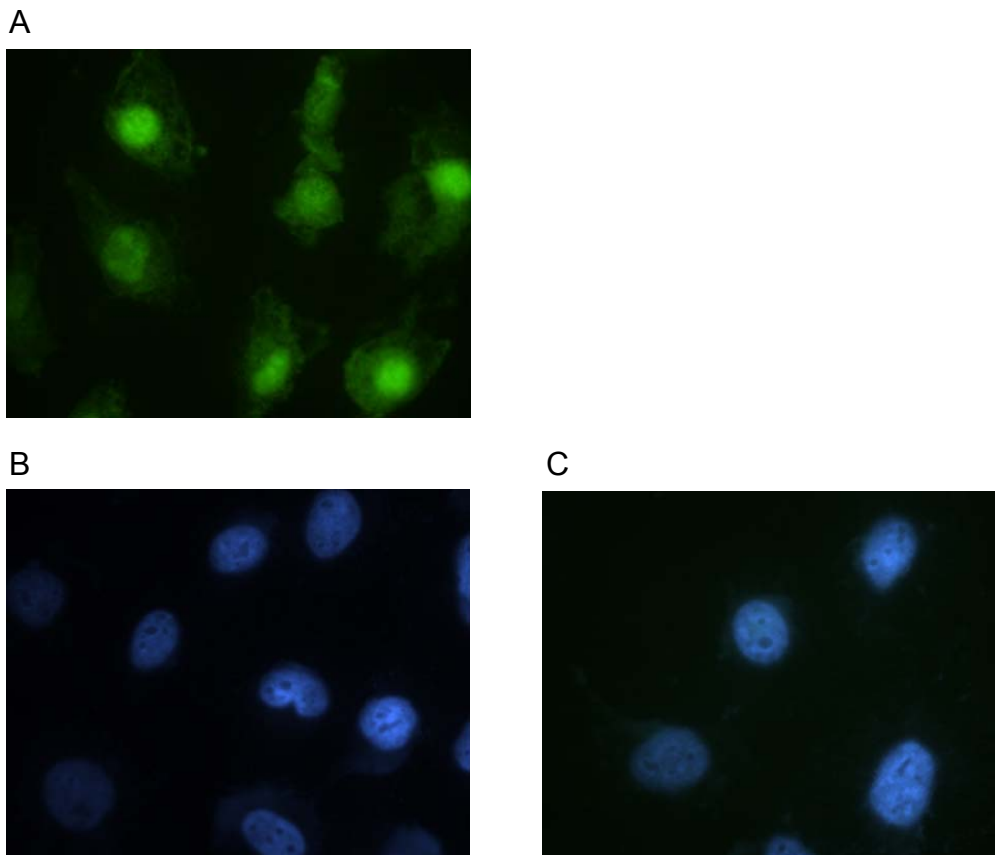


Abb. 51: Eahy926-Zellen wurden für 1h mit 100µg/ml E-LDL (A), LDL (B) und oxLDL (C) behandelt. Nach 3h Inkubation in normalem Medium wurde die Caspase-Färbung durchgeführt. Anschließend folgte Fixierung der Zellen und DAPI-Färbung der Zellkerne.

4.2.3.2 Caspase-Assay

Die Caspase 3/7-Aktivierung durch E-LDL konnte mit einem weiteren Assay gezeigt werden. Hierbei wurde nicht der Zustand von einzelnen Zellen, sondern der der gesamten Zellpopulation untersucht. Die Behandlung der Zellen mit E-LDL war identisch zu der bei der Caspase-Färbung. Lyse der Zellen und Chemilumineszenz-Reaktion (Abspaltung von Luciferin aus einem prälumineszierenden Substrat durch Caspasen und anschließende Luciferase-Reaktion) fanden in einem Schritt statt.

Mit LDL und oxLDL behandelte Zellen zeigen keine Caspasen-Aktivierung. E-LDL führt zu einem starken Signal. Auch hier ist die Fettsäure-Abhängigkeit der Aktivierung zu erkennen: Behandlung der Zellen mit flotiertem E-LDL (d4 bzw. d10) reduziert das Signal.

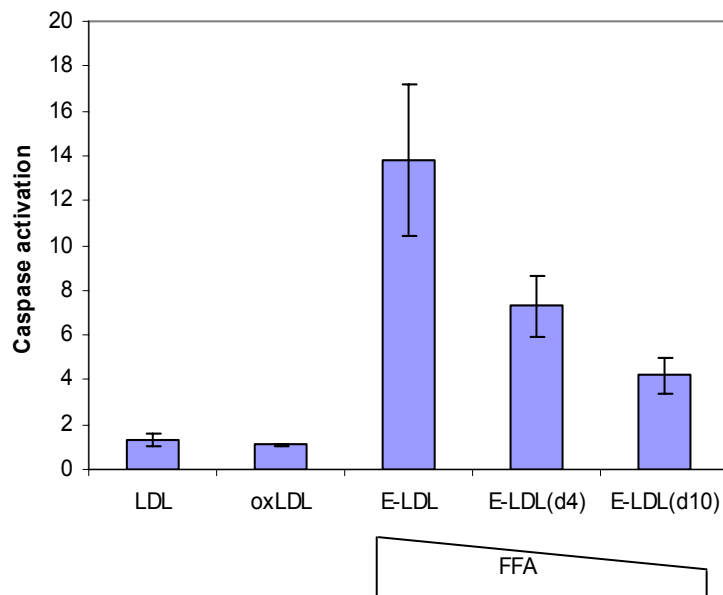


Abb. 52: Eahy926-Zellen wurden für 1h mit 100µg/ml der entsprechenden Lipoproteine in serumfreiem Medium behandelt. Dann folgte 3h Inkubation in Medium mit 1% FCS und anschließend Durchführung des Caspase-Assays. Angegeben sind die Mittelwerte (+/-SE) von drei unabhängigen Experimenten in x-facher Aktivierung bezogen auf unbehandelte Zellen.

4.2.4 Behandlung von Endothelzellen mit E-LDL oder FFA führt zu positiver TUNEL-Färbung

Zur Detektion von apoptotischen Zellen nach Behandlung mit E-LDL wurde eine TUNEL-Färbung (*Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick-End Labeling*) durchgeführt. 3'-OH Enden von DNA-Strangbrüchen, die in apoptotischen Zellen auftreten, werden mit Fluorescein-12-dUTP markiert. Apoptotische Zellen sind also anhand einer grünen Fluoreszenz zu erkennen.

Endothelzellen wurden in Chamberslides ausgesät und mit E-LDL, LDL, oxLDL und Linolsäure (freie Säure) behandelt. Grün fluoreszierende apoptotische Zellen waren nur nach Behandlung mit E-LDL und Linolsäure zu erkennen. Hier kam es auch zu morphologischen Veränderungen der Zellkerne, die nach LDL und oxLDL-Behandlung ebenfalls nicht in Erscheinung traten.

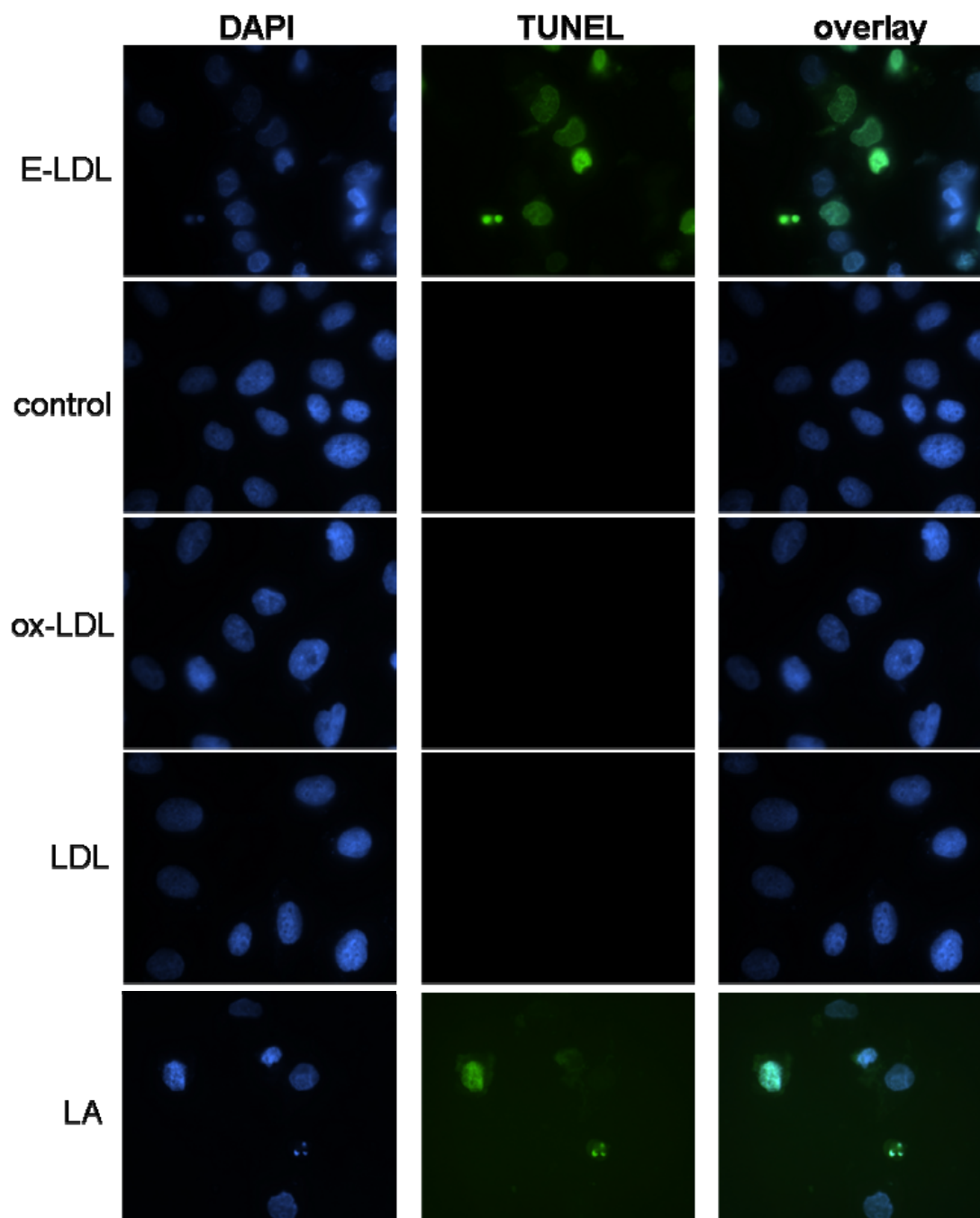


Abb. 53: Eahy926-Zellen wurden für 16h behandelt mit 75 μ g/ml E-LDL (A), oxLDL (C), LDL (D) und 0,3 μ M Linolsäure, freie Säure (E). Dann folgte TUNEL-Färbung inklusive DAPI-Färbung der Zellkerne.

4.2.5 Behandlung von Endothelzellen mit freien Fettsäuren führt zur Fragmentierung von PARP

Ein weiteres Merkmal von apoptotischen Zellen ist die Spaltung des Enzyms poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) durch Caspasen. Dieses Enzym ist für die Reparatur von DNA-Schäden verantwortlich. Wenn es durch Caspasen gespalten wird und seine Reparatur-Funktion nicht mehr ausüben kann, trägt dies zur Irreversibilität der Apoptose bei. Da wie oben gezeigt eine Caspasen-Aktivierung nach Behandlung mit E-LDL stattfindet, sollte nun untersucht werden, ob es nachfolgend auch zur Spaltung von PARP kommt. Dies lässt mit einem gegen ein 85kD Fragment des gespaltenen PARP-Enzyms gerichteten Antikörper detektieren. Zunächst wurden Endothelzellen mit verschiedenen Konzentrationen an Fettsäuren behandelt. Erst bei einer Konzentration von 0,3 μ M ist eine deutliche p85-PARP Fragment Bande zu sehen. Beim Ernten dieser Zellen fiel auf, dass sie schon morphologisch verändert waren. Sie hatten sich abgerundet, waren aber noch nicht vollständig von der Zellkulturplatte losgelöst.

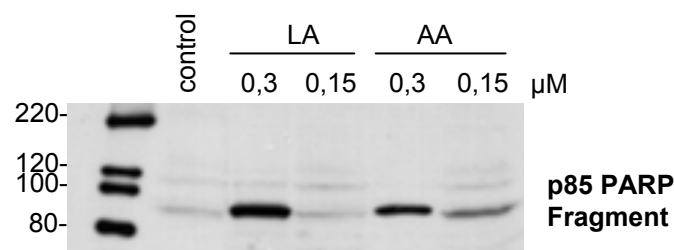


Abb. 54: Eahy926-Zellen wurden für 16h mit 0,15 bzw. 0,3 μ M LA oder AA (freie Säuren) behandelt. WB: anti-PARP p85 Fragment rabbit Antikörper/anti-rabbit-HRP.

4.2.6 Hemmung von ASK1 bzw. p38-MAP Kinase verhindert die E-LDL-induzierte Apoptose in Endothelzellen

Die oben gezeigte Induktion der Apoptose durch E-LDL bzw. FFA ist normalerweise ein irreversibler Schritt für die Zelle. Um herauszufinden, ob es möglich ist, durch Unterbrechung der Signalkaskade die Zellen vor dem programmierten Zelltod zu retten, wurde ASK1 mittels RNAi ausgeschaltet bzw. p38-MAP Kinase mit dem Inhibitor SB203580 blockiert.

4.2.6.1 Ausschaltung von ASK1 hemmt die Caspasen-Aktivierung durch E-LDL

Mittels Transfektion der spezifischen siRNAs gegen ASK1 wurde in Cos7-Zellen eine transiente Ausschaltung von ASK1 erreicht. Bei Behandlung mit E-LDL kam es hierbei nicht zu einer Aktivierung der Caspase-3/7. Diese war bei Transfektion der Negativ-Kontroll siRNA jedoch uneingeschränkt möglich. LDL und oxLDL – Behandlung führte wie schon gezeigt nicht zu einer Caspasen-Aktivierung.

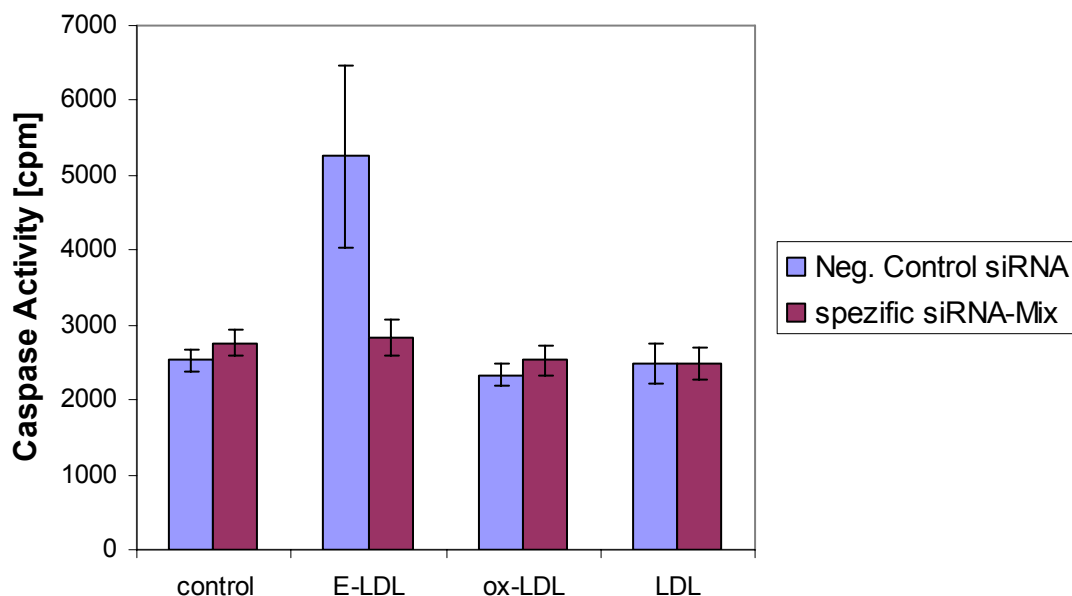


Abb. 55: Cos7-Zellen wurden mit 100nM spezifischem siRNA-Mix bzw. mit der Negativ-Kontroll siRNA transfiziert. 48h nach Transfektion wurde 1h mit 100µg/ml der entsprechenden Lipoproteine behandelt. Dann folgte 3h Inkubation in normalem Medium und anschließend Caspase-Assay. Die Daten repräsentieren Mittelwerte (+/-SE) von 2 unabhängigen Experimenten in je 6-facher Ausführung.

4.2.6.2 Ausschaltung von ASK1 verhindert PARP-Spaltung durch E-LDL bzw. FFA

In Cos7-Zellen konnte weiterhin gezeigt werden, dass es bei Ausschaltung von ASK1 mittels siRNAs zu einer reduzierten PARP-Spaltung kommt.

Bei Transfektion der Negativ-Kontroll siRNA sind starke Banden des p85 PARP-Fragments zu sehen. Bei Hemmung von ASK1 durch die spezifischen siRNAs zeigen sich nur noch schwache p85-PARP Banden. Da die Transfektionseffizienz der Cos7-Zellen wie oben erwähnt nur 20-40% beträgt, lässt sich das Signal nicht vollständig unterdrücken. Als Kontrollantikörper für gleiche Beladung des Gels wurde ein GAPDH-Antikörper (Glycerinaldehyd-phosphat Dehydrogenase) verwendet.

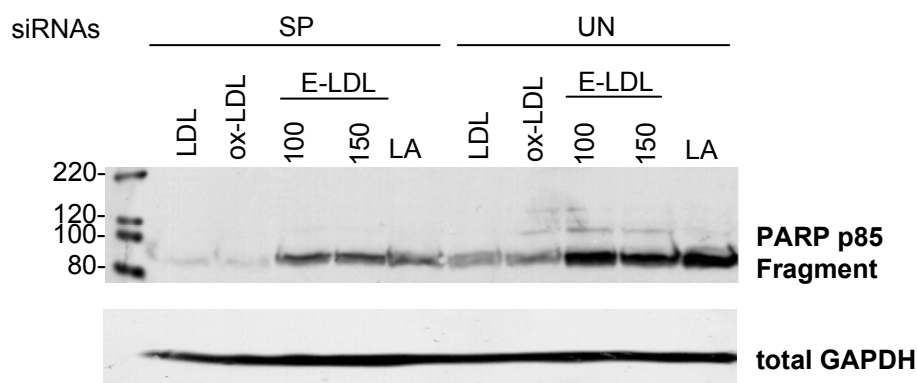


Abb. 56: Cos7-Zellen wurden mit 100nM siRNA-Mix bzw. Negativ-Kontroll siRNA transfiziert. 48h nach Transfektion fand für 16h eine Behandlung mit 100-150µg/ml E-LDL, LDL, oxLDL und 0,3µM LA statt. Oberer Blot: anti-PARP p85 Fragment rabbit Antikörper/anti-rabbit-HRP; unterer Blot: anti-GAPDH-mouse/anti-mouse-HRP.

4.2.6.3 Hemmung von p38-MAP Kinase mit SB203580 führt zu geringerem ATP-Verlust bzw. verminderter Caspasen-Aktivierung nach E-LDL Behandlung

Die Rolle von p38 wurde sowohl bei der Caspase-Aktivierung als auch bei Cytotoxizitäts-Experimenten (ATP-Messung) nach Behandlung von Endothelzellen mit E-LDL untersucht. Es stellte sich heraus, dass p38 eine zentrale Bedeutung für diese beiden Ereignisse zukommt. Bei Hemmung von p38 mit dem Inhibitor SB203580 zeigte sich, dass sowohl die Caspase-Aktivierung durch E-LDL als auch

der ATP-Verlust reduziert waren. Hemmung von p38-MAP Kinase rettet also die Zellen vor Apoptose.

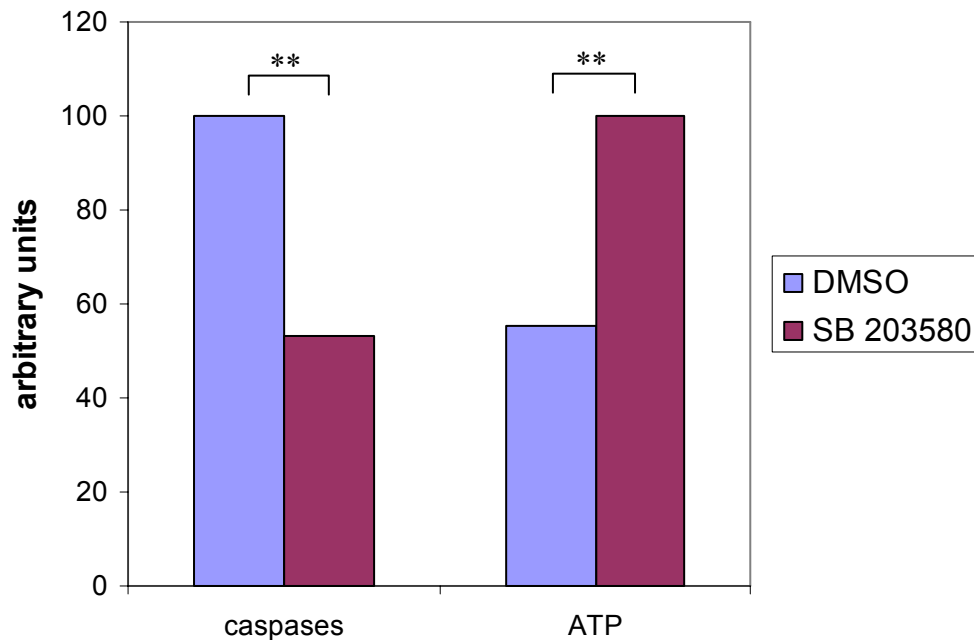


Abb. 57: Effekt von SB203580 auf ATP-Verlust bzw. Caspasen-Aktivität. Eahy926-Zellen wurden jeweils 2h mit 20 μ M SB203580 vorbehandelt. Als Kontrolle diente die entsprechende Menge DMSO. Die Behandlung mit E-LDL (100 μ g/ml, 1h) und die anschließende Inkubation in Medium (3h) erfolgten ebenfalls unter Zusatz von SB bzw. DMSO. Die Daten repräsentieren die Mittelwerte von 6 unabhängigen Experimenten (Caspase-Aktivierung: $p=0,058$ für Inhibitor vs. DMSO; Cytotoxizität: $p=0,025$ für Inhibitor vs. DMSO).

Es wurde weiterhin versucht, eine Abhängigkeit der Caspasen-Aktivierung von JNK zu zeigen. Durch Hemmung der JNK mit dem Inhibitor SP600125 konnte allerdings keine Blockade der Caspasen-Aktivierung festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Dies könnte auf die nur kurzzeitige Aktivierung der JNK zurückzuführen sein, der in diesem Fall anscheinend andere Aufgaben als die Auslösung der Apoptose zukommen.

Wenn man also die MAP-Kinase Signal Kaskade bei ASK1 oder auch bei p38 unterbricht, können die Zellen vor dem programmierten Zelltod gerettet werden. Bei Blockade von ASK1 oder p38 kommt es nicht zu ATP-Verlust, Caspasen-Aktivierung und PARP-Spaltung.

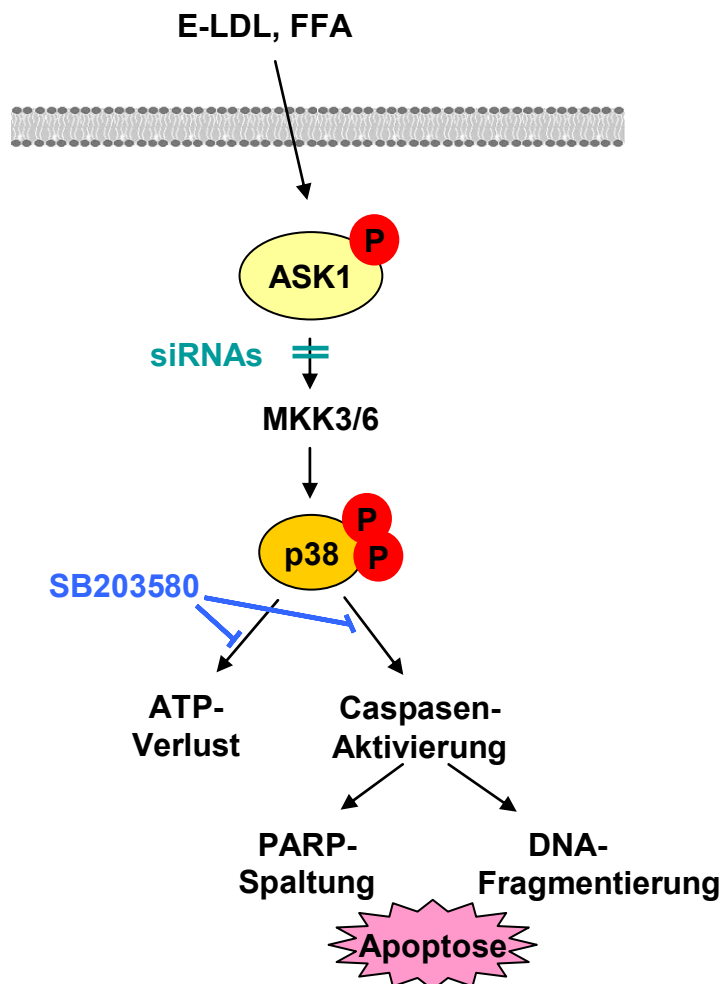


Abb. 58: Hemmung der Apoptose bei Blockade von ASK1 bzw. p38

4.3 E-LDL verursacht oxidativen Stress in Endothelzellen

Oxidativer Stress bedeutet die Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) nach Einwirkung von bestimmten Substanzen wie z.B. TNF α auf Zellen. Zu den ROS zählen Superoxidradikal-Anionen ($O_2^{\cdot-}$), H_2O_2 und Hydroxylradikale (HO^{\cdot}). In Endothelzellen können bei der Bildung der ROS verschiedene Enzyme beteiligt sein, wie z.B. die Xanthin Oxidase, die NO-Synthase, die Cyclooxygenase, die Lipoxigenase oder die NADPH-Oxidoreduktase. Auch durch Autooxidation oder als Nebenprodukt der Atmungskette können ROS entstehen (Bayraktutan *et al.*, 2000).

Von den oben genannten Enzymen ist hauptsächlich die NADPH-Oxidoreduktase für die ROS-Bildung verantwortlich. In neutrophilen Granulozyten generiert sie große Mengen (mM) an Superoxid-radikal Anionen während des *oxidative burst*. Entstehendes H_2O_2 dient z.B. zur Abtötung von Bakterien oder zur Regulation der Produktion von Cytokinen über NF- κ B abhängige Mechanismen. Die NADPH-Oxidase besteht aus einer membrangebundenen Cytochrom-Einheit und vier cytosolischen Untereinheiten (Thrasher *et al.*, 1994; Leusen *et al.*, 1996). Erst bei Stimulierung des Enzyms erfolgt Translokation der cytosolischen Komponenten an das Cytochrom (=aktiver Zustand). In nicht-stimulierten Zellen ist das Enzym inaktiv.

In Endothelzellen dagegen ist die NADPH-Oxidase konstitutiv aktiv, d.h. auch in nicht-stimulierten Zellen, aber auf viel geringerem Level (Pagano *et al.*, 1997; Griendling *et al.*, 1998). Der Grund hierfür beruht wahrscheinlich auf Isoformen der Untereinheiten, die weniger aktiv sind (Bayraktutan *et al.*, 2000).

Der Effekt der ROS ist ein shift des zellulären Redox-potentials. Ein Indikator hierfür stellt das Verhältnis von reduziertem bzw. oxidiertem Glutathion dar (GSSG / 2 GSH) dar. Eine Gemeinsamkeit der neutrophilen und der vaskulären NADPH-Oxidase besteht in ihrer Aktivierbarkeit durch Arachidonsäure (Griendling *et al.*, 1998).



Abb. 59: Generierung von ROS durch die NADPH-oxidase

Die Superoxidradikal-Anionen haben eine sehr geringe steady state Konzentration (n-pM), deshalb können sie nur lokale Effekte ausüben. Der Hauptteil wird durch nicht-enzymatische Dismutation außerhalb der Zellen in H_2O_2 umgewandelt. Intrazellulär katalysiert die Superoxid-Dismutase, die nur in sehr geringer Konzentration vorliegt (μM) die Umsetzung von $\text{O}_2^{\cdot-}$ zu H_2O_2 . Wasserstoffperoxid ist sehr diffusionsfähig und relativ unreaktiv. Es kann schnell in Zellen eindringen, auch wenn es außerhalb entsteht. Die Elimination von H_2O_2 erfolgt durch die Catalase (aus Peroxysomen) oder durch die GSH-peroxidase (in Cytosol und Mitochondrien).

Als wichtigste Auswirkungen der ROS sind zum einen die oxidative Abspaltung von redox-empfindlichen Inhibitoren wie z.B. Thioredoxin von proapoptotischen Enzymen, zum anderen die Effekte von freien Radikalen auf lange Fettsäure-Seitenketten von Lipiden in der Zellmembran zu nennen. Durch Übertragung von H^+ -Ionen von der Fettsäure auf die freien Radikale und anschließender Anlagerung von O_2 kommt es zur Bildung von Peroxid-radikalen, wodurch z.B. eine Vernetzung von benachbarten Fettsäure-Seitenketten herbeigeführt werden kann. Infolgedessen kommt es zur Schädigung der Membranen.

4.3.1 Messung des *oxidative burst* mit Luminol und Cytochrom C

In Endothelzellen sollte nun gezeigt werden, ob durch Behandlung mit E-LDL ein oxidativer Stress ausgelöst wird. Die Messung der ROS ist prinzipiell mit Luminol oder Cytochrom C möglich. Beide Methoden erwiesen sich in diesem Falle jedoch als ungeeignet.

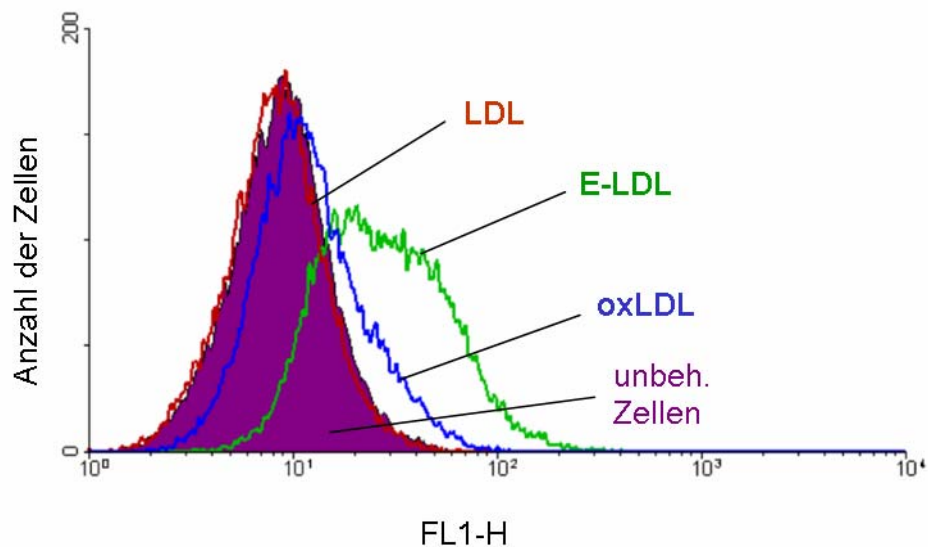
Bei der Luminol-Methode wird H_2O_2 detektiert. Dieses oxidiert Luminol und es entsteht ein chemilumineszierendes Produkt. Anhand einer H_2O_2 Verdünnungsreihe konnte allerdings nur eine H_2O_2 -Konzentration oberhalb von $5\mu\text{M}$ gemessen werden. Die Methode ist also nicht sensitiv genug, um die geringen Mengen an eventuell entstehendem H_2O_2 zu detektieren.

Bei der CytochromC-Methode werden Superoxidradikal-Anionen detektiert. Diese reduzieren CytochromC ($\text{Fe}^{3+}\text{CytC} + \text{O}_2^{\cdot-} \rightarrow \text{Fe}^{2+}\text{CytC} + \text{O}_2$) und es kommt zu einer Absorptionzunahme bei 550nm. Man ermittelt dann die Differenz zu 540nm. Es stellte sich jedoch heraus, dass E-LDL selbst bei 550nm eine eigene Absorption zeigte, die die Messung störte.

4.3.2 Messung des *oxidative burst* mit Dichlorofluorescein (DCF)

Mittels DCF war es möglich, entstehende ROS nach Behandlung von Endothelzellen mit E-LDL zu detektieren. Der Farbstoff liegt zunächst in einer zellpermeablen, nicht-fluoreszierenden Form vor. Nach intrazellulärer Esterspaltung kann er durch ROS zu einer stark fluoreszierenden Form oxidiert werden (siehe Material und Methoden). Durch FACS-Analysen konnte der oxidierte, fluoreszierende Farbstoff als nach rechts verschobene Kurve von der nicht-oxidierten Form unterschieden werden. Eine deutliche Zunahme der Fluoreszenz konnte nach Behandlung der Zellen mit E-LDL gezeigt werden, die bei LDL nicht auftrat (Abb. 60A). Ox-LDL führte zu einer schwachen Fluoreszenz. Außerdem war es möglich, eine fettsäure-abhängige Zunahme des oxidierten Farbstoffs festzustellen. E-LDL verursachte eine starke Oxidation, E-LDL(d4) eine etwas schwächere, während die Kurve von E-LDL(d10) sich nur wenig von der Kontrolle unterschied (Abb. 60B).

A



B

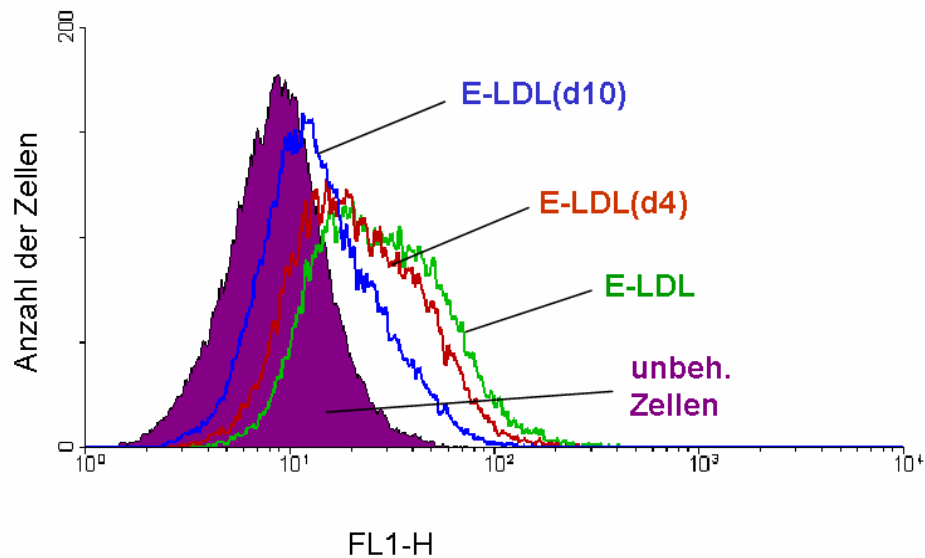


Abb. 60: Endothelzellen wurden 5 Minuten mit 5nM DCF inkubiert. Dann folgte Behandlung mit 100µg/ml E-LDL, LDL und oxLDL für 10Min. Nach Trypsinisieren und Fixieren der Zellen wurden die Proben im FACS analysiert.

4.3.3 NAC inhibiert Aktivierung von MAP-Kinasen durch E-LDL

Durch Vorbehandlung von Endothelzellen mit einem Antioxidanz bzw. Radikalfänger sollte versucht werden, die Aktivierung der MAP-Kinasen Kaskade durch E-LDL zu verhindern. N-Acetyl-Cystein (NAC) wurde in einer Konzentration von 30mM 1 Stunde vor Behandlung mit E-LDL bzw. LDL zugesetzt. Als Kontrolle für die antioxidative Wirkung des NAC wurden die Zellen mit 1mM H₂O₂ behandelt. Hierbei sollte eine deutliche Reduktion der Phosphorylierung von ASK1 bzw. p38 zu sehen sein. Als weitere Kontrolle diente Sorbitol. Da die Aktivierung der MAP Kinasen durch Sorbitol nicht über oxidativen Stress läuft, sollte hier die Phosphorylierung von ASK1 bzw. p38 nicht durch NAC zu reduzieren sein.

4.3.3.1 Vorbehandlung mit NAC verhindert Aktivierung von ASK1 durch E-LDL

Bei Zusatz von NAC ist eine deutliche Reduktion der H_2O_2 -induzierten ASK1-Phosphorylierung zu erkennen. Auch die durch E-LDL bzw. LA verursachte ASK1-Aktivierung wird bei Vorinkubation mit NAC unterdrückt.

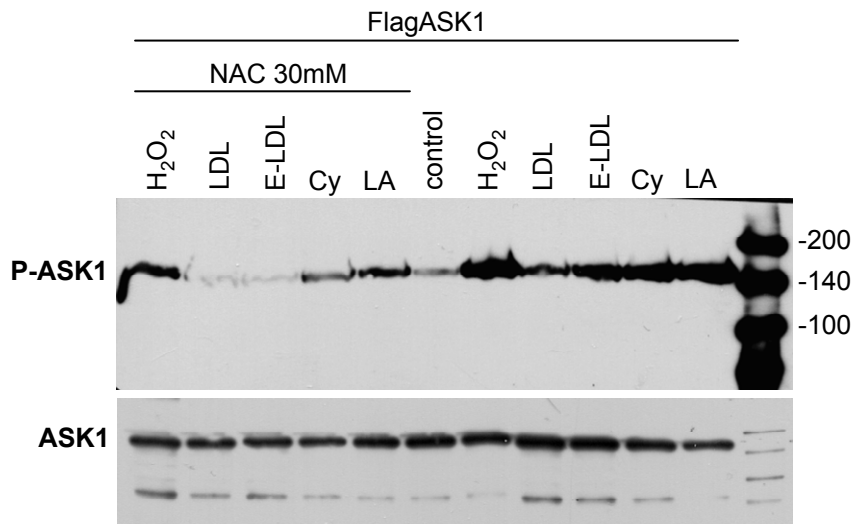


Abb. 61: Cos7-Zellen wurden mit 1 μ g/ml FlagASK1 transfiziert und 1h mit 30mM NAC (pH7,5) vorbehandelt. Anschließend folgte Behandlung mit E-LDL und LDL (100 μ g/ml) bzw. LA (100 μ M). Positiv-Kontrolle: H_2O_2 1mM; Oberer Blot: anti-Phospho-ASK1-rabbit/anti-rabbit-HRP; Unterer Blot: anti-ASK1-F9-mouse/anti-mouse-HRP

4.3.3.2 Vorbehandlung mit NAC verhindert Aktivierung von p38-MAP Kinase

Wie schon aus Abb.61 ersichtlich reduziert Zusatz von NAC auch die p38-Phosphorylierung durch E-LDL. Das durch H_2O_2 entstehende Signal wird ebenfalls durch NAC-Vorbehandlung vermindert. Bei Behandlung mit Sorbitol und NAC-Zusatz ist wie gewünscht ein starkes Signal zu sehen, da die p38-Aktivierung durch Sorbitol über osmotischen Schock und nicht über oxidativen Stress läuft.

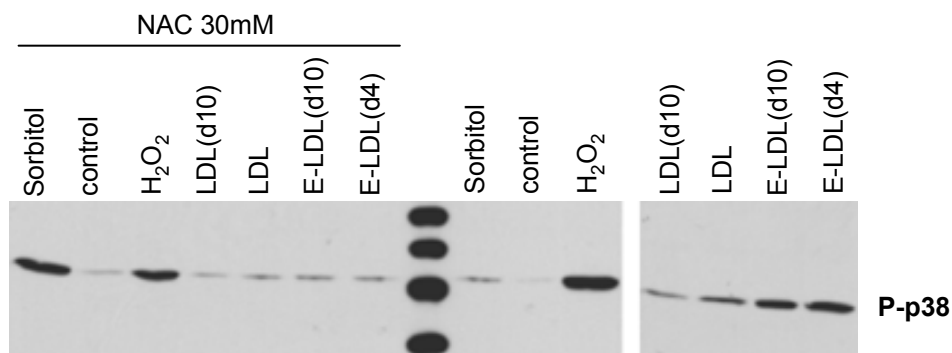


Abb. 62: Eahy926-Zellen wurden 1h mit NAC 30mM (pH 7,5) vorbehandelt. Dann folgte Zugabe von E-LDL bzw. LDL (100 μ g/ml). Positiv-Kontrollen: Sorbitol 0,5M und H_2O_2 1mM. WB: anti-Phospho-p38-rabbit/anti-rabbit-HRP

4.4 Effekt von E-LDL auf AP1 und NF- κ B

4.4.1 Allgemeines zu Reporterplasmiden

Um den Effekt von E-LDL auf stromabwärts der MAP-Kinase Kaskade gelegene Ziele wie AP1 bzw. NF- κ B zu untersuchen, wurden Reporterplasmide (*PathDetect Cis-Reporting Systems*; Stratagene) verwendet.

Sie enthalten Luciferase als Reporterogen, welches von einem basalen Promotorelement (TATA-Box) gesteuert wird. Diesem Promotor vorangestellt sind sich wiederholende Elemente, an die die Transkriptionsfaktoren binden.

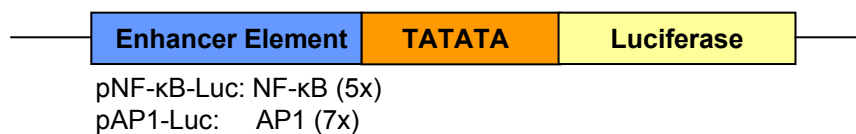


Abb. 63: Struktur der PathDetect Cis-Reporting System Plasmide pNF- κ B-Luc und pAP1-Luc (Quelle: Stratagene)

Durch extrazelluläre Signale wird die Aktivierung verschiedener intrazellulärer Moleküle wie z.B. Proteinkinasen und Phosphatasen ausgelöst. Viele dieser Signal-Transduktionswege enden in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren die an spezifische Elemente binden, die in den Promotoren von vielen verschiedenen Genen gefunden werden. Damit kommt es zur Modulation der Transkription dieser Gene.

In diesem Fall soll die Bindung von AP1 bzw. NF- κ B nach Behandlung der Zellen mit E-LDL an die in den Reporterplasmiden vorhandenen spezifischen Elemente untersucht werden. Bei vermehrter Bindung sollte es zu erhöhter Luciferase-Expression kommen, bei verringerter Bindung sollte eine abnehmende Luciferase-Aktivität messbar sein.

Weiterhin sollte der Einfluß von ASK1 auf beide Transkriptionsfaktoren untersucht werden. Hierzu fanden Cotransfektions-Experimente von FlagASK1 mit den jeweiligen Reporterplasmiden statt.

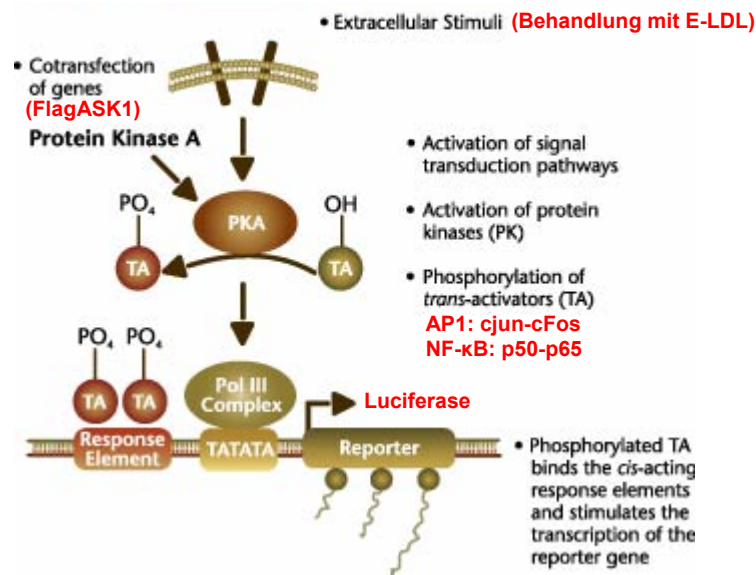


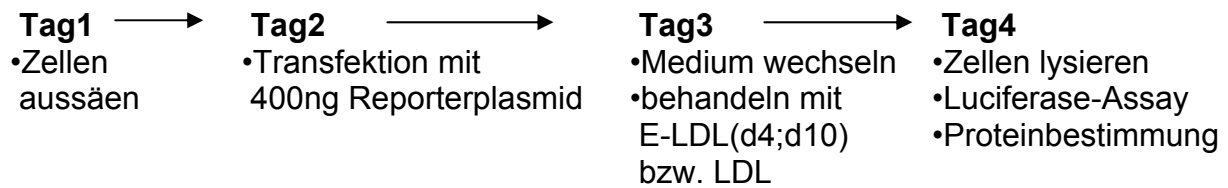
Abb. 64: Funktionsweise der Reporterplasmide (Quelle: Stratagene)

Die mit diesen Versuchen ermittelten funktionellen Daten sollen in Ergänzung zu bereits bestehenden Ergebnissen zur AP1-Aktivierung bzw. NF-κB-Hemmung durch E-LDL durchgeführt werden. D. Fenske zeigte in seiner Arbeit anhand von EMSA-Experimenten, dass E-LDL(d4) in Endothelzellen spezifisch die Aktivierung von NF-κB durch nachfolgende Stimulierung mit z.B. TNFα hemmt bei gleichzeitiger Aktivierung von AP1.

4.4.2 E-LDL aktiviert pAP1-Luc und hemmt pNF-κB-Luc

Die Versuche zur Aktivierung bzw. Hemmung der Reporterplasmide wurden sowohl in Endothelzellen als auch in der Makrophagen-Zelllinie J774 (Maus) durchgeführt. Letztere besaß den Vorteil, eine bessere Transkriptionseffizienz zu zeigen. Statt E-LDL wurde mit flotiertem E-LDL(d4) bzw. E-LDL(d10) gearbeitet, da diese weniger toxisch sind. Bei der langen Behandlungsdauer von 16h kam es mit unflotiertem E-LDL zu starken Zellschäden.

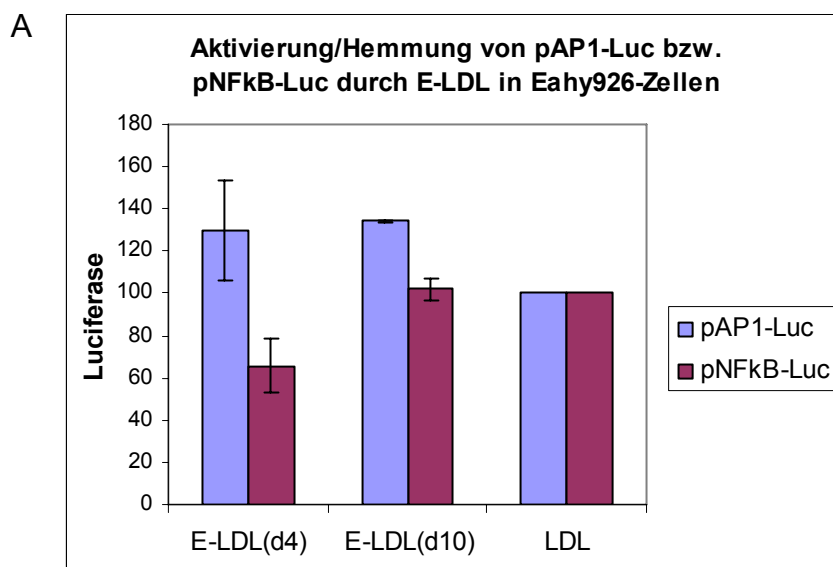
Die Versuche wurden nach folgendem Schema vorbereitet:



Die Effekte von E-LDL(d4) auf beide Reporterplasmide waren nicht sehr stark. Beide Reporterplasmide zeigten zudem relativ hohe Hintergrundwerte, was evt. auf die Transfektion zurückzuführen ist, ein Ereignis, dass für die Zelle Stress darstellt.

Es kam bei Endothelzellen zu einer Aktivierung von AP1 um 30% im Vergleich zu LDL (Abb. 65A), bei J774-Zellen war nur eine Aktivierung um 3% feststellbar (Abb. 65B). Behandlung mit E-LDL(d10) zeigte bei Endothelzellen eine vergleichbare AP1-Aktivierung wie E-LDL(d4) um ebenfalls 30% (Abb. 65A). In J774 Zellen erfolgte unter E-LDL(d10)-Behandlung eine stärkere Aktivierung von AP1 als unter E-LDL(d4), nämlich um 20% (Abb. 65B).

NF- κ B wurde in Endothelzellen durch E-LDL(d4) um 34% gehemmt im Vergleich zu LDL (Abb. 65A). Mit E-LDL(d10) behandelte Zellen zeigte keine Hemmung. In J774-Zellen konnte mit E-LDL(d4) nur 23% Hemmung erreicht werden, E-LDL(d10) verursachte nur 5% Hemmung (Abb. 65B).



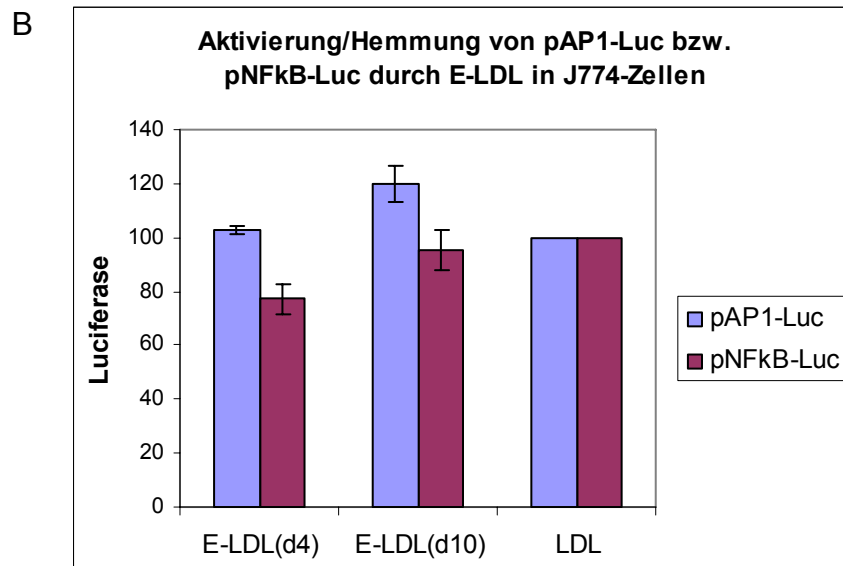


Abb. 65: Eahy926-Zellen (A) bzw. J774-Zellen (B) wurden mit 400ng der jeweiligen Reporterplasmide transfiziert. 24h nach Transfektion wurden die Zellen behandelt mit 75 μ g/ml (A) bzw. 100 μ g/ml (B) für 16h. Anschließend folgte Luciferase-Assay und Korrektur der Werte mittels Division durch den Proteingehalt der Zelllysate. Angegeben sind Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten als Aktivierung bzw. Hemmung der Reporterplasmide durch E-LDL im Vergleich zu LDL (=100%).

Die Unterschiede der NF- κ B-Hemmung bzw. AP1-Aktivierung durch E-LDL im Vergleich zu LDL sind nicht sehr groß, trotzdem unterstützen diese Daten die im Arbeitskreis bereits vorhandenen Ergebnisse.

4.4.3 Cotransfektion der Reporterplasmide mit FlagASK1

Bei Cotransfektion von FlagASK1 mit dem jeweiligen Reporterplasmid kam es zu einer AP1-Aktivierung während gleichzeitig NF- κ B gehemmt wurde. Die AP1-Aktivierung ist dadurch zu erklären, dass ASK1 eine stromaufwärts von AP1 gelegene Kinase ist. Bei Überexpression kommt es dadurch auch zu vermehrter AP1-Bildung.

pAP1-Luc konnte ca. 2,3fach durch FlagASK1 aktiviert werden im Vergleich zum Kontrollvektor pcDNA3. Gleichzeitig erfolgte eine Hemmung von pNF- κ B durch FlagASK1 um ca. 60%.

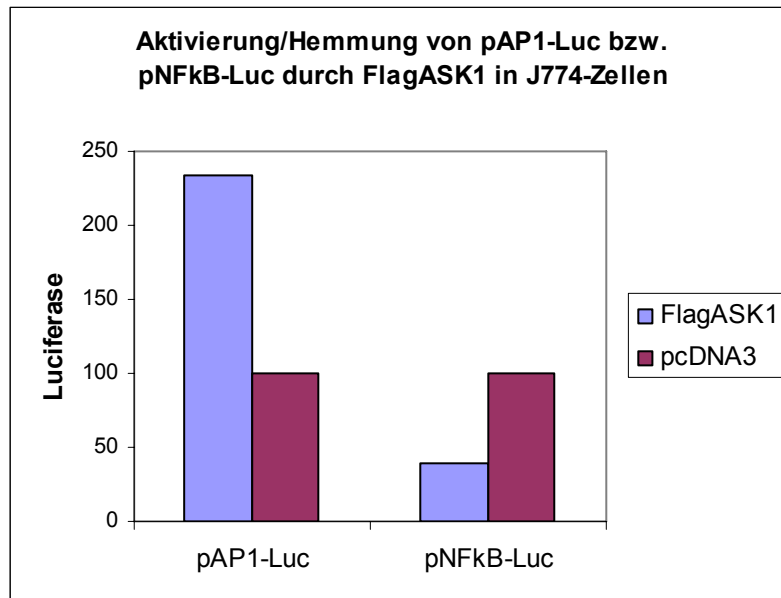


Abb. 66: Cotransfektion von 80ng FlagASK1 bzw. pcDNA3 mit 400ng des jeweiligen Reporterplasmids (Verhältnis 1:5) in J774-Zellen. Der Luciferase-Assay wurde 48h nach Transfektion durchgeführt. Angegeben sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten als Aktivierung bzw. Hemmung der Reporterplasmide durch FlagASK1 im Vergleich zu pcDNA3 (=100%).

Die Hemmung von NF- κ B beruht evtl. auf einer Wechselwirkung von ASK1 mit TAK1, einer MAPKKK welche unter anderem für eine Phosphorylierung, d.h. Aktivierung der IKK α / β zuständig ist. Die in von Mochida *et al.* beschriebene Hemmung von TAK1 durch ASK1 könnte verantwortlich dafür sein, dass die Aktivierung der IKK α / β durch diesen Weg verhindert wird und somit in den weiteren Schritten keine NF- κ B Aktivierung zustande kommt (Mochida *et al.*, 2000).

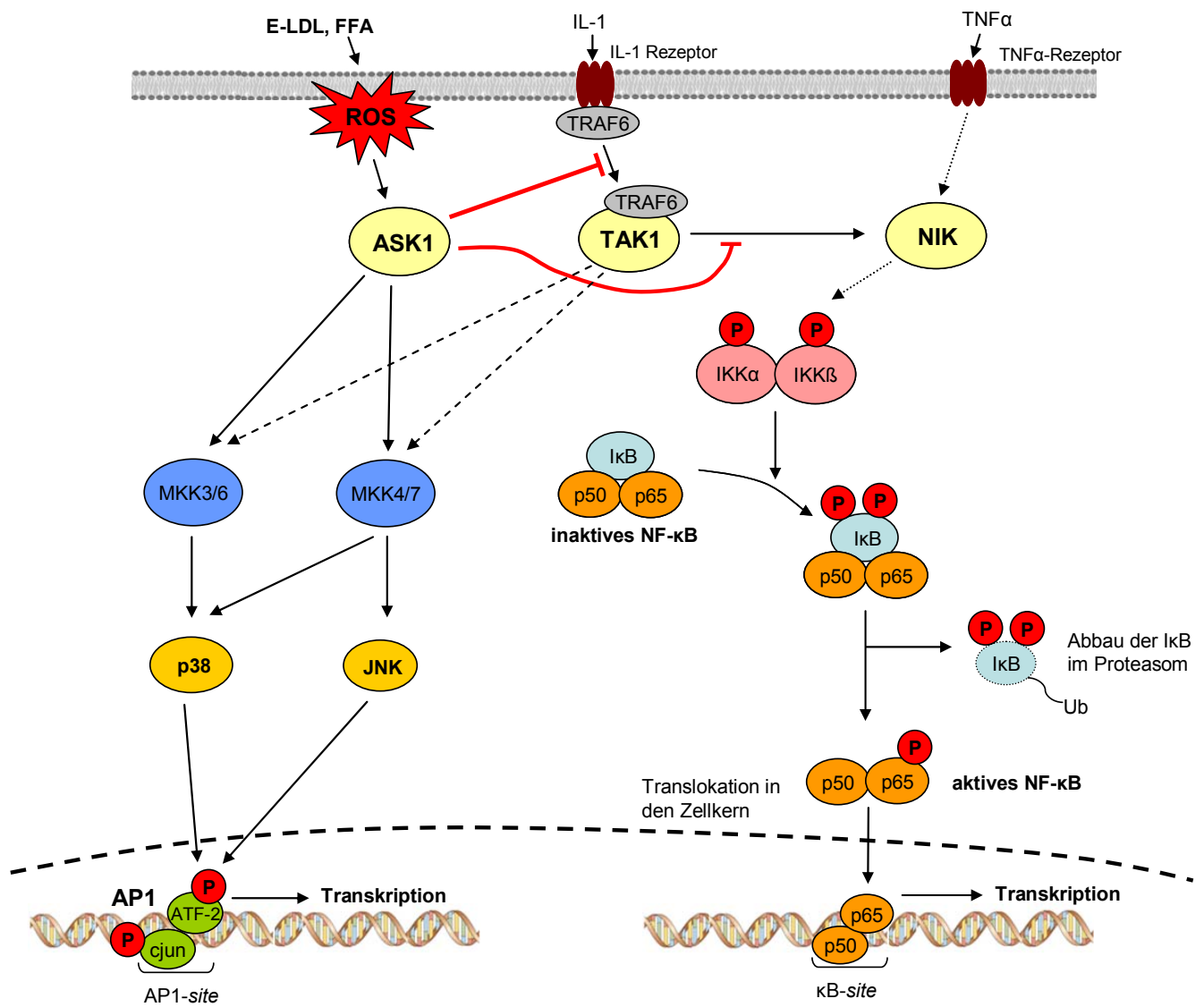


Abb. 67: Induktion von AP-1 bzw. Hemmung von NF-κB durch E-LDL über ASK1

4.5 Effekte von alpha-Toxin auf MAP-Kinasen

Neben der Atherosklerose beschäftigt sich unsere Arbeitsgruppe mit der Wirkung von alpha-Toxin auf HaCat-Zellen (humane Keratinozyten-Zelllinie). Bei Inkubation der HaCat-Zellen mit dem Toxin kommt es zunächst zu einem ATP-Verlust mit einem Tiefpunkt bei 2h, bevor eine Regeneration der Zellen begleitet von einem ATP-Wiederanstieg bei ca. 6h erfolgt. Die neuesten Befunde sprechen dafür, dass alpha-Toxin die Zellen zur Teilung anregt, obwohl bei einem Teil der Population die Apoptose über Caspasen-Aktivierung ausgelöst wird. In diesem Zusammenhang war es von Interesse zu prüfen, ob alpha-Toxin auch zu einer Aktivierung der MAPK-Kaskade (ASK1, p38, JNK) führen kann, wie es bei E-LDL der Fall ist.

4.5.1 Eigenschaften von alpha-Toxin

Alpha-Toxin, auch alpha-Hämolysin genannt, wird produziert von *Staphylococcus aureus* und kann zu Lyse von kernhaltigen Zellen wie Monozyten, Lymphozyten oder Endothelzellen sowie von Erythrozyten führen. Alpha-Toxin ist ein hydrophiles Polypeptid, das aus 293 Aminosäuren besteht und heptamere transmembrane Poren bildet. Die Membranpermeabilisation ist bedingt durch Konformationsänderungen des Oligomers, wodurch ein amphiphiler Charakter zustande kommt (Valeva *et al.*, 1996). Durch die Porenbildung entsteht ein Ungleichgewicht der Ionenkonzentration in der Zelle, verursacht durch einen Ausstrom von K^+ -Ionen. Dies führt u.a. zu einem ATP-Verlust der Zelle. In diesem Zusammenhang sollte zunächst der Effekt von alpha-Toxin auf die MAP-Kinase p38 untersucht werden. Die Mutante des alpha-Toxins bindet zwar an die Zellen, führt aber nicht zur Bildung einer Pore.

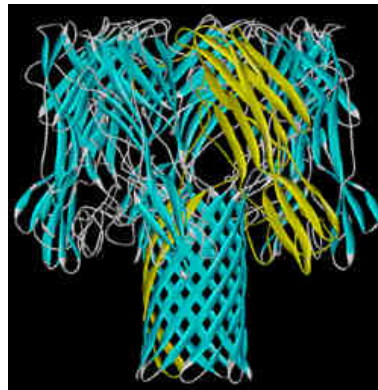


Abb. 68: Heptamere Form des Alpha-Toxins; der untere Teil entspricht der Pore, die in die Zellmembran inseriert.

4.5.2 alpha-Toxin aktiviert die MAP-Kinasen p38, JNK und Erk in HaCat-Zellen

HaCat-Zellen wurden mit alpha-Toxin bzw. der Mutante behandelt und die p38-Phosphorylierung im Western Blot untersucht. Es ist eine deutliche Aktivierung von p38 nach 1 bzw. 2h Behandlung zu sehen. Die Mutante hat keinen Effekt auf die p38-Aktivierung.

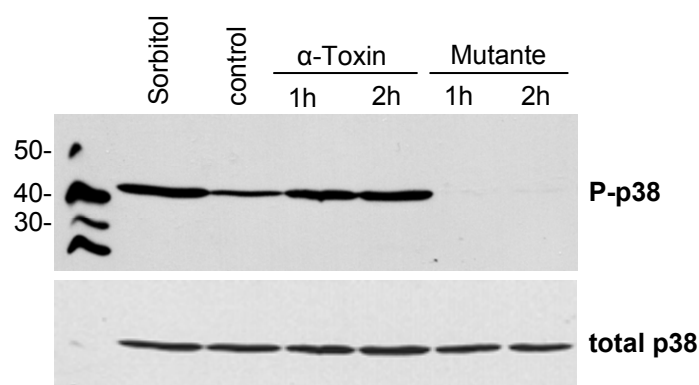


Abb. 69: Behandlung von HaCat-Zellen mit 200ng/ml α-Toxin bzw. Mutante; Positiv-Kontrolle: Sorbitol 0,5M, 10Min. Oberer Blot zeigt p38-Phosphorylierung, unterer Blot: gesamtes p38.

Nun wurde eine Kinetik im Bereich von 0-7h durchgeführt. Die gleichen Zelllysate wurden für Western Blots mit Antikörpern gegen Phospho-p38, Phospho-JNK und Phospho-Erk verwendet, um vergleichen zu können, welche der MAP-Kinasen zu welcher Zeit aktiviert wird.

Es stellte sich heraus, dass p38 schon nach 15Minuten aktiviert wird (Abb. 70A). Die zunächst schwache Bande ist ab 1h deutlich stärker und hält an bis 7h. Die JNK-Aktivierung setzt etwas später ein als die p38-Aktivierung, doch auch hier sind ab 1h deutliche Banden zu erkennen, die in ihrer Stärke bis 7h noch etwas zunehmen.

Bei der Phosphorylierung von Erk (*extracellular signal-regulated kinase*) ist ein genauer Zeitpunkt nur schwer zu erkennen. Unbehandelte Zellen zeigen hier auch ein schwaches Signal. Ab 1-3 Stunden verstärkt sich dieses und nimmt bis 7h weiter zu.

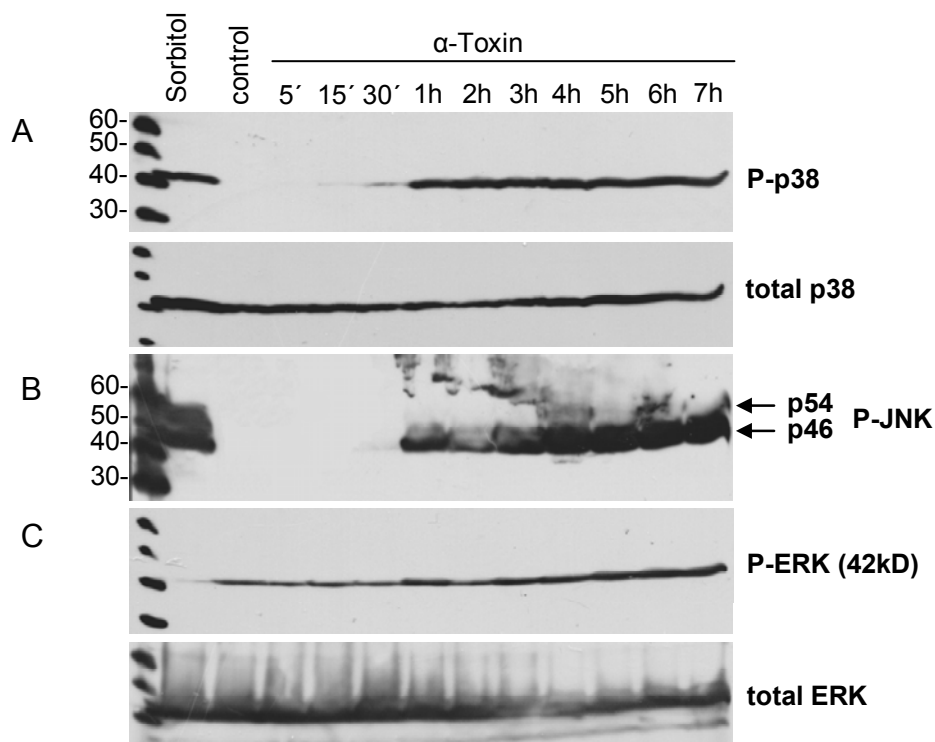


Abb. 70: Behandlung von HaCat-Zellen mit 200ng/ml α -Toxin für 5'-7h. Positiv Kontrolle: Sorbitol 0,5M, 10'. (A) Western Blot anti-Phospho-p38 (oben) und gesamtes p38 (unten); (B) Western Blot anti-Phospho-JNK; (C) Western Blot anti-Phospho-ERK (oben) und gesamtes ERK (unten).

4.5.3 Schwache Aktivierung von ASK1 durch alpha-Toxin

Des Weiteren sollte eine Aktivierung von ASK1 durch alpha-Toxin gezeigt werden. Hierzu wurde wieder in Cos7-Zellen gearbeitet, da FlagASK1 transfiziert werden musste. Die transfizierten Zellen wurden mit H_2O_2 als Positiv-Kontrolle behandelt, was zu einer starken ASK1-Phosphorylierung führte. Die Behandlung mit alpha-Toxin jedoch resultierte nur in sehr schwachen Banden mit einem Maximum bei 30 Min. Man könnte also annehmen, dass ASK1 zwar durch alpha-Toxin aktiviert wird, aber nicht vergleichbar stark wie durch E-LDL.

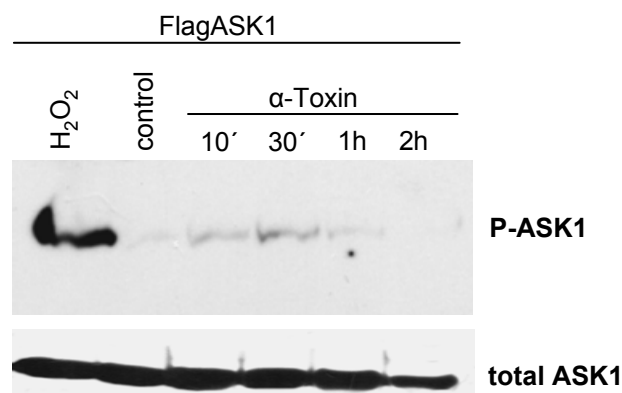


Abb. 71: Transfektion von Cos7-Zellen mit FlagASK1 und Behandlung 48h nach Transfektion mit 200ng/ml alpha-Toxin (10'-2h) bzw. H_2O_2 5mM (5Min). Oberer Blot: ASK1-Phosphorylierung, unterer Blot: gesamtes ASK1.

4.5.4 Die p38-Aktivierung durch alpha-Toxin ist wahrscheinlich nicht unbedingt ASK1-abhängig

Nun sollte die Frage geklärt werden, ob die p38-Phosphorylierung von einer vorhergehenden ASK1-Aktivierung abhängig ist. Hierbei wurden Cos7-Zellen mit den siRNA's (spezifisch bzw. unspezifisch) gegen ASK1 transfiziert und anschließend mit alpha-Toxin bzw. E-LDL behandelt. Wie schon unter 4.1.4.2 gezeigt führt auch hier Behandlung mit E-LDL zu einer deutlichen p38-Phosphorylierung, die bei Transfektion der spezifischen siRNAs fast vollständig unterdrückt wird (90% Hemmung). Bei Behandlung mit alpha-Toxin kommt es zu einer doppelt so starken p38-Phosphorylierung im Vergleich zu E-LDL, die bei Ausschaltung von ASK1 nur um 18% abnimmt.

Dies lässt darauf schließen, dass im Fall der Aktivierung von p38 durch alpha-Toxin nicht unbedingt eine vorhergehende ASK1-Aktivierung nötig ist bzw. dass ASK1 nicht die einzige MAPKKK ist, die zu einer Phosphorylierung von p38 führt. Es wäre demnach sinnvoll die Aktivierung weiterer MAPKKKs nach Toxin-Behandlung zu überprüfen.

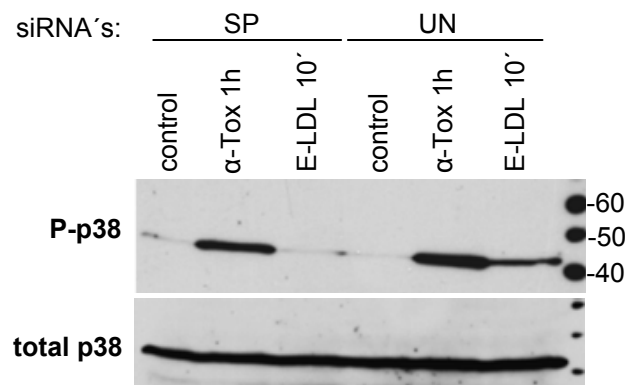


Abb. 72: Transfektion von Cos7-Zellen mit 100nM spezifischem siRNA-Mix (SP) bzw. Negativ-Kontroll siRNA (UN). Behandlung 48h nach Transfektion mit 200ng/ml alpha-Toxin (2h) bzw. 100 μ g/ml E-LDL (10Min). Oberer Blot: p38-Phosphorylierung; unterer Blot: gesamtes p38.

4.5.5 Die p38-Aktivierung durch alpha-Toxin ist nicht hemmbar durch Antioxidantien (NAC)

In HaCat-Zellen sollte untersucht werden, ob nach Behandlung mit alpha-Toxin wie nach Behandlung mit E-LDL oxidativer Stress entsteht, bzw. ob eine Vorbehandlung mit dem Radikalfänger NAC eine Aktivierung der MAP-Kinase Kaskade verhindern kann. HaCat-Zellen wurden mit NAC vobehandelt und anschließend erfolgte Zugabe von alpha-Toxin und H₂O₂ bzw. Sorbitol als Positiv- bzw. Negativ-Kontrollen.

Die p38-Phosphorylierung durch H₂O₂ reduzierte sich unter NAC-Vorbehandlung um 75%. Auf die p38-Aktivierung durch Sorbitol und alpha-Toxin hatte NAC keinen Einfluß. Dies deutet darauf hin, dass kein oxidativer Stress nach Behandlung mit alpha-Toxin in HaCat-Zellen auftritt.

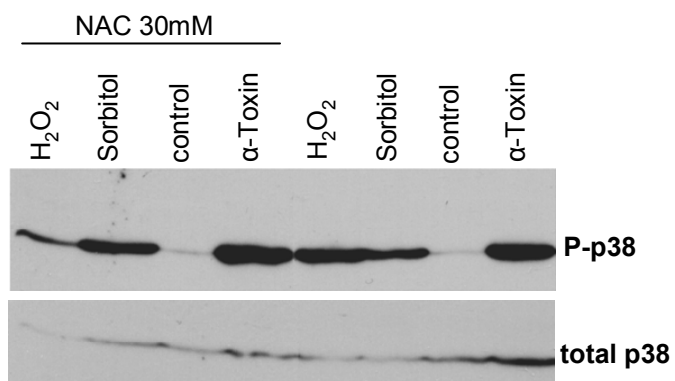


Abb. 73: Vorbehandlung von HaCat-Zellen für 1h mit 30mM NAC (pH 7,4), dann Zugabe von 200ng/ml alpha-Toxin (2h); Kontrollen: H₂O₂ 1mM, Sorbitol 0,5M (je 10Min). Oberer Blot: p38-Phosphorylierung, unterer Blot: gesamtes p38.

5. Diskussion

Die wichtigste Feststellung, die in dieser Arbeit gemacht wurde, ist die Auslösung der Apoptose in Endothelzellen durch die in enzymatisch modifiziertem LDL enthaltenen freien Fettsäuren. Der programmierte Zelltod wird induziert durch Signalübertragung *via* ASK1-abhängiger p38- und Caspase-3/-7-Aktivierung, die zu nachfolgender Fragmentierung der DNA sowie zur Spaltung von nukleären Enzymen (PARP) führt. Mit freien Fettsäuren alleine konnte derselbe Effekt gezeigt werden. Inkubation mit der gleichen Konzentration von nativem oder oxLDL führte hingegen nicht zur Apoptose.

5.1 Freie Fettsäuren aus E-LDL induzieren Apoptose

Der Befund, dass freie Fettsäuren aus E-LDL zur Auslösung der Apoptose führen können, liefert eine einfache Erklärung dafür, warum übermäßige Ansammlung von subendothelial abgelagertem LDL eine Gefährdung für die benachbarten Zellen darstellt. Bei der enzymatischen Umwandlung des Lipoproteins in der Intima kann es zu einer massiven Freisetzung von freien Fettsäuren kommen. Diese könnten dann in den angrenzenden Endothelzellen oder auch in anderen benachbarten Zellen den programmierten Zelltod auslösen.

Freie Fettsäuren können einerseits aus Phospholipiden hervorgehen, indem sie beispielsweise durch die von Makrophagen sekretierte sPLA2 abgespalten werden. Dieses Enzym kann durch E-LDL induziert werden (Han *et al.*, 2003) und wurde in atherosklerotischen Läsionen vorgefunden. Daher könnte es zur Entwicklung der Atherosklerose beitragen (Murakami and Kudo, 2003). Auch bei der Induktion der membranassoziierten-PLA2 durch Angiotensin II können freie Fettsäuren entstehen. (Cui and Douglas, 1997).

Der Hauptteil der Fettsäuren ist im LDL jedoch in Form von Cholesterinestern gespeichert. Der Cholesterinestergehalt pro LDL-Partikel wird ungefähr auf 1700 Moleküle geschätzt (Baumstark *et al.*, 1991). Bei der in der Intima stattfindenden enzymatischen Umwandlung kommt es zu einer Aufspaltung der die Cholesterinester umgebenden Apolipoprotein-B Hülle. Verschiedene Proteasen können hierbei beteiligt sein. Ein Beispiel ist das Cathepsin H, das in den frühen Läsionen detektiert

wurde (Han *et al.*, 2003). Dadurch werden die Cholesterinester zugänglich für die hydrolytische Spaltung der Esterbindung durch die Cholesterinesterase, ein Enzym, das ebenfalls in den atherosklerotischen Läsionen vorkommt. Hierbei kann eine massive Freisetzung von freien Fettsäuren erfolgen, die die Apoptose in benachbarten Zellen, z.B. den Endothelzellen, auslösen können. Die Tatsache, dass große Mengen an freiem Cholesterin in den frühen atherosklerotischen Läsionen enthalten sind (Simionescu *et al.*, 1986; Kruth and Fry, 1984; Kruth, 1985; Chao *et al.*, 1988; Seifert *et al.*, 1990) spricht ebenfalls dafür, dass freie Fettsäuren schon zu einem frühen Zeitpunkt der Atherosklerose entstehen. Dennoch fanden sie bisher nie besondere Erwähnung.

Durch *in vitro* Modifizierung mit Trypsin und Cholesterinesterase erhält man ein dem läSIONalen LDL ähnliches Produkt mit einem hohen Gehalt an freiem Cholesterin und freien Fettsäuren (FFA). Der Gehalt an FFAs, der in LDL 7,7µg/mg Cholesterin beträgt, erhöht sich bei der enzymatischen Umsetzung zu E-LDL auf 600µg/mg. Der Anteil an unverestertem Cholesterin in LDL liegt bei ca. 25% und steigt an auf rund 85% in E-LDL. Der Fettsäure-Anteil des E-LDL besteht hauptsächlich aus Linolsäure. Ölsäure, Palmitinsäure, Arachidonsäure und Stearinsäure sind in geringeren Mengen vertreten (Suriyaphol *et al.*, 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Inkubation von Endothelzellen mit E-LDL zu einer Aktivierung von ASK1 führt. Eine nachfolgende, ASK1-abhängige Aktivierung von p38 induzierte die Apoptose über die Aktivierung der Caspase-3/-7, was zur Fragmentierung der DNA und zur Spaltung von nukleären Enzymen (PARP) führte. Durch Depletion der Fettsäuren aus E-LDL verringerten sich die cytotoxischen Eigenschaften des Partikels deutlich. Neben geringeren ATP-Verlusten kam es auch zu einer stark reduzierten Caspase-3/-7 Aktivierung. Rekonstitution des depletierten E-LDL(d4) bzw. (d10) mit Linolsäure brachte die ursprünglichen Effekte wieder zurück.

Freie Fettsäuren alleine führten ebenfalls über ASK1/p38-Aktivierung zur Apoptose in Endothelzellen. Linolsäure, Ölsäure und Arachidonsäure zeigten ähnlich starke Auswirkungen bei der ASK1-bzw. p38-Phosphorylierung oder der Fragmentierung von PARP.

Übereinstimmend mit anderen Arbeiten (Zhu *et al.*, 2001) fand unter Einwirkung von nativem LDL auf Endothelzellen eine schwache p38-Phosphorylierung statt, die aber

keine zytotoxischen Auswirkungen hatte und auch nicht zu einer Caspasen-Aktivierung führte. Nach Inkubation von LDL mit Albumin, also dem Entfernen der auch in LDL vorhandenen freien Fettsäuren, konnte die p38-Phosphorylierung weiter supprimiert werden im Vergleich zu nativem LDL. Dies spricht dafür, dass die schwache p38-Phosphorylierung durch LDL, die auch von mehreren anderen Arbeitsgruppen gefunden, aber nicht begründet werden konnte (Zhu *et al.*, 2001; Jing *et al.*, 1999), durch den in LDL vorhandenen, wenn auch geringen, Anteil an freien Fettsäuren zustande kommt.

Auch die cytotoxischen Eigenschaften des E-LDL sind vom Fettsäure-Gehalt des Partikels abhängig: je höher der Gehalt an freien Fettsäuren, desto stärker ist die cytotoxische Wirkung von E-LDL – dies wurde anhand von ATP-Messungen deutlich. LDL und oxLDL hatten bei gleicher Konzentration wie E-LDL (100µg/ml) keinen toxischen Effekt, d.h. es kam nicht zu ATP-Verlusten.

In dieser Arbeit wurden freie Fettsäuren (Linolsäure, Ölsäure) zunächst als wasserlösliche Komplexe in Methyl- β -Cyclodextrin verwendet. Sie mußten in einer Konzentration von 100µM eingesetzt werden, um eine ASK1 bzw. p38 Aktivierung zu erhalten. Dies entspricht in etwa der in E-LDL enthaltenen Linolsäure-Menge bei der Behandlung der Zellen mit 100µg/ml E-LDL (100µg E-LDL-Cholesterin enthalten ca. 128nmol Linolsäure). Bei Verwendung der reinen Fettsäuren konnte eine wesentlich niedrigere Dosierung erfolgen um die Apoptose auszulösen. Inkubation von Endothelzellen mit 0,3µM Linolsäure oder Arachidonsäure über 16h Stunden war ausreichend, um eine Spaltung des nukleären Enzyms PARP zu erreichen. Anscheinend ist also die Konstitution, in der die Fettsäuren auf die Zellen treffen, von ausschlaggebender Bedeutung für den Effekt.

Der Effekt von freien Fettsäuren bzw. E-LDL auf die Proteinphosphatase pp5, einem *negativ-Feedback*-Inhibitor von ASK1, konnte mittels Co-Immunpräzipitation gezeigt werden. In einem Experiment wurden erhöhten Mengen von copräzipitiertem pp5 nach Behandlung mit Linolsäure bei der Präzipitation von FlagASK1 aus transfizierten 293-Zellen nachgewiesen. Allerdings konnte der Befund, dass in Monozyten eine Zunahme der pp5-Menge nach 24h Behandlung mit E-LDL erfolgte, in Endothelzellen nicht reproduziert werden. Eine Bestimmung der pp5-Aktivität nach Inkubation mit E-LDL könnte über die Dephosphorylierung eines Substrates unter

Messung der Zunahme der dephosphorylierten Form erfolgen (Ramsey and Chinkers, 2002). Darauf wurde aber in dieser Arbeit verzichtet, da es von vorrangiger Bedeutung war, eine Aktivierung der Kinase ASK1 darzustellen.

Die freien Fettsäuren spielen folglich eine essentielle Rolle bei der Auslösung der E-LDL-induzierten Apoptose in Endothelzellen. In glatten Muskelzellen scheinen freie Fettsäuren, insbesondere Linolsäure, jedoch auch mitogene Effekte zu haben. Neben der Induktion der DNA-Synthese wurde in einer Arbeitsgruppe eine Stimulation der Expression von c-fos und c-jun mRNA durch Linolsäure sowie eine Aktivierung der MAP-Kinase Erk beobachtet (Rao *et al.*, 1995). Eine andere Arbeitsgruppe fand heraus, dass es durch Angiotensin II-vermittelte Freisetzung von Arachidonsäure über eine Aktivierung der membran-assoziierten PLA2 zu einer Aktivierung der MAP-Kinase Erk in Nieren-Epithelzellen kommen kann (Cui and Douglas, 1997). Die Arachidonsäure funktionierte in diesem Fall als Lipid-*second messenger* für die Stimulation des Erk-Signalweges, der hauptsächlich zu zellulärem Wachstum bzw. Differenzierung führt.

Die Menge der freigesetzten Fettsäuren, ob aus Phospholipiden oder Cholesterinestern stammend, ist wahrscheinlich verantwortlich für die Vermittlung von mitogenen Effekten oder für die Auslösung der Apoptose.

5.2 Bedeutung der Apoptose von Endothelzellen für die Pathogenese der Atherosklerose

Die Induktion der Apoptose ist ein wichtiger Prozess im Zusammenhang mit der Atherosklerose und stellt eine der möglichen Reaktionen von Endothelzellen nach Kontakt mit schädlichen Stoffen dar. Die Endothelzellen bedecken die Gefäßwände in einer einzelligen Schicht und spielen eine wichtige Rolle bei der Homöostase der Blutgefäße. Zu den wichtigsten physiologischen Funktionen des Endothels gehören die Regulation des Gefäßtonus, die Kontrolle des Gefäßwachstums, die Vermittlung von Leukozytenadhäsiven Prozessen und die Aufrechterhaltung eines antithrombotischen und profibrinolytischen Zustands (Kinlay *et al.*, 1997). Die durch die Apoptose entstehenden Verletzungen im Endothel tragen zur Pathogenese der Atherosklerose bei, indem sie die Integrität der Einzelzellschicht aufheben. Es kann

zu einer Erosion der Plaques und zu Bildung von Thrombosen kommen, was zu akuten Koronarsyndromen (Herzinfarkt) führt.

Die Apoptose der Endothelzellen kann wesentlich zur endothelialen Dysfunktion beitragen, welche als eine der initialen pathophysiologischen Veränderungen im Voranschreiten der Atherosklerose angesehen wird (Cai and Harrison, 2000). Die endotheliale Dysfunktion ist definiert als gestörte endotheliale NO-Verfügbarkeit. Die bekannten klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren wie Hypertonie, Nikotinkonsum oder Diabetes mellitus gehen mit einem Verlust der endothelvermittelten Vasodilatation einher, die durch verminderte NO-Mengen begründet wird (Vita *et al.*, 1990; Ross, 1999).

Das vasodilatative Stickstoffmonoxid (NO) wird im intakten Endothel durch die endotheliale NO-Synthase aus der Aminosäure L-Arginin gebildet. Zu den wichtigsten Stimuli der NO-Synthese zählt die Exposition des Endothels für Scherkräfte. Atherosklerotische Läsionen treten bevorzugt an verzweigten Stellen im Gefäßsystem auf, wo der sich teilende Blutfluß Turbulenzen und reduzierte Scherkräfte erzeugt. In unverzweigten Gefäßen treten dagegen deutlich höhere Scherkräfte auf. Diese mechanische Stimulation der Endothelzellen führt zur Aktivierung einer Vielzahl von intrazellulären Signalwegen (Garcia-Cardena *et al.*, 2001; Urbich *et al.*, 2000). Auf diese Weise wird z.B. die Genexpression der endothelialen NO-Synthase über Mechanorezeptoren hochreguliert. Als gasförmiges Molekül diffundiert NO durch die Zellmembranen und steigert über Aktivierung der Guanylat-Cyclase die cGMP-Konzentration in den glatten Gefäßmuskelzellen. Daraufhin sinkt die cytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration, welche für die Kontraktion der Gefäße notwendig ist, und es kommt zur Dilatation.

Durch Hemmung der Apoptose in Endothelzellen sorgt NO für eine intakte Gefäßinnenwand (Noris *et al.*, 1995; Dimmeler *et al.*, 1997; Dimmeler *et al.*, 1999). Die Blockade der Apoptose erfolgt über S-Nitrosylierung von Zielproteinen durch NO. NO kann z.B. mit dem essentiellen Cystein im reaktiven Zentrum der Caspasen reagieren, was deren Enzymaktivität bzw. die Apoptose hemmt (Dimmeler *et al.*, 1997). Auch bei dem ASK1-Inhibitor Thioredoxin kann eine S-Nitrosylierung durch NO stattfinden, was allerdings dessen enzymatische Aktivität erhöht und intrazellulär auftretenden oxidativen Stress sowie eine Aktivierung von ASK1 reduziert (Haendeler *et al.*, 2002).

Die endotheliale Dysfunktion bzw. die verminderte Produktion von NO kann nun zum einen durch Apoptose der Endothelzellen zustande kommen. Aber auch verschiedene andere Mechanismen wie z.B. ein Mangel an L-Arginin oder die Inaktivierung von NO durch freie Radikale (ROS) unter der Bildung von Peroxynitrit können die Funktion des Endothels schwächen. Neben der Produktion von ROS in Reaktion auf Stress kann auch eine erhöhte Aktivität des *angiotensin converting enzym* (ACE) zur Bildung von freien Radikalen beitragen. Angiotensin I und II sind essentielle Bestandteile des wesentlich zur Hypertonie beitragenden Renin-Angiotensin-Systems. Zirkulierende Monozyten können Angiotensinogen synthetisieren; ihre Differenzierung zu Makrophagen induziert eine Zunahme der ACE-Synthese (Takahashi *et al.*, 2002). Angiotensin II stimuliert die membranassoziierte PLA2 und es kommt zur Freisetzung von Arachidonsäure. Diese funktioniert als Botenstoff und aktiviert die NADPH-Oxidase, was die Produktion von Superoxidradikal-Anionen zur Folge hat.

Die Regulation der redox-Balance zwischen ROS-Produktion in Reaktion auf Stress und der Synthese von NO hat demnach entscheidende Bedeutung für das Überleben von Endothelzellen. ACE-Hemmer wie z.B. Quinapril bewiesen in verschiedenen Studien eine generelle Verbesserung der endothelialen Funktion sowie eine Reduktion von Herzinfarkten. Daher werden sie häufig therapeutisch eingesetzt, um durch Hemmung der Bildung von Angiotensin II dessen Einfluß auf die ROS-Produktion zu reduzieren.

Apoptotische Endothelzellen besitzen zudem prokoagulierende Eigenschaften, die ebenfalls durch die gehemmte NO-Synthese zustande kommen. NO diffundiert normalerweise in die Thrombozyten und hemmt deren Aktivierung und Aggregation. Ist dies bei Schädigung des Endothels nicht mehr der Fall, so kommt es zur Bindung von Thrombozyten an das Endothel, worauf eine Plättchen-Aktivierung erfolgt (Bombeli *et al.*, 1997; Bombeli *et al.*, 1999). Die Thrombus-Bildung kann also nicht nur bei der Ruptur von Plaques, sondern auch direkt durch apoptotische Endothelzellen ausgelöst werden.

Eine Studie von Boulanger *et al.* verdeutlicht die Induktion von endothelialer Dysfunktion durch zirkulierende Mikropartikel, die aus Resten apoptotischer Endothelzellen entstehen (Boulanger *et al.*, 2001). Diese endothelialen Mikropartikel

treten in hohem Maße bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom auf (Mallat *et al.*, 1999). Auch andere Arbeitsgruppen berichten über eine Zunahme von zirkulierenden Endothelzellen bei Patienten mit Herzinfarkt oder instabiler Angina (Hladovec *et al.*, 1978; Mutin *et al.*, 1999). Annäherungsweise 5-30 apoptotische Endothelzellen können pro Mikroliter Blut in Patienten mit akutem Koronarsyndrom gefunden werden (Dimmeler *et al.*, 2002).

Eine weitere Hypothese besagt, dass apoptotische Endothelzellen durch benachbarte Zellen regeneriert werden müssen. In diesem Zusammenhang wurde festgestellt, dass die regenerierten Endothelzellen in ihrer Funktion beeinträchtigt sind (Fournet-Bourguignon *et al.*, 2000). Daraus resultiert die Annahme, dass als Konsequenz der initialen Endothelzell-Apoptose die einzellige Endothelzellschicht zum Teil durch nicht-funktionierende Zellen ausgetauscht wird. Hierbei geht der atheroprotektive Schutz des Endothels wie z.B. die Fähigkeit zur NO-Synthese verloren (Dimmeler *et al.*, 2002).

5.3 Verbindung der Apoptose mit der MAPK-Kaskade

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Abhängigkeit der durch E-LDL verursachten Caspase-3/7 Aktivierung von p38 bzw. ASK1 dargestellt. Bei Hemmung von p38 mit dem Inhibitor SB203580 konnte die Caspasen-Aktivierung um ca. 50% gesenkt werden. Die wichtige Rolle von ASK1 bei der Auslösung der Apoptose wurde bei Ausschaltung des Enzyms durch RNA-Interferenz deutlich: Hemmung von ASK1 mittels siRNAs reduzierte die Caspasen-Aktivierung sogar auf den Level von unbehandelten Zellen. Der Zusammenhang zwischen der E-LDL induzierten p38-MAP-Kinase- und Caspase-Aktivierung besteht wahrscheinlich in der Regulation der Cytochrom C-Freisetzung aus den Mitochondrien, welche die Aktivierung der Initiator-Caspase-9 reguliert.

Es ist bekannt, dass eine Aktivierung von ASK1 die Apoptose hauptsächlich über mitochondriale Caspasen-Aktivierung auslöst. Überexpression einer konstitutiv aktiven ASK1-Mutante induziert CytC-Freisetzung und aktiviert Caspase-9 sowie Caspase-3, nicht aber Caspase-8. In Caspase-9 *-/-* embryonischen Maus-Fibroblasten (MEFs) konnte durch überexprimiertes ASK1 keine Caspase-3

Aktivierung stattfinden (Hatai *et al.*, 2000). Die Caspase-3 ist also kein direktes Target von ASK1 oder p38, sondern benötigt zur Aktivierung eine vorhergehende Caspase-9 Aktivierung.

Die Coexpression von ASK1 und JNK verursacht eine Modifizierung von antiapoptotischen Proteinen der Bcl-2 Familie, die die CytC-Freisetzung aus den Mitochondrien kontrollieren. Die Phosphorylierung von Bcl-2 durch JNK führt zu dessen Inaktivierung und hebt die hemmende Funktion von Bcl-2 auf die CytC-Freisetzung auf (Yamamoto *et al.*, 1999).

Zhang *et al.* zeigen eine Lokalisation von ASK1 sowohl im Cytoplasma als auch in den Mitochondrien, wo eine Bindung an den Inhibitor Trx1 bzw. Trx2 stattfindet. Eine Überexpression des mitochondrialen Trx2 konnte die ASK1-induzierte Apoptose verhindern (Zhang *et al.*, 2004).

Regulation der Cytochrom C-Freisetzung aus den Mitochondrien

Die durch Störung der mitochondrialen Funktion (z.B. Zerstörung des inneren transmembranen Potentials; Permeabilitätserhöhung der inneren Mitochondrien-Membran für kleine Proteine) aufkommenden apoptotischen Signale werden durch das Gleichgewicht der pro- und antiapoptotischen Bcl-2/Bad Proteine erfasst. Aus einer Verschiebung des Gleichgewichtes in Richtung Todes-Signalen (Bad, Bax) resultiert die Freisetzung von CytC und kleinen, apoptose-induzierenden Proteinen wie z.B. Smac/Diablo (Gross *et al.*, 1999; Verhagen, 2000). Das freigesetzte CytC bindet zusammen mit ATP an Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor 1*), welches wiederum zur Aktivierung der Initiator-Caspase-9 führt (Li *et al.*, 1997). Dieser cytosolische *death-signalling* Protein Komplex wird als Apoptosom bezeichnet (Salvesen and Renatus, 2002). Caspase-9 aktiviert anschließend die Effektor-Caspase-3, die wiederum die Effektor-Caspase-7 aktiviert.

Zusätzlich zur Freisetzung der mitochondrialen Faktoren verursacht eine Zerstörung der inneren mitochondrialen Membranfunktion einen Verlust der zellulären Homöostase: die ATP-Synthese wird gestoppt, redox-Moleküle wie z.B. NADH und Glutathion werden oxidiert und ROS in erhöhtem Maße produziert. ROS verursachen die Oxidation von Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren, was die Zerstörung des Membranpotentials im Sinne einer positiven Rückkopplung verstärkt.

Die antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-xL befinden sich an der äußeren Mitochondrienmembran und hemmen die CytC-Freisetzung. Die proapoptotischen Proteine wie z.B. Bad oder Bax sind im Cytosol lokalisiert, wandern aber nach Todes-Signal Stimulation zu den Mitochondrien, wo sie eine CytC-Freisetzung induzieren. Dies geschieht mittels Bildung von Kanälen in der Mitochondrien-Membran durch Bax (Muchmore *et al.*, 1996) oder durch Bildung eines proapoptotischen Komplexes von Bad mit Bcl-xL. Letzteres verliert dadurch seine antiapoptotische Funktion.

Diese Komplexbildung wird über Phosphorylierung von Bad durch Akt verhindert. Phosphoryliertes Bad wird an 14-3-3 Proteine gebunden und kann demzufolge nicht mehr an Bcl-2 oder Bcl-xL binden.

p38 kann Translokation von Bax zu den Mitochondrien induzieren

Die Translokation von Bax aus dem Cytosol zu den Mitochondrien könnte in einer Konformationsänderung, d.h. der Exposition einer versteckten C-terminalen Transmembrandomäne des Proteins begründet sein (Goping *et al.*, 1998). Diese kann durch eine p38-vermittelte Phosphorylierung der N- oder C-terminalen Domänen von Bax zustande kommen. Die Regulation der Bax-Translokation durch p38 wurde sowohl bei der NO- als auch bei der Cyanid-induzierten Apoptose gezeigt (Ghatan *et al.*, 2000; Shou *et al.*, 2003). Ob dieser Zusammenhang auch bei der E-LDL vermittelten Apoptose besteht, ist noch zu klären.

Phosphorylierung des antiapoptotischen Bcl-xL durch p38

Grethe *et al.* untersuchten die Rolle von p38 bei der TNF-induzierten Apoptose und fanden neben einer Aktivierung der Caspase-3 eine Herunterregulation des antiapoptotischen Bcl-xL, die durch Zusatz des p38-Inhibitors SB203580 gehemmt wurde. In Immunpräzipitations-Experimenten von TNF-behandelten Zellen zeigte sich daraufhin eine p38-abhängige Serin-Threonin-Phosphorylierung von Bcl-xL (Grethe *et al.*, 2004). Auch auf diese Weise wäre die Caspasen-Aktivierung durch E-LDL denkbar.

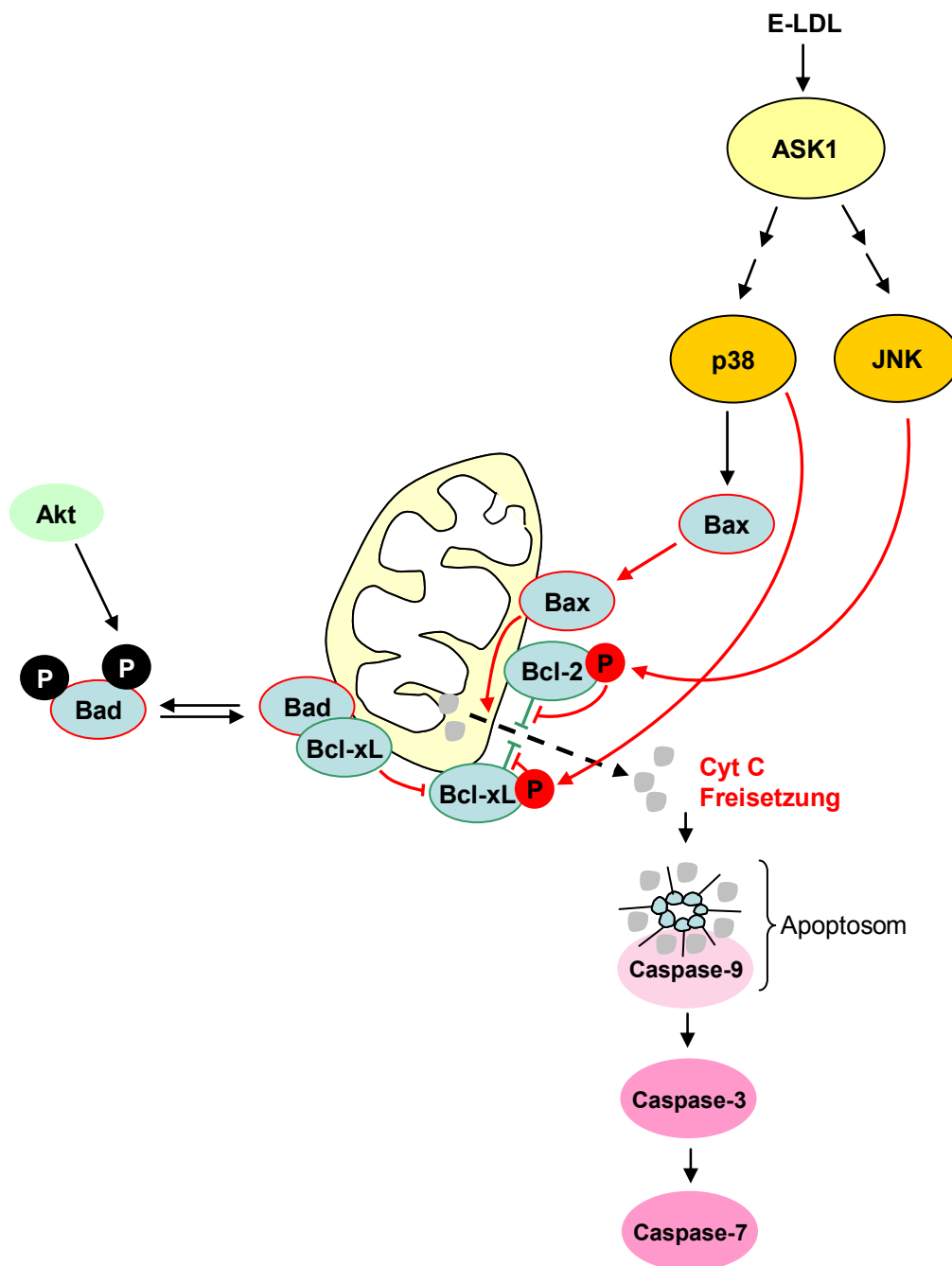


Abb. 74: Die E-LDL induzierte p38-abhängige Caspasen-Aktivierung könnte auf unterschiedlichen Wegen ablaufen: p38 induziert die Translokation des proapoptischen Bax aus dem Cytosol zu den Mitochondrien, was zur Bildung von Kanälen für die CytC-Freisetzung führt. Außerdem kann durch p38 eine Phosphorylierung des antiapoptischen Bcl-xL erfolgen, wodurch dessen hemmende Wirkung auf die CytC-Freisetzung aufgehoben wird. *Via* JNK ist eine Phosphorylierung von Bcl-2 möglich, die ebenfalls zu einer CytC-Freisetzung führt. Da die E-LDL induzierte Caspasen-Aktivierung p38-abhängig ist, tritt vermutlich einer der ersten beiden Wege ein. Freigesetztes CytC induziert die Aktivierung der Initiator-Caspase-9 am Apoptosom, was schließlich eine Aktivierung der Effektor-Caspasen-3 und -7 zur Folge hat.

5.4 Vergleich von oxidiertem LDL mit nativem bzw. E-LDL

Um zu überprüfen, ob eine Oxidation von LDL ebenfalls die proapoptotischen Effekte von E-LDL bewirken kann, wurde zunächst die p38-Phosphorylierung nach Exposition der Zellen mit LDL, oxLDL und E-LDL verglichen. Erstaunlicherweise zeigte oxLDL keinen stärkeren Effekt auf die p38-Phosphorylierung als LDL: bei beiden Lipoproteinpräparationen war diese gleich schwach. Im Gegensatz dazu erfolgte eine 2,5fach stärkere Aktivierung von p38 durch E-LDL, welches keine TBARs enthielt. OxLDL hingegen wies einen TBAR-Gehalt von 9,5nmol/mg Protein auf. Im Vergleich zu anderen Studien mit oxidiertem LDL bedeutet dies einen mittleren bis starken Oxidationsgrad (Akiba *et al.*, 2003). Im Gegensatz zu E-LDL konnten gleiche Konzentrationen natives LDL bzw. oxLDL keine Auslösung der Apoptose bewirken: weder Caspasen-Aktivierung noch DNA-Fragmentierung wurden beobachtet.

Dies deutet darauf hin, dass die freien Fettsäuren, die mit der Auslösung der Apoptose in Verbindung gebracht werden, nicht hauptsächlich durch oxidative Veränderungen des LDL entstehen.

Die Auswirkungen der Oxidation auf die Struktur des LDL wurden von Steinbrecher *et al.* beschrieben. Neben einer erhöhten elektrophoretischen Mobilität kommt es bei der Oxidation von LDL u.a. zur Fragmentierung der ApoB-Komponente, zur Hydrolyse von Phosphatidylcholin und zur Derivatisierung von Lysin-Resten (Steinbrecher *et al.*, 1990). Verschiedene Arbeitsgruppen unternahmen Untersuchungen von oxLDL beladenen Makrophagen, um die Zusammensetzung der in den Schaumzellen entstehenden Ablagerungen darzustellen. Anscheinend ist die ApoB-Komponente von oxLDL ungewöhnlich resistent gegenüber lysosomaler Proteolyse (Jialal and Chait, 1989; Loughheed *et al.*, 1991; Jessup *et al.*, 1992; Hoppe *et al.*, 1994). Dies könnte auf eine generelle Resistenz von Proteinen mit oxidierten Aminosäuren gegenüber lysosomalen Proteasen zurückzuführen sein. Übereinstimmend hiermit wurde eine Akkumulation von ApoB sowohl in Makrophagen nach Aufnahme von oxLDL (Mander *et al.*, 1994) als auch in atherosklerotischen Läsionen gefunden (Rosenfeld *et al.*, 1990).

Einige Studien stellten einen relativ hohen Anteil von unverestertem Cholesterin zum Gesamt-Cholesterin in Makrophagen nach Aufnahme von oxLDL fest (Jialal and Chait, 1989; Roma *et al.*, 1990; Maor *et al.*, 1994). Dieser Befund wurde auf eine

lysosomale Speicherung des oxLDL bzw. des ox-LDL-Cholesterins zurückgeführt, so dass dieses nicht als Substrat zur Veresterung durch die ACAT im Cytosol zur Verfügung steht (Maor *et al.*, 1994). Brown *et al.* zeigten, dass nach Aufnahme von oxLDL in J774-Zellen (Maus-Makrophagen) zwar eine lysosomale Hydrolyse der Cholesterylester stattfindet, deren cytoplasmatische Reesterifizierung jedoch durch die Verfügbarkeit von freien Fettsäuren als Substrate der ACAT limitiert ist. Durch Zusatz von Ölsäure zusammen mit oxLDL konnte eine deutliche Zunahme der Cholesteryloleat-Ester nachgewiesen werden (Brown *et al.*, 2000). Neuere Erkenntnisse belegen, dass oxLDL in Makrophagen anscheinend die Ca^{2+} -abhängige cytosolische PLA2 aktivieren kann, was zu einer Hydrolyse von membranständigen Phospholipiden unter Freisetzung von Ölsäure führt. Die freigesetzte Fettsäure wird benötigt, um das bei der Endocytose von oxLDL aufgenommene Cholesterin durch die ACAT zu reesterifizieren und als Cholesteryloleat in Lipidtröpfchen abzulagern (Akiba *et al.*, 2003).

Abgesehen davon konnte eine große Menge an oxidierten Sterolestern nachgewiesen werden, die Cholesterol bzw. 7-Ketocholesterol, verestert mit oxidierten Fettsäuren, enthalten. Diese oxidierten Sterolester akkumulieren in den Lysosomen der Makrophagen und sind resistent gegenüber Hydrolyse (Hoppe *et al.*, 1997; Brown *et al.*, 2000).

Demzufolge könnten theoretisch bei Aufnahme von oxLDL durch Makrophagen nicht in dem Maße freie Fettsäuren entstehen, wie es bei der enzymatischen Umsetzung von LDL zu E-LDL der Fall wäre.

Einige oxidierende Enzyme wurden bisher mit der Oxidation von LDL in Verbindung gebracht, wie z.B. die Myeloperoxidase, NO-Synthase und 15-Lipoxygenase (15-LO) (Heinecke, 1998; Steinberg, 1999). NO ist ein Oxidationsmittel, das sowohl in Endothelzellen als auch in Makrophagen produziert wird und abhängig von der Art der Entstehung unterschiedliche Effekte zeigen kann. Durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS) produziertes NO hat auf Grund seiner vasodilatatorischen Funktion einen protektiven Effekt. Im Gegensatz dazu hat NO, das in den Makrophagen durch die induzierbare NO-Synthase (iNOS) hergestellt wird, durch seine oxidierenden Eigenschaften eine antimikrobielle Funktion. Dass die iNOS zur Oxidation von LDL beitragen kann, zeigte eine Arbeitsgruppe durch Ausschaltung des Enzyms in ApoE-defizienten Mäusen, die dadurch weniger Plaques entwickelten (Behr-Roussel *et al.*,

2000). Dieser Zusammenhang wurde in anderen Arbeitsgruppen jedoch nicht beobachtet (Knowles *et al.*, 2000). Eine proatherogene Funktion der 15-LO wurde in Experimenten mit *knock-out* Mäusen bzw. durch Überexpression des Enzyms gezeigt (Cyrus *et al.*, 1999; Harats *et al.*, 2000). Die Ausschaltung der NADPH-Oxidase konnte die Plaque-Bildung nicht hemmen, somit wurde dieses Enzym eher nicht in Verbindung mit einer Oxidation von LDL gebracht (Kirk *et al.*, 2000).

Die Rolle von oxLDL im Zusammenhang mit der Auslösung der Apoptose ist bereits in mehreren Arbeitsgruppen untersucht worden. Takahashi *et al.* stellten fest, dass Lysophosphatidylcholin (lysoPC), ein Bestandteil von oxidiertem LDL, über eine Aktivierung von p38 zur Apoptose führt (Takahashi *et al.*, 2001; Galle *et al.*, 1999). Lyso-PC entsteht durch die PLA2 aus Phosphatidylcholin während der Oxidation von LDL (Esterbauer *et al.*, 1992). Zhao *et al.* zeigten eine p38-Abhängigkeit der Schaumzellbildung durch oxLDL in J774-Zellen (Zhao *et al.*, 2002).

Kürzlich fand eine weitere Arbeitsgruppe eine erniedrigte Expression der antiapoptischen Proteine Bcl-2 und IAP-1 nach Aufnahme von oxLDL über den Scavenger-Rezeptor LOX-1 (*lectin like oxLDL-receptor*) von HCAEC-Zellen (*human coronary artery endothelial cells*). Dies führte zur Freisetzung von CytC und Smac und zu einer Caspase-9 Aktivierung (Chen *et al.*, 2004). Eine erhöhte Expression des LOX-1 Rezeptors in Endothelzellen durch oxLDL und die Hemmung dieses Vorgangs durch Statine wurde von derselben Arbeitsgruppe zuvor gezeigt (Li and Mehta, 2000; Li *et al.*, 2001). Über diese Rezeptoren können anscheinend auch Remnant-Lipoproteinpartikel, die aus VLDL entstehen, von Endothelzellen aufgenommen werden. *Via* Stimulation der NADPH-Oxidase und nachfolgender ROS-Produktion können Remnants die Apoptose auslösen und zur Atherogenese beitragen (Shin *et al.*, 2004).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit widersprechen trotzdem nicht denen der oben genannten Arbeitsgruppen, die cytotoxische bzw. apoptoseauslösende Effekte von oxLDL zu wesentlich späteren Zeitpunkten mit höheren Konzentrationen ermittelt haben. In der vorliegenden Arbeit wurden sehr frühe Ereignisse untersucht. Die Cytotoxizität des E-LDL bzw. die Auslösung der Apoptose durch die freien Fettsäuren wurde innerhalb von Stunden sichtbar.

5.5 Die Bedeutung von intrazellulär entstehenden ROS

In Endothelzellen konnte nach Inkubation mit E-LDL oxidativer Stress nachgewiesen werden, indem der profluoreszierende Farbstoff DCF nach intrazellulärer Esterspaltung und Oxidation in ein hoch-fluoreszierendes Molekül umgewandelt wurde. In FACS-Analysen war eine deutliche Zunahme des fluoreszierenden Produktes nach Behandlung mit E-LDL zu erkennen. Bei Inkubation mit E-LDL(d4) kam es zur Reduktion der Fluoreszenz. Mit E-LDL(d10) behandelte Zellen unterschieden sich geringfügig von der Behandlung mit nativem LDL und zeigten schwache Fluoreszenz. Auch hier ist also ein fettsäure-abhängiger Anstieg des fluoreszierenden Signals zu erkennen.

Dieser intrazellulär entstehende oxidative Stress könnte zur Abspaltung des redoxregulierten ASK1-Inhibitors Thioredoxin führen. Auf diesem Weg wäre eine Verbindung zwischen dem Stimulus E-LDL und der Aktivierung der MAPK-Kaskade zu erklären. Die Tatsache, dass sowohl die ASK1- als auch die p38-Aktivierung durch E-LDL bei Vorbehandlung der Zellen mit dem Radikalfänger N-Acetyl-Cystein gehemmt werden konnte, spricht ebenfalls für diese Vermutung (s. Abb. 75).

Bei der Produktion der ROS könnte die membran-assoziierte NADPH-Oxidase involviert sein. Diese kann in Phagozyten und glatten Muskelzellen durch Arachidonsäure aktiviert werden, was eine Produktion von Superoxidradikal-Anionen auslöst (Henderson *et al.*, 1993; Sakata *et al.*, 1987; Griendling *et al.*, 1994). Ausgehend davon fand sich in Nieren-Epithelzellen eine Aktivierung von JNK durch Arachidonsäure, die durch die ROS-Produktion der NADPH-Oxidase vermittelt wird und durch NAC hemmbar ist (Cui and Douglas, 1997).

Dieselbe Arbeitsgruppe zeigte in den gleichen Zellen eine durch Arachidonsäure und Linolsäure vermittelte frühzeitige Aktivierung der MAP-Kinasen p38 und Erk, die nach 15 Min wieder basale Level erreichte (Cui and Douglas, 1997; Alexander *et al.*, 2001).

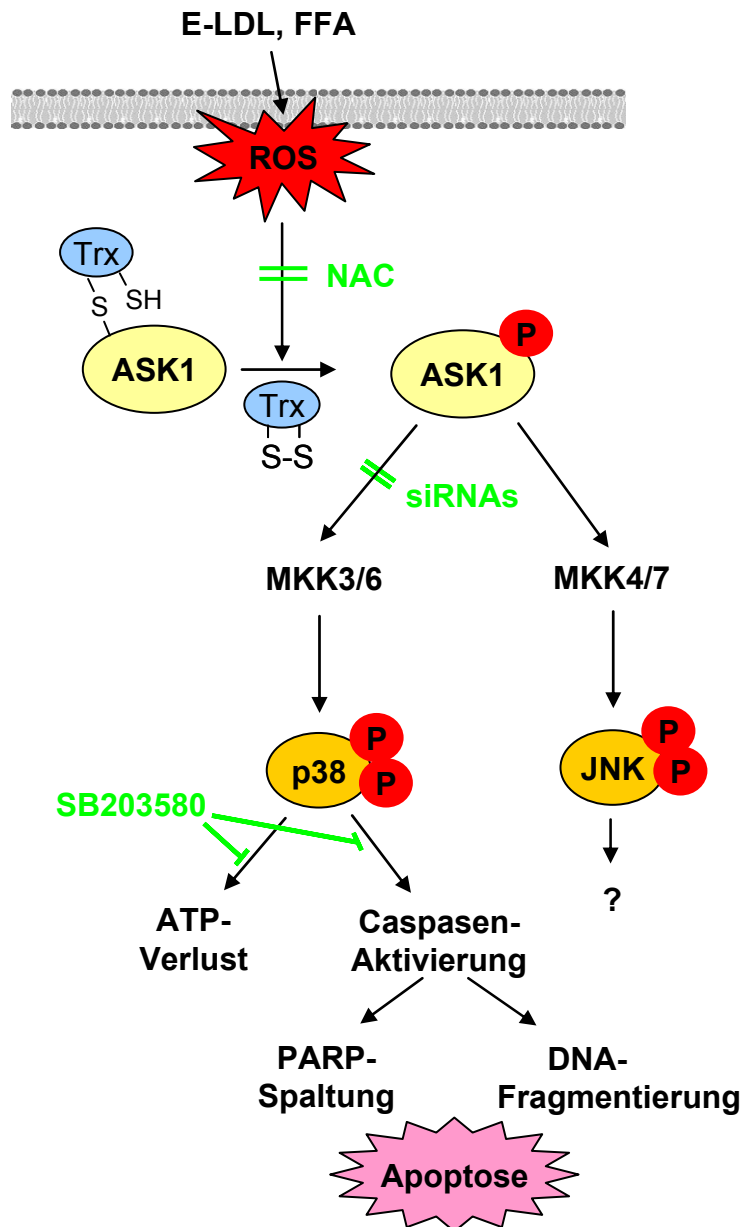


Abb. 75: Nach Behandlung von Endothelzellen mit E-LDL ist ein intrazellulärer oxidativer Stress meßbar. Durch die entstehenden Radikale könnte der ASK1-Inhibitor Thioredoxin, der über Sulfidbrücken an ASK1 gebunden ist, oxidiert und dabei von ASK1 abgespalten werden. Die ASK1-Aktivierung ist hemmbar durch Vorinkubation mit dem Radikalfänger NAC. Sobald ASK1 freigesetzt wird, nimmt es einen aktiven Zustand an (Autophosphorylierung) und setzt die Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade in Gang.

Prinzipiell können ROS auch in Reaktion auf Streß aus Mitochondrien freigesetzt werden. Da aber die ASK1-Aktivierung durch NAC hemmbar ist und die Messung der E-LDL induzierten ROS-Produktion schon nach 10 Minuten Inkubation erfolgte, ist es wahrscheinlicher, dass die membranständige NADPH-Oxidase hieran beteiligt ist. Auch die bereits genannte Aktivierbarkeit dieses Enzyms durch Arachidonsäure spricht für die Beteiligung der NADPH-Oxidase bei der Signalübertragung durch E-LDL. Geklärt werden könnte diese Frage durch Hemmung des Enzyms mit DPI (*diphenylene iodonium*). Würde in diesem Fall kein oxidativer Stress bzw. keine ASK1-Aktivierung zustande kommen, so ist die Lage eindeutig. Eine oxidative Abspaltung des Trx von ASK1 könnte mittels Co-Immunpräzipitationsexperimenten gezeigt werden, wie sie auch schon von Saitoh *et al.* durchgeführt wurden (Saitoh *et al.*, 1998; Morita *et al.*, 2001).

Bemerkenswert ist, dass oxLDL im Vergleich zu E-LDL nur in sehr geringem Maße oxidativen Stress in Endothelzellen auslöste. OxLDL-Behandlung führte zu einem schwachen Fluoreszenz-Signal im Gegensatz zu nativem LDL, das keine Oxidation von DCF bewirkte.

Eine Zunahme der $O_2^{\cdot-}$ Produktion durch oxidiertes LDL im Vergleich zu LDL wurde auch schon von Galle *et al.* in HUVECs (*human vascular endothelial cells*) nachgewiesen (Galle *et al.*, 1999). Jene Arbeitsgruppe erkannte Dosis-abhängig unterschiedliche Effekte von oxLDL in Endothelzellen: geringe Menge oxLDL (5µg/ml) induzierten Proliferation, höhere Mengen jedoch Apoptose. Die oxLDL-abhängige Proliferation der Zellen sowie auch die Apoptose konnten durch Antioxidantien oder DPI gehemmt werden, was für eine Beteiligung der NADPH-Oxidase in beiden Fällen sprach. Behandlung der HUVECs mit ROS, die durch die Xanthin-Oxidase entstanden, führte ebenfalls zur Proliferation der Zellen. Der Apoptose-auslösende Effekt des oxLDL wurde auf dessen Gehalt an Lysophosphatidylcholin zurückgeführt (Heinloth *et al.*, 2000; Galle *et al.*, 2001).

Die Tatsache, dass E-LDL zu deutlich stärkerer Auslösung von intrazellulärem oxidativen Streß als oxLDL führt, verdeutlicht die Rolle der Oxidation im Zusammenhang mit der Apoptose: es muss zwischen einer Oxidation außerhalb und innerhalb der Zellen unterschieden werden. LDL mag zwar außerhalb der Zellen oxidiert werden, zur Auslösung der Apoptose ist jedoch eine Produktion von

intrazellulären ROS erforderlich. Durch oxidative Abspaltung von Inhibitoren proapoptotischer Enzyme kann folglich der programmierte Zelltod ausgelöst werden. Die Tatsache, dass eine ASK1- bzw. p38-Aktivierung durch Zusatz eines Antioxidanz (NAC) gehemmt werden konnte, spricht für die Notwendigkeit der ROS-Produktion bei der Auslösung der Apoptose durch E-LDL.

Die Menge der produzierten ROS scheint die Entscheidung, ob die Apoptose ausgelöst werden soll oder nicht, wesentlich zu beeinflussen. Kleine Mengen ROS (10-50 μ M H₂O₂) können sogar die Apoptose in Endothelzellen blockieren, indem es zur Erhöhung der Thioredoxin-Expression kommt (Haendeler *et al.*, 2004). Auch Wachstumsfaktoren können zu einer Produktion von ROS führen. So kommt es z.B. nach Stimulation von glatten Muskelzellen mit PDGF (*platelet-derived growth factor*) innerhalb von Minuten zur Entstehung von H₂O₂ (Sundaresan *et al.*, 1995). Intrazelluläre Tyrosin-Phosphatasen stellen möglicherweise ein Ziel der ROS dar, denn sie enthalten redox-sensitive Cysteine im aktiven Zentrum. Eine Funktion der Wachstumsfaktor-induzierten ROS-Produktion könnte also die Regulation der Tyrosin-Phosphatase Aktivität beinhalten.

Prävention der Atherosklerose mit Antioxidantien?

Die Einnahme von Vitaminen und Mineralstoffen als antioxidative Nahrungsergänzung ist nach wie vor umstritten. Eine Hemmung von oxidativen Prozessen, die zur Auslösung der Apoptose führen, kann zwar bei Betrachtung einzelner Signalwege eventuell angebracht sein. Allgemein gesehen aber kann eine generelle Ausschaltung oxidations-abhängiger Vorgänge durch hohe Dosen antioxidativer Substanzen nicht sinnvoll sein. Die Tatsache, dass ROS sowohl bei der Vermittlung von Wachstumssignalen als auch bei der Apoptose beteiligt sein können, spricht dafür, dass ROS nicht nur schädliche Effekte vermitteln. So dient z.B. auch der *oxidative Burst* in Makrophagen zur Abtötung von Bakterien.

Eine Auflistung der bisherigen Studien mit antioxidativen Vitaminen (A, C, E) wurde kürzlich von Duvall zusammengestellt mit dem Ergebnis, dass diese Therapie einen geringen bis nicht vorhandenen Nutzen für die Reduktion von Kardialen Ereignissen darstellt (Duvall, 2005). Auch die American Heart Association empfiehlt eine ausgewogene Ernährung ohne zusätzliche Ergänzungsmittel mit Ausnahme von Omega-3-Fettsäuren.

5.5 Regulation von Transkriptionsfaktoren durch E-LDL

In dieser Arbeit konnte der Effekt von E-LDL auf zwei verschiedene Transkriptionsfaktoren (AP-1 und NF- κ B) dargestellt werden. Dazu wurden Reporterplasmide, die aus AP-1 bzw. NF- κ B-*sites* gekoppelt mit einem Luciferasegen bestehen, in Endothelzellen bzw. Makrophagen (J774-Zellen) transfiziert. Nach Behandlung mit E-LDL kam es zu einer Erhöhung der AP-1 abhängigen Luciferaseexpression bei gleichzeitiger Hemmung von NF- κ B-Luc. Die beobachteten Effekte sind zwar relativ gering, stimmen aber überein mit bereits in der Arbeitsgruppe bestehenden Daten aus *elecrophoretic mobility shift assays* (Dissertation von D. Fenske). Durch Cotransfektion von FlagASK1 mit den jeweiligen Reporterplasmiden kam es ebenfalls zu einer Aktivierung von AP-1-Luc bzw. zu einer Hemmung von NF- κ B-Luc.

Letzterer Befund wurde allerdings von Hirovani *et al.* nicht beobachtet: durch Überexpression von konstitutiv aktivem ASK1 erreichte jene Arbeitsgruppe eine Aktivierung von NF- κ B. Weiterhin untersuchte jene Arbeitsgruppe die Angiotensin II vermittelte Entstehung von ROS in neonatalen Kardiomyocyten. Demzufolge kam es zur Aktivierung von ASK1 und zu einer anschließenden Aktivierung von NF- κ B, die die Entstehung einer kardialen Hypertrophie begünstigte (Hirovani *et al.*, 2002).

Obwohl nach Inkubation von Endothelzellen mit E-LDL ebenfalls oxidativer Stress entsteht, konnte in unserer Arbeitsgruppe keine Aktivierung von NF- κ B gefunden werden. D. Fenske zeigte in seiner Arbeit, dass wahrscheinlich die freien Fettsäuren des E-LDL für die Hemmung von NF- κ B verantwortlich sind, da sich bei Entzug der FFAs mit Albumin die Hemmung von NF- κ B aufhob und der Transkriptionsfaktor sich wieder durch TNF α stimulieren ließ.

Die in dieser Arbeit beobachtete Hemmung von NF- κ B durch ASK1 ließe sich durch die bereits erwähnte Hemmung der Kinase TAK1 durch ASK1 erklären, wodurch eine Aktivierung der NF- κ B-induzierenden Kinase NIK verhindert wird (Mochida *et al.*, 2000).

Eine Suppression von NF- κ B wurde allerdings auch schon von Heermeier *et al.* beschrieben. Diese Arbeitsgruppe fand eine verminderte NF- κ B Aktivität nach Inkubation von Endothelzellen mit oxLDL oder Lysophosphatidylcholin, resultierend in einer Reduktion der Expression des NF- κ B abhängigen, antiapoptischen Gens

A20. Somit wurde LPC neben der direkten Auslösung der Apoptose mit einer Reduktion der antiapoptitischen Schutzfunktion von Endothelzellen in Verbindung gebracht (Heermeier *et al.*, 2001).

Eine AP-1 Aktivierung wurde bisher im Zusammenhang mit der Atherosklerose bei der transkriptionellen Regulation von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) beobachtet (Hall *et al.*, 2003). Auch Bluthochdruck aktiviert MAP-Kinasen in der Gefäßwand, was eine Erhöhung der c-fos und c-jun Genexpression bzw. eine erhöhte AP-1 Bindungsaktivität zur Folge hat (Xu *et al.*, 1996). Eine verstärkte Expression der *Scavenger*-Rezeptoren in glatten Muskelzellen durch freie Radikale wurde ebenfalls mit einer Beteiligung von AP-1 in Verbindung gebracht (Mietus-Snyder, 1998).

Untersuchungen mit nativem LDL führten Zhu *et al.* durch; in *electrophoretic mobility shift assays* zeigten sie, dass AP-1, nicht aber NF- κ B in Endothelzellen durch LDL induziert wird. Nach Transfektion von AP-1-Luciferase Konstrukten konnte eine erhöhte Expression des Reportergens nach Behandlung mit nativem LDL festgestellt werden, die zwei Maxima, nämlich nach 6 Stunden und nach 48 Stunden enthielt. Bei der AP-1 Bindung war in diesem Fall nur c-jun, nicht aber c-fos beteiligt (Zhu *et al.*, 1998).

Die freien Fettsäuren aus E-LDL besitzen eine weitere Funktion: in Depletions- und Rekonstitutionsexperimente wurden FFAs als Auslöser der E-LDL induzierten IL-8 Produktion entdeckt (Suriyaphol *et al.*, 2002).

Die frühzeitig in den atherosklerotischen Läsionen entstehenden freien Fettsäuren könnten also zunächst über eine Erhöhung der IL-8 Produktion zu einer Anlockung von Monozyten beitragen. Die Hemmung der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch die freien Fettsäuren könnte eventuell mit einer nicht-entzündlichen Abräumung des subendothelial abgelagerten LDLs verbunden sein.

5.6 Wirkung von alpha-Toxin auf die MAPK-Kaskade

Durch Inkubation von HaCat-Zellen mit alpha-Toxin kam es zu einer langanhaltenden, starken p38-Phosphorylierung. Die Mutante des Toxins, die zwar an die Zellmembran bindet, aber keine Lyse der Zellen auslöst bzw. keine Poren bildet, konnte keine p38-Phosphorylierung bewirken. Eine maximale Aktivierung von

p38 durch alpha-Toxin wurde nach 1 Stunde erreicht. Zu demselben Zeitpunkt trat auch eine JNK-Aktivierung ein, die ebenfalls von langer Dauer war. Die Phosphorylierung der MAP-Kinase Erk erfolgte schleichend und nahm stetig bis zum Endpunkt der durchgeführten Kinetik bei 7 Stunden zu.

Im Gegensatz zu der starken, langanhaltenden Aktivierung der MAP-Kinasen p38, JNK und Erk erfolgte durch alpha-Toxin nur eine schwache ASK1-Phosphorylierung. Ausschaltung von ASK1 mittels RNA-Interferenz zeigte eine schwache Abhängigkeit der p38-Aktivierung von ASK1. Dies könnte darauf hindeuten, dass p38 auch durch andere MAPKKs aktiviert wird.

Durch Vorbehandlung mit einem Antioxidanz (NAC) konnte die p38-Aktivierung durch alpha-Toxin nicht gehemmt werden, was gegen die Auslösung von oxidativem Stress spricht. Dies ist ein wesentlicher Unterschied zur Aktivierung der MAPK-Kaskade durch E-LDL, die wie schon beschrieben vermutlich durch oxidative Abspaltung des Inhibitors von ASK1 erfolgt.

5.7 Kurzzeitige oder langanhaltende MAPK-Aktivierung

Bei der Durchführung einer Kinetik der p38 bzw. JNK-Phosphorylierung durch E-LDL war auffallend, dass es zu einer frühzeitigen, langanhaltenden p38-Aktivierung und einer späteren, nur kurzzeitigen JNK-Aktivierung kam. In diesem Fall führte die langanhaltende p38-Aktivierung, die abhängig von einer starken ASK1-Phosphorylierung ist, zur Apoptose der Endothelzellen.

Auch in anderen Arbeitsgruppen wurde schon ein ähnlicher Effekt beobachtet. Tobiume *et al.* zeigten, dass ASK1 für eine *langanhaltende* p38/JNK-Aktivierung benötigt wird, die schließlich zur Apoptose in verschiedenen Zellen führt. In Zellen aus ASK1-*knock out* Mäusen (ASK1^{-/-} MEFs) unterschied sich eine *kurzzeitige* Aktivierung von JNK oder p38 in Antwort auf H₂O₂ oder TNF nicht von der in ASK1^{+/+} MEFs. Erst nach 45 Minuten verringerte sich die p38/JNK-Phosphorylierung in den ASK1^{-/-} Zellen deutlich. Diese Zellen waren außerdem resistent gegen die H₂O₂- oder TNF- induzierte Apoptose (Tobiume *et al.*, 2001). Die frühe p38/JNK-Aktivierung erfolgte in diesem Fall wahrscheinlich kompensatorisch über andere MAPKKs wie z.B. MEKK1 (Xia *et al.*, 2000; Yujiri *et al.*, 2000).

Allgemein wurde eine kurze, frühzeitige JNK/p38-Aktivierung durch TNF, UV oder Serumentzug bisher mit der Tendenz zu zellulärem Überleben in Verbindung gebracht, wohingegen eine spätere, langanhaltende Aktivierung eher zur Apoptose führt (Guo *et al.*, 1998; Roulston *et al.*, 1998; Chen *et al.*, 1996; Xia *et al.*, 1995).

Welche Auswirkungen die E-LDL induzierte relativ kurzzeitige JNK-Aktivierung hat, müsste in weiteren Studien noch geklärt werden. Eine Abhängigkeit der Caspasen-Aktivierung bzw. der Apoptose von einer JNK-Aktivierung scheint hier nicht zu bestehen.

Auch bei der MAP-Kinase Erk induziert eine kurzzeitige oder langanhaltende Aktivierung unterschiedliche Effekte: bei einer transienten Erk-Aktivierung durch EGF kommt es zur Proliferation von PC12-Zellen, wohingegen eine langanhaltende Aktivierung durch NGF (*neuronal growth factor*) eine neuronale Differenzierung verursacht (Marshall, 1995). Eine schwache bzw. hohe Expression einer konstitutiv aktiven ASK1-Mutante erzeugte in Keratinozyten Differenzierung oder aber Apoptose (Marshall, 1994). Andere Studien berichten, dass eine moderate Expression von konstitutiv aktivem ASK1 über p38 Signale vermittelt, die sowohl zur neuronalen Differenzierung als auch zum Überleben von PC12-Zellen führen (Takeda *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2001). Allerdings wird auch in differenzierten PC12-Zellen durch Überexpression von ASK1 die Apoptose ausgelöst (Kanamoto *et al.*, 2000). ASK1 kommt also nicht nur beim stress-induzierten Zelltod sondern auch in einer weiten Reihe von biologischen Aktivitäten eine wichtige Rolle zu.

Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass es wegen der schwachen ASK1-Aktivierung durch alpha-Toxin nicht in dem Maße wie bei E-LDL zur Apoptose in HaCat-Zellen kommt, sondern dass alpha-Toxin eventuell über p38 Signale zur Zellteilung vermittelt.

Die Dauer bzw. das Ausmaß der Aktivierung der einzelnen MAP-Kinasen scheinen die Entscheidung zwischen dem Überleben der Zelle und Auslösung der Apoptose wesentlich zu beeinflussen. MAPK-Signalwege funktionieren nicht isoliert, sie sind integriert in ein zelluläres Signal-Netzwerk. Zellen empfangen ständig eine Vielzahl von verschiedenen Signalen. Die resultierenden Antworten entstehen durch Interaktionen der verschiedenen Signalwege. Schon geringfügige Änderungen im

Gleichgewicht der Stimulation der Zellen kann die Entscheidung zwischen Überleben der Zelle oder Apoptose beeinflussen. Da die MAPK in so vielen Fällen eine wichtige Rolle spielen, können Störungen in der Signalübertragung zu schwerwiegenden pathologischen Konsequenzen führen. Aus diesem Grund sind MAPK zu einem wichtigen therapeutischen Angriffspunkt geworden.

6. Zusammenfassung und Ausblick

Subendothelial in den Arterienwänden abgelagertes LDL unterliegt einer enzymatischen Modifikation, die es in einen cytotoxischen Partikel überführt. *In vitro* Behandlung von LDL mit Proteasen (Trypsin) und Cholesterinesterase führt zu einem dem läSIONalen LDL ähnlichen Produkt, dem E-LDL. Die Behandlung von Endothelzellen mit E-LDL, das einen hohen Gehalt an freiem Cholesterin und freien Fettsäuren aufweist, resultiert in der Auslösung von Apoptose durch Signalübertragung *via* MAPK-Kaskade (ASK1/p38) und mitochondrialer Caspasen-Aktivierung. Natives oder oxidiertes LDL konnte bei gleicher Konzentration keinen programmierten Zelltod induzieren.

Nach Inkubation von Endothelzellen mit E-LDL kommt es zur Entstehung von oxidativem Stress. Die dabei produzierten reaktiven Sauerstoffspezies sind wahrscheinlich der Auslöser für eine Aktivierung von ASK1, indem Thioredoxin, ein redox-sensibler Inhibitor von ASK1, abgespalten wird. Durch Vorbehandlung mit NAC läßt sich die Aktivierung sowohl von ASK1 als auch von p38 durch E-LDL blockieren. Die Apoptose wird ausgelöst durch die ASK1-abhängige Phosphorylierung der p38-MAP Kinase. Über eine p38-abhängige Aktivierung der Effektor-Caspasen-3/-7 kommt es schließlich zur Fragmentierung der DNA (TUNEL-Assay) und zur Spaltung von nukleären Enzymen (PARP). Ein weiteres Merkmal der E-LDL induzierten Apoptose ist neben dem Verlust von zellulärem ATP die Exposition von Phosphatidylserin auf der äußeren Zellmembran (Annexin-Assay). Behandlung der Endothelzellen mit nativem oder oxLDL führt jeweils zu einer deutlich schwächeren ASK1- bzw. p38-Phosphorylierung als E-LDL.

Durch Entfernen der freien Fettsäuren aus E-LDL mittels Albumin wurden weniger toxische Lipoproteinderivate hergestellt: E-LDL(d4) bzw. E-LDL(d10). Behandlung von Endothelzellen mit diesen Präparationen führte zu deutlich geringeren ATP-Verlusten im Vergleich zu E-LDL. Auch die ASK1- und p38 –Phosphorylierung sowie die Aktivierung der Caspase-3/-7 verringerte sich mit abnehmender Konzentration von freien Fettsäuren. Die schwache ASK1-bzw. p38 durch natives LDL konnte durch Depletion der freien Fettsäuren aus LDL fast komplett reduziert werden. In Rekonstitutionsexperimenten, d.h. nach Wiederhinzufügen der Fettsäuren, zeigten

sich wieder die ursprünglichen Effekte. Die Behandlung von Endothelzellen mit freien Fettsäuren alleine führt ebenfalls über eine Aktivierung von ASK1 und p38 zur Apoptose. Den freien Fettsäuren aus E-LDL kommt somit eine Triggerfunktion bei der Auslösung der Apoptose zu.

Durch Blockade der MAPK-Kaskade (Ausschaltung von ASK1 mit siRNAs; Hemmung von p38 mit SB203580) konnten die Zellen vor dem programmierten Zelltod gerettet werden.

Die Rolle der JNK-Aktivierung durch E-LDL im Zusammenhang mit der Auslösung der Apoptose ist unklar und bleibt ein Gegenstand weiterer Untersuchungen.

In Ergänzung zu bereits in der Arbeitsgruppe bestehenden Daten konnte mittels Reporterplasmiden eine Aktivierung von AP-1 bzw. eine Hemmung von NF- κ B durch E-LDL in Form einer erhöhten bzw. verminderten Luciferase-Expression gezeigt werden. Cotransfektion von FlagASK1 mit AP-1-Luc bzw. NF- κ B-Luc resultierte in einer Aktivierung der AP-1-abhängigen und in einer Hemmung der NF- κ B-abhängigen Luciferaseexpression.

Der Effekt von alpha-Toxin, einem anderen Forschungsgebiet der Arbeitsgruppe, auf die MAPK-Kaskade zeigte einige Abweichungen zu der durch E-LDL ausgelösten Signalübertragung. Die Unterschiede bestehen zum einen in der schwächeren Aktivierung von ASK1 bei gleich starker p38-Phosphorylierung. Andererseits läßt sich die p38-Phosphorylierung nicht wie bei E-LDL durch Vorbehandlung mit NAC hemmen. Durch alpha-Toxin erfolgt eine längeranhaltende JNK-Aktivierung als durch E-LDL. Die Abhängigkeit der p38-Phosphorylierung von ASK1 nach Toxin-Behandlung scheint jedoch gegeben zu sein.

Zusammenfassend bietet sich nun ein einfacher, bisher unerkannter Zusammenhang an zwischen der subendothelialen Ablagerung des LDL und der Apoptose von benachbarten Zellen. Letztere entsteht, wenn die Menge des abgelagerten Lipids einen bestimmten Schwellenwert überschreitet, so dass es, verursacht durch lokal vorhandene Proteasen und Cholesterinesterase, zur Freisetzung von toxischen Konzentrationen an freien Fettsäuren kommt. Ob der hier dargestellte Signalweg

auch in anderen Zellen innerhalb von atherosklerotischen Läsionen bzw. eine generelle Anwendung findet, sobald hohe Konzentrationen von freien Fettsäuren auf Zellen treffen, ist ein Gegenstand weiterer Untersuchungen. Der Befund, dass bei Blockade der MAPK-Kaskade eine Hemmung der Apoptose erfolgt, ist von großer Bedeutung für mögliche therapeutische Maßnahmen.

7. Veröffentlichung von Ergebnissen dieser Arbeit



Cell Death and Differentiation advance online publication 22 April 2005; doi: 10.1038/sj.cdd.4401633

Fatty acids liberated from low-density lipoprotein trigger endothelial apoptosis via mitogen-activated protein kinases

Edited by P Nicotera

K Dersch¹, H Ichijo², S Bhakdi¹ and M Husmann¹

1. ¹Institute of Medical Microbiology and Hygiene, Johannes Gutenberg-University Mainz, Hochhaus am Augustusplatz, 55131 Mainz, Germany
2. ²Laboratory of Cell Signaling Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan

Correspondence: Dr M Husmann, Institute of Medical Microbiology and Hygiene Johannes Gutenberg-University Mainz, Hochhaus am Augustusplatz, 55131 Mainz, Germany. Tel: +49-6131-3933128; Fax: +49-6131-3932359; E-mail:

MattHusmann@web.de

Received 11 November 2004; Revised 02 March 2005; Accepted 04 March 2005; Published online 22 April 2005.

Abstract

Enzymatic modification of low-density lipoprotein (LDL) as it probably occurs in the arterial intima drastically increases its cytotoxicity, which could be relevant for the progression of atherosclerotic lesions. LDL was treated with a protease and cholesterylesterase to generate a derivative similar to lesional LDL, with a high content of free cholesterol and fatty acids. Exposure of endothelial cells to the enzymatically modified lipoprotein (E-LDL), but not to native or oxidized LDL, resulted in programmed cell death. Apoptosis was triggered by apoptosis signal-regulating kinase 1 dependent phosphorylation of p38. Depletion and reconstitution experiments identified free fatty acids (FFA) as the triggers of this pathway. Levels of FFA in native LDL are low and the lipoprotein is therefore not cytotoxic; enzymatic cleavage of cholesterylestes liberates FFA that can rapidly trigger an apoptosis signaling cascade in neighboring cells. Blockade of this pathway can rescue cells from death.

Keywords: enzymatically modified LDL, free fatty acids; Endothelial cells, apoptosis; P38, apoptosis signal-regulating kinase 1

8. Literaturverzeichnis

- Aitken, A. (1995) 14-3-3 proteins on the MAP. *Trends Biochem Sci*, **20**, 95-97.
- Akiba, S., Yoneda, Y., Ohno, S., Nemoto, M. and Sato, T. (2003) Oxidized LDL activates phospholipase A2 to supply fatty acids required for cholesterol esterification. *J Lipid Res*, **44**, 1676-1685.
- Alexander, L.D., Cui, X.L., Falck, J.R. and Douglas, J.G. (2001) Arachidonic acid directly activates members of the mitogen-activated protein kinase superfamily in rabbit proximal tubule cells. *Kidney Int*, **59**, 2039-2053.
- Alving, C.R., Richards, R.L. and Guirguis, A.A. (1977) Cholesterol-dependent human complement activation resulting in damage to liposomal model membranes. *J Immunol*, **118**, 342-347.
- Angel, P. and Karin, M. (1991) The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta*, **1072**, 129-157.
- Baeuerle, P.A. and Baltimore, D. (1988) I kappa B: a specific inhibitor of the NF-kappa B transcription factor. *Science*, **242**, 540-546.
- Baker, S.J. and Reddy, E.P. (1998) Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene*, **17**, 3261-3270.
- Baumstark, M.W., Kreutz, W., Berg, A. and Keul, J. (1991) Symmetry of the surface, and structure of the central core of human LDL particles, analyzed by X-ray small angle scattering. *Adv Exp Med Biol*, **285**, 123-130.
- Bayraktutan, U., Blayney, L. and Shah, A.M. (2000) Molecular characterization and localization of the NAD(P)H oxidase components gp91-phox and p22-phox in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **20**, 1903-1911.
- Beg, A.A. and Baldwin, A.S., Jr. (1993) The I kappa B proteins: multifunctional regulators of Rel/NF-kappa B transcription factors. *Genes Dev*, **7**, 2064-2070.
- Behr-Roussel, D., Rupin, A., Simonet, S., Bonhomme, E., Coumailleau, S., Cordi, A., Serkiz, B., Fabiani, J.N. and Verbeuren, T.J. (2000) Effect of chronic treatment with the inducible nitric oxide synthase inhibitor N-iminoethyl-L-lysine or with L-arginine on progression of coronary and aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Circulation*, **102**, 1033-1038.
- Bennett, M.R. (1999) Apoptosis of vascular smooth muscle cells in vascular remodelling and atherosclerotic plaque rupture. *Cardiovasc Res*, **41**, 361-368.
- Bennett, M.R. (2001) Reactive oxygen species and death: oxidative DNA damage in atherosclerosis. *Circ Res*, **88**, 648-650.
- Berliner, J.A., Territo, M.C., Sevanian, A., Ramin, S., Kim, J.A., Bamshad, B., Esterson, M. and Fogelman, A.M. (1990) Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. *J Clin Invest*, **85**, 1260-1266.
- Bhakdi, S. (1998) Complement and atherogenesis: the unknown connection. *Ann Med*, **30**, 503-507.
- Bhakdi, S., Dorweiler, B., Kirchmann, R., Torzewski, J., Weise, E., Trantum-Jensen, J., Walev, I. and Wieland, E. (1995) On the pathogenesis of atherosclerosis: enzymatic transformation of human low density lipoprotein to an atherogenic moiety. *J Exp Med*, **182**, 1959-1971.
- Bhakdi, S., Torzewski, M., Klouche, M. and Hemmes, M. (1999) Complement and atherogenesis: binding of CRP to degraded, nonoxidized LDL enhances complement activation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **19**, 2348-2354.
- Bombeli, T., Karsan, A., Tait, J.F. and Harlan, J.M. (1997) Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant. *Blood*, **89**, 2429-2442.

- Bombeli, T., Schwartz, B.R. and Harlan, J.M. (1999) Endothelial cells undergoing apoptosis become proadhesive for nonactivated platelets. *Blood*, **93**, 3831-3838.
- Boulanger, C.M., Scoazec, A., Ebrahimian, T., Henry, P., Mathieu, E., Tedgui, A. and Mallat, Z. (2001) Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction. *Circulation*, **104**, 2649-2652.
- Bratton, S.B., MacFarlane, M., Cain, K. and Cohen, G.M. (2000) Protein complexes activate distinct caspase cascades in death receptor and stress-induced apoptosis. *Exp Cell Res*, **256**, 27-33.
- Brockman, J.A., Scherer, D.C., McKinsey, T.A., Hall, S.M., Qi, X., Lee, W.Y. and Ballard, D.W. (1995) Coupling of a signal response domain in I kappa B alpha to multiple pathways for NF-kappa B activation. *Mol Cell Biol*, **15**, 2809-2818.
- Brown, A.J., Mander, E.L., Gelissen, I.C., Kritharides, L., Dean, R.T. and Jessup, W. (2000) Cholesterol and oxysterol metabolism and subcellular distribution in macrophage foam cells. Accumulation of oxidized esters in lysosomes. *J Lipid Res*, **41**, 226-237.
- Brown, G. (1985) A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Nobel lecture*, 9. December.
- Brown, M.S. and Goldstein, J.L. (1997) The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*, **89**, 331-340.
- Brown, R.T., Ades, I.Z. and Nordan, R.P. (1995) An acute phase response factor/NF-kappa B site downstream of the junB gene that mediates responsiveness to interleukin-6 in a murine plasmacytoma. *J Biol Chem*, **270**, 31129-31135.
- Cai, H. and Harrison, D.G. (2000) Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*, **87**, 840-844.
- Carmeliet, P. (2000) Proteinases in cardiovascular aneurysms and rupture: targets for therapy? *J Clin Invest*, **105**, 1519-1520.
- Chang, H.Y., Nishitoh, H., Yang, X., Ichijo, H. and Baltimore, D. (1998) Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by the adapter protein Daxx. *Science*, **281**, 1860-1863.
- Chao, F.F., Amende, L.M., Blanchette-Mackie, E.J., Skarlatos, S.I., Gamble, W., Resau, J.H., Mergner, W.T. and Kruth, H.S. (1988) Unesterified cholesterol-rich lipid particles in atherosclerotic lesions of human and rabbit aortas. *Am J Pathol*, **131**, 73-83.
- Chen, C.G., Malliaros, J., Katerelos, M., d'Apice, A.J. and Pearse, M.J. (1996a) Mutation at ser32 of I kappa B alpha blocks NF-kappa B activation. *Transplant Proc*, **28**, 615-616.
- Chen, J., Fujii, K., Zhang, L., Roberts, T. and Fu, H. (2001) Raf-1 promotes cell survival by antagonizing apoptosis signal-regulating kinase 1 through a MEK-ERK independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 7783-7788.
- Chen, M., Masaki, T. and Sawamura, T. (2002) LOX-1, the receptor for oxidized low-density lipoprotein identified from endothelial cells: implications in endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Pharmacol Ther*, **95**, 89-100.
- Chen, Y.R., Wang, X., Templeton, D., Davis, R.J. and Tan, T.H. (1996b) The role of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in apoptosis induced by ultraviolet C and gamma radiation. Duration of JNK activation may determine cell death and proliferation. *J Biol Chem*, **271**, 31929-31936.
- Chinkers, M. (2001) Protein phosphatase 5 in signal transduction. *Trends Endocrinol Metab*, **12**, 28-32.

- Collins, R.G., Velji, R., Guevara, N.V., Hicks, M.J., Chan, L. and Beaudet, A.L. (2000) P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Exp Med*, **191**, 189-194.
- Cui, X.L. and Douglas, J.G. (1997) Arachidonic acid activates c-jun N-terminal kinase through NADPH oxidase in rabbit proximal tubular epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 3771-3776.
- Cybulsky, M.I. and Gimbrone, M.A., Jr. (1991) Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science*, **251**, 788-791.
- Cyrus, T., Witztum, J.L., Rader, D.J., Tangirala, R., Fazio, S., Linton, M.F. and Funk, C.D. (1999) Disruption of the 12/15-lipoxygenase gene diminishes atherosclerosis in apo E-deficient mice. *J Clin Invest*, **103**, 1597-1604.
- Das, A.K., Cohen, P.W. and Barford, D. (1998) The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. *Embo J*, **17**, 1192-1199.
- Davies, M.J., Richardson, P.D., Woolf, N., Katz, D.R. and Mann, J. (1993) Risk of thrombosis in human atherosclerotic plaques: role of extracellular lipid, macrophage, and smooth muscle cell content. *Br Heart J*, **69**, 377-381.
- de Villiers, W.J. and Smart, E.J. (1999) Macrophage scavenger receptors and foam cell formation. *J Leukoc Biol*, **66**, 740-746.
- Degitz, K., Li, L.J. and Caughman, S.W. (1991) Cloning and characterization of the 5'-transcriptional regulatory region of the human intercellular adhesion molecule 1 gene. *J Biol Chem*, **266**, 14024-14030.
- Deveraux, Q.L., Roy, N., Stennicke, H.R., Van Arsdale, T., Zhou, Q., Srinivasula, S.M., Alnemri, E.S., Salvesen, G.S. and Reed, J.C. (1998) IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *Embo J*, **17**, 2215-2223.
- Dimmeler, S., Haendeler, J. and Zeiher, A.M. (2002) Regulation of endothelial cell apoptosis in atherothrombosis. *Curr Opin Lipidol*, **13**, 531-536.
- Dimmeler, S. and Zeiher, A.M. (1997) Nitric oxide and apoptosis: another paradigm for the double-edged role of nitric oxide. *Nitric Oxide*, **1**, 275-281.
- Dimmeler, S. and Zeiher, A.M. (1999) Nitric oxide-an endothelial cell survival factor. *Cell Death Differ*, **6**, 964-968.
- Dong, Z.M., Chapman, S.M., Brown, A.A., Frenette, P.S., Hynes, R.O. and Wagner, D.D. (1998) The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest*, **102**, 145-152.
- Dorion, S., Lambert, H. and Landry, J. (2002) Activation of the p38 signaling pathway by heat shock involves the dissociation of glutathione S-transferase Mu from Ask1. *J Biol Chem*, **277**, 30792-30797.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L. and Wang, X. (2000) Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, **102**, 33-42.
- Dudek, H., Datta, S.R., Franke, T.F., Birnbaum, M.J., Yao, R., Cooper, G.M., Segal, R.A., Kaplan, D.R. and Greenberg, M.E. (1997) Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science*, **275**, 661-665.
- Duvall, W.L. (2005) Endothelial dysfunction and antioxidants. *Mt Sinai J Med*, **72**, 71-80.
- Earnshaw, W.C., Martins, L.M. and Kaufmann, S.H. (1999) Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem*, **68**, 383-424.

- Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T. (2001a) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, **411**, 494-498.
- Elbashir, S.M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W. and Tuschl, T. (2001b) Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *Embo J*, **20**, 6877-6888.
- Esterbauer, H., Gebicki, J., Puhl, H. and Jurgens, G. (1992) The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med*, **13**, 341-390.
- Febbraio, M., Podrez, E.A., Smith, J.D., Hajjar, D.P., Hazen, S.L., Hoff, H.F., Sharma, K. and Silverstein, R.L. (2000) Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin Invest*, **105**, 1049-1056.
- Fenske, D. (2001) Enzymatisch modifiziertes LDL induziert IL-8 in Endothelzellen bei Hemmung von NF-kB und Induktion von AP-1. *Dissertation im Fachbereich Medizin, Joh.Gutenberg Universität Mainz*.
- Finco, T.S., Beg, A.A. and Baldwin, A.S., Jr. (1994) Inducible phosphorylation of I kappa B alpha is not sufficient for its dissociation from NF-kappa B and is inhibited by protease inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 11884-11888.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**, 806-811.
- Forman, H.J. and Torres, M. (2002) Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. *Am J Respir Crit Care Med*, **166**, S4-8.
- Fournet-Bourguignon, M.P., Castedo-Delrieu, M., Bidouard, J.P., Leonce, S., Saboureau, D., Delescluse, I., Vilaine, J.P. and Vanhoutte, P.M. (2000) Phenotypic and functional changes in regenerated porcine coronary endothelial cells : increased uptake of modified LDL and reduced production of NO. *Circ Res*, **86**, 854-861.
- Frank, J.S. and Fogelman, A.M. (1989) Ultrastructure of the intima in WHHL and cholesterol-fed rabbit aortas prepared by ultra-rapid freezing and freeze-etching. *J Lipid Res*, **30**, 967-978.
- Franke, T.F., Kaplan, D.R. and Cantley, L.C. (1997) PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis. *Cell*, **88**, 435-437.
- Fukuda, H., Shima, H., Vesonder, R.F., Tokuda, H., Nishino, H., Katoh, S., Tamura, S., Sugimura, T. and Nagao, M. (1996) Inhibition of protein serine/threonine phosphatases by fumonisin B1, a mycotoxin. *Biochem Biophys Res Commun*, **220**, 160-165.
- Galis, Z.S., Sukhova, G.K., Lark, M.W. and Libby, P. (1994) Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*, **94**, 2493-2503.
- Galle, J., Heinloth, A., Wanner, C. and Heermeier, K. (2001) Dual effect of oxidized LDL on cell cycle in human endothelial cells through oxidative stress. *Kidney Int Suppl*, **78**, S120-123.
- Galle, J., Schneider, R., Heinloth, A., Wanner, C., Galle, P.R., Conzelmann, E., Dimmeler, S. and Heermeier, K. (1999) Lp(a) and LDL induce apoptosis in human endothelial cells and in rabbit aorta: role of oxidative stress. *Kidney Int*, **55**, 1450-1461.

- Garcia-Cardena, G., Comander, J.I., Blackman, B.R., Anderson, K.R. and Gimbrone, M.A. (2001) Mechanosensitive endothelial gene expression profiles: scripts for the role of hemodynamics in atherogenesis? *Ann N Y Acad Sci*, **947**, 1-6.
- Ghatan, S., Lerner, S., Kinoshita, Y., Hetman, M., Patel, L., Xia, Z., Youle, R.J. and Morrison, R.S. (2000) p38 MAP kinase mediates bax translocation in nitric oxide-induced apoptosis in neurons. *J Cell Biol*, **150**, 335-347.
- Glagov, S., Zarins, C., Giddens, D.P. and Ku, D.N. (1988) Hemodynamics and atherosclerosis. Insights and perspectives gained from studies of human arteries. *Arch Pathol Lab Med*, **112**, 1018-1031.
- Glass, C.K. and Witztum, J.L. (2001) Atherosclerosis. the road ahead. *Cell*, **104**, 503-516.
- Gluecksmann, A. (1951) Cell death in normal vertebrate ontogeny. *Biological Reviews*, **26**, 59-86.
- Goldstein, J.L. and Brown, M.S. (1977) Atherosclerosis: the low-density lipoprotein receptor hypothesis. *Metabolism*, **26**, 1257-1275.
- Goldstein, J.L., Ho, Y.K., Basu, S.K. and Brown, M.S. (1979) Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 333-337.
- Goossens, V., Grooten, J., De Vos, K. and Fiers, W. (1995) Direct evidence for tumor necrosis factor-induced mitochondrial reactive oxygen intermediates and their involvement in cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 8115-8119.
- Goping, I.S., Gross, A., Lavoie, J.N., Nguyen, M., Jemmerson, R., Roth, K., Korsmeyer, S.J. and Shore, G.C. (1998) Regulated targeting of BAX to mitochondria. *J Cell Biol*, **143**, 207-215.
- Gould, A.L., Rossouw, J.E., Santanello, N.C., Heyse, J.F. and Furberg, C.D. (1998) Cholesterol reduction yields clinical benefit: impact of statin trials. *Circulation*, **97**, 946-952.
- Greaves, D.R., Gough, P.J. and Gordon, S. (1998) Recent progress in defining the role of scavenger receptors in lipid transport, atherosclerosis and host defence. *Curr Opin Lipidol*, **9**, 425-432.
- Grethe, S., Ares, M.P., Andersson, T. and Porn-Ares, M.I. (2004) p38 MAPK mediates TNF-induced apoptosis in endothelial cells via phosphorylation and downregulation of Bcl-x(L). *Exp Cell Res*, **298**, 632-642.
- Griendling, K.K., Minieri, C.A., Ollerenshaw, J.D. and Alexander, R.W. (1994) Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res*, **74**, 1141-1148.
- Griendling, K.K., Sorescu, D. and Ushio-Fukai, M. (2000) NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*, **86**, 494-501.
- Griendling, K.K. and Ushio-Fukai, M. (1998) Redox control of vascular smooth muscle proliferation. *J Lab Clin Med*, **132**, 9-15.
- Guicciardi, M.E. and Gores, G.J. (2003) AIP1: a new player in TNF signaling. *J Clin Invest*, **111**, 1813-1815.
- Guo, J.H., Wang, H.Y. and Malbon, C.C. (1998) Conditional, tissue-specific expression of Q205L Galphai2 in vivo mimics insulin activation of c-Jun N-terminal kinase and p38 kinase. *J Biol Chem*, **273**, 16487-16493.
- Gupta, S., Barrett, T., Whitmarsh, A.J., Cavanagh, J., Sluss, H.K., Derijard, B. and Davis, R.J. (1996) Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. *Embo J*, **15**, 2760-2770.

- Haendeler, J., Hoffmann, J., Tischler, V., Berk, B.C., Zeiher, A.M. and Dimmeler, S. (2002) Redox regulatory and anti-apoptotic functions of thioredoxin depend on S-nitrosylation at cysteine 69. *Nat Cell Biol*, **4**, 743-749.
- Haendeler, J., Tischler, V., Hoffmann, J., Zeiher, A.M. and Dimmeler, S. (2004) Low doses of reactive oxygen species protect endothelial cells from apoptosis by increasing thioredoxin-1 expression. *FEBS Lett*, **577**, 427-433.
- Hai, T. and Curran, T. (1991) Cross-family dimerization of transcription factors Fos/Jun and ATF/CREB alters DNA binding specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 3720-3724.
- Hall, M.C., Young, D.A., Waters, J.G., Rowan, A.D., Chantry, A., Edwards, D.R. and Clark, I.M. (2003) The comparative role of activator protein 1 and Smad factors in the regulation of Timp-1 and MMP-1 gene expression by transforming growth factor-beta 1. *J Biol Chem*, **278**, 10304-10313.
- Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D. and Hannon, G.J. (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells. *Nature*, **404**, 293-296.
- Han, S.R., Momeni, A., Strach, K., Suriyaphol, P., Fenske, D., Paprotka, K., Hashimoto, S.I., Torzewski, M., Bhakdi, S. and Husmann, M. (2003) Enzymatically modified LDL induces cathepsin H in human monocytes: potential relevance in early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **23**, 661-667.
- Hansson, G.K. (1997) Cell-mediated immunity in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, **8**, 301-311.
- Harats, D., Shaish, A., George, J., Mulkins, M., Kurihara, H., Levkovitz, H. and Sigal, E. (2000) Overexpression of 15-lipoxygenase in vascular endothelium accelerates early atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **20**, 2100-2105.
- Hatai, T., Matsuzawa, A., Inoshita, S., Mochida, Y., Kuroda, T., Sakamaki, K., Kuida, K., Yonehara, S., Ichijo, H. and Takeda, K. (2000) Execution of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)-induced apoptosis by the mitochondria-dependent caspase activation. *J Biol Chem*, **275**, 26576-26581.
- Havel, R.J., Eder, H.A. and Bragdon, J.H. (1955) The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest*, **34**, 1345-1353.
- Haworth, R., Platt, N., Keshav, S., Hughes, D., Darley, E., Suzuki, H., Kurihara, Y., Kodama, T. and Gordon, S. (1997) The macrophage scavenger receptor type A is expressed by activated macrophages and protects the host against lethal endotoxic shock. *J Exp Med*, **186**, 1431-1439.
- Heermeier, K., Leicht, W., Palmetshofer, A., Ullrich, M., Wanner, C. and Galle, J. (2001) Oxidized LDL suppresses NF-kappaB and overcomes protection from apoptosis in activated endothelial cells. *J Am Soc Nephrol*, **12**, 456-463.
- Heinecke, J.W. (1998) Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis. *Atherosclerosis*, **141**, 1-15.
- Heinloth, A., Heermeier, K., Raff, U., Wanner, C. and Galle, J. (2000) Stimulation of NADPH oxidase by oxidized low-density lipoprotein induces proliferation of human vascular endothelial cells. *J Am Soc Nephrol*, **11**, 1819-1825.
- Henderson, L.M., Moule, S.K. and Chappell, J.B. (1993) The immediate activator of the NADPH oxidase is arachidonate not phosphorylation. *Eur J Biochem*, **211**, 157-162.

- Hirotsu, S., Otsu, K., Nishida, K., Higuchi, Y., Morita, T., Nakayama, H., Yamaguchi, O., Mano, T., Matsumura, Y., Ueno, H., Tada, M. and Hori, M. (2002) Involvement of nuclear factor-kappaB and apoptosis signal-regulating kinase 1 in G-protein-coupled receptor agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Circulation*, **105**, 509-515.
- Hladovec, J., Prerovsky, I., Stanek, V. and Fabian, J. (1978) Circulating endothelial cells in acute myocardial infarction and angina pectoris. *Klin Wochenschr*, **56**, 1033-1036.
- Hoppe, G., O'Neil, J. and Hoff, H.F. (1994) Inactivation of lysosomal proteases by oxidized low density lipoprotein is partially responsible for its poor degradation by mouse peritoneal macrophages. *J Clin Invest*, **94**, 1506-1512.
- Hoppe, G., Ravandi, A., Herrera, D., Kuksis, A. and Hoff, H.F. (1997) Oxidation products of cholesteryl linoleate are resistant to hydrolysis in macrophages, form complexes with proteins, and are present in human atherosclerotic lesions. *J Lipid Res*, **38**, 1347-1360.
- Huang, H., Joazeiro, C.A., Bonfoco, E., Kamada, S., Levenson, J.D. and Hunter, T. (2000) The inhibitor of apoptosis, cIAP2, functions as a ubiquitin-protein ligase and promotes in vitro monoubiquitination of caspases 3 and 7. *J Biol Chem*, **275**, 26661-26664.
- Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K., ten Dijke, P., Saitoh, M., Moriguchi, T., Takagi, M., Matsumoto, K., Miyazono, K. and Gotoh, Y. (1997) Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science*, **275**, 90-94.
- Jacobson, M.D. and Raff, M.C. (1995) Programmed cell death and Bcl-2 protection in very low oxygen. *Nature*, **374**, 814-816.
- Jessup, W., Mander, E.L. and Dean, R.T. (1992) The intracellular storage and turnover of apolipoprotein B of oxidized LDL in macrophages. *Biochim Biophys Acta*, **1126**, 167-177.
- Jha, P., Flather, M., Lonn, E., Farkouh, M. and Yusuf, S. (1995) The antioxidant vitamins and cardiovascular disease. A critical review of epidemiologic and clinical trial data. *Ann Intern Med*, **123**, 860-872.
- Jialal, I. and Chait, A. (1989) Differences in the metabolism of oxidatively modified low density lipoprotein and acetylated low density lipoprotein by human endothelial cells: inhibition of cholesterol esterification by oxidatively modified low density lipoprotein. *J Lipid Res*, **30**, 1561-1568.
- Jing, Q., Xin, S.M., Cheng, Z.J., Zhang, W.B., Zhang, R., Qin, Y.W. and Pei, G. (1999) Activation of p38 mitogen-activated protein kinase by oxidized LDL in vascular smooth muscle cells: mediation via pertussis toxin-sensitive G proteins and association with oxidized LDL-induced cytotoxicity. *Circ Res*, **84**, 831-839.
- Jorgensen, R. (1990) Altered gene expression in plants due to trans interactions between homologous genes. *Trends Biotechnol*, **8**, 340-344.
- Kanamoto, T., Mota, M., Takeda, K., Rubin, L.L., Miyazono, K., Ichijo, H. and Bazenet, C.E. (2000) Role of apoptosis signal-regulating kinase in regulation of the c-Jun N-terminal kinase pathway and apoptosis in sympathetic neurons. *Mol Cell Biol*, **20**, 196-204.
- Kang, H., Sayner, S.L., Gross, K.L., Russell, L.C. and Chinkers, M. (2001) Identification of amino acids in the tetratricopeptide repeat and C-terminal domains of protein phosphatase 5 involved in autoinhibition and lipid activation. *Biochemistry*, **40**, 10485-10490.

- Karin, M. (1995) The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem*, **270**, 16483-16486.
- Karin, M., Liu, Z. and Zandi, E. (1997) AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol*, **9**, 240-246.
- Kaufman, R.J. (1999) Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev*, **13**, 1211-1233.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H. and Currie, A.R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, **26**, 239-257.
- Kim, A.H., Khursigara, G., Sun, X., Franke, T.F. and Chao, M.V. (2001) Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol Cell Biol*, **21**, 893-901.
- Kinlay, S. and Ganz, P. (1997) Role of endothelial dysfunction in coronary artery disease and implications for therapy. *Am J Cardiol*, **80**, 111-161.
- Kirk, E.A., Dinauer, M.C., Rosen, H., Chait, A., Heinecke, J.W. and LeBoeuf, R.C. (2000) Impaired superoxide production due to a deficiency in phagocyte NADPH oxidase fails to inhibit atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **20**, 1529-1535.
- Klouche, M., Gottschling, S., Gerl, V., Hell, W., Husmann, M., Dorweiler, B., Messner, M. and Bhakdi, S. (1998) Atherogenic properties of enzymatically degraded LDL: selective induction of MCP-1 and cytotoxic effects on human macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **18**, 1376-1385.
- Klouche, M., May, A.E., Hemmes, M., Messner, M., Kanse, S.M., Preissner, K.T. and Bhakdi, S. (1999) Enzymatically modified, nonoxidized LDL induces selective adhesion and transmigration of monocytes and T-lymphocytes through human endothelial cell monolayers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **19**, 784-793.
- Knowles, J.W. and Maeda, N. (2000) Genetic modifiers of atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **20**, 2336-2345.
- Kruth, H.S. (1984) Localization of unesterified cholesterol in human atherosclerotic lesions. Demonstration of filipin-positive, oil-red-O-negative particles. *Am J Pathol*, **114**, 201-208.
- Kruth, H.S. (1985) Subendothelial accumulation of unesterified cholesterol. An early event in atherosclerotic lesion development. *Atherosclerosis*, **57**, 337-341.
- Kuhn, H., Heydeck, D., Hugou, I. and Gniwotta, C. (1997) In vivo action of 15-lipoxygenase in early stages of human atherogenesis. *J Clin Invest*, **99**, 888-893.
- Kume, N., Cybulsky, M.I. and Gimbrone, M.A., Jr. (1992) Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells. *J Clin Invest*, **90**, 1138-1144.
- Landschulz, W.H., Johnson, P.F. and McKnight, S.L. (1988) The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science*, **240**, 1759-1764.
- Lang, V., Janzen J., Fischer, G.Z., Soneji, Y., Beinke S., Salmeron A., Allen H., Hay R.T., Ben-Neriah Y., Ley S.C. (2003) β TrCP-mediated proteolysis of NF- κ B1 p105 requires phosphorylation of p105 serines 927 and 932. *Mol Cell Biol*, **23**, 402-413.
- Ledebur, H.C. and Parks, T.P. (1995) Transcriptional regulation of the intercellular adhesion molecule-1 gene by inflammatory cytokines in human endothelial

- cells. Essential roles of a variant NF-kappa B site and p65 homodimers. *J Biol Chem*, **270**, 933-943.
- Lee, R.T. and Libby, P. (1997) The unstable atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **17**, 1859-1867.
- Lehr, H.A., Sagban, T.A., Ihling, C., Zahringer, U., Hungerer, K.D., Blumrich, M., Reifenberg, K. and Bhakdi, S. (2001) Immunopathogenesis of atherosclerosis: endotoxin accelerates atherosclerosis in rabbits on hypercholesterolemic diet. *Circulation*, **104**, 914-920.
- Leist, M. and Jaattela, M. (2001) Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 589-598.
- Leusen, J.H., Verhoeven, A.J. and Roos, D. (1996) Interactions between the components of the human NADPH oxidase: a review about the intrigues in the phox family. *Front Biosci*, **1**, d72-90.
- Li, D. and Mehta, J.L. (2000) Upregulation of endothelial receptor for oxidized LDL (LOX-1) by oxidized LDL and implications in apoptosis of human coronary artery endothelial cells: evidence from use of antisense LOX-1 mRNA and chemical inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **20**, 1116-1122.
- Li, D.Y., Chen, H.J. and Mehta, J.L. (2001) Statins inhibit oxidized-LDL-mediated LOX-1 expression, uptake of oxidized-LDL and reduction in PKB phosphorylation. *Cardiovasc Res*, **52**, 130-135.
- Li, F., Ambrosini, G., Chu, E.Y., Plescia, J., Tognin, S., Marchisio, P.C. and Altieri, D.C. (1998) Control of apoptosis and mitotic spindle checkpoint by survivin. *Nature*, **396**, 580-584.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S. and Wang, X. (1997) Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, **91**, 479-489.
- Lin, J.H. (1996) Induction of vascular cell adhesion molecule-1 by low-density lipoprotein. *Atherosclerosis*, **127**, 185-194.
- Liu, H., Nishitoh, H., Ichijo, H. and Kyriakis, J.M. (2000) Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 requires prior dissociation of the ASK1 inhibitor thioredoxin. *Mol Cell Biol*, **20**, 2198-2208.
- Liu, Y. and Min, W. (2002) Thioredoxin promotes ASK1 ubiquitination and degradation to inhibit ASK1-mediated apoptosis in a redox activity-independent manner. *Circ Res*, **90**, 1259-1266.
- Lockshin, R.A. and Zakeri, Z. (2001) Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 545-550.
- Lockshin, R.A.a.W., C.M. (1964) Programmed cell death. II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkmoths. *Journal of Insect Physiology*, **10**, 643-649.
- Lougheed, M., Zhang, H.F. and Steinbrecher, U.P. (1991) Oxidized low density lipoprotein is resistant to cathepsins and accumulates within macrophages. *J Biol Chem*, **266**, 14519-14525.
- Lucas, A.D. and Greaves, D.R. (2001) Atherosclerosis: role of chemokines and macrophages. *Expert Rev Mol Med*, **2001**, 1-18.
- Mallat, Z., Hugel, B., Ohan, J., Leseche, G., Freyssinet, J.M. and Tedgui, A. (1999) Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation*, **99**, 348-353.

- Mander, E.L., Dean, R.T., Stanley, K.K. and Jessup, W. (1994) Apolipoprotein B of oxidized LDL accumulates in the lysosomes of macrophages. *Biochim Biophys Acta*, **1212**, 80-92.
- Maor, I. and Aviram, M. (1994) Oxidized low density lipoprotein leads to macrophage accumulation of unesterified cholesterol as a result of lysosomal trapping of the lipoprotein hydrolyzed cholesteryl ester. *J Lipid Res*, **35**, 803-819.
- Marshall, C.J. (1995) Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*, **80**, 179-185.
- Matsuzawa, A. and Ichijo, H. (2001) Molecular mechanisms of the decision between life and death: regulation of apoptosis by apoptosis signal-regulating kinase 1. *J Biochem (Tokyo)*, **130**, 1-8.
- Mietus-Snyder, M., Glass, C.K. and Pitas, R.E. (1998) Transcriptional activation of scavenger receptor expression in human smooth muscle cells requires AP-1/c-Jun and C/EBPbeta: both AP-1 binding and JNK activation are induced by phorbol esters and oxidative stress. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **18**, 1440-1449.
- Mochida, Y., Takeda, K., Saitoh, M., Nishitoh, H., Amagasa, T., Ninomiya-Tsuji, J., Matsumoto, K. and Ichijo, H. (2000) ASK1 inhibits interleukin-1-induced NF-kappa B activity through disruption of TRAF6-TAK1 interaction. *J Biol Chem*, **275**, 32747-32752.
- Mora, R., Lupu, F. and Simionescu, N. (1987) Prelesional events in atherogenesis. Colocalization of apolipoprotein B, unesterified cholesterol and extracellular phospholipid liposomes in the aorta of hyperlipidemic rabbit. *Atherosclerosis*, **67**, 143-154.
- Morel, D.W., Hessler, J.R. and Chisolm, G.M. (1983) Low density lipoprotein cytotoxicity induced by free radical peroxidation of lipid. *J Lipid Res*, **24**, 1070-1076.
- Mori, K. (2000) Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell*, **101**, 451-454.
- Morita, K., Saitoh, M., Tobiume, K., Matsuura, H., Enomoto, S., Nishitoh, H. and Ichijo, H. (2001) Negative feedback regulation of ASK1 by protein phosphatase 5 (PP5) in response to oxidative stress. *Embo J*, **20**, 6028-6036.
- Muchmore, S.W., Sattler, M., Liang, H., Meadows, R.P., Harlan, J.E., Yoon, H.S., Nettesheim, D., Chang, B.S., Thompson, C.B., Wong, S.L., Ng, S.L. and Fesik, S.W. (1996) X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature*, **381**, 335-341.
- Murakami, M. and Kudo, I. (2003) New phospholipase A(2) isozymes with a potential role in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol*, **14**, 431-436.
- Mutin, M., Canavy, I., Blann, A., Bory, M., Sampol, J. and Dignat-George, F. (1999) Direct evidence of endothelial injury in acute myocardial infarction and unstable angina by demonstration of circulating endothelial cells. *Blood*, **93**, 2951-2958.
- Nagata, S. (1999) Fas ligand-induced apoptosis. *Annu Rev Genet*, **33**, 29-55.
- Napoli, C., D'Armiento, F.P., Mancini, F.P., Postiglione, A., Witztum, J.L., Palumbo, G. and Palinski, W. (1997) Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest*, **100**, 2680-2690.
- Navab, M., Berliner, J.A., Watson, A.D., Hama, S.Y., Territo, M.C., Lusis, A.J., Shih, D.M., Van Lenten, B.J., Frank, J.S., Demer, L.L., Edwards, P.A. and

- Fogelman, A.M. (1996) The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **16**, 831-842.
- Neish, A.S., Williams, A.J., Palmer, H.J., Whitley, M.Z. and Collins, T. (1992) Functional analysis of the human vascular cell adhesion molecule 1 promoter. *J Exp Med*, **176**, 1583-1593.
- Nicoletti, A., Caligiuri, G. and Hansson, G.K. (2000) Immunomodulation of atherosclerosis: myth and reality. *J Intern Med*, **247**, 397-405.
- Niculescu, F., Hugo, F., Rus, H.G., Vlaicu, R. and Bhakdi, S. (1987) Quantitative evaluation of the terminal C5b-9 complement complex by ELISA in human atherosclerotic arteries. *Clin Exp Immunol*, **69**, 477-483.
- Ninomiya-Tsuji, J., Kishimoto, K., Hiyama, A., Inoue, J., Cao, Z. and Matsumoto, K. (1999) The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature*, **398**, 252-256.
- Nishitoh, H., Matsuzawa, A., Tobiume, K., Saegusa, K., Takeda, K., Inoue, K., Hori, S., Kakizuka, A. and Ichijo, H. (2002) ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev*, **16**, 1345-1355.
- Nishitoh, H., Saitoh, M., Mochida, Y., Takeda, K., Nakano, H., Rothe, M., Miyazono, K. and Ichijo, H. (1998) ASK1 is essential for JNK/SAPK activation by TRAF2. *Mol Cell*, **2**, 389-395.
- Noris, M., Morigi, M., Donadelli, R., Aiello, S., Foppolo, M., Todeschini, M., Orisio, S., Remuzzi, G. and Remuzzi, A. (1995) Nitric oxide synthesis by cultured endothelial cells is modulated by flow conditions. *Circ Res*, **76**, 536-543.
- Pagano, P.J., Clark, J.K., Cifuentes-Pagano, M.E., Clark, S.M., Callis, G.M. and Quinn, M.T. (1997) Localization of a constitutively active, phagocyte-like NADPH oxidase in rabbit aortic adventitia: enhancement by angiotensin II. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 14483-14488.
- Pahl, H.L. and Baeuerle, P.A. (1996) Activation of NF-kappa B by ER stress requires both Ca²⁺ and reactive oxygen intermediates as messengers. *FEBS Lett*, **392**, 129-136.
- Park, H.S., Cho, S.G., Kim, C.K., Hwang, H.S., Noh, K.T., Kim, M.S., Huh, S.H., Kim, M.J., Ryoo, K., Kim, E.K., Kang, W.J., Lee, J.S., Seo, J.S., Ko, Y.G., Kim, S. and Choi, E.J. (2002) Heat shock protein hsp72 is a negative regulator of apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol Cell Biol*, **22**, 7721-7730.
- Perkins, N.D. (2000) The Rel/NF-kB family: friend and foe. *Trends Biochem Sci*, **25**, 434-440.
- Peters, W. and Charo, I.F. (2001) Involvement of chemokine receptor 2 and its ligand, monocyte chemoattractant protein-1, in the development of atherosclerosis: lessons from knockout mice. *Curr Opin Lipidol*, **12**, 175-180.
- Ramsey, A.J. and Chinkers, M. (2002) Identification of potential physiological activators of protein phosphatase 5. *Biochemistry*, **41**, 5625-5632.
- Rao, G.N., Alexander, R.W. Runge, M.S. (1995) Linoleic acid and its metabolites, Hydroperoxyoctadecadienoic acids, stimulate c-fos, c-jun, and c-myc mRNA expression, mitogen-activated protein kinase activation, and growth in rat aortic smooth muscle cells. *J Clin Invest*, **96**, 842-847.
- Reape, T.J. and Groot, P.H. (1999) Chemokines and atherosclerosis. *Atherosclerosis*, **147**, 213-225.
- Roebuck, K.A., Rahman, A., Lakshminarayanan, V., Janakidevi, K. and Malik, A.B. (1995) H₂O₂ and tumor necrosis factor-alpha activate intercellular adhesion

- molecule 1 (ICAM-1) gene transcription through distinct cis-regulatory elements within the ICAM-1 promoter. *J Biol Chem*, **270**, 18966-18974.
- Roma, P., Catapano, A.L., Bertulli, S.M., Varesi, L., Fumagalli, R. and Bernini, F. (1990) Oxidized LDL increase free cholesterol and fail to stimulate cholesterol esterification in murine macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, **171**, 123-131.
- Rommel, C., Clarke, B.A., Zimmermann, S., Nunez, L., Rossman, R., Reid, K., Moelling, K., Yancopoulos, G.D. and Glass, D.J. (1999) Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt. *Science*, **286**, 1738-1741.
- Rosenfeld, M.E., Palinski, W., Yla-Herttuala, S., Butler, S. and Witztum, J.L. (1990) Distribution of oxidation specific lipid-protein adducts and apolipoprotein B in atherosclerotic lesions of varying severity from WHHL rabbits. *Arteriosclerosis*, **10**, 336-349.
- Ross, R. (1999) Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J*, **138**, S419-420.
- Roulston, A., Reinhard, C., Amiri, P. and Williams, L.T. (1998) Early activation of c-Jun N-terminal kinase and p38 kinase regulate cell survival in response to tumor necrosis factor alpha. *J Biol Chem*, **273**, 10232-10239.
- Saitoh, M., Nishitoh, H., Fujii, M., Takeda, K., Tobiume, K., Sawada, Y., Kawabata, M., Miyazono, K. and Ichijo, H. (1998) Mammalian thioredoxin is a direct inhibitor of apoptosis signal-regulating kinase (ASK) 1. *Embo J*, **17**, 2596-2606.
- Sakata, A., Ida, E., Tominaga, M. and Onoue, K. (1987) Arachidonic acid acts as an intracellular activator of NADPH-oxidase in Fc gamma receptor-mediated superoxide generation in macrophages. *J Immunol*, **138**, 4353-4359.
- Salvesen, G.S. and Renatus, M. (2002) Apoptosome: the seven-spoked death machine. *Dev Cell*, **2**, 256-257.
- Saraste, A. and Pulkki, K. (2000) Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res*, **45**, 528-537.
- Sartorius, U., Schmitz, I. and Krammer, P.H. (2001) Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis. *Chembiochem*, **2**, 20-29.
- Sayama, K., Hanakawa, Y., Shirakata, Y., Yamasaki, K., Sawada, Y., Sun, L., Yamanishi, K., Ichijo, H. and Hashimoto, K. (2001) Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) is an intracellular inducer of keratinocyte differentiation. *J Biol Chem*, **276**, 999-1004.
- Schmiedt, W., Kinscherf, R., Deigner, H.P., Kamencic, H., Nauen, O., Kilo, J., Oelert, H., Metz, J. and Bhakdi, S. (1998) Complement C6 deficiency protects against diet-induced atherosclerosis in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **18**, 1790-1795.
- Schreiber, M., Kolbus, A., Piu, F., Szabowski, A., Mohle-Steinlein, U., Tian, J., Karin, M., Angel, P. and Wagner, E.F. (1999) Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent. *Genes Dev*, **13**, 607-619.
- Schulze-Osthoff, K., Krammer, P.H. and Droge, W. (1994) Divergent signalling via APO-1/Fas and the TNF receptor, two homologous molecules involved in physiological cell death. *Embo J*, **13**, 4587-4596.
- Seifert, P.S., Hugo, F., Hansson, G.K. and Bhakdi, S. (1989) Prelesional complement activation in experimental atherosclerosis. Terminal C5b-9 complement deposition coincides with cholesterol accumulation in the aortic intima of hypercholesterolemic rabbits. *Lab Invest*, **60**, 747-754.

- Seifert, P.S., Hugo, F., Trantum-Jensen, J., Zahringer, U., Muhly, M. and Bhakdi, S. (1990) Isolation and characterization of a complement-activating lipid extracted from human atherosclerotic lesions. *J Exp Med*, **172**, 547-557.
- Shanahan, C.M. and Weissberg, P.L. (1999) Smooth muscle cell phenotypes in atherosclerotic lesions. *Curr Opin Lipidol*, **10**, 507-513.
- Shin, H.K., Kim, Y.K., Kim, K.Y., Lee, J.H. and Hong, K.W. (2004) Remnant lipoprotein particles induce apoptosis in endothelial cells by NAD(P)H oxidase-mediated production of superoxide and cytokines via lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 activation: prevention by cilostazol. *Circulation*, **109**, 1022-1028.
- Shirakabe, K., Yamaguchi, K., Shibuya, H., Irie, K., Matsuda, S., Moriguchi, T., Gotoh, Y., Matsumoto, K. and Nishida, E. (1997) TAK1 mediates the ceramide signaling to stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem*, **272**, 8141-8144.
- Shou, Y., Li, L., Prabhakaran, K., Borowitz, J.L. and Isom, G.E. (2003) p38 Mitogen-activated protein kinase regulates Bax translocation in cyanide-induced apoptosis. *Toxicol Sci*, **75**, 99-107.
- Simionescu, N., Mora, R., Vasile, E., Lupu, F., Filip, D.A. and Simionescu, M. (1990) Prelesional modifications of the vessel wall in hyperlipidemic atherogenesis. Extracellular accumulation of modified and reassembled lipoproteins. *Ann N Y Acad Sci*, **598**, 1-16.
- Simionescu, N., Vasile, E., Lupu, F., Popescu, G. and Simionescu, M. (1986) Prelesional events in atherogenesis. Accumulation of extracellular cholesterol-rich liposomes in the arterial intima and cardiac valves of the hyperlipidemic rabbit. *Am J Pathol*, **123**, 109-125.
- Sinclair, C., Borchers, C., Parker, C., Tomer, K., Charbonneau, H. and Rossie, S. (1999) The tetratricopeptide repeat domain and a C-terminal region control the activity of Ser/Thr protein phosphatase 5. *J Biol Chem*, **274**, 23666-23672.
- Skinner, J., Sinclair, C., Romeo, C., Armstrong, D., Charbonneau, H. and Rossie, S. (1997) Purification of a fatty acid-stimulated protein-serine/threonine phosphatase from bovine brain and its identification as a homolog of protein phosphatase 5. *J Biol Chem*, **272**, 22464-22471.
- Stary, H.C. (1987) Macrophages, macrophage foam cells, and eccentric intimal thickening in the coronary arteries of young children. *Atherosclerosis*, **64**, 91-108.
- Steiberg, D., and Witztum, J.L. (1999) Lipoproteins, Lipoprotein Oxidation, and Atherogenesis. *K.R. Chien, ed. (Philadelphia: W.B. Saunders Co.)*.
- Steinberg, D. (1981) Underlying mechanisms in atherosclerosis. *J Pathol*, **133**, 75-87.
- Steinberg, D. (1999) At last, direct evidence that lipoxygenases play a role in atherogenesis. *J Clin Invest*, **103**, 1487-1488.
- Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Khoo, J.C. and Witztum, J.L. (1989) Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med*, **320**, 915-924.
- Steinbrecher, U.P., Zhang, H.F. and Loughheed, M. (1990) Role of oxidatively modified LDL in atherosclerosis. *Free Radic Biol Med*, **9**, 155-168.
- Sundaresan, M., Yu, Z.X., Ferrans, V.J., Irani, K. and Finkel, T. (1995) Requirement for generation of H₂O₂ for platelet-derived growth factor signal transduction. *Science*, **270**, 296-299.
- Suriyaphol, P., Fenske, D., Zahringer, U., Han, S.R., Bhakdi, S. and Husmann, M. (2002) Enzymatically modified nonoxidized low-density lipoprotein induces

- interleukin-8 in human endothelial cells: role of free fatty acids. *Circulation*, **106**, 2581-2587.
- Takahashi, M., Okazaki, H., Ogata, Y., Takeuchi, K., Ikeda, U. and Shimada, K. (2002) Lysophosphatidylcholine induces apoptosis in human endothelial cells through a p38-mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism. *Atherosclerosis*, **161**, 387-394.
- Takeda, K., Hatai, T., Hamazaki, T.S., Nishitoh, H., Saitoh, M. and Ichijo, H. (2000) Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) induces neuronal differentiation and survival of PC12 cells. *J Biol Chem*, **275**, 9805-9813.
- Takeda, K., Matsuzawa, A., Nishitoh, H. and Ichijo, H. (2003) Roles of MAPKKK ASK1 in stress-induced cell death. *Cell Struct Funct*, **28**, 23-29.
- Tall, A.R. and Wang, N. (2000) Tangier disease as a test of the reverse cholesterol transport hypothesis. *J Clin Invest*, **106**, 1205-1207.
- Thrasher, A.J., Keep, N.H., Wientjes, F. and Segal, A.W. (1994) Chronic granulomatous disease. *Biochim Biophys Acta*, **1227**, 1-24.
- Tibbles, L.A. and Woodgett, J.R. (1999) The stress-activated protein kinase pathways. *Cell Mol Life Sci*, **55**, 1230-1254.
- Tobiume, K., Matsuzawa, A., Takahashi, T., Nishitoh, H., Morita, K., Takeda, K., Minowa, O., Miyazono, K., Noda, T. and Ichijo, H. (2001) ASK1 is required for sustained activations of JNK/p38 MAP kinases and apoptosis. *EMBO Rep*, **2**, 222-228.
- Tobiume, K., Saitoh, M. and Ichijo, H. (2002) Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 by the stress-induced activating phosphorylation of pre-formed oligomer. *J Cell Physiol*, **191**, 95-104.
- Tojima, Y., Fujimoto, A., Delhase, M., Chen, Y., Hatakeyama, S., Nakayama, K., Kaneko, Y., Nimura, Y., Motoyama, N., Ikeda, K., Karin, M. and Nakanishi, M. (2000) NAK is an I kappa B kinase-activating kinase. *Nature*, **404**, 778-782.
- Torzewski, M., Klouche, M., Hock, J., Messner, M., Dorweiler, B., Torzewski, J., Gabbert, H.E. and Bhakdi, S. (1998) Immunohistochemical demonstration of enzymatically modified human LDL and its colocalization with the terminal complement complex in the early atherosclerotic lesion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **18**, 369-378.
- Traenckner, E.B., Pahl, H.L., Henkel, T., Schmidt, K.N., Wilk, S. and Baeuerle, P.A. (1995) Phosphorylation of human I kappa B-alpha on serines 32 and 36 controls I kappa B-alpha proteolysis and NF-kappa B activation in response to diverse stimuli. *Embo J*, **14**, 2876-2883.
- Urbich, C., Walter, D.H., Zeiher, A.M. and Dimmeler, S. (2000) Laminar shear stress upregulates integrin expression: role in endothelial cell adhesion and apoptosis. *Circ Res*, **87**, 683-689.
- Valeva, A., Weisser, A., Walker, B., Kehoe, M., Bayley, H., Bhakdi, S. and Palmer, M. (1996) Molecular architecture of a toxin pore: a 15-residue sequence lines the transmembrane channel of staphylococcal alpha-toxin. *Embo J*, **15**, 1857-1864.
- van Dam, H., Wilhelm, D., Herr, I., Steffen, A., Herrlich, P. and Angel, P. (1995) ATF-2 is preferentially activated by stress-activated protein kinases to mediate c-jun induction in response to genotoxic agents. *Embo J*, **14**, 1798-1811.
- van der Wal, A.C., Becker, A.E., van der Loos, C.M. and Das, P.K. (1994) Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation*, **89**, 36-44.

- Vita, J.A., Treasure, C.B., Nabel, E.G., McLenachan, J.M., Fish, R.D., Yeung, A.C., Vekshtein, V.I., Selwyn, A.P. and Ganz, P. (1990) Coronary vasomotor response to acetylcholine relates to risk factors for coronary artery disease. *Circulation*, **81**, 491-497.
- Vlaicu, R., Niculescu, F., Rus, H.G. and Cristea, A. (1985) Immunohistochemical localization of the terminal C5b-9 complement complex in human aortic fibrous plaque. *Atherosclerosis*, **57**, 163-177.
- Vogt, P.K. (2002) Fortuitous convergences: the beginnings of JUN. *Nat Rev Cancer*, **2**, 465-469.
- Vogt, P.K. and Bos, T.J. (1990) jun: oncogene and transcription factor. *Adv Cancer Res*, **55**, 1-35.
- Voraberger, G., Schafer, R. and Stratowa, C. (1991) Cloning of the human gene for intercellular adhesion molecule 1 and analysis of its 5'-regulatory region. Induction by cytokines and phorbol ester. *J Immunol*, **147**, 2777-2786.
- Wang, X.S., Diener, K., Jannuzzi, D., Trollinger, D., Tan, T.H., Lichenstein, H., Zukowski, M. and Yao, Z. (1996) Molecular cloning and characterization of a novel protein kinase with a catalytic domain homologous to mitogen-activated protein kinase kinase kinase. *J Biol Chem*, **271**, 31607-31611.
- Whitmarsh, A.J. and Davis, R.J. (1996) Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med*, **74**, 589-607.
- Wisdom, R., Johnson, R.S. and Moore, C. (1999) c-Jun regulates cell cycle progression and apoptosis by distinct mechanisms. *Embo J*, **18**, 188-197.
- Xia, Y., Makris, C., Su, B., Li, E., Yang, J., Nemerow, G.R. and Karin, M. (2000) MEK kinase 1 is critically required for c-Jun N-terminal kinase activation by proinflammatory stimuli and growth factor-induced cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 5243-5248.
- Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R.J. and Greenberg, M.E. (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*, **270**, 1326-1331.
- Xu, Q., Liu, Y., Gorospe, M., Udelsman, R. and Holbrook, N.J. (1996) Acute hypertension activates mitogen-activated protein kinases in arterial wall. *J Clin Invest*, **97**, 508-514.
- Yamaguchi, K., Shirakabe, K., Shibuya, H., Irie, K., Oishi, I., Ueno, N., Taniguchi, T., Nishida, E. and Matsumoto, K. (1995) Identification of a member of the MAPKKK family as a potential mediator of TGF-beta signal transduction. *Science*, **270**, 2008-2011.
- Yamamoto, K., Ichijo, H. and Korsmeyer, S.J. (1999) BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Mol Cell Biol*, **19**, 8469-8478.
- Yang, D., Lu, H. and Erickson, J.W. (2000) Evidence that processed small dsRNAs may mediate sequence-specific mRNA degradation during RNAi in Drosophila embryos. *Curr Biol*, **10**, 1191-1200.
- Yang, X., Khosravi-Far, R., Chang, H.Y. and Baltimore, D. (1997) Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell*, **89**, 1067-1076.
- Yujiri, T., Ware, M., Widmann, C., Oyer, R., Russell, D., Chan, E., Zaitso, Y., Clarke, P., Tyler, K., Oka, Y., Fanger, G.R., Henson, P. and Johnson, G.L. (2000) MEK kinase 1 gene disruption alters cell migration and c-Jun NH2-terminal kinase regulation but does not cause a measurable defect in NF-kappa B activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 7272-7277.

- Yusuf, S., Dagenais, G., Pogue, J., Bosch, J. and Sleight, P. (2000) Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med*, **342**, 154-160.
- Zhang, R., Al-Lamki, R., Bai, L., Streb, J.W., Miano, J.M., Bradley, J. and Min, W. (2004) Thioredoxin-2 inhibits mitochondria-located ASK1-mediated apoptosis in a JNK-independent manner. *Circ Res*, **94**, 1483-1491.
- Zhang, R., He, X., Liu, W., Lu, M., Hsieh, J.T. and Min, W. (2003) AIP1 mediates TNF-alpha-induced ASK1 activation by facilitating dissociation of ASK1 from its inhibitor 14-3-3. *J Clin Invest*, **111**, 1933-1943.
- Zhao, M., Liu, Y., Wang, X., New, L., Han, J. and Brunk, U.T. (2002) Activation of the p38 MAP kinase pathway is required for foam cell formation from macrophages exposed to oxidized LDL. *Apmis*, **110**, 458-468.
- Zhu, Y., Liao, H., Wang, N., Ma, K.S., Verna, L.K., Shyy, J.Y., Chien, S. and Stemerman, M.B. (2001) LDL-activated p38 in endothelial cells is mediated by Ras. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **21**, 1159-1164.
- Zhu, Y., Lin, J.H., Liao, H.L., Friedli, O., Jr., Verna, L., Marten, N.W., Straus, D.S. and Stemerman, M.B. (1998) LDL induces transcription factor activator protein-1 in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **18**, 473-480.
- Zimmermann, S. and Moelling, K. (1999) Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). *Science*, **286**, 1741-1744.