

---

**Zur Zytotoxizität von enzymatisch  
verändertem Low Density Lipoprotein  
Differenzielle Empfindlichkeit von  
Granulozyten und Makrophagen  
gegenüber E-LDL**

**Cornelia Aquilina Lux**

---

**It is dearness only that gives every thing its value.  
Heaven knows how to put a proper price upon its goods.**

**Thomas Paine**

**A.L. in dankbarem Andenken**

---

**Zur Zytotoxizität von enzymatisch verändertem Low  
Density Lipoprotein  
Differenzielle Empfindlichkeit von Granulozyten und  
Makrophagen gegenüber E-LDL**

---

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
”Doktor  
der Naturwissenschaften”  
im Promotionsfach Pharmazie  
am Fachbereich Chemie, Pharmazie und Geowissenschaften  
der Johannes-Gutenberg-Universität  
Mainz

Cornelia Aquilina Lux  
geb. in  
Rüsselsheim

Mainz, den 07.04.2009

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>xii</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Atherosklerose . . . . .	1
1.1.1 Definition der Atherosklerose . . . . .	1
1.1.2 Lipoproteine . . . . .	2
1.1.3 Entstehung . . . . .	3
1.1.4 Atherosklerose als chronische Entzündungskrankheit . . . . .	13
1.1.5 Mainzer Hypothese . . . . .	14
1.1.6 Therapie . . . . .	16
1.2 Granulozyten . . . . .	18
1.2.1 Eigenschaften der Granulozyten . . . . .	18
1.2.2 Granulozyten in der Atherosklerose . . . . .	20
1.3 Fettsäuren . . . . .	21
1.4 Transkriptionsfaktoren . . . . .	23
1.4.1 NF $\kappa$ B . . . . .	23
1.4.2 AP-1 . . . . .	25
1.5 Fragestellung . . . . .	26
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>28</b>
2.1 Material . . . . .	28
2.1.1 Chemikalien . . . . .	28
2.1.2 Puffer und Lösungen . . . . .	30
2.1.3 Antikörper . . . . .	33
2.1.4 Kits . . . . .	34
2.1.5 Laborbedarfsartikel . . . . .	34
2.1.6 Laborgeräte . . . . .	36

2.1.7	Materialien und Medien für die Zellkultur . . . . .	36
2.2	Methoden . . . . .	36
2.2.1	Präparation von LDL . . . . .	36
2.2.2	Messung des Cholesterolgehaltes von Lipoproteinen . . . . .	39
2.2.3	Präparation der modifizierten Lipoproteine: E-LDL, oxLDL, E-LDL d4 und d10 . . . . .	39
2.2.4	Verdünnen der Fettsäuren . . . . .	42
2.2.5	Zellkultur . . . . .	42
2.2.6	Isolierung von Zellen aus Frischblut . . . . .	44
2.2.7	Isolierung von Monozyten aus Buffy-coats und Reifung zu Makrophagen	45
2.2.8	ATP-Messung . . . . .	46
2.2.9	Caspase-Messung . . . . .	47
2.2.10	LDH-Messung . . . . .	47
2.2.11	Messung des <i>respiratory burst</i> . . . . .	49
2.2.12	Messung der Peroxidaseaktivität . . . . .	50
2.2.13	Durchflusszytometrie . . . . .	50
2.2.14	Western Blot . . . . .	51
2.2.15	Coomassie-Färbung . . . . .	55
2.2.16	Immunfluoreszenz . . . . .	55
2.2.17	ELISA . . . . .	57
2.2.18	Calcium-Einstrom . . . . .	57
2.2.19	Oil-Red-O-Färbung . . . . .	58
2.2.20	Proteinbestimmung nach Pierce . . . . .	58
2.2.21	Hämolysetest . . . . .	59
2.2.22	Messung des zellulären Cholesterolgehaltes . . . . .	60
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>61</b>
3.1	Wirkung von E-LDL auf Endothelzellen . . . . .	61
3.1.1	Weder E-LDL noch Linolsäure induzieren NF- $\kappa$ B . . . . .	62
3.1.2	E-LDL und Linolsäure hemmen die Induktion von NF- $\kappa$ B durch TNF- $\alpha$ .	63
3.1.3	E-LDL induziert Expression und Phosphorylierung von c-jun . . . . .	69
3.2	Differentielle Schädigung von Immunzellen durch E-LDL und seine Bestandteile	71
3.2.1	Toxizität von E-LDL gegenüber Makrophagen . . . . .	72
3.2.2	Toxizität freier Fettsäuren gegenüber Makrophagen . . . . .	72

3.2.3	Toxizität von E-LDL gegenüber Granulozyten . . . . .	75
3.2.4	Toxizität freier Fettsäuren gegenüber Granulozyten . . . . .	77
3.2.5	Albumin schützt vor der fettsäurebedingten Toxizität . . . . .	80
3.2.6	Unterschiedliche Empfindlichkeit von Granulozyten und Makrophagen gegenüber fettsäurebedingter Toxizität . . . . .	83
3.3	Lipidaufnahme von Makrophagen und Granulozyten durch Inkubation mit E-LDL	85
3.3.1	Cholesterolaufnahme . . . . .	85
3.3.2	Schaumzellbildung . . . . .	88
3.4	Granulozyten werden von E-LDL und freien Fettsäuren aktiviert . . . . .	88
3.4.1	E-LDL und Linolsäure bewirken einen <i>respiratory burst</i> in Granulozyten	91
3.4.2	E-LDL und Linolsäure bewirken einen Calciumeinstrom in Granulozyten	93
3.4.3	E-LDL und Linolsäure bewirken die Sekretion vesikulärer Inhaltsstoffe aus Granulozyten . . . . .	93
3.5	Mechanismus der Toxizität von E-LDL und Linolsäure auf Granulozyten . . . . .	97
3.5.1	Der Zelltod erfolgt durch Nekrose . . . . .	97
3.5.2	Aktivierung von Granulozyten bedingt nicht die Toxizität . . . . .	99
3.5.3	E-LDL und Linolsäure schädigen Zellmembranen . . . . .	100
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>107</b>
4.1	Einfluß von E-LDL und Linolsäure auf die Regulation von IL-8 in Endothelzellen	107
4.1.1	E-LDL und Fettsäuren hemmen NF- $\kappa$ B . . . . .	107
4.1.2	Weitere Untersuchungen zum Einfluß von freien Fettsäuren und modifi- zierten Lipoproteinen auf NF- $\kappa$ B . . . . .	108
4.1.3	E-LDL aktiviert c-jun und bewirkt die IL-8-Ausschüttung über AP-1 . . .	109
4.2	Differentielle Zytotoxizität von E-LDL und Linolsäure gegenüber Granulozyten und Makrophagen . . . . .	110
4.2.1	Weshalb sind keine Granulozyten in der atherosklerotischen Läsion zu finden? . . . . .	110
4.2.2	Die Hypothese von Einwanderung und Tod . . . . .	111
4.2.3	Toxizität von E-LDL wird durch Fettsäuren bedingt . . . . .	112
4.2.4	E-LDL und ungesättigte freie Fettsäuren aktivieren Granulozyten . . . . .	114
4.2.5	Mechanismus der Schädigung von Granulozyten durch E-LDL und Li- nolsäure . . . . .	116
4.2.6	Der Detergens-Effekt von Linolsäure . . . . .	119

---

4.2.7	Mögliche Erklärungen für die unterschiedliche Schädigung von PMN und MDM . . . . .	121
4.2.8	Granulozyten in der atherosklerotischen Läsion können durch E-LDL aktiviert werden und sterben . . . . .	122
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	<b>125</b>
<b>6</b>	<b>Veröffentlichung von Ergebnissen dieser Arbeit</b>	<b>127</b>

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Stadien der atherosklerotischen Läsion . . . . .	4
1.2	Mainzer Hypothese: physiologische Bedingungen . . . . .	15
1.3	Mainzer Hypothese: pathologische Bedingungen . . . . .	16
1.4	Reaktionsschema <i>respiratory burst</i> . . . . .	19
1.5	Fettsäurestrukturen . . . . .	22
2.1	Nachweisreaktion CHOL-Messung . . . . .	40
2.2	Reaktionsschema ATP-Messung . . . . .	46
2.3	Reaktionsschema Caspase-Messung . . . . .	47
2.4	Reaktionsschema LDH-Messung . . . . .	48
2.5	Chemilumineszenz von Luminol . . . . .	49
2.6	Oxidation von TMB . . . . .	50
2.7	Proteinbestimmung mit BCA nach Pierce . . . . .	59
3.1	E-LDL-behandelte Endothelzellen zeigen keine $I\kappa B\alpha$ -Phosphorylierung . . . . .	62
3.2	Weder E-LDL noch Linolsäure bewirkt eine Phosphorylierung von $I\kappa B\alpha$ . . . . .	63
3.3	E-LDL und Linolsäure bewirken keine nukleäre p65-Translokation in Endothelzellen . . . . .	64
3.4	E-LDL hemmt die TNF- $\alpha$ -induzierte $I\kappa B$ -Phosphorylierung in Endothelzellen . . . . .	66
3.5	Linolsäure hemmt die TNF- $\alpha$ -induzierte $I\kappa B$ -Phosphorylierung in Endothelzellen . . . . .	67
3.6	Auswirkung verschiedener Fettsäuren auf die $I\kappa B\alpha$ -Phosphorylierung sowie deren Induktion durch TNF- $\alpha$ . . . . .	67
3.7	E-LDL und Linolsäure hemmen die von TNF- $\alpha$ induzierte nukleäre p65-Translokation in Endothelzellen. . . . .	68
3.8	E-LDL induziert die Expression und Phosphorylierung von c-jun in Endothelzellen . . . . .	69
3.9	IL-8-Ausschüttung E-LDL-behandelter Endothelzellen . . . . .	70
3.10	Toxizität von E-LDL gegenüber Makrophagen . . . . .	73

3.11	Toxizität von Linolsäure gegenüber Makrophagen . . . . .	74
3.12	Toxizität von E-LDL gegenüber Granulozyten . . . . .	76
3.13	Toxizität von Linolsäure gegenüber Granulozyten . . . . .	78
3.14	Granulozyten versch. Fettsäuren ATP dose response . . . . .	79
3.15	Granulozyten versch. Fettsäuren Caspase dose response . . . . .	79
3.16	Granulozyten E-LDL Albumin ATP . . . . .	80
3.17	Granulozyten Linolsäure Albumin ATP . . . . .	81
3.18	Granulozyten E-LDL d4 d10 ATP . . . . .	82
3.19	Gegenüberstellung Granulozyten Makrophagen . . . . .	83
3.20	Granulozyten und Makrophagen E-LDL Cholesterolestergehalt . . . . .	86
3.21	Granulozyten und Makrophagen E-LDL Gehalt an freiem Cholesterol . . . . .	87
3.22	Oil Red O-Färbung nach E-LDL-Behandlung . . . . .	89
3.23	Oil Red O-Färbung nach Linolsäure-Behandlung . . . . .	90
3.24	Reaktionsschema <i>respiratory burst</i> . . . . .	91
3.25	OxBurst Granulozyten E-LDL mit und ohne DPI . . . . .	92
3.26	Granulozyten Linolsäure und Arachidonsäure, <i>respiratory burst</i> mit und ohne DPI . . . . .	93
3.27	Granulozyten Ca-Influx Gießen . . . . .	94
3.28	Granulozyten E-LDL Peroxidasefreisetzung TMB . . . . .	95
3.29	Granulozyten E-LDL Peroxidasefreisetzung FS-abh. TMB . . . . .	96
3.30	Granulozyten E-LDL 7-AAD Annexin-PE . . . . .	98
3.31	Granulozyten Linolsäure, AA mit und ohne DPI, ATP . . . . .	99
3.32	Granulozyten Linolsäure, AA mit und ohne NAC, ATP . . . . .	100
3.33	Granulozyten E-LDL, Linolsäure mit und ohne Calcium im Medium, ATP . . . . .	101
3.34	E-LDL Hämolyse . . . . .	102
3.35	E-LDL Hämolyse . . . . .	103
3.36	E-LDL Hämolyse . . . . .	104
3.37	E-LDL Hämolyse . . . . .	105
3.38	E-LDL Hämolyse . . . . .	106
3.39	Hämolyse auf Eis . . . . .	106
4.1	E-LDL Gehalt an freien Fettsäuren . . . . .	113
4.2	Entsprechende Konzentrationen von E-LDL und LA . . . . .	114
4.3	Mainzer Hypothese: Beteiligung von Granulozyten . . . . .	123

Die Balkendiagramme zeigen Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten und

den jeweiligen Standardfehler als Fehlerbalken. Abbildungen von Western Blots, Immunfluoreszenzen und Dot Blots bzw. Histogramme durchflußzytometrischer Analysen sind repräsentativ für wiederholte Experimente.

# Tabellenverzeichnis

1.1	Lipoproteine . . . . .	2
2.1	Chemikalien . . . . .	29
2.2	Puffer und Lösungen . . . . .	32
2.3	Antikörper . . . . .	33
2.4	Kits . . . . .	34
2.5	Laborbedarfsartikel . . . . .	35
2.6	Laborgeräte . . . . .	37
2.7	Medien und Lösungen für die Zellkultur . . . . .	38
2.8	Medien für die Zellkultur . . . . .	38
2.9	10 % SDS-Gel . . . . .	53

# Abkürzungsverzeichnis

ACE

angiotensin-converting enzyme

ADFP = ADRP = Adipophilin

adipocyte differentiation-related protein

AHA

American Heart Association

BSA

bovine serum albumin = Albumin aus Rinderserum

CAMs

cellular adhesion molecules = Adhäsionsmoleküle

CMC

critical micellar concentration = Konzentration, oberhalb der ein Detergens wie etwa eine freie Fettsäure sich zu Mizellen zusammenlagert

DMSO

Dimethylsulfoxid

DPI

Diphenyliodonium

EDTA

Ethylendiamintetraessigsäure

ER

endoplasmatisches Retikulum

FABP

fatty acid binding protein

GM-CSF

granulocyte macrophage-colony stimulating factor

HRP

horseradish peroxidase

IF

Immunfluoreszenz

JNK

c-jun N-terminal kinase

LB

lipid body, synonym verwendet mit lipid droplet

LCAT

Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase

MDCK-Zellen

Madin-Darby canine kidney - Zellen = eine Zelllinie aus der Hundeniere

MDM

monocyte derived macrophages = aus Monozyten herangereifte Makrophagen

MMP

Matrix-Metalloproteasen

**PBS**

phosphate buffered saline = Phosphatpuffer, siehe Tabelle 'Puffer und Lösungen'

**PEST**

Aminosäuresequenz, die Ubiquitylierung und Abbau eines Proteins veranlaßt. Reich an Prolin (P), Glutaminsäure (E), Serin (S) und Threonin (T)

**PI3K**

Phosphatidylinositol-3-Kinase

**PKC**

Proteinkinase C

**PMN**

polymorphonuclear leukocytes = Polymorphkernige Leukozyten = Granulozyten

**PRR**

pattern recognition receptor

**SDS**

sodium dodecylsulfate = Natriumdodecylsulfat

**SDS-PAGE**

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

**SR-B1**

Scavenger-Rezeptor B1

**TBS**

tris buffered saline = Tris-Puffer, siehe Tabelle 'Puffer und Lösungen'

**TBST**

TBS mit Tween 20 (Puffer, siehe TBS, mit Detergens)

**TEMED**

N,N,N',N'-Tetramethyldiamin

**TMB**

3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin

**TPA**

12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat, ein Tumorpromoter

**TRE**

TPA response element; synonym für die AP-1-Bindungsstelle

**Tris**

Trishydroxyaminomethan

**upm**

Umdrehungen pro Minute

**VCAM**

vascular cell adhesion molecule

**WB**

Western Blot

# 1 Einleitung

## 1.1 Atherosklerose

### 1.1.1 Definition der Atherosklerose

Atherosklerose ist eine krankhafte Veränderung der Arterien, die mit Verhärtung, Verdickung, Elastizitätsverlust und Lumeneinengung einhergeht. Der Begriff 'Arteriosklerose' wird heute synonym gebraucht [PSCHYREMBEL 2007] .

Als fortschreitender Prozess beginnt die Atherosklerose bereits im ersten Lebensjahrzehnt mit der Einlagerung von Lipiden in die Gefäßwand und verläuft zunächst ohne klinische Anzeichen. Eine Behinderung des Blutflusses durch stark verdickte, entzündete oder verkalkte Ablagerungen tritt in der Regel erst im mittleren Lebensalter auf. Durch Aufbrechen intakter Ablagerungen kommt es zu Thrombosen und Entzündungen, deren Folgen - Herzinfarkt, Schlaganfall, instabile Angina pectoris oder periphere Verschußkrankheit - zusammengenommen die Haupttodesursache in den Industrienationen bilden.

Verschiedene Risikofaktoren begünstigen die Entwicklung der Atherosklerose, darunter Diabetes, Übergewicht, Rauchen, wenig Bewegung sowie die genetische Veranlagung. Sie allein können allerdings keine Atherosklerose hervorrufen; notwendige Ursache hierfür ist eine Hyperlipoproteinämie, ein Überschuß des atherogenen Low Density Lipoprotein (LDL) im Blut [WILLIAMS und TABAS 1995]. Als klinischer Normalwert gilt zwar ein LDL-Plasmaspiegel von 100mg/dL, allerdings liegt bei Säuglingen und in Jäger-und-Sammler-Völkern der durchschnittliche LDL-Spiegel unter 40mg/dL [TABAS et al. 2007]. Das ist ausreichend, um die Versorgung der Zellen mit Cholesterol zu gewährleisten, gleichzeitig bleibt die Wahrscheinlichkeit für Herz-Kreislauf-Erkrankungen weit unter dem Niveau der Industrienationen. Vermutlich ist der klinisch 'normale' Plasma-LDL-Spiegel bereits unphysiologisch hoch und bedingt das häufige Auftreten der Atherosklerose in der westlichen Welt [GOLDSTEIN und BROWN 1977].

## 1.1.2 Lipoproteine

Cholesterol und Fette werden in der Blutbahn in Form mizellenähnlicher Partikel, sogenannter Lipoproteine, transportiert. Dabei umschließt der eigentliche Proteinanteil, das Apolipoprotein, das Partikel von außen. Es dient zur Stabilisierung und bietet Bindungsstellen für Rezeptoren. An der Oberfläche der Lipoproteine liegen außerdem freies Cholesterol und Phospholipide, während sich die stärker lipophilen Bestandteile wie Triglyceride und Cholesterolester im Kern befinden. Die Lipoproteine werden nach steigender Dichte eingeteilt in Chylomikronen, VLDL, IDL, LDL und HDL.

Lipoprotein	Durchmesser [nm]	Dichte [g/ml]
Chylomikronen	100-1000	<0,95
VLDL (Very Low Density Lipoprotein)	30-80	0,95-1,006
IDL (Intermediate Density Lipoprotein)	25-50	1,006-1,019
LDL (Low Density Lipoprotein)	18-28	1,019-1,063
HDL (High Density Lipoprotein)	5-15	>1,063

Tabelle 1.1: Einteilung der Lipoproteine

Mit der Nahrung aufgenommene Fette werden im Darm von Gallensäuren emulgiert und durch die Enterozyten aufgenommen. Diese bilden die triglyceridreichen Chylomikronen, die über den Lymphweg in die Blutbahn gelangen und Fett- und Muskelgewebe mit freien Fettsäuren versorgen. Durch Einwirkung der Lipoproteinlipase werden diese für die Zellen zugänglich. Als Rest bleiben die cholesterolreichen *remnants*, die von der Leber aufgenommen werden. Aus endogenem Cholesterol und verbliebenen Fetten dieser Partikel bilden die Leberzellen VLDL-Partikel, die wieder in den Blutkreislauf gelangen und durch Abgabe ihrer Triglyceride an Muskeln und Fettgewebe zu IDL werden. IDL wird von der Leber aufgenommen und zu  $2,5 \cdot 10^6$  Da großen LDL-Partikeln umgeformt [LÖFFLER 2007a].

LDL enthält ein Molekül Apolipoprotein B-100, das den Lipidkern umhüllt und 25 % der Teilchenmasse entspricht. Die Cholesterolester des Kerns sowie geringe Mengen freien Cholesterols machen 50 % des LDL aus, weitere 21 % sind Phospholipide und lediglich 4 % Triglyceride. LDL stellt den Körperzellen Cholesterol zur Verfügung, das zum Membranaufbau und als Vorstufe für Steroidhormone und Gallensäuren benötigt wird. Dabei bindet das Apolipoprotein B-100 an den LDL-Rezeptor der Zellen und das LDL-Partikel wird endozytiert. Im Lysosom wird es enzymatisch abgebaut.

Die Konzentration an Cholesterol wird von der Zelle durch zwei Mechanismen im Gleichgewicht gehalten. Bei hohem Cholesterolgehalt wird zum einen die Expression des LDL-Rezeptors vermindert, zum anderen diejenige der HMG-CoA-Reduktase, die den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Cholesterolsynthese katalysiert. Außerdem wird die Acyl-CoA-Cholesterol-Acyltransferase (ACAT) durch Kontakt freien Cholesterols mit dem endoplasmatischen Retikulum aktiviert, so daß mehr Cholesterol verestert und in dieser Form in Lipidtropfen gespeichert werden kann [LÖFFLER 2007a]. Dieser Mechanismus schützt zwar die einzelnen Zellen vor Überladung mit Cholesterol, jedoch trägt er zur weiteren Erhöhung des LDL-Plasmaspiegels bei, da das Lipoprotein nicht aus dem Kreislauf entzogen wird.

Der Rücktransport zellulären Cholesterols zur Leber erfolgt durch Bindung an HDL, das als Haupt-Apolipoprotein ApoA1 enthält. Über ApoA1 bindet es das Enzym Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT), das die Veresterung von Cholesterol und Fettsäuren katalysiert. HDL bindet freies Cholesterin aus Zellmembranen mit Hilfe des ATP-abhängigen Transporters ABCA1 und die LCAT setzt es zu Cholesterolestern um, die aufgrund ihrer Lipophilie in den Kern des Partikels wandern. Auf der Oberfläche des HDL-Partikels ist damit wieder Platz für die Anlagerung neuer Cholesterolmoleküle. HDL kann neben der Aufnahme von Phospholipiden aus abgebauten VLDL auch wasserlösliche Apolipoproteine wie Apolipoprotein E mit anderen Lipoproteinen austauschen. Es wird über den Scavenger Receptor B1 (SR-B1) wieder in die Leber aufgenommen. Durch Umwandlung in Gallensäuren kann Cholesterol aus der Leber schließlich ausgeschieden werden, allerdings ist dieser Prozeß aufgrund der hohen Resorption der Gallensäuren im Dünndarm wenig effektiv [THEWS G. 1999].

### 1.1.3 Entstehung der Atherosklerose

#### Lipidinfiltration in die Intima

In einigen Bereichen großer Blutgefäße wie etwa der Aorta ist die innerste Gefäßwand, die Intima, stellenweise verdickt. Während die Intima normalerweise fast ausschließlich aus Endothelzellen besteht, finden sich in diesen als diffuse intimal thickening (DIT) bezeichneten Regionen auch glatte Muskelzellen. Die dort stark ausgebildete extrazelluläre Matrix enthält hohe Mengen des Strukturproteins Elastin sowie der Proteoglykane Versican und Biglycan. Bereits vor der Geburt sind DITs nachweisbar. Sie können als physiologische Anpassung an mechanische Belastung gedeutet werden, da sie bei hohem Blutdruck stärker ausgeprägt sind [NAKASHIMA et al. 2008].

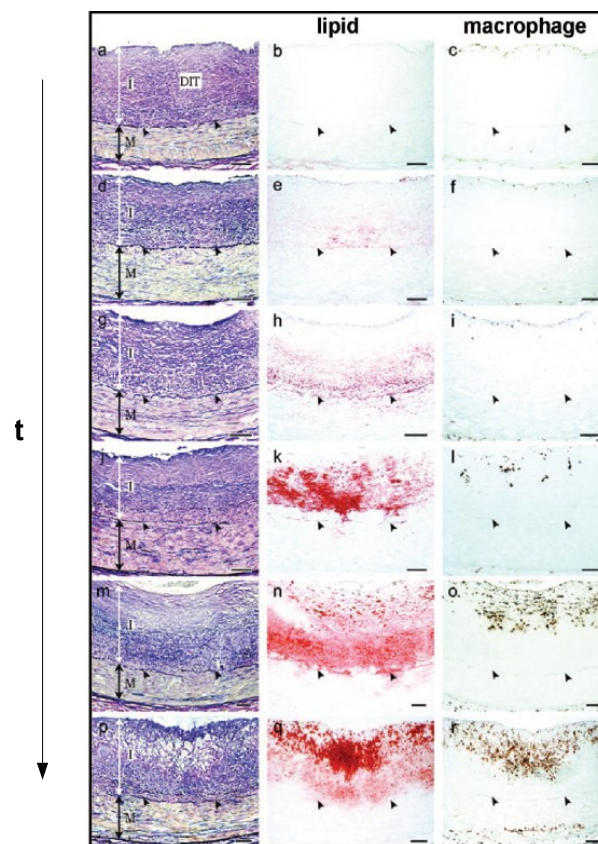


Abbildung 1.1: Stadien der atherosklerotischen Läsion. Abb. aus [TABAS et al. 2007].

In die DIT infiltriert zunächst Lipid, erst danach werden die eingewanderten Makrophagen sichtbar.

Der erste Schritt bei der Entstehung der Atherosklerose besteht in der Ablagerung von Lipiden in den DITs ('response-to-retention hypothesis' von Williams und Tabas, [WILLIAMS und TABAS 1995]). Es handelt sich um einen sehr schnellen Prozeß, der im Tiermodell innerhalb weniger Stunden nach Erzeugen einer Hypercholesterolämie abläuft. Wegen Entsprechungen in Größe und Morphologie der Lipide und aufgrund ihres Apolipoprotein B - Gehaltes wird angenommen, daß es sich um eingewandertes Plasma-LDL handelt. Schwenke und Carew haben gezeigt, daß an läsionsanfälligen Stellen LDL gleich schnell infiltriert wie in anderen Bereichen der Arterien, aber besonders stark zurückgehalten wird [SCHWENKE und CAREW 1989]. Ross et al. gehen davon aus, daß eine Einwanderung von LDL in die Intima erst dann in großem

Maßstab geschehen kann, wenn das Endothel geschädigt ist. Durch eine solche endotheliale Dysfunktion kann es zu einer Immunreaktion, etwa zur Einwanderung von Makrophagen, kommen. ('response to injury-Hypothese') [ROSS 1999a]. Verschiedene Prozesse können eine Veränderung der normalen Endothelfunktion bewirken: Denkbar ist eine direkte mechanische Verletzung der Zellschicht, etwa an Stellen mit turbulenter Blutströmung wie Arterienverzweigungen. Einzelne Endothelzellen der Intima können durch Abbau der extrazellulären Matrix und der Basalmembran oder infolge ihrer Apoptose abschuppen (Desquamation). Treffen dadurch subendotheliales Kollagen und von-Willebrand-Faktor auf Blutplättchen, entstehen Gerinnsel, die das Endothel weiter belasten. In Bereichen fortgeschrittener Läsionen kann es zu Mikrohämmorrhagien aus neu gebildeten, weniger stabilen Blutgefäßen kommen. Infektionen mit Herpes oder Chlamydia pneumoniae üben ebenso wie oxidativer Stress und erhöhte Homocysteinspiegel einen schädlichen Einfluß auf das Endothel aus. Besonders an Stellen mit turbulentem Blutfluß, zu denen oft läsionsanfällige Bereiche gehören, und bei Bluthochdruck steht die mechanische Belastung durch das vorbeiströmende Blut ('shear stress') im Vordergrund. Shear stress kann zur Aktivierung von Endothelzellen durch intrazelluläre Calcium-Ausschüttung sowie Öffnung verschiedener Ionenkanäle und zu vermehrter Zellteilung führen. Außerdem haben bestimmte Gene, etwa das des Adhäsionsmoleküls ICAM-1, ein auf shear stress reagierendes Promoter-Element [WILLIAMS und TABAS 1995]. Damit kann geschädigtes Endothel die Einwanderung von Monocyten begünstigen und so die Läsionsentstehung hervorrufen.

Die Response-to-injury-Hypothese als ursächliche Erklärung der Atherosklerose wird von Williams und Tabas jedoch verworfen, da sich bei genügend niedrigem LDL-Spiegel trotz Vorliegen von Risikofaktoren keine Läsionen ausbilden. LDL kann auch passiv durch ungeschädigtes Endothel wandern, und ApoB-reiche Lipoproteinansammlungen in der Gefäßwand bilden die ersten Anzeichen des beginnenden Atheroms. Die meisten atherosklerotischen Läsionen haben selbst im fortgeschrittenen Zustand noch ein intaktes Endothel, in das mehr LDL infiltrieren kann, als sich überhaupt ablagert. Während eine Denudation oder Verletzung durchaus verschlimmernd wirken kann, ist sie zur Erklärung des Geschehens in der zeitigen Atherosklerose nicht notwendig [WILLIAMS und TABAS 1995].

### **Retention durch Bindung an die extrazelluläre Matrix**

Die Ablagerung infiltrierten LDLs in den DITs als entscheidender Schritt der Läsionsentstehung [SCHWENKE und CAREW 1989] erfolgt durch Bindung an Bestandteile der extrazellulären Matrix. Sie wird wesentlich durch Art und Konzentration der Matrix-Proteoglykane und durch

das Enzym Lipoproteinlipase (LpL) bestimmt; beide Substanzen sind in der gesunden Arterienwand vorhanden. Proteoglykane bestehen aus einem Protein, an dem Glykosaminoglykan-Seitenketten, also sulfathaltige Zuckerketten, hängen. Positiv geladene Domänen des Apolipoprotein B können an die negativen Sulfatreste binden. Proteoglykane mit einer Chondroitinsulfat-Seitenkette wie Versican oder Biglycan binden ApoB-100 besonders stark [TABAS et al. 2007]. Durch ihre verdickte extrazelluläre Matrix mit dem zugunsten von Biglycan veränderten Proteoglykanmuster sind die DITs also prädestiniert für die Lipidablagerung. Daneben bilden glatte Muskelzellen unter shear stress-Bedingungen besonders viele Proteoglykane. Auch die starke Läsionsbildung in strömungsbelasteten Arterienbereichen läßt sich demnach durch vermehrte Retention erklären [TABAS et al. 2007]. Wird eine einzige Aminosäure des ApoB-100 verändert, so daß es nicht mehr an Proteoglykane binden kann, ist die Atheroskleroseentstehung im Mausmodell stark vermindert [TABAS 1999]. Mit Ausbildung der eigentlichen Läsion verändert sich die Proteoglykanzusammensetzung weiter, beispielsweise ist das Molekulargewicht von Chondroitinsulfat herabgesetzt, die Menge an Hyaluronsäure ebenfalls. Dadurch sinkt die Viskoelastizität der Matrix und das Eindringen weiterer Lipoproteine aus dem Blutstrom wird begünstigt [STARY et al. 1995].

LpL wird von Makrophagen gebildet, die sich in der beginnenden Läsion als erste Zellen ansammeln und besitzt Bindungsstellen sowohl für Proteoglykane als auch für Lipoproteine, deren Interaktion sie wie eine Brücke vermitteln kann [OORNI et al. 2000]. In vivo kolokalisiert LpL mit LDL in der Intima, im Tiermodell steigert katalytisch inaktive LpL die Größe von Läsionen. Da die LpL als Enzym auch am Abbau von Lipoproteinen beteiligt ist, spielt sie eine Doppelrolle in der Atheroskleroseentstehung [TABAS et al. 2007].

Diese Prozesse bieten eine plausible Erklärung für die Lokalisation erster Lipidablagerungen in den Arterien und verdeutlichen, wie das Fortschreiten der Läsion durch weitere Lipidansammlung gesteigert wird.

## **Modifikation der Lipide**

Die in der Intima abgelagerten Lipide sind dort einer Vielzahl an Einflüssen ausgesetzt, durch die sie verändert werden. Aus Läsionen wurden Liposomen-ähnliche Lipide isoliert, die besonders viel freies Cholesterol enthalten [KRUTH und FRY 1984] [KRUTH 1984] [SEIFERT et al. 1990] [SIMIONESCU et al. 1986] [CHAO et al. 1988], das vermutlich aus LDL entstanden ist [NAKASHIMA et al. 2008]. Weiterhin wurde aggregiertes und fusioniertes LDL in der Läsion nachgewiesen [TABAS 1999]. Der terminale Komplementkomplex C5b-9 kolokalisiert in athe-

rosklerotischen Läsionen mit 100-500nm großen fusionierten Lipidpartikeln, die reich an freiem Cholesterol sind. Diese als LCA (lesional complement activator) bezeichneten Partikel aktivieren Komplement über den alternativen Weg [SEIFERT et al. 1990].

Oxidiertes LDL wurde in der Läsion nachgewiesen, wobei dessen Epitope vorwiegend im Zellinneren von Makrophagen, nicht in extrazellulären Lipiden erkennbar waren [TORZEWSKI und LACKNER 2006] .

Lipoproteine mit den geschilderten Eigenschaften wurden durch verschiedene Behandlungen von LDL in vitro hergestellt:

Die Oxidation ist die bekannteste und bestuntersuchte Modifikation von LDL. Enzyme wie Cyclooxygenase, Lipoxigenase, NO-Synthase katalysieren die Bildung von oxLDL ebenso wie Cytochrom P450, Stoffwechselendprodukte der Zellen oder freie Eisenionen [NAVAB et al. 1996] . Wird LDL mit Endothelzellen inkubiert, treten bereits oxidative Veränderungen auf

[WITZTUM und STEINBERG 1991] . Dabei führt die Lipidperoxidation in einer Reaktionskette bis hin zur Spaltung der Fettsäuren zu Aldehyden und Ketonen. Diese reagieren mit Phospholipiden und mit Lysinresten des ApoB-100, das dann nicht mehr vom LDL-Rezeptor erkannt wird. Phosphatidylcholin wird zu Lysophosphatidylcholin gespalten, Phospholipide werden ebenfalls oxidiert. Allerdings ist die Menge an oxLDL in der Läsion vergleichsweise gering und Eigenschaften läSIONalen Lipids wie Komplementaktivierung, hoher Anteil an freiem Cholesterol oder proteolytisch gespaltenes ApoB-100 lassen sich durch Oxidation des Lipoproteins nicht erklären [STEINBRECHER und LOUGHEED 1992] .

Eine Aggregation der LDL-Partikel kann in vitro durch verschiedene Behandlungen erreicht werden, beispielsweise durch Vortexen, Spaltung mit Sphingomyelinase oder durch Proteolyse. Auch starke Oxidation bewirkt eine Zusammenlagerung der Partikel, allerdings ist die Aggregation in vivo bereits nach wenigen Stunden nachweisbar, während die Oxidation mehr Zeit in Anspruch nehmen würde [WILLIAMS und TABAS 1995] .

Bhakdi et al. gelang es, durch Spaltung von LDL mittels verschiedener Proteasen und Cholesterylesterase enzymatisch verändertes LDL (E-LDL) in vitro herzustellen, das dem komplementaktivierenden LCA strukturell und funktionell gleicht [BHAKDI et al. 1995] . E-LDL ist reich an freiem Cholesterol und freien Fettsäuren und besteht aus einer unregelmäßigen Population bis zu 200nm großer Teilchen, die bei der Fusion von durchschnittlich 5 LDL-Partikeln entstehen. Proteolytische und hydrolytische Enzyme, die in der Läsion nachgewiesen wurden, wie etwa Cathepsin D und H, Plasmin, MMPs und Cholesterylesterase, können zu einer solchen enzymatischen Spaltung führen [TORZEWSKI et al. 2004] [BHAKDI et al. 2004a] . Monoklonale An-

tikörper gegen E-LDL reagierten ebenfalls auf LCA und mit ihrer Hilfe konnten Ablagerungen des veränderten Lipids in der Läsion nachgewiesen werden [TORZEWSKI et al. 1998].

### Einwanderung von Immunzellen in Lipidablagerungen

Unter dem Einfluß der angereicherten und veränderten Lipide in der Gefäßwand bilden Zellen chemotaktisch wirkende Substanzen. Das Leukozyten anlockende Interleukin IL-8 wurde in der Läsion nachgewiesen und es gibt Hinweise auf seine proatherogene Wirkung [SHIN et al. 2002]. Im Einklang hiermit konnte gezeigt werden, daß mit E-LDL behandelte Endothelzellen IL-8 ausschütten [SURIYAPHOL et al. 2002]. Außerdem werden bei der durch E-LDL ausgelösten Komplementaktivierung chemotaktisch wirkende Peptide frei. Komplement konnte in Lipidablagerungen nachgewiesen werden, bevor die ersten Immunzellen eingewandert waren [BHAKDI et al. 2004a]. Oxidiertes LDL fördert die Monozyten-Chemotaxis direkt [ROSS 1999a] [FAN und WATANABE 2003], ebenso wie Lysophosphatidylcholin und Abbauprodukte von Kollagen und Elastin [FAN und WATANABE 2003]. Endothelzellen, die durch die Aufnahme von modifiziertem LDL mit Cholesterol beladen sind, exprimieren das Adhäsionsmolekül VCAM-1. Dies ist in vivo zu beobachten, bevor die ersten Immunzellen in die Intima einwandern [LIBBY 2002]. Wird VCAM-1 im Mausmodell ausgeschaltet, ist die Ausbildung von Läsionen zudem stark verringert [LIBBY 2006].

VCAM-1 führt zu Adhäsion und Einwanderung von Monozyten und T-Lymphozyten, zusammen mit E- und P-Selectin. P-Selectin ist notwendig für das Rollen der Monozyten auf der Endothelschicht, eine Vorstufe der festen Adhäsion, und tritt ebenfalls vermehrt in Läsionen auf [LIBBY 2000].

ICAM, PECAM, E- und P-Selectin werden in mit E-LDL behandelten Endothelzellen überexprimiert, ebenso ICAM in mit E-LDL behandelten glatten Muskelzellen. Dies erklärt die vermehrte Adhäsion und Transmigration von Monozyten und T-Lymphozyten, die an Endothel- bzw. Muskelzellen in Anwesenheit von E-LDL beobachtet wurde. OxLDL hatte ebenfalls einen wenn auch wesentlich geringeren Effekt auf die Adhäsion und Einwanderung der Immunzellen [KLOUCHE et al. 1999].

In der Läsion reifen die Monozyten unter dem Einfluß des dort überexprimierten macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) [LIBBY 2002] zu Makrophagen aus, wobei sie Scavengerrezeptoren wie CD36, Scavenger Rezeptor A (SR-A) und -B1 (SR-B1), lectin-type oxidized low-density lipoprotein receptor 1 (LOX1) und andere pattern recognition-Rezeptoren, etwa toll like-Rezeptoren (TLRs), stärker exprimieren [HANSSON und LIBBY 2006].

Werden Makrophagen mit E-LDL behandelt, sezernieren sie monocyte chemotactic protein-1

(MCP-1) [KLOUCHE et al. 1998]. Dieser Monozyten-Lockstoff wird im Atherom überexprimiert. Sein Gradient regt den Durchtritt der Monozyten aus dem Blutstrom durch das Endothel an, indem es an den Rezeptor CCR2 der Zellen andockt [ROSS 1999a]. Somit werden durch bereits ausgereifte Makrophagen weitere Monozyten in die Läsion gelockt.

### **Aufnahme von Cholesterol und Schaumzellbildung**

Ein Kennzeichen der atherosklerotischen Läsion sind von Lipidtröpfchen gefüllte Makrophagen, nach ihrem Aussehen als Schaumzellen bezeichnet. Obwohl die Lipide dieser Tröpfchen ursprünglich aus den Lipoproteinen des Plasma stammen, bewirkt eine Inkubation mit reinem, unverändertem LDL keine Schaumzellbildung [GOLDSTEIN et al. 1979]. Die Zellen schützen sich vor Überladung mit LDL durch vermehrte Internalisierung und verminderte Neusynthese des LDL-Rezeptors [TRABER und KAYDEN 1980]. Eine hohe LDL-Aufnahme wirkt außerdem inhibitorisch auf die endogene Cholesterolsynthese. Der Cholesterolgehalt der Zelle ist also durch einen negativen Feedback-Mechanismus streng reguliert. Goldstein und Brown haben nachgewiesen, daß durch Acetylierung modifiziertes LDL über einen sogenannten *scavenger*-Weg vermehrt aufgenommen wird [GOLDSTEIN et al. 1979]. Die veränderten Lipide binden dabei an Scavenger-Rezeptoren, vor allem SRA (scavenger receptor class a) und werden daraufhin phagozytiert. Dieser Aufnahmeprozeß ist unabhängig vom LDL-Rezeptor und nicht sättigbar, was zu einer starken Ansammlung von Cholesterolestern in den Zellen führt und so die Schaumzellbildung erklärt [LUSIS 2000]. Sowohl das als erstes Arbeitsmodell entwickelte, im Organismus nicht vorkommende acetylierte LDL [GOLDSTEIN et al. 1979] als auch oxidiertes [WITZTUM und STEINBERG 1991], aggregiertes [TABAS 1999] und enzymatisch gespaltenes LDL [BHAKDI et al. 1995] verursachen Schaumzellbildung. E-LDL ist der stärkste in der Läsion nachweisbare Schaumzellbildner [TORZEWSKI und LACKNER 2006]. Lediglich das von Goldstein und Brown eingeführte acLDL wirkt noch stärker, dabei handelt es sich jedoch um ein künstliches Modell-Lipoprotein, das im Körper nicht vorkommt. Die Zellen spalten das aufgenommene Lipoprotein im Lysosom zu freiem Cholesterol und verestern dieses im Cytosol mittels AcylCoA-Cholesterol-Acyltransferase wieder. Die resultierenden Cholesterolester bilden die sichtbaren Lipidtröpfchen [BROWN et al. 1980].

Die geschilderte Lipidablagerung, verbunden mit einigen eingewanderten Makrophagen, die teils durch Aufnahme von Lipiden schon zu Schaumzellen geworden sind, wird nach der offiziellen Einteilung der Stadien atherosklerotischer Läsionen durch die American Heart Association (AHA) als Läsion vom Typ I bezeichnet. [STARY et al. 1994]. Der Typ II wird auch als 'fatty

streak' bezeichnet. Neben mehreren Schichten von Schaumzellen fallen viele teils lipidhaltige glatte Muskelzellen auf. Die extrazellulären Lipidtröpfchen enthalten vorwiegend Cholesterolester. Einige Lymphozyten und Mastzellen sind bereits in die Läsion eingewandert. Typ I und II umfassen die frühen Läsionen, die nicht zu einer Verengung des Gefäßlumens führen und klinisch unauffällig sind. Im Tiermodell sind derartige Läsionen durch Senkung des Plasma-LDL-Spiegels reversibel.

In der intermediären Läsion vom Typ III sind die extrazellulären Lipidansammlungen stark vergrößert und zeigen beginnende Konfluenz. Sie enthalten vermehrt freies Cholesterol, Fettsäuren, Lysolecithin, Sphingomyelin und Triglyceride [STARY et al. 1994].

Makrophagen können der Entwicklung zu Schaumzellen entgegenwirken, indem sie aufgenommenes Cholesterol wieder an HDL abgeben [BROWN et al. 1980]. Dabei wird freies Cholesterol über die ATP-binding cassette-Proteine ABCA1 und ABCG1 aus der Zelle transportiert und von Apo-A1 auf HDL bzw. pre-HDL-Partikeln entgegengenommen [DROBNIK et al. 2002].

Obwohl die Aufnahme veränderter Lipoproteine über Scavenger-Rezeptoren zur Schaumzellbildung beiträgt, zeigen Tiermodelle, in denen diese Rezeptoren ausgeschaltet sind, vermehrte Atherosklerose. Der Abtransport der Lipoproteine über HDL zur Leber, wo sie abgebaut werden, ist auch nur nach Aufnahme in die Zelle möglich; dies könnte den paradox wirkenden Schutzeffekt von Scavengerrezeptoren erklären [HANSSON und LIBBY 2006].

### **Entwicklung einer komplizierten Läsion: Der Einfluß von Entzündungsprozessen**

Die ausgereiften Makrophagen schütten unter Einfluß von PRR-Liganden wie oxLDL diverse Cytokine aus [HANSSON und LIBBY 2006]. Sie locken weitere Immunzellen an, aktivieren diese und verwickeln die Läsion in Entzündungsprozesse, die sich teils schützend, teils schädigend auswirken.

Unter dem Einfluß von  $\text{IFN}\gamma$  produzieren die Makrophagen T-Zell-Chemokine. Die so angelockten T-Lymphozyten sammeln sich vorwiegend in der Schulter der Läsion an [HANSSON und LIBBY 2006].

Durch Kontakt mit Makrophagen und anderen Zellen, die läSIONALE Antigene wie oxLDL präsentieren, entwickeln sich T-Zellen entweder zu proinflammatorischen TH1-Zellen, die IL-1, IL-12, IL-18,  $\text{TNF-}\alpha$  und  $\text{IFN}\gamma$  ausschütten, oder zu antiinflammatorischen TH2-Zellen mit den Hauptcytokinen IL-4 und IL-10. IL-1beta und  $\text{TNF-}\alpha$  regen die Expression von VCAM-1 zusätzlich an, so daß noch mehr Immunzellen adhären können [LIBBY 2002].  $\text{IFN}\gamma$  hemmt die Proliferation

von Endothel- und Muskelzellen und die Kollagensynthese. Außerdem stimuliert es, wie oben geschildert, über Makrophagen die weitere Einwanderung von T-Zellen in die Läsion, so daß ein Teufelskreis der Aktivierung entsteht.  $TNF\alpha$  bewirkt  $NF\kappa B$ -Aktivierung sowie die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies, proteolytischer Enzyme und *tissue factor* in Endothelzellen. IL-12 und IL-18 fördern die Ausreifung weiterer T-Zellen [HANSSON und LIBBY 2006].

Neben Chemokinen, die zur Einwanderung von Immunzellen beitragen, schütten die Makrophagen auch Stoffe aus, die das Zellwachstum in der Läsion steuern: Platelet derived growth factor (PDGF), der glatte Muskelzellen zur Proliferation anregt, außerdem fibroblast growth factor [FGF], vascular endothelial growth factor (VEGF), heparin-binding epidermal growth factor [HBEGF], monocyte-colony stimulating factor [M-CSF], granulocyte-monocyte-colony stimulating factor [GM-CSF]. Allerdings synthetisieren sie auch Stoffe, die dem Zellwachstum entgegenwirken: transforming growth factor b [TGF- $\beta$ ], interleukin-1 [IL-1] und tumor necrosis factor [TNF- $\alpha$ ] [ROSS 1999b].

Aktivierte Makrophagen in der Intima bilden ebenso wie stimulierte Endothel- und Muskelzellen verstärkt Matrix-Metalloproteinasen. Ebenso wie von Makrophagen sezerniertes Cathepsin S und K wirken diese Enzyme matrixspaltend und reduzieren die Stabilität des Bindegewebes.

Durch die fortschreitende Einlagerung von Lipiden entsteht in der Läsion ein klar begrenzter Kern aus extrazellulären Lipiden ('lipid core'), der von intakter Intima zum Gefäßlumen hin abgeschlossen wird. Der Kern enthält kristallines Cholesterin und wird durch sterbende Schaumzellen vergrößert ('necrotic core'). Die Cholesterinüberladung führt dabei zum Tod der Zellen. Zytotoxizität wurde für verschiedene modifizierte Lipoproteine nachgewiesen: E-LDL wirkt in hohen Konzentrationen apoptotisch auf Endothelzellen [DERSCH et al. 2005] und ist ebenfalls zytotoxisch für Makrophagen [KLOUCHE et al. 1998]. OxLDL bewirkt den Zelltod von Endothelzellen und Muskelzellen [WITZTUM und STEINBERG 1991]. Die Läsion ist zunehmend verdickt und reich an Kollagen und Bindegewebe. Eine solche komplizierte Läsion, die bereits zu klinischen Beschwerden führen kann, wird als Atherom (Läsion Typ IV) bezeichnet.

Etwa ab der dritten Lebensdekade kommt es zum Fibroatherom (Typ V), bei dem mehrere dicke Bindegewebsschichten eine Kappe zum Gefäßlumen hin formen ('fibrous cap'). Neben der Intima ist auch die Media betroffen mit Ansammlungen von Muskel- und Immunzellen. Das Gefäßlumen ist stark eingeschränkt. Neue Mikrokapillaren werden gebildet [STARY et al. 1995].

Läsionen mit dünner fibröser Kappe sind anfällig für Rupturen, Einblutungen aus den Kapillaren und Gerinnselbildung. Dazu tragen die inflammatorischen Prozesse in der Läsion entscheidend bei:

Besonders vulnerable Plaques haben oft nur wenige glatte Muskelzellen, die die Festigkeit des fibrösen Gewebes stärken können, denn SMCs in der Läsion gehen apoptotisch zugrunde und noch lebende Zellen teilen sich seltener [LIBBY 2000].

Die MMPs schwächen die extrazelluläre Matrix durch die Spaltung von Kollagen, dessen Synthese durch die abnehmende Anzahl glatter Muskelzellen unter dem Einfluß von  $IFN\gamma$  verringert ist. Hingegen ist die Stimulation der Muskelzellproliferation durch diverse Wachstumsfaktoren sowie die Anregung der Kollagenbildung durch das unter anderem von Makrophagen gebildete TGF-beta zunächst protektiv. Die Dicke und Stabilität der Bindegewebskappe über der Läsion wird verstärkt. Allerdings kann dabei das Atherom das Gefäßlumen deutlich verengen (Stenose), so daß unter Belastung (Sport, Treppen steigen) der Sauerstoffbedarf des Herzmuskels nicht mehr gedeckt werden kann. Es kommt zur stabilen Angina pectoris.

Weitaus gefährlicher sind komplizierte Läsionen (Typ VI). Sie sind ebenfalls stark verdickt und enthalten viel Kollagen, zusätzlich ist aber ihre Intima beschädigt. Oberflächliche Fissuren bringen den nekrotischen Lipidkern in Kontakt mit dem Blutstrom und seine Bestandteile, etwa Kollagen aus der Basalmembran oder *tissue factor*, lösen die Blutgerinnung aus. Hämatome und Thromben sind die Folge. Ein schneller und weitgehender Verschuß der Ader durch einen Thrombus bedingt Herzinfarkt, Schlaganfall, instabile Angina.

Ist die Plaque bereits rupturiert, sammeln sich aktivierte T-Zellen, die  $IFN\gamma$  (und  $TNF\alpha$ ) ausschütten, welches die Kollagensynthese und die Proliferation der Muskelzellen hemmt [HANSSON und LIBBY 2006]. Ein Teufelskreis entsteht. Heilt die verletzte Läsion ab, verdickt sie sich weiter durch Bindegewebs- und Kollagenbildung [LIBBY 2000]. Die Stabilität der Kappe über fortgeschritteneren Läsionen hängt also maßgeblich vom Gleichgewicht zwischen Neubildung und Abbau von Kollagen, Proliferation und Apoptose von SMCs ab.

Aktivierte Blutplättchen (während Verletzung und Thrombosierung der Läsion) bilden TGF-beta, das die Kollagensynthese durch glatte Muskelzellen anregt, deren Proliferation aber hemmt. [LIBBY 2002]

Atherome können dieses Stadium mehrfach durchlaufen, wobei das Gefäßlumen sich weiter und weiter verringert. Läsionen von Typ VI verursachen am häufigsten klinische Symptome und sind hauptverantwortlich für atherosklerosebedingte Todesfälle.

Weiterhin unterschieden werden Typ VII, gekennzeichnet durch eine Kalkablagerung ähnlich der Knochenbildung (Hydroxylapatit, Carbonat-Apatit, Calciumfreies Apatit). Glatte Muskelzellen können beispielsweise das für den Erhalt der Knochensubstanz wichtige Osteopontin produzieren. Läsionen vom Typ VIII sind stark bindegewebig vernarbte, abgeheilte rupturierte Typ

VI-Läsionen. VII und VIII können aus IV und V durch Lipidregression entstehen.

Atherosklerotische Läsionen durchlaufen die beschriebenen Stadien nicht zwangsläufig vollständig oder in der angegebenen Reihenfolge. Läsionen vom Typ V-VIII sind nicht mehr reversibel [STARY 2000].

### 1.1.4 Atherosklerose als chronische Entzündungskrankheit

Die Entzündung ist eine schnelle Reaktion der unspezifischen Immunabwehr, gekennzeichnet durch *rubor, dolor, calor, tumor* und *function laesa*. Sie wird unterteilt in die rasch verlaufenden perakuten, akuten und subakuten sowie die sich über mehrere Monate bis Jahre hinziehenden chronischen und chronisch-aktiven Formen.

Atherosklerose hat mit anderen chronischen Entzündungskrankheiten Merkmale wie die Anwesenheit von Makrophagen, Fibrose, Gewebsuntergang und Komplementaktivierung gemeinsam [SEIFERT et al. 1990]. Dem Endothel kommt eine Schlüsselrolle zu, da es die Leukozyten zur Einwanderung anregt, aktiviert und die Gefäßneubildung regelt. Bei den meisten chronischen Entzündungskrankheiten erfolgt die Einwanderung von Immunzellen durch die feinen postkapillaren Venen. Die Atherosklerose bildet insofern eine Ausnahme, als hier nach der Lipideinlagerung Monozyten durch die Gefäßwand großer Arterien dringen [KULDO et al. 2005].

Während alle chronischen Entzündungen unter Mitwirkung von Monozyten bzw. Makrophagen und T-Zellen entstehen, wurden Granulozyten lediglich bei einigen chronisch-entzündlichen Erkrankungen nachgewiesen, etwa bei der rheumatoiden Arthritis oder der Lungenfibrose. Die Anreicherung von Bindegewebe erfolgt in der Atherosklerose, ähnlich wie bei der chronischen Pankreatitis, vorwiegend durch proliferierende Muskelzellen, während bei anderen Erkrankungen Fibroblasten im Vordergrund stehen. Verstärkte Kollagensynthese, Vernarbung und Neubildung der extrazellulären Matrix treten als weitere Kennzeichen chronischer Entzündungen auch bei der Atherosklerose auf [ROSS 1999a]. Die Auslöser chronischer Entzündungskrankheiten sind vielfältig und oft noch nicht überzeugend aufgeklärt. Während bei einigen Syndromen Infektionen oder Allergene im Vordergrund stehen (Asthma), können auch Schadstoffe eine Entzündung bewirken, etwa bei der chronisch-obstruktiven Lungenerkrankung (COPD). Häufig wird eine Autoimmunreaktion als Ursache der Erkrankung angesehen, wie bei rheumatoider Arthritis oder Psoriasis. Die Überladung mit körpereigenen Stoffen, wie sie durch Ansammlung cholesterolreicher Lipide in der Gefäßwand in der Atherosklerose stattfindet, ist jedoch eine Besonderheit. Möglicherweise findet sich eine Entsprechung in der Rolle veränderter Proteine in neurodegenerativen Erkrankungen, die ebenfalls zunächst physiologisch, sich in modifizierter

Form ablagern wie beta-Amyloide oder tau-Fibrillen in der Alzheimer'schen Erkrankung und dann zu pathologischen Prozessen führen. Wie genau das Überangebot an LDL die Entzündung auslöst und wann und wodurch die Weichen von einer Schutzreaktion des Körpers im Sinne des Abräumens angelagerter Lipide zur schädlichen Inflammation gestellt werden, ist noch nicht völlig klar.

### 1.1.5 Die Mainzer Hypothese

Die Mainzer Hypothese kann als neues Konzept zur Erklärung der Entstehung von Atherosklerose auf zellulärer Ebene einen wichtigen Beitrag zur Erklärung dieser Entzündungsvorgänge liefern.

Wie bereits geschildert, konnten Bhakdi et al. ein komplementaktivierendes Lipoprotein aus der Läsion isolieren und durch enzymatische Veränderung von LDL in vitro herstellen. Der Einfluß dieses E-LDL auf Entstehung und Progression der atherosklerotischen Läsion wurde in den entsprechenden Abschnitten oben bereits dargelegt und ist im Folgenden nochmals kurz zusammengefaßt.

E-LDL wurde in der atherosklerotischen Läsion immunhistochemisch nachgewiesen

[TORZEWSKI et al. 1998] . Läsionale Enzyme können die Spaltung des LDL zu E-LDL bewirken [TORZEWSKI et al. 2004] . E-LDL verursacht die Ausschüttung von IL-8 [SURIYAPHOL et al. 2002] sowie eine Überexpression von ICAM, PECAM, E- und P-Selectin in Endothelzellen

[KLOUCHE et al. 1999] . Dadurch wird die Adhäsion und Transmigration von Monozyten und T-Lymphozyten gefördert. Mit E-LDL behandelte Makrophagen sezernieren MCP-1

[KLOUCHE et al. 1998] . E-LDL ist ein potenter Schaumzellbildner [BHAKDI et al. 1995] und ruft in mittleren Konzentrationen Endothelzellapoptose hervor [DERSCH et al. 2005] . Hohe Konzentrationen sind selbst für Makrophagen toxisch [KLOUCHE et al. 1998] .

Bei der Präparation des E-LDL aus LDL wird zunächst das Apolipoprotein B-100 durch eine Protease gespalten. Daraufhin kann zugegebene Cholesterolesterase zu den Cholesterolestern im Inneren des LDL-Partikels vordringen und diese in freies Cholesterol und freie Fettsäuren aufspalten [BHAKDI et al. 1995] [SURIYAPHOL et al. 2002] [BHAKDI et al. 2004a]. Die so hervorgerufene Strukturveränderung des Lipoproteins führt zu dessen Fusionierung, außerdem werden Phosphorylcholingruppen zugänglich, an die CRP calciumabhängig binden kann. In der Läsion kolokalisiert CRP mit E-LDL [BHAKDI et al. 1999]. Das gebundene CRP aktiviert Komplement,

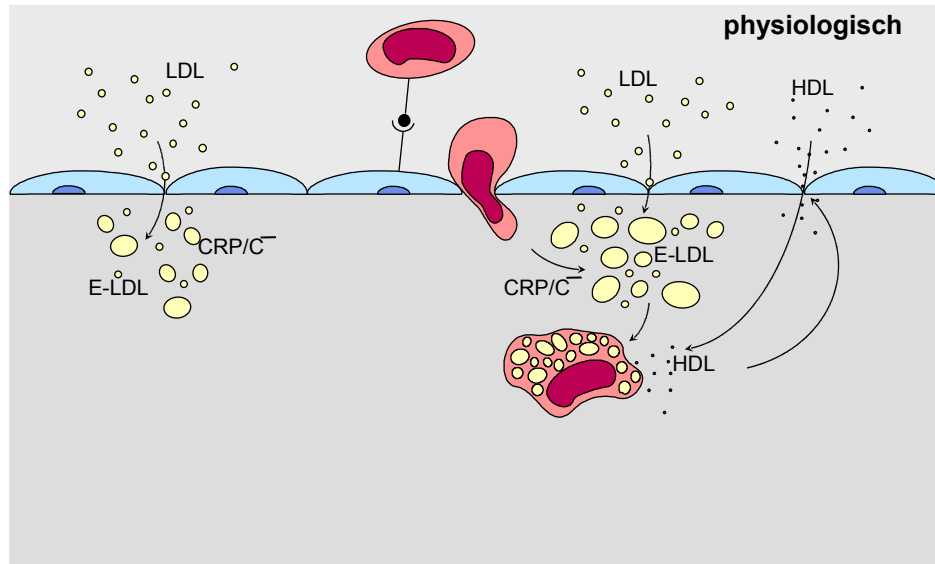


Abbildung 1.2: Mainzer Hypothese: physiologische Bedingungen

allerdings bricht die Kaskade vor Erreichen des terminalen Komplementkomplexes ab. Lediglich sehr hohe Konzentrationen an E-LDL können Komplement direkt und dann auch vollständig aktivieren. In fortgeschrittenen, nicht jedoch in zeitigen Läsionen kolokalisiert auch der terminale Komplementkomplex C5b-9 mit E-LDL und CRP [BHAKDI et al. 2004b]. Natives LDL und oxLDL zeigten weder mit noch ohne CRP eine komplementaktivierende Wirkung.

Auffällig ist hier der Unterschied zwischen der zunächst untoxischen Wirkung von geringen Konzentrationen und dem Umschwung zu proinflammatorischen und zytotoxischen Vorgängen bei hohen Konzentrationen an E-LDL.

Die enzymatische Spaltung von LDL könnte zunächst dazu dienen, das Immunsystem auf den Überschuss gestrandeten LDLs aufmerksam zu machen. Dieser kann nur durch die Phagozyten beseitigt werden. Geringe Mengen an LDL könnten so durch eine Art körpereigene Müllabfuhr abtransportiert und das Endothel vor dem Fortschreiten der Läsionsbildung geschützt werden. Eine Überladung mit E-LDL könnte dieses System jedoch überfordern, woraufhin die zytotoxischen und inflammatorischen Wirkungen des veränderten Lipoproteins in den Vordergrund träten [BHAKDI et al. 2004a]. Diese Erklärung steht im Einklang mit dem Plasma-LDL-Spiegel

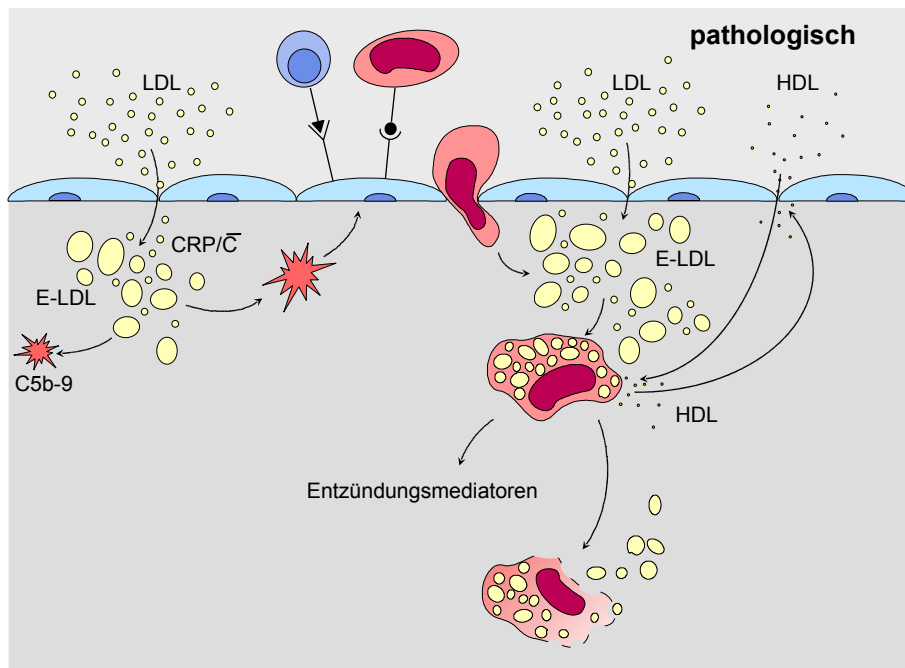


Abbildung 1.3: Mainzer Hypothese: pathologische Bedingungen

als entscheidendem Parameter der Atherosklerose.

Weder die Ansammlung unveresterten extrazellulären Cholesterols noch die Komplementaktivierung in der Läsion läßt sich durch die gängige oxLDL-Hypothese ausreichend erklären. Die Mengen an oxLDL, die in der Läsion vorliegen, sind sehr gering [BHAQDI et al. 2004a] und zellassoziiert [TORZEWSKI und LACKNER 2006]. Anti-oxLDL-Antikörper wurden zwar in atherosklerotischen Mäusen nachgewiesen, hatten aber dieselbe Struktur wie Antikörper, die gegen bakterielle Phosphorylcholine gerichtet sind und können somit nicht zum Beweis des Vorkommens von oxLDL herangezogen werden.

### 1.1.6 Therapie der Atherosklerose

Vorrangiges Ziel bei der Behandlung der Atherosklerose ist die Senkung des LDL-Cholesterolspiegels, um eine Verschlimmerung zu vermeiden oder wenigstens zu verzögern. Neben Veränderung des Lebensstils durch kalorienarme, cholesterolreduzierte Ernährung verbunden mit körperlicher Bewegung werden dazu Medikamente eingesetzt.

Versuche, mit Antioxidantien der Bildung des vermeintlich entscheidenden proatherosklerotischen Faktors oxLDL vorzubeugen, blieben ohne Erfolg. In klinischen Studien konnte kein Schutz vor Atherosklerose nachgewiesen werden [BROWN et al. 2002] .

Fibrate sind Agonisten des PPAR-Rezeptors und aktivieren die Lipoproteinlipase. So wird der Abbau von LDL verstärkt, zudem reduzieren Fibrate die VLDL-Synthese.

Statine, die derzeit wirksamsten Cholesterolsenker, sind HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren. Die HMG-CoA-Reduktase ist ein Enzym der Cholesterolsynthese. Wird die körpereigene Cholesterolsynthese durch Statine gehemmt, sind die Zellen auf eine Zufuhr des Cholesterols von außen angewiesen. Sie exprimieren verstärkt LDL-Rezeptoren, so wird dem Kreislauf LDL entzogen und der Plasmaspiegel des Lipoproteins sinkt.

Auch das Vitamin Niacin wird zur Senkung des LDL-Plasmaspiegels herangezogen. Es hemmt den Abbau von Triglyceriden im Fettgewebe und senkt so den Blutspiegel an freien Fettsäuren und die VLDL-Synthese in der Leber.

Ezetimib hemmt die Aufnahme von Cholesterol am Bürstensaum des Dünndarms durch Bindung an das Niemann-Pick-C1-like-1-Protein.

Colestyramin senkt ebenfalls den Cholesterolspiegel. Es handelt sich um ein Anionenaustauscherharz, das im Darm Gallensäuren bindet und mit diesen zusammen als unverdaulicher Komplex ausgeschieden wird. Gallensäuren werden normalerweise über den enterohepatischen Kreislauf vom Körper wieder aufgenommen; bei Einnahme von Colestyramin müssen sie somit vermehrt neu synthetisiert werden. Dazu ist Cholesterol notwendig.

Nahrungsmitteln wird beta-Sitosterin zugesetzt, das die Aufnahme von Cholesterol hemmt.

Mit dem Wirkstoff Torcetrapib wurde versucht, den HDL-Plasmaspiegel zu erhöhen und so vor Atherosklerose zu schützen. Torcetrapib hemmt CETP, Cholesterolester-Transferprotein, das Cholesterol von HDL auf LDL überträgt. Aufgrund eines Anstiegs von Todesfällen wurden die klinischen Studien mit Torcetrapib jedoch abgebrochen.

ACAT-Inhibitoren, die die Akkumulation von Cholesterolestern in Makrophagen und damit die Schaumzellbildung hemmen, wurden entwickelt und in klinischen Studien getestet (Avasimibe, Pactimibe). Sie erwiesen sich jedoch als proatherogen [NISSEN et al. 2006] . Für den als antiatherogen bekannten Wirkstoff Tamoxifen wurde ebenfalls ACAT-Hemmung als Mechanismus postuliert [DE MEDINA et al. 2004] .

Inhibitoren des mikrosomalen Triglycerid-Transferproteins (MTP) sind ebenfalls in der Entwicklung (Implitapide). MTP ist notwendig für die Bildung von Chylomikronen und VLDL in der Leber [JAMIL et al. 1996] .

## 1.2 Granulozyten

### 1.2.1 Eigenschaften der Granulozyten

Granulozyten gehören zu den Leukozyten und werden nach der Form ihres viellappigen Kernes auch Polymorphkernige Leukocyten (polymorphonuclear leukocytes, PMN) genannt. Sie werden in neutrophile, basophile und eosinophile Granulozyten eingeteilt, abhängig von ihrer Anfärbbarkeit, wobei die neutrophilen Granulozyten mit über 90% den überwiegenden Anteil stellen. Als Phagozyten dienen sie der unspezifischen Abwehr von Krankheitserregern, die sie mit Hilfe verschiedener Inhaltsstoffe ihrer Granula bekämpfen.

Granulozyten zeichnen sich durch amöboide Beweglichkeit aus. Nach durchschnittlich 8 Stunden im Blutkreislauf wandern sie ins Gewebe ein, wo sie nur wenige Tage überleben, bevor sie in konstitutive Apoptose gehen. Ob zirkulierende Granulozyten ebenfalls apoptotisch werden oder nach Seneszenz zurück ins Knochenmark wandern, wird diskutiert.

Ausgereifte Granulozyten gewinnen ihre Energie durch Glycolyse aus gespeichertem Glycogen, sie verfügen nur noch über wenige Mitochondrien [PETRIDES 2007] .

Granulozyten verfügen über primäre und sekundäre Granula. Die primären, sog. azurophilen Granula enthalten bei pH 5,5 saure Hydrolasen und Proteasen sowie Myeloperoxidase, Defensine und Lysozym. Sie degranulieren verzögert, teils direkt ins Phagosom, wo ihr Inhalt aufgenommene Keime abtötet und verdaut. Die sekundären Granula liefern vorwiegend Chemokine wie MCF, FMLP, daneben Lactoferrin, komplementspaltende Proteasen und Membranrezeptoren. Sie werden rasch exozytotisch ausgeschüttet und ihr Inhalt wirkt inflammatorisch auf das umliegende Gewebe.

Granulozyten, die Bakterien aufnehmen, machen diese unter anderem durch freie Sauerstoffradikale unschädlich. Dabei erhöht sich ihr Verbrauch an molekularem Sauerstoff, also ihre Atmung. NADPH-Oxidase wandelt den Sauerstoff in Superoxid-Anionen um, während NADPH als Elektronendonator zu  $\text{NADP}^+ + \text{H}^+$  oxidiert wird. Der Prozeß wird als *oxidative* oder auch *respiratory burst* bezeichnet. DPI ist ein Inhibitor der NADPH-Oxidase neutrophiler Granulozyten und hemmt auf diese Weise ihren respiratorischen Burst. Die entstandenen Superoxidanionen dismutieren spontan oder katalysiert durch Superoxiddismutase zu Wasserstoffperoxid. Myeloperoxidase, die in azurophilen Granula der PMN enthalten ist, verbindet das Wasserstoffperoxid mit Chloridionen zu hypochloriger Säure, die ebenfalls toxisch auf Bakterien und andere Zielzellen der PMN wirkt. Die beim Burst freiwerdenden Radikale und Verbindungen können benachbarte Zellen schädigen und deren Apoptose auslösen, Entzündungen im umliegenden Gewebe hervor-

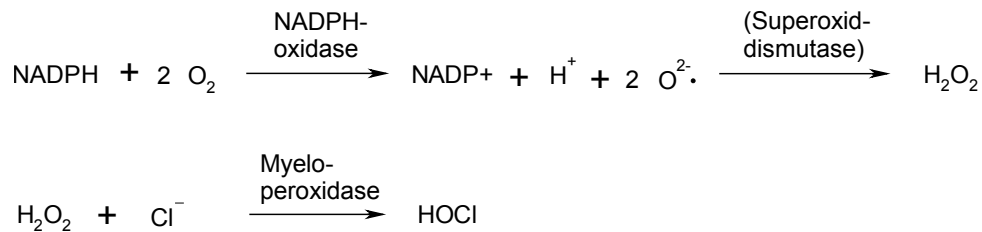


Abbildung 1.4: Entstehung von Sauerstoffradikalen, Wasserstoffperoxid und Hypochloriger Säure beim respiratorischen Burst von PMN

rufen und weitere Immunzellen anlocken. Der burstende Granulozyt selbst ist durch Enzyme wie Superoxiddismutase, Catalase und Glutathionperoxidase geschützt, die die entstehenden Radikale und das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> abfangen können [DAHLGREN und KARLSSON 1999].

Um ihre Funktion ausführen zu können, müssen die Granulozyten zunächst aus dem Blutstrom in das Zielgewebe transportiert werden. Chemotaktische Substanzen wie Leukotriene, IFN $\gamma$ , die Komplementfaktoren C 3a und C 5a und Interleukine locken Granulozyten an. Sie werden in entzündetem Gewebe verstärkt ausgeschüttet, so wird etwa IL-8 von läSIONalem Endothel produziert. IL-8 bewirkt zusätzlich eine vermehrte Mobilisierung der Granulozyten aus dem Knochenmark [PETRIDES 2007]. Die Chemokine binden dabei an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren [DENSEN P 1995].

Die Phagozyten aus dem Blutstrom rollen zunächst in der Nähe des Entzündungsherdes am Endothel entlang. Diese noch lockere Anheftung wird von Adhäsionsmolekülen vermittelt, auf Seite des Endothels sind das E- und P-Selectin, die Leukozyten selbst exprimieren L-Selectin. Als Bindungspartner dienen Glycoproteine der Zelloberfläche. Binden Granulozyten an E-Selectin, wird in der Endothelzelle, die das E-Selectin auf ihrer Oberfläche trägt, eine Signalkaskade aktiviert, die die Bildung von Integrinen stimuliert. Integrine bilden eine weitere Klasse von Adhäsionsmolekülen und sind für die nun folgende Verlangsamung des Rollens notwendig. Auch Granulozyten exprimieren in dieser Phase Integrine, vor allem beta-2-Integrine, die wesentlich für den Übergang zur festen Adhäsion sind [LEY et al. 2007]. IL-8 aktiviert die Granulozyten, indem es über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren eine MAPK-Signalkaskade anstößt [KUPPER et al. 1992]. Daraufhin werden beta-2-Integrine wie Mac-1 (CD11b/CD18) und LFA-

1, der leukozytäre Bindungspartner für ICAM-1 [PETRIDES 2007], aus den spezifischen Granula an die Zelloberfläche transportiert. Durch Konformationsänderung wird außerdem in der aktivierten Zelle die Bindebereitschaft der Integrine gegenüber Liganden verstärkt. Die Endothelzellen exprimieren intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), das besonders stark an LFA-1 bindet. IL-8 führt zum Shedding, also Abwerfen, von L-Selectin auf Granulozyten. Dadurch wird die Adhäsion der Blutkörperchen an das Endothel enger. So kommt die Zelle letztlich zum Stillstand und adhärirt fest an das Endothel [LEY et al. 2007].

Das Shedding des L-Selectin ermöglicht erst die Transmigration der Zellen durch das Endothel, hemmt allerdings deren Adhäsion. Das Integrin PECAM (auch als CD31 bezeichnet) kommt auf Leukozyten und Endothelzellen vor, seine homophile Bindung führt die Leukozyten zu interendothelialen Grenzen, durch die sie ins Gewebe einwandern können [DENSEN P 1995]. Welche Adhäsionsmoleküle für die Transmigration bedeutsam sind, ist vom aktivierenden Stimulus abhängig. PECAM-1, ICAM-2, JAMA und ELAM scheinen wichtig für die Transmigration von Neutrophilen zu sein; ihre Elimination verzögert oder vermindert deren Einwanderung [LEY et al. 2007]. Das Durchdringen des Endothels kann sowohl para- als auch transzellulär erfolgen. Dabei verformen sich Granulozyten, werden innerhalb von Sekunden flach und sind nach einigen Minuten durch das Endothel hindurchgedrungen. Im Gewebe richten sie sich nach Gradienten chemotaktischer Substanzen aus und umgeben Fremdkörper wie Bakterien mit Pseudopodien, also Zellausläufern. Ist der Fremdkörper ganz umschlossen, fusionieren die Pseudopodien, so daß er sich im Zellinneren im sogenannten Phagosom befindet. In dieses sezernieren Granulozyten die Inhaltsstoffe ihrer Granula, die den Fremdkörper abtöten und verdauen.

### 1.2.2 Die Bedeutung von Granulozyten in der Atherosklerose

Granulozyten sind normalerweise in der atherosklerotischen Läsion nicht nachweisbar [ROSS 1999a] [JONASSON et al. 1986], obwohl sie 60 Prozent der zirkulierenden weißen Blutkörperchen stellen. Eine Ausnahme sind bereits fortgeschrittene, rupturierte Läsionen [NARUKO et al. 2002] [MEHTA et al. 1989] [MAZZONE et al. 1993].

Allerdings gab es in verschiedenen Modellen der beginnenden Läsion Hinweise auf eine zeitige Einwanderung von Granulozyten. So waren in einem Mausmodell die meisten an Läsionen rollenden Leukozyten Granulozyten [ERIKSSON et al. 2001]. Durch Elektrostimulation bei hohem LDL-Spiegel wurden von Kling et al. schaumzellreiche Verdickungen in der Aorta von Kaninchen erzeugt, in die zunächst vor allem Granulozyten eindrangen. Nach zwei Wochen verschwanden sie wieder aus der Läsion [KLING et al. 1993]. In einem in vitro-Modell der Intima aus auf-

einandergeschichteten Endothel- und Muskelzellen konnte nach Inkubation mit LDL die Infiltration neutrophiler Granulozyten gezeigt werden, die im Gewebe Matrix-Metalloproteinasen produzierten [DORWEILER et al. 2008]. Einige Hinweise auf die Anwesenheit von Granulozyten in zeitigen atherosklerotischen Läsionen gibt es [COGNY et al. 1996], zudem wurden granulozytenspezifische Enzyme wie Matrix-Metalloproteinasen [HERMAN et al. 2001] [HEMDAHL et al. 2006] oder Leukozyten-Elastase im Atherom in hoher Konzentration nachgewiesen [DOLLERY et al. 2003]. Die Produktion dieser Enzyme wird in den zitierten Arbeiten anderen Zellen wie Makrophagen zugeschrieben, allerdings erfolgt sie in diesen Zellen in deutlich geringerem Maß als in den Granulozyten selbst.

Zernecke et al. zeigten kürzlich, daß Granulozyten in Läsionen von ApoE<sup>-/-</sup>-Mäusen einwandern und daß ihre Depletion mittels Antikörper das Fortschreiten der Atherosklerose zu hemmen vermag [ZERNECKE et al. 2008].

### 1.3 Freie Fettsäuren

Freie Fettsäuren werden vorwiegend aus den Triglyceriden von Ölen und Fetten der Nahrung aufgenommen. Diese werden im Darm in Chylomikronen eingebaut und vom Muskel- und Fettgewebe aufgenommen. Durch beta-Oxidation dienen sie in den Muskeln der Energiegewinnung, im Fettgewebe werden sie neu verestert und gespeichert. Im Zuge der Umwandlung in weitere Lipoproteine werden die restlichen Fettsäuren aus den *remnants* mit freiem Cholesterin zu Cholesterolestern verknüpft. Bis auf zwei essentielle Fettsäuren, Linolsäure und alpha-Linolensäure, können alle vom Körper selbst aus AcetylCoA-Einheiten synthetisiert werden. Pflanzenöle sind besonders reich an der Omega-6-Fettsäure Linolsäure, die damit auch einen hohen Anteil der in LDL enthaltenen Fettsäuren stellt.

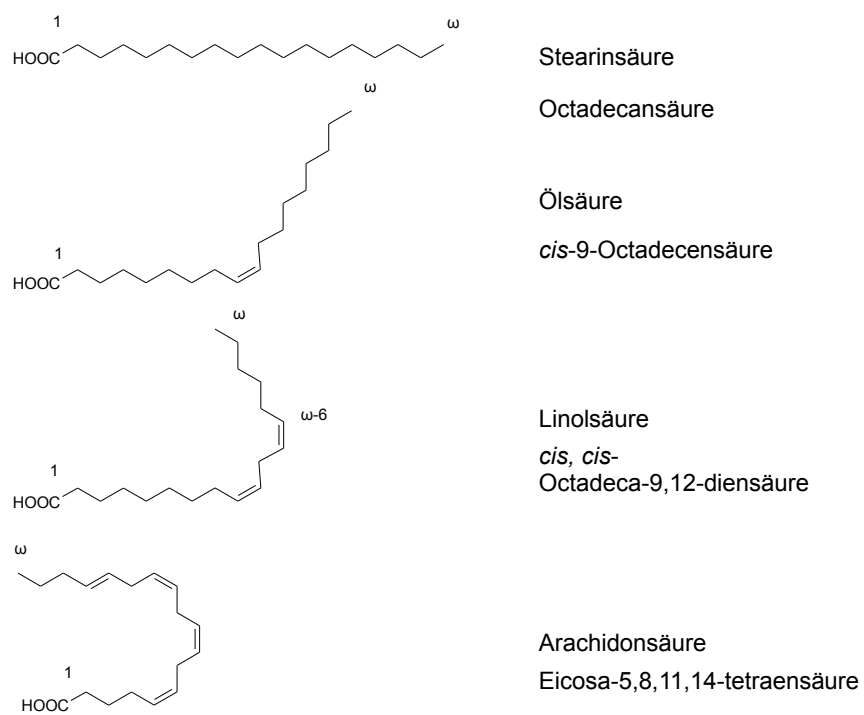


Abbildung 1.5: Strukturen gesättigter und ungesättigter Fettsäuren

## 1.4 Transkriptionsfaktoren in der Entzündung: NF $\kappa$ B und AP-1

### 1.4.1 NF $\kappa$ B in der Atherosklerose

Der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B kommt den meisten eukaryotischen Zellen vor und reguliert eine Vielzahl von Genen. An der Regulierung zentraler Prozesse wie Zellteilung und -differenzierung ist NF $\kappa$ B ebenso beteiligt wie an der Steuerung von Entzündung, Entzündungsresolution und programmiertem Zelltod. Das Zusammentreffen von proliferativer und antiapoptotischer Wirkung des Transkriptionsfaktors macht NF $\kappa$ B unter bestimmten Bedingungen zu einem Onkogen. In der Atherosklerose als chronischer Entzündung ist er von großer Bedeutung. Brand et al. haben gezeigt, daß aktiviertes NF $\kappa$ B in vaskulären Läsionen vorliegt, nicht aber in gesundem Gefäßgewebe [BRAND et al. 1996]. Inflammatorische Zytokine wie TNF $\alpha$  oder IL-1 stimulieren die Aktivierung von NF $\kappa$ B in verschiedenen an der Läsion beteiligten Zelltypen. Es bindet unter anderem an Promotoren von für die Atherosklerose bedeutsamen Genen wie IL-1beta, IL-8, MCP-1, VCAM, ICAM, E-Selectin. Wird die Aktivierung von NF $\kappa$ B in manchen Zellen gehemmt, gehen sie leichter in die Apoptose [GHOSH et al. 1998]. NF $\kappa$ B induziert antiapoptotische Faktoren wie IAPs oder Bcl2-like factors, durch deren Fehlen die erleichterte Apoptose zustande kommt. Unter anderen Bedingungen kann NF $\kappa$ B jedoch auch den Zelltod begünstigen, beispielsweise kann es für die p53-abhängige Apoptose notwendig sein [PERKINS 2000].

NF $\kappa$ B ist ein Dimer aus Proteinen der rel-Familie [GHOSH et al. 1998]. Die konservierte Rel-Homologiedomäne, die diesen Proteinen gemeinsam ist, liegt am N-Terminus und umfaßt etwa 300 Aminosäuren. Sie vermittelt die Dimerisierung sowie die Bindung an DNA oder Inhibitoren der I $\kappa$ B-Familie und enthält eine Sequenz, die den Transport des Transkriptionsfaktors in den Kern bewirkt. Verschiedene Homo- und Heterodimere werden der NF $\kappa$ B-Familie zugerechnet, das häufigste besteht aus den Untereinheiten p50 und p65. p50 wird als inaktive Vorform p105 gebildet, diese verfügt über C-terminale Ankyrin-repeats, die posttranslational abgespalten werden. Beide werden auch als NF $\kappa$ B1 bezeichnet. Auf gleiche Weise wird aus p100 p52 (NF $\kappa$ B2). Weitere Untereinheiten aus der NF $\kappa$ B-Familie sind RelA (p65), RelB und c-Rel. Diese drei werden auch als Rel-Proteine bezeichnet und enthalten mindestens eine Transaktivierungsdomäne. Häufig verbindet sich ein Rel- mit einem Nicht-Rel-Protein zum Heterodimer. In einigen Zelltypen wie B-Zellen und dendritischen Zellen befindet sich NF $\kappa$ B dauerhaft im Zellkern. Diese konstitutive Aktivierung von NF $\kappa$ B kann Zellen im ausdifferenzierten Status halten.

Nicht aktives NF $\kappa$ B liegt an den Inhibitor I $\kappa$ B gebunden vor und verbleibt im Cytosol, da der Inhibitor die Translokationssequenz maskiert. I $\kappa$ B besteht wie NF $\kappa$ B aus einer Familie ähnlicher Proteine, die Ankyrin-repeats enthalten, über die sie an die Rel-Homologiedomäne der NF $\kappa$ B-Untereinheiten binden [BAEUERLE 1998]. C-terminal verfügt I $\kappa$ B über eine PEST-Sequenz, eine Zielsequenz für Ubiquitinylierung und Abbau. Als erstes bekannt und am besten charakterisiert ist I $\kappa$ B $\alpha$ , ein Protein von 37kDa. Die Induzierung erfolgt über den I $\kappa$ B-Kinase-Komplex IKK, der I $\kappa$ B an Serin 32 und Serin 36 phosphoryliert, woraufhin der Inhibitor an Lysin 21 und Lysin 22 ubiquitinyliert und vom 26S-Proteasom abgebaut wird. Eine alternative Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  an Tyrosin 42 wurde ebenfalls gezeigt. Diese führt nicht zur Ubiquitinylierung und folglich nicht zum Abbau des Inhibitors. Ob NF $\kappa$ B auf diesem Weg aktiviert oder seine Aktivierung gehemmt wird, ist noch unklar. Der IKK besteht aus drei Untereinheiten, von denen IKK $\gamma$  von der stromaufwärts liegenden Signalkaskade aktiviert wird, IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  hingegen die katalytische Funktion tragen.

Das freie NF $\kappa$ B wandert in den Kern und bindet an die sogenannten kappaB-sites der DNA. Diese umfassen 10 Basenpaare und sitzen in Promotoren und Enhancern vieler verschiedener Gene, darunter solche für Cytokine, Adhäsionsmoleküle und akute Phase-Proteine. In aller Regel bewirkt NF $\kappa$ B eine Aktivierung der von ihm regulierten Gene; selten wird auch eine Repression beobachtet, vor allem durch Dimere, die kein Rel-Protein enthalten, wie etwa p50/p50.

PKA kann NF $\kappa$ B durch Phosphorylierung transaktivieren, außerdem wird p65 durch p300 und CBP (CREB-binding protein) an Lysinresten acetyliert und damit aktiviert. Es interagiert außerdem mit heterologen DNA-bindenden Proteinen wie CCAAT/enhancer-binding protein  $\beta$  (C/EBP $\beta$ ). Durch die HDAC (Histondeacetylase) wird p65 wieder deacetyliert, woraufhin I $\kappa$ B $\alpha$  leichter binden und es aus dem Kern exportieren kann [CHEN und GREENE 2003].

Einige Gene werden nur bei gemeinsamer Anwesenheit von NF $\kappa$ B und einem bestimmten Enhancer induziert. Dadurch wird die Spezifität der NF $\kappa$ B-Wirkung trotz der Vielzahl der NF $\kappa$ B-regulierten Genen gewährleistet [PERKINS 2000].

Da zur geschilderten Aktivierung von NF $\kappa$ B keine Neusynthese des Proteins erforderlich ist, zählt es zu den schnell induzierbaren Transkriptionsfaktoren. In einer Feedback-Schleife bindet das aktivierte NF $\kappa$ B auch an eine kappaB-site im Gen für I $\kappa$ B $\alpha$  und induziert die Synthese des Inhibitors. Freies NF $\kappa$ B im Cytosol wird dann an I $\kappa$ B gebunden und inaktiviert; es kommt sogar zur Translokation von I $\kappa$ B $\alpha$  selbst in den Nukleus, wo es NF $\kappa$ B bindet und aufgrund

einer enthaltenen Exportsequenz wieder ins Cytosol transportiert wird. Damit ist die NF $\kappa$ B-Aktivierung nicht nur ein schneller, sondern auch ein transienter, schnell beendeter Prozeß.

Eine Abspaltung des I $\kappa$ B und Aktivierung von NF $\kappa$ B kann durch viele Faktoren bewirkt werden: Zytokine, virale und bakterielle Antigene wie virale RNA oder Lipopolysaccharide, Wachstumsfaktoren, aber auch chemisch-physikalische Faktoren wie UV-Strahlung oder freie Radikale. Die Aktivierung durch inflammatorische Cytokine wie TNF $\alpha$  oder IL-1 ist im Rahmen der Atherosklerose besonders hervorzuheben.

OxLDL kann je nach Inkubationsbedingungen sowohl NF $\kappa$ B aktivieren als auch eine Hemmung des Transkriptionsfaktors bewirken [MONACO und PALEOLOG 2004]. Hennig et al. zeigten, daß Linolsäure in Zellen oxidativen Streß auslöst und dadurch NF $\kappa$ B aktiviert [HENNIG et al. 1996].

Die Bedeutung des NF $\kappa$ B für Entzündungsprozesse wird bereits therapeutisch genutzt, zudem ist inzwischen für einige gängige Wirkstoffgruppen wie nichtsteroidale Antirheumatika, Glucocorticoide, ACE-Hemmer und PPAR-Agonisten nachgewiesen, daß sie unter anderem eine Hemmung im NF $\kappa$ B-Signalweg bewirken. Die pleiotropen Effekte der Statine könnten durch die in vitro gezeigte Hochregulation von I $\kappa$ B $\alpha$  und folgende NF $\kappa$ B-Hemmung zustande kommen: unter Statinbehandlung wurden weniger Cytokine, Adhäsionsmoleküle und Leukozyten in der Läsion nachgewiesen, ebenso weniger MMPs.

Die Immunsuppressiva Cyclosporin A und Tacrolimus hemmen beide NF $\kappa$ B; Tacrolimus ist ein I $\kappa$ B $\alpha$ -Superrepressor und verhindert die Translokation von c-Rel, während Cyclosporin A ebenso wie Bortezomib das Proteasom inhibiert und so den Abbau von I $\kappa$ B verhindert. Die Wirkstoffe Enbrel und Remicade fangen den NF $\kappa$ B-Aktivator TNF $\alpha$  ab. Enbrel ist ein löslicher TNF $\alpha$ -Rezeptor, Remicade ein TNF-Antikörper. Kineret, ein IL-1R $\alpha$ , hemmt die NF $\kappa$ B-Aktivierung durch IL-1.

### 1.4.2 AP-1

AP-1 ist ein dimerer Transkriptionsfaktor, der an der Genregulation bei Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Zellen beteiligt ist. Er wird in allen Säugetierzellen exprimiert und kann sich aus Proteinen der Jun-, Fos-, Maf- und ATF(activating transcription factor)-Familien zusammensetzen. Diese Untereinheiten sind bZIP (basic leucine zipper)-Proteine und binden an die gleiche DNA-Sequenz, die AP-1-Bindungsstelle oder TRE (TPA response element; TPA ist ein Tumor-auslösender Phorbolster) bezeichnet wird. Besonders häufig ist das Heterodimer aus c-jun und c-fos. c-jun wird ebenso wie die anderen AP-1-Untereinheiten nur in geringer Menge konstitutiv exprimiert; die für diese Untereinheiten codierenden Gene zählen zu den 'immediate

early genes', die bei Stimulation der Zelle sehr rasch abgelesen werden. Cytokine, Wachstumsfaktoren oder UV-Bestrahlung aktivieren über MAPK-Kinasekaskaden JNK, die c-jun an den N-terminal gelegenen Aminosäuren Serin 63 und Serin 73 phosphoryliert. Die Phosphorylierung hat eine dreifache Wirkung:

Das Gen für c-jun selbst wird induziert, da es über eine AP-1-Bindungsstelle im Promotor verfügt, an die konstitutiv ein Heterodimer aus c-jun und ATF2 gebunden ist. Beide Untereinheiten werden von JNK phosphoryliert und bewirken so eine vermehrte Expression des Proteins.

Zudem wird phosphoryliertes c-jun weniger gut ubiquitinyliert, wodurch sein Abbau verringert wird. Drittens bewirkt die Phosphorylierung an den beiden in der Transaktivierungsdomäne liegenden Serinen eine Vervielfachung der Transkriptionsaktivität. MAPK-Aktivatoren können also via JNK bewirken, daß mehr c-jun länger aktiver ist. [KARIN et al. 1997] [KARIN 1995] AP-1 kann die Gene von IL-8 [HIPP et al. 2002], VCAM-1 [LIN et al. 1996] [AHMAD et al. 1998], TGF- $\beta$  [WEIGERT et al. 2000] und MMPs [HALL et al. 2003] aktivieren.

.

## 1.5 Fragestellung

Prinzipielle Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, den Einfluss enzymatisch modifizierten LDLs auf ausgesuchte Funktionen unterschiedlicher, für die Atherogenese relevanter Zelltypen zu untersuchen. Diese Untersuchungen wurden vor dem Hintergrund vorgenommen, daß einerseits der inflammatorische Charakter der Atherogenese in der Fachwelt zunehmend thematisiert wird, andererseits bislang praktisch keine Arbeiten publiziert wurden, die eine Abgrenzung atherosklerosetypischer Entzündungsprozesse von denen klassischer Entzündungsformen anstreben.

Es ist anzunehmen, daß nach Insudation in den Subendothelialraum und enzymatischer Modifikation des LDLs die Produkte dieses Prozesses direkt auf das Endothel einwirken. In Fortsetzung früherer Arbeiten sollte daher der Einfluß des E-LDLs auf den Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B, der ein wichtiger Regulator entzündlicher Prozesse ist, untersucht werden.

Mit IL-8 wird ein Lockstoff für weiße Blutzellen in der Läsion produziert. Es konnte bereits gezeigt werden, daß mit E-LDL behandelte Endothelzellen IL-8 ausschütten und eine Erklärung für die selektive Genregulation, die hierzu führt, wurde im ersten Teil der vorliegenden Arbeit angestrebt.

Während die aus Monozyten gereiften Makrophagen das Zellbild der Läsion prägen, sind Granulozyten, obwohl sie unter den zirkulierenden weißen Blutzellen am zahlreichsten sind, in der frühen Läsion kaum nachweisbar. Daher sollte in einer weiteren Serie von Experimenten die Wirkung des E-LDLs auf diese Zellen untersucht und insbesondere die Möglichkeit geprüft werden, ob E-LDL eine zelltypspezifisch unterschiedliche Toxizität entfaltet.

Kruth et al. wiesen auf extrazelluläre Ansammlungen freien Cholesterols in der Läsion hin, für deren Vorhandensein die Mainzer Hypothese eine einleuchtende Erklärung liefert: sie sind das Ergebnis der Deesterifizierung akkumulierten LDLs. Das toxische Potential freien Cholesterols wurde in der Literatur bereits hervorgehoben [FENG et al. 2003] [TABAS 2002]. Die Cholesterolaufnahme und Schaumzellbildung nach Behandlung mit E-LDL sollte für die untersuchten Zelltypen ermittelt werden.

# 2 Material und Methoden

## 2.1 Material

### 2.1.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
7-AAD	Beckman Coulter
Acrylamid (Rotiphorese-Gel)	Roth
Annexin-PE	BD Biosciences
Ammoniumperoxodisulfat	Roth
Arachidonsäure	Calbiochem
Bromphenolblau	Merck
BSA (Albumin Fraktion V)	Roth
Coomassie Blue R-250 (Serva Blue R)	Sigma
Cholesterolesterase (aus <i>Candida cylindracea</i> )	Roche
Cholesterolesterase (aus <i>Candida cylindracea</i> )	Seikagaku
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth
DPI (Diphenyliodonium)	Sigma
Ethanol 99,8 %	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz (EDTA)	Merck
Formaldehyd	Roth
Fotochemikalien (Entwickler und Fixierer)	Kodak
Fura 2	Molecular Probes
Glycerin wasserfrei	Roth
Hoechst 33258	Sigma
Humanalbumin, fettsäurefrei	Sigma
Isopropanol	Roth
Kaliumbromid	Roth

Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Kupfersulfat	Merck
Linolsäure	Sigma
Luminol	Sigma
Methanol	Roth
2-Mercaptoethanol	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumdodecylsulfat ultra pure (SDS)	Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Roth
Natriumphosphat	Roth
MagicMark	Invitrogen
Magermilchpulver	Roth
Ölsäure	Sigma
Oil Red O	Sigma
Paraformaldehyd	Merck
Ponceau S	Sigma
Schwefelsäure, rauchend	Merck
Sucrose	Roth
Salzsäure 37 %	Roth
Stearinsäure	Sigma
N,N,N',N'Tetramethyldiamin (TEMED)	Roth
TMB	Sigma
Trishydroxyaminomethan (Tris) Ultra Qualität	Roth
Triton X-100	Roth
Trypsin	Sigma
Trypsininhibitor	Sigma
Tween 20	Roth
Wasserstoffperoxid	Roth

Tabelle 2.1: Verwendete Chemikalien

## 2.1.2 Puffer und Lösungen

Puffer	Bestandteil	Menge und Herstellung
Blotpuffer	Tris 48mM Glycin 39mM SDS 0,0375% Methanol 20%	11,6g 5,8g 3,75ml 20% SDS 200ml 99% MeOH mit dH <sub>2</sub> O auf 1L auffüllen
Coomassie-Lösung	Isopropanol Essigsäure (100%) Coomassie Blue R-250	227ml 46ml 1,25g lösen und mit dH <sub>2</sub> O auf 500ml auffüllen
Dialysepuffer für LDL	NaCl 150mM Tris 5mM EDTA x 2 H <sub>2</sub> O 0,23mM	44g 3g 0,465g Auf 5l auffüllen mit dH <sub>2</sub> O, pH mit konzentrierter HCl auf 7,3-7,4 einstellen
Entfärber für Coomassie-gefärbte Gele	Essigsäure (100%) Isopropanol H <sub>2</sub> O	75ml 50ml 875ml
HBSS-Puffer 10x	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O NaCl Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O D-Glucose	0,6g 1g 1g 80g 0,9g 10g in 900ml H <sub>2</sub> O auflösen, nacheinander 1,4g CaCl <sub>2</sub> und 4g KCl zugeben, vollständig lösen. pH 6,0 einstellen. Sterilfiltrieren, bei 4°C aufbewahren.

KBr leicht	KBr 5% EDTA pH 7,0	9g auf 1L in dH <sub>2</sub> O lösen, 20ml verwerfen 20ml zugeben, autoklavieren
KBr Dichte 1,019	KBr 5% EDTA pH 7,0	2g auf 90ml dH <sub>2</sub> O, lösen 10ml zugeben, autoklavieren
Lysepuffer	NH <sub>4</sub> Cl KHCO <sub>3</sub> EDTA	2,07g 0,25g 250µl 0,1M EDTA pH 7,4 in ca. 200ml dH <sub>2</sub> O lösen, pH 7,27 einstellen auf 250ml mit dH <sub>2</sub> O auffüllen, sterilfiltrieren, Lagerung bei 4°C
PBS 10x	NaCl KCl Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	80g 2g 14,4g 2,4g H <sub>2</sub> O ad 1L auffüllen und pH7,4 mit NaOH einstellen
Percoll-HBSS	Percoll 10x HBSS	30ml 5ml mischen, pH auf 7,2 einstellen, sterilfiltrieren (0,45 Mikrometer). Lagerung dunkel bei 4°C
Ponceau S-Lösung	Ponceau S Trichloressigsäure	0,5g 5ml Säure mit 95ml H <sub>2</sub> O mischen, Ponceau S darin lösen
Probenpuffer 2x für WB	Upper Tris Glycerin 86% 2-Mercaptoethanol SDS 10% Bromphenolblau H <sub>2</sub> O	13,0ml 11,6ml 5,0ml 20ml 1 Spatelspitze ad 100,0ml

SDS-Laufpuffer für WB, 10x	Tris Glycin SDS	30g 144g 10g H <sub>2</sub> O ad 2L
Stripping-Puffer für 1 Membran	TBS 1x SDS 10% <i>β</i> -Mercaptoethanol	40ml 20ml 370μl
TBS 10x	Tris NaCl	60,5g 87,6g mit dH <sub>2</sub> O auf 1L auffüllen, pH 7,5 einstellen
TBST 1x	TBS 10x Tween-20 mit dH <sub>2</sub> O auf 1L auffüllen	100ml 1ml
4x Tris-Puffer pH 6,8 für WB-Sammelgel ('Upper Tris')	Tris  SDS	6,05g  0,4g H <sub>2</sub> O ad 100ml, pH 6,8 mit HCl ein- stellen
4x Tris-Puffer pH 8,8 für WB-Trenngel ('Lower Tris')	Tris  SDS	18,17g  0,4g H <sub>2</sub> O ad 100ml, pH 8,8 mit HCl ein- stellen

Tabelle 2.2: Verwendete Puffer und Lösungen

Antikörper	Spezies	Hersteller	Anwendung
anti-p65, Klon sc372	Kaninchen	Santa Cruz	IF
anti-I $\kappa$ B $\alpha$	Kaninchen	Cell Signaling	WB
anti-mouse, HRP-gekoppelt	Ziege	Santa Cruz	WB
anti-phospho-I $\kappa$ B $\alpha$ , Klon 5A5	Maus	Cell Signaling	WB
anti-rabbit, HRP-gekoppelt	Ziege	Cell Signaling	WB
anti-rabbit AlexaFluor 594 - gekoppelt	Ziege	Molecular Probes	IF
anti-c-jun	Kaninchen	Santa Cruz	WB
anti-phospho-c-jun	Maus	Santa Cruz	WB
anti-CD66b, FITC-gekoppelt	Maus	BD Pharmingen	FACS

Tabelle 2.3: Verwendete Antikörper

### 2.1.3 Antikörper

## 2.1.4 Kits

Kit	Hersteller
ATP Bioluminescence	Roche
BM chemiluminescence Blotting Substrate POD	Roche
Caspase-3/7 Glo	Promega
CytotoxOne	Promega
CHOL	Roche
IL-8 OptEIA Human IL-8 ELISA Kit II	BD
Pierce BCA Protein Assay Kit	ThermoScientific

Tabelle 2.4: Verwendete Kits

## 2.1.5 Laborbedarfsartikel

Artikel	Größe	Artikelnr.	Hersteller
Eppendorf-Reaktionsgefäße	1,5ml	212130	Eppendorf
Dialyseschlauch ZelluTrans	MW Cut-off 4000-6000Da		Roth
Flotationsröhrchen	13x51mm	5022	Konrad Beranek Laborgeräte
Heparinröhrchen			
Küvetten (Halbmikro)	2ml	297872710	MBT
Minisart Spritzenfilter steril	0,8 Mikrometer	16592	Sartorius
Multitips	12,5ml, 5ml,2,5ml	147870347	MBT
Nitrocellulosemembran	300mmx3m, Porengröße 0,45 Mikrometer	10401196	Schleicher und Schuell
PD-10 desalting column	Probenvolumen 2,5ml	170851-01	Amersham Bios- ciences
pH-Teststreifen			Roth
Probenröhrchen mit Schraubdeckel	1,5ml	710005	Biozym
PP-Falconröhrchen	15ml	188271	Greiner Bio-One

PP-Falconröhrchen	50ml	227261	Greiner Bio-One
QuickSep Dialysekapsel	500 $\mu$ l		Roth
Rotilabo Spritzenfilter steril	0,22 Mikrometer, 0,45 Mikrometer	P664.1, P665.1	Roth
Sorvall-Zentrifugenröhrchen			
Spritzen steril Luer injekt	5ml, 10ml, 25ml	4606108V	B.Braun
Ultrazentrifugenröhrchen Re-Seal	25x89mm	9052	Konrad Beranek Laborgeräte
Whatman-Filterpapier	190mmx100m	3030690	Whatman Inter- national Ltd.
Zellschaber steril	24cm	99002	TPP
Röntgenfilme Fuji Fotofilm Super RX			Fujifilm

Tabelle 2.5: Laborbedarfsartikel

## 2.1.6 Laborgeräte

## 2.1.7 Materialien und Medien für die Zellkultur

Alle Zellen wurden im Brutschrank bei einer Temperatur von 37 °C und einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5 % unter sterilen Bedingungen kultiviert.

- FCS wurde vor Verwendung für die Zellkultur hitzeinaktiviert, indem es für 30 Minuten bei 56°C im Wasserbad erhitzt wurde.
- Medium für MDM  
MEM-alpha mit 10 % hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum, 100U/ml Penicillin, 100 Mikrogramm/ml Streptomycin, 1ng/ml Interferon  $\gamma$  und 2,5ng/ml GM-CSF.
- Medium für Endothelzellen  
DMEM-F12 GlutaMax-Medium mit 10 % hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum, 100U/ml Penicillin, 100 Mikrogramm/ml Streptomycin und 1 % HEPES-Puffer

Medium für CRL-2018-Zellen 370ml ddH<sub>2</sub>O 50ml Dulbeccos MEM 50ml hitzeinaktiviertes FKS 20ml 7,5 % NaHCO<sub>3</sub> 5ml Penicillin / Streptomycin U/ml 10ml L-Glutamin (200 mM)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Präparation von LDL

Die Isolierung von LDL erfolgte aus humanem, nicht lipämischem Blutplasma, das von der Blutbank zur Verfügung gestellt wurde. Von den 18 bis 65 Jahre alten Spendern war kein Bluthochdruck, keine koronare Herzkrankheit oder Diabetes mellitus bekannt und sie nahmen keinerlei Medikamente ein. Bei der Präparation wurde soweit möglich aseptisch gearbeitet. Grundprinzip der Isolation ist die Auftrennung über einen KBr-Dichtegradienten wie von Havel et al. beschrieben [HAVEL et al. 1955].

Um zunächst das VLDL abzutrennen, wurde das Plasma in 40ml-Ultrazentrifugenröhrchen gefüllt, diese zugeschweißt und bei 10°C und 45000upm für 24h zentrifugiert. Dabei sammelten sich die schwereren Lipoproteine wie LDL und HDL am Boden des Röhrchens als orange-braune,

Gerät	Hersteller
Analysenwaage	Sartorius
Brutschrank für Zellkulturen	Heraeus Instruments
DM-IRB Fluoreszenzmikroskop mit Kamera zur time lapse-Mikroskopie	Leica
Elektrophorese-Power Supply	Consort 400V-400mA AE844
Elektrophoresekammer für Western Blots	Kreutz Labortechnik
ELISA-Reader Titertek Multiskan MCC	Titertek
EPICS®-PROFILE II Durchflusszytometer	Beckman-Coulter
Fluoreszenzmikroskop	Zeiss
Filmkassette	Kodak Cassette BioMax
Gefrierschrank -20°C	Liebherr
Gefrierschrank -70°C	Heraeus
Glasgeräte, -flaschen	Schott
Horizontalschüttler KS 10	Edmund Bühler
Kühlschrank	Liebherr
Lumat LB 9507	Berthold Technologies
Magnetrührer IKAMAG	Jankel und Kunkel, Staufen
Mikro-Lumat LB 96P	Berthold
Mikroskop	Zeiss Axiovert 200M
Mikroskop mit Farbkamera	Zeiss
pH-Meter pH320	WTW
Pipettierhilfe 'Pipetus'	Hirschman Laborgeräte
Pipetten 10 - 1000µl	Eppendorf
Schüttelwasserbad	Haake SWB25
Sorvall-Zentrifuge	Sorvall
Sorvall-Zentrifugenrotor	Sorvall
Standzentrifuge GPKR	Beckman
Sterilwerkbank	Cryo-Technik
Thermomixer	Eppendorf
Ultrazentrifuge	Beckman Coulter
Ultrazentrifugenrotor VTi50	Beckman
Ultrazentrifugenrotor SW55	Beckman
UV/Visible Spectrometer Ultrospec 2000	Pharmacia Biotech
Vortex	Heidolph
Waage	Mettler

Tabelle 2.6: Laborgeräte

Artikel	Hersteller
Gewebekulturflaschen T75	Greiner Bio-One GmbH
Gewebekulturflaschen klein	Greiner Bio-One GmbH
Nunclon Zellkulturplatten steril 6-well, 12-well, 24-well, 96-well	Nunc
Zellkulturplatten 96-well U-Form	Greiner Bio-One GmbH
Deckgläschen rund	Roth
Menzel-Objektträger	ThermoScientific

Tabelle 2.7: Medien und Lösungen für die Zellkultur

Artikel	Hersteller
Bicoll (Ficoll), Dichte 1,077	Biochrom KG
D-MEM:F-12 (1:1) + GlutaMAX	Gibco
RPMI	Gibco
MEM alpha	Gibco
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco
HEPES 1M	Gibco
Interferon $\gamma$ (rekombinant)	BioSource
Penicillin 10000U/ml, Streptomycin 10000 $\mu$ g/ml	Gibco
Percoll, Dichte 1,131	Amersham Biosciences
Polymorphprep	AxisShield
Trypsin/EDTA 10x	Gibco

Tabelle 2.8: Medien für die Zellkultur

zähflüssige Schicht, während das weißlich-trübe VLDL ganz oben aufschwamm.

Das VLDL wurde mit einer dicken Kanüle entnommen, die Röhren wurden unten angestochen und die heraustropfende Lipoprotein-Bodenschicht wurde aufgefangen. Das Volumen V der Bodenschicht wurde gemessen, die klare Mittelfraktion der Röhren verworfen. Um die Dichte D der Lipoproteinfraktion zu bestimmen, wurde ein Eppendorfgefäß auf der Analysenwaage austariert, ein Milliliter der Fraktion hineinpipettiert und gewogen.

Im nächsten Zentrifugationsschritt wurde LDL von HDL abgetrennt. Dazu wurde die Lipidfraktion mit KBr auf die Dichte 1,19 gebracht und unter leichter KBr-Lösung unterschichtet. Die Ultrazentrifugation erfolgte wiederum für einen Tag unter den oben angegebenen Bedingungen. Das LDL setzte sich als orange-gelbe Schicht oben ab und wurde mit einer Kanüle entnommen, HDL blieb als bräunliche Schicht am Boden.

## 2.2.2 Messung des Cholesterolgehaltes von Lipoproteinen

10  $\mu$ l des Lipoproteins (z.B. LDL) wurden in einer Halbmikro-Einmalküvette zu einem Milliliter CHOL-Reagenz gegeben und gut gemischt. Bei Raumtemperatur wurde das Gemisch für 15 Minuten inkubiert, danach wurde die Absorption bei 546nm im Photometer gemessen und daraus nach Firmenprotokoll der Cholesterolgehalt [mg/ml] berechnet.

Zunächst werden Cholesterolester in der Probe durch die im CHOL-Reagenz enthaltene Cholesterolesterase gespalten. Weiterhin enthält CHOL Cholesteroxidase, die das freie Cholesterol zu Cholest-4-en-3-on und Wasserstoffperoxid oxidiert. Dieses reagiert, katalysiert durch Peroxidase, mit 4-Aminophenazon und Phenol (ebenfalls aus dem CHOL-Reagenz) zu dem roten Farbstoff 4-(p-benzochinon-monoimino)-phenazon.

## 2.2.3 Präparation der modifizierten Lipoproteine: E-LDL, oxLDL, E-LDL d4 und d10

### Enzymatische Spaltung von LDL zu E-LDL

Beim Enzymverdau von LDL wurde zuerst das Apolipoprotein B durch eine Protease gespalten. 1ml LDL wurde in einem Eppendorfgefäß mit 1,7 Mikrogramm Trypsin je mg Cholesterol bei 37 °C einen Tag lang geschüttelt.

Die nun zugänglichen Cholesterolester im Inneren des LDL-Partikels wurden dann mittels Cholesterolesterase zu freiem Cholesterol und freien Fettsäuren gespalten. Um den Abbau der Cho-

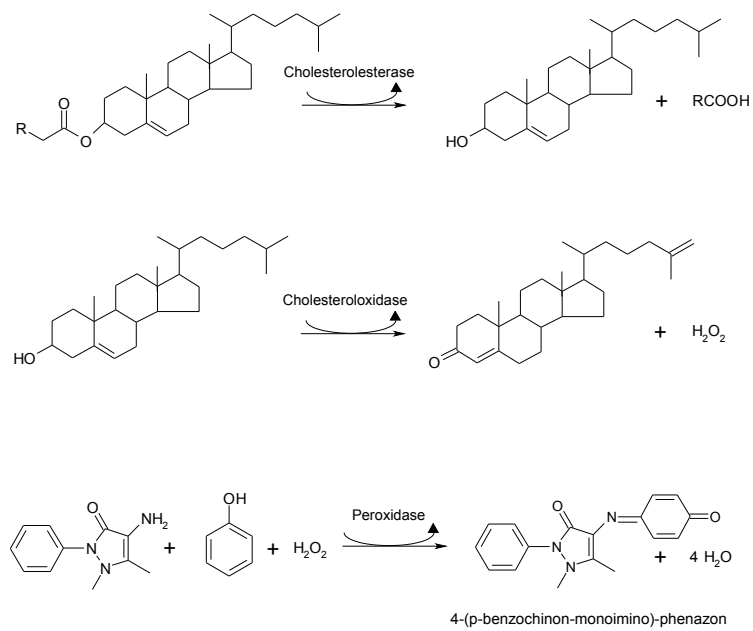


Abbildung 2.1: Reaktionsschema des Cholesterol-Nachweises mittels CHOL-Reagenz

lesterolesterase sowie unerwünschte proteolytische Aktivität des fertigen E-LDL zu vermeiden, wurde Trypsininhibitor im Überschuß zugegeben ( $2,5\mu\text{g}$  je mg Cholesterol). Dann wurde  $40\mu\text{g/ml}$  Cholesterolesterase aus *Candida cylindracea* (Roche) zugegeben und wieder bei  $37^\circ\text{C}$  24-48h bis zur deutlichen Trübung geschüttelt. Da die Cholesterolesterase der Firma Roche ab 2007 nicht mehr lieferbar war, wurde auf die Cholesterolesterase der Firma Seikagaku umgestellt, die ebenfalls aus *Candida cylindracea* gewonnen wurde. 50u (entsprechend mind. 2,5mg Protein) wurden dabei steril in  $500\mu\text{l}$  destilliertem Wasser aufgenommen und bei  $4^\circ\text{C}$  aufbewahrt.  $10\mu\text{l}$  dieser Lösung wurden pro Milliliter zu spaltendes LDL eingesetzt. Das fertige E-LDL wurde einer Cholesterolbestimmung und einer Sterilitätsprüfung unterzogen wie LDL (s. dort).

### Flotieren von E-LDL zu E-LDL d4 und d10

Albumin bindet freie Fettsäuren und kann sie auch dem E-LDL entziehen. E-LDL wurde mit serumfreiem Humanalbumin in einer Konzentration von 4 % (für d4) oder 10 % (d10) gemischt, bis das Albumin vollständig gelöst war, dann für eine Stunde bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Überschüssiges Albumin wurde durch Zentrifugation durch einen Sucrose-Dichtegradienten abgetrennt. Dazu wurden  $0,8\text{g/ml}$  Sucrose in dem Lipoprotein-Albumin-Gemisch gelöst. Je 1ml dieser nahezu gesättigten Sucroselösung wurde in einem 5ml-Ultrazentrifugenröhrchen mit 2,5ml einer 25%igen sterilen Sucrose/VBS-Lösung und 0,5ml einer 4%igen sterilen Sucrose/VBS-Lösung überschichtet. Im Swingout-Rotor (SW55Ti) wurde bei  $20^\circ\text{C}$  und 35000upm für 3,5h zentrifugiert. Das fettsäuredepletierte Lipoprotein durchwanderte den Sucrosegradienten und sammelte sich als gelblich-trübe feste Schicht an der Oberfläche. Mit Hilfe einer 1ml-Eppendorfpipette mit blauer Spitze wurde das E-LDL d4 bzw. d10 vorsichtig abgenommen, resuspendiert und bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert.

### Oxidation von LDL zu oxLDL

Zugabe von Kupferionen katalysiert die Oxidation des Lipoproteins. Zunächst wurde das aus dem Dialysepuffer stammende EDTA in LDL entfernt, da es mit Kupferionen einen stabilen Komplex eingeht. Dazu wurde 1ml LDL über eine mit PBS equilibrierte PD10-Säule gegeben und mit PBS in Fraktionen eluiert. Die Fraktionen mit dem höchsten Gehalt an LDL (abgeschätzt anhand der Gelbfärbung) wurden zu etwa 1ml vereinigt. 25 mikromolar Kupfersulfat (Stammlösung 1M in Wasser, Verdünnungen werden frisch hergestellt) wird zugegeben und für einen Tag bei  $37^\circ\text{C}$  geschüttelt. Die nun weißlich-trübe Probe wird wiederum über eine PD10-

Säule gereinigt, um die Kupferionen zu entfernen. Die trübe Fraktion wird möglichst konzentriert aufgefangen und bei 4°C gelagert.

### 2.2.4 Verdünnen der Fettsäuren

Die verwendeten Fettsäuren Arachidonsäure, Linolsäure, Ölsäure und Stearinsäure sind in reiner Form lipophil und schlecht oder gar nicht wasserlöslich. Um sie für die Versuche verwenden zu können, wurden sie vor jedem Experiment frisch in ihr Natriumsalz überführt. Durch das Säure-Salz-Gleichgewicht ist sichergestellt, daß die Fettsäuren in gleicher Weise auf Zellen wirken können wie im Körper. Während Fettsäuren im Blut an das Serumalbumin gebunden vorliegen, sind in der atherosklerotischen Läsion bei der enzymatischen Umwandlung von LDL entstehenden Fettsäuren zunächst frei, da die Läsion in den meisten Fällen durch das Endothel vom Blutstrom abgetrennt ist. Albumin dringt nicht in großen Mengen in das Gewebe ein.

Zur Umwandlung in das Natriumsalz wie beschrieben [BADWEY et al. 1981] wurden Ethanol-Stammlösungen der Fettsäuren hergestellt (100mg/ml oder 10mg/ml), die bei -20°C aufbewahrt wurden. Diese wurden 1:1 mit Wasser verdünnt, wobei eine Trübung durch die ausfallende Säure auftrat. Mit NaOH (1M bzw. 0,1M) wurde neutralisiert, mit Wasser zur Endverdünnung 1:4 aufgefüllt und der pH wurde mit einem Teststreifen kontrolliert. Klare Lösungen mit einem pH zwischen 6,5 und 7,5 wurden verwendet. Als Lösungsmittelkontrolle wurden Wasser und Ethanol entsprechend gemischt und der pH ebenfalls mit NaOH eingestellt (bezeichnet als 'Lösungsmittelkontrolle').

### 2.2.5 Zellkultur

Alle Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und wasserdampfgesättigter Atmosphäre unter sterilen Bedingungen kultiviert. Arbeiten an Zellkulturen fanden an einer sterilen Werkbank (Laminar Air Flow) unter Verwendung steriler Medien und Lösungen und sterilisierter Pipetten statt, um Kontamination mit Pilzen oder Bakterien zu vermeiden. Vor Arbeitsbeginn erfolgte eine gründliche Händedesinfektion, sofern nicht mit Handschuhen gearbeitet wurde; nach dem Öffnen und vor dem Schließen wurden die verwendeten Gefäße (Mediumflaschen, Zellkulturflaschen) über einem Gasbrenner abgeflammt, um eine Kontamination durch am Rand anhaftende Keime zu verhindern.

### **Kultur der Eahy.926-Zellen**

Eahy.926 ist eine adhärenente Endothelzelllinie. Die Kultur erfolgte in Endothelzellmedium in 250ml-Zellkulturflaschen, die liegend aufbewahrt wurden, so daß die Eahy.926-Zellen eine einzellige Schicht am Boden bildeten. Die Zellen wurden bei 90-100 % Konfluenz durch Trypsinieren passagiert. Dazu wurde das Medium entfernt, die Flaschen mit 5ml PBS gespült und 1ml 1x-Trypsin-EDTA-Lösung zugegeben. Dabei verdaut die Serinprotease Trypsin Proteine, die für die Verankerung der Zellen an der Plastikoberfläche sowie aneinander sorgen. Die Zellkulturflaschen wurden für wenige Minuten in den Brutschrank gestellt, bis die Zellen bei Rütteln der Flasche frei schwammen. Dann wurden die Zellen vorsichtig mit 5ml serumhaltigem Zellkulturmedium ab gespült und 1:4 geteilt oder aber gezählt und für Experimente ausgesät. Für alle Experimente mit Eahy.926-Zellen wurden die Zellen ausgesät und über Nacht im Brutschrank kultiviert. Bei Beginn der Experimente waren sie 80-90 % konfluent.

### **Einfrieren von Zellen in flüssigem Stickstoff zur Dauerkultur**

Die trypsinierten Zellen einer konfluenten Zellflasche wurden zu je 1,5ml pro Röhrchen in Cryo-Röhrchen gegeben, 150  $\mu$ l steriles DMSO wurden zum Schutz der Zellen zugesetzt. Die Zellen wurden durch langsame Temperaturreduktion eingefroren, indem sie zuerst auf Eis, dann über Nacht bei -20°C, nochmals über Nacht bei -70°C gehalten und schließlich in den flüssigen Stickstoff eingelagert wurden.

### **Auftauen von in flüssigem Stickstoff eingelagerten Zellen**

Das Auftauen der Zellen erfolgte möglichst schnell im Wasserbad bei 37 °C. Das Cryo-Röhrchen wurde mit 70%igem Alkohol ab gespült, trocken gelassen und die Zellen wurden vorsichtig mit einer sterilen Pipette resuspendiert. Um das restliche DMSO zu entfernen, wurden die Zellen in 5ml vorgewärmtes Medium gegeben und für 5 Minuten bei 800upm und Raumtemperatur zentrifugiert, das Medium wurde entfernt und die Zellen in frischem Medium resuspendiert und in eine vorbereitete Zellkulturflasche gegeben. Nach einem Tag wurde das Medium gewechselt, um aufschwimmende tote Zellen zu entfernen. Die lebenden Zellen waren bereits adhärenent und konnten nach etwa 3 Tagen passagiert werden.

## Kultur der CRL-2018-Zellen

CRL-2018 sind glatte Muskelzellen aus der Aorta der Ratte. Die Zellen wurden in CRL-2018-Medium kultiviert und behandelt wie für Eahy.926-Zellen beschrieben.

## 2.2.6 Isolierung von Zellen aus Frischblut

### Gewinnung von Frischblut

Die Isolierung erfolgte unter sterilen Bedingungen. Es wurde Plastik-Einmalmaterial verwendet (Röhrchen, Pipetten) und als Schutz vor Infektionen durch Blutprodukte wurden Einmalhandschuhe getragen. Frischblut wurde mittels Butterfly und Heparinröhrchen aus der Armvene gesunder freiwilliger Spender entnommen. Das Blut wurde kurz geschwenkt, um es möglichst gut mit den heparinbeschichteten Kügelchen des Röhrchens in Kontakt zu bringen, so daß die Blutgerinnung gehemmt wurde.

### Isolierung von PMN

PMN wurden in einer Dichtegradienten-Zentrifugation unter Verwendung von Polymorphprep nach Herstellerprotokoll isoliert. Dazu wurde in einem 15ml-greiner-Röhrchen Polymorphprep-Lösung zu gleichen Teilen mit heparinisiertem Blut überschichtet und bei 1500upm und 20°C ungebremst für 30 Minuten zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation wurde die oberste trübe Zellschicht, die Monozyten und Lymphozyten enthält, verworfen. Die zweite Zellschicht, die vorwiegend aus Granulozyten besteht, wurde in ein frisches 50ml-Röhrchen pipettiert und der rote Unterstand aus Erythrozyten wurde verworfen. Da die Polymorphprep [TM]-Lösung auf osmotisch aktivem Ficoll basiert und hyperosmotisch ist, wurde zu der PMN-Suspension ein gleiches Volumen 0,45%ige Kochsalzlösung gegeben, die die osmotische Wirkung ausgleicht. Dann wurde zum Waschen der Zellen das Röhrchen mit PBS aufgefüllt und für 10 Minuten bei 20°C und 1000upm mit schwacher Bremse zentrifugiert. Die PMN sammelten sich am Boden als Zellpellet, das durch verbliebene Erythrozyten rot gefärbt war. Diese wurden mit 10ml Lysepuffer auf Eis für 10 Minuten lysiert, dann wurde PBS zugegeben und die verbliebenen PMN wurden erneut gewaschen.

Die Zellen wurden in DMEM F-12 GlutaMax ohne Zusätze resuspendiert und mit einer Neubauerkammer gezählt. Ihre Reinheit, die durchflusszytometrisch bestimmt wurde, (Transfusi-

onszentrale) lag bei mindestens 93 %. In 96well-Platten wurden  $5 \cdot 10^4$  Zellen je well, in 6well-Platten 1 Million Zellen je well ausgesät.

### Isolierung von Monozyten aus Frischblut

Dazu wurden je 4ml Bicolll in 15ml-greiner-Röhrchen gefüllt und mit je 5ml heparinisiertem Blut überschichtet. Bei 20°C und 3000upm wurde ohne Bremse für 45 Minuten zentrifugiert. Danach waren Monozyten und Lymphozyten als weißlich-trübe Zellschicht im oberen Teil des Röhrchens erkennbar, wurden abgenommen und in einem frischen 50ml-Röhrchen vereinigt. Das Röhrchen wurde mit RPMI-Medium aufgefüllt und für 5 Minuten bei 2200upm und 20°C zentrifugiert. Die Zellen sammelten sich als Pellet am Boden, wurden vorsichtig in RPMI resuspendiert und erneut zentrifugiert (1000upm, 20°C, 10 Minuten).

Resuspension, Zählen und Aussäen der Zellen ebenso wie die Reifung zu MDM erfolgte wie bei Monozyten aus Buffy-coats (s.dort).

### 2.2.7 Isolierung von Monozyten aus Buffy-coats und Reifung zu Makrophagen

Buffy coats wurden von gesunden Spendern zwischen 18 und 65 Jahren ohne bekannte Herz-Kreislauf-Erkrankungen, Diabetes oder Medikamenteneinnahme gewonnen und freundlicherweise von der Blutbank Mainz zur Verfügung gestellt. Die verwendeten Buffy coats waren nicht lipämisch und wurden bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

Monozyten wurden über eine Dichtegradientenzentrifugation präpariert. Die Buffy coats wurden 4 : 1 mit PBS verdünnt und in 50ml-Röhrchen über 12,5ml Ficoll vorsichtig überschichtet, so daß keine Vermischung der Phasen stattfand. Die Röhrchen wurden ganz gefüllt und für 25 Minuten bei 20°C und 1800upm ungebremst zentrifugiert. Die trüb-weiße Zellschicht im oberen Teil des Röhrchens wurde entnommen, gepoolt und mit PBS gewaschen (Zentrifugation bei 20°C und 1000upm für 10 Minuten). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 7,5ml PBS aufgenommen. Je 4ml dieser Zellsuspension wurden in einem Sorvall-Zentrifugenröhrchen mit je 8ml Percoll-HBSS langsam und gründlich gemischt. In der Sorvall-Zentrifuge wurde das Gemisch bei 20°C und 2000upm für 30 Minuten ungebremst zentrifugiert. Die Leukozyten sammelten sich an der Oberfläche der Flüssigkeit; die trübe Zellschicht wurde vorsichtig abgenommen und im 50ml-Röhrchen mit PBS gewaschen wie bereits beschrieben. Das Pellet wurde in 10ml vorgewärmtem MEM alpha-Medium ohne Serum aufgenommen und die Zellen wurden

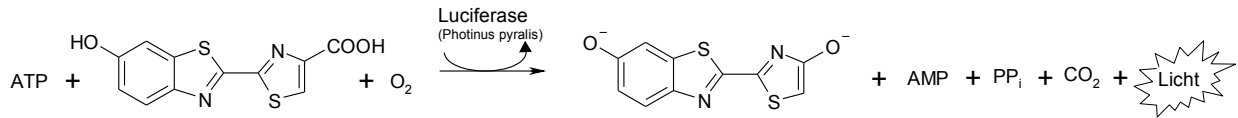


Abbildung 2.2: Reaktionsschema der ATP-Messung durch Chemilumineszenz

in einer Neubauerkammer gezählt. In 96well-Platten wurden 0,25 Millionen Zellen je well, in 6well-Platten 5 Millionen Zellen je well ausgesät.

Da die lebenden Monozyten, nicht aber Lymphozyten, sich unter serumfreien Bedingungen rasch an die Zellkulturplatten anheften, wurden die Platten für mindestens eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Dann wurden die Platten an der sterilen Werkbank über Filterpapier ausgeschlagen, um das Medium mit den aufschwimmenden Lymphozyten zu entfernen. Das Filterpapier wurde hierbei nicht berührt, damit die Platten steril blieben. Die anheftenden Monozyten wurden durch zweimalige Zugabe von PBS und Ausschlagen der Platten gewaschen, dann wurde MDM-Medium zugegeben. Die Zellen wurden für mindestens 4 Tage zu MDM gereift, wobei das Medium alle 3 Tage gewechselt wurde.

## 2.2.8 ATP-Messung

Die ATP-Messung wurde mit dem ATP-Bioluminescence-Kit durchgeführt, in dessen ATP-Substrat D-Luciferin sowie das lichtbildende Enzym des Leuchtkäfers, Luciferase, enthalten ist. Mit dem ATP lysierter Zellen setzt Luciferase D-Luciferin zu Oxyluciferin um und es kommt zur Chemilumineszenz.

Zellen wurden in 96well-Platten in 50  $\mu$ l serumfreiem Medium kultiviert und behandelt. Für die ATP-Messung wurden stets Doppelbestimmungen angesetzt. Zu den Zellen wurden 10  $\mu$ l 10%ige Triton-X 100-Lösung gegeben, mit einer auf 100  $\mu$ l eingestellten Eppendorfpipette 10x gemischt, dann wurden 10  $\mu$ l des Zelllysates zu 150  $\mu$ l Wasser gegeben. 10  $\mu$ l ATP-Substrat aus dem ATP-Bioluminescence-Kit wurden zugefügt, dann gevortext und die Chemilumineszenz im Berthold Lumat LB 9507 im 10s-Integrationsmodus bestimmt.

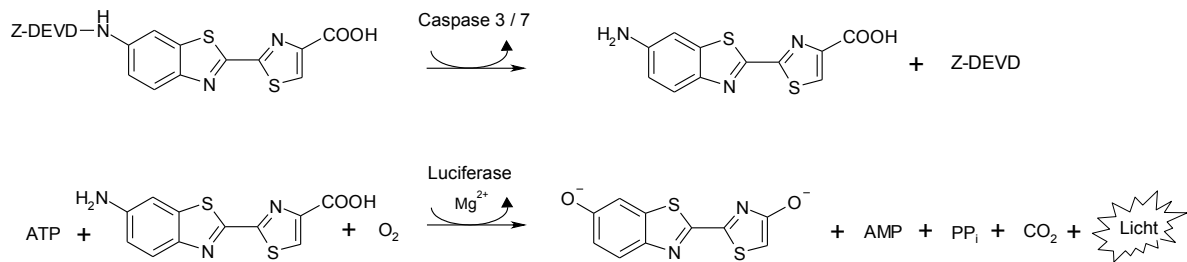


Abbildung 2.3: Reaktionsschema der Caspase 3/7-Messung durch Chemilumineszenz

## 2.2.9 Caspase-Messung

Die Aktivität der beiden für die Apoptoseregulation zentralen Cystein-Aspartat-Proteasen Caspase 3 und 7 kann durch Spaltung eines Peptidsubstrates nachgewiesen werden. Das verwendete Caspase 3/7-Glo-Kit enthält das Substrat Z-DEVD-Aminoluciferin. Z bezeichnet die Benzyloxycarbonylschutzgruppe, die das Tetrapeptid aus Aspartat - Glutamat - Valin - Aspartat (abgekürzt DEVD) abschließt. Das Tetrapeptid ist peptidisch an die Aminogruppe des Aminoluciferin gebunden; die Caspasen spalten diese Bindung. Das freie Aminoluciferin wird mit Sauerstoff und ATP durch die ebenfalls im Substrat des Kits enthaltene Luciferase zu Oxyluciferin umgesetzt, das Licht aussendet.

Zellen wurden in 96well-Platten in serumfreiem Medium kultiviert und behandelt, dabei wurden Doppelbestimmungen angesetzt. Caspase-Substrat wurde zu gleichen Teilen zugegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur lichtgeschützt geschüttelt. 80  $\mu\text{l}$  dieses Zelllysates wurden in 96well-Platten mit schwarzen Wells überführt und die Chemilumineszenz wurde im Berthold-Luminometer im 10s-Integrationsmodus gemessen.

## 2.2.10 LDH-Messung

Zellen wurden in 96well-Platten in 50  $\mu\text{l}$  serumfreiem Medium kultiviert und behandelt. Für die LDH-Messung wurden Vierfachbestimmungen angesetzt, von denen zwei nach Behandlung durch Zugabe von 1  $\mu\text{l}$  Lysispuffer (CytoTox-One-Kit) und kurzes Rütteln der Platte lysiert wurden, um den Gesamtgehalt der Zellen an LDH zu ermitteln. LDH katalysiert die Oxidation von Laktat zu Pyruvat, wobei Reduktionsäquivalente in Form von  $\text{NADH} / \text{H}^+$  frei werden. Als Ge-

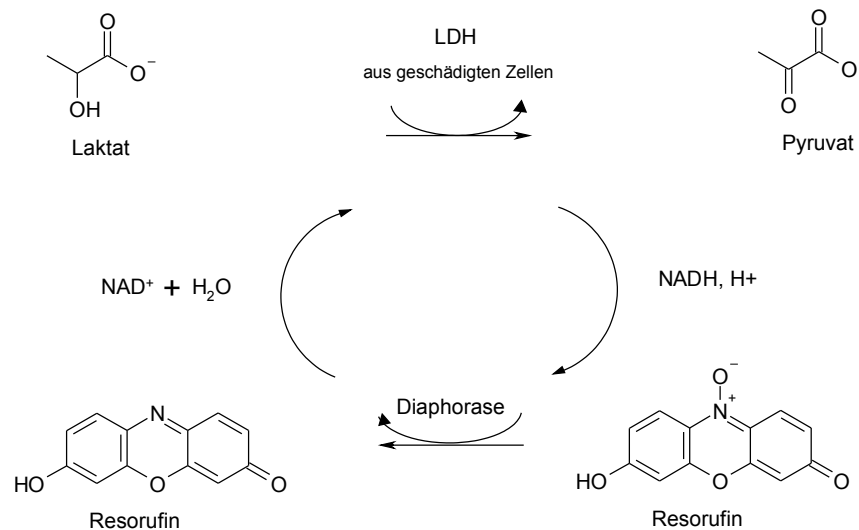


Abbildung 2.4: Reaktionsschema der LDH-Bestimmung über die Reduktion von Resazurin zu Resorufin

genreaktion katalysiert das im LDH-Substrat enthaltene Flavoprotein Diaphorase die Reduktion von Resazurin zum Fluoreszenzfarbstoff Resorufin unter Verbrauch des  $\text{NADH} / \text{H}^+$ . Das LDH-Substrat greift die Zellen nicht an und kann direkt zum Medium gegeben werden, so daß nur das LDH des Zellüberstandes gemessen wird.

Zu allen vier Ansätzen wurde danach je  $50 \mu\text{l}$  CytoTox-One-Substrat pro well zugegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Im Tecan GENIOS-Fluorimeter wurde die Fluoreszenz mit einer Exzitationswellenlänge von 535nm und einer Emissionswellenlänge von 595nm gemessen. Der LDH-Gehalt unbehandelter Zellen wurde als Hintergrund von den übrigen Meßwerten abgezogen, Meßwerte der lysierten Zellen wurden als 100 % gesetzt und der Anteil der Meßwerte nichtlysierten Zellen berechnet.

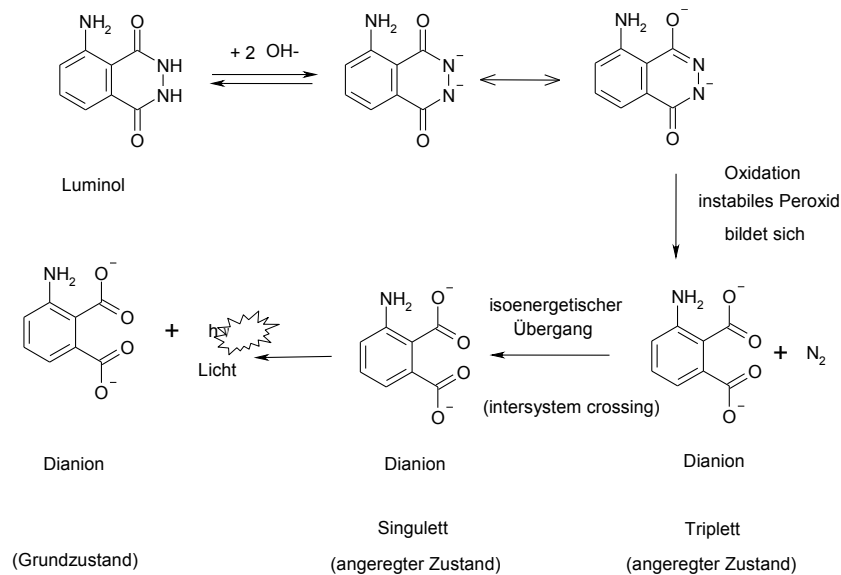


Abbildung 2.5: Reaktionsschema der Oxidation von Luminol durch reaktive Sauerstoffspezies, bei der Licht entsteht

### 2.2.11 Messung des *respiratory burst*

Aktiviert PMN produzieren im sogenannten *respiratory burst* reaktive Sauerstoffradikale, die zur Abtötung von Bakterien oder zu phagozytierenden anderen Zellen (z.B. Krebszellen) dienen. Die Sauerstoffradikale oxidieren Luminol und können durch die dabei entstehende Chemilumineszenz nachgewiesen werden [DAHLGREN und KARLSSON 1999].

Die zu testenden Lipoproteine und Fettsäuren wurden in einer weißen undurchsichtigen 96well-Flachbodenplatte vorgelegt. Die PMN wurden in einer Konzentration von 1 Million Zellen pro Milliliter eingesetzt. Zur Hemmung des *respiratory burst* wurden Kontrollansätze für 30 Minuten bei 37 °C mit 10/ $\mu\text{M}$  DPI behandelt. Allen Ansätzen wurde 125/ $\mu\text{M}$  Luminol zugegeben. Je well wurden 200 $\mu\text{l}$  dieser Zellsuspension zugegeben und sofort im Berthold-MicroLumat 96 gemessen (Meßdauer 1s, Kinetik mit Messung alle 2 Minuten). Zur Auswertung wurden die Höchstwerte herangezogen.

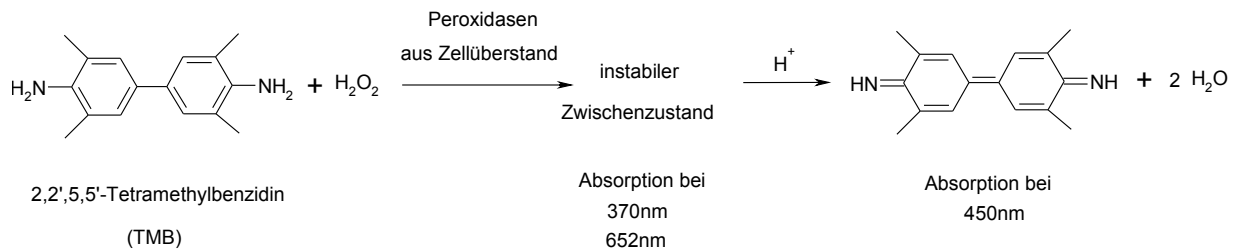


Abbildung 2.6: Reaktionsschema der peroxidasekatalysierten Oxidation von TMB als Nachweis von Peroxidasen aus dem Zellüberstand

### 2.2.12 Messung der Peroxidaseaktivität

Aktivierte PMN degranulieren und schütten in ihren Granula enthaltene Substanzen dabei in den Extrazellularraum aus, um Keime abzutöten. In den Granula ist in hohem Maß Myeloperoxidase enthalten. Peroxidasen katalysieren die Reaktion des Farbsubstrates TMB mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ihre Aktivität kann also mit der Färbung des TMB gemessen werden.

5\*10<sup>4</sup> Zellen wurden behandelt, kurz bei 1000upm anzentrifugiert und der Überstand wurde zur Hälfte abgenommen, um eine Verunreinigung durch eventuell noch aufschwimmende Zellen zu verhindern. Die Überstände wurden mit TMB und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gemischt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2N-Schwefelsäure gestoppt und die Absorption wurde bei 450nm und 540nm photometrisch bestimmt (ELISA-Reader). Dabei wurden die Meßwerte der Korrekturwellenlänge 540nm von den eigentlichen Meßwerten bei 450nm abgezogen. Als Positivkontrolle dienten mit Triton-X 100 lysierte Zellen.

### 2.2.13 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie wird Größe, Granularität und (Antikörper-)Fluoreszenz einzelner Zellen bestimmt, die Zellen werden ausgezählt und nach ihren genannten Merkmalen in Gruppen ausgewertet. Die Zellen werden aus einer Suspension angesaugt und mittels eines größeren Vo-

lumens Trägerflüssigkeit (in der Regel eine einfache Salzlösung) durch eine Kapillare gespült, die von Laserstrahlen abgetastet wird. Wenn die Zellen die Kapillare einzeln passieren, wird der Strahl unterbrochen und gegebenenfalls durch Fluoreszenz Licht einer anderen Wellenlänge ausgesandt; beides wird von Detektoren gemessen. Für alle Experimente wurde ein EPICS®-PROFILE II Durchflusssytometer verwendet, 10000 Ereignisse (Zellen) wurden ausgezählt und die Datenanalyse erfolgte mit der EPICS®ELITE 3.0-Software.

Zur Differenzierung zwischen apoptotischem und nekrotischem Zelltod wurde eine Doppelfärbung durchgeführt. Annexin bindet an Phosphatidylserin, ein Molekül aus der inneren Schicht der Plasmamembran, das während der Apoptose externalisiert wird. 7-AAD ist ein DNA-bindender Farbstoff, der in alle Zellen eindringt, deren Plasmamembran durchlässig geworden ist. Dies geschieht sowohl beim nekrotischen Zelltod als auch in späten Phasen der Apoptose, insbesondere in Abwesenheit von Phagozyten, die die apoptotischen Zellen im Körper aufnehmen.

Zur Messung der raschen Membranschädigung wurde der Propidiumiodid-Einstrom in Granulozyten herangezogen, die Durchführung erfolgte wie beschrieben [BHAKDI und MARTIN 1991]. Zellsuspensionen (1 Million Zellen pro Milliliter) wurden behandelt, dann mit 5  $\mu$ l Annexin-PE/ml Zellsuspension und 7  $\mu$ l 7-AAD/ml Zellsuspension für 15 Minuten bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Forward scatter als Maß der Granularität und Side scatter als Maß der Zellgröße wurden linear, alle Fluoreszenzen logarithmisch aufgetragen.

## 2.2.14 Western Blot

Das Western Blot-Verfahren dient zur Auftrennung von Proteingemischen und zum Nachweis einzelner Proteine durch Antikörperbindung. Die Proben werden zuerst auf ein SDS-Gel gegeben, wobei sich das negativ geladene Detergens SDS an positive Gruppen des Proteins anlagert. Ungeachtet einer möglichen Eigenladung des Proteins ist nun das ganze Molekül durch den Überschuss an SDS negativ aufgeladen. Wird eine Spannung angelegt, wandert es zum positiven Pol (Gelelektrophorese). Dabei wird die Geschwindigkeit, mit der es sich durch das Gel bewegt, von seiner Größe und von seiner Ladung bestimmt. Da das Ausmaß der Anlagerung von SDS in etwa proportional zur Proteingröße ist, ist die Wanderungsgeschwindigkeit des Proteins bei der SDS-PAGE lediglich abhängig von seiner Größe. Kleine Proteine dringen weit in das Gel vor, große kommen nur wenig voran.

Die im Gel aufgetrennten Proteine wandern durch das Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine Nitrocellulose-Membran ('Blot'). Dort lassen sie sich anfärben oder durch die Bindung von Antikörpern an die Membran spezifisch markieren. Die Antikörper können durch verschie-

dene Verfahren sichtbar gemacht werden, beispielsweise indem ein zweiter, mit Meerrettichperoxidase gekoppelter Antikörper an den ersten bindet und ein durch Peroxidase spaltbares Chemilumineszenz-Substrat zugegeben wird. Wo die Antikörper gebunden sind, spaltet die Peroxidase das Substrat und das entstehende Licht belichtet einen aufgelegten Röntgenfilm.

### **Gewinnung der Proben für den Western Blot**

Zellen für Western Blots wurden in 6well-Platten oder in 12well-Platten ausgesät und, soweit nicht anders angegeben, in serumfreiem Medium behandelt. Nach Behandlung wurde das Medium abgezogen und 70  $\mu\text{l}$  (6well-Platte) bzw. 50  $\mu\text{l}$  (12well-Platte) 2x-Probenpuffer auf jeden well gegeben. Der Probenpuffer lysierte die Zellen, der enthaltene Mercaptoethanol trennt Schwefelbrücken und zerstört damit die räumliche Struktur der Proteine, während das SDS im Probenpuffer denaturiert. Die Zellysate wurden mit einem Zellschaber zusammengeschabt und in Eppendorfgefäße pipettiert. Um DNA und RNA zu denaturieren, die sonst eine schleimige Konsistenz der Proben bewirken und das Auftragen erschweren, wurden diese für 5 Minuten bei 95°C erhitzt und entweder direkt weiterverwendet oder bei -20°C eingefroren, um später analysiert zu werden.

### **SDS-PAGE**

Die Elektrophorese wird in einem Polyacrylgel durchgeführt, das ungeladen und chemisch inert ist. Für die analysierten Proteingrößen erwies sich ein 10%iges Gel als geeignet.

In einer Keutz-Apparatur wurde zunächst ein 10%iges Trenngel gegossen, mit Isopropanol überschichtet, um eine glatte blasenfreie Oberfläche zu erhalten, und für 20 Minuten auspolymerisieren lassen. Dann wurde das Isopropanol mit Wasser abgespült, das Wasser mit Filterpapierstreifen aufgesaugt und das Sammelgel darauf gegossen, in das der Probenkamm vorsichtig eingesetzt wurde. Das Gel wurde vor Verwendung wieder für mindestens 20 Minuten auspolymerisiert oder in feuchten Papiertüchern über Nacht bei 4°C gelagert.

Zur Gelelektrophorese wurde der Kamm aus dem Sammelgel gezogen, die Apparatur mit Laufpuffer gefüllt, so daß beide Elektrodendrähte der Elektrophoresekammer mit Flüssigkeit bedeckt waren, und die entstandenen Taschen im Gel mit Laufpuffer von Gelresten freigespült. Dann wurden je 5  $\mu\text{l}$  MagicMark Proteinmarker und 20  $\mu\text{l}$  Proben in die Taschen eingefüllt. Es wurde darauf geachtet, die Taschen nicht zu überfüllen, damit es nicht zur Verunreinigung von Proben kam; die Spritze wurde nach dem Auftrag jeder Probe mehrfach mit Laufpuffer gespült.

10 % SDS-Gel	Bestandteil	Menge (für zwei Gele)
Sammelgel	H <sub>2</sub> O	2,25ml
	Upper Tris pH 6,8	1,25ml
	Acrylamid	1,25ml
	Ammoniumperoxodisulfat (10% in dH <sub>2</sub> O)	75 $\mu$ l
	TEMED	10 $\mu$ l
Trenngel	dH <sub>2</sub> O	4ml
	Lower Tris pH 8,8	2,5ml
	Acrylamid	3,25ml
	Ammoniumperoxodisulfat (10% in dH <sub>2</sub> O)	150 $\mu$ l
	TEMED	5 $\mu$ l

Tabelle 2.9: 10 %iges Gel zur SDS-PAGE

Die Kammer wurde an eine Spannungsquelle angeschlossen und die Proben wurden zunächst bei 120 V in das Gel einlaufen gelassen. Der Laufpuffer im Inneren der Gelkammer wurde gegebenenfalls ergänzt und die Spannung wurde auf 150 V erhöht, sobald die Proben sich im Sammelgel befanden.

## Blot

Drei mit Blotpuffer befeuchtete Whatman-Filterpapiere und eine ebenso angefeuchtete Nitrocellulosemembran wurden auf die Kathode einer Semi-Dry-Blotapparatur gelegt. Das Gel wurde aus der Elektrophoresekammer entnommen, das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel wurde blasenfrei auf die Membran aufgelegt. Nach dem Abdecken mit drei weiteren befeuchteten Filterpapieren wurde die Anode der Blotapparatur aufgelegt und für eine Stunde eine Spannung von 60 V (1 Gel) bzw. 120 V (2 Gele) angelegt.

## Ponceau-Rot-Färbung

Die Membran wurde entnommen und kurz mit etwas Ponceau-Rot-Lösung bedeckt, dann mit Wasser abgespült, bis die Proteinbanden auf der Membran sich rosa vom weißen Hintergrund abhoben. Die gefärbte Membran wurde zwischen Folien gelegt und kopiert.

### **Blocken, Waschen, Antikörperbindung**

Um die unspezifische Bindung der Antikörper an die Nitrocellulosemembran zu verhindern, wurde diese zuerst mit Protein abgesättigt. Dazu wurde in der Regel eine 5 %ige Lösung von BSA in TBST verwendet. Bei einzelnen Versuchen kam jedoch auch eine 10 %ige Lösung von Magermilchpulver in TBST zum Einsatz. Die Membran wurde mit der Blockierlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt, danach zum Abwaschen überschüssigen Proteins dreimal für 10 Minuten mit TBST geschüttelt.

Der verwendete erste Antikörper wurde, soweit nicht anders angegeben, in 10ml 5 %iger BSA-TBST-Lösung verdünnt und auf die Membran gegeben. Diese wurde über Nacht bei 4°C langsam geschüttelt. Danach wurde die Membran wie beschrieben dreimal gewaschen, um Reste des ersten Antikörpers zu entfernen, und der zweite Antikörper wurde verdünnt und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Membran gegeben.

War der erste Antikörper aus dem Kaninchen gewonnen, wurde als zweiter Antikörper HRP-gekoppelter anti-rabbit 1:1000 in 5 % BSA-TBST eingesetzt. Für Mausantikörper wurde der Sekundärantikörper anti-mouse (HRP) 1:500 in 2,5%iger Lösung von Magermilchpulver in TBST verwendet.

Nach Inkubation mit dem zweiten Antikörper wurde die Membran dreimal mit TBST gewaschen, dann wurde das Antikörpersignal detektiert.

### **Detektion**

Die Detektion erfolgte mit dem BM chemiluminescence Blotting Substrate (POD) Kit. Die Peroxidase am zweiten Antikörper katalysiert dabei die Oxidation von Luminol, bei der Licht frei wird. 3 ml Substrat A wurden kurz erwärmt, dann wurden 30 µl Substrat B zugegeben und die Mischung wurde auf der Membran einige Male geschwenkt. Nach Abtropfen überschüssiger Detektionslösung wurde die Membran zwischen zwei Folien in die Kassette eingeklebt und ein Röntgenfilm wurde aufgelegt. Der Film wurde nach Bedarf einige Sekunden bis hin zu einer halben Stunde belichtet, entwickelt und fixiert.

### **Stripping der Membran**

Um verschiedene Proteine nachzuweisen oder den Phosphorylierungszustand eines Proteins zu untersuchen, wurden die gebundenen Antikörper wieder von der Membran entfernt ('Stripping') und durch andere (z.B. phosphorylierungsspezifische) ersetzt. Der im Stripping-Puffer enthal-

tene Mercaptoethanol zerstört die Struktur der Antikörper, indem er ihre Schwefelbrücken löst, und hebt damit die Bindung an das Antigen auf. Zum Stripping wurde die Membran mit 40ml Stripping-Puffer für 30 Minuten im Wasserbad bei 50°C geschüttelt, danach zweimal mit TBST für 15 Minuten gewaschen und erneut geblockt. Die Bindung und Detektion anderer Antikörper konnte nun wie bereits beschrieben durchgeführt werden.

### 2.2.15 Coomassie-Färbung

Auf SDS-Gelen, die nicht für einen Western Blot verwendet wurden, wurden die aufgetrennten Proteine durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. So konnte etwa die Spaltung von Apolipoprotein B-100 aus LDL bei der E-LDL-Präparation überprüft werden. Der Triphenylmethan-Farbstoff Coomassie-Brillantblau färbt Proteine unspezifisch, indem er an basische Seitenketten von Aminosäuren bindet. Zum Anfärben wurden die Gele für 15 Minuten bei Raumtemperatur mit der Coomassie-Lösung geschüttelt. Die Coomassie-Lösung wurde abgeschüttelt und zunächst für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Entfärber geschüttelt. Zum vollständigen Entfärben wurde der Entfärber mehrfach gewechselt und die Gele über Nacht bei 4°C geschüttelt. Die Gele wurden blasenfrei zwischen eingeweichte Folien gelegt, die Folien wurden zwischen zwei Rahmen straff gespannt und die Gele so für mehrere Tage getrocknet.

### 2.2.16 Immunfluoreszenz

Die Immunfluoreszenz dient zum Nachweis der Anwesenheit und des Ortes von Proteinen in Zellen durch Antikörperbindung. Die Zellen werden fixiert, so daß ihre Struktur bestehen bleibt, mit einem Detergens wird ihre Membran durchlässig gemacht und die Antikörper können nun ins Zellinnere eindringen. Durch Bindung von Sekundärantikörpern, die mit fluoreszierenden Molekülen gekoppelt sind, werden die Proteine sichtbar gemacht. Vorteil des Verfahrens ist, daß die genaue Verteilung der Proteine in der Zelle und Auffälligkeiten hierbei direkt sichtbar sind. Teilweise sind so Rückschlüsse auf Funktion und Aktivierungszustand der Proteine möglich. Außerdem können mehrere Proteine gleichzeitig nachgewiesen werden, indem Antikörper verschiedener Spezies und bei verschiedenen Wellenlängen fluoreszierende Koppelmoleküle an den zweiten Antikörpern verwendet werden.

## Zellbehandlung

Für Immunfluoreszenzversuche wurden  $2 \cdot 10^5$  Eahy.926-Zellen auf runde Deckgläschen in 12well-Platten ausgesät, über Nacht kultiviert und in serumfreiem Medium behandelt. Nach der Behandlung wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen.

## Fixieren und Permeabilisieren

Zum Fixieren wurden die Zellen für 7 Minuten mit Methanol inkubiert. Der Wasserentzug durch den reinen Methanol erhält dabei die intrazellulären Strukturen und tötet die Zellen ab. Um die Plasmamembran für Antikörper durchlässig zu machen, werden die Zellen anschließend für 7 Minuten mit 0,1% Triton-X 100 in PBS behandelt.

## Blocken, Waschen, Antikörperbindung

Unspezifisches Binden des ersten Antikörpers wird durch Absättigen der Präparate mit einer 3%igen Lösung von BSA in TBST für eine Stunde (Raumtemperatur) verhindert. Erst dann wird der in PBS verdünnte erste Antikörper für eine Stunde auf die fixierten Zellen gegeben. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wird der zweite Antikörper ebenfalls für eine Stunde zugesetzt.

## Anfärben der Zellkerne mit Hoechst 33258

Hoechst... dringt sehr schnell in Zellen ein und färbt nur die Zellkerne hellblau an. Damit sind alle Zellen sichtbar und es kann beurteilt werden, ob die mit Antikörpern markierten Proteine sich im oder am Kern befinden. Die Präparate werden für 2 Minuten mit  $0,1 \mu\text{g/ml}$  Hoechst in PBS inkubiert, dann wird einmal mit PBS gewaschen.

## Eindecken der Präparate

Mit einem Skalpell und einer spitzen Pinzette wurden die Deckgläschen vorsichtig aus den Wells entnommen und auf Papiertüchern zum Trocknen ausgelegt. Ist der überschüssige Puffer fast vollständig abgetrocknet, wurde ein Tropfen FluoPrep auf jedes Deckgläschen gegeben, um die Fluoreszenz der Antikörper zu erhalten und ein Austrocknen der Präparate zu verhindern. Dann wurden die Deckgläschen mit der Oberseite nach unten auf beschriftete Objektträger gelegt, wobei Luftblasen zwischen Objektträger und Deckgläschen so weit wie möglich vermieden wurden. Der Tropfen FluoPrep breitete sich durch die Kapillarkräfte aus und verband Deckgläschen und

Objektträger fest. Die Präparate wurden zum Antrocknen noch etwas liegengelassen und dann am Mikroskop ausgewertet oder bei 4°C dunkel gelagert, um ein Ausbleichen der Fluoreszenz zu verhindern..

## Auswertung

Die Präparate wurden am Zeiss Axiovert 200M Fluoreszenzmikroskop betrachtet und fotografiert. Zur Aufnahme und Bearbeitung der Bilder wurde die AxioVision Rel.4.7 Software verwendet.

### 2.2.17 ELISA

Der ELISA ist ein Immunoassay, bei dem Proteine aus Gemischen abgetrennt und quantitativ bestimmt werden. Antikörper gegen das Zielprotein werden auf einer Platte gebunden und mit Albumin abgesättigt, um unspezifisches Binden von Fremdproteinen zu verhindern. Dann wird das Gemisch, z.B. Kulturüberstand von Zellen, auf die Platte gegeben und nach Inkubation entfernt und mehrfach gewaschen. Lediglich das Zielprotein bleibt gebunden und kann mit einem zweiten Antikörper detektiert werden, der entweder direkt fluoreszenzmarkiert oder mit einem Enzym verknüpft ist, das ein Farb- oder Chemilumineszenzsubstrat spaltet. Eine Verdünnungsreihe bekannter Konzentration des Zielproteins ermöglicht die quantitative Bestimmung.

Für die Bestimmung von IL-8 mittels ELISA wurde der IL-8 OptEIA-Kit nach Herstellerprotokoll verwendet. 0,6 Millionen Eahy.926-Zellen je well wurden in 6-well-Platten ausgesät, über Nacht kultiviert und für zwei Stunden mit je 50µg/ml Substanz in 1ml pro well serumfreiem Medium inkubiert. Vorsichtig wurden 800µl des Überstandes abgenommen, in ein Eppendorfgefäß gegeben und bei 14000upm für 3 Minuten zentrifugiert, um mögliche Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde bis zur Durchführung des ELISA bei -20°C gelagert.

### 2.2.18 Calcium-Einstrom

Die elektrophysiologischen Messungen des Calcium-Einstroms wurden von Dr. Andreas Koschinsky am Rudolf-Buchheim-Institut für Pharmakologie der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt. Fura 2 ist ein fluoreszierender Chelatbildner, dessen Emissionsmaximum sich durch die Bindung von Calcium von 365nm zu 340nm hin verschiebt. Das Verhältnis der Fluo-

reszenzintensität der beiden Wellenlängen hängt allein von der Calciumkonzentration ab. PMN wurden für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit  $5\mu\text{M}$  Fura 2 beladen und zweimal gewaschen. Die Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration wurde durch time lapse-Mikroskopie erfaßt. Nach Aufzeichnen des Ausgangswertes während 5 Minuten wurden  $100\mu\text{g/ml}$  E-LDL zugegeben und das Experiment für weitere 30 Minuten fortgesetzt.

### 2.2.19 Oil-Red-O-Färbung

Oil Red O ist ein lipophiler Farbstoff, der in Zellen eindringt und neutrale Fette und Cholesterolester rot anfärbt. An unverestertes Cholesterol bindet Oil Red O nicht. Zur Oil Red O-Färbung wurden die Zellen in 6well-Platten auf Deckgläschen ausgesät, über Nacht in serumfreiem Medium inkubiert und behandelt. Das Medium wurde abgezogen und die wells einmal mit PBS gewaschen, bevor mit  $0,5\text{ml}$  einer 3%igen Lösung von Paraformaldehyd in PBS für 30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert wurde. Dann wurden  $200\mu\text{l}$  einer gesättigten Lösung von Oil Red O in 60% Isopropanol/PBS, die für 15 Minuten auf  $37^\circ\text{C}$  erhitzt worden und danach durch Filterpapier und einen  $0,2\mu\text{m}$ -Spritzenfilter filtriert worden war, für 45 Minuten auf die Präparate gegeben. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Deckgläschen mit Skalpell und Pinzette vorsichtig entnommen, auf Papiertüchern trocknen gelassen und mit einem Tropfen 30%igem Glycerol auf beschriftete Objektträger gegeben. Die Deckgläschen wurden mit Nagellack ringsum abgedichtet, um ein Austrocknen der Präparate zu verhindern. Auswertung und Aufnahme von Farbfotos erfolgte am Zeiss Axioskop 2 Mikroskop mit einer AxioCam HRC Kamera und der AxioVision-Software Version 3.1.

### 2.2.20 Proteinbestimmung nach Pierce

Zur Proteinbestimmung wird bei der Methode nach Pierce die Reduktion zweiwertigen Kupfers im Alkalischen durch Proteine herangezogen. Das entstehende einwertige Kupferion bildet mit zwei Molekülen Bicinchoninsäure (BCA) einen blauen Komplex, dessen Absorption gemessen wird.

Zum Erstellen einer Standardgerade wurden  $2\text{mg/ml}$  BSA in 0,1%SDS gelöst und eine 1:1-Verdünnungsreihe in einer 96well-Mikrotiterplatte erstellt. Je  $25\mu\text{l}$  Probe oder Standard wurden pro well verwendet, als Leerwert diente 0,1%SDS. Das BCA-Reagenz wurde frisch aus 50 Teilen Lösung A (Kupfersulfat) und einem Teil Lösung B (alkalisch gepufferte Bicinchoninsäurelösung) angesetzt und  $25\mu\text{l}$  zu jedem well gegeben. Zum Mischen wurde die Platte kurz

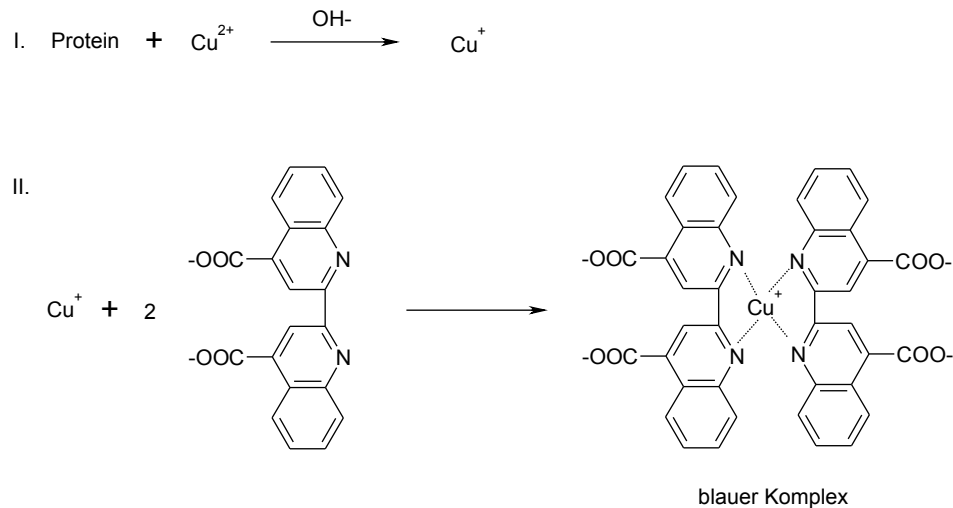


Abbildung 2.7: Bestimmung der Proteinkonzentration durch die BCA-Reaktion: Methode nach Pierce

gerüttelt und dann für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Absorption wird bei 540nm im ELISA-reader bestimmt und anhand der mit Excel erstellten Standardgerade wird der Proteingehalt der Proben berechnet.

### 2.2.21 Hämolysetest

Stoffe, die sich in Membranen einlagern und diese stören können, bewirken die Lyse roter Blutkörperchen. Deren Farbstoff Hämoglobin tritt aus und die Konzentration des Hämoglobins im Überstand kann photometrisch bestimmt werden. Verdünnungen der zu analysierenden Substanzen in PBS werden in einer 96well-Platte der U-Form (runder Boden der wells) zu gleichen Teilen (je 50  $\mu\text{l}$ ) mit einer 0,5 %igen Suspension von Kaninchenerythrozyten gemischt. Die Kaninchenerythrozyten wurden einmal wöchentlich isoliert und nach Zusatz Penicillin und Streptomycin zur Hemmung von Bakterienwachstum bei 4 °C aufbewahrt. Als Negativkontrolle diente PBS, als Positivkontrolle eine 1%ige Lösung von Triton X-100 in Wasser. Durch das Detergens

wurden die roten Blutzellen sofort aufgelöst.

Die Zellkulturplatte wurde für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert und bei 1000upm für 3 Minuten zentrifugiert, so daß sich intakte rote Blutzellen als kleines rotes Pellet in der Mitte der wells absetzten. Waren die Erythrozyten lysiert, war kein Pellet mehr zu sehen und der Überstand war hellrot gefärbt. 80  $\mu$ l des Überstandes wurden entnommen, in eine frische Platte pipettiert und ihre Absorption wurde bei 414nm im ELISA-Reader gemessen.

### **2.2.22 Messung des zellulären Cholesterolgehaltes**

Zur Bestimmung zellulärer Lipide wurden Zellen in 6well-Platten kultiviert und behandelt, mit PBS gewaschen und mit einem Zellschaber in 0,5ml PBS abgeschabt. Die Zellsuspensionen aus je 2 wells wurden in einem Eppendorfgefäß vereinigt und nochmals mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 0,1% SDS aufgenommen und durch Vortexen und Ultraschallbad lysiert. Der Proteingehalt der Proben wurde mit der Methode nach Pierce bestimmt.

Die Extraktion und Analyse der Proben erfolgte wie bereits beschrieben [KAPINSKY et al. 2001] durch Dr. Gerhard Liebisch in Regensburg.

# 3 Ergebnisse

## 3.1 Wirkung von E-LDL auf Endothelzellen

Mit E-LDL behandelte Endothelzellen schütten den Leukozyten-Lockstoff IL-8 aus [SURIYAPHOL et al. 2002]. Die Induktion von IL-8 erfolgt häufig über den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B, dessen Untereinheit p65 an den IL-8-Promotor bindet und diesen aktiviert. Aktiviertes NF- $\kappa$ B wurde in atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen [BRAND et al. 1996]. Damit lag es nahe, zu untersuchen, ob NF- $\kappa$ B die E-LDL-bedingte IL-8-Ausschüttung reguliert.

Bei der Aktivierung von NF- $\kappa$ B wird zunächst der Inhibitor I $\kappa$ B phosphoryliert, der im Cytosol an NF- $\kappa$ B bindet und es an der Translokation in den Kern hindert. Das phosphorylierte I $\kappa$ B trennt sich von NF- $\kappa$ B und wird abgebaut. Dieser zeitige Aktivierungsschritt läßt sich mittels eines Antikörpers gegen phosphoryliertes I $\kappa$ B im Western Blot nachweisen.

Entsprechende Versuche, mit denen Arbeiten von D. Fenske und K. Dersch aufgegriffen wurden, zeigten jedoch, daß E-LDL NF- $\kappa$ B in Endothelzellen nicht aktiviert (vgl. Abb.3.1).

Die Aktivierung von NF- $\kappa$ B erfolgt rasch und kann ebenfalls rasch wieder beendet werden. Um sicherzustellen, daß der Zeitpunkt einer möglichen NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch E-LDL in den Experimenten erfaßt wurde, wurde in der vorliegenden Arbeit zusätzlich eine Kinetik mit Inkubationszeiten von 5min bis 1,5h durchgeführt. Für alle folgenden Experimente wurde die humane Endothelzelllinie Eahy.926 verwendet. Mit 100 $\mu$ g E-LDL behandelte Eahy.926-Zellen wurden im Western Blot auf phosphoryliertes I $\kappa$ B untersucht. Es kam im gesamten Zeitraum jedoch zu keiner Phosphorylierung von I $\kappa$ B.

I $\kappa$ B kann neben der klassischen Serin 32- und Serin 36- Phosphorylierung auch atypisch an Tyrosin 42 phosphoryliert werden. Dies ist bei Anoxie der Fall; tyrosinphosphoryliertes I $\kappa$ B $\alpha$  bindet dann an die SH<sub>2</sub>-Domäne der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und wird so von NF- $\kappa$ B getrennt. Eine Tyrosin 42 - Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  durch E-LDL konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

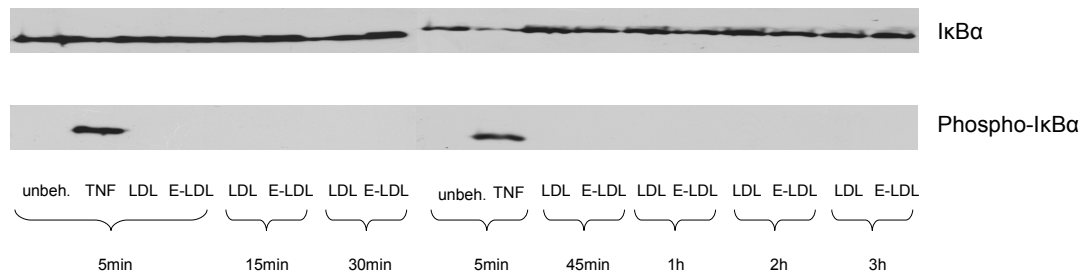


Abbildung 3.1: E-LDL-behandelte Endothelzellen zeigen keine  $I\kappa B\alpha$ -Phosphorylierung.

Endothelzellen wurden für die angegebenen Zeiträume mit  $100\mu\text{g/ml}$  Lipoprotein inkubiert und Vorkommen und Phosphorylierung von  $I\kappa B\alpha$  wurde per Western Blot der Zell-Lysate geprüft.

### 3.1.1 Weder E-LDL noch Linolsäure induzieren $\text{NF-}\kappa\text{B}$

Für die E-LDL-induzierte IL-8-Ausschüttung sind die freien Fettsäuren des modifizierten Lipoproteins notwendig. Den höchsten Anteil an den freien Fettsäuren des E-LDL hat die zweifach ungesättigte Linolsäure [SURIYAPHOL et al. 2002]. Eine Aktivierung von  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  durch Linolsäure wurde bereits beschrieben [HENNIG et al. 1996]. Da dies im Gegensatz zu unseren Ergebnissen mit E-LDL steht, haben wir den Einfluß von E-LDL und Linolsäure auf den Transkriptionsfaktor parallel untersucht. Eine Phosphorylierung von  $I\kappa B$  erfolgte weder durch Behandlung der Zellen mit E-LDL noch durch Behandlung mit der Fettsäure. Das als Positivkontrolle eingesetzte  $\text{TNF-}\alpha$  führte jedoch wie erwartet zur Phosphorylierung des Inhibitors.

Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz zu den Daten von Hennig et al. liegt in den unterschiedlichen Versuchsbedingungen, insbesondere unserer Durchführung der Experimente unter serumfreien Bedingungen.

Nach der Mainzer Hypothese wandert LDL ins Gewebe ein und wird dort zu E-LDL umgewandelt. Im Gewebe und in der Interstitialflüssigkeit Die Endothelzellen kommen daher zunächst nicht von der luminalen, dem Blut zugewandten Seite her mit E-LDL in Kontakt, sondern von der abluminalen Seite, dem Gewebe, her.

Im Gewebe ist E-LDL aber nicht von Serum, sondern von der anders zusammengesetzten Inter-

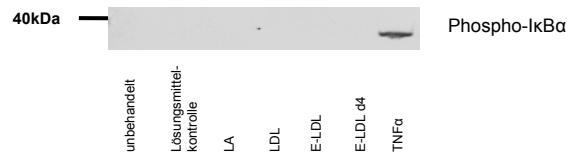


Abbildung 3.2: Weder E-LDL noch Linolsäure bewirkt eine Phosphorylierung von  $I\kappa B\alpha$ .

Endothelzellen wurden für 2h mit je  $100\mu\text{g/ml}$  Substanz inkubiert bzw. für 5 Minuten mit  $2,5\text{ng/ml}$   $\text{TNF-}\alpha$  und die Zell-Lysate wurden per Western Blot auf phosphoryliertes  $I\kappa B\alpha$  getestet (Beladung des Gels mit je  $20\mu\text{l}$  Zellysat).

tialflüssigkeit umgeben, deren Albumingehalt beispielsweise geringer ist. Albumin bindet freie Fettsäuren und verändert damit die Wirkung von E-LDL. Für die Experimente der vorliegenden Arbeit wurden serumfreie Bedingungen gewählt, um den läSIONalen Verhältnissen möglichst gut zu entsprechen.

Ist der Inhibitor  $I\kappa B\alpha$  phosphoryliert und daraufhin von  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  getrennt, können die  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Untereinheiten in den Kern wandern. Dieser Folgeschritt der  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ -Aktivierung läßt sich mit einem Antikörper gegen p65 mittels Immunfluoreszenz zeigen. Aus Abbildung 3.3 ist ersichtlich, daß weder E-LDL noch Linolsäure eine Translokation von  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  in den Nukleus bewirkten. Unbehandelte Zellen zeigten eine gleichmäßige Verteilung von p65 im Cytosol, aber nicht im Zellkern. In  $\text{TNF-}\alpha$ -behandelten Zellen wanderte p65 dagegen fast vollständig in den Kern. Auch in diesem Experiment bestätigt sich also der Befund, daß E-LDL  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  nicht aktiviert.

### 3.1.2 E-LDL und Linolsäure hemmen die Induktion von $\text{NF-}\kappa\text{B}$ durch $\text{TNF-}\alpha$

Daten von D. Fenske deuteten darauf hin, daß E-LDL  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  nicht völlig unbeteiligt läßt, sondern hemmend wirken kann. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit bestätigt. In Zellen, die mit E-LDL vorbehandelt waren, induzierte  $\text{TNF-}\alpha$  den Transkriptionsfaktor  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  nicht in dem Maße wie in Zellen ohne Vorbehandlung (Abb. 3.4). Ob auch dieser Effekt abhängig von den freien Fettsäuren des modifizierten Lipoproteins war, wurde in weiteren Experimenten untersucht.

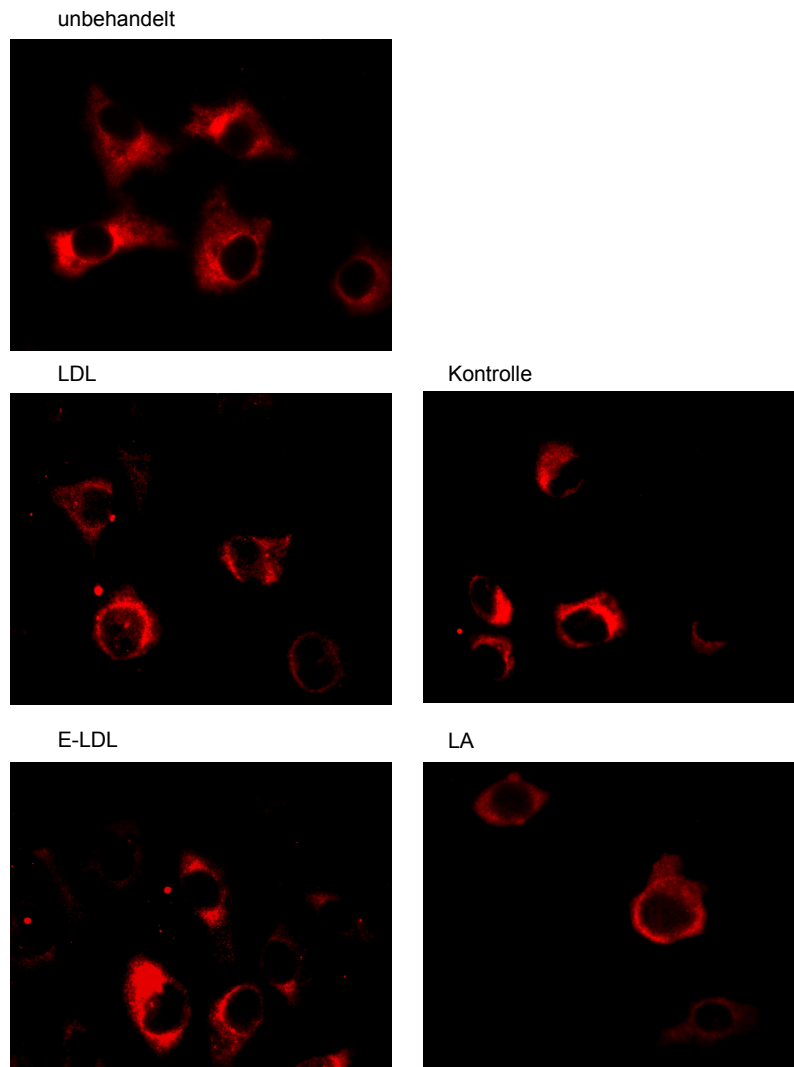


Abbildung 3.3: E-LDL und Linolsäure bewirken keine nukleäre p65-Translokation in Endothelzellen.

Endothelzellen wurden mit  $50\mu\text{g/ml}$  Substanz für 2h inkubiert und eine Immunfluoreszenz auf p65 wurde durchgeführt. p65 ist im Cytosol sichtbar (rot angefärbt), es fand jedoch keine Translokation in den Kern statt, dieser ist als dunkle Aussparung erkennbar.

Eahy.926-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an E-LDL für 2 Stunden vorbehandelt und nach Mediumwechsel für 5min mit TNF- $\alpha$  inkubiert. Nicht vorbehandelte Zellen zeigten mit TNF- $\alpha$  eine Phosphorylierung von I $\kappa$ B, während E-LDL ab einer Konzentration von 50 $\mu$ g/ml die Phosphorylierung deutlich reduzierte.

Die Zellen wiesen keine morphologisch erkennbare Schädigung auf. Die von K. Dersch gezeigte apoptotische Wirkung von E-LDL auf Endothelzellen [DERSCH et al. 2005] könnte die Hemmung des NF- $\kappa$ B-Signalweges bewirken, daher wurde die Aktivierung von Caspasen, denen eine Schlüsselstellung in der Apoptose zukommt, unter den Bedingungen des Hemmversuchs überprüft. Es kam zu keiner Caspaseaktivierung (Daten nicht gezeigt). Die Hemmung TNF- $\alpha$ -induzierter NF- $\kappa$ B-Aktivierung ist demnach kein durch Zellschädigung ausgelöster unspezifischer Vorgang; denkbar wäre jedoch, daß sie im weiteren Verlauf Einfluß auf die E-LDL-induzierte Apoptose nimmt.

Eine Vorinkubation mit Linolsäure hemmte ebenfalls die TNF- $\alpha$ -induzierte Phosphorylierung von I $\kappa$ B. Die niedrigste hemmende Konzentration an Linolsäure lag bei 25 $\mu$ g/ml.

Auch die Hemmung der TNF- $\alpha$ -induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung wurde anhand des späteren Aktivierungsschrittes der p65-Translokation in den Zellkern überprüft. Während der Effekt von TNF- $\alpha$  auf die I $\kappa$ B-Phosphorylierung im Western Blot bereits nach 5 Minuten deutlich war, war die Translokation von p65 in den Zellkern als späterer Teilabschnitt der NF- $\kappa$ B-Aktivierung erst nach 15 Minuten optimal sichtbar. Daher wurde die Dauer der TNF- $\alpha$ -Behandlung für die Immunfluoreszenz abgewandelt.

Unbehandelte sowie mit LDL vorbehandelte Zellen zeigten nach der Inkubation mit TNF- $\alpha$  Translokation von p65 in den Nukleus, bei mit E-LDL oder Linolsäure vorbehandelten Zellen unterblieb diese ganz. Die Hemmung der TNF- $\alpha$ -induzierten NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch E-LDL und Linolsäure wurde mit dieser Methode bestätigt.

E-LDL enthält neben Linolsäure verschiedene weitere Fettsäuren, unter anderem eine erhebliche Menge an Ölsäure. Die Wirkung von Ölsäure und der in geringer Menge enthaltenen Arachidonsäure auf die TNF- $\alpha$ -induzierte Phosphorylierung von I $\kappa$ B wurde im Western Blot überprüft (Abb. 3.6). Arachidonsäure unterdrückte dabei die I $\kappa$ B-Phosphorylierung vollständig, während Ölsäure keine hemmende Wirkung hatte. Dies deutet auf eine Abhängigkeit der NF- $\kappa$ B-Hemmung von der Anzahl an Doppelbindungen in einem Fettsäuremolekül hin.

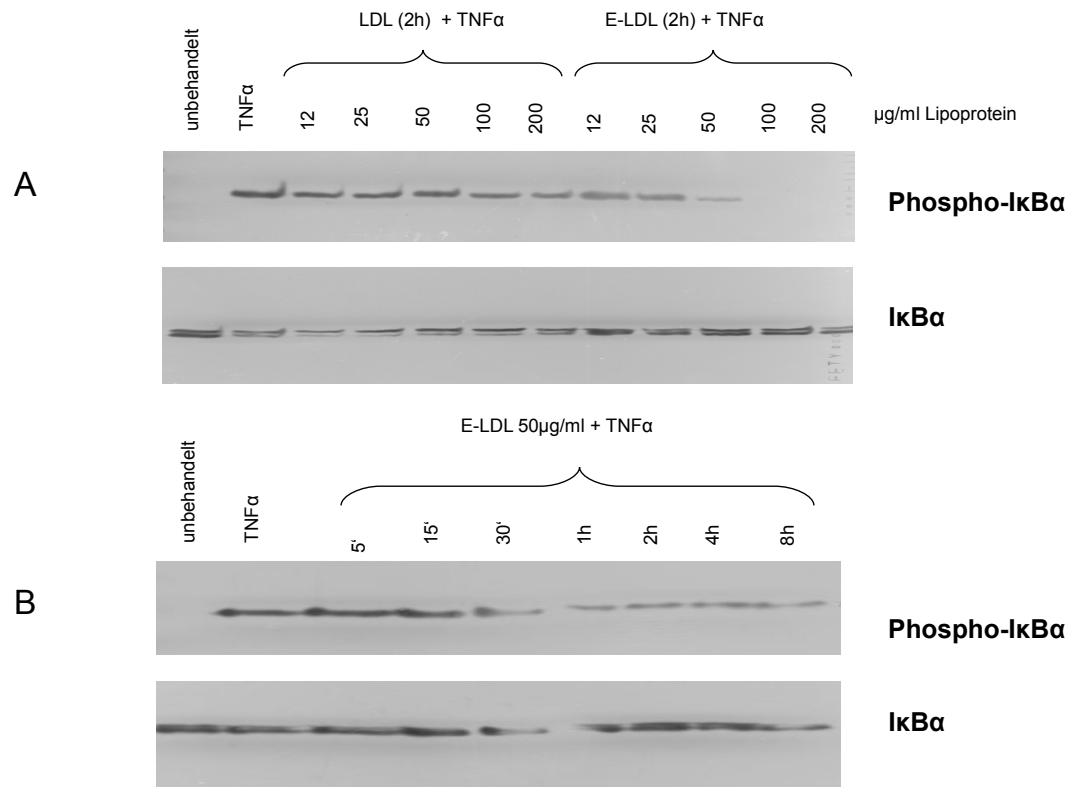


Abbildung 3.4: E-LDL hemmt die TNF- $\alpha$ -induzierte I $\kappa$ B-Phosphorylierung in Endothelzellen: Western Blot.

A: Dosis-Wirkungs-Beziehung, B: Kinetik. Endothelzellen wurden mit E-LDL inkubiert, dann wurde das Medium gewechselt und für 5 Minuten mit 2,5ng/ml TNF- $\alpha$  inkubiert. Die Zell-Lysate wurden per Western Blot auf Vorkommen und Phosphorylierung von I $\kappa$ B $\alpha$  getestet.

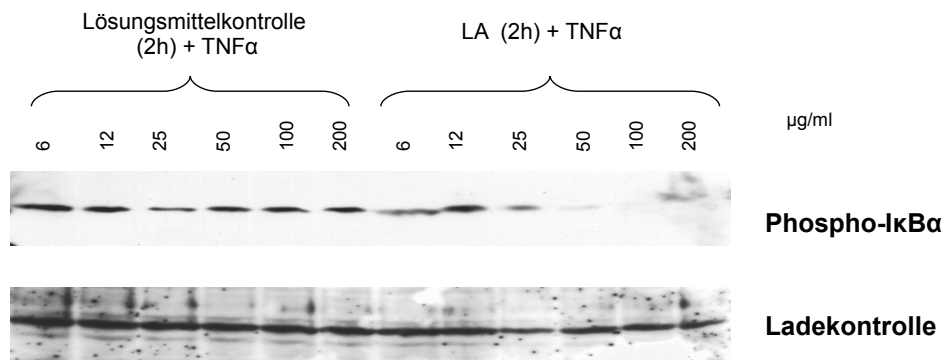


Abbildung 3.5: Linolsäure hemmt die TNF- $\alpha$ -induzierte I $\kappa$ B-Phosphorylierung in Endothelzellen: Western Blot.

Die Durchführung erfolgte analog zum Versuch mit E-LDL.

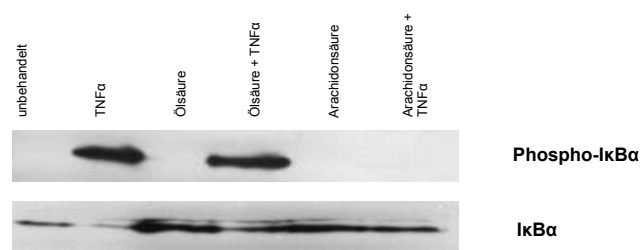


Abbildung 3.6: Auswirkung verschiedener Fettsäuren auf die I $\kappa$ B $\alpha$ -Phosphorylierung sowie deren Induktion durch TNF- $\alpha$ .

Endothelzellen wurden mit 50  $\mu$ g/ml der Fettsäuren für 2h inkubiert, dann wurde das Medium gewechselt und für 5 Minuten 2,5ng/ml TNF- $\alpha$  zugegeben. Die Zell-Lysate wurden mittels Western Blot auf I $\kappa$ B $\alpha$ -Phosphorylierung getestet.

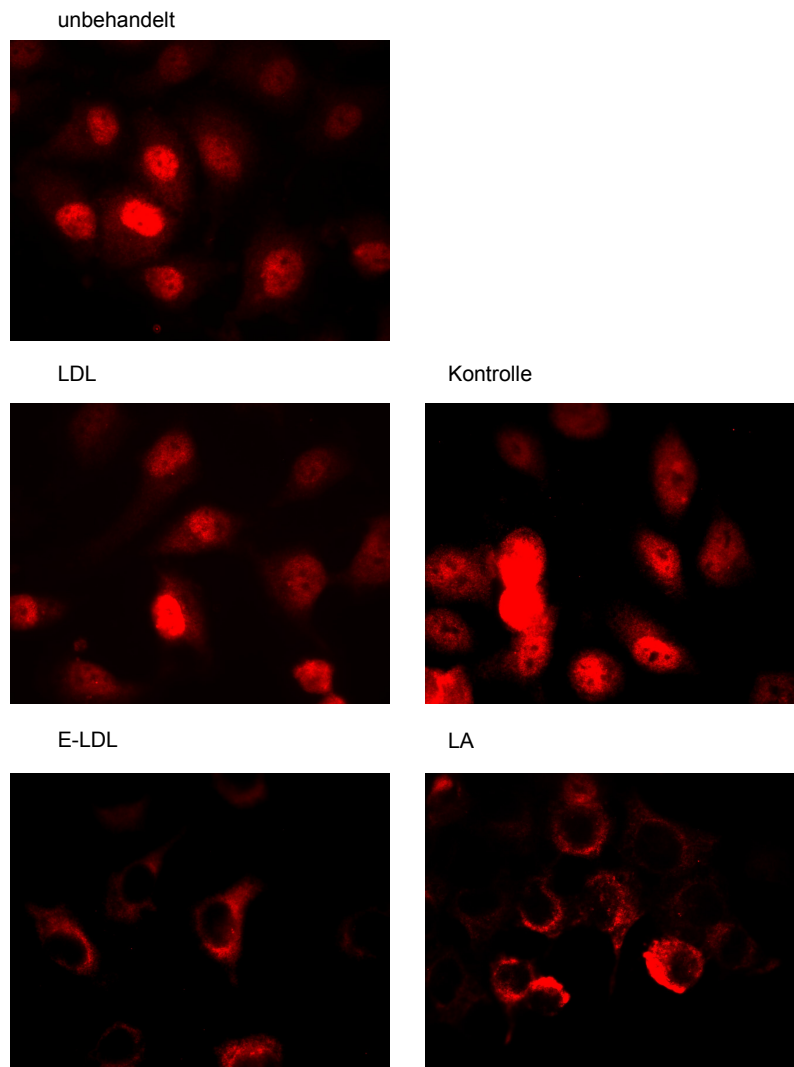


Abbildung 3.7: E-LDL und Linolsäure hemmen die von  $\text{TNF-}\alpha$  induzierte nukleäre p65-Translokation in Endothelzellen.

Endothelzellen wurden mit  $50\text{ }\mu\text{g/ml}$  Substanz für 2h inkubiert, dann wurde das Medium gewechselt und weitere 15 Minuten mit  $2,5\text{ng/ml}$   $\text{TNF-}\alpha$  inkubiert. Per Immunfluoreszenz wurde die Translokation von p65 in den Zellkern detektiert.

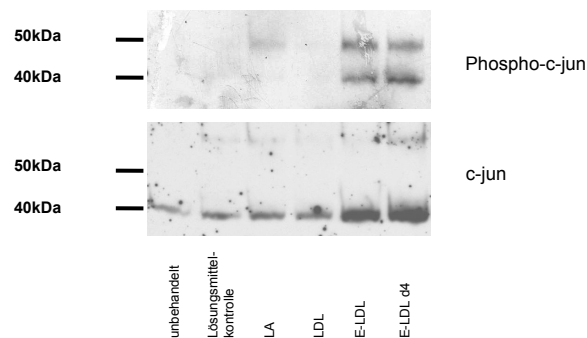


Abbildung 3.8: E-LDL induziert die Expression und Phosphorylierung von c-jun in Endothelzellen: Western Blot.

Endothelzellen wurden für 2h mit je  $100\mu\text{g/ml}$  Substanz inkubiert, danach wurde das Medium gewechselt und für 5 Minuten mit  $2,5\text{ng/ml}$   $\text{TNF-}\alpha$  behandelt. Die Zell-Lysate wurden per Western Blot auf c-jun und dessen Phosphorylierung getestet.

### 3.1.3 E-LDL induziert Expression und Phosphorylierung von c-jun

Da die Aktivierung von  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  durch E-LDL gehemmt wird, muß die E-LDL-induzierte Produktion von IL-8 über einen anderen Signalweg erfolgen. Der Transkriptionsfaktor AP-1 ist ebenfalls an der Regulation von Genen beteiligt, die für die Atherosklerose von Bedeutung sind (VCAM, MMPs). Eine untypische Regulation des IL-8-Gens über AP-1 könnte die von E-LDL hervorgerufene IL-8-Ausschüttung bei gleichzeitiger Hemmung von  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  erklären. Zur Untersuchung der AP-1-Aktivität in E-LDL-behandelten Endothelzellen wurde eine Untereinheit des Heterodimers AP-1, c-jun, herangezogen. Die Aktivierung von c-jun erfolgt durch Phosphorylierung und kann durch einen Antikörper, der spezifisch an die phosphorylierte Form des Proteins bindet, nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde per Western Blot überprüft, ob c-jun in E-LDL- sowie Linolsäure-behandelten Zellen phosphoryliert ist. Dies war bei der Behandlung mit E-LDL der Fall, außerdem kam es zu einer verstärkten Expression des Proteins verglichen mit unbehandelten Zellen. Linolsäure verursachte hingegen keine gesteigerte Expression und lediglich eine sehr schwache Phosphorylierung von c-jun.

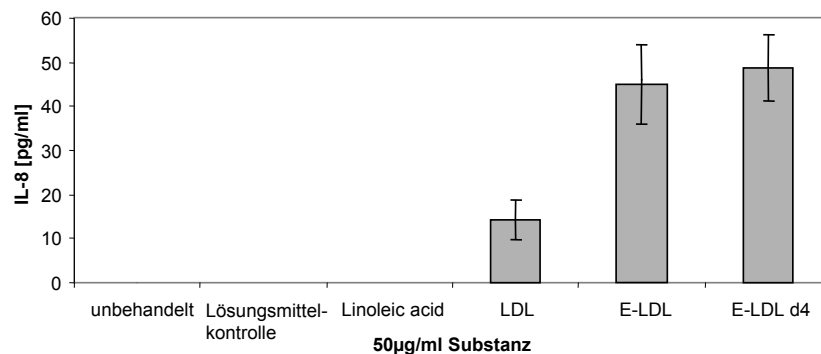


Abbildung 3.9: IL-8-Ausschüttung E-LDL-behandelter Endothelzellen.

Endothelzellen wurden für 2h mit je 50 µg/ml Substanz inkubiert und IL-8 wurde aus dem Zellüberstand mittels ELISA nachgewiesen. Abgebildet sind die Mittelwerte dreier Experimente mit Standardfehler (Fehlerbalken).

Die von Suriyaphol et al. gezeigte IL-8-Induktion ist vom Fettsäuregehalt des E-LDL abhängig [SURIYAPHOL et al. 2002]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde geprüft, ob auch Linolsäure allein eine IL-8-Ausschüttung aus Endothelzellen bewirkt. Im Überstand E-LDL-behandelter Zellen konnte mittels eines ELISA IL-8 nachgewiesen werden, Linolsäure bewirkte hingegen keine Ausschüttung des Cytokins. Das Lipoprotein könnte aus noch ungeklärten Gründen für die Aktivierung von AP-1 und somit für die IL-8-Induktion notwendig sein.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, daß E-LDL in Endothelzellen IL-8 möglicherweise über den Transkriptionsfaktor AP-1 induziert. NF- $\kappa$ B war dabei gehemmt. Die in E-LDL enthaltene freie Linolsäure löste diese Hemmung ebenfalls aus, bewirkte jedoch keine nennenswerte Aktivierung von AP-1. Eine IL-8-Ausschüttung verursachte die freie Linolsäure nicht. Ob andere zelluläre Effekte der Fettsäure sich hemmend auf IL-8 auswirken, weitere E-LDL-Bestandteile notwendig für die IL-8-Induktion sind oder die Carrierfunktion des Lipoproteins einen entscheidenden Einfluß auf seine Wirkung hat, ist noch nicht klar.

## 3.2 Differentielle Schädigung von Immunzellen durch E-LDL und seine Bestandteile

Es wurde bereits gezeigt, daß E-LDL konzentrationsabhängig zur Apoptose von Endothelzellen führen kann. Die Toxizität wird von den freien Fettsäuren des E-LDL ausgelöst und tritt auch bei Inkubation mit Linolsäure auf [DERSCH et al. 2005].

Mit E-LDL behandelte glatte Muskelzellen sterben ebenfalls dosisabhängig durch Apoptose [SCHWARZ et al. 2008].

In die Läsion wandern Monozyten ein, die dort zu Makrophagen ausreifen und atherogene Lipide aufnehmen. Auch auf Makrophagen wirkt E-LDL toxisch, allerdings erfolgt ein ATP-Verlust der Zellen erst bei sehr hoher Dosis [KLOUCHE et al. 1998].

E-LDL kann demnach generell zelltoxisch wirken und Apoptose auslösen. Schädigung und Tod von Immunzellen nach E-LDL-Behandlung wurden in der vorliegenden Arbeit näher untersucht. Ein starkes Absinken des zellulären Energieüberträgers ATP ist ein Kennzeichen geschädigter Zellen. Der ATP-Gehalt von Zellen läßt sich rasch und direkt aus geringen Zahlen lebender Zellen messen und wurde von uns als Marker für die Viabilität der Immunzellen herangezogen. Allerdings können sich auch Zellen, deren ATP-Gehalt drastisch gesunken ist (z.B. auf 10 Prozent des Ausgangswertes), unter Umständen noch erholen [HUSMANN et al. 2006].

Daher wurden zur eindeutigen Feststellung des Zelltodes weitere Parameter herangezogen. Sind Zellen irreversibel geschädigt, wird ihre Zellmembran durchlässig. Stoffe aus dem Zellinneren treten aus, beispielsweise das zytosolische Enzym LDH. Dessen Freisetzung wurde gemessen und zum Gesamtgehalt der Zellen an LDH in Bezug gesetzt.

Im Organismus sterben geschädigte Zellen meist durch Apoptose. Bei diesem kontrollierten 'Selbstmordprogramm' schrumpft die Zelle, schnürt Vesikel ab und die DNA wird zu Bruchstücken gespalten. Die Zellmembran bleibt intakt und die Vesikel können von Phagozyten aufgenommen werden, ohne daß das umliegende Gewebe durch Zellbestandteile geschädigt wird. Caspasen, eine Gruppen von Proteasen, die sich gegenseitig kaskadenartig durch Spaltung aktivieren, steuern den apoptotischen Prozess. Schlüsselenzyme sind dabei die Caspasen 3 und 7, deren Aktivität in E-LDL-behandelten Zellen von uns gemessen wurde, um die Art des Zelltodes genauer zu charakterisieren.

Die Experimente erfolgten unter serumfreien Bedingungen, wie sie im Inneren einer durch das Endothel vom Blutstrom abgeschnittenen Läsion herrschen. Das im Serum enthaltene Albumin besitzt Bindungsstellen für vielfältige Substanzen, unter anderem freie Fettsäuren, und könnte

daher die Zellen vor E-LDL schützen.

### **3.2.1 Toxizität von E-LDL gegenüber Makrophagen**

Die Makrophagen wurden durch E-LDL in einer Konzentration von  $400\mu\text{g/ml}$  deutlich geschädigt, niedrigere Konzentrationen beeinflussten die Zellen hingegen nur minimal. Die Behandlung mit  $200\mu\text{g/ml}$  E-LDL führte zu einer leichten,  $400\mu\text{g/ml}$  zu signifikanter Caspaseaktivierung. Mit  $400\mu\text{g/ml}$  E-LDL behandelte Zellen enthielten nur noch halb soviel ATP wie unbehandelte Kontrollzellen. Die geringe Freisetzung von LDH blieb jedoch auch bei dieser Konzentration unter dem Signifikanzniveau. LDL ( $100\mu\text{g/ml}$ ) bewirkte einen Anstieg des ATP-Gehaltes gegenüber unbehandelten Zellen (Daten nicht gezeigt).

### **3.2.2 Toxizität freier Fettsäuren gegenüber Makrophagen**

Da die freien Fettsäuren aus E-LDL für die E-LDL-induzierte Schädigung von Muskelzellen und Endothelzellen notwendig sind, lag es nahe, die Wirkung reiner Linolsäure auf Makrophagen zu prüfen. Makrophagen starben ebenfalls dosisabhängig apoptotisch durch Linolsäure. Bereits  $200\mu\text{g/ml}$  Linolsäure bewirkten eine Reduktion des ATP-Gehaltes auf die Hälfte,  $400\mu\text{g/ml}$  eine Verringerung auf nur 20 % des ATP-Gehaltes unbehandelter Zellen. Die Freisetzung von LDH erreichte bei  $400\mu\text{g/ml}$  Linolsäure Signifikanzniveau, die Caspaseaktivierung verzehnfachte sich bei dieser Konzentration gegenüber dem Ausgangsniveau.

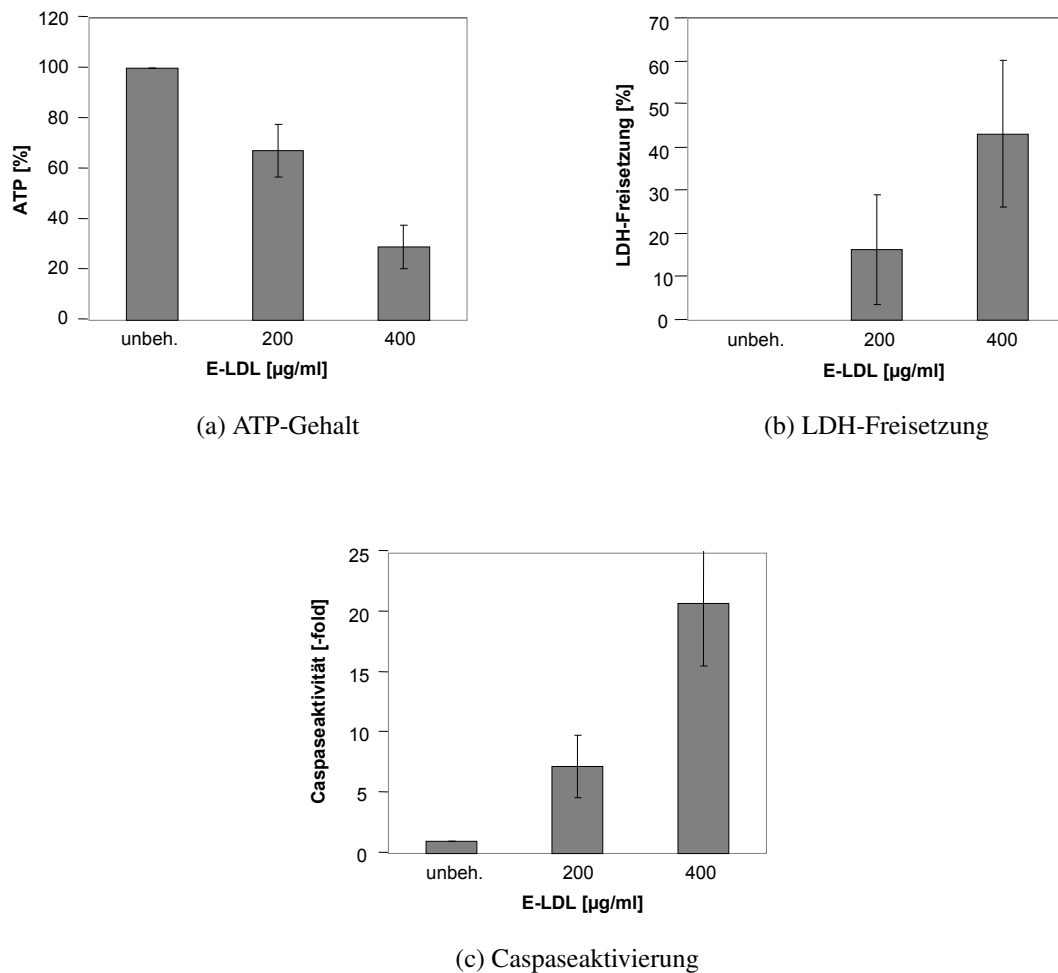


Abbildung 3.10: E-LDL ist ab einer Dosis von etwa  $400\mu\text{g/ml}$  toxisch für Makrophagen.

4 Tage gereifte humane MDM wurden für 2h mit verschiedenen Konzentrationen an E-LDL inkubiert und der ATP-Gehalt der Zellen (a), ihre LDH-Freisetzung in den Überstand bezogen auf den Gesamtgehalt der Zellen an LDH (b) sowie die Caspaseaktivität als Zeichen apoptotischen Zelltodes (c) wurden bestimmt. Der Standardfehler ist als Fehlerbalken gezeigt.

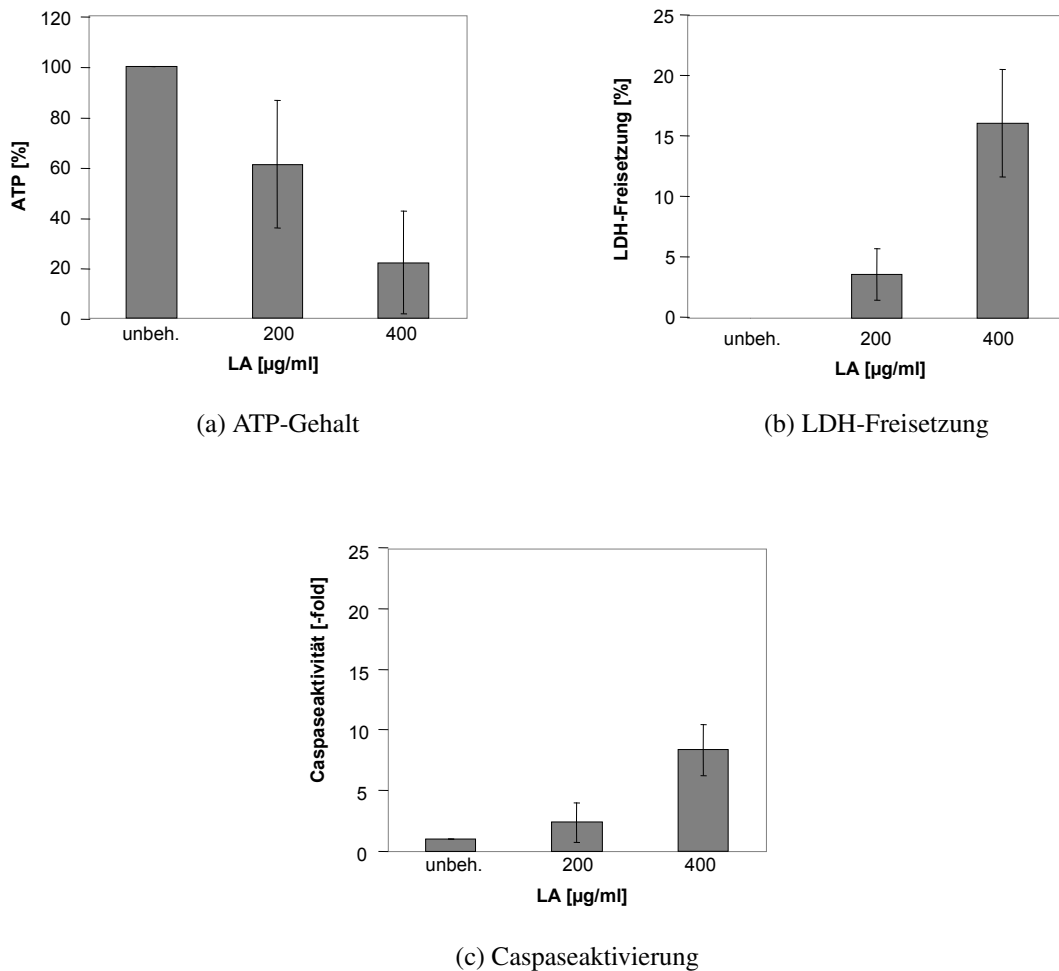


Abbildung 3.11: Linolsäure ist ebenfalls ab einer Dosis von etwa  $400\mu\text{g/ml}$  toxisch für Makrophagen.

4 Tage gereifte humane MDM wurden für 2h mit verschiedenen Konzentrationen an LA inkubiert und der ATP-Gehalt der Zellen (a), ihre LDH-Freisetzung in den Überstand bezogen auf den Gesamtgehalt der Zellen an LDH (b) sowie die Caspaseaktivität als Zeichen apoptotischen Zelltodes (c) wurden bestimmt.

### 3.2.3 Toxizität von E-LDL gegenüber Granulozyten

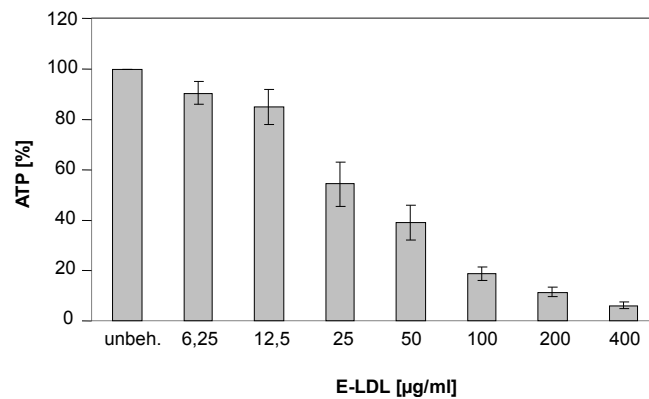
Wie bereits gezeigt [SURIYAPHOL et al. 2002] und im ersten Teil der vorliegenden Arbeit näher ausgeführt, setzen mit E-LDL behandelte Endothelzellen IL-8 frei. Dieses Chemokin lockt neben Monozyten vor allem Granulozyten an. Granulozyten sind jedoch in der Läsion nur selten und in geringer Zahl nachweisbar [JONASSON et al. 1986] [NARUKO et al. 2002]. Allerdings wurden im Atherom hohe Mengen granulozytentypischer Enzyme nachgewiesen, beispielsweise Leukozyten-Elastase, die in azurophilen Granula der Granulozyten enthalten ist

[DOLLERY und LIBBY 2006] [DOLLERY et al. 2003], und die für Neutrophile typische Matrix-Metalloproteinase 8 [HERMAN et al. 2001]. Da E-LDL auf Zellen toxisch wirkt, ist denkbar, daß Granulozyten zwar angelockt werden und in die Läsion einwandern, dort jedoch rasch durch die Einwirkung des E-LDL sterben. Alle läSIONalen Zellen sind vergleichbaren Konzentrationen an E-LDL ausgesetzt, demnach müssten Granulozyten von geringeren Mengen des atherogenen Lipoproteins tödlich geschädigt werden als beispielsweise Makrophagen oder Muskelzellen.

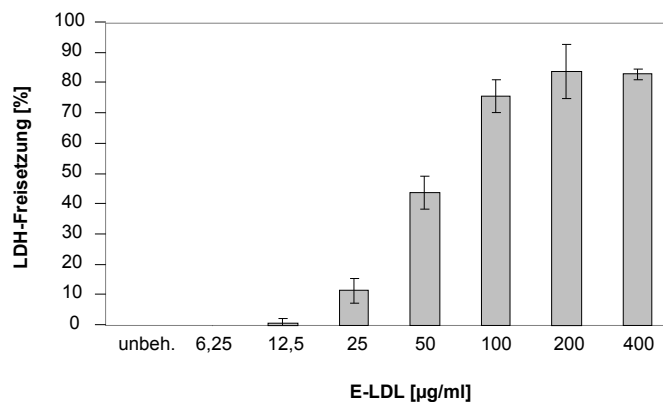
Um die Toxizität von E-LDL gegenüber Granulozyten zu ermitteln, wurden humane Granulozyten aus frischem venösen Blut isoliert. Nach Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen an E-LDL wurde ihre Schädigung anhand ihres ATP-Gehaltes, der freigesetzten Menge an LDH und ihrer Caspaseaktivierung überprüft.

Schon 25 µg/ml E-LDL senkten den ATP-Gehalt der Granulozyten auf die Hälfte; bei dieser Konzentration begann auch die Freisetzung von LDH. E-LDL-Konzentrationen von 100 µg/ml und mehr bewirkten die Freisetzung eines Großteils der zellulären Laktatdehydrogenase. Allerdings kam es im gesamten Dosisbereich zu keiner nennenswerten Steigerung der Caspaseaktivität gegenüber unbehandelten Granulozyten.

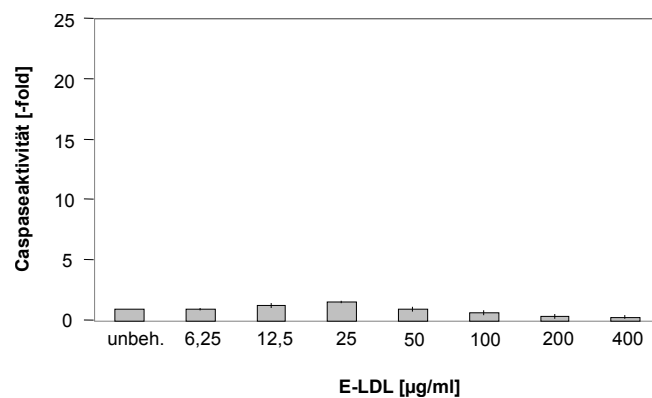
LDL erhöhte den zellulären ATP-Gehalt, oxLDL hatte keinen Effekt (vgl. Abb. 3.18).



(a) ATP-Gehalt



(b) LDH-Freisetzung



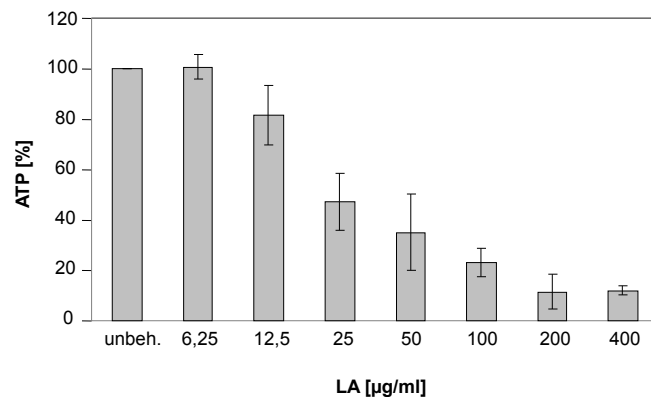
(c) Caspaseaktivierung

Abbildung 3.12: E-LDL ist für Granulozyten bereits ab einer Dosis von etwa  $25\mu\text{g/ml}$  toxisch. Humane Granulozyten wurden für 2h mit verschiedenen Konzentrationen an E-LDL inkubiert und der ATP-Gehalt der Zellen (a), ihre LDH-Freisetzung in den Überstand bezogen auf den Gesamtgehalt der Zellen an LDH (b) sowie die Caspaseaktivität als Zeichen apoptotischen Zelltodes (c) wurden bestimmt.

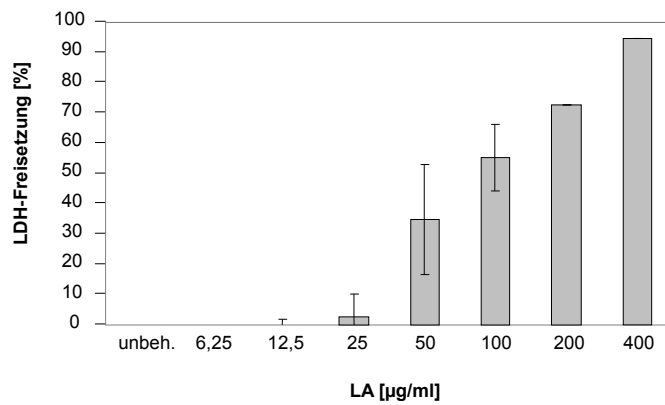
### 3.2.4 Toxizität freier Fettsäuren gegenüber Granulozyten

Die Inkubation von Granulozyten mit Linolsäure führt zu entsprechenden Werten für ATP-Gehalt, LDH-Freisetzung und Caspaseaktivierung.

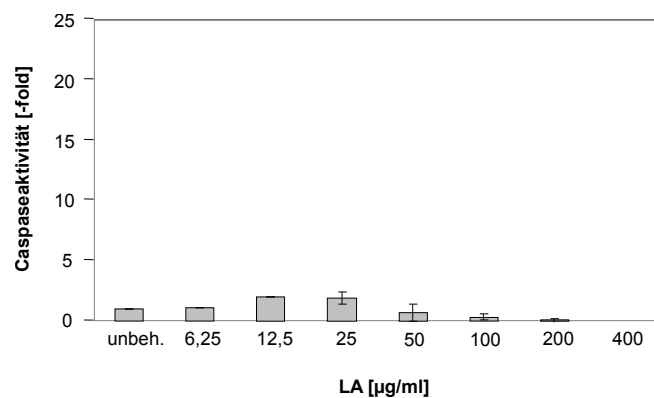
Verschiedene Fettsäuren weisen unterschiedliche Toxizität gegenüber Granulozyten auf, abhängig von der Anzahl an Doppelbindungen, die sie enthalten. Die gesättigte Stearinsäure bewirkt weder ein Absinken des ATP-Gehaltes noch eine Aktivierung der zellulären Caspasen. Unter den gewählten Versuchsbedingungen ist sie untoxisch. Zu vergleichbarem ATP-Abfall und minimaler Caspaseaktivierung führen die einfach ungesättigte Ölsäure und die doppelt ungesättigte Linolsäure, während Arachidonsäure die höchste Toxizität aufweist. Sie bewirkt schon in einer Konzentration von  $6,25\mu\text{g/ml}$  einen leichten Caspaseanstieg. Zu beachten ist allerdings der Kontrast zwischen einer Vervierfachung der Caspasen in diesem Experiment und dem wesentlich stärkeren Anstieg der Caspaseaktivität in Makrophagen. Ein vorwiegend apoptotischer Zelltod von Granulozyten durch Arachidonsäure läßt sich aus dem Experiment nicht ableiten.



(a) ATP-Gehalt



(b) LDH-Freisetzung



(c) Caspaseaktivierung

Abbildung 3.13: Linolsäure ist für Granulozyten ebenfalls toxisch. Die Schädigung erfolgt bereits bei einer Dosis von etwa  $25\mu\text{g/ml}$ .

Humane Granulozyten wurden für 2h mit verschiedenen Konzentrationen an Linolsäure inkubiert und der ATP-Gehalt der Zellen (a), ihre LDH-Freisetzung in den Überstand bezogen auf den Gesamtgehalt der Zellen an LDH (b) sowie die Caspaseaktivität als Zeichen apoptotischen Zelltodes (c) wurden bestimmt.

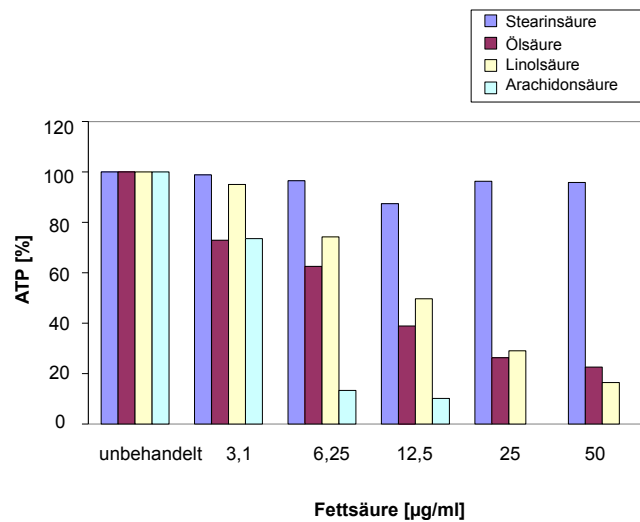


Abbildung 3.14: ATP-Gehalt von Granulozyten nach 2h Behandlung mit verschiedenen Fettsäuren.

Frisch isolierte humane Granulozyten wurden für 2h mit Stearinsäure, Ölsäure, Linolsäure oder Arachidonsäure behandelt, danach wurde ATP gemessen.

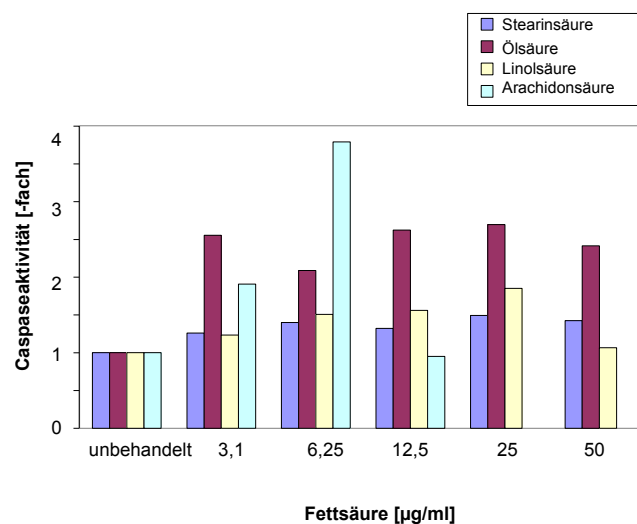


Abbildung 3.15: Caspaseaktivierung von Granulozyten nach 2h Behandlung mit verschiedenen Fettsäuren.

Frisch isolierte humane Granulozyten wurden für 2h mit Stearinsäure, Ölsäure, Linolsäure oder Arachidonsäure behandelt und die Aktivierung der Caspasen 3 und 7 wurde bestimmt.

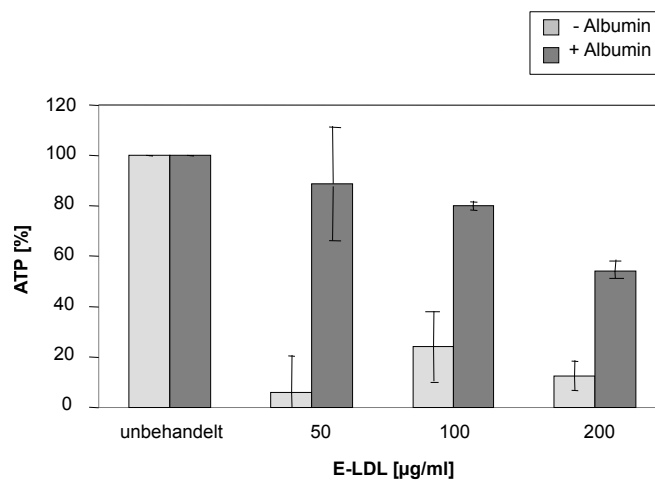


Abbildung 3.16: Albumin schützt vor der Toxizität von E-LDL.

Granulozyten wurden mit und ohne Albuminzusatz für 2h mit E-LDL behandelt und ihr ATP-Gehalt wurde gemessen.

### 3.2.5 Albumin schützt vor der fettsäurebedingten Toxizität

Da Albumin freie Fettsäuren bindet [SURIYAPHOL et al. 2002], sollten sich Zellen vor fettsäurebedingter E-LDL-Toxizität durch Zugabe von fettsäurefreiem Albumin schützen lassen.

Granulozyten wurden unter Zusatz von 2% fettsäurefreiem Albumin mit E-LDL inkubiert. Bis zu einer Konzentration von 100 µg/ml E-LDL waren die Zellen durch Albumin geschützt und zeigen kaum ATP-Abfall, während der zelluläre ATP-Gehalt ohne Albumin bereits bei 50 µg/ml E-LDL unter 20% fiel.

Wurden die Granulozyten direkt mit Linolsäure inkubiert, waren sie vor Konzentrationen bis zu 500 µg/ml durch Albumin geschützt. Dies entspricht bei 2 % Albumin im Serum dem bekannten maximalen molaren Bindungskoeffizienten für freie Fettsäuren an Albumin. [SIMARD et al. 2005].

E-LDL mit reduziertem Gehalt an freien Fettsäuren des E-LDL kann durch Vorbehandlung mit verschiedenen Konzentrationen an fettsäurefreiem Albumin hergestellt werden. Durch Flotation über einem Dichtegradienten wird das so behandelte E-LDL vom Albumin und den daran gebundenen Fettsäuren wieder abgetrennt [SURIYAPHOL et al. 2002]. Je nach Konzentration an Albumin bezeichnen wir das Endprodukt als d4 (E-LDL mit 4 % Albumin inkubiert) oder d10 (E-LDL mit 10 % Albumin inkubiert). Alle fettsäurebedingten Effekte des E-LDL werden durch

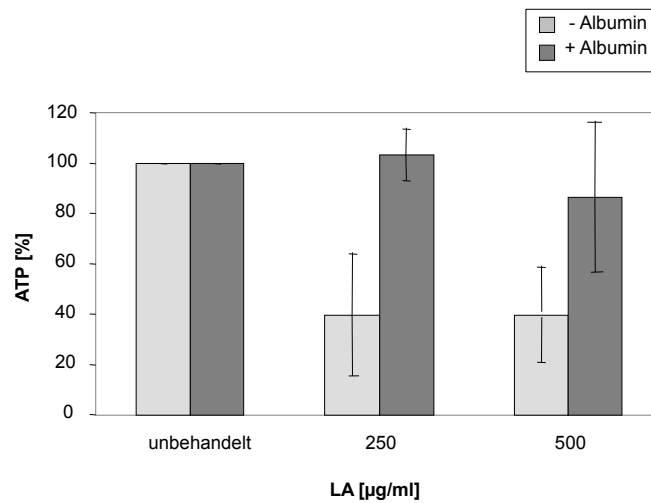


Abbildung 3.17: Albumin schützt vor der Toxizität von Linolsäure.

ATP-Gehalt von Granulozyten nach 2h Behandlung mit Linolsäure, mit und ohne Albumin im Medium.

diese Behandlung reduziert.

Die Toxizität von E-LDL d4 und d10 auf Granulozyten ist aus Abb. 3.18 ersichtlich. Den höchsten ATP-Gehalt wiesen Zellen nach Behandlung mit LDL auf, auch nach Behandlung mit oxLDL war er höher als bei den unbehandelten Zellen. (Der ATP-steigernde Effekt von LDL wurde in den vorangegangenen Abschnitten bereits erwähnt.) E-LDL d10 bewirkte einen merklich geringeren ATP-Verlust der Zellen verglichen mit unverändertem E-LDL, während die Schädigung durch E-LDL d4 nur unwesentlich geringer ausfiel. Statistisch signifikant war dieser Unterschied nicht.

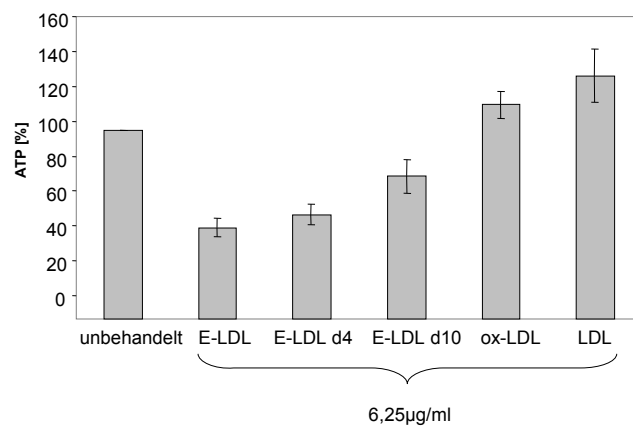


Abbildung 3.18: ATP-Gehalt von Granulozyten nach Behandlung mit modifizierten Lipoproteinen in Abhängigkeit ihres Gehaltes an freien Fettsäuren.

Frisch isolierte Granulozyten wurden mit je  $6,25\mu\text{g/ml}$  Lipoprotein für 2h behandelt, dann wurde ihr ATP-Gehalt bestimmt.

### 3.2.6 Unterschiedliche Empfindlichkeit von Granulozyten und Makrophagen gegenüber fettsäurebedingter Toxizität

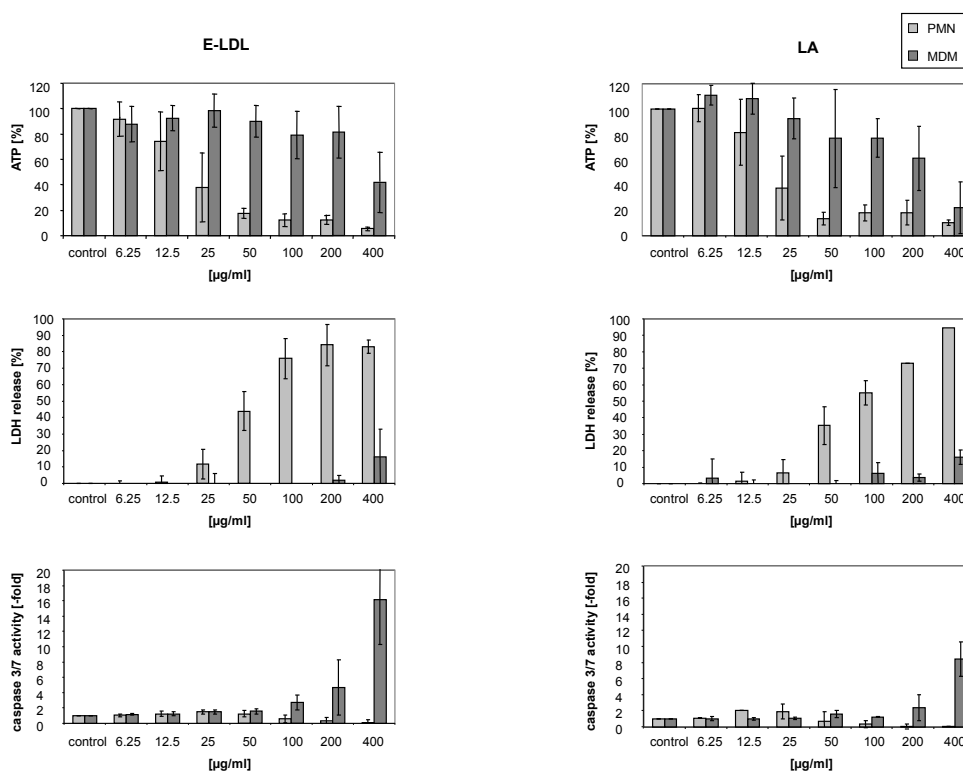


Abbildung 3.19: E-LDL und Linolsäure wirken auf Granulozyten stärker toxisch als auf Makrophagen.

Gegenüberstellung des ATP-Gehaltes, der Caspaseaktivierung und der LDH-Freisetzung von Granulozyten und Makrophagen.

Granulozyten wurden bereits von wesentlich niedrigeren Konzentrationen an E-LDL und Linolsäure geschädigt als Makrophagen. Beim Vergleich des ATP-Verlustes von Makrophagen und Granulozyten nach Inkubation mit E-LDL fiel auf, daß die Makrophagen erst von der vierfachen granulozytotoxischen Konzentration des Lipoproteins geschädigt wurden. Die folgende Gegenüberstellung verdeutlicht den Unterschied, der zwischen Zellen desselben Spenders unter Verwendung von E-LDL derselben Charge auftrat. Die zeitlich parallele Durchführung der Expe-

perimente mit Granulozyten und Makrophagen war aufgrund der Ausreifungszeit der Makrophagen nicht möglich, allerdings zeigte sich ein etwas geringerer Unterschied in der Empfindlichkeit bereits zwischen frisch isolierten Monozyten und Granulozyten desselben Spenders. Wurden die für das Granulozyten-Experiment verwendeten E-LDL-Verdünnungen bei 4 °C gelagert und für die Behandlung der Makrophagen ebenfalls verwendet, blieb der Unterschied bestehen. Eine Abschwächung der E-LDL-Wirkung durch die Lagerung konnte also ausgeschlossen werden.

Während Makrophagen ihre Energie durch Glykolyse und Fettsäureabbau in den Mitochondrien gewinnen, stammt das ATP der Granulozyten hauptsächlich aus dem Abbau ihrer großen Glykogenspeicher. Der Vergleich der LDH-Freisetzung von PMN und MDM zeigt, daß der unterschiedliche ATP-Verlust der Zellen nicht nur Zeichen verschiedener Stoffwechselwege, sondern einer unterschiedlichen Empfindlichkeit gegenüber der Toxizität von E-LDL ist.

## 3.3 Lipidaufnahme von Makrophagen und Granulozyten durch Inkubation mit E-LDL

### 3.3.1 Cholesterolaufnahme

Makrophagen weisen nach Behandlung mit E-LDL einen erhöhten Cholesterolgehalt auf [KAPINSKY et al. 2001]. Die Aufnahme von Cholesterol wird generell als Mechanismus der Schaumzellbildung in der Läsion angesehen, zudem für die Toxizität veränderter Lipoproteine verantwortlich gemacht [FENG et al. 2003].

Die Cholesterolaufnahme von Granulozyten wurde unter den für die Toxizitätsversuche gewählten Bedingungen untersucht und gleichzeitig die der Makrophagen überprüft. Dazu wurden behandelte Zellen gewaschen, mittels Detergens lysiert und die Proben konnten dank einer Kooperation mit Prof. Dr. Gerd Schmitz in Regensburg massenspektrometrisch untersucht werden. Unbehandelte Zellen enthielten etwa 10 nmol Cholesterol pro mg zellulären Proteins.

Der Gehalt an verestertem Cholesterol verzehnfachte sich in Granulozyten nach Inkubation mit E-LDL, während er in Makrophagen unverändert blieb. Dies steht nicht in Widerspruch zu anderen bereits publizierten Untersuchungen an Makrophagen [KAPINSKY et al. 2001], da diese mit wesentlich längeren Inkubationszeiten durchgeführt wurden und die Makrophagen anders ausgereift wurden.

Natives LDL führte zu einer leichten, nicht signifikanten Erhöhung des Cholesterolestergehaltes von Granulozyten. Das freie Cholesterol der Zellen stieg in E-LDL-behandelten Granulozyten ebenfalls signifikant an, während LDL hier keinen Effekt hatte. Lipidbehandelte Makrophagen zeigten keine Veränderung des Gehaltes an freiem Cholesterol.

Nach den vorliegenden Daten konnte allerdings nicht sicher zwischen an Zellen gebundenem und in die Zellen aufgenommenem Cholesterol unterschieden werden. Durch mehrere Waschschriffe und Überführen in ein anderes Gefäß wurde ausgeschlossen, daß an die Oberfläche der Zellkulturplatte adsorbiertes Lipoprotein mitgemessen wurde; entsprechende Kontrollen waren negativ (Daten nicht gezeigt).

Während die freien Fettsäuren des E-LDL für dessen toxische Wirkung verantwortlich waren, nahmen Zellen parallel dazu auch das freie Cholesterol aus dem veränderten Lipoprotein auf. Die vorliegenden Daten lassen eine Aufnahme des ganzen E-LDL-Partikels vermuten, die auf einem bislang noch unklaren Weg erfolgen könnte.

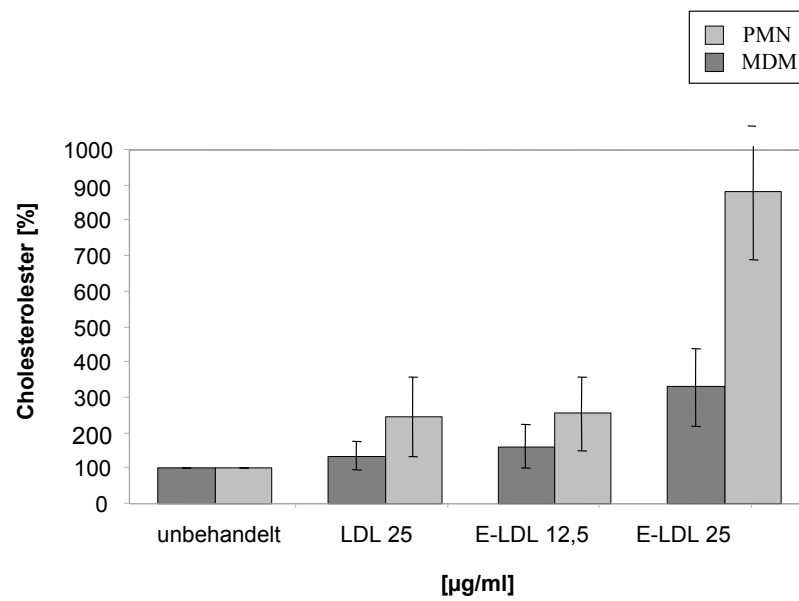


Abbildung 3.20: Mit E-LDL behandelte Granulozyten enthalten mehr Cholesterolester als Makrophagen.

Die Zellen wurden für 2 Stunden mit E-LDL bzw. LDL inkubiert, gewaschen, lysiert und ihr Cholesterolgehalt wurde nach Lipidextraktion nach Bligh/Dyer mittels GC-MS analysiert.

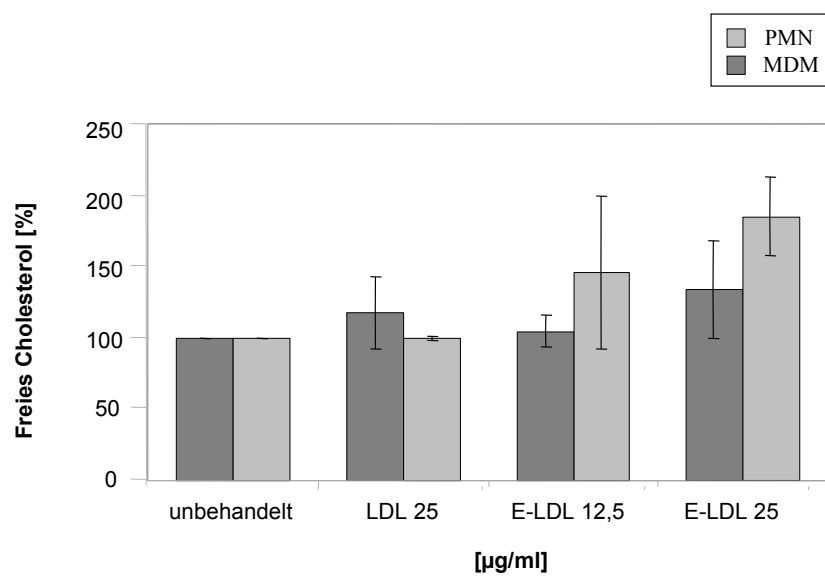


Abbildung 3.21: Mit E-LDL behandelte Granulozyten enthalten mehr freies Cholesterol als Makrophagen.

Die Behandlung der Zellen und die Analyse erfolgten wie bei der Bestimmung der Cholesterolester.

### 3.3.2 Schaumzellbildung

Es wurde bereits gezeigt, daß E-LDL die Schaumzellbildung in Makrophagen induziert [BHAKDI et al. 1995]. Die sich dabei in den Zellen ansammelnden Lipidtröpfchen lassen sich mit Oil Red O anfärben. Oil Red O ist ein sogenanntes Lysochrom, ein lipophiler Farbstoff, der sich an Fette in Zellen anlagert. Er ist spezifisch für Triglyceride und Cholesterolester; unverestertes Cholesterol färbt er dagegen nicht [KRUTH 1984].

Die Schaumzellbildung von Granulozyten wurde bislang noch nicht untersucht. Inwiefern eine Schaumzellbildung unter den Bedingungen der Toxizitätsversuche (kurze Inkubationszeit von nur 2h, relativ hohe Konzentrationen an E-LDL, kein Serum) eintritt, wurde für Makrophagen und für Granulozyten überprüft.

Granulozyten entwickelten genauso wie Makrophagen Oil Red O-positive Lipidtröpfchen nach Inkubation mit E-LDL, aber nicht durch die Behandlung mit nativem LDL. Sie enthielten meist nur einen einzigen großen Lipidkörper je Zelle, während die Makrophagen angefüllt mit einer Vielzahl roter Tropfen erschienen.

Nach Inkubation mit E-LDL wurde sowohl eine Ansammlung von Triglyceriden [KAPINSKY et al. 2001] als auch eine erhöhte intrazelluläre Konzentration freier Fettsäuren [BUECHLER et al. 2001] beobachtet. Als 'lipid bodies' bezeichnete Fetttröpfchen sammeln sich in neutrophilen Granulozyten nach Inkubation mit freien Fettsäuren innerhalb einer Stunde [WELLER et al. 1991]. Daher wurde die Abhängigkeit der Bildung der intrazellulären Lipidtröpfchen vom Angebot an freier Linolsäure in einem weiteren Experiment untersucht.

Vor allem die Makrophagen zeigten eine starke Ansammlung roter Öltröpfchen nach Behandlung mit Linolsäure. Der sehr schwache rötliche Schimmer an den Granulozyten trat bei längerer Inkubationszeit mit niedrigen Linolsäurekonzentrationen deutlich stärker auf (Daten nicht gezeigt). Die durch Oil-Red-O-Färbung gezeigte Schaumzellbildung war demnach nicht generell von der Aufnahme freien Cholesterols aus E-LDL abhängig.

## 3.4 Granulozyten werden von E-LDL und freien Fettsäuren aktiviert

Eine Voraktivierung der Granulozyten ermöglicht erst ihre Einwanderung ins Gewebe und ihre effektive Beteiligung an der Immunabwehr. Aktivierte Granulozyten sind bereit zur Phagozytose,

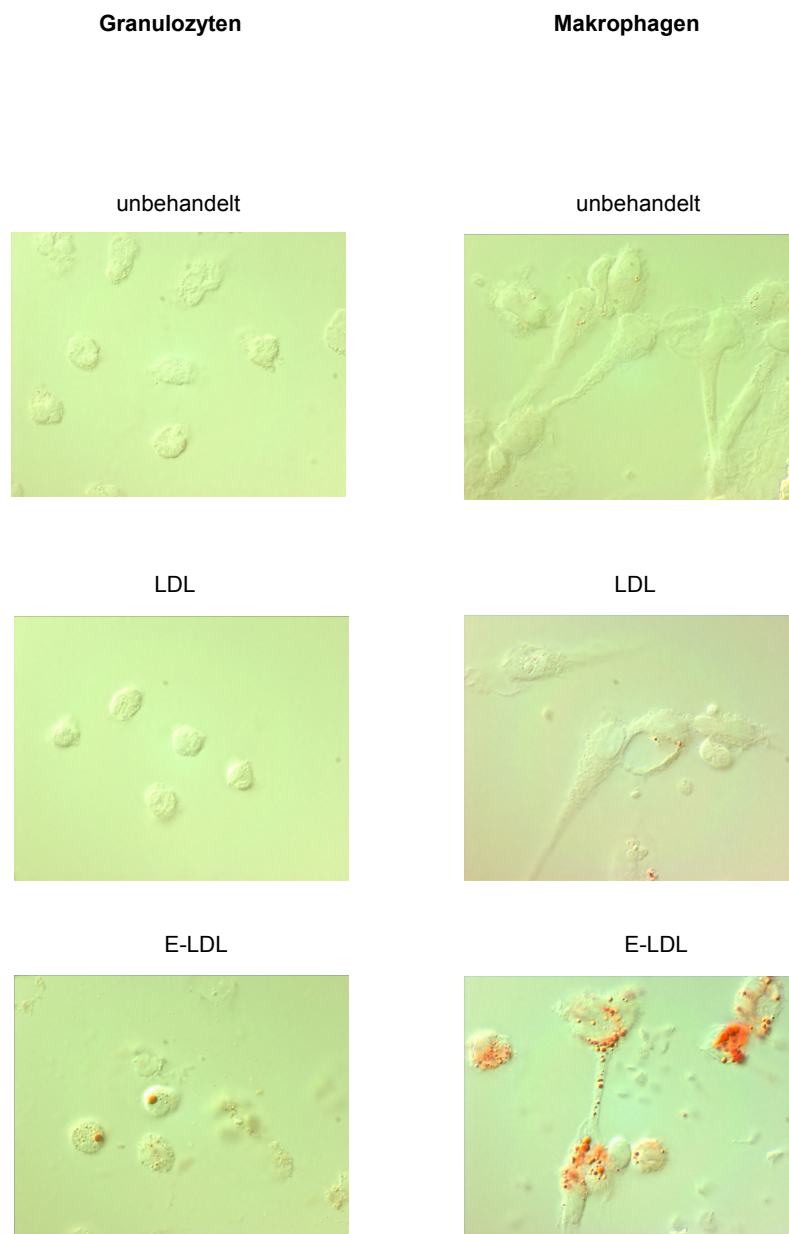


Abbildung 3.22: Granulozyten und Makrophagen weisen nach Behandlung mit E-LDL Fetttropfen auf.

Die Zellen wurden für 2 Stunden mit  $50\mu\text{g/ml}$  E-LDL bzw. LDL inkubiert, fixiert und mit Oil Red O angefärbt.

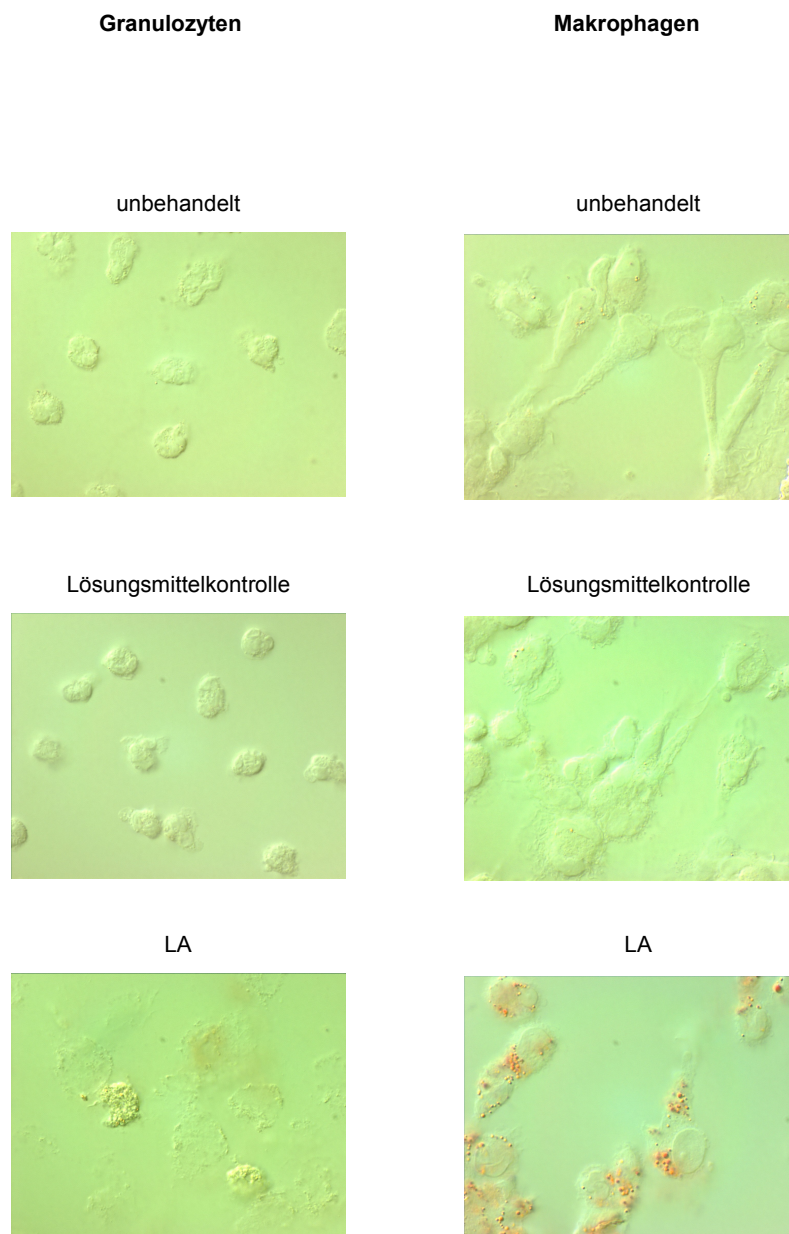


Abbildung 3.23: Granulozyten und Makrophagen enthalten auch nach Behandlung mit Linolsäure Fetttropfen.

Die Zellen wurden für 2 Stunden mit  $50\mu\text{g/ml}$  Linolsäure bzw. der entsprechenden Lösungsmittelkontrolle inkubiert, fixiert und mit Oil Red O angefärbt.

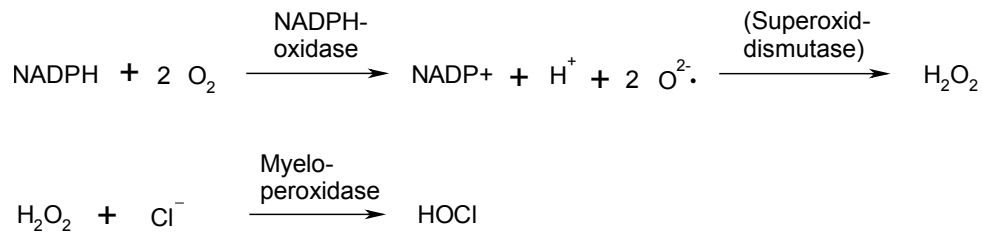


Abbildung 3.24: Entstehung von Sauerstoffradikalen, Wasserstoffperoxid und Hypochloriger Säure beim respiratorischen Burst von PMN

setzen durch Degranulierung Cytokine und Enzyme frei und produzieren freie Sauerstoffradikale. Die Erhöhung des intrazellulären Calciums ist ein zentraler Vorgang der für die Aktivierung wichtigen Signalkaskaden.

### 3.4.1 E-LDL und Linolsäure bewirken einen *respiratory burst* in Granulozyten

Granulozyten, die Bakterien aufnehmen, machen diese unter anderem durch freie Sauerstoffradikale unschädlich. Beim sogenannten respiratorischen Burst wandelt das Enzym NADPH-Oxidase molekularen Sauerstoff in Superoxidanionen um, während NADPH als Elektronendonator zu  $\text{NADP}^+ + \text{H}^+$  oxidiert wird. Die Superoxidanionen reagieren spontan oder katalysiert durch Superoxid-dismutase zu Wasserstoffperoxid weiter. Die Myeloperoxidase der Granulozyten katalysiert die Reaktion von Wasserstoffperoxid und Chloridionen zu hypochloriger Säure. Die freiwerdenden Radikale und Verbindungen können eine Vielzahl von Reaktionen in benachbarten Zellen auslösen.

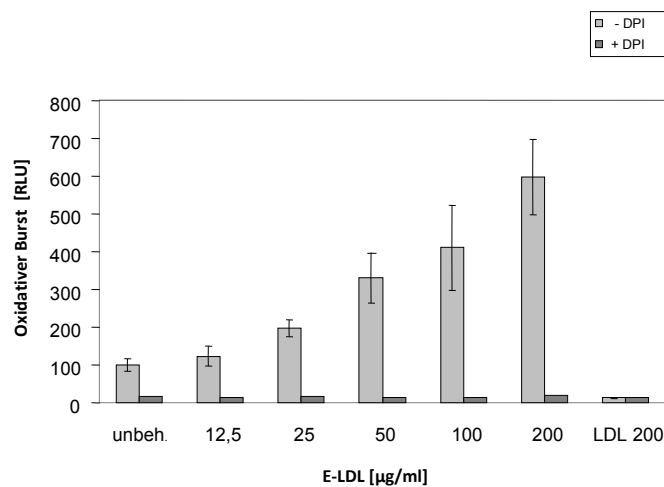


Abbildung 3.25: E-LDL verursacht einen *respiratory burst* in Granulozyten.

Granulozyten mit und ohne Vorbehandlung mit DPI wurden mit E-LDL versetzt und die freiwerdenden Sauerstoffradikale durch Chemilumineszenz von Luminol nachgewiesen.

Humane Granulozyten wurden mit E-LDL sowie Linolsäure inkubiert und die freigesetzten Sauerstoffradikale wurden durch Chemilumineszenzmessung in Anwesenheit von Luminol ermittelt. Diphenyliodonium (DPI) hemmt den oxidativen Burst durch Inhibition der NADPH-Oxidase neutrophiler Granulozyten. Vermutlich phenyliert es das Flavoproteingerüst des FAD, eines von zwei Redox-Zentren des Enzyms. [O'DONNELL et al. 1993]

Nach Behandlung mit E-LDL wurden dosisabhängig und durch DPI vollständig hemmbar Sauerstoffradikale freigesetzt.

Die in E-LDL enthaltenen und für Granulozyten toxischen freien Fettsäuren Linolsäure und Arachidonsäure riefen ebenfalls eine Ausschüttung von Sauerstoffradikalen hervor, die durch DPI gehemmt wurde.

Der Nachweis des *respiratory burst* nach Anregung mit E-LDL oder Fettsäuren legte nahe, daß die behandelten Granulozyten in einen aktivierten Zustand versetzt wurden.

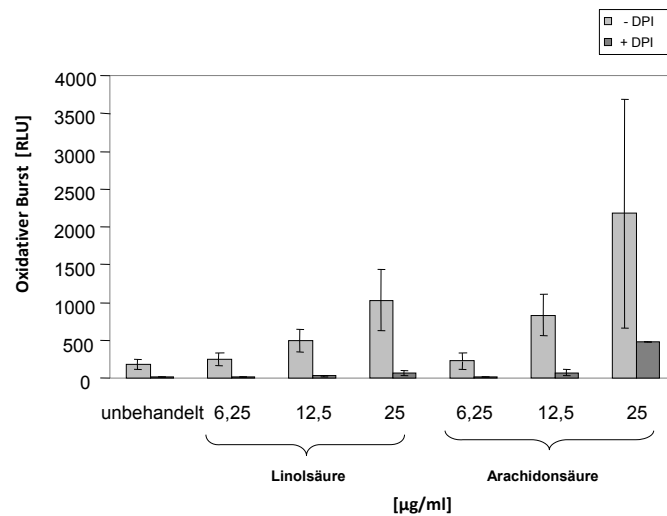


Abbildung 3.26: Fettsäuren verursachen einen *respiratory burst* in Granulozyten.

Granulozyten mit und ohne Vorbehandlung mit DPI wurden mit Linolsäure und Arachidonsäure versetzt und die freiwerdenden Sauerstoffradikale durch Chemilumineszenz von Luminol nachgewiesen.

### 3.4.2 E-LDL und Linolsäure bewirken einen Calciumeinstrom in Granulozyten

Daraufhin wurde untersucht, ob E-LDL und Fettsäuren einen Calcium-Influx in Granulozyten auslösen.

Anhand der Fluoreszenzänderung von Fura-2 wird deutlich, daß die intrazelluläre Calciumkonzentration abhängig von der verwendeten E-LDL-Dosis anstieg. Weder natives LDL noch das zur Herstellung von E-LDL verwendete Enzymgemisch veränderten den Calciumspiegel (Daten nicht gezeigt).

### 3.4.3 E-LDL und Linolsäure bewirken die Sekretion vesikulärer Inhaltsstoffe aus Granulozyten

Aktivierte Granulozyten setzen Chemokine und verschiedene antimikrobielle Substanzen aus ihren Granula frei. Ein Hauptbestandteil und Marker der azurophilen Granula ist die Myeloperoxidase, die aus freien Sauerstoffradikalen und Halogenionen reaktive Stoffe bildet, die beispielsweise Bakterien abtöten. Als weiteres Indiz für den aktivierten Zustand der Granulozyten

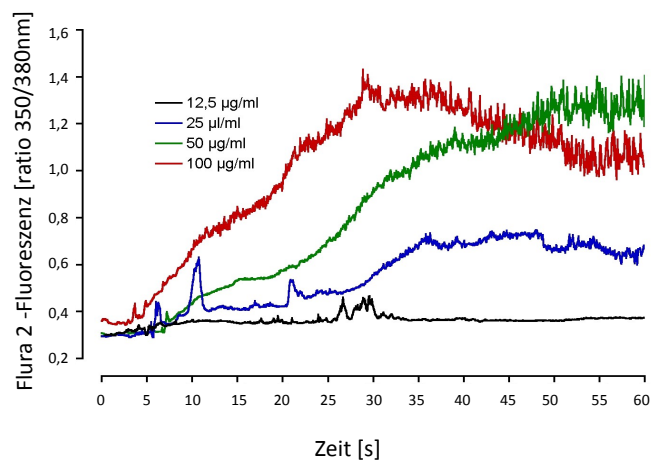


Abbildung 3.27: E-LDL bewirkt einen Calciumeinstrom in Granulozyten.

Granulozyten wurden mit verschiedenen Konzentrationen an E-LDL behandelt und intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  mittels Fura-2 Fluoreszenzmessung bestimmt.

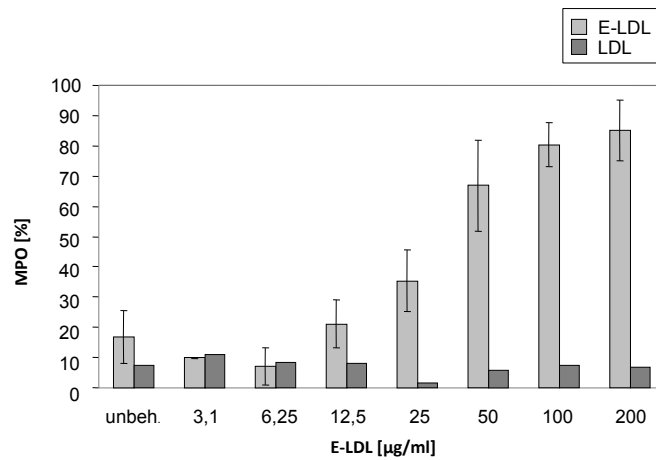


Abbildung 3.28: E-LDL führt zur Freisetzung von Peroxidasen aus PMN-Granula.

Granulozyten wurden mit unterschiedlichen Dosen an E-LDL und LDL behandelt und ihr Überstand wurde auf Peroxidaseaktivität geprüft.

wurde die Peroxidaseaktivität des Überstandes nach Inkubation mit LDL, E-LDL und Linolsäure bestimmt.

Durch Behandlung mit E-LDL stieg die Peroxidaseaktivität im Überstand der Granulozyten an, abhängig von der verwendeten Dosis und dem Fettsäuregehalt des E-LDL. LDL blieb inaktiv, ebenso Linolsäure allein (nicht gezeigt). Das Lipoprotein als Trägerpartikel scheint für die De-granulierung bedeutsam zu sein.

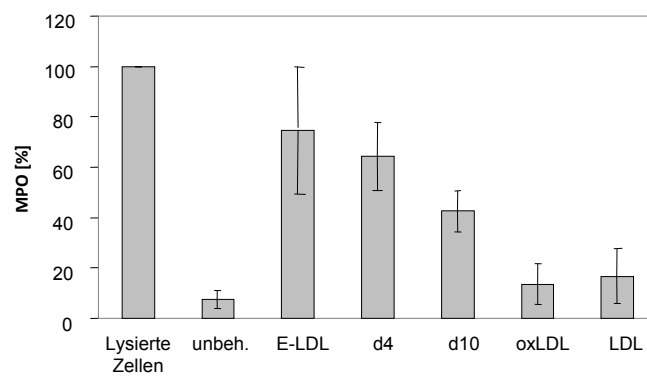


Abbildung 3.29: Die Freisetzung von Peroxidasen aus PMN-Granula durch E-LDL ist abhängig vom Fettsäuregehalt des Lipoproteins. Granulozyten wurden mit E-LDL, oxLDL sowie fettsäuredepletiertem E-LDL behandelt und ihr Überstand wurde auf Peroxidaseaktivität geprüft.

## 3.5 Mechanismus der Toxizität von E-LDL und Linolsäure auf Granulozyten

### 3.5.1 Der Zelltod erfolgt durch Nekrose

Irreversibel geschädigte Zellen können den programmierten Zelltod, die Apoptose, einleiten. Dabei bleibt die Zellmembran intakt, die DNA der Zelle wird gespalten und schließlich schnürt die Zelle Vesikel, sogenannte apoptotic bodies, ab. Phosphatidylserin, das normalerweise auf der Innenseite der Zellmembran sitzt, verlagert sich bei der Apoptose nach außen und dient als Signal für Phagozyten, die Zellreste aufzunehmen. So wird vermieden, daß unkontrolliert freiwerdende Inhaltsstoffe dem umliegenden Gewebe schaden.

Im Gegensatz dazu ist die Nekrose oder Onkose ein ungesteuerter Prozeß, der zur Schädigung umliegender Zellen und Gewebe führen kann.

Um zu prüfen, ob mit E-LDL behandelte Granulozyten durch Apoptose sterben - wie bereits für andere Zelltypen gezeigt wurde - oder ob sie nekrotisch zugrunde gehen, wurde eine Doppelfärbung mit Einzelzellanalyse in der Durchflußzytometrie eingesetzt. An den Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin gekoppeltes Annexin diente als Marker für apoptotische Zellen, da es an das externalisierte Phosphatidylserin bindet. Der Zelltod wurde durch Anfärbung der DNA mit 7-AAD nachgewiesen. 7-AAD dringt in Zellen ein, deren Plasmamembran durchlässig geworden ist.

Wie in Abbildung 3.30 gezeigt, bildete sich eine sowohl Annexin- als auch 7-AAD-positive Fraktion der Granulozyten aus. Auch geringere Konzentrationen an E-LDL und längere Inkubationszeiten (bis zu 8h) führten zu einem vergleichbaren Resultat: eine lediglich Annexin-positive, also rein apoptotische Zellpopulation entstand dabei nicht. Der Schluß liegt nahe, dass die Granulozyten durch E-LDL vorwiegend nekrotisch sterben. Wurden Granulozyten hingegen über einen längeren Zeitraum ohne E-LDL kultiviert, verstärkte sich die Annexinbindung deutlich. Es ist anzunehmen, daß sie aufgrund ihrer kurzen Lebensdauer bereits ein Anfangsstadium der konstitutiven Apoptose erreicht hatten.

Dies legt einen nekrotischen Zelltod der PMN nahe.

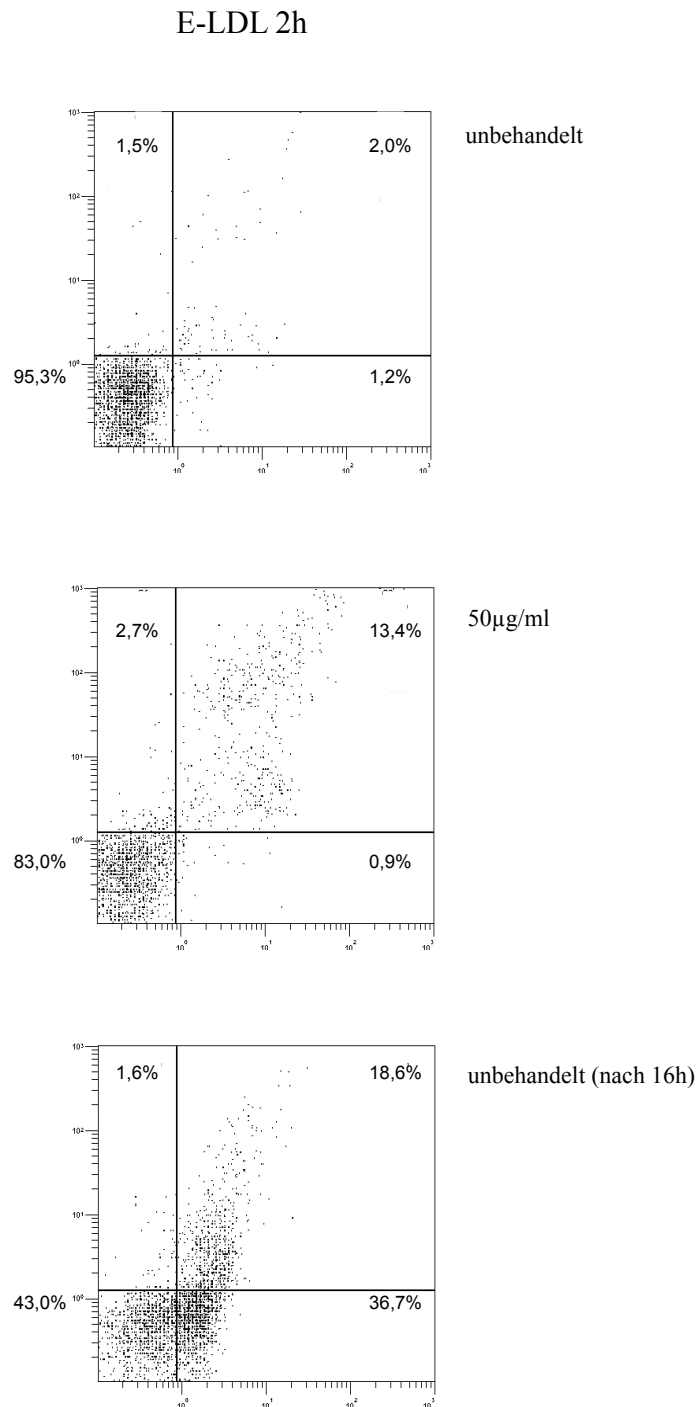


Abbildung 3.30: Granulozyten sterben durch E-LDL vorwiegend nekrotisch.

Granulozyten wurden in Medium (unbehandelt) oder mit E-LDL für 2h inkubiert. Annexin-PE diente als Apoptosemarker, das Eindringen von 7-AAD in die Zellen zeigte den Verlust der Integrität der Zellmembran an. Granulozyten nach 16h Kultur in serumfreiem Medium wiesen eine stärkere Annexinbindung auf (unterstes Bild).

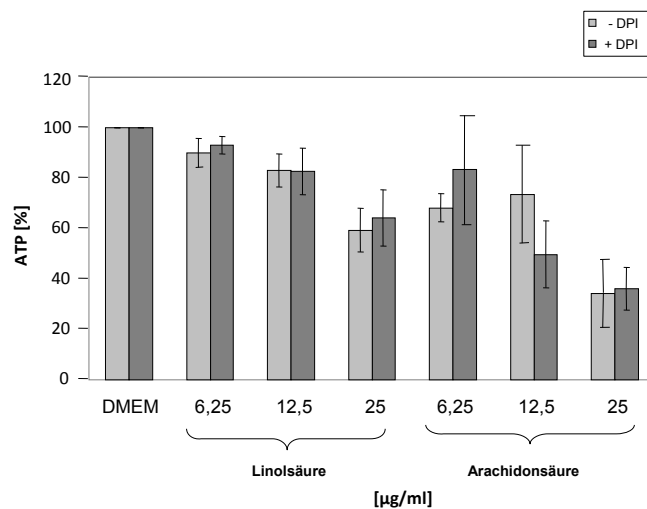


Abbildung 3.31: Viabilität von Granulozyten, deren *respiratory burst* geblockt wurde.

PMN wurden mit DPI vorbehandelt, nach Inkubation mit Linolsäure und Arachidonsäure wurde ihr ATP-Gehalt gemessen.

### 3.5.2 Aktivierung von Granulozyten bedingt nicht die Toxizität

Die von Granulozyten selbst produzierten reaktiven Sauerstoffspezies können zum Zelltod führen [SCHEEL-TOELLNER et al. 2004]. Um zu prüfen, ob der durch freie Fettsäuren ausgelöste oxidative Burst der Granulozyten auf diese Weise auch ihren Zelltod bedingt, wurde der Burst durch Zugabe von DPI gehemmt und den ATP-Gehalt der Zellen gemessen. Die Reduktion des ATP-Gehaltes war bei ungehemmtem und gehemmttem oxidativen Burst gleich; die Zellen konnten nicht geschützt werden.

Weiterhin wurden durch Zugabe des Antioxidans NAC beim oxidativen Burst entstehende Sauerstoffradikale abgefangen und per ATP-Messung geprüft, ob die Zellen so vor der Schädigung durch freie Fettsäuren bewahrt werden konnten. Das war jedoch nicht der Fall; der ATP-Verlust der Zellen blieb mit NAC ähnlich groß wie ohne Zugabe des Antioxidans.

Der durch E-LDL verursachte Calciuminflux trägt zur Aktivierung der Zellen bei und könnte damit auch den Zelltod bedingen. Calcium kann entweder aus dem Medium durch die Plasmamembran in die Zellen eindringen oder aus intrazellulären Speichern ausgeschüttet werden. Wurden Granulozyten in Medium, dessen Calcium durch Chelatbildung mittels EGTA gebunden war, mit E-LDL stimuliert, war in der Durchflußzytometrie kein Calciumeinstrom nachweisbar. E-LDL verursachte demnach einen Einstrom von extrazellulärem Calcium. Eine Freiset-

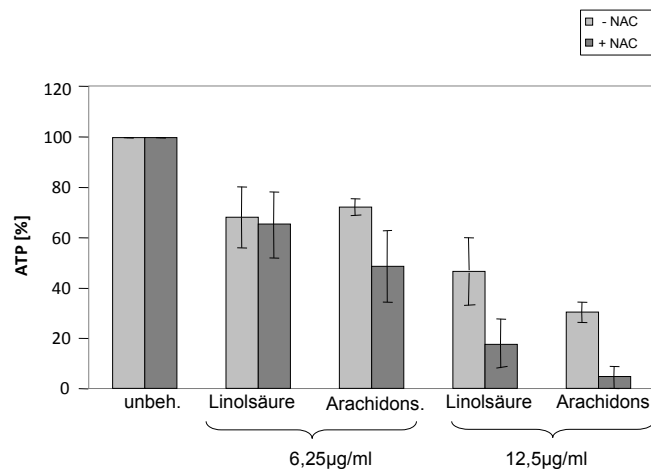


Abbildung 3.32: Viabilität von Granulozyten unter Antioxidanzienzusatz.

PMN wurden in Anwesenheit von 30mM N-Acetylcystein mit Linolsäure und Arachidonsäure behandelt. Gemessen wurde der ATP-Gehalt der Zellen.

zung des Ions aus intrazellulären Speichern, wie sie für Arachidonsäure und Linolsäure berichtet wurde [BEAUMIER et al. 1987] , erfolgt möglicherweise zusätzlich. Dieser Vorgang reicht jedoch nicht zur Erklärung der vorliegenden Daten aus. Eine ATP-Messung nach Behandlung der Granulozyten mit E-LDL und Linolsäure ergab unter calciumfreien Bedingungen gleich starke Zellschädigung wie in normalem, calciumhaltigen Medium. Der Calciuminflux war nicht notwendig für den Zelltod durch E-LDL.

### 3.5.3 E-LDL und Linolsäure schädigen Zellmembranen

Es ist bekannt, daß ungesättigte freie Fettsäuren in Membranen interkalieren können und durch ihre Doppelbindungen die Membranstruktur stören. Werden die Fettsäuren zu Erythrozyten gegeben, kann die Membranstörung bis hin zur Disruption gehen, so daß die roten Blutkörperchen ihr Hämoglobin freigegeben. Die zytotoxische Wirkung von E-LDL war unabhängig von deren Zellaktivierenden Eigenschaften und zeigte lediglich zelltypspezifische Unterschiede. Eine direkte Einwirkung des modifizierten Lipoproteins auf die Zellmembran würde eine plausible Erklärung für diesen Befund bieten.

Erythrozyten wurden mit E-LDL und Linolsäure inkubiert und das Ausmaß ihrer Lyse durch Bestimmen der Hämoglobinkonzentration im Überstand festgestellt. Beide Agenzien bewirkten

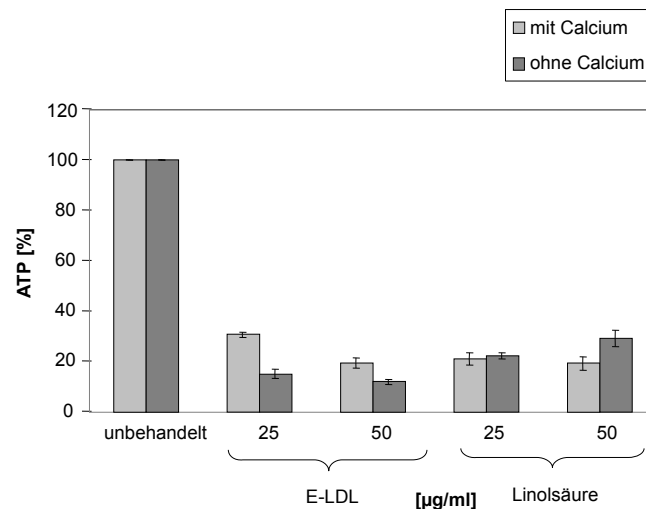


Abbildung 3.33: Abhängigkeit der fettsäurebedingten Schädigung von Granulozyten vom Calciumeinstrom.

Zellen wurden in calciumhaltigem und calciumfreiem Medium mit E-LDL und Linolsäure behandelt und ihr ATP-Gehalt wurde bestimmt.

eine dosisabhängige Hämolyse. Erythrozyten sind kernlose Zellen. Es ist davon auszugehen, daß die Zerstörung dieser Zellen durch eine direkte Membranschädigung verursacht wurde.

Auch die Membran von Granulozyten wurde durch hohe Konzentrationen an E-LDL und Linolsäure rasch geschädigt und durchlässig gemacht, was einen Propidiumiodid-Einstrom in die Zellen innerhalb von Minuten bewirkte (s. Abb. 3.36, 3.37, 3.38).

Eine direkte Membraneinwirkung im Sinne eines Detergenseffektes erfolgt ohne Energieverbrauch; zur Bewegung von Fettsäuren durch Membranen kommt es selbst bei 0 °C

[BOJESEN und BOJESEN 1999].

Als Bestätigung für die Art der Einwirkung auf die Erythrozytenmembran wurden zusätzlich Hämolyseversuche auf Eis durchgeführt. Linolsäure bewirkte eine vollständige Lyse bei vergleichbar hoher hämolytischer Dosis. Auch E-LDL wirkte noch hämolytisch, die dazu notwendige Dosis lag jedoch um das 16fache höher als bei 37 °C (s. Abb. 3.39). Das spricht dafür, daß der Transfer der freien Fettsäuren von E-LDL auf Erythrozyten temperaturabhängig ist.

Eine weitgehende ATP-Depletion der Granulozyten veränderte ihre Empfindlichkeit gegenüber E-LDL und Linolsäure nicht, was gegen einen energieabhängigen Aufnahme- oder Schädigungsprozeß sprach. Mit einer reinen Membranschädigung stand dieses Resultat hingegen in Einklang.

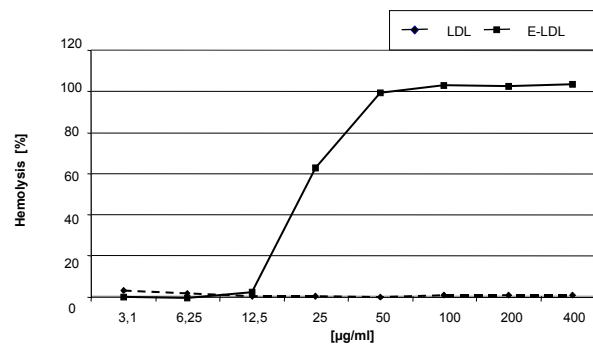


Abbildung 3.34: Dosisabhängige Lyse von Erythrocyten durch E-LDL.

Kaninchenerthrocyten wurden mit verschiedenen Konzentrationen an E-LDL und LDL inkubiert und das in den Überstand freigesetzte Hämoglobin wurde photometrisch bestimmt.

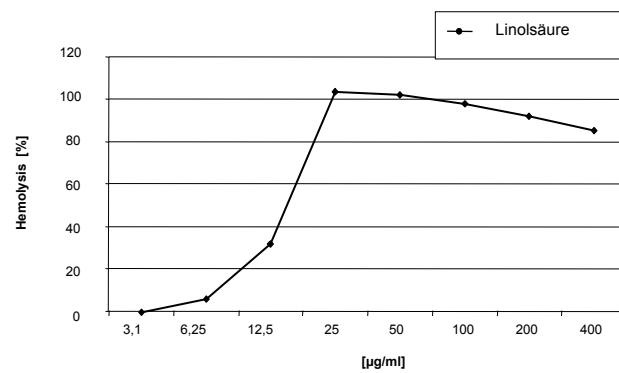


Abbildung 3.35: Dosisabhängige Lyse von Erythrocyten durch Linolsäure.

Kaninchenerthrocyten wurden mit verschiedenen Konzentrationen an Linolsäure inkubiert und das in den Überstand freigesetzte Hämoglobin wurde durch Absorptionsmessung bei 414nm bestimmt.

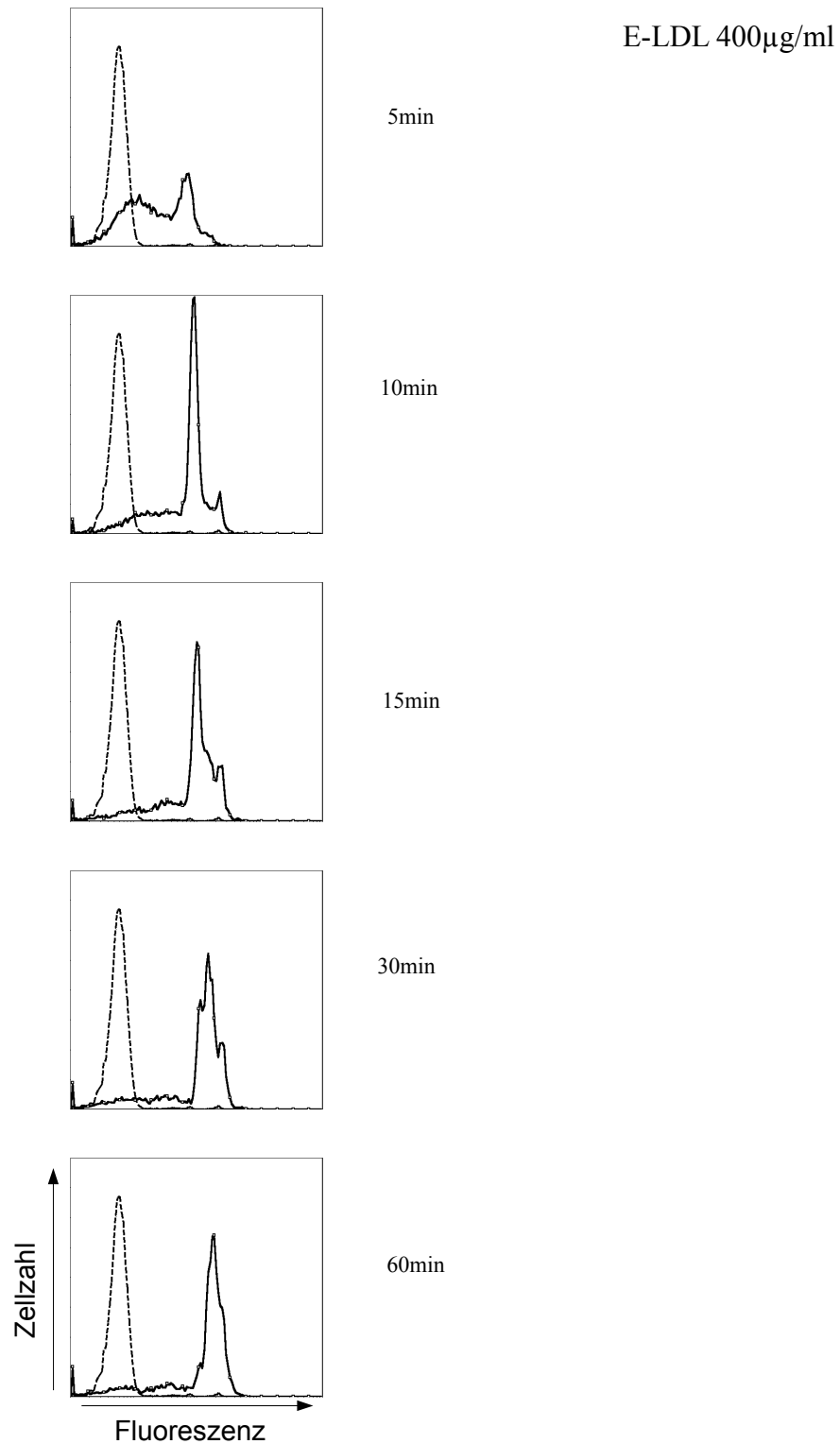


Abbildung 3.36: E-LDL bewirkt eine rasche Membranschädigung in Granulozyten.

Durchflußzytometrische Analyse des PI-Einstroms in mit 400 $\mu$ g/ml ELDL behandelte Granulozyten. Die PI-Fluoreszenzintensität wurde gegen die Anzahl entsprechend fluoreszierender Zellen aufgetragen.

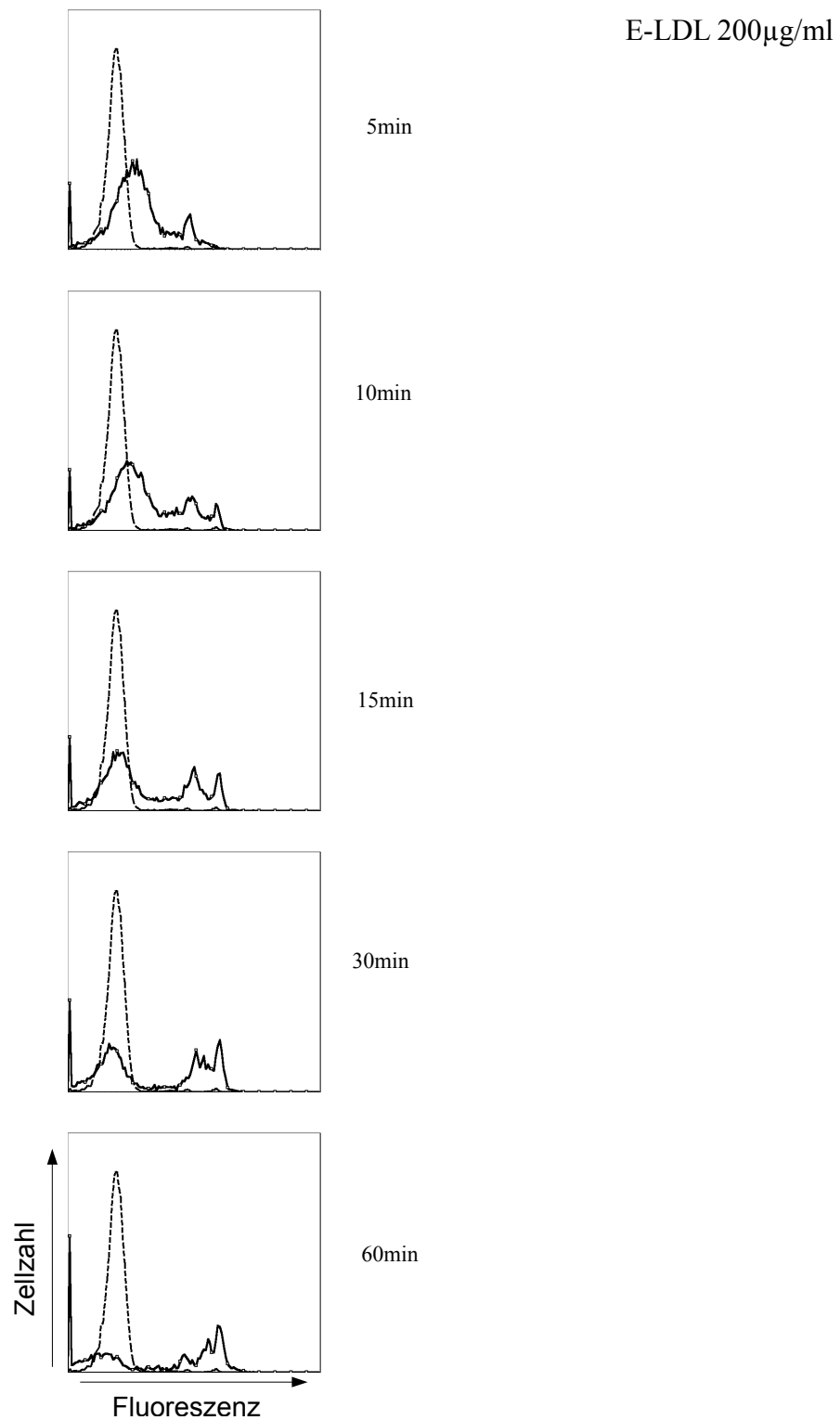


Abbildung 3.37: Durchflußzytometrische Analyse des PI-Einstroms in mit 200 $\mu$ g/ml ELDL behandelte Granulozyten. Die PI-Fluoreszenzintensität wurde gegen die Anzahl entsprechend fluoreszierender Zellen aufgetragen.

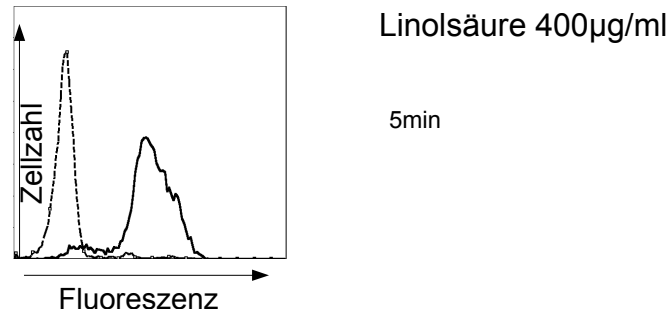


Abbildung 3.38: Linolsäure bewirkt eine rasche Membranschädigung in Granulozyten.

Durchflußzytometrische Analyse des PI-Einstroms in mit 400µg/ml Linolsäure behandelte Granulozyten. Die PI-Fluoreszenzintensität wurde gegen die Anzahl entsprechend fluoreszierender Zellen aufgetragen.

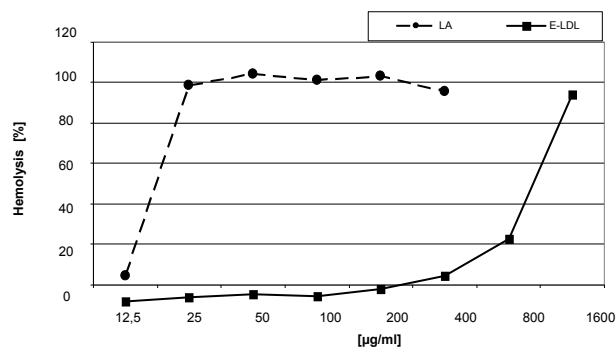


Abbildung 3.39: Linolsäure und E-LDL wirken auch bei 0 °C hämolytisch.

Kaninchenerythrocyten wurden für 30 Minuten auf Eis mit Linolsäure oder E-LDL inkubiert, dann wurde die Hämoglobinkonzentration im Überstand photometrisch bestimmt.

## 4 Diskussion

Eine bemerkenswerte Eigenschaft der atherosklerotischen Läsion ist die Abwesenheit von Granulozyten, obwohl die vorhandenen Chemokine und Adhäsionsmoleküle eine Granulozyten-Infiltration erwarten lassen. Die *in vitro*-Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bieten einen Erklärungsansatz für diese Diskrepanz: Granulozyten reagieren besonders empfindlich auf E-LDL. Es ist denkbar, daß sie auch im Körper zwar in atherosklerotische Läsionen einwandern, unter Einfluß der modifizierten Lipide dort allerdings rasch sterben. Verantwortlich für den Zelltod sind die in E-LDL enthaltenen freien Fettsäuren. Die Granulozyten werden durch sie aktiviert und sterben nekrotisch; durch beide Prozesse könnten sie in der Läsion proinflammatorisch wirken. Verglichen mit Makrophagen sind Granulozyten wesentlich empfindlicher gegenüber fettsäureabhängiger Toxizität. Beide Zellen bilden nach Inkubation mit E-LDL intrazelluläre Lipidtropfen, wie sie für Schaumzellen typisch sind. Das in der atherosklerotischen Läsion nachgewiesene Chemokin IL-8 lockt Granulozyten ebenso wie Monozyten an. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß es von E-LDL-behandelten Endothelzellen ausgeschüttet wird. Dabei bindet der Transkriptionsfaktor AP-1 an das IL-8-Gen, während NF- $\kappa$ B, über das häufig die Regulation des IL-8 erfolgt, durch E-LDL gehemmt wird. Die Hemmung von NF- $\kappa$ B wird durch die in E-LDL in hohen Mengen enthaltene Linolsäure bewirkt. AP-1 könnte somit die IL-8-Expression in E-LDL-behandelten Endothelzellen induzieren, ohne daß über NF- $\kappa$ B eine umfassende Entzündungsreaktion ausgelöst wird.

### 4.1 Einfluß von E-LDL und Linolsäure auf die Regulation von IL-8 in Endothelzellen

#### 4.1.1 E-LDL und Fettsäuren hemmen NF- $\kappa$ B

Es wurde bereits gezeigt, daß E-LDL in Endothelzellen die IL-8-Ausschüttung stimuliert [SURIYAPHOL et al. 2002] und über die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies und die p38-

MAPK-Signalkaskade zur Apoptose führt [DERSCH et al. 2005]. NF- $\kappa$ B ist ein bekannter Regulator des IL-8-Gens und kann auch über p38 aktiviert werden. Zudem lagen Hinweise für die Blockade des NF- $\kappa$ B durch E-LDL vor (D. Fenske, Dissertation). In den Experimenten der vorliegenden Arbeit zeigte sich, daß E-LDL NF- $\kappa$ B nicht aktivierte, sondern sogar eine Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch TNF- $\alpha$  bewirkte. In der vorliegenden Arbeit wurde die Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit dieses Effektes untersucht. Die Hemmung trat ab einer Konzentration von 50  $\mu$ g/ml E-LDL und einer Inkubationsdauer von 30 Minuten ein und erfolgte an einem zeitigen Schritt der NF- $\kappa$ B-Aktivierung. Nicht nur die Translokation der Untereinheit p65 in den Kern, sondern bereits die Phosphorylierung des zytosolischen Inhibitors I $\kappa$ B wurde von E-LDL blockiert. Diese Phosphorylierung ist notwendig für die Abspaltung und den folgenden proteosomalen Abbau des Inhibitors, worauf p65 frei wird. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß bereits die in E-LDL enthaltene ungesättigte freie Fettsäure Linolsäure allein eine Hemmung von NF- $\kappa$ B bewirkt.

#### **4.1.2 Weitere Untersuchungen zum Einfluß von freien Fettsäuren und modifizierten Lipoproteinen auf NF- $\kappa$ B**

Eine Hemmung von NF- $\kappa$ B ist ebenfalls für OxLDL gezeigt worden [HEERMEIER et al. 2001]. Sie ist abhängig von Lysophosphatidylcholin (LPC), das in OxLDL enthalten ist und in geringeren Mengen auch in E-LDL vorkommt [BINDER et al. 2006]. Auffallend an den Daten von Heermeier et al. ist, daß nur hohe LPC-Konzentrationen hemmend, niedrige hingegen aktivierend wirken. Diese LPC-Wirkung wird von der Proteinkinase C (PKC) vermittelt und kann von PKC-Inhibitoren blockiert werden [SUGIYAMA et al. 1998].

Linolsäure induziert die Expression von PKC in Endothelzellen [MAINGRETTE und RENIER 2005] und kann PKC durch Erhöhung der Membranfluidität direkt aktivieren [LESTER 1990]. Hennig et al. zeigten ebenfalls eine Aktivierung der PKC durch Linolsäure, allerdings über einen anderen Mechanismus, nämlich durch Auslösen von oxidativem Streß in den Endothelzellen [HENNIG et al. 1996]. Auf diesem Weg lösen sowohl E-LDL als auch Linolsäure in hohen Konzentrationen die Apoptose der Endothelzellen aus [DERSCH et al. 2005]. Eine analoge Hemmung von NF- $\kappa$ B über PKC wäre für die Fettsäure also denkbar.

Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit vorgestellten Daten zeigen Hennig et al. allerdings eine PKC-vermittelte Aktivierung von NF- $\kappa$ B [HENNIG et al. 1996]. Ein wesentlicher Unterschied in den gewählten Versuchsbedingungen könnte für diese Diskrepanz verantwortlich sein. Während Hennig et al. ihre Experimente in serumhaltigem Medium durchführten, haben wir bewußt se-

rumfreie Konditionen gewählt, um die Bedingungen innerhalb der Läsion möglichst gut zu reproduzieren. Das im Serum enthaltene Albumin kann die freien Fettsäuren aus E-LDL binden und somit ihre Wirkung auf Zellen einschränken. E-LDL bildet sich nach der Einlagerung von LDL in der Gefäßwand und ist damit von Interstitialflüssigkeit umgeben, deren Albuminkonzentration lediglich halb so hoch wie die des Plasmas ist [SMITH und ASHALL 1983]. Zudem finden sich in den fatty streaks und Läsionen lokal sehr hohe Konzentrationen an eingelagertem LDL und damit auch an E-LDL. Während LDL lediglich 7,7  $\mu\text{g}$  freie Fettsäuren je mg Cholesterol enthält, steigt dieser Wert bei E-LDL auf 600  $\mu\text{g}/\text{mg}$  an. Da die Plasmakonzentration des LDL selbst bei klinischen Normalwerten 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  überschreiten kann, werden bei der Spaltung des im Gewebe eingelagerten LDL Fettsäuren in einer Menge frei, die die Pufferkapazität der zugänglichen Albuminmenge überschreitet.

Einen ähnlichen Effekt der An- bzw. Abwesenheit von Serum auf die Aktivierung von NF- $\kappa$ B diskutieren Sugiyama et al. bezüglich der Wirkung von Lysophosphatidylcholin [SUGIYAMA et al. 1998]. Sie weisen auf einen möglichen Synergismus zwischen Wachstumsfaktoren aus dem Serum und LPC hin. In Anwesenheit von Serum würden diese auf einem alternativen tyrosinkinasevermittelten Weg NF- $\kappa$ B aktivieren, ohne daß die PKC beteiligt sei.

Entgegen den Daten von Heermeier, Sugiyama und anderen konnten wir weder bei niedrigen Konzentrationen an E-LDL oder Linolsäure, noch bei kurzen Inkubationszeiten eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B feststellen. Sugiyama et al. zeigen, daß die Hemmung der NF- $\kappa$ B-Aktivierung durch hohe Konzentrationen an LPC nicht durch die Toxizität bedingt wird. Dies entspricht unseren Ergebnissen mit E-LDL und Linolsäure: die für die Hemmung ausreichenden Konzentrationen und Inkubationszeiten führten noch nicht zur Apoptose der Endothelzellen (Daten nicht gezeigt). Zusammenfassend bleibt plausibel, daß die Inhibition von NF- $\kappa$ B durch E-LDL und Linolsäure von PKC vermittelt abläuft. Dieser Prozeß könnte zunächst vor der Induktion proinflammatorischer Gene durch NF- $\kappa$ B schützen und die Läsionsentwicklung verzögern.

#### **4.1.3 E-LDL aktiviert c-jun und bewirkt die IL-8-Ausschüttung über AP-1**

AP-1 kann durch E-LDL aktiviert werden; in der vorliegenden Arbeit wurde dies durch Nachweis von phosphoryliertem c-jun in E-LDL-behandelten Zellen gezeigt. D. Fenske und K. Dersch konnten zudem nach Inkubation mit E-LDL AP-1-Komplexe detektieren, die an den Promotor des IL-8-Gens gebunden waren (Dissertationen Fenske, Dersch sowie [FENSKE et al. 2008]).

Dabei wurden nach Behandlung mit E-LDL die an die DNA der Zellen gebundenen Proteine mittels Formaldehyd fixiert, dann die Zellen zertrümmert und eine Immunpräzipitation mit einem Antikörper gegen Phospho-c-jun durchgeführt. Der IL-8-Promoter wurde im Präzipitat nachgewiesen. E-LDL führte also zu einer Aktivierung von AP-1, die mittels phospho-c-jun-Bindung an dessen Promoter IL-8 induziert. Ob eine AP-1-Aktivierung durch die in E-LDL enthaltenen Linolsäure hervorgerufen wird, ist noch nicht abschließend geklärt. Die vorliegende Arbeit zeigt lediglich eine sehr schwache Phosphorylierung von c-jun nach Behandlung mit Linolsäure. Zur Ausschüttung des IL-8 ist offenbar das Lipoprotein notwendig, Linolsäure allein bewirkte keine IL-8-Sekretion in Endothelzellen.

## 4.2 Differentielle Zytotoxizität von E-LDL und Linolsäure gegenüber Granulozyten und Makrophagen

### 4.2.1 Weshalb sind keine Granulozyten in der atherosklerotischen Läsion zu finden?

Atherosklerose ist eine chronische Entzündungskrankheit, bei der sich LDL in der Gefäßwand ansammelt. Dort wird es durch Enzyme modifiziert, woraufhin die entstandenen atherogenen Lipide eine Immunreaktion auslösen. Von Chemokinen wie IL-8, das von Endothelzellen unter Einfluß des enzymatisch gespaltenen LDL ausgeschüttet wird, werden Monozyten angezogen, die in die beginnende Läsion einwandern. IL-8 übt auch eine starke chemotaktische Wirkung auf Granulozyten aus, diese wurden jedoch in zeitigen atherosklerotischen Läsionen nicht nachgewiesen [JONASSON et al. 1986] [NARUKO et al. 2002].

Zwar ist denkbar, daß andere Chemokine die Einwanderung der Granulozyten beeinflussen oder sogar begrenzen. Endothelzellen können zudem ein 77 Aminosäuren umfassendes, 'endotheliales' IL-8 ausschütten, das zwar Granulozyten anlockt, anders als die 72 Aminosäuren lange Normalform deren Adhäsion an das Endothel jedoch hemmt [NASHKEVICH et al. 2002]

[HEBERT et al. 1990]. Monozyten sondern jedoch IL-8<sub>72</sub> ab und Granulozyten selbst können durch Enzyme, die bei ihrer Degranulation frei werden, IL-8<sub>77</sub> zu IL-8<sub>72</sub> spalten [PADRINES et al. 1994]. Die Komplementaktivierung durch E-LDL [BHAKDI et al. 1999] [TORZEWSKI et al. 1998] führt ebenfalls zur Freisetzung chemotaktischer Peptide, die Granulozyten anlocken können [GERARD und GERARD 1991].

Die für die Einwanderung der Zellen ins Gewebe notwendigen Adhäsionsmoleküle wie E-Selektin, [DA COSTA MARTINS et al. 2007], VCAM oder PECAM wurden in der Läsion nachgewiesen und werden dort teilweise sogar verstärkt exprimiert [DAVIES et al. 1993] [BOCHNER et al. 1991]. In verschiedenen Atherosklerosemodellen wurde, wie in Abschnitt 1.2.2 ausgeführt, tatsächlich eine Einwanderung der Granulozyten beobachtet [ERIKSSON et al. 2001] [KLING et al. 1993] [DORWEILER et al. 2008]. Für PMN typische Enzyme wie Leukozyten-Elastase [DOLLERY et al. 2003] und bestimmte MMPs [HERMAN et al. 2001] wurden im Atherom nachgewiesen. Die Produktion dieser Enzyme durch andere Zellen erfolgt in wesentlich geringerem Maß. Ob sie als Erklärung für die hohen anwesenden Enzymkonzentrationen ausreicht, kann diskutiert werden [NARUKO et al. 2002].

Gleichzeitig mit den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit haben Zernecké et al. im Tierversuch wichtige Indizien für die Bedeutung der Granulozyten in der Atherosklerose gefunden [ZERNECKE et al. 2008]. Sie konnten Granulozyten in geringer Zahl in den atherosklerotischen Läsionen von ApoE-Knockout-Mäusen nachweisen sowie zeigen, daß mit Latexpartikeln markierte neutrophile Granulozyten in die Plaques einwandern. Die Depletion der mit einem gegen neutrophile Granulozyten gerichteten Antikörper führte zu verminderter Plaquebildung und wirkte so antiatherogen.

#### 4.2.2 Die Hypothese von Einwanderung und Tod

Eine schlüssige Erklärung für die Abwesenheit der Granulozyten in der zeitigen humanen Läsion fehlt bislang. Es ist denkbar, daß PMN zwar in die Läsion einwandern, dort jedoch rasch sterben. Die in hoher Zahl anwesenden Makrophagen würden dann Reste toter Granulozyten durch Phagozytose abräumen, so daß diese tatsächlich nur schwer nachweisbar wären. Die konstitutive Apoptose der PMN erfolgt nach etwa 24 bis 48 Stunden. Dieses Zeitfenster wäre sicherlich ausreichend, um die Zellen in der Läsion zu detektieren. Erst wenn die PMN durch einen speziellen Einfluß in der Läsion viel schneller absterben, ist die vorgestellte Überlegung sinnvoll.

Die zelltoxische Wirkung von E-LDL wurde bereits mehrfach gezeigt. Die toxische Dosis war dabei für Makrophagen [KLOUCHE et al. 1998] mit  $400\mu\text{g/ml}$  wesentlich höher als für Endothelzellen [DERSCH et al. 2005], die bereits ab  $100\mu\text{g/ml}$  geschädigt wurden. Diese Konzentration an E-LDL erwies sich auch für glatte Muskelzellen als toxisch [SCHWARZ et al. 2008]. Die Endothelzellen starben apoptotisch durch die in E-LDL enthaltenen freien Fettsäuren.

Die Toxizität von E-LDL kann also nach bisherigem Wissen zellspezifische Unterschiede aufweisen. E-LDL könnte in der atherosklerotischen Läsion einen selektiven Zelltod hervorrufen.

Unsere Experimente weisen in der Tat nach, daß bereits geringe Konzentrationen an E-LDL für Granulozyten toxisch sind, während Makrophagen desselben Spenders unter gleichen Bedingungen überleben. Werden hohe, makrophagenschädigende Konzentrationen von E-LDL eingesetzt, kommt es in diesen Zellen zu einer Caspaseaktivierung, bei Granulozyten jedoch nicht. Dies deutet auf eine Abhängigkeit des Toxizitätsmechanismus vom Zelltyp hin.

### 4.2.3 Toxizität von E-LDL wird durch Fettsäuren bedingt

Bei der enzymatischen Spaltung von LDL werden neben unverestertem Cholesterol hohe Mengen an Fettsäuren freigesetzt. E-LDL enthält etwa  $600\mu\text{g}$  Fettsäuren pro mg Cholesterol, LDL im Vergleich dazu lediglich  $7,7\mu\text{g}$  pro mg Cholesterol [SURIYAPHOL et al. 2002]. Die Toxizität von E-LDL gegenüber Endothelzellen erwies sich als fettsäureabhängig [DERSCH et al. 2005].

Ebenso wie E-LDL selbst wirkte freie Linolsäure auf Granulozyten und Makrophagen toxisch, wobei die Granulozyten wesentlich empfindlicher reagierten.

Werden Triglyceride in vivo gespalten, binden die freiwerdenden Fettsäuren neben Albumin auch an Lipoproteine [CHUNG et al. 1995]. Lediglich an Lipoprotein gebundene Fettsäuren sind toxisch für Zellen, die Bindung an Albumin hemmt die Toxizität. Im Einklang mit diesem Befund schützte die Zugabe von Albumin zum Medium Granulozyten vor der Toxizität von E-LDL und Linolsäure, allerdings bricht dieser Schutz bei hohen, die Bindekapazität von Albumin überschreitenden Konzentrationen ab. Ein mol Albumin kann 5 mol und mehr an freien Fettsäuren binden [SPECTOR 1975], die von uns eingesetzten 2% fettsäurefreies Albumin im Medium (MW 67000) können also  $1,5\text{mmol/L}$  an Fettsäuren abfangen. Der Schutz von Albumin endet übereinstimmend mit dieser Abschätzung bei etwa  $750\mu\text{g/ml}$  Linolsäure, allerdings bereits bei etwa  $250\mu\text{g/ml}$  E-LDL. Die Daten von Chung et al. zur Toxizität an Lipoprotein gebundener Fettsäuren zeigen eine dem E-LDL ähnliche Situation auf. Dabei richtet sich die fettsäureabhängige Toxizität nicht nach der Gesamtkonzentration freier Fettsäuren, sondern nach dem Bindungsverhältnis von Lipoprotein und Fettsäuren [CHUNG et al. 1995]. Möglicherweise liegt dem verminderten Schutz von Albumin vor E-LDL ein ähnlicher Effekt zugrunde. Denkbar ist auch eine direkte Übertragung eines Teils der Fettsäuren aus E-LDL auf die Zellen, so daß sie nicht mit Albumin in Kontakt kommen und nicht daran binden können. Auch eine Schwankung der genauen Fettsäurezusammensetzung von LDL mit der Nahrungszusammensetzung, die sich auf E-LDL ebenso auswirken würde, kann nicht außer Acht gelassen werden.

Fettsäuredepletiertes E-LDL schädigte in unseren Experimenten Granulozyten weniger stark als E-LDL selbst. Die Wirkung freier Fettsäuren auf PMN hing von der Anzahl der enthaltenen Dop-

Fettsäure		$\mu\text{mol/mg}$ Cholesterol in E-LDL
(ungesättigte <b>fett</b> )		
Myristinsäure	14:00	0,08
Palmitinsäure	16:00	0,66
<b>Palmitoleinsäure</b>	16:01	<b>0,24</b>
Stearinsäure	18:00	0,11
<b>Ölsäure</b>	18:01	<b>0,7</b>
<b>Linolsäure</b>	18:02	<b>1,28</b>
<b>Arachidonsäure</b>	20:04	<b>0,17</b>
Summe		3,23
Summe <b>ungesättigte</b>		2,38

Abbildung 4.1: Gehalt des E-LDL an freien Fettsäuren.

Daten aus [SURIYAPHOL et al. 2002]

E-LDL [ $\mu\text{g/ml}$ ]	Fettsäurekonzentration [mM]			Fettsäurekonzentration [ $\mu\text{g/ml}$ ] berechnet als Linolsäure		
	alle FS	unges. FS	Linolsäure	alle FS	unges. FS	Linolsäure
3.1	0.010	0.007	0.004	2.809	2.070	1.110
6.25	0.020	0.015	0.008	5.663	4.172	2.239
12.5	0.040	0.030	0.016	11.325	8.345	4.477
25	0.081	0.060	0.032	22.650	16.690	8.955
50	0.162	0.119	0.064	45.301	33.380	17.910
100	0.323	0.238	0.128	90.602	66.759	35.820
200	0.646	0.476	0.255	181.203	133.518	71.640
250	0.808	0.595	0.319	226.504	166.898	89.550
500	1.615	1.190	0.639	453.008	333.795	179.099

Abbildung 4.2: Der E-LDL-Konzentration entsprechende Konzentrationen von Linolsäure.

Die Gesamtmenge freier Fettsäuren in E-LDL wurde in die äquivalente Menge Linolsäure umgerechnet (Spalte 'alle FS'), ebenso der Gehalt an ungesättigten Fettsäuren ('unges. FS'). Die reine Linolsäuremenge in E-LDL wurde in der letzten Spalte dargestellt. Alle Angaben in [ $\mu\text{g/ml}$ ].

pelbindungen ab: während die gesättigte Stearinsäure nicht toxisch war, starben die Zellen durch die einfach ungesättigte Ölsäure in ähnlichem Ausmaß wie durch Linolsäure. Arachidonsäure, die in E-LDL ebenfalls enthalten ist, bewirkte bereits in einer Konzentration von  $6,25\mu\text{g/ml}$  einen vollständigen Energieverlust der PMN.

Daraus läßt sich ableiten, daß ungesättigte freie Fettsäuren, wie sie in E-LDL in großer Menge enthalten sind, auf PMN erheblich toxischer wirken als auf MDM. Dies stützt die These der Einwanderung und des raschen Zugrundegehens der PMN in der atherosklerotischen Läsion.

#### 4.2.4 E-LDL und ungesättigte freie Fettsäuren aktivieren Granulozyten

Granulozyten werden außerdem durch E-LDL und gleichermaßen durch Linolsäure und Arachidonsäure aktiviert, wie wir durch Messung des respiratorischen Burst, der Peroxidaseausschüttung als Maß der Degranulierung sowie der intrazellulären Calciumkonzentration zeigen konnten. Dies entspricht den in der Literatur genannten Auswirkungen ungesättigter Fettsäuren, wie in den folgenden Abschnitten dargestellt.

### ***Respiratory burst***

Badwey et al. berichteten, daß cis-ungesättigte freie Fettsäuren die Superoxidbildung in neutrophilen Granulozyten anregen [BADWEY et al. 1981]. Dabei wirkt Arachidonsäure stärker als Linolsäure und diese wiederum stärker als Ölsäure. Dies entspricht unseren Beobachtungen mit Linolsäure und Arachidonsäure (s. Abb. 3.25).

Sowohl gesättigte als auch ungesättigte freie Fettsäuren binden an Neutrophile. Die gesättigte Palmitinsäure bindet dabei in einer Menge, die linear mit der Fettsäurekonzentration ansteigt; bei Linolsäure ist dieses lineare Verhältnis von einem weiteren, sättigbaren Bindungsprozeß überlagert [BADWEY et al. 1984]. Dieser sättigbare Prozeß korreliert mit dem Ausmaß der Superoxidbildung. Palmitinsäure regt keine Superoxidbildung an. Ein spezifischer Transporter für ungesättigte Fettsäuren, wie er in Neutrophilen nachgewiesen wurde, könnte den sättigbaren Prozeß erklären [KRISCHER et al. 1998]. Möglicherweise wird der respiratorische Burst nicht intrazellulär durch die Fettsäuren angeregt, sondern bei deren Bindung an die Zelle oder während ihres Membrandurchtritts.

Die Aktivierung des respiratorischen Bursts und damit die Superoxidbildung könnte durch eine Aktivierung der Phosphatidylinositol-spezifischen Phospholipase C erfolgen; ungesättigte freie Fettsäuren aktivierten dieses Enzym vermutlich durch die Veränderung im Membranamfeld, die sie bei ihrer Insertion in die Zellmembran verursachen. Die Phospholipase C spaltet Phosphatidylinositol zu Inositoltriphosphat und Diacylglycerol, das die Proteinkinase C aktiviert. Proteinkinase C-Aktivatoren wie PMA regen Granulozyten ebenfalls zum respiratorischen Burst an. Daß Fettsäuren auf verschiedenen Wegen PKC aktivieren können, wurde in Abschnitt 4.1.2 bereits ausgeführt.

Superoxidausschüttung durch Arachidonsäure mit gleichzeitigem Verlust des Membranpotentials berichten Cohen et al. Sie weisen außerdem auf die Toxizität der Arachidonsäure hin. Die Depolarisation war bei Zugabe von fettsäurefreiem Albumin nicht reversibel [COHEN et al. 1986].

### **Calciumeinstrom**

Ungesättigte freie Fettsäuren bewirken einen Calciumeinstrom in Lungenepithelzellen. Die Anzahl an Doppelbindungen im Molekül spielt hierbei keine Rolle, gesättigte Fettsäuren haben dagegen keine Wirkung. Das Calcium stammt nicht aus intrazellulären Speichern, denn in calciumfreiem Medium erfolgt keine Änderung der zellulären Calciumkonzentration [WANG et al. 1994]. Außerdem können Ölsäure und Arachidonsäure vermutlich durch Störungen in der Plasmamem-

bran in verschiedenen Zelltypen Calcium aus intrazellulären Speichern mobilisieren. Durch Zugabe von Albumin ist dieser Effekt reversibel [GAMBERUCCI et al. 1997]. Unsere Daten bezüglich E-LDL lassen auf einen Calciumeinstrom aus dem Medium schließen, stimmen also mit den Beobachtungen von Wang et al. überein.

## Degranulation

E-LDL bewirkte eine Degranulation der PMN, die in dieser Arbeit anhand der Quantifizierung von sezernierter Peroxidase nachgewiesen wurde. Die Peroxidasefreisetzung beginnt bereits bei etwas niedrigeren Dosen als die LDH-Freisetzung, daraus läßt sich auf Degranulierung statt Zerstörung der Zellen als Mechanismus schließen. Während die Fettsäureabhängigkeit des Effektes anhand fettsäuredepletierten E-LDLs klar sichtbar war (s. Abb. 3.29), blieb Linolsäure allein ohne Wirkung.

Die Literatur zur Wirkung freier Fettsäuren auf die Degranulation von Neutrophilen liefert widersprüchliche Aussagen. Zum einen wurde gezeigt, daß Linolsäure zur Degranulation vorwiegend spezifischer, in geringem Maß auch azurophiler Granula führt [BATES et al. 1995], zum anderen wurde berichtet, daß Ölsäure die Freisetzung von Myeloperoxidase hemmt

[HIGAZI und BARGHOUTI 1994]. OxLDL soll ebenfalls Degranulation hervorrufen [SEDGWICK et al. 2003]. Möglicherweise ist hier das Lipoprotein als Träger von besonderer Bedeutung für die Wirkung.

### 4.2.5 Mechanismus der Schädigung von Granulozyten durch E-LDL und Linolsäure

Die Toxizität von Fettsäuren ist bekannt, es werden allerdings mehrere mögliche Mechanismen dafür diskutiert. Nach Einwirkung von Fettsäuren wurde sowohl apoptotischer [HEALY et al. 2003] [CNOP et al. 2001] [KOLLER et al. 1997] [WENZEL et al. 2005] [PAUMEN et al. 1997] als auch nekrotischer [DE LIMA et al. 2006] [CNOP et al. 2001] Zelluntergang beobachtet. Während die Makrophagen nach Behandlung mit 400µg/ml E-LDL oder Linolsäure eine deutliche Caspaseaktivierung aufwiesen, starben die Granulozyten nekrotisch. Es kam im gesamten Dosisbereich weder zur Aktivierung von Caspasen noch zu Phosphatidylserin-Externalisierung.

Eine Erholung von MDM oder Granulozyten nach Wegwaschen von E-LDL war nicht zu beobachten (Kinetik-Daten, nicht gezeigt). Außerdem stieg die Toxizität des E-LDL auf MDM bei kontinuierlicher Inkubation zwischen 2 und 24h nicht mehr. Mit Linolsäure kam es ebenfalls nicht zu einer Erholung.

Wir haben verschiedene Einflußfaktoren auf die Toxizität von E-LDL und Linolsäure untersucht, um Rückschlüsse auf den Mechanismus ziehen zu können.

### **Aktivierung von Granulozyten bedingt nicht die Toxizität**

ROS, die bei der Aktivierung von Granulozyten entstehen, können deren Apoptose verursachen bzw. beschleunigen [SCHEEL-TOELLNER et al. 2004]. Caspasen werden allerdings durch sie gehemmt [FADEEL et al. 1998]. Jedoch erfolgt beim ROS-induzierten Zelltod eine Externalisierung von Phosphatidylserin, die durch Bindung von Annexin an die Zellen nachgewiesen werden kann. Nach Behandlung mit E-LDL konnten wir weder eine Caspaseaktivierung noch eine Annexinbindung in nennenswertem Ausmaß feststellen (vgl. Abb. 3.30). Wurde die Entstehung freier Sauerstoffradikale gehemmt bzw. wurde ein Antioxidans zugegeben, blieb die Schädigung der Zellen durch E-LDL unverändert. Somit bewirkt E-LDL ebenso wie die darin enthaltene Linolsäure zwar eine Freisetzung von ROS aus Granulozyten, diese ist jedoch nicht notwendig für die Toxizität des modifizierten Lipoproteins.

Auch eine Behandlung der Zellen in calciumfreiem Medium, wobei keine Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration stattfand, veränderte die Empfindlichkeit von Granulozyten gegenüber E-LDL und Linolsäure nicht. Dies stimmt mit den Untersuchungen von Doroshenko et al. [DOROSHENKO und DOROSHENKO 2004] überein, die zeigten, daß der von Arachidonsäure hervorgerufene Calciumeinstrom nicht für die Toxizität der freien Fettsäure verantwortlich ist.

### **Energieabhängigkeit der Toxizität**

Mehrere der für freie Fettsäuren postulierten Toxizitätsmechanismen sind ATP-abhängig, beispielsweise die Toxizität durch Ansammlung neutraler Fette [HEALY et al. 2003].

Wird der ATP-Gehalt von Nierenepithelzellen auf 5-10% des Ausgangswertes abgesenkt, vermögen diese sich noch durch Veresterung zu Triglyceriden vor freien Fettsäuren zu schützen. Erst bei ATP-Werten von unter 5% steigt der intrazelluläre Gehalt an freien Fettsäuren an, ein Zeichen dafür, daß selbst für diesen offenbar lebenswichtigen Schutzmechanismus die Energie fehlt [VENKATACHALAM et al. 1988]. Zur Veresterung mit Glycerol müssen Fettsäuren in der Zelle erst zu AcylCoAs umgewandelt werden, wobei Energie verbraucht wird [LÖFFLER 2007b]. Zelluläres ATP kann durch Zugabe des Glucoseanalogons 2-Deoxy-D-Glucose, das die Hexokinase kompetitiv hemmt und von den Zellen nicht verstoffwechselt wird, gesenkt werden. Nach Behandlung mit 2-Deoxy-D-Glucose wiesen Granulozyten und Makrophagen weniger als 5%

des ATP-Gehalts unbehandelter Kontrollzellen auf. Dennoch war die Toxizität von E-LDL nicht verändert (Daten nicht gezeigt). ATP-abhängige Prozesse, beispielsweise die Bildung von Triglyceriden, scheinen weder die Toxizität zu bedingen noch vor ihr zu schützen. Auch eine erhöhte Zufuhr von Glucose im Zellkulturmedium veränderte die Toxizität von E-LDL gegenüber Granulozyten nicht (Daten nicht gezeigt).

### **Temperaturabhängigkeit der Toxizität**

Bei 0 °C waren erst erheblich höhere Konzentrationen an E-LDL hämolytisch wirksam und toxisch für PMN, wie die Messung ihres ATP-Gehaltes und ihrer LDH-Freisetzung ins Medium belegte. Hingegen blieb die hämolytische Konzentration der Linolsäure unverändert. Der Übertritt der freien Fettsäuren aus E-LDL auf die Zellen erfolgt also möglicherweise temperaturabhängig.

### **E-LDL und Linolsäure rufen eine direkte Membranschädigung hervor**

Fettsäuren liegen extrazellulär zu einem Großteil an Albumin gebunden vor; im Blut und in der Interstitialflüssigkeit ist aufgrund der Lipophilie der freien Fettsäuren lediglich die Salzform löslich. In die Membran umliegender Zellen können die Fettsäuren sich einlagern und entweder durch freie Diffusion oder vermittelt durch Carrierproteine in die Zellen eindringen.

Lagern sich ungesättigte freie Fettsäuren in die Zellmembran ein, verändern sie die Membranfluidität und -durchlässigkeit [WANG et al. 1994]. Cis-ungesättigte Fettsäuren stören durch ihre abgeknickte Form dabei die sterische Ordnung der Membranlipide; dieser Effekt bleibt bei gesättigten Fettsäuren aus [ANEL et al. 1993]. Ein Indiz für eine solche direkte Membranstörung ist der überaus schnelle Einstrom kleiner Moleküle. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Einstrom von Propidiumiodid in Granulozyten innerhalb weniger Minuten nach Inkubation mit E-LDL und mit Linolsäure gezeigt.

Es ist also denkbar, daß E-LDL durch die darin enthaltenen ungesättigten Fettsäuren eine Membranstörung bewirkt. Ein solcher Effekt könnte außerdem der hämolytischen Aktivität von E-LDL und Linolsäure zugrunde liegen.

Neben Linolsäure riefen auch Ölsäure und Arachidonsäure eine Hämolyse hervor, dagegen blieb Stearinsäure ohne Effekt (Daten nicht gezeigt). Auch in den Experimenten von Lovstad et al. erwiesen sich freie Fettsäuren in einer Konzentration zwischen 50 und 100 µM als hämolytisch [LOVSTAD 1986]. Lovstad et al. schlossen einen kolloidosmotischen Mechanismus der Hämolyse aus, ebenso einen Schutz durch Antioxidantien. Albumin konnte jedoch die Hämolyse verhin-

dern. Eine weitere, von Lovstad et al. aufgegriffene frühere Untersuchung zur Hämolyse durch freie Fettsäuren durch Bai et al. weicht hier ab: in Übereinstimmung mit unseren Beobachtungen weisen sie lediglich für ungesättigte freie Fettsäuren hämolytische Aktivität nach, für die gesättigte Stearinsäure jedoch nicht [BAI et al. 1980]. Unterhalb von 8 °C fand laut Bai et al. keine Hämolyse mehr statt. Dies steht im Widerspruch zu unseren Daten (s. Abb. 3.39), allerdings waren die verwendeten Erythrozyten von einer anderen Spezies.

#### 4.2.6 Der Detergens-Effekt von Linolsäure

Fettsäuren und ihre Salze sind durch ihre langen, lipophilen Kohlenstoffketten in Verbindung mit der polaren Carbonsäuregruppe Amphiphile, die sich in Membranen einlagern können. Die protonierte Form ist hierbei in Wasser unlöslich und kann stabile Monolayer ausbilden, die löslichen Natriumsalze der Fettsäuren bilden instabile Monolayer und oberhalb der temperaturabhängigen, als critical micellar concentration (CMC) bezeichneten Grenzkonzentration Mizellen [HELENIUS und SIMONS 1975].

Wird ein lösliches Amphiphil zu Phospholipiden in Form von Liposomen oder Membranen gegeben, adsorbieren einige Moleküle an die Phospholipidschicht. Sie können in diese eingelagert werden, wobei die Phospholipidschicht zunächst nicht unterbrochen wird. Allerdings kann ihr Aufbau sterisch gestört werden, Fettsäuresalze beispielsweise schieben sich wie Keile in die Membran ein. Steigt die Menge des löslichen Amphiphils, wird immer mehr in die Membran eingelagert, wobei die Konzentration des freien Amphiphils in der wässrigen Phase unter der CMC bleibt. Im Verlauf dieses Prozesses steigt die Membranpermeabilität. Schließlich können selbst Makromoleküle wie Hämoglobin die Membran durchwandern. Die Lyse von Erythrocyten mit Freisetzung des leicht meßbaren Hämoglobins ist damit ein unaufwendiger, rascher und reproduzierbarer Test für die Membranschädigung.

Oberhalb einer Sättigungskonzentration, die vom Detergens, von der Zusammensetzung der Membran sowie vom Mengenverhältnis beider Komponenten abhängt, existieren nebeneinander Doppelmembranen, die mit dem Amphiphil gesättigt sind, und Mischmizellen aus Amphiphil und Membranbestandteilen. Wird noch mehr Amphiphil zugesetzt, verschiebt sich das Mengenverhältnis ganz in Richtung der Mizellen. Das Amphiphil kann so die Zellmembran schließlich auflösen, es wirkt als Detergens. Für den experimentellen Nachweis der vollständigen Membransolubilisierung werden Parameter wie der Wechsel einer Membranlösung von trüb zu klar oder das Verschwinden lamellarer Membranschichten, das unter dem Elektronenmikroskop erkennbar ist, herangezogen [HELENIUS und SIMONS 1975].

Bei neutralem pH im Körper liegt freie Linolsäure mit einem pKa-Wert von 7,9 [VERHAGEN et al. 1978] bereits zu einem beträchtlichen Teil als Salz vor. Für die CMC von Linolsäure finden sich diverse Literaturangaben, die von etwa  $20\mu\text{M}$  bei pH 8 bis hin zu  $200\mu\text{M}$  bei pH 9 reichen. Bevor sich klassische Mizellen bilden, lagern sich Dimere, die sogenannten sauren Seifen (*acid soaps*), bestehend aus einem dissoziierten und einem undissoziierten Linolsäuremolekül zusammen. Dies beginnt ab einer Konzentration von  $21\mu\text{M}$  [VERHAGEN et al. 1978]. Aus solchen Dimeren können sich Fettsäurevesikel bilden, die dazu notwendige Konzentration wird für Linolsäure mit  $< 1,7\text{mM}$  angegeben [GREGORIADIS 2006].

Unter den von uns gewählten Bedingungen ist also von einer Bildung von *acid soaps* sowie möglicherweise auch von einer Mizellbildung der Linolsäure auszugehen. Die Abhängigkeit der Erythrocyten-Lyse vom Verhältnis lysierendes Agens zu Membranmenge konnten wir für E-LDL, Linolsäure, Lysolecithin und weitere Detergentien mit unterschiedlichen Erythrocytenkonzentrationen zeigen. Der Detergenseffekt der Fettsäure verursacht vermutlich die von uns beobachtete Hämolyse. Inwieweit Linolsäure und E-LDL Membranen vollständig auflösen können, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht bestimmt, da bereits eine Erhöhung der Membranpermeabilität für Ionen und Makromoleküle zytotoxisch wirken kann.

Niedrige Konzentrationen eines Detergens können Carrier-abhängige Transportprozesse durch Membranen hemmen [HELENIUS und SIMONS 1975]. Mehrere bekannte Toxizitätsmechanismen freier Fettsäuren gehen möglicherweise auf den Detergenseffekt freier Fettsäuren zurück.

Martins de Lima et al. zeigten eine fettsäureabhängige Nekrose in Makrophagen [DE LIMA et al. 2006]. Die Fettsäuren bewirkten auf noch nicht völlig geklärtem Wege eine Depolarisierung der Mitochondrien. Es wird vermutet, daß sie durch Beeinträchtigung membrangebundener Enzyme die Atmungskette entkoppeln können. Ist der Protonengradient der Atmungskette, der zwischen Matrix und Intermembranraum aufgebaut wird, gestört, führt das zur Öffnung eines High-conductance-Ionenkanals, der sogenannten Permeability Transition Pore. Durch sie treten apoptotisch wirkende Substanzen, etwa Cytochrom C oder SMAC-Diablo, aus dem Inneren der Mitochondrien aus. Dieser Prozeß war laut de Lima et al. abhängig von der Anzahl der Doppelbindungen in der Fettsäure.

Burton et al. berichteten eine direkte Zelllyse von Lymphozyten durch freie Fettsäuren [BURTON und PIETTE 1983] [BURTON und DUNN 1984]. Noch bevor es zur Zytolyse kam, bildete sich ein Kernödem in den Zellen aus. Die Zellkerne zeigten morphologische Veränderungen in Verbindung mit einem Einstrom von Chloridionen. Die dazu verwendeten Konzentrationen an Fettsäure lagen nach Angabe der Autoren unterhalb der für eine starke Membranstörung notwen-

digen Konzentration. Allerdings ist denkbar, daß die amphiphile Fettsäure entweder das Carrierprotein für Chloridionen beeinflußt oder durch Erhöhung der Permeabilität der Kernmembran für kleine Ionen ihre Wirkung entfaltet.

20 $\mu$ M Ölsäure zeigte in den Experimenten von Burton et al. bereits eine Wirkung (zum Vergleich: in unseren Experimenten senkte 100 $\mu$ M Linolsäure den Energiegehalt von PMN um die Hälfte). Die Zytolyse bildete sich erst nach Stunden aus, war in Anwesenheit von Albumin vermindert und zelltypspezifisch unterschiedlich, während ionische Detergentien und Lysolecithin auf verschiedene Zelltypen gleich stark wirkten. Spezifische Störungen an der Membran des Zellkerns gefolgt von nukleärem Ödem wurden als Erklärung herangezogen; diese Änderungen beginnen bereits innerhalb von Minuten [BURTON und DUNN 1984] [BURTON und PIETTE 1983].

#### **4.2.7 Mögliche Erklärungen für die unterschiedliche Schädigung von PMN und MDM**

Da E-LDL und Linolsäure Zellen über direkte Membranwirkung schädigen können, ist denkbar, daß die Membranen von Granulozyten und Makrophagen aufgrund unterschiedlicher Zusammensetzung für den Toxizitätsunterschied verantwortlich sind. Versuche, das Cholesterol der Plasmamembran an- oder abzureichern und danach die Toxizität von E-LDL zu bestimmen, blieben jedoch erfolglos.

Die Aufnahme von freier Arachidonsäure und Linolsäure in PMN wird durch ein Carrierprotein vermittelt [PERRELLA et al. 2001]. Es ist möglich, daß so mehr freie Fettsäure in PMN aufgenommen wird als in MDM. Auf eine ebenfalls stärkere Aufnahme oder zumindest Zellassoziation von E-LDL lassen außerdem die Daten zum Cholesterolgehalt der Zellen schließen.

Durch verschieden starke Pinozytose könnte eine unterschiedliche Aufnahme von E-LDL oder freien Fettsäuren aus dem Medium erklärt werden. Die Makropinocytose wird durch kristallines Cholesterol angeregt und wurde bereits als Aufnahmeweg für acLDL und oxLDL beschrieben [JONES und WILLINGHAM 1999]. *Fluid phase endocytosis* wurde von Kruth et al. als Aufnahmeweg von LDL in PMA-aktivierte Makrophagen postuliert [KRUTH et al. 2005] und schließlich auch als Aufnahmeweg von nativem LDL in hohen Konzentrationen bestätigt.

Nach Inkubation mit E-LDL konnten wir in PMN die Bildung einzelner großer Lipidtropfen nachweisen, die sich mit Oil Red O anfärben ließen, also offenbar Neutralfette oder Cholesterolerster enthielten. Durch Behandlung mit Linolsäure bildeten sich hingegen mehrere kleine, membrannahe Lipidtropfen, ähnlich den von Weller et al. gezeigten [WELLER et al. 1991]. Die

Vermutung liegt nahe, daß die großen Lipidtropfen der PMN vorwiegend aus Cholesterolestern bestanden, wobei das Cholesterol aus E-LDL stammte.

Auffallend in unseren Daten ist jedoch die Diskrepanz zwischen hohem Cholesterolgehalt der Granulozyten und geringer Zahl an Lipidtropfen in diesen Zellen. Möglicherweise können Makrophagen mehr Fettsäuren zu Triglyceriden verstoffwechseln und schützen sich so vor deren toxischer Wirkung. Versuche, die Fettsäureveresterung mittels Triacsin C zu hemmen und die Zellen dann mit Linolsäure zu behandeln, führten jedoch nicht zu einer Veränderung der Ansammlung von Lipidtropfen oder der Toxizität (Daten nicht gezeigt). Zudem erwies sich die Toxizität von E-LDL weitestgehend energieunabhängig. Die Bildung von lipid bodies in Granulozyten wird durch ATP-Depletion mit 2-Deoxyglucose gehemmt, ebenso durch Absenken der Temperatur auf 4 °C [WELLER et al. 1991]. Beides hatte in unseren Experimenten keinen Einfluß auf die Toxizität von E-LDL. Sie scheint unabhängig von der Bildung der Lipidkörper zu sein.

Die Ursache der unterschiedlichen Toxizität freier Fettsäuren gegenüber Granulozyten und Makrophagen bleibt offen. Ansammlungen freien Cholesterols sind prominent in der atherosklerotischen Läsion [KRUTH 1985] und gehen mit der Freisetzung unveresterter Fettsäuren einher, deren Wirkung auf das Atherom noch kaum erforscht ist. Ihr Effekt auf läsionale Zellen sollte ebenso wie das Zustandekommen des in dieser Arbeit behandelten Toxizitätsunterschiedes Gegenstand weiterer Forschungsarbeiten sein.

#### **4.2.8 Granulozyten in der atherosklerotischen Läsion können durch E-LDL aktiviert werden und sterben**

Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten bieten eine plausible Erklärung für die Abwesenheit von Granulozyten in der atherosklerotischen Läsion einerseits und für den von Zerneck et al. gezeigten Schutz vor dem Fortschreiten der Läsion durch Depletion von Granulozyten andererseits. Das in die beginnende Läsion infiltrierende LDL wird dort von Enzymen gespalten, das resultierende E-LDL trifft auf Endothelzellen und regt sie zur Bildung von IL-8 an. Es ist davon auszugehen, daß dieses Chemokin neben Monozyten auch Granulozyten anregt, die von Zerneck et al. in der atherosklerotischen Läsion nachgewiesen werden konnten. Die neben unverestertem Cholesterol in E-LDL enthaltenen freien Fettsäuren können zunächst durch Albumin, das in der Interstitialflüssigkeit enthalten ist, gebunden werden. Umliegende Zellen werden so vor deren Toxizität geschützt. Die hohen in der Läsion nachgewiesenen Konzentrationen an LDL jedoch setzen bei ihrer Spaltung Konzentrationen an Fettsäuren frei, die die Bindungskapazität

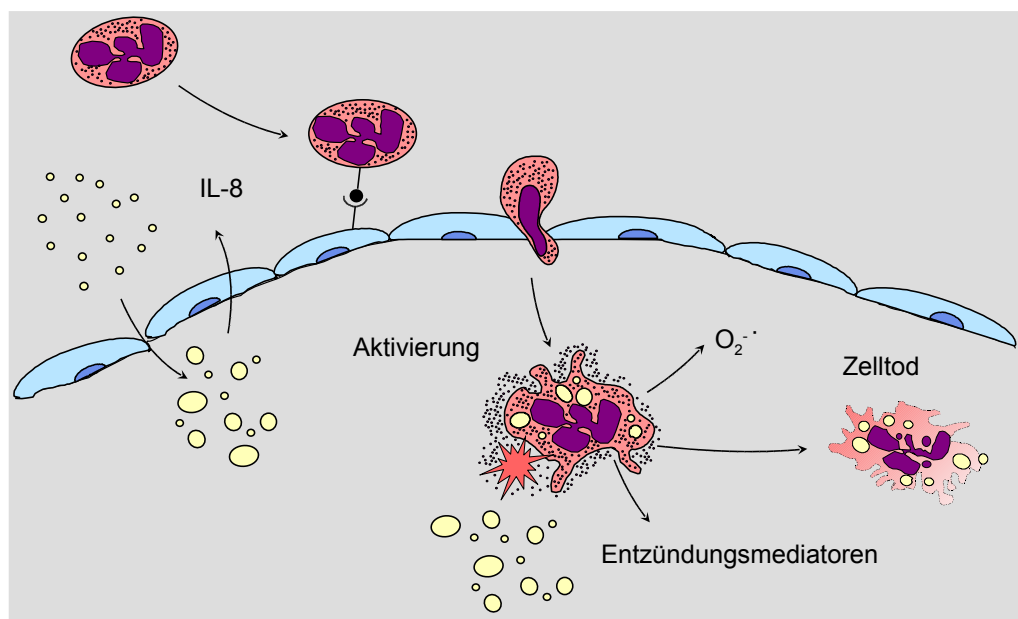


Abbildung 4.3: Granulozyten wandern in die Läsion ein und sterben.

Granulozyten wandern in die Läsion ein und werden durch E-LDL aktiviert, bevor sie nekrotisch sterben. Die Ausschüttung von reaktiven Sauerstoffspezies, Entzündungsmediatoren, Peroxidasen und Zellinhalt verstärkt die Entzündungsprozesse in der Läsion und schädigt umliegendes Gewebe.

des Albumin übersteigen können. Nun kommt es zu einer Aktivierung der Granulozyten, wobei sie durch Freisetzung granulärer Enzyme und reaktiver Sauerstoffspezies zur Schädigung des läSIONalen Gewebes beitragen. Außerdem nehmen sie ebenso wie Makrophagen E-LDL auf und wandeln sich zu Schaumzellen. Schließlich sterben die Granulozyten durch Konzentrationen modifizierten Lipoproteins, die für Makrophagen noch unschädlich sind. In vitro ist der durch E-LDL ausgelöste Zelltod von Granulozyten nekrotisch, Zernecke et al. wiesen jedoch in vivo apoptotische Zellen nach. Überreste zugrundegegangener Zellen werden vermutlich wie das modifizierte Lipoprotein von Makrophagen abgeräumt und beschleunigen so die Überlastung und das Absterben der Phagozyten selbst. Insgesamt wird deutlich, daß in die Läsion einwandernde und dort durch E-LDL zugrunde gehende Granulozyten eine proinflammatorische Wirkung entfalten und ihre Depletion so schützend wirken muß.

Während die toxische Wirkung des freien Cholesterols gut untersucht ist [FENG et al. 2003], wird in dieser Arbeit zudem der wichtige Einfluß der freien Fettsäuren auf das Fortschreiten der atherosklerotischen Läsion herausgestellt.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der vorangegangenen Arbeiten zur Mainzer Hypothese wurde gezeigt, daß in der arteriellen Intima eingelagertes LDL von Proteasen und Cholesterinesterase gespalten wird. Das daraus resultierende enzymatisch modifizierte LDL (E-LDL) ist reich an freien Fettsäuren und freiem Cholesterol.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung von E-LDL auf läSIONALE Zellen näher untersucht. In mit E-LDL behandelten Endothelzellen war c-jun, eine der Untereinheiten des Transkriptionsfaktors AP-1, phosphoryliert und somit aktiviert. NF- $\kappa$ B war jedoch gehemmt. Verantwortlich für diese Hemmung war die in E-LDL in hohen Mengen enthaltene Linolsäure. E-LDL-behandelte Endothelzellen schütteten zudem IL-8 aus. AP-1 könnte somit die Expression des IL-8 induzieren, ohne daß über NF- $\kappa$ B eine umfassende Entzündungsreaktion ausgelöst wird.

IL-8 lockt Granulozyten ebenso wie Monozyten an. Weshalb Granulozyten in der atherosklerotischen Läsion normalerweise nicht detektiert werden, ist noch unklar. In der vorliegenden Arbeit wurde die Empfindlichkeit humaner Granulozyten und Makrophagen gegenüber E-LDL untersucht. Bereits geringe Konzentrationen an E-LDL waren dabei toxisch für Granulozyten, während Makrophagen unbeeinflusst blieben. Oxidiertes und unverändertes LDL zeigte keine Wirkung. Als Ursache der Toxizität erwiesen sich die in E-LDL enthaltenen freien Fettsäuren, deren schädigende Wirkung auf verschiedene Zelltypen bereits gezeigt wurde. Die Granulozyten zeigten vorwiegend Anzeichen eines nekrotischen Zelltodes.

Sowohl Granulozyten als auch Makrophagen wiesen nach E-LDL-Behandlung intrazelluläre Lipidtropfen auf. Der Gehalt an Cholesterolestern stieg in den Granulozyten, nicht aber in den Makrophagen stark an. E-LDL und freie Fettsäuren aktivierten Granulozyten, wie anhand von *respiratory burst* und Degranulierung gezeigt werden konnte, und bewirkten einen Calciumeinstrom in die Zellen. Die Hemmung des *respiratory burst* oder des Calciumeinstroms veränderte die Toxizität ebensowenig wie eine ATP-Depletion der Zellen.

E-LDL und Linolsäure bewirkten einen raschen Einstrom von Propidiumiodid in Granulozyten sowie eine Lyse und Hämoglobinfreisetzung von Erythrozyten. Wir vermuten, daß die amphi-

phile Fettsäure wie ein Detergens auf die Zellmembran wirkt. Unterschiede in der Membranzusammensetzung könnten den Toxizitätsunterschied zwischen Granulozyten und Makrophagen erklären.

Die vorliegende Arbeit bietet eine mögliche Erklärung für die Abwesenheit von Granulozyten in der atherosklerotischen Läsion. Wir stellen die Hypothese auf, daß in die atherosklerotische Läsion einwandernde Granulozyten rasch durch das dort in hoher Menge vorliegende E-LDL aktiviert und schließlich getötet werden. Ihre Sekretionsprodukte sowie die bei ihrem vorwiegend nekrotischen Zelltod freigesetzten Zellinhaltsstoffe wirken dabei proinflammatorisch. Makrophagen, die in der Läsion in hoher Zahl vorhanden sind, erwiesen sich als wesentlich resistenter gegenüber der toxischen Wirkung von E-LDL. Ob der Aufnahme prozeß oder verschiedene Stoffwechselwege für den Toxizitätsunterschied entscheidend sind, ist Gegenstand weiterer Forschungsarbeiten. Die bislang wenig beachtete Wirkung freier Fettsäuren auf die Progression der Atherosklerose wird in der vorliegenden Arbeit betont.

## 6 Veröffentlichung von Ergebnissen dieser Arbeit

**Thrombosis and Haemostasis 2008 100 6: 1146-1154, DOI 10.1160/TH08-03-0166**

Enzymatically hydrolyzed low density lipoprotein modulates inflammatory responses in endothelial cells

Dominic Fenske; Katrin Dersch; Cornelia Lux; Lisa Zipse; Prapat Suriyaphol; Yolantha Dragneva; Shan-Rui Han; Sucharit Bhakdi; Matthias Husmann

Institute of Medical Microbiology and Hygiene, Johannes Gutenberg-University Mainz, Mainz, Germany

### Summary

There is evidence that low-density lipoprotein (LDL) is modified by hydrolytic enzymes, and that the product (E-LDL) induces selective production of interleukin 8 (IL-8) in endothelial cells. Since nuclear factor-kappaB (NF- $\kappa$ B) is a major regulator of IL-8 transcription, we studied its activation in endothelial cells treated with E-LDL. Unexpectedly, the modified lipoprotein not only failed to activate NF- $\kappa$ B, but completely blocked its activation by tumour necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) in EA.hy926-cells, as assessed by electrophoretic mobility shift assays and immunofluorescence. Inhibition occurred upstream of NF- $\kappa$ B translocation, as inhibitor of NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B)-phosphorylation was suppressed by E-LDL. In contrast to NF- $\kappa$ B, transcription factor activator protein-1 (AP-1) proved to be activated. Removal of free fatty acids present in E-LDL obliterated both activation of AP-1 and inhibition of NF- $\kappa$ B. Chromatin immunoprecipitation revealed that phosphorylated c-jun, but not NF- $\kappa$ Bp65 bound to the natural IL-8 promoter. Production of endothelial IL-8 and simultaneous modulation of NF- $\kappa$ B in response to hydrolyzed LDL might serve to protect the vessel wall and promote silent removal of the insudated lipoprotein.

**Atherosclerosis, DOI 10.1016/j.atherosclerosis.2009.04.004**

Received 22 December 2008

Received in revised form 24 March 2009

Accepted 1 April 2009

Available online xxx (Article in press)

Hypersusceptibility of neutrophil granulocytes towards lethal action of free fatty acids contained in enzyme-modified atherogenic low density lipoprotein

Cornelia Aquilina Lux(a), Andreas Koschinski(b), Katrin Dersch(a), Matthias Husmann(a), Su-charit Bhakdi(a). (a) Institute of Medical Microbiology and Hygiene, Johannes Gutenberg-University Mainz, Hochhaus am Augustusplatz, 55131 Mainz, Germany (b) Rudolf-Buchheim-Institute for Pharmacology; Justus-Liebig-University Gießen, Frankfurter Str. 107, 35392 Gießen, Germany

**Abstract**

**Objective:** The bulk of LDL entrapped in the arterial intima is modified by hydrolytic enzymes, leading to extensive cleavage of cholesterylesters and liberation of fatty acids. The latter induce apoptosis in endothelial cells but are far less cytotoxic towards macrophages. We have compared the cytotoxic effects of enzymatically modified LDL (E-LDL) on macrophages and polymorphonuclear granulocytes (PMN).

**Methods and results:** E-LDL displayed toxicity towards PMN at far lower concentrations than towards monocyte-derived macrophages. Native or oxidized LDL had no effect. Free fatty acids contained in E-LDL were the cause of the observed toxicity, which could be mimicked by linoleic acid, oleic acid and arachidonic acid. E-LDL provoked Ca<sup>2+</sup> influx and activated PMN, as witnessed by the generation of superoxide anions and peroxidase secretion. Inhibition of either oxidative burst or calcium influx did not diminish the cytotoxicity of E-LDL. Similar to free linoleic acid, E-LDL lysed red blood cells and rapidly rendered cells permeable to propidium iodide.

**Conclusion:** Possibly through their capacity to directly perturb cell membranes, free fatty acids contained in E-LDL exert potent cytotoxic effects on PMN. This may be one reason why PMN are not abundantly present in atherosclerotic lesions, and why PMN-depletion suppresses atherogenesis.

# Literaturverzeichnis

- [AHMAD et al. 1998] AHMAD, M., P. THEOFANIDIS und R. M. MEDFORD (1998). *Role of activating protein-1 in the regulation of the vascular cell adhesion molecule-1 gene expression by tumor necrosis factor-alpha.* J Biol Chem, 273:4616–4621.
- [ANEL et al. 1993] ANEL, A., G. V. RICHERI und A. M. KLEINFELD (1993). *Membrane partition of fatty acids and inhibition of T cell function.* Biochemistry, 32:530–6.
- [BADWEY et al. 1981] BADWEY, J. A., J. T. CURNUTTE und M. L. KARNOVSKY (1981). *cis-Polyunsaturated fatty acids induce high levels of superoxide production by human neutrophils.* J Biol Chem, 256:12640–3.
- [BADWEY et al. 1984] BADWEY, J. A., J. T. CURNUTTE, J. M. ROBINSON, C. B. BERDE, M. J. KARNOVSKY und M. L. KARNOVSKY (1984). *Effects of free fatty acids on release of superoxide and on change of shape by human neutrophils. Reversibility by albumin.* J Biol Chem, 259:7870–7.
- [BAEUERLE 1998] BAEUERLE, P. A. (1998). *IkappaB-NF-kappaB structures: at the interface of inflammation control.* Cell, 95:729–731.
- [BAI et al. 1980] BAI, N. J., T. GEORGE und S. KRISHNAMURTHY (1980). *Linoleic acid hemolysis of erythrocytes.* Indian J Biochem Biophys, 17:139–43.
- [BATES et al. 1995] BATES, E. J., A. FERRANTE, L. SMITHERS, A. POULOS und B. S. ROBINSON (1995). *Effect of fatty acid structure on neutrophil adhesion, degranulation and damage to endothelial cells.* Atherosclerosis, 116:247–59.
- [BEAUMIER et al. 1987] BEAUMIER, L., N. FAUCHER und P. H. NACCACHE (1987). *Arachidonic acid-induced release of calcium in permeabilized human neutrophils.* FEBS Lett, 221:289–92.
- [BHAKDI et al. 1995] BHAKDI, S., B. DORWEILER, R. KIRCHMANN, J. TORZEWSKI, E. WEISE, J. TRANUM-JENSEN, I. WALEV und E. WIELAND (1995). *On the pathogenesis of atherosclerosis: enzymatic transformation of human low density lipoprotein to an atherogenic moiety.* J Exp Med, 182:1959–71.

- [BHAKDI et al. 2004a] BHAKDI, S., K. J. LACKNER, S. R. HAN, M. TORZEWSKI und M. HUSMANN (2004a). *Beyond cholesterol: the enigma of atherosclerosis revisited*. *Thromb Haemost*, 91:639–45.
- [BHAKDI und MARTIN 1991] BHAKDI, S. und E. MARTIN (1991). *Superoxide generation by human neutrophils induced by low doses of Escherichia coli hemolysin*. *Infect Immun*, 59:2955–2962.
- [BHAKDI et al. 1999] BHAKDI, S., M. TORZEWSKI, M. KLOUCHE und M. HEMMES (1999). *Complement and atherogenesis: binding of CRP to degraded, nonoxidized LDL enhances complement activation*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19:2348–54.
- [BHAKDI et al. 2004b] BHAKDI, S., M. TORZEWSKI, K. PAPROTKA, S. SCHMITT, H. BARSOOM, P. SURIYAPHOL, S. R. HAN, K. J. LACKNER und M. HUSMANN (2004b). *Possible protective role for C-reactive protein in atherogenesis: complement activation by modified lipoproteins halts before detrimental terminal sequence*. *Circulation*, 109:1870–6.
- [BINDER et al. 2006] BINDER, MARION, G. LIEBISCH, T. LANGMANN und G. SCHMITZ (2006). *Metabolic profiling of glycerophospholipid synthesis in fibroblasts loaded with free cholesterol and modified low density lipoproteins*. *J Biol Chem*, 281:21869–21877.
- [BOCHNER et al. 1991] BOCHNER, B. S., F. W. LUSCINSKAS, J. GIMBRONE, M. A., W. NEWMAN, S. A. STERBINSKY, C. P. DERSE-ANTHONY, D. KLUNK und R. P. SCHLEIMER (1991). *Adhesion of human basophils, eosinophils, and neutrophils to interleukin 1-activated human vascular endothelial cells: contributions of endothelial cell adhesion molecules*. *J Exp Med*, 173:1553–7.
- [BOJESEN und BOJESEN 1999] BOJESEN, I. N. und E. BOJESEN (1999). *Sheep erythrocyte membrane binding and transfer of long-chain fatty acids*. *J Membr Biol*, 171:141–149.
- [BRAND et al. 1996] BRAND, K., S. PAGE, G. ROGLER, A. BARTSCH, R. BRANDL, R. KNUECHEL, M. PAGE, C. KALTSCHMIDT, P. A. BAEUERLE und D. NEUMEIER (1996). *Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion*. *J Clin Invest*, 97:1715–1722.
- [BROWN et al. 2002] BROWN, B. GREG, M. C. CHEUNG, A. C. LEE, X.-Q. ZHAO und A. CHAIT (2002). *Antioxidant vitamins and lipid therapy: end of a long romance?*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 22:1535–1546.
- [BROWN et al. 1980] BROWN, M. S., Y. K. HO und J. L. GOLDSTEIN (1980). *The cholesteryl ester cycle in macrophage foam cells. Continual hydrolysis and re-esterification of cytoplasmic cholesteryl esters*. *J Biol Chem*, 255:9344–52.

- [BUECHLER et al. 2001] BUECHLER, C., M. RITTER, C. Q. DUONG, E. ORSO, M. KAPINSKY und G. SCHMITZ (2001). *Adipophilin is a sensitive marker for lipid loading in human blood monocytes*. *Biochim Biophys Acta*, 1532:97–104.
- [BURTON und DUNN 1984] BURTON, A. F. und W. L. DUNN (1984). *Role of anions in the lymphocytolytic action of corticosteroids and fatty acids*. *Mol Cell Biochem*, 63:125–9.
- [BURTON und PIETTE 1983] BURTON, A. F. und L. H. PIETTE (1983). *Spin labelling studies of cytotoxicity induced by fatty acids*. *Mol Cell Biochem*, 51:73–8.
- [CHAO et al. 1988] CHAO, F. F., L. M. AMENDE, E. J. BLANCHETTE-MACKIE, S. I. SKARLATOS, W. GAMBLE, J. H. RESAU, W. T. MERGNER und H. S. KRUTH (1988). *Unesterified cholesterol-rich lipid particles in atherosclerotic lesions of human and rabbit aortas*. *Am J Pathol*, 131:73–83.
- [CHEN und GREENE 2003] CHEN, LIN-FENG und W. C. GREENE (2003). *Regulation of distinct biological activities of the NF-kappaB transcription factor complex by acetylation*. *J Mol Med*, 81:549–557.
- [CHUNG et al. 1995] CHUNG, B. H., G. A. TALLIS, B. H. CHO, J. P. SEGREST und Y. HENKIN (1995). *Lipolysis-induced partitioning of free fatty acids to lipoproteins: effect on the biological properties of free fatty acids*. *J Lipid Res*, 36:1956–70.
- [CNOP et al. 2001] CNOP, M., J. C. HANNAERT, A. HOORENS, D. L. EIZIRIK und D. G. PIPELEERS (2001). *Inverse relationship between cytotoxicity of free fatty acids in pancreatic islet cells and cellular triglyceride accumulation*. *Diabetes*, 50:1771–7.
- [COGNY et al. 1996] COGNY, A., V. ATGER, J. L. PAUL, T. SONI und N. MOATTI (1996). *High-density lipoprotein 3 physicochemical modifications induced by interaction with human polymorphonuclear leucocytes affect their ability to remove cholesterol from cells*. *Biochem J*, 314 ( Pt 1):285–92.
- [COHEN et al. 1986] COHEN, H. J., M. E. CHOVANIEC, K. TAKAHASHI und J. C. WHITIN (1986). *Activation of human granulocytes by arachidonic acid: its use and limitations for investigating granulocyte functions*. *Blood*, 67:1103–1109.
- [DA COSTA MARTINS et al. 2007] COSTA MARTINS, PAULA DA, J.-J. GARCÍA-VALLEJO, J. V. VAN THIENEN, M. FERNANDEZ-BORJA, J. M. VAN GILS, C. BECKERS, A. J. HORREVOETS, P. L. HORDIJK und J.-J. ZWAGINGA (2007). *P-selectin glycoprotein ligand-1 is expressed on endothelial cells and mediates monocyte adhesion to activated endothelium*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 27:1023–1029.
- [DAHLGREN und KARLSSON 1999] DAHLGREN, C. und A. KARLSSON (1999). *Respiratory*

- burst in human neutrophils.* J Immunol Methods, 232:3–14.
- [DAVIES et al. 1993] DAVIES, M. J., J. L. GORDON, A. J. GEARING, R. PIGOTT, N. WOOLF, D. KATZ und A. KYRIAKOPOULOS (1993). *The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis.* J Pathol, 171:223–9.
- [DENSEN P 1995] DENSEN P, CLARK RA, NAUSEEF WM (1995). *Granulocytic Phagocytes.* In: MANDELL GL, BENNETT JE, DOLIN R, Hrsg.: *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases*, Bd. 1. Churchill Livingstone Inc., New York, 4th Aufl.
- [DERSCH et al. 2005] DERSCH, K., H. ICHIJO, S. BHAKDI und M. HUSMANN (2005). *Fatty acids liberated from low-density lipoprotein trigger endothelial apoptosis via mitogen-activated protein kinases.* Cell Death Differ, 12:1107–14.
- [DOLLERY et al. 2003] DOLLERY, C. M., C. A. OWEN, G. K. SUKHOVA, A. KRETTEK, S. D. SHAPIRO und P. LIBBY (2003). *Neutrophil elastase in human atherosclerotic plaques: production by macrophages.* Circulation, 107:2829–36.
- [DOLLERY und LIBBY 2006] DOLLERY, CLARE M und P. LIBBY (2006). *Atherosclerosis and proteinase activation..* Cardiovasc Res, 69:625–635.
- [DOROSHENKO und DOROSHENKO 2004] DOROSHENKO, N. und P. DOROSHENKO (2004). *Ca<sup>2+</sup> influx is not involved in acute cytotoxicity of arachidonic acid.* Biochem Pharmacol, 67:903–9.
- [DORWEILER et al. 2008] DORWEILER, BERNHARD, M. TORZEWSKI, M. DAHM, C. J. KIRKPATRICK, K. J. LACKNER und C.-F. VAHL (2008). *Subendothelial infiltration of neutrophil granulocytes and liberation of matrix-stabilizing enzymes in an experimental model of human neo-intima..* Thromb Haemost, 99:373–381.
- [DROBNIK et al. 2002] DROBNIK, WOLFGANG, H. BORSUKOVA, A. BÖTTCHER, A. PFEIFFER, G. LIEBISCH, G. J. SCHÜTZ, H. SCHINDLER und G. SCHMITZ (2002). *Apo AI/ABCA1-dependent and HDL3-mediated lipid efflux from compositionally distinct cholesterol-based microdomains..* Traffic, 3:268–278.
- [ERIKSSON et al. 2001] ERIKSSON, E. E., X. XIE, J. WERR, P. THOREN und L. LINDBOM (2001). *Direct viewing of atherosclerosis in vivo: plaque invasion by leukocytes is initiated by the endothelial selectins.* Faseb J, 15:1149–57.
- [FADEEL et al. 1998] FADEEL, B., A. AHLIN, J. I. HENTER, S. ORRENIUS und M. B. HAMPTON (1998). *Involvement of caspases in neutrophil apoptosis: regulation by reactive oxygen species..* Blood, 92:4808–4818.

- [FAN und WATANABE 2003] FAN, JIANGLIN und T. WATANABE (2003). *Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis.* J Atheroscler Thromb, 10:63–71.
- [FENG et al. 2003] FENG, B., P. M. YAO, Y. LI, C. M. DEVLIN, D. ZHANG, H. P. HARDING, M. SWEENEY, J. X. RONG, G. KURIAKOSE, E. A. FISHER, A. R. MARKS, D. RON und I. TABAS (2003). *The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages.* Nat Cell Biol, 5(9):781–92.
- [FENSKE et al. 2008] FENSKE, DOMINIC, K. DERSCH, C. LUX, L. ZIPSE, P. SURIYAPHOL, Y. DRAGNEVA, S.-R. HAN, S. BHAKDI und M. HUSMANN (2008). *Enzymatically hydrolyzed low-density lipoprotein modulates inflammatory responses in endothelial cells.* Thromb Haemost, 100:1146–1154.
- [GAMBERUCCI et al. 1997] GAMBERUCCI, A., R. FULCERI, F. L. BYGRAVE und A. BENEDETTI (1997). *Unsaturated fatty acids mobilize intracellular calcium independent of IP3 generation and VIA insertion at the plasma membrane.* Biochem Biophys Res Commun, 241:312–6.
- [GERARD und GERARD 1991] GERARD, N. P. und C. GERARD (1991). *The chemotactic receptor for human C5a anaphylatoxin.* Nature, 349:614–617.
- [GHOSH et al. 1998] GHOSH, S., M. J. MAY und E. B. KOPP (1998). *NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses.* Annu Rev Immunol, 16:225–260.
- [GOLDSTEIN und BROWN 1977] GOLDSTEIN, J. L. und M. S. BROWN (1977). *Atherosclerosis: the low-density lipoprotein receptor hypothesis.* Metabolism, 26:1257–1275.
- [GOLDSTEIN et al. 1979] GOLDSTEIN, J. L., Y. K. HO, S. K. BASU und M. S. BROWN (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.
- [GREGORIADIS 2006] GREGORIADIS, GREGORY (2006). *Liposome technology.*
- [HALL et al. 2003] HALL, MARIE-CLAIRE, D. A. YOUNG, J. G. WATERS, A. D. ROWAN, A. CHANTRY, D. R. EDWARDS und I. M. CLARK (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.
- [HANSSON und LIBBY 2006] HANSSON, GÖRAN K und P. LIBBY (2006). *The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword.* Nat Rev Immunol, 6:508–519.

- [HAVEL et al. 1955] HAVEL, R. J., H. A. EDER und J. H. BRAGDON (1955). *The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum.* J Clin Invest, 34:1345–1353.
- [HEALY et al. 2003] HEALY, D. A., R. W. WATSON und P. NEWSHOLME (2003). *Polyunsaturated and monounsaturated fatty acids increase neutral lipid accumulation, caspase activation and apoptosis in a neutrophil-like, differentiated HL-60 cell line.* Clin Sci (Lond), 104:171–9.
- [HEBERT et al. 1990] HEBERT, C. A., F. W. LUSCINSKAS, J. M. KIELY, E. A. LUIS, W. C. DARBONNE, G. L. BENNETT, C. C. LIU, M. S. OBIN, J. GIMBRONE, M. A. und J. B. BAKER (1990). *Endothelial and leukocyte forms of IL-8. Conversion by thrombin and interactions with neutrophils.* J Immunol, 145:3033–40.
- [HEERMEIER et al. 2001] HEERMEIER, K., W. LEICHT, A. PALMETSHOFER, M. ULLRICH, C. WANNER und J. GALLE (2001). *Oxidized LDL suppresses NF-kappaB and overcomes protection from apoptosis in activated endothelial cells.* J Am Soc Nephrol, 12:456–463.
- [HELENIUS und SIMONS 1975] HELENIUS, A. und K. SIMONS (1975). *Solubilization of membranes by detergents.* Biochim Biophys Acta, 415:29–79.
- [HEMDAHL et al. 2006] HEMDAHL, ANNE-LOUISE, A. GABRIELSEN, C. ZHU, P. ERIKSSON, U. HEDIN, J. KASTRUP, P. THORÉN und G. K. HANSSON (2006). *Expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in atherosclerosis and myocardial infarction.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 26:136–142.
- [HENNIG et al. 1996] HENNIG, B., M. TOBOREK, S. JOSHI-BARVE, S. W. BARGER, S. BARVE, M. P. MATTSON und C. J. MCCLAIN (1996). *Linoleic acid activates nuclear transcription factor-kappa B (NF-kappa B) and induces NF-kappa B-dependent transcription in cultured endothelial cells.* Am J Clin Nutr, 63:322–328.
- [HERMAN et al. 2001] HERMAN, M. P., G. K. SUKHOVA, P. LIBBY, N. GERDES, N. TANG, D. B. HORTON, M. KILBRIDE, R. E. BREITBART, M. CHUN und U. SCHONBECK (2001). *Expression of neutrophil collagenase (matrix metalloproteinase-8) in human atheroma: a novel collagenolytic pathway suggested by transcriptional profiling.* Circulation, 104:1899–904.
- [HIGAZI und BARGHOUTI 1994] HIGAZI, A. AL-R. und I. BARGHOUTI (1994). *Regulation of neutrophil activation by oleic acid.* Biochim Biophys Acta, 1201:442–6.
- [HIPPEL et al. 2002] HIPPEL, MARK S, C. URBICH, P. MAYER, J. WISCHHUSEN, M. WELLER, M. KRACHT und I. SPYRIDOPOULOS (2002). *Proteasome inhibition leads to NF-kappaB-independent IL-8 transactivation in human endothelial cells through induction of AP-1.* Eur

- J Immunol, 32:2208–2217.
- [HUSMANN et al. 2006] HUSMANN, MATTHIAS, K. DERSCH, W. BOBKIEWICZ, E. BECKMANN, G. VEERACHATO und S. BHAKDI (2006). *Differential role of p38 mitogen activated protein kinase for cellular recovery from attack by pore-forming S. aureus alpha-toxin or streptolysin O.* Biochem Biophys Res Commun, 344:1128–1134.
- [JAMIL et al. 1996] JAMIL, H., D. A. GORDON, D. C. EUSTICE, C. M. BROOKS, J. K. DICKSON, Y. CHEN, B. RICCI, C. H. CHU, T. W. HARRITY, C. P. CIOSEK, S. A. BILLER, R. E. GREGG und J. R. WETTERAU (1996). *An inhibitor of the microsomal triglyceride transfer protein inhibits apoB secretion from HepG2 cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 93:11991–11995.
- [JONASSON et al. 1986] JONASSON, L., J. HOLM, O. SKALLI, G. BONDJERS und G. K. HANSSON (1986). *Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque.* Arteriosclerosis, 6:131–8.
- [JONES und WILLINGHAM 1999] JONES, N. L. und M. C. WILLINGHAM (1999). *Modified LDLs are internalized by macrophages in part via macropinocytosis.* Anat Rec, 255:57–68.
- [KAPINSKY et al. 2001] KAPINSKY, M., M. TORZEWSKI, C. BÜCHLER, C. Q. DUONG, G. ROTHE und G. SCHMITZ (2001). *Enzymatically degraded LDL preferentially binds to CD14(high) CD16(+) monocytes and induces foam cell formation mediated only in part by the class B scavenger-receptor CD36.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 21:1004–1010.
- [KARIN 1995] KARIN, M. (1995). *The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases.* J Biol Chem, 270:16483–16486.
- [KARIN et al. 1997] KARIN, M., Z. LIU und E. ZANDI (1997). *AP-1 function and regulation.* Curr Opin Cell Biol, 9:240–246.
- [KLING et al. 1993] KLING, D., T. HOLZSCHUH und E. BETZ (1993). *Recruitment and dynamics of leukocytes in the formation of arterial intimal thickening—a comparative study with normo- and hypercholesterolemic rabbits.* Atherosclerosis, 101:79–96.
- [KLOUCHE et al. 1998] KLOUCHE, M., S. GOTTSCHLING, V. GERL, W. HELL, M. HUSMANN, B. DORWEILER, M. MESSNER und S. BHAKDI (1998). *Atherogenic properties of enzymatically degraded LDL: selective induction of MCP-1 and cytotoxic effects on human macrophages.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 18:1376–85.
- [KLOUCHE et al. 1999] KLOUCHE, M., A. E. MAY, M. HEMMES, M. MESSNER, S. M. KANSE, K. T. PREISSNER und S. BHAKDI (1999). *Enzymatically modified, nonoxidized LDL induces selective adhesion and transmigration of monocytes and T-lymphocytes through human*

- endothelial cell monolayers*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 19:784–93.
- [KOLLER et al. 1997] KOLLER, M., P. WACHTLER, A. DAVID, G. MUHR und W. KONIG (1997). *Arachidonic acid induces DNA-fragmentation in human polymorphonuclear neutrophil granulocytes*. *Inflammation*, 21:463–74.
- [KRISCHER et al. 1998] KRISCHER, S. M., M. EISENMANN und M. J. MUELLER (1998). *Transport of arachidonic acid across the neutrophil plasma membrane via a protein-facilitated mechanism*. *Biochemistry*, 37:12884–91.
- [KRUTH 1984] 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 1985] KRUTH, H. S. (1985). *Subendothelial accumulation of unesterified cholesterol. An early event in atherosclerotic lesion development..* *Atherosclerosis*, 57:337–341.
- [KRUTH und FRY 1984] KRUTH, H. S. und D. L. FRY (1984). *Histochemical detection and differentiation of free and esterified cholesterol in swine atherosclerosis using filipin*. *Exp Mol Pathol*, 40:288–94.
- [KRUTH et al. 2005] KRUTH, HOWARD S, N. L. JONES, W. HUANG, B. ZHAO, I. ISHII, J. CHANG, C. A. COMBS, D. MALIDE und W.-Y. ZHANG (2005). *Macropinocytosis is the endocytic pathway that mediates macrophage foam cell formation with native low density lipoprotein..* *J Biol Chem*, 280:2352–2360.
- [KULDO et al. 2005] KULDO, JOANNA M, K. I. OGAWARA, N. WERNER, S. A. AS-GEIRSDÓTTIR, J. A. A. M. KAMPS, R. J. KOK und G. MOLEMA (2005). *Molecular pathways of endothelial cell activation for (targeted) pharmacological intervention of chronic inflammatory diseases..* *Curr Vasc Pharmacol*, 3:11–39.
- [KUPPER et al. 1992] KUPPER, R. W., B. DEWALD, K. H. JAKOBS, M. BAGGIOLINI und P. GIERSCHIK (1992). *G-protein activation by interleukin 8 and related cytokines in human neutrophil plasma membranes..* *Biochem J*, 282 ( Pt 2):429–434.
- [LESTER 1990] LESTER, D. S. (1990). *In vitro linoleic acid activation of protein kinase C..* *Biochim Biophys Acta*, 1054:297–303.
- [LEY et al. 2007] LEY, KLAUS, C. LAUDANNA, M. I. CYBULSKY und S. NOURSHARGH (2007). *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated..* *Nat Rev Immunol*, 7:678–689.
- [LÖFFLER 2007a] LÖFFLER, GEORG (2007a). *Stoffwechsel von Phosphoglyceriden, Sphingo-*

- lipiden und Cholesterin*. In: *Biochemie und Pathobiochemie*. Georg Löffler Petro E. Petrides Peter C. Heinrich.
- [LÖFFLER 2007b] LÖFFLER, GEORG (2007b). *Stoffwechsel von Triacylglycerinen und Fettsäuren*. In: *Biochemie und Pathobiochemie*. Georg Löffler Petro E. Petrides Peter C. Heinrich.
- [LIBBY 2000] LIBBY, P. (2000). *Changing concepts of atherogenesis*. J Intern Med, 247:349–358.
- [LIBBY 2002] LIBBY, PETER (2002). *Inflammation in atherosclerosis*. Nature, 420:868–874.
- [LIBBY 2006] LIBBY, PETER (2006). *Inflammation and cardiovascular disease mechanisms*. Am J Clin Nutr, 83:456S–460S.
- [DE LIMA et al. 2006] LIMA, THAIS MARTINS DE, M. F. CURY-BOAVENTURA, G. GIANNOCCO, M. T. NUNES und R. CURI (2006). *Comparative toxicity of fatty acids on a macrophage cell line (J774)*. Clin Sci (Lond), 111:307–317.
- [LIN et al. 1996] LIN, J. H., Y. ZHU, H. L. LIAO, Y. KOBARI, L. GROSZEK und M. B. STEMERMAN (1996). *Induction of vascular cell adhesion molecule-1 by low-density lipoprotein*. Atherosclerosis, 127:185–194.
- [LOVSTAD 1986] LOVSTAD, R. A. (1986). *Fatty acid induced hemolysis. Protective action of ceruloplasmin, albumins, thiols and vitamin C*. Int J Biochem, 18:771–5.
- [LUSIS 2000] LUSIS, A. J. (2000). *Atherosclerosis*. Nature, 407(6801):233–241.
- [MAINGRETTE und RENIER 2005] MAINGRETTE, FRITZ und G. RENIER (2005). *Linoleic acid increases lectin-like oxidized LDL receptor-1 (LOX-1) expression in human aortic endothelial cells*. Diabetes, 54:1506–1513.
- [MAZZONE et al. 1993] MAZZONE, A., S. DE SERVI, G. RICEVUTI, I. MAZZUCHELLI, G. FOSSATI, D. PASOTTI, E. BRAMUCCI, L. ANGOLI, F. MARSICO, G. SPECCHIA und ET AL. (1993). *Increased expression of neutrophil and monocyte adhesion molecules in unstable coronary artery disease*. Circulation, 88:358–63.
- [DE MEDINA et al. 2004] MEDINA, PHILIPPE DE, B. L. PAYRÉ, J. BERNAD, I. BOSSER, B. PIPY, S. SILVENTE-POIROT, G. FAVRE, J.-C. FAYE und M. POIROT (2004). *Tamoxifen is a potent inhibitor of cholesterol esterification and prevents the formation of foam cells*. J Pharmacol Exp Ther, 308:1165–1173.
- [MEHTA et al. 1989] MEHTA, J., J. DINERMAN, P. MEHTA, T. G. SALDEEN, D. LAWSON, W. H. DONNELLY und R. WALLIN (1989). *Neutrophil function in ischemic heart disease*.

- Circulation, 79:549–56.
- [MONACO und PALEOLOG 2004] MONACO, CLAUDIA und E. PALEOLOG (2004). *Nuclear factor kappaB: a potential therapeutic target in atherosclerosis and thrombosis..* Cardiovasc Res, 61:671–682.
- [NAKASHIMA et al. 2008] NAKASHIMA, YUTAKA, T. N. WIGHT und K. SUEISHI (2008). *Early atherosclerosis in humans: role of diffuse intimal thickening and extracellular matrix proteoglycans..* Cardiovasc Res, 79:14–23.
- [NARUKO et al. 2002] NARUKO, T., M. UEDA, K. HAZE, A. C. VAN DER WAL, C. M. VAN DER LOOS, A. ITOH, R. KOMATSU, Y. IKURA, M. OGAMI, Y. SHIMADA, S. EHARA, M. YOSHIYAMA, K. TAKEUCHI, J. YOSHIKAWA und A. E. BECKER (2002). *Neutrophil infiltration of culprit lesions in acute coronary syndromes.* Circulation, 106:2894–900.
- [NASHKEVICH et al. 2002] NASHKEVICH, N. N., S. AKALOVICH, N. LOUNEVA, G. A. HEAVNER und N. N. VOITENOK (2002). *A monoclonal antibody and an enzyme immunoassay for human Ala-IL-8(77).* J Immunol Methods, 270:37–51.
- [NAVAB et al. 1996] NAVAB, M., J. A. BERLINER, A. D. WATSON, S. Y. HAMA, M. C. TERRITO, A. J. LUSIS, D. M. SHIH, B. J. V. LENTEN, J. S. FRANK, L. L. DEMER, P. A. EDWARDS und A. M. FOGELMAN (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.
- [NISSEN et al. 2006] NISSEN, STEVEN E, E. M. TUZCU, H. B. BREWER, I. SIPAHI, S. J. NICHOLLS, P. GANZ, P. SCHOENHAGEN, D. D. WATERS, C. J. PEPINE, T. D. CROWE, M. H. DAVIDSON, J. E. DEANFIELD, L. M. WISNIEWSKI, J. J. HANYOK, L. M. KASSALOW und A. C. A. T. I. A. T. E. A. INVESTIGATORS (2006). *Effect of ACAT inhibition on the progression of coronary atherosclerosis..* N Engl J Med, 354:1253–1263.
- [O'DONNELL et al. 1993] O'DONNELL, B. V., D. G. TEW, O. T. JONES und P. J. ENGLAND (1993). *Studies on the inhibitory mechanism of iodonium compounds with special reference to neutrophil NADPH oxidase..* Biochem J, 290 ( Pt 1):41–49.
- [OORNI et al. 2000] OORNI, K., M. O. PENTIKAINEN, M. ALA-KORPELA und P. T. KOVANEN (2000). *Aggregation, fusion, and vesicle formation of modified low density lipoprotein particles: molecular mechanisms and effects on matrix interactions.* J Lipid Res, 41:1703–14.
- [PADRINES et al. 1994] PADRINES, M., M. WOLF, A. WALZ und M. BAGGIOLINI (1994). *Interleukin-8 processing by neutrophil elastase, cathepsin G and proteinase-3.* FEBS Lett, 352:231–5.

- [PAUMEN et al. 1997] PAUMEN, M. B., Y. ISHIDA, M. MURAMATSU, M. YAMAMOTO und T. HONJO (1997). *Inhibition of carnitine palmitoyltransferase I augments sphingolipid synthesis and palmitate-induced apoptosis*. J Biol Chem, 272:3324–9.
- [PERKINS 2000] PERKINS, N. D. (2000). *The Rel/NF-kappa B family: friend and foe*. Trends Biochem Sci, 25:434–440.
- [PERRELLA et al. 2001] PERRELLA, M. A., A. PELLACANI, M. D. LAYNE, A. PATEL, D. ZHAO, B. M. SCHREIBER, J. STORCH, M. W. FEINBERG, C. M. HSIEH, E. HABER und M. E. LEE (2001). *Absence of adipocyte fatty acid binding protein prevents the development of accelerated atherosclerosis in hypercholesterolemic mice*. FASEB J, 15:1774–6.
- [PETRIDES 2007] PETRIDES, PETRO E. (2007). *Leukozyten*. In: *Biochemie und Pathobiochemie*. Georg Löffler Petro E. Petrides Peter C. Heinrich.
- [PSCHYREMBEL 2007] PSCHYREMBEL, WILLIBALD, Hrsg. (2007). *Klinisches Wörterbuch*. de Gruyter, 261 Aufl.
- [ROSS 1999a] ROSS, R. (1999a). *Atherosclerosis—an inflammatory disease*. N Engl J Med, 340:115–126.
- [ROSS 1999b] ROSS, R. (1999b). *Atherosclerosis is an inflammatory disease*. Am Heart J, 138:S419–S420.
- [SCHEEL-TOELLNER et al. 2004] SCHEEL-TOELLNER, D., K. WANG, R. CRADDOCK, P. R. WEBB, H. M. MCGETTRICK, L. K. ASSI, N. PARKES, L. E. CLOUGH, E. GULBINS, M. SALMON und J. M. LORD (2004). *Reactive oxygen species limit neutrophil life span by activating death receptor signaling*. Blood, 104:2557–64.
- [SCHWARZ et al. 2008] SCHWARZ, MARGARETHE, L. SPATH, C. A. LUX, K. PAPROTKA, M. TORZEWSKI, K. DERSCH, C. KOCH-BRANDT, M. HUSMANN und S. BHAKDI (2008). *Potential protective role of apoprotein J (clusterin) in atherogenesis: binding to enzymatically modified low-density lipoprotein reduces fatty acid-mediated cytotoxicity*. Thromb Haemost, 100:110–118.
- [SCHWENKE und CAREW 1989] SCHWENKE, D. C. und T. E. CAREW (1989). *Initiation of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits. II. Selective retention of LDL vs. selective increases in LDL permeability in susceptible sites of arteries*. Arteriosclerosis, 9:908–918.
- [SEDGWICK et al. 2003] SEDGWICK, J. B., Y. S. HWANG, H. A. GERBYSHAK, H. KITA und W. W. BUSSE (2003). *Oxidized low-density lipoprotein activates migration and degranulation of human granulocytes*. Am J Respir Cell Mol Biol, 29:702–9.

- [SEIFERT et al. 1990] SEIFERT, P. S., F. HUGO, J. TRANUM-JENSEN, U. ZÂHRINGER, M. MUHLY und S. BHAKDI (1990). *Isolation and characterization of a complement-activating lipid extracted from human atherosclerotic lesions..* J Exp Med, 172:547–557.
- [SHIN et al. 2002] SHIN, WILLIAM S, A. SZUBA und S. G. ROCKSON (2002). *The role of chemokines in human cardiovascular pathology: enhanced biological insights..* Atherosclerosis, 160:91–102.
- [SIMARD et al. 2005] SIMARD, J. R., P. A. ZUNSZAIN, C.-E. HA, J. S. YANG, N. V. BHAGAVAN, I. PETITPAS, S. CURRY und J. A. HAMILTON (2005). *Locating high-affinity fatty acid-binding sites on albumin by x-ray crystallography and NMR spectroscopy..* Proc Natl Acad Sci U S A, 102:17958–17963.
- [SIMIONESCU et al. 1986] SIMIONESCU, N., E. VASILE, F. LUPU, G. POPESCU und M. SIMIONESCU (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, 123:109–25.
- [SMITH und ASHALL 1983] SMITH, E. B. und C. ASHALL (1983). *Low-density lipoprotein concentration in interstitial fluid from human atherosclerotic lesions. Relation to theories of endothelial damage and lipoprotein binding..* Biochim Biophys Acta, 754:249–257.
- [SPECTOR 1975] SPECTOR, A. A. (1975). *Fatty acid binding to plasma albumin.* J Lipid Res, 16:165–79.
- [STARY 2000] STARY, H. C. (2000). *Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update..* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 20:1177–1178.
- [STARY et al. 1995] STARY, H. C., A. B. CHANDLER, R. E. DINSMORE, V. FUSTER, S. GLAGOV, W. INSULL, M. E. ROSENFELD, C. J. SCHWARTZ, W. D. WAGNER und R. W. WISSLER (1995). *A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association..* Circulation, 92:1355–1374.
- [STARY et al. 1994] STARY, H. C., A. B. CHANDLER, S. GLAGOV, J. R. GUYTON, W. INSULL, M. E. ROSENFELD, S. A. SCHAFFER, C. J. SCHWARTZ, W. D. WAGNER und R. W. WISSLER (1994). *A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association..* Circulation, 89:2462–2478.
- [STEINBRECHER und LOUGHEED 1992] STEINBRECHER, U. P. und M. LOUGHEED (1992). *Scavenger receptor-independent stimulation of cholesterol esterification in macrophages by*

- low density lipoprotein extracted from human aortic intima.. Arterioscler Thromb*, 12:608–625.
- [SUGIYAMA et al. 1998] SUGIYAMA, S., K. KUGIYAMA, N. OGATA, H. DOI, Y. OTA, M. OHGUSHI, T. MATSUMURA, H. OKA und H. YASUE (1998). *Biphasic regulation of transcription factor nuclear factor-kappaB activity in human endothelial cells by lysophosphatidylcholine through protein kinase C-mediated pathway.. Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 18:568–576.
- [SURIYAPHOL et al. 2002] SURIYAPHOL, P., D. FENSKE, U. ZHRINGER, S. R. HAN, S. BHAKDI und M. HUSMANN (2002). *Enzymatically modified nonoxidized low-density lipoprotein induces interleukin-8 in human endothelial cells: role of free fatty acids. Circulation*, 106:2581–7.
- [TABAS 1999] TABAS, I. (1999). *Nonoxidative modifications of lipoproteins in atherogenesis.. Annu Rev Nutr*, 19:123–139.
- [TABAS 2002] TABAS, I. (2002). *Consequences of cellular cholesterol accumulation: basic concepts and physiological implications. J Clin Invest*, 110:905–11.
- [TABAS et al. 2007] TABAS, IRA, K. J. WILLIAMS und J. BORÉN (2007). *Subendothelial lipoprotein retention as the initiating process in atherosclerosis: update and therapeutic implications.. Circulation*, 116:1832–1844.
- [THEWS G. 1999] THEWS G., MUTSCHLER E., VAUPEL P. (1999). *Anatomie Physiologie Pathophysiologie des Menschen*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.
- [TORZEWSKI et al. 1998] TORZEWSKI, M., M. KLOUCHE, J. HOCK, M. MESSNER, B. DORWEILER, J. TORZEWSKI, H. E. GABBERT und S. BHAKDI (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*, 18:369–78.
- [TORZEWSKI und LACKNER 2006] TORZEWSKI, M. und K. J. LACKNER (2006). *Initiation and progression of atherosclerosis—enzymatic or oxidative modification of low-density lipoprotein?. Clin Chem Lab Med*, 44:1389–94.
- [TORZEWSKI et al. 2004] TORZEWSKI, M., P. SURIYAPHOL, K. PAPROTKA, L. SPATH, V. OCHSENHIRT, A. SCHMITT, S. R. HAN, M. HUSMANN, V. B. GERL, S. BHAKDI und K. J. LACKNER (2004). *Enzymatic modification of low-density lipoprotein in the arterial wall: a new role for plasmin and matrix metalloproteinases in atherogenesis. Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24:2130–6.
- [TRABER und KAYDEN 1980] TRABER, M. G. und H. J. KAYDEN (1980). *Low density lipo-*

- protein receptor activity in human monocyte-derived macrophages and its relation to atherosclerotic lesions..* Proc Natl Acad Sci U S A, 77:5466–5470.
- [VENKATACHALAM et al. 1988] VENKATACHALAM, M. A., Y. J. PATEL, J. I. KREISBERG und J. M. WEINBERG (1988). *Energy thresholds that determine membrane integrity and injury in a renal epithelial cell line (LLC-PK1). Relationships to phospholipid degradation and unesterified fatty acid accumulation.* J Clin Invest, 81:745–58.
- [VERHAGEN et al. 1978] VERHAGEN, J., J. F. Vliegenthart und J. BOLDINGH (1978). *Micelle and acid-soap formation of linoleic acid and 13-L-hydroperoxylinoleic acid being substrates of lipoxygenase-1..* Chem Phys Lipids, 22:255–259.
- [WANG et al. 1994] WANG, L. Y., J. K. MA, W. F. PAN, D. TOLEDO-VELASQUEZ, C. J. MALANGA und Y. ROJANASAKUL (1994). *Alveolar permeability enhancement by oleic acid and related fatty acids: evidence for a calcium-dependent mechanism.* Pharm Res, 11:513–7.
- [WEIGERT et al. 2000] WEIGERT, C., U. SAUER, K. BRODBECK, A. PFEIFFER, H. U. HÄRING und E. D. SCHLEICHER (2000). *AP-1 proteins mediate hyperglycemia-induced activation of the human TGF-beta1 promoter in mesangial cells..* J Am Soc Nephrol, 11:2007–2016.
- [WELLER et al. 1991] WELLER, P. F., S. W. RYEOM, S. T. PICARD, S. J. ACKERMAN und A. M. DVORAK (1991). *Cytoplasmic lipid bodies of neutrophils: formation induced by cis-unsaturated fatty acids and mediated by protein kinase C.* J Cell Biol, 113:137–46.
- [WENZEL et al. 2005] WENZEL, U., A. NICKEL und H. DANIEL (2005). *Increased carnitine-dependent fatty acid uptake into mitochondria of human colon cancer cells induces apoptosis.* J Nutr, 135:1510–4.
- [WILLIAMS und TABAS 1995] WILLIAMS, K. J. und I. TABAS (1995). *The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis..* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 15:551–561.
- [WITZTUM und STEINBERG 1991] WITZTUM, J. L. und D. STEINBERG (1991). *Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis..* J Clin Invest, 88:1785–1792.
- [ZERNECKE et al. 2008] ZERNECKE, ALMA, I. BOT, Y. DJALALI-TALAB, E. SHAGDARSUREN, K. BIDZHEKOV, S. MEILER, R. KROHN, A. SCHOBER, M. SPERANDIO, O. SOEHNLEIN, J. BORNEMANN, F. TACKE, E. A. BIESSEN und C. WEBER (2008). *Protective role of CXCR4 receptor 4/CXCR4 ligand 12 unveils the importance of neutrophils in atherosclerosis..* Circ Res, 102:209–217.