



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

Die Rolle der Elastase in der atherosklerotischen Läsionsprogression

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

im Promotionsfach Biologie

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Irina Grechowa

geb. in Nowosibirsk

Mainz, 2016

Dekan:

Erstgutachter:

Zweitgutachter:

Tag der mündlichen Prüfung: 2016

*Inmitten der Schwierigkeiten
liegt die Möglichkeit*

(Albert Einstein)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis		I
Abbildungsverzeichnis		IV
Tabellenverzeichnis		VI
Abkürzungsverzeichnis		VII
1 Einleitung		1
<hr/>		
1.1	Atherosklerose	1
1.1.1	Humane neutrophile Elastase	8
1.2	Endoplasmatischer Retikulum (ER)-Stress	9
1.3	Zelltod-Signalwege	12
1.3.1	Apoptose	12
1.3.2	Nekrose / Nekroptose	13
1.3.3	Autophagie	15
1.4	Protease-aktivierte Rezeptoren (PARs)	18
2 Ziele der Arbeit		20
3 Material		21
<hr/>		
3.1	Chemikalien, Zellkulturmedien, Farbstoffe	21
3.2	Verbrauchsmaterialien	23
3.3	Laborgeräte	24
3.4	Reagenzien und Kits	25
3.5	Lösungen und Puffer	26
3.6	Enzyme und Standards	26
3.7	Antikörper	27
3.7.1	Primärantikörper und Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper	27
3.7.2	Sekundärantikörper	28
3.8	Oligonukleotide für die quantitativen real-time PCR Analysen	29
3.9	Oligonukleotide für RNA-Interferenz & blockierende Antikörper	30
3.10	Zellen und Medien / Medienzusätze	30
3.10.1	Zellen	30
3.10.2	Medien und Zusätze für die Zellkultur	30

3.11	Versuchstiere zur Zellisolation	31
3.12	Humanes Gewebe	31
4	Methoden	32
<hr/>		
4.1	Zellbiologische Arbeitsmethoden	32
4.1.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen	32
4.1.2	Kryokonservierung und Auftauen eukaryotischer Zellen	32
4.1.3	Bestimmung der Zellzahl und Aussaat	33
4.1.4	Transfektion von siRNA in eukaryotische Zellen	34
4.1.5	Blockierung des PAR-2 Rezeptors mittels Antikörper	34
4.1.6	Messung der Caspase-3/7-Aktivität und Zell-Viabilität in eukaryotischen Zellen	35
4.1.7	Überprüfung des PAR-1- <i>Knockdowns</i> mittels Durchflusszytometrie	36
4.1.8	Messung apoptotischer Zellen mittels Durchflusszytometrie	36
4.1.9	Messung der Autophagie mittels Durchflusszytometrie	37
4.1.10	Nachweis apoptotischen Zelltodes mittels Konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)	38
4.1.11	Messung der CHOP- und cCaspase-3-Intensität in fixierten Zellen am CLSM	38
4.2	Molekularbiologische Arbeitsmethoden	40
4.2.1	Extraktion der Gesamtzell-RNA aus eukaryotischer Zellen	40
4.2.2	Bestimmung des Nukleinsäuregehalts	40
4.2.3	cDNA-Synthese mittels Reverser Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)	40
4.2.4	Quantitative <i>real-time</i> RT-PCR (qRT-PCR)	41
4.3	Proteinbiochemische Arbeitsmethoden	42
4.3.1	Herstellung von Gesamtprotein-Extrakten aus eukaryotischen Zellen und humanen Karotisproben	42
4.3.2	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Test	43
4.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	43
4.3.4	Western Blot (WB): Immunologischer Nachweis zur Identifizierung von Proteinen	45
4.4	Isolierung von murinen Peritoneal-Makrophagen (mPM)	47
4.5	Histologische Arbeitsmethoden	47
4.5.1	Entnahme von Gewebeproben und Aufbewahrung	48
4.5.2	Histopathologie	48
4.5.3	Immunhistochemische Färbungen	49
4.5.4	Doppelimmunhistochemie	51
4.6	Statistik	52
5	Ergebnisse	53
<hr/>		
5.1	<i>In vitro</i> Charakterisierung der Rolle der Elastase in humanen Endothelzellen	53
5.1.1	Elastase induziert Apoptose in humanen Endothelzellen	53
5.1.2	Elastase induziert Autophagie in humanen Endothelzellen	57
5.1.3	Nekrose und Nekroptose sind beim endothelialen Zelltod nicht beteiligt	59
5.1.4	Elastase aktiviert den Stress-Signalweg <i>unfolded protein response (UPR)</i>	61

5.1.5	Der <i>Knockdown</i> von CHOP verhindert den Elastase-induzierten Zelltod	69
5.1.6	PAR-1 ist nicht an dem Elastase-induzierten Zelltod beteiligt	72
5.1.7	PAR-2 ist nicht an dem Elastase-induzierten Zelltod beteiligt	76
5.1.8	Charakterisierung der Rolle der Elastase in glatten Gefäßmuskelzellen und Makrophagen	77
5.2	<i>Ex vivo</i> Charakterisierung der Rolle der Elastase in humanen Gewebeproben	80
5.2.1	Histopathologie von humanen Karotisplaques	81
5.2.2	Lokalisation von Elastase und Makrophagen in humanen Karotisplaques	84
5.2.3	Aktivierung von Zelltod-Markern in humanen Karotisplaques	85
5.2.4	Aktivierung von UPR-Markern in humanen Karotisplaques	86
5.2.5	Kolokalisationsanalysen an humanen Karotisplaques	91
6	Diskussion	94
6.1	<i>In vitro</i> Charakterisierung der Rolle der Elastase in humanen Endothelzellen	94
6.1.1	Elastase induziert Apoptose in humanen Endothelzellen	94
6.1.2	Die Signalkaskade des Elastase-induzierten UPR	96
6.1.3	Elastase-induzierte Autophagie in Endothelzellen	98
6.1.4	PAR-1 und PAR-2 sind nicht an dem Elastase-induzierten Zelltod beteiligt	99
6.1.5	Elastase induziert UPR-vermittelte Apoptose spezifisch in Endothelzellen	100
6.2	Charakterisierung des Einflusses der Elastase auf die atherosklerotische Läsionsprogression	102
6.3	Elastase und ER-Stress als <i>therapeutisches Target</i> ?	106
7	Zusammenfassung	108
8	Literatur	109
9	Publikationsliste	120

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Schematische Darstellung der atherosklerotische Plaqueformation.	4
Abbildung 1-2: Schematische Darstellung des ER-Stress Signalweges UPR.	11
Abbildung 5-1: Elastase induziert eine Caspase-3/7-Aktivierung in primären humanen Aorten-Endothelzellen (HAoECs).	54
Abbildung 5-2: Elastase induziert eine Caspase-3/7-Aktivierung in immortalisierten humanen Endothelzellen.	55
Abbildung 5-3: Elastase induziert Doppelstrangbrüche in EA.hy 926-Zellen.	56
Abbildung 5-4: EA.hy 926-Zellen weisen nach Elastase-Behandlung eine erhöhte Zelltodrate auf.	57
Abbildung 5-5: Elastase induziert Autophagie in EA.hy 926-Zellen.	58
Abbildung 5-6: Elastase führt nicht zur Freisetzung von Lactatdehydrogenase (LDH).	60
Abbildung 5-7: Necrostatin-1 verhindert nicht den Elastase-induzierten Zelltod.	60
Abbildung 5-8: Necrostatin-1 alleine hat keinen Einfluss auf die Endothelzellen.	61
Abbildung 5-9: Schematische Darstellung des UPR (<i>unfolded protein response</i>) Signalweges.	62
Abbildung 5-10: Spezifität des anti-phospho-PERK Antikörpers.	63
Abbildung 5-11: Elastase induziert die Phosphorylierung und Aktivierung von PERK.	64
Abbildung 5-12: Elastase induziert die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors eIF2 α in Endothelzellen.	65
Abbildung 5-13: Elastase induziert die Expression von sXBP1 und GRP78 in EA.hy 926-Zellen.	65
Abbildung 5-14: Elastase induziert pro-apoptotisches CHOP in Endothelzellen.	67
Abbildung 5-15: Erhöhte CHOP- und cCaspase-3-Intensität in EA.hy 926-Zellen nach Elastase-Behandlung.	68
Abbildung 5-16: Herunterregulation von CHOP durch siRNA verringert dessen Induktion / Expression nach Elastase-Behandlung.	70
Abbildung 5-17: Eine CHOP-Defizienz in EA.hy 926-Zellen verhindert Elastase-induzierten Zelltod.	71
Abbildung 5-18: Die CHOP-Defizienz ändert nicht den ATP-Gehalt von EA.hy 926-Zellen.	71
Abbildung 5-19: Die enzymatische Aktivität / katalytische Wirksamkeit der Elastase ist essentiell für die Endothelzell- Apoptose.	72
Abbildung 5-20: Überprüfung der PAR-1-Defizienz in EA.hy 926-Zellen.	73
Abbildung 5-21: Die PAR-1-Defizienz verhindert nach einer Elastase-Behandlung nicht die gesteigerte Expression von CHOP in Endothelzellen.	74
Abbildung 5-22: PAR-1-Defizienz verhindert weder die Elastase-induzierte Caspase-3/7-Aktivierung noch den Zelltod von EA.hy 926-Zellen.	75
Abbildung 5-23: Die PAR-1-Defizienz kann den Zelltod von EA.hy 926-Zellen nicht vermindern.	75

Abbildung 5-24: PAR-2-Defizienz verhindert nach der Elastase-Behandlung weder eine Caspase-3/7-Aktivierung noch den Zelltod von EA.hy 926-Zellen.	76
Abbildung 5-25: Elastase induziert den UPR in primären glatten Muskelzellen.	78
Abbildung 5-26: Elastase induziert weder Caspase-3/7-Aktivität noch Zelltod von HCASMCs, jedoch Autophagie.	79
Abbildung 5-27: Elastase induziert keine Caspase-3/7-Aktivierung in murinen Peritoneal-Makrophagen.	80
Abbildung 5-28: Quantitative Auswertung der morphologischen Untersuchungen von humanen Karotisplaques.	83
Abbildung 5-29: Semiquantitative Analysen von CD68- (Makrophagen) und Elastase-Marker in humanen Karotisplaques.	84
Abbildung 5-30: Semiquantitative Analysen von Zelltod-Markern in humanen Karotisplaques.	85
Abbildung 5-31: Semiquantitative Analysen von UPR-Markern in humanen Karotisplaques.	87
Abbildung 5-32: Erhöhte CHOP-Expression in humanen Karotisplaques.	88
Abbildung 5-33: In Endothelzellen sind ebenfalls Elastase-, UPR- und Apoptose-Marker exprimiert.	88
Abbildung 5-34: Übersichtsbilder der einzelnen immunhistologischen Färbungen.	89
Abbildung 5-35: Immunhistologische Kontrollfärbungen von Kontrollgewebe, sowie negative / positive Kontrollen.	90
Abbildung 5-36: Kolokalisation von CHOP und TUNEL in angrenzenden Paraffinschnitten von humanen Karotisplaques.	91
Abbildung 5-37: UPR-Marker KDEL (GRP78 / GRP94) kolokalisiert mit Apoptose-Marker cCaspase-3 und Makrophagen (CD68) in humanen Karotisplaques.	92
Abbildung 5-38: Elastase kolokalisiert mit Makrophagen (CD68), KDEL (GRP78 / GRP94) und Apoptose-Markern.	93
Abbildung 6-1: Zusammenfassung der Ergebnisse.	105

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1: Darstellung der Progression arteriellen Läsionen und ihrer Klassifizierung	7
Tabelle 1.2: Vergleich der Zelltodarten Apoptose, Nekrose, Autophagie.	17
Tabelle 1.3: Protease-aktivierte Rezeptoren (PARs) im kardiovaskulärem System: Zellexpression, Aktivierung, Bindung, Funktion	19
Tabelle 4.1: Zellzahl für Aussaat	33
Tabelle 4.2: Reaktionsansatz und Reaktionsprofil der qRT-PCR	41
Tabelle 4.3: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gele im BioRad Mini Gel	44
Tabelle 4.4: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gele im Peqlab <i>PerfectBlue</i> ExW S Gel	44
Tabelle 5.1: Patientencharakteristika ($n = 10$)	82
Tabelle 8.1: Übersicht der Publikationen	119

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Amino-Actinomycin
7-Keto	5-Cholesten-3 β -ol-7-one (7-Ketocholesterol)
A	Ampere
ADP / ATP	Adenosindiphosphat / Adenosintriphosphat
AP	Alkalische Phosphatase
ApoE	Apolipoprotein E
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATF3 / ATF4 / ATF6	engl. <i>activating transcription factor</i> 3 bzw. 4 bzw. 6
AU	beliebig gesetzte Einheiten (engl. <i>arbitrary units</i>)
BCA	Bicinchoninsäure (engl. <i>bicinchoninic acid</i>)
BSA	Rinder Serum Albumin (engl. <i>bovine serum albumine</i>)
bzw.	beziehungsweise
c	Zenti bzw. geschnitten (engl. <i>cleaved</i>)
Ca	Calcium
CCA	Karotisarterie (engl. <i>common carotid artery</i>)
CD	engl. <i>cluster of differentiation</i>
CHOP	engl. <i>C/EBP homologous protein</i>
cDNA	(zur mRNA) komplementäre DNA (engl. <i>complementary DNA</i>)
CFA	Oberschenkelarterie (engl. <i>common femoral artery</i>)
Chloro	Chloroquin
Cl	Chlorid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cu	Kupfer
Cyt c	Cytochrom c
Da	Dalton
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	doppel destilliertes Wasser

Abkürzungsverzeichnis

DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	standardisiertes Nährmedium (engl. <i>dulbecco's modified eagle medium</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
dNTP(s)	2'-Desoxyribonukleotid-5'-Triphosphatich
ECL	engl. <i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (engl. <i>ethylene diamine tetraacetic acid</i>)
EGF	Epidermale Wachstumsfaktor (engl. <i>epidermal growth factor</i>)
eIF2 α	engl. <i>eukaryotic translation initiation factor 2α</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	lat. <i>Et alii</i> (und andere)
Eto	Etoposid
evtl.	eventuell
FACS	Durchflusszytometrie (engl. <i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FasL	engl. <i>Fas ligand</i>
FCS	Fötale Kälberserum (engl. <i>fetal calf serum</i>)
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (engl. <i>fibroblast growth factor</i>)
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
ggf.	Gegebenenfalls
GRP78 / 94	engl. <i>glucose-regulated protein of 78 kDa / 94 kDa</i>
h	Stunde(n)
HCL	Salzsäure
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. <i>horseradish peroxidase</i>)
ICA	interne Karotisarterie angrenzend an den Plaque (engl. <i>internal carotid artery</i>)
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
ICH	Immunhistochemie
k	Kilo
kb	Kilobase(n)

Abkürzungsverzeichnis

l	Liter
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
LC	engl. <i>microtubule-associated protein 1 light chain</i>
LDH	Lactatdehydrogenase
LDL	Lipoprotein niederer Dichte (engl. <i>low density lipoprotein</i>)
LSAB	Labelled (Strept-)Avidin-Biotin
LSM	Laser-Scanning-Mikroskop (engl. <i>laser scanning microscope</i>)
M	Molar
m	Meter bzw. Milli
μ	Mikro
min	Minute(n)
mRNA	engl. <i>messenger RNA</i>
n	Nano
Na	Natrium
Nec-1	Necrostatin-1
OD	Optische Dichte
p	Pico bzw. phospho
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAR	Protease-aktivierter Rezeptor
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (engl. <i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PERK	engl. <i>protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase</i>
PI	Propidiumiodid
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qRT-PCR	quantitative <i>real-time</i> RT-PCR
Rapa	Rapamycin
RIP	engl. <i>receptor-interacting protein</i>
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <i>ribonucleic acid</i>)
Rnase	Ribonuklease

Abkürzungsverzeichnis

RNS	Reaktive Stickstoffspezies
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (engl. <i>reactive oxygene species</i>)
RT	Reverse Transkription bzw. Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
s	gespalten (engl. <i>spliced</i>)
sek	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
siRNA	kleine eingreifende RNA (engl. <i>small interfering RNA</i>)
SMC	glatte Muskelzellen (engl. <i>smooth muscle cell</i>)
STS	Staurosporin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung (engl. <i>tris buffered saline</i>)
TdT	terminale Desoxyribonukleotidyltransferase
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethylethylendiamin
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRAIL	engl. <i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
TUNEL	engl. <i>TdT-mediated dUTP-X nick end labeling</i>
Tunica	Tunicamycin
U	engl. <i>Unit</i>
u. a.	unter anderem
ü. N	über Nacht
UPR	engl. <i>unfolded protein response</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
XBP1	engl. <i>X-box binding protein 1</i>
z. B.	zum Beispiel
ZVTE	Zentrale Versuchstiereinrichtung

1 Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen stehen global an der Spitze der Morbidität und Mortalität der Bevölkerung (Quelle: World Health Organization, Fact sheet N°317, Updated January 2015). So stellten nach Angaben des Statistischen Bundesamtes Krankheiten des Kreislaufsystems auch im Jahr 2013 mit 39.7 % aller Todesfälle die bei weitem häufigste Todesursache in Deutschland dar (Quelle: Statistisches Bundesamt Deutschland, Fachserie 12 Reihe 4, 2013). Den meisten kardiovaskulären Erkrankungen liegen atherosklerotische Veränderungen der Gefäße zugrunde, welche ihrerseits Folgekrankheiten wie Myokardinfarkt und Schlaganfall (Apoplex) induzieren können ¹. Verschiedene Risikofaktoren begünstigen die Entwicklung und Progression der Atherosklerose, darunter zählen neben Umwelteinflüssen wie Nikotinkonsum, fettreicher Ernährung, körperlicher Inaktivität, Diabetes / metabolisches Syndrom, Hypertonie und Übergewicht bzw. Adipositas auch genetische Prädispositionen wie familiäre Hyperlipidämie ^{2,3}.

Atherosklerose ist eine komplexe multifaktorielle, inflammatorische Erkrankung, deren pathophysiologische Mechanismen bisher noch nicht endgültig aufgeklärt werden konnten. Die Charakterisierung der Mechanismen, die für die Entstehung und Progression der Atherosklerose verantwortlich sind bzw. fördern, sind aus diesem Grund gegenwärtig verstärkter Gegenstand der Forschung und liefern Anregungen für neue therapeutische Ansätze.

1.1 Atherosklerose

Atherosklerose ist eine krankhafte Veränderung der Arterien, die mit einer graduellen Verdickung, Elastizitätsverlust, Verhärtung und Lumeneinengung des betroffenen Gefäßes einhergeht ⁴. Obwohl der fortschreitende Prozess der atherosklerotischen Gefäßveränderung bereits im Kindesalter mit der Einlagerung von Lipiden in die Gefäßwand (Intima) beginnt, vergehen Jahrzehnte bis zum Auftreten klinisch relevanter Komplikationen wie einem Herzinfarkt oder Schlaganfall ^{1,5}.

Für die Atherogenese wurden diverse Hypothesen aufgestellt. In der von Ross beschriebenen *Response to injury*-Hypothese wird durch Risikofaktoren wie Nikotinkonsum, Diabetes, Übergewicht oder Hypertonie eine chronische Endothelschädigung durch Denudation verursacht, als deren Folgen es zur Einwanderung und Akkumulation von Lipiden (LDL; *low density lipoproteins*) in die Intima und zur Ausbildung atherosklerotischer Plaques kommt⁶. Diese Hypothese als ursächliche Erklärung der Atherosklerose wird von Williams und Tabas jedoch verworfen, da sich bei niedrigem LDL-Spiegel trotz Vorliegen von Risikofaktoren keine Läsionen ausbilden. LDL kann auch passiv durch ungeschädigtes Endothel wandern und Lipoproteinansammlungen in der Gefäßwand bilden (*Response-to-retention*-Hypothese von Williams und Tabas). Die meisten atherosklerotischen Läsionen haben selbst im fortgeschrittenen Zustand noch ein intaktes Endothel. Während eine Denudation oder Verletzung des Endothels durchaus progressiv wirken kann, ist sie zur Erklärung des Geschehens in der Atherosklerose vernachlässigbar³. Gegenwärtig wird als Ursache für die Atherosklerose und als eines der frühesten Ereignisse der Atherogenese eine Dysfunktion des Endothels angesehen, die durch kardiovaskuläre Risikofaktoren verursacht werden kann. Bevorzugte Stellen für funktionelle Veränderungen des Endothels sind insbesondere Gefäßbereiche, die starker hämodynamischer Beanspruchung und erhöhten Strömungsstörungen ausgesetzt sind, wie Gefäßverzweigungen oder der Aortenbogen^{7,8}.

Endotheliale Dysfunktion bezeichnet eine eingeschränkte Kontraktions- bzw. Relaxationsfähigkeit des Blutgefäßes, was oft mit einer erhöhten Permeabilität des Endothels für Lipidproteine, insbesondere den LDLs einhergeht (Abbildung 1-1). Auf molekularer Ebene zeigt sich ein sich gegenseitig verstärkender Kreislauf aus vaskulärem oxidativen Stress und damit einhergehenden inflammatorischen Prozessen⁹. Wird im Gefäß vermehrt reaktive Sauerstoff Spezies (ROS) oder reaktive Stickstoffspezies (RNS) gebildet, reagieren diese im subendothelialen Raum (*Lamina intima*) mit den akkumulierten LDL zu oxidiertem LDL (oxLDL). Vermehrte ROS-Bildung und Anreicherung von oxLDL wirken als pro-inflammatorische Stimuli in der Gefäßwand und führen zu einer verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen (wie z.B. E- und P-Selektin, *intercellular adhesion molecule-1*, *vascular cell adhesion molecule-1*), auf der Endothelzelloberfläche. Dies erleichtert den Kontakt, das Anhaften sowie die Transmigration inflammatorischer Zellen wie Monozyten und T-Zellen aus dem Blut an und durch das Endothel¹⁰. Im subendothelialen Raum differenzieren anschließend Monozyten zu Makrophagen aus und nehmen das oxLDL über Scavenger-

Rezeptoren auf. Die insbesondere von Makrophagen und T-Zellen sezernierten Zytokine und Wachstumsfaktoren sind verantwortlich für die (hypertrophe) Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen (SMCs) und deren Migration von der *Lamina media* in die *Lamina intima* sowie für die Produktion von extrazellulärer Matrix (*extracellular matrix*, ECM)^{2,11}. Die kontinuierliche Aufnahme des oxLDL führt zu einer Überladung der Makrophagen mit Lipidprotein und letztlich zu deren Apoptose. Es entstehen die für die atherosklerotische Plaquebildung charakteristischen Schaumzellen¹². Werden die apoptotischen Zellen nur unzureichend durch Phagozyten entfernt, verbleiben diese schließlich im subendotheliale Raum und führen zusammen mit weiterer Lipidaufnahme zur Ausbildung eines nekrotischen Lipidkerns¹³. Es entsteht ein stabiler atherosklerotischer Plaque, der durch eine fibröse Kappe vom zirkulierenden Blut getrennt ist, welche von Endothelzellen und SMCs gebildeter ECM besteht. Bei fortschreitender Plaquebildung kommt es schließlich zu einer Verengung des Gefäßlumens. Durch verstärkten Abbau der ECM und damit einhergehender Verdünnung der fibrösen Kappe kann der atherosklerotische Plaque instabil werden und unter dem Einfluss von Scherkräften bzw. erhöhter mechanischer Beanspruchung schlussendlich aufreißen, wodurch es zur Freisetzung thrombogenen Materials aus dem Plaque kommt (Plaqueruptur). Die daraus resultierende Aktivierung des Blutgerinnungssystems führt letztlich zur Bildung nicht-okkludierender oder okkludierender Thromben mit den entsprechenden klinischen Manifestationen eines Herzinfarktes oder eines Schlaganfalls⁸. Rupturen atherosklerotischer Plaques finden sich gehäuft in deren Randbereichen (Schulterregion), in der sich immunhistologisch eine Anreicherung inflammatorischer Zellen wie Makrophagen, T-Lymphozyten und Mastzellen nachweisen lassen². Im Gegensatz zur Plaqueruptur ist eine Plaqueerosion durch das Fehlen von Endothel charakterisiert, wobei nur eine geringe Entzündung der exponierten Intima auftritt⁸. Erosionen der Endotheloberfläche entstehen, wenn die Verankerung des Endothels an der Basalmembran den einwirkenden hämodynamischen Kräften nicht mehr standhält, oder wenn Endothelzellen einen apoptotischen oder zytotoxischen Zelltod erfahren¹⁴. Akute ischämische Ereignisse gehen in etwa zu 70% der Fälle auf Plaquerupturen und zu 30% auf Erosionen zurück^{15,8}.

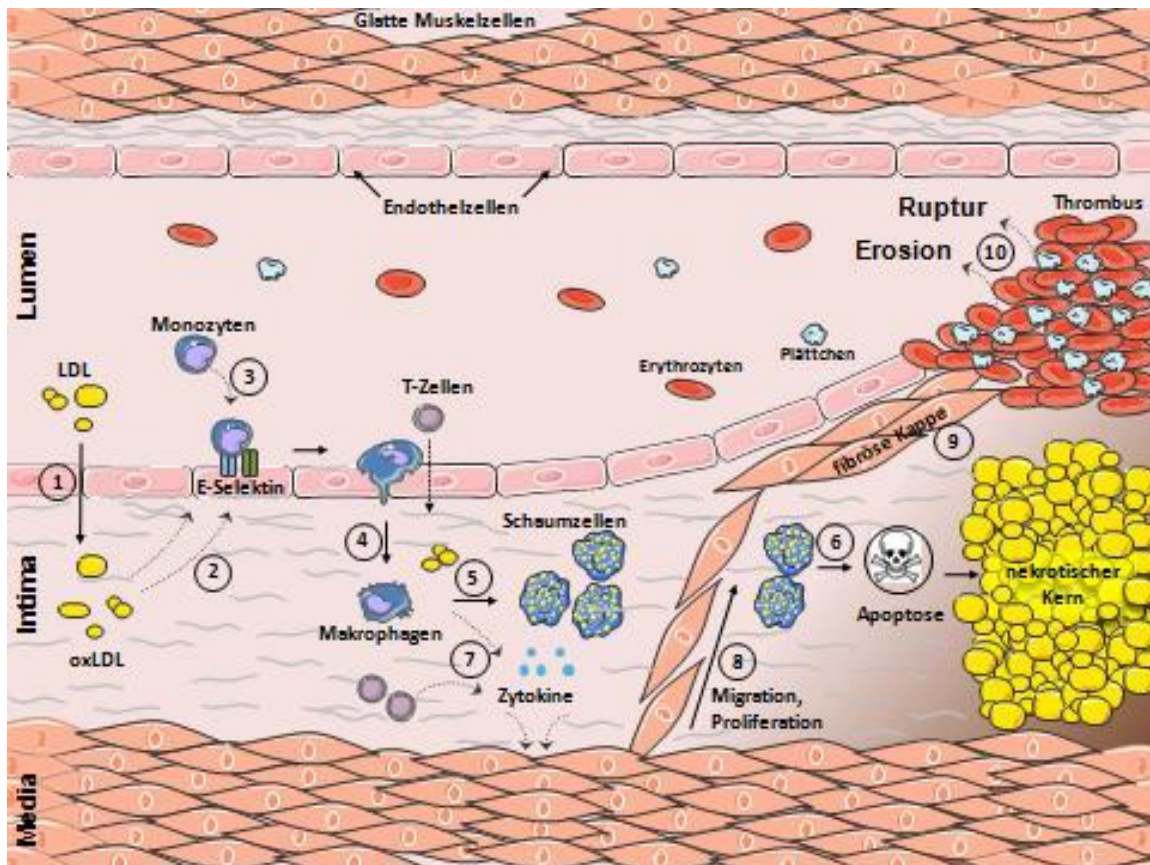


Abbildung 1-1: Schematische Darstellung der atherosklerotischen Plaqueformation. (1) Dysfunktionales Endothel ermöglicht den Durchtritt von Lipoproteinen (LDL) aus dem Gefäßlumen in den subendothelialen Raum (Intima). Dort erfolgt die Modifikation von LDL unter anderem durch oxidative Prozesse (oxLDL). (2) Vermehrte Anreicherung von oxLDL wirkt als pro-inflammatorischer Stimuli in der Gefäßwand und führt zu einer verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen (wie z.B. E-Selektin) auf der Endothelzelloberfläche. (3) Dies erleichtert die Adhäsion von Monozyten aus dem Blutstrom ans Endothel und die anschließende Migration in den subendothelialen Raum. (4) Dort differenzieren Monozyten zu Makrophagen aus und nehmen das oxLDL über Scavenger-Rezeptoren endozytotisch in die Zelle auf, wodurch die Makrophagen zu Schaumzellen differenzieren (5). (6) Mit fortschreitender Entwicklung der Läsion finden sich im Zentrum apoptotische Zellen und extrazelluläres Lipid. (7) Von Makrophagen und T-Zellen sezernierte Zytokine aktivieren glatte Muskelzellen der *Lamina media* (Media) in die *Lamina intima* (Intima) zu migrieren (8). (9) Die glatten Muskelzellen sezernieren extrazelluläre Matrix und bilden eine fibröse Kappe, die die Läsion von der Blutzirkulation trennt. (10) Die fibröse Kappe aus glatten Muskelzellen und Endothelzellen wird instabil und kann bei mechanischer Belastung reißen (Plaqueruptur). Das thrombogener Material aus dem Plaque kommt mit dem Blut in Kontakt und führt zur Anlagerung von Plättchen und der Auslösung der Gerinnungskaskade (Thrombus). Eine Plaqueerosion ist durch das Fehlen von Endothel charakterisiert, wobei nur eine geringe Entzündung der exponierten Intima auftritt. Abbildung in Anlehnung an J.Sanz & Fayad NATURE, Vol 451/21 February 2008 erstellt.

Die graduelle morphologische Entwicklung (Progression) humaner atherosklerotischen Läsionen lassen sich nach der AHA-Klassifikation von Stary *et al.* in sechs Läsionstypen bzw. Gruppen einteilen (Tabelle 1.1)^{5,113}. Diese Klassifikation basiert auf histologischen und zellulären Zusammensetzungen der Läsionen und erlaubt den Aufbau der Läsionen mit klinischen Manifestationen zu vergleichen.

Typ I-Läsion: Initialläsion

Die Initialläsionen stellen die ersten minimalen Intima-Veränderungen des atherosklerotischen Prozesses dar, welche nur mikroskopisch oder biochemisch festgestellt werden können. Die Veränderungen zeichnen sich durch unscheinbare Ansammlungen von mit Lipiden beladenen Makrophagen (Schaumzellen) in der Intima aus⁵.

Typ II-Läsion: Fettstreifen

Fettstreifen stellen die früheste visuell nachweisbare Läsion dar und unterscheiden sich von den initialen Läsionen durch eine erhöhte Anzahl lipidbeladener Makrophagen, welche sich in der Intima ansammeln. Die Anzahl von glatten Muskelzellen entspricht der des gesunden Intimagewebes⁵.

Typ III-Läsion: Intermediärläsion

In Typ III-Läsionen ist die Anzahl von lipidbeladenen Makrophagen, glatten Muskelzellen und Lymphozyten vergleichbar zu den Typ II-Läsionen, jedoch ist der Lipidanteil erhöht und anders verteilt. Während die Lipide von Typ II-Läsionen vereinzelt intrazellulär vorzufinden sind, sind die Lipide der Typ III-Läsionen hauptsächlich extrazellulär lokalisiert und wirken als größere Lipidansammlungen auf die Struktur der Intima ein. Solche extrazellulären Ansammlungen von Lipiden treten zwischen glatten Muskelzellen auf und drängen diese auseinander⁵.

Typ IV-Läsionen: Atherom

Typ IV-Läsionen sind durch eine größere zentrale Ansammlung von extrazellulären Lipiden, einem sog. Lipidkern, gekennzeichnet. Ein solcher Lipidkern kommt sowohl durch das Zusammenfließen von kleineren extrazellulären Lipidansammlungen zustande, die in Typ III-Läsionen zu finden sind, als auch durch die ständige Einwanderung von Lipiden aus dem Plasma. Obwohl Typ IV-Läsionen noch keine fibrösen Veränderungen, Oberflächendefekte oder Thrombosen aufweisen, ist die Struktur der Intima durch den Lipidkern zerstört. Insbesondere die glatten Muskelzellen werden in den tieferen Intimaschichten durch extrazelluläre Lipide weiter auseinander gedrängt. Die Schicht zwischen dem Lipidkern und dem Endothel wird mit lipidbeladenen Makrophagen (Schaumzellen) und glatten Muskelzellen besetzt. Der Lipidkern von Typ IV-Läsionen kann zu einer weiteren Verdickung der Arteriewand führen. Wobei die klinische Bedeutung dieser Läsionen nicht in der

Stenosierung der Arterie liegt, sondern in der Möglichkeit einer Fissur (Riss) und Ruptur mit den sich daraus ergebenden Komplikationen auszubilden ¹¹³.

Typ V-Läsionen: Fibroatherom

Typ V-Läsionen besitzen fibrosiertes Gewebe und werden in drei Kategorien unterteilt:

Typ Va - fibrosierte Läsionen mit einem Lipidkern

Typ Vb - fibrosierte Läsionen mit Verkalkung

Typ Vc - fibrosierte Läsionen ohne oder mit nur wenigen Lipiden

Die Fibrosierung ist eine Folge der Zerstörung der normalen Intimastruktur. Das neue Bindegewebe, das vor allem aus Kollagen und glatten Muskelzellen besteht, wird hauptsächlich dort gebildet, wo der große Lipidkern die Intimastruktur am meisten zerstört hat und spielt bei der Verdickung der Arterienwand eine bedeutende Rolle. Bei Typ Va-Läsionen (Fibroatheromen) wird eine Stratifikation beobachtet, wobei ein Lipidkern nach dem anderen von einer fibrösen Schicht überdeckt wird. Typ Vb-Läsionen zeigen eine Verkalkung, welche durch Mineralisation der Bestandteile eines vorherigen Atheroms entsteht. Typ Vc-Läsionen sind durch ihre Lipid-Armut gekennzeichnet und zeigen ein fast völlig fibrosiertes Bild. Solche Läsionen kommen häufig an den unteren Extremitäten vor und können sowohl das Resultat einer Lipidresorption als auch der fibrösen Komponente eines Fibroatheroms sein ¹¹³.

Typ VI-Läsionen: Komplizierte Läsionen

Typ VI-Läsionen sind Plaques mit der Morphologie von Typ IV- und Typ V-Läsionen, jedoch mit mindestens einer zusätzlichen Komponente. Typ VIa bezeichnet Läsionen mit einer zerstörten Oberfläche. Solche oberflächlichen Destruktionen reichen von mikroskopisch nachweisbaren Endothelläsionen bis zu tiefen Ulzerationen, die sich bis zum Lipidkern ausdehnen. Größere Fissuren finden sich dort, wo eine erhöhte Anzahl von Schaumzellen lokalisiert ist. Typ VIb-Läsionen werden durch Hämatome oder Hämorrhagien gekennzeichnet. Diese Komplikationen können auf zwei Wegen Zustandekommen. Entweder es entsteht eine Fissur und Blut strömt aus dem Lumen ein, oder die neu gebildeten Kapillaren innerhalb der Läsion werden geschädigt und aus ihnen sickert Blut ein. Fissuren, die Einblutungen verursachen, können sich oft wieder verschließen und ein gekapseltes Hämatom innerhalb der Läsion hinterlassen. Typ VIc-Läsionen werden durch thrombotische Komplikationen gekennzeichnet. Thromben können durch die wiederholte Abscheidung

kleiner Thromben auf der Intima-Oberfläche oder als Folge einer größeren Fissur entstehen. Die Thromben werden allmählich von glatten Muskelzellen infiltriert und von einer Endothelschicht bedeckt ¹¹³.

Tabelle 1.1: Darstellung der Progression arteriellen Läsionen und ihrer Klassifizierung (nach Sary *et al.* 1995) ¹¹³

Nomenklatur	Histologie	Haupt-Wachstumsmechanismus	Klinische Korrelation
Typ I-Läsion (Initialläsion)	Lipidbeladene Makrophagen (Schaumzellen)	Zuwachs hauptsächlich aufgrund von Lipidansammlung	Klinisch unauffällig
Typ II-Läsion (Fettstreifen)	Intrazelluläre Lipidansammlung		
Typ III-Läsion (Intermediärläsion)	Typ II-Veränderungen & extrazelluläre Lipidansammlungen		
Typ IV-Läsion (Atherom)	Typ II-Veränderungen & Lipidkern-Formation	Beschleunigter Zuwachs an glatten Muskelzellen & Kollagen	Klinisch unauffällig oder klinische Komplikation
Typ V-Läsion (Fibroatherom)	Lipidkern & fibrosierte Schicht, oder multiple Lipidkerne & fibrosierte Schichten, oder Verkalkung oder Fibrosierung		
Typ VI-Läsion (Komplizierte Läsion)	Oberflächendefekt, Hämatom-Hämorrhagie oder Thrombus	Thrombose oder Hämatome	

Die arterielle Verschlusskrankung wird abhängig vom Ausmaß der Verengung der Gefäße therapiert. Zu den konservativen Therapieformen gehört zunächst die Eliminierung der oben genannten Risikofaktoren wie Rauchen und Übergewicht. Hierzu muss auf Nikotin verzichtet werden, aber auch sportliche Bewegung und gesunde Ernährung sind unumgänglich, um dem Übergewicht entgegenzuwirken. Je nach Schwere der Erkrankung werden medikamentöse und / oder operative Therapieformen eingesetzt. Bei der medikamentösen Behandlung werden z.B. Thrombozytenaggregationshemmer (wie Acetylsalicylsäure zur

Thromboseprophylaxe)¹⁶, Cholesterinsyntheseenzymhemmer (wie Statine zur Senkung der Serumkonzentration von Cholesterin)¹⁷ oder Angiotensinkonversionsenzym-Hemmer (ACE-Hemmer zur Senkung der Hypertonie)^{18,19} eingesetzt. Auch die optimale medikamentöse Einstellung bei einer Diabetes-Erkrankung ist unabdingbar. Als operative Maßnahmen zur Verbesserung der Durchblutung von verengten Gefäßen werden Bypassoperationen, Thrombendarterektomien (TAE; Rekanalisierung von Blutgefäße), oder Angioplastien (Ballondilatation, Stentangioplastie) durchgeführt^{20,21}. Da die Atherosklerose, wie oben erwähnt, epidemiologisch ein weltweites Problem darstellt, ist es besonders wichtig neue Therapiemöglichkeiten zu entwickeln.

1.1.1 Humane neutrophile Elastase

Myeloische Vorläuferzellen produzieren und aktivieren neutrophile Elastase im Knochenmark, wo neutrophile Granulozyten dieses 218-Aminosäure lange Glykoprotein in lysosomalen Granula lagern²². Diese Serinprotease spielt im menschlichen Körper eine wichtige Rolle u.a bei der Immunantwort auf pathogene Mikroorganismen²³ im Gastrointestinaltrakt, auf Wunden und in der Lunge. In Letzterer kann eine gesteigerte Elastase-Aktivität im Rahmen einer Pneumonie (Entzündung des Lebergewebes), zu erheblichen Schäden mit Einschränkung der Lungenfunktion führen (z.B. Lungenemphysem)²⁴. Auch ist die Elastase bei der Entwicklung und Progression von Aneurysmen (Gefäßwandaussackungen) beteiligt²⁵ und wird in Tiermodellen zur Induktion von eben diesen verwendet^{26,27}. In Bezug auf die Atherosklerose ist die Elastase in der Lage Bestandteile der Extrazellulären Matrix (ECM) wie Elastin, Fibronectin, Laminin, Kollagen III, IV und VI, sowie Proteoglykane zu degradieren und Zellen der Gefäßwand zu schädigen^{22,28}. Das lässt die Vermutung nahe, dass diese Serinprotease ein hohes Pathogenitätspotential für die der Atherothrombose zugrunde liegenden Plaqueruptur / Plaqueeosion hat^{28,29}. Als auslösende Faktoren der Plaqueruptur bzw. -erosion werden u.a erhöhte Zelltodraten von Endothelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen (SMCs - *smooth muscle cells*) und Makrophagen angesehen^{28,30}. Dass die Apoptose von Endothelzellen erheblich zur Vulnerabilität von atherosklerotischen Plaques beiträgt, konnte in Untersuchungen an Kaninchen demonstriert werden, in denen eine Endothelzellapoptose zu luminalen Thrombusbildungen führte³¹. Kürzlich konnte in einer zu dieser Arbeit parallel durchgeführten Studie an humanen

atherosklerotischen Plaques die neutrophile Elastase in erhöhten Konzentrationen vorgefunden werden³¹. Der hohe Anteil der Elastase in den Plaques, sowie die proapoptischen und proteolytischen Eigenschaften sprechen der Elastase in der atherosklerotischen Läsionsprogression / Atherogenese eine wichtige Rolle zu²⁸. So kann Elastase in den für die atherosklerotischen Plaques entscheidenden Gefäßwandzellen, darunter vor allem in SMCs³², aber auch in Endothelzellen Apoptose auslösen^{28,29,33}. Die Mechanismen sind bisher jedoch noch unbekannt. Auch konnten erhöhte Plasmakonzentrationen an Elastase bei klassischen kardiovaskulären Risikofaktoren, wie Nikotinabusus, Diabetes mellitus und Hyperlipoproteinämie, beobachtet werden³⁴ und gelten prädiktiv für ein akutes koronares Ereignis bei Patienten mit Koronarerkrankungen³⁵.

1.2 Endoplasmatischer Retikulum (ER)-Stress

Das Endoplasmatische Retikulum (ER), eine komplexe zytoplasmatische Membranstruktur in eukaryotischen Zellen, ist an multiplen zellulären Prozessen beteiligt. So ist es an der Lipidbiosynthese, der intrazellulären Ca^{2+} -Homöostase sowie der Proteinfaltung und -Synthese involviert³⁶. Eine Störung der Homöostase, verursacht durch ungefaltete Proteine im ER oder die Inhibierung des Transports zwischen ER und Golgi, wird als ER-Stress bezeichnet. Auch eine Störung in der Ca^{2+} -Homöostase, oxidativer Stress oder eine Überladung des ER mit Lipiden, welcher zum Tod der Makrophagen bzw. zur Progression der Atherosklerose wesentlich beitragen kann, können Auslöser des ER-Stress sein³⁷. Um diesem Stress entgegenzuwirken aktiviert die Zelle einen adaptiven Mechanismus, den sogenannten *unfolded protein response* (UPR)³⁸. Ziel des UPR ist das Überleben der Zelle zu sichern, indem die ungefalteten Proteine reduziert und das Gleichgewicht wieder hergestellt wird. Hierfür werden Protein-faltenden Chaperone im ER transkriptionell erhöht und die allgemeine Proteintranslation gehemmt, eine Expansion des ER induziert und der retrograde Proteintransport ungefalteter Proteine aus dem ER heraus gesteigert, um diese dem proteasomalen Abbau (ERAD; *ER-associated protein degradation*) zuzuführen. Kann durch diese Maßnahmen der ER-Stress nicht bewältigt oder der auslösende Stimulus nicht behoben werden, führt der UPR die Zelle in den Zelltod^{39,40}.

Die drei ER-Transmembran-Sensoren ATF6 (*activating transcription factor 6*), IRE1 (*inositol-requiring enzyme 1*) und PERK (*protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase*) überwachen die Homöostase im ER³⁸. Der N-Terminus der Rezeptoren ist im Lumen des ER und der C-Terminus im Cytosol lokalisiert. Unter normalen, ungestressten Bedingungen befinden sich diese Rezeptoren, durch Bindung ihrer luminalen Domäne mit ER Chaperonen insbesondere der HSP70 Familie wie z.B. GRP78 (*glucose-regulated protein of 78 kDa*; BiP), in einem inaktiven Zustand. Akkumulieren ungefaltete oder fehlgefaltete Proteine im ER, so dissoziiert GRP78, aufgrund einer höheren Affinität zu den ungefalteten Proteinen, von den Transmembranrezeptoren ab und erlaubt dadurch die Aktivierung von ATF6, IRE1 und PERK und führt zur Initiation des UPR Signalweges^{41,42}. Diese drei Rezeptoren induzieren verschiedene nachgeschaltete Signalkaskaden, um in erster Linie dem Stress entgegenzuwirken und die Homöostase wiederherzustellen (Abbildung 1-2). Die Aktivierung von IRE1 ruft eine Endoribonuklease-Aktivität bei dieser hervor, welche ein unkonventionelles Spleißen der XBP1-mRNA (*X-box binding protein 1*) zu *spliced* XBP1 zur Folge hat. Hierdurch kann die Translation eines aktiven (*spliced*) XBP1 Transkriptionsfaktors erfolgen. Dieser transloziert in den Nukleus und kontrolliert die Transkription von ER Chaperonen und Komponenten des ER-assoziierten Degradierungsprozesses (ERAD)^{43,42}. ATF6 transloziert nach der Dissoziation von GRP78 in den Golgi Apparat, wird dort prozessiert und aktiviert, und transloziert daraufhin als Transkriptionsfaktor in den Nukleus. Hier aktiviert er ebenfalls UPR-Zielgene, die vermehrt in der ER-Homöostase beteiligt sind, XBP1 eingeschlossen³⁶. Zusätzlich führt die Aktivierung der Kinase PERK zur Phosphorylierung von eIF2 α (*eukaryotic translation initiation factor 2 α*), der eine sofortige Translationshemmung induziert, wodurch der Nachschub an ungefalteten Proteinen unterbunden wird. Hierdurch kann eine weitere Überlastung des ER vermieden werden und die Chaperone erhalten mehr Zeit die ungefalteten Proteine korrekt zu falten. Gleichzeitig induziert phospho-eIF2 α die Synthese des Transkriptionsfaktors ATF4 (*activating transcription factor 4*), welcher verschiedene UPR-Zielgene induziert, um dem ER-Stress entgegenzuwirken. Kann der Stress jedoch nicht behoben werden kann sowohl ATF4 als auch ATF6 den Transkriptionsfaktor CHOP (*C/EBP homologous protein*) herauf regulieren, um die Zelle in Richtung Apoptose zu führen^{41,38}. Die Neusynthese von bestimmten UPR Faktoren wie z.B. ATF4 ist trotz phospho-eIF2 α vermittelter Translationshemmung möglich,

weil die ATF4-mRNA aufgrund eines IRES-Elements über eine cap-unabhängige Translation synthetisiert werden kann⁴¹.

Da der UPR über die Ausübung der physiologischen Funktion und das Überleben der betroffenen Zelle entscheiden kann, wird dieser mit verschiedenen Krankheiten in Verbindung gebracht, darunter Neurodegeneration, Krebs, Diabetes mellitus, kardiovaskulären Erkrankungen oder Atherosklerose⁴¹. Es wurde gezeigt, dass der UPR sowohl in frühen als auch späten Stadien der Atherosklerose aktiviert ist⁴⁴ und zur ER-Stress induzierten Apoptose in Makrophagen führen kann³⁷, welche wiederum negativ mit der Plaqueprogression und -stabilität in Verbindung gebracht wird^{45,41,46,30}.

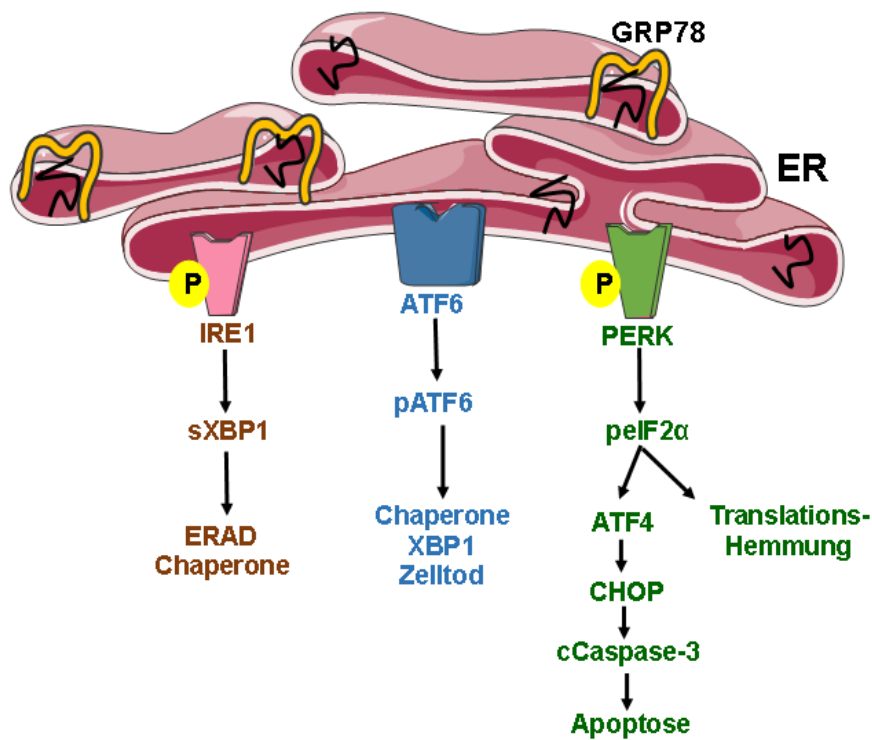


Abbildung 1-2: Schematische Darstellung des ER-Stress Signalweges UPR. ER-Stress kann die ER-Transmembran-Sensoren IRE1, ATF6 und PERK aktivieren. Eine Störung der Ca^{2+} -Homöostase, oxidativer Stress, Lipidüberladung oder ungefaltete Proteine sind auslösende Faktoren für die Aktivierung des ER-Stress Signalweges UPR. IRE1 führt zum Spleißen der XBP1-mRNA (*spliced* XBP1, sXPB1) und zur Aktivierung von Chaperonen sowie von Proteindegradierungsprozessen. ATF6 wird durch Prozessierung (pATF6) aktiviert und induziert ebenfalls Chaperone und XBP1, was bei anhaltendem Stress zum Zelltod führen kann. PERK phosphoryliert eIF2a (p-eIF2a) und induziert eine Translationshemmung sowie den Transkriptionsfaktor ATF4. Im Zellkern führt der ER-Stress-Signalweg zur CHOP-Expression, gefolgt von der Apoptose.

1.3 Zelltod-Signalwege

1.3.1 Apoptose

Der Prozess der Apoptose nimmt in der embryonalen Entwicklung, in der Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase und bei der Eliminierung von Zellen, die dem Organismus gefährlich werden können (z.B. Virus-infizierte Zellen, maligne Zellen), eine wichtige Stellung ein. Die Apoptose ist ein induzierter programmierter Zelltod von Einzelzellen mit definierten biochemischen und morphologischen Abläufen (Tabelle 1.2) ⁴⁷. Charakteristisch für apoptotische Zellen ist ein Schrumpfen und Ablösen vom Zellverband, die Verdichtung des Nukleus und Zerstörung des Zytoskeletts, eine Chromatin-Kondensation und dem Zerfall der Zelle in kleine, membranumschlossene Partikel, sog. „apoptotic bodies“, mit anschließender Fragmentierung der genomischen DNA ⁴⁸. Hierdurch kommt es während der Apoptose im Gegensatz zu nekrotischen Prozessen zu keiner Freisetzung von zellulärem Inhalt ins umliegende Gewebe ^{49,50}, was eine inflammatorische Stimulation verhindert. Das Phospholipid Phosphatidylserin, welches in gesunden Zellen überwiegend auf der zytosolischen Seite der Zellmembran zu finden ist, erscheint während der Apoptose auf der Zelloberfläche ⁵¹, was zur Erkennung, Aufnahme und Verdau der apoptotischen Körperchen durch Phagozyten beiträgt ⁵². Eine zentrale Rolle im apoptotischen Prozess kommt der Aktivierung einer bestimmten Klasse von Cystein-Aspartat-Proteasen, den Caspasen zu. Diese werden zunächst als Zymogene mit nur sehr geringer enzymatischer Aktivität synthetisiert. In Folge von Apoptose-induzierenden Stimuli wird dieser Präkursor durch proteolytische Spaltung aktiviert und spaltet ihrerseits wiederum andere Caspasen, an deren Ende die Aktivierung der Caspase-3/7 steht. Die Aktivierung der Caspase-3/7 stellt wahrscheinlich einen finalen, nicht mehr umkehrbaren Schritt der Apoptose dar ⁵³. Die Aktivierung der Caspase-Kaskade kann über den intrinsischen, ER-Stress-induzierten (siehe 1.2) oder extrinsischen Signalweg erfolgen.

Der extrinsische Apoptose-Signalweg wird extrazellulär durch die Bindung von pro-apoptotischen Liganden (z.B. TNF- α , TRAIL, FasL) an ihre entsprechenden Todesrezeptoren (*death receptor*, DR) der TNF-Familie eingeleitet. Im Falle des am besten charakterisierten TNF-Rezeptor/Ligand-System kommt es nach der Ligandenbindung zur Formierung eines Todesrezeptorkomplexes (DISC; *death-inducing signaling complex*). Dabei rekrutiert der

Rezeptor die Fas-assoziierte-Todes-Domäne FADD (*Fas-associating protein with death domain*) und die Pro-Caspase-8, wodurch diese aktiviert werden. Die prozessierte Caspase-8 aktiviert nun direkt Caspase-3 und -7 und stimuliert dadurch die endgültige Apoptose^{54,55,56}. Es kann jedoch auch eine Signalverstärkung über den mitochondrialen, intrinsischen Signalweg erfolgen. Durch die Caspase-8-vermittelte Spaltung des pro-apoptotischen Bcl-2-Proteins Bid^{57,58} und der Caspase-6⁵⁹ findet eine Verknüpfung zwischen dem extrinsischen und intrinsischen Signalweg statt.

Die Induktion des intrinsischen, mitochondrialen Signalweges der Apoptose erfolgt aufgrund zellulären Stresses (z.B. DNA-Schädigung, oxidativer Stress, pro-apoptotischer Faktor CHOP), der z.B. durch UV-oder Gammastrahlung oder Zytostatika hervorgerufen werden kann und über die Mitochondrien vermittelt wird⁶⁰. Die Mitochondrien spielen eine entscheidende Rolle, indem eine Reihe pro-apoptotischer Proteine wie Bax, Noxa (Mitglieder der Bcl-2-Familie, *B-cell lymphoma-2*) und Puma (*p53-upregulated modulator of apoptosis*) zum Verlust der Membranintegrität beitragen und es dadurch zur Freisetzung des stark pro-apoptotisch wirkenden Cytochrom *c* kommt^{61,62,63}. Cytochrom *c* übernimmt in vitalen Zellen die Elektronenübertragung von Komplex III auf Komplex IV während der Atmungskette, fungiert aber nach seiner Freisetzung ins Cytosol während der Apoptose als *second messenger*. Hierbei bindet das Cytochrom *c* zusammen mit dATP an Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor-1*), welches über eine Konformationsänderung mit seiner CARD (*caspase-recruitment domain*) an die Pro-Caspase-9 bindet und diese durch Spaltung zur Caspase-9 aktiviert. Das hierdurch gebildete Apoptosom führt wiederum zur Aktivierung der Caspasen 3 und 7, die schließlich zur Apoptose führen^{64,65,66,67,68}.

1.3.2 Nekrose / Nekroptose

Die Nekrose, eine weitere Form des Zelltodes, ist als ein willkürlich ablaufender Prozess unter bestimmten Stimuli (u.a. Toxine, mechanische Verletzungen, Hypoxie, Hypothermie, Infektionen mit Krankheitserregern) definiert^{69,70} und beschreibt den pathologischen Untergang einzelner oder mehrerer Zellen. In nekrotischen Zellen kommt es zum Zerfall der Zellorganellen. Diese morphologische Veränderungen finden infolge von Protein-Denaturierungen und Verdauung mittels freigesetzter lysosomaler Enzyme (Autolyse) in den Zellen statt. Schließlich führen u.a die erhöhten enzymatischen Konzentration in der Zelle zu

Defekten in der Membran, so dass der Zellinhalt unkontrolliert in die Umgebung austritt und eine Entzündungsreaktion zur Folge hat ⁷¹. Bei einer Form der Nekrose, namens Oncosis, kommt es zur Vergrößerung des Zellvolumens und Anschwellen des Zellkerns, der Mitochondrien und des Zytoplasmas. Morphologisch steht die Form der Nekrose damit im Gegensatz zur Apoptose, für die ein Schrumpfen der Zelle charakteristisch ist. Eine mögliche Ursache der Oncosis ist das Versagen der Membranpumpen infolge eines ATP-Mangels nach Hypoxie ⁷². Dies führt zu einer Ruptur der Plasmamembran und letztlich zum Austritt von intrazellulären Komponenten in das extrazelluläre Milieu ^{73,74}, die in dem betroffenen Gewebe eine Entzündungsreaktion / Immunantwort auslösen (Tabelle 1.2) ⁷¹.

In den letzten Jahren konnten diverse Arbeitsgruppen zeigen, dass einige Formen der Nekrose streng kontrollierte Prozesse, mit genau definiert ablaufenden intrazellulären Signalwegen darstellen ^{75,76}. Die erste entdeckte Form der programmierten, Caspase-unabhängigen Nekrose wurde durch eine rezeptorvermittelte Abhängigkeit der Kinasen RIP1 (*receptor-interacting protein 1*) und RIP3 gezeigt und als "Nekroptose" bezeichnet ⁷⁷. Wie auch bei dem extrinsischen Apoptose-Signalweg (siehe 1.3.1) wird die Nekroptose extrazellulär durch die Bindung von pro-apoptotischen Liganden (z.B. TNF- α , FasL, TRAIL) an ihre entsprechenden Todesrezeptoren (*death receptor*, DR) der TNF-Familie eingeleitet. Jedoch tritt Nekroptose erst auf, wenn die Apoptose inhibiert ist, da beide Zelltodmechanismen sich gegenseitig blockieren. So inhibiert z.B. aktive Caspase-8 sowohl RIP1, als auch RIP3, wodurch die Nekroptose blockiert und die Apoptose induziert wird. Wird jedoch FADD inhibiert oder die Caspase-8 durch einen Inhibitor wie FLIP (*FLICE like inhibitory protein*) blockiert, induziert dies die Nekroptose ^{77,78}. Daraufhin interagiert RIP1 mit RIP3, worauf dieser Komplex MLKL (*mixed lineage kinase domain-like protein*) aktiviert ⁷⁹, gefolgt von der Phosphorylierung und Aktivierung von PGAM5 (*phosphoglycerate mutase family member 5*) und Dephosphorylierung von Drp1 (*dynamain-related protein 1*). Diese Dephosphorylierung führt zur mitochondrialen Fission (Fragmentierung) vom mitochondrialen Netzwerk und zum nekrotischen Zelltod ^{80,81}. Charakteristisch für sämtliche Signalwege der Regulierten Nekrose ist der Verlust der Integrität der Plasmamembran und mit der unkontrollierten Freisetzung intrazellulärer Bestandteile in das Interstitium verbunden ist. Dies legt den Grundstein für eine Entzündungsreaktion. Auch Nekrostatine, wie Necrostatin-1, inhibieren die Kinase-Aktivität von RIP1 ^{82,83}. Möglicherweise dient die

Nekroptose als Absicherungsmechanismus, um beschädigte Zellen während zellulärem Stress zu entfernen, sollte die Apoptose inhibiert sein ⁸⁴.

1.3.3 Autophagie

Autophagie ist eine zelluläre Reaktion auf unterschiedliche Stress-Situationen, wie Nährstoffmangel, oxidativen Stress, Schädigung bzw. Inaktivität oder Alterung von Organellen oder Beeinflussung des mTOR Signalweges. Die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase zählt zur Hauptaufgabe der Autophagie und ist daher konstitutiv auf basalem Niveau in allen Zelltypen mit lysosomalen Kompartimenten vorzufinden ⁸⁵. Neben der Mikroautophagie, in der lysosomaler Verdau kleinerer Mengen zytosolischer Proteine stattfindet und der Chaperon-vermittelten Autophagie, die gezielt zytoplasmatische Proteine erkennt und mittels eines Proteinkomplexes ins Lysosom transferiert, meint der Begriff Autophagie vor allem den Prozess der Makroautophagie ⁸⁶. Die Makroautophagie, ein evolutionär hochkonservierter Prozess, wird bei Stress über die Inhibition der Serin/Threonin-Kinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*) durch Dephosphorylierung eingeleitet. Dies dient der Wiederherstellung der Energieversorgung und dem Überleben der Zelle, indem durch Eigendegradation zelluläre Komponenten (wie fehlgefaltete Proteine oder beschädigte Zellorganellen) abgebaut und wieder verwertet werden. Der erste Schritt der Vesikelbildung ist die Aktivierung von Vps34, einer Klasse III Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), die mit den Bindungspartnern Beclin-1, UVRAG (*UV irradiation resistance-associated tumor suppressor gene*) und der Kinase Vsp15/150 einen Komplex bildet. Die anschließende Elongation der Isolationsdoppelmembran läuft über zwei kovalent gebundene, koordinierte Konjugationssysteme den ATG12-ATG5 Komplex (ATG; *Autophagy target gene*) und den LC3-PE Komplex ab. Die Bildung des ATG12-ATG5 Komplexes erfolgt mit Hilfe des E1 Enzyms ATG7 und dem E2 Enzym ATG10. Der ATG12-ATG5 Komplex wird schließlich durch die Bindung von ATG16L vervollständigt. Während der Reifung des Autophagosoms umschließt dieses langlebige Organellen, Proteinaggregate, mikrobiologische Pathogene oder auch ganze Abschnitte des Cytosols einschließlich seiner Proteine. Nach Fertigstellung der Isolationsmembran dissoziiert der ATG12-ATG5-ATG16L-Komplex vom fertigen Autophagosom. Die Bildung des ATG12-ATG5-Konjugats ist Voraussetzung für die Membranrekrutierung von LC3. Hierbei wird das Protein LC3

(*microtubule-associated protein 1 light chain 3*) durch die Endopeptidase ATG4 proteolytisch vom pro-LC3 zum LC3-I gespalten, welches im fertigen Autophagosom mit Phosphatidylethanolamin (PE) konjugiert als LC3-II vorliegt^{87,85}. Das gebundene LC3-PE (LC3-II) befindet sich auf der inneren und äußeren Membran des Autophagosoms und bleibt an dieser von der Bildung bis zum lysosomalen Abbau des Autophagosoms gebunden⁸⁸. Damit stellt der LC3-II einen Marker für Autophagosomen dar^{89,90}. Das entstandene Autophagosom fusioniert anschließend mit Lysosomen zum Autolysosom. In Autolysosomen wird die innere autophagosomale Membran degradiert und der Inhalt verdaut. Dadurch entsteht ein Autolysosom mit einfacher Membran. Die daraufhin ins Cytosol entlassenen Bestandteile der degradierten Proteine und Organellen liefern Makromoleküle für die fortlaufende Proteinneusynthese an den Ribosomen oder Substrate für die oxidative ATP-Synthese in den Mitochondrien. Auf diese Weise wird die Homöostase der Zelle durch Eigendegradation zellulärer Komponenten gewährleistet und das Überleben der Zelle sichergestellt (Tabelle 1.2)^{86,91}.

Autophagie ist – ähnlich dem UPR - ein vorwiegend zellprotektiver Signalweg, dem eine Rolle bei Krebs, an der Alterung, neurodegenerativen Krankheiten wie z.B. Alzheimer oder Parkinson und Kardiomyopathien zugeschrieben wird. Wie auch beim ER-Stress, kann die Autophagie bei anhaltender Stress-Stimulation, den Zelltod induzieren. Es wird jedoch kontrovers diskutiert, ob Autophagie einen eigenen Zelltodmechanismus in Säugerzellen darstellt oder als Begleiterscheinung der Apoptose oder Nekrose auftritt, zumal die Prozesse überlappende Anteile aufweisen^{86,92}.

Tabelle 1.2: Vergleich der Zelltodarten Apoptose, Nekrose, Autophagie. ¹Oncosis

Apoptose	Nekrose	Autophagie
Programmierter Zelltod	Willkürlich ablaufender Prozess	Eigendegradation; Selbstverdau
Embryogenese, Morphogenese, Zellhomöostase	Hyperthermie, Hypoxie, virale Infektion, mechanische Verletzung	Zellhomöostase, Morphogenese oxidativer Stress, Nährstoffmangel
Zellschrumpfung	Zellschwellung ¹	-
Erhalt der Organellen	Zerfall der Organellen	Verdau der Organellen
Chromatin-Kondensation	Zellkernschwellung ¹	-
Oligonukleosomale DNA-Fragmentierung; DNA-Leiter	DNA-Fragmentierung an zufälliger Stelle	-
Intakte Membran	Verlust der Membranintegrität	Intakte Membran
<i>membrane blebbing</i>	-	-
<i>apoptotic bodies</i>	-	-
-	Freisetzung lysosomaler Enzyme (Autolyse)	Autolysosombildung
Phagozytose ohne Inflammation	Inflammation	Ohne Inflammation
Phosphatidylserin Externalisierung (Eat-me-Marker)	-	-
ATP-abhängig	ATP-abhängig	ATP-abhängig
Caspasenaktivierung	Proteolyse durch Calpain, Cathepsin	Lysosomaler Abbau zytosolischen Materials in Autophagosomen

1.4 Protease-aktivierte Rezeptoren (PARs)

Protease-aktivierte Rezeptoren (PARs) gehören zur Klasse G-Protein gekoppelter Rezeptoren⁹³. Diese membranständigen Rezeptoren gehören aufgrund Ihrer sieben Zellmembran durchspannenden Domänen der Familie der heptahelikalen Rezeptoren an, wobei das G-Protein über die intrazelluläre Seite des Rezeptors an diesen gekoppelt ist⁹⁴. Die Aktivierung der PARs basiert auf dem Prinzip der proteolytischen Abspaltung des extrazellulären N-Terminus an einer spezifischen Erkennungssequenz und Freilegung einer neuen terminalen Proteindomäne. Diese neu entstandene Domäne agiert als *tethered ligand* („angebundener Ligand“) mit der zweiten extrazellulären Schleife des PARs und aktiviert diesen. Nach der Aktivierung werden die Rezeptoren der PAR Familie durch Endozytose internalisiert und anschließend lysosomal Abgebaut^{95,96}. Die Aktivierung der Protease-aktivierten Rezeptoren ist somit irreversibel⁹³. Es ist ebenfalls möglich die PAR Rezeptoren selektiv über kurze synthetische Peptide (TRAP; *thrombin-activated peptide*), deren Sequenzen dem jeweiligen *tethered ligand* entsprechen, ohne proteolytische Spaltung zu aktivieren^{97,98}. Die Art der Aktivierung der PARs steht im Gegensatz zu den klassischen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, deren Ligandenbindungen reversibel sind.

Vier verschiedene PAR Subtypen (PAR-1 bis PAR-4) sind bis heute beschrieben worden (Tabelle 1.3). Sie unterscheiden sich nicht nur in ihren spezifischen Agonisten, sondern auch im induzierten Signalweg und Vorkommen. Alle werden auf arteriellen / venösen Endothelzellen exprimiert, jedoch nur PAR-1 und PAR-2 auf glatten Gefäßmuskelzellen (SMCs) und PAR-1, PAR-2 und PAR-3 auf Makrophagen⁹⁹. Die Aktivierung erfolgt für PAR-1, PAR-3 und PAR-4 hauptsächlich durch Thrombin, für PAR-2 hingegen durch Trypsin. Darüber hinaus wirken einige Trypsin-ähnliche Serin-Proteasen auf die PAR Rezeptoren. So konnte in Studien gezeigt werden, dass auch die neutrophile Elastase PAR-1 und PAR-2 aktivieren kann^{100,101}. Von den bisher charakterisierten Protease-aktivierten Rezeptoren sind die Signalwege des PAR-1 am besten beschrieben. Nach Aktivierung bindet PAR-1 an mindestens drei unterschiedliche Familien von G-Proteinen ($G_{12/13}$, G_q und G_i) und vermittelt auf diese Weise diverse Wirkungen auf Proliferation, Migration, Apoptose sowie auf die extrazelluläre Matrix¹⁰². In Bezug auf das kardiovaskuläre System führt die PAR-1-Aktivierung in Endothelzellen zu einer Zellkontraktion und –abrundung. Dies destabilisiert den Zell-Zell-Kontakt und erhöht die vaskuläre Permeabilität für Zellen und Moleküle aus dem Blutstrom ins subendotheliale

Gewebe einzuwandern. Des Weiteren führt die Aktivierung von PAR-1 zu erhöhten Expressionen von Oberflächen-Adhäsionsmolekülen (wie E- und P-Selektin, *intercellular adhesion molecule-1*, *vascular cell adhesion molecule-1*), erleichtert dadurch Leukozyten die Transmigration in vaskulär geschädigte Regionen¹⁰³ und kann atherosklerotische Läsionsprogressionen begünstigen. Auch konnte in atherosklerotischen Plaques bereits eine PAR-1 Überexpression in Endothelzellen und SMCs dokumentiert werden¹⁰⁴. Diese Befunde weisen den PARs eine Rolle als *therapeutisches Target* in kardiovaskulären und inflammatorischen Erkrankungen zu.

Tabelle 1.3: Protease-aktivierte Rezeptoren (PARs) im kardiovaskulären System: Zellexpression, Aktivierung, Bindung, Funktion

	PAR-1	PAR-2	PAR-3	PAR-4
Expression	Endothel SMCs Makrophagen	Endothel SMCs Makrophagen	Endothel Makrophagen	Endothel
Aktivierung Lokalisation	Thrombin Elastase	Trypsin Elastase	Thrombin	Thrombin
G-Protein Bindung	G _q , G _i , G _{12/13}	G _q , G ₀		G _q
Physiologische Funktion	Vasoregulation; Kollagenproduktion	Vasoregulation; Erhöhte vaskuläre Permeabilität, SMCs Proliferation	-	-
Pathophysiologische Funktion	Begünstigt Hypertrophie, Apoptose; Thrombose	Begünstigt Hypertrophie, Apoptose; Inflammation	Thrombose (Maus)	Kardiales Remodelling; Thrombose Inflammation

2 Ziele der Arbeit

Die Elastase wird aufgrund ihrer pro-apoptotischen Wirkung auf Gefäßzellen, sowie ihrer proteolytischen Eigenschaften auf die fibröse Kappe atherosklerotischer Plaques als eigenständiger Mediator der Läsionsprogression angesehen. Damit besitzt die von Makrophagen und Granulozyten sekretierte Elastase hohes Pathogenitätspotential für die Atherosklerose zugrunde liegende Plaqueruptur und Plaqueerosion. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Signalkaskade der Elastase, um einen potentiell beschleunigten Einfluss auf die atherosklerotische Plaqueprogression zu charakterisieren. In vorherigen Studien dieser Arbeitsgruppe konnte in einem selbstentwickelten *in vitro*-Modell der Gefäßwand die subendotheliale Infiltration von Makrophagen mit Freisetzung von Elastase simuliert und ein Elastase-induzierter Endothelzelltod nachgewiesen werden. Der genaue Mechanismus als auch seine pathophysiologische Rolle blieben weitestgehend ungeklärt und wurden hier erstmalig untersucht.

Zur Aufklärung der Rolle der Elastase in der Atherosklerose sollte zunächst *in vitro* der Elastase-induzierte Zelltod und Typus in Endothelzellen analysiert werden, da dieser als Auslösender Faktor der Plaqueruptur und Plaqueerosion angesehen wird. In einem weiteren Schritt sollte aufgedeckt werden, ob der ER-Stress Signalweg UPR, der in atherosklerotischen Plaques für Makrophagen beschrieben wurde, auch in Elastase-behandelten Endothelzellen vorzufinden ist. Ebenfalls sollte eine Beteiligung der Protease-aktivierten Rezeptoren 1 und 2 untersucht werden, da diese auf Endothelzellen exprimiert und mittels Elastase aktiviert werden konnten. Da die Plaqueruptur nach gegenwärtigen Einschätzungen maßgeblich durch das Absterben von SMCs und Makrophagen verursacht ist wurden auch die Auswirkungen der Elastase auf diese vaskuläre Zellen analysiert.

Es ist bekannt, dass in atherosklerotischen Plaques erhöhte Konzentrationen an Makrophagen-sekretierter Elastase vorzufinden ist. Zur Charakterisierung ihrer Rolle bei der potentiell-beschleunigten Plaqueprogression sollte *ex vivo* der zuvor untersuchte UPR Signalweg, der Zelltod sowie die Elastase-sekretierenden Makrophagen in humanem Rupturgefährdeten Karotis-Plaquematerial untersucht werden. Die Aufklärung des Signalweges der Elastase könnte bei der Prävention von kardiovaskulären Erkrankungen behilflich sein und mögliche Ausweitungen des Einsatzspektrums von Elastase- bzw. UPR-Inhibitoren aufzeigen.

3 Material

Alle nicht einzeln aufgeführten Chemikalien wurden durch die Firmen Roth, Dako, Sigma Aldrich bzw. Merck bezogen.

3.1 Chemikalien, Zellkulturmedien, Farbstoffe

Accutase-Lösung	Sigma Aldrich
Aceton	Roth
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Roth
Bisacrylamid	Roth
Bromphenolblau	Sigma Aldrich
BSA (Albumin Fraktion V)	Roth
Chloroquin	Enzo
5-Cholesten-3 β -ol-7-one (7-Ketocholesterol)	Sigma
DAPI	Sigma Aldrich
DL-Norleucin	Sigma Aldrich
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich
DRAQ5 [®]	Cell Signaling Technology
<i>Dulbecco's modified eagle medium</i> (DMEM)	Sigma Aldrich
<i>Dulbecco's modified eagle medium</i> (DMEM)/F12 + <i>GlutaMAX</i> [™] -I	Gibco
<i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i> (PBS), 1x, steril, -CaCl ₂ , -MgCl ₂	Sigma Aldrich
EDTA Solution, 100x	Thermo Scientific
<i>Endothelial cell basal medium</i>	PromoCell
<i>Endothelial cell growth medium SupplementPack</i>	PromoCell
<i>Entellan</i> [®]	Merck
Eosin	Roth
Essigsäure	Roth

Material

Ethanol	Roth
Etoposid	Sigma Aldrich
<i>Fetal calf serum</i> (FCS)	Sigma Aldrich
<i>Fluoromount™</i> aqueous mounting medium	Sigma Aldrich / Dako
Formalin, 4 %	Roth
Glycerin, 99 %	Roth
Glycin	Roth
Gill's Hematoxilin No.3	Polyscience Inc.
Goldner-Lösung II (Phosphorwolframsäure-Orange-G-Lösung)	Roth
<i>Halt™</i> Proteaseinhibitor, 100x	Thermo Scientific
Hämatoxylin-Lösung A nach Weigert	Roth
Hämatoxylin-Lösung B nach Weigert	Roth
Isofluran	Abbott
Isopropanol	Roth
Laemmli Lysepuffer	BioRad
L-Glutamin, 100x	Gibco
Lichtgrün	Merck
Masson-Goldner's Trichrome Staining Kit	Roth
Methanol	Roth
Methylgrün	Merck
Milchpulver	Roth
N-Butanol	Roth
Necrostatin-1	Sigma Aldrich
Normalserum aus Ziege	Dako
<i>Opti-MEM®</i> I (1x) + <i>GlutaMAX™</i> -I Medium	Gibco
Paraformaldehyd	Roth
Penicillin / Streptomycin, 100x	Gibco
PhosSTOP	Roche
Ponceau S	Roth
<i>ProLong®</i> Gold Antifade	Invitrogen

Material

Propidium Iodide Staining Solution (PI)	BD Biosciences
Rapamycin	Enzo
Retrieve-All Antigen Unmasking System 2 : Basic (pH10)1x Solution	Covance Research Products
<i>Roti</i> [®] -Plast Paraffin-Pastillen	Roth
<i>Smooth muscle cell basal medium 2</i>	PromoCell
<i>Smooth muscle cell growth medium 2 SupplementPack</i>	PromoCell
Staurosporin	Sigma Aldrich
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma Aldrich
Thapsigargin	Molecular Probes
Tris	Roth
<i>Triton</i> [™] X-100	Sigma Aldrich
Trypsin / EDTA, 10x	Gibco
Tunicamycin	Sigma Aldrich
<i>Tween</i> [®] 20	Sigma Aldrich
Tris / HCl	Roth
Wasserstoffperoxid	Roth
Xylol	Roth

3.2 Verbrauchsmaterialien

12- <i>well</i> -Platten	Greiner
24- <i>well</i> -Platten	Greiner
96- <i>well</i> -Platten, <i>μClear</i> [®] , weiß	Greiner
96- <i>well</i> -Platten, <i>μClear</i> [®] , schwarz	Greiner
<i>Amersham</i> [™] <i>Hyperfilm</i> [™] ECL	GE Healthcare
<i>Amersham</i> [™] <i>Hybond</i> [™] PVDF Transfer Membran	GE Healthcare
Deckgläschen, rund, 12 mm	Thermo Scientific
Deckgläschen, 24 x 50 mm für IHC	Menzel-Gläser

Material

Entwickler- und Fixierlösung	Kodak
FACS-Röhrchen	BD Falcon
Kanüle, 23 G, spitz	BD
Kryoröhrchen	Greiner
Pasteurpipetten (ohne Wattestopfen)	Roth
Reaktionsgefäße (1.5 ml, 2.0 ml)	Sarstedt
Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	Greiner
Serologische Pipetten (2 ml, 5 ml, 10 ml, 50 ml), steril	Greiner
<i>Superfrost</i> [®] Plus Objektträger	Menzel-Gläser
<i>Whatman</i> [®] -Papier	Whatman
Zellkulturflaschen, steril mit Filterdeckel (25 cm ² , 75 cm ²)	Greiner

3.3 Laborgeräte

Centro LB960 Luminometer	Berthold Technologies
<i>ChemiDoc XRS</i> Imaging System mit <i>QuantityOne 4.6.7</i> Software	BioRad
CO ₂ -Inkubatoren CO-150 und Excella ECO-170	New Brunswick Scientific
Dampfgarer	Braun
Einschweißgerät	Severin
<i>FACSCanto</i> [™] II Durchflusszytometer mit <i>FACSDiva</i> Software	BD Biosciences
Feuchtkammer	VWR
FLUOstar OPTIMA Fluometer	BWG Labtechnologies
Gelelektrophoresekammer, Mini- <i>PROTEAN</i> [®] III	BioRad
Gelelektrophoresekammer, <i>PerfectBlue</i> Doppelgelsystem Twin ExW S	Peqlab
Gelelektrophoresekammer, <i>PerfectBlue</i> Doppelgelsystem Twin L	Peqlab
My Cycler [™] thermal cycler	BioRad
Leica RM 2155 Mikrotom	Leica
Leitz DM IL Mikroskop	Leica

Material

Megafuge 1.0R	Heraeus Sepatech
Mini-Transblot-Zelle, Mini- <i>PROTEAN</i> ®III Cell	BioRad
Neubauer-Zählkammer	Labor Optik
Nanodrop 2000 Spectrophotometer	Peqlab
PowerPac™ Basic Power Supply	BioRad
PowerPac™ HC High-Current Power Supply	BioRad
PT 1200 Präzisionswaage	Sartorius
StepOnePlus Real-Time PCR System	Applied Biosystems
Thermomixer kompakt	Eppendorf
Tischzentrifuge	Labnet
Trans-Blot® Semi-Dry Transfer Cell	BioRad
Vortexer	Heidolph
Wasserbad	GFL
Zeiss LSM-710 mit ZEN2011 Software	Zeiss
Zeiss Axioplan Mikroskop mit Olympus XC30 Kamera und CellSens Imaging Software	Zeiss / Olympus
Zentrifuge 5417R	Eppendorf

3.4 Reagenzien und Kits

<i>ApopTag</i> ® Peroxidase <i>In Situ</i> Apoptosis Detection Kit	Merck
Background Buster Working Solution	Innovex Biosciences
<i>BCA</i> ™ Protein Assay Kit	Pierce
<i>Caspase-Glo</i> ® 3/7 Assay System	Promega
<i>CellTiter-Glo</i> ® Luminescent Cell Viability Assay	Promega
<i>Cyto-ID</i> ® Autophagy Detection Kit	Enzo
<i>CytoTox-ONE</i> ™ Homogeneous Membrane Integrity Assay	Promega
<i>EnVision</i> ™ G 2 Doublestain System Visualisierungskit	Dako
<i>EnVision</i> ™ Detection Systems Peroxidase/DAB, <i>rabbit/mouse</i>	Dako

<i>High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit</i>	Applied Biosystems
<i>In Situ</i> Cell Death Detection Kit	Roche
<i>Lipofectamine</i> [®] RNAiMAX	Invitrogen
LSAB [™] 2 Kit	Dako
peqGOLD Total RNA Kit	Peqlab
<i>WesternBright</i> [™] Sirius	Advansta
<i>Western Lightning</i> [®] Plus-ECL Chemiluminescence Substrate	PerkinElmer

3.5 Lösungen und Puffer

Anodenpuffer I	300 mM Tris/HCl pH 10.4, 20 % Methanol
Anodenpuffer II	25 mM Tris/HCl pH 10.4, 20 % Methanol
Citratpuffer, 10 mM, pH6.0	18 ml 0.1 M Zitronensäure, 82 ml 0.1 M Natriumcitrat, 0.05 % Tween [®] 20, pH 6.0
Kathodenpuffer	25 mM Tris/HCl pH 9.4, 40 mM DL-Norleucin, 0.05 % SDS
RIPA-Puffer	25 mM Tris/HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 1 % NP-40 (Tergitol-Typ Nonylphenoethoxylat), 1 % Natriumdeoxycholat, 0.1 % SDS
SDS-Ladepuffer, 5x	250 mM Tris/HCl pH 6.8, 0.5 M Dithiothreitol, 40 % Glycerin, 10 % SDS, 0.2 % Bromphenolblau
SDS-Laufpuffer, 5x	250 mM Tris, 19.2 mM Glycin, 0.35 mM SDS
TBS, 20x	200 mM Tris pH 7.6, 2 M NaCl
TBS / Tween	1x TBS, 0.1 % Tween [®] 20
Transferpuffer	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol
Wasser, doppel destilliert	ddH ₂ O

3.6 Enzyme und Standards

Benzonase Nuclease	Novagen
FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase	Thermo Scientific

Human sputum elastase (Elastase)	Elastin Products Company
Lambda Phosphatase	Santa Cruz
Prestained Protein Molecular Weight Marker	Thermo Scientific
<i>Precision Plus Protein™</i> Standards	BioRad
<i>ProSieve QuadColor™</i> Protein Markers	Lonza
Proteinase K	Sigma Aldrich
<i>Ready-to-Use Proteinase K Solution (IHC)</i>	Dako
RNase A	Sigma Aldrich
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Durch Prof. Dr. H. Kleinert, Institut für Pharmakologie, Universitätsmedizin Mainz, synthetisiert und zur Verfügung gestellt.

3.7 Antikörper

3.7.1 Primärantikörper und Fluoreszenz-gekoppelte Antikörper

Im Falle von Western Blot Analysen wurden alle verwendeten Antikörper laut Herstellerangaben in 5 %-igem BSA oder in 5 %-igem Milchpulver in 1x TBS / Tween inkubiert. Die in Klammern angegebenen Zahlen beziehen sich auf die im Western Blot (siehe 4.3.4), Immunhistochemie (siehe 4.5.3) oder Immunfluoreszenz (siehe 4.1.11) eingesetzten Verdünnungen der aufgeführten Antikörper. Gleiches gilt für die eingesetzten Sekundärantikörper (siehe 3.7.2). Die Proteinbeladung lag zwischen 70-150 µg Proteinlysate pro Spur.

monoklonaler α -Actin; Klon 1A4 (<i>mouse</i> , 1:500 IHC)	Sigma Aldrich
monoklonaler α - β -Actin; Klon AC-15 (<i>mouse</i> , 1:5.000 WB)	Sigma Aldrich
monoklonaler α -cCaspase-3; Klon Asp175 (5A1) (<i>rabbit</i> , 1:100 IHC)	Cell Signaling
monoklonaler α -CD68; Klon PG-M1 (<i>mouse</i> , 1:50 IHC)	Dako
monoklonaler α -CHOP; Klon L63F7 (<i>mouse</i> , 1:1.000 WB, 1:1.600 IF)	Cell Signaling
monoklonaler α -neutrophile Elastase; Klon 121-3E10 (<i>mouse</i> , 1:200 IHC)	Gentaur

monoklonaler α -GAPDH; Klon 6C5 (<i>mouse</i> , 1:2.000 WB)	Santa Cruz
monoklonaler α -KDEL; Klon 10C3 (<i>mouse</i> , 1:700 IHC)	Enzo
monoklonaler α -LC3-II; Klon D11, XP [®] PE gekoppelt (<i>mouse</i> , 1:50 FACS)	Cell Signaling
monoklonaler α -Phospho-eIF2 α (Ser51) (<i>rabbit</i> , 1:1.000 WB)	Cell Signaling
monoklonaler sXBP1; Klon D2C1F (<i>rabbit</i> , 1:1.000 WB)	Cell Signaling
monoklonaler α -Thrombin R; Klon ATAP2, PE gekoppelt (=PAR-1) (<i>mouse</i> , 1:10 FACS)	Santa Cruz
monoklonaler α -Tubulin; Klon DM1A (<i>mouse</i> , 1:2.000 WB)	Dianova
polyklonaler α -ATF3 (<i>rabbit</i> , 1:200 IHC)	Sigma Aldrich/Atlas
polyklonaler α -cCaspase-3; Klon Asp175, Alexa Fluor [®] 488 gekoppelt (1:100 IF)	Cell Signaling
polyklonaler α -CHAC-1 (<i>rabbit</i> , 1:3.000 IHC)	Abcam
polyklonaler α -CHOP; Klon F-168 (<i>rabbit</i> , 1:50 IHC)	Santa Cruz
polyklonaler α -eIF2 α (<i>rabbit</i> , 1:1.000 WB)	Cell Signaling
polyklonaler α -GRP78 (BiP); Klon C-20 (<i>goat</i> , 1:750 WB)	Santa Cruz
Negativkontroll IgG mouse/rabbit (IHC)	Dako
polyklonaler α -Phospho-PERK Thr 981 (<i>rabbit</i> , 1:50 FACS)	Santa Cruz

3.7.2 Sekundärantikörper

anti- <i>goat</i> IgG aus dem Esel, Peroxidase gekoppelt (1:5.000 WB)	Santa Cruz
anti- <i>mouse</i> IgG aus dem Kaninchen, Peroxidase gekoppelt (1:20.000 WB)	Sigma Aldrich
anti- <i>mouse</i> IgG aus der Ziege, Alexa Fluor [®] 514 gekoppelt (1:1.500 IF)	Invitrogen
anti- <i>mouse</i> IgG aus dem Pferd, Peroxidase gekoppelt (1:5.000 WB)	Cell Signaling
anti- <i>mouse</i> IgG aus der Ziege, Cy [™] 3 gekoppelt (1:100 IF)	Jackson ImmunoResearch
anti- <i>rabbit</i> IgG aus der Ziege, Alexa Fluor [®] 488 gekoppelt (1:1.500 IF)	Invitrogen
anti- <i>rabbit</i> IgG aus der Ziege, Peroxidase gekoppelt (1:5.000 WB)	Sigma Aldrich
anti- <i>rabbit</i> IgG aus der Ziege, Peroxidase gekoppelt (1:5.000 WB)	Cell Signaling
anti- <i>rabbit</i> , anti- <i>mouse</i> EnVision [™] Detection Systems Peroxidase/DAB (IHC)	Dako

3.8 Oligonukleotide für die quantitativen real-time PCR Analysen

Primer und *TaqMan*[®]-Sonden für β -Actin, GAPDH, GRP78 und *spliced* XBP1 wurden von Eurofins MWG-Biotech bezogen. Zudem stammen die Primer und Sonden für β -Actin, CHOP (DDIT3), PolR II α und F2R (PAR-1) als vordesignte *TaqMan*[®]-Primer/Sonden-Mixe (*TaqMan*[®] *Gene Expression Assays*; in der Tabelle als Assay ID angegeben) von Applied Biosystem. Diese enthalten sowohl *sense*- und *antisense*-Primer als auch die Sonde. Die Sonden sind am 5'-Ende mit dem Fluorophor 6-Carboxyfluorescein (FAM) und am 3'-Ende mit dem Quencher Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA) markiert.

Primer / Sonde	Sequenz (5' – 3') bzw. Assay ID
β -Actin	Hs03023943
β -Actin_ <i>sense</i>	GGT CAT CAC CAT TGG CAA TG
β -Actin_ <i>antisense</i>	CGT CAC ACT TCA TGA TGG AGT TG
β -Actin_Sonde	ATG GAG TCC TGT GGC ATC CAC GAA ACT AC
CHOP (DDIT3)	Hs01090850
F2R (PAR-1)	Hs00169258
GAPDH_ <i>sense</i>	CAA CAG CCT CAA GAT CAT CAG C
GAPDH_ <i>antisense</i>	TGG CAT GGA CTG TGG TCA TGA G
GAPDH_Sonde	CCT GGC CAA GGT CAT CCA TGA CAA C
GRP78_ <i>sense</i>	AAA CCG CTG AAG CTT ATT TG
GRP78_ <i>antisense</i>	AGT TCC AGC GTC TTT GGT TG
GRP78_Sonde	ATT TTA ATG ATG CCC AAC GC
PolR II α	Hs00172187
XBP1_ <i>sense</i>	GGA GTT AAG ACA GCG CTT G
XBP1_ <i>spliced_antisense</i>	GCA CCT GCT GCG GAC TC
XBP1_Sonde	GAA GCC AAG GGG AAT GAA GT

3.9 Oligonukleotide für RNA-Interferenz & blockierende Antikörper

Die CHOP- und PAR-1-spezifische siRNA wurde von Dharmacon bezogen (Gemisch aus vier verschiedenen siRNAs = ON-TARGETplus SMARTpool) und die Kontroll-*Stealth*[®]-siRNA von Invitrogen (unbekannte Zufallssequenz ohne Zielstruktur mit einem GC Gehalt von etwa 36 %). Der blockierende polyklonale *rabbit* anti-human PAR-2 Antikörper^{105,106,107} wurde freundlicherweise von Prof. Dr. W.Ruf (Centrum für Thrombose und Hämostase (CTH), Universitätsmedizin Mainz) zur Verfügung gestellt.

3.10 Zellen und Medien / Medienzusätze

3.10.1 Zellen

Zellen	Beschreibung	Quelle
EA.hy 926	Humane, endotheliale immortalisierte Hybridzelllinie aus HUVEC und A549-Zellen	American Tissue Culture Collection (ATCC [®] CRL-2922 [™]) Bereitgestellt von PD Dr. S. Horke
HAoEC	Primäre humane Gefäßendothelzellen aus der Aorta (Human Aortic Endothelial Cells)	PromoCell
HCASMC	Primäre humane glatte Muskelzellen aus der koronaren Arterie (Primary human coronary artery smooth muscle cells)	PromoCell
mPM	Murine Peritoneal-Makrophagen	Isoliert aus C57BL/6J Mäusen Bezogen über ZVTE Mainz

3.10.2 Medien und Zusätze für die Zellkultur

Medium	Zusammensetzung
DMEM-Vollmedium für EA.hy	500 ml <i>Dulbecco's modified eagle medium</i> (1000 mg/l Glukose), 10 % FCS, 5 ml L-Glutamin, 5 ml Penicillin / Streptomycin
Vollmedium für HAoEC	500 ml Endothelial Cell Basal Medium, Endothelial Cell Growth Medium SupplementPack [FCS 0.02 ml/ml, Endothelial Cell Growth Supplement 0.004 ml/ml, EGF (recombinant human) 0.1 ng/ml, basic FGF (recombinant human) 1 ng/ml, Heparin 90 µg/ml, Hydrocortisone 1 µg/ml], 5 ml Penicillin / Streptomycin

Vollmedium für HCASMC	500 ml Smooth Muscle Cell Basal Medium 2, Smooth Muscle Cell Growth Medium 2 SupplementPack [FCS 0.05 ml/ml, EGF (recombinant human) 0.5 ng/ml, basic FGF (recombinant human) 2 ng/ml, Insulin 5 µg/ml], 5 ml Penicillin / Streptomycin
Vollmedium für mPM	500 ml <i>Dulbecco's modified eagle medium</i> / Nutrient Mixture F12 (3151 mg/l Glukose) mit GlutaMAX™-I (1x), 10 % FCS, 5 ml Penicillin / Streptomycin

3.11 Versuchstiere zur Zellisolation

Die Haltung und Zucht von den im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Versuchstieren wurden durch Mitarbeiter der zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) Mainz sichergestellt. Folgenden Versuchstiere wurden benutzt und wie folgt bezogen:

Mausmodell	Beschreibung	Quelle
C57BL/6J Wildtyp Mäuse	Inzuchtstamm	Bezogen über ZVTE Mainz

3.12 Humanes Gewebe

Gewebeproben der inneren Karotisarterie (engl. *internal carotid artery* / lat. *arteria carotis interna*) wurde im Rahmen einer Karotisendarterektomie bei hochgradiger Stenosis an der Universitätsmedizin Mainz in der Herz-, Thorax-, Gefäßchirurgie, Sektion Gefäßchirurgie, von Prof. Dr. B. Dorweiler entnommen (siehe 4.5). Die klinischen Daten jedes einzelnen Patienten wurden dokumentiert (Tabelle 5.1). Die Einverständniserklärungen der Patienten und die Genehmigung der Ethikkommission lagen jeweils vor dem Durchführen des Eingriffs vor.

4 Methoden

4.1 Zellbiologische Arbeitsmethoden

Alle zellbiologischen Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen unter einer Sterilwerkbank. Es wurden ausschließlich autoklavierte und steril erworbene Materialien / Substanzen verwendet. Die Behandlung der Zellen mit Elastase erfolgte für die angegebenen Konzentrationen einmalig zu Beginn der angegebenen Inkubationszeit, ohne die erneute Zugabe an Elastase.

4.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die Kultivierung der verwendeten Zelllinien erfolgte in ihrem jeweiligen Vollmedium (siehe 3.10.2) in einem Brutschrank bei 37°C, 100 % Luftfeuchtigkeit und bei 5 % CO₂-Begasung bzw. 10 % für die EA.hy 926-Zellen. Sobald die Zellen eine Konfluenz von 90-95 % erreicht haben wurden diese passagiert. Hierzu wurde zunächst das Medium abgenommen und die Zellen mit 5 - 10 ml PBS pro 75 cm² Zellkulturflasche gewaschen. Eine anschließende zwei- bis dreiminütige Inkubation mit 2 ml Accutase bzw. 0.5 %-iger Trypsinlösung für EA.hy 926-Zellen pro 75 cm² Zellkulturflasche im Brutschrank führte zu einer enzymatischen Ablösung der Zellen vom Boden der Kulturflasche. Durch Zugabe von frischem serumhaltigem Medium wurde der enzymatische Verdau beendet. Zur Erhaltung der Stammkultur wurde ein Teil der Zellsuspension in der Zellkulturflasche zurückbehalten, während die restlichen Zellen je nach Versuchsbedingung und Bedarf entweder eingefroren, in Zellkulturplatten ausplattiert oder verworfen wurden.

4.1.2 Kryokonservierung und Auftauen eukaryotischer Zellen

Für eine dauerhafte Aufbewahrung der Zellen wurden diese kryokonserviert. Hierzu wurden die konfluenten Zellen aus einer 75 cm² Zellkulturflasche mittels Trypsinbehandlung vom Boden der Kulturflasche gelöst, in frischem Vollmedium aufgenommen und in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt (siehe 4.1.1). Nach Zentrifugation (5 min, 800 x g, RT) wurde der

Überstand abgenommen und das Pellet in eiskaltem Vollmedium, welches zusätzlich 10 % DMSO und 10 % FCS enthielt, aufgenommen. Je 1 ml der Suspension wurde in ein vorgekühltes 1.5 ml Kryoröhrchen überführt, zunächst bei -80°C eingefroren und zur langfristigen Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt.

Zum Auftauen wurde die Zellsuspension im Kryoröhrchen bei 37°C im Wasserbad erwärmt, sofort in 5 ml Vollmedium aufgenommen und das DMSO-haltige Medium durch fünfminütige Zentrifugation bei $800 \times g$ und RT entfernt. Das Zellpellet wurde in 5 ml frischem Vollmedium aufgenommen und zur Kultivierung in eine 25 cm^2 Zellkulturflasche überführt.

4.1.3 Bestimmung der Zellzahl und Aussaat

Zur Bestimmung der Zellzahl der aus der Stammkultur entnommenen Zellsuspension (siehe 4.1.1) wurden $10 \mu\text{l}$ auf das Zählraster einer Neubauer-Zählkammer aufgetragen und vier Großquadrate unter einem Lichtmikroskop ausgezählt. Der daraus resultierende Mittelwert wurde mit zehn multipliziert und ergab die Zellzahl pro Mikroliter Zellsuspension. Davon ausgehend wurden die für die Experimente benötigten Zellzahlen durch Verdünnung mit dem entsprechenden Vollmedium angesetzt und anschließend in die Zellkultur-Platten ausplattiert. Das Ausplattieren der Zellen erfolgte am Vortag des jeweiligen Experiments, wobei je nach Kulturgefäß eine definierte Zellzahl ausgesät wurde, um am Versuchstag die gewünschte Konfluenz zu erreichen (Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Zellzahl für Aussaat

Zelllinie	Kulturgefäß	Konfluenz	Zellzahl
EA.hy 926	12-well-Platte	60 %	1.4×10^5
	24-well-Platte	60 %	6.5×10^4
	24-well-Platte	80 %	8×10^4
HAoEC	96-well-Platte	60 %	1×10^4
	24-well-Platte	60 %	6.5×10^4
	24-well-Platte	80 %	8×10^4
HCASMC	96-well-Platte	60 %	1×10^4
	24-well-Platte	60 %	6.5×10^4

	24-well-Platte	80 %	8×10^4
	96-well-Platte	60 %	1×10^4
mPM	96-well-Platte	80 %	3×10^5

4.1.4 Transfektion von siRNA in eukaryotische Zellen

Die RNA-Interferenz (kurz RNAi) ist ein natürlich vorkommender und experimentell nutzbarer Mechanismus zur Inaktivierung einer spezifischen Genexpression¹⁰⁸. Diese erlaubt mit Hilfe von synthetischen siRNAs (*small interfering RNAs*) die gezielte Herabregulation jedes beliebigen Gens (*Gene Silencing*), woraus die Funktion des codierten Proteins abgeleitet werden kann. Bei den siRNAs handelt es sich um 20–25 Nukleotide lange RNA-Doppelstränge, die nach dem Einschleusen in eine eukaryotische Zelle an komplementäre mRNA-Sequenzen binden und dadurch deren Abbau bewirken¹⁰⁹.

Für die Transfektion von siRNAs wurden Zellen mit einer Konfluenz von 60 % in 24-well-Platten ausplattiert (siehe 4.1.3) und am Folgetag mit dem siRNA-Transfektionsreagenz *Lipofectamine*® RNAiMAX nach Angaben des Herstellers transfiziert. Dabei wurde die empfohlene *Lipofectamine*® RNAiMAX-Menge zur Verringerung der Zytotoxizität herabgesetzt und im 24-well-Format je 33 nM siRNA mit 1 μ l *Lipofectamine*® RNAiMAX transfiziert. Nach 24 Stunden erfolgte ein vollständiger Medienwechsel. Zur Überprüfung unspezifischer Effekte, die durch die Transfektion bzw. den aktivierten RNAi-Signalweg verursacht werden könnten, wurde parallel eine Kontroll-siRNA mit unbekannter Zufalls-Sequenz transfiziert. Die verminderte Expression der mRNA und des Proteins wurde mittels quantitativer *real-time* RT-PCR (siehe 4.2.4), Western Blot (siehe 4.3.4) und / oder Durchflusszytometrie (siehe 4.1.7) überprüft.

4.1.5 Blockierung des PAR-2 Rezeptors mittels Antikörper

Für die Blockierung des PAR-2 wurde ein polyklonaler rabbit anti-human PAR-2 Antikörper (100 μ g/ml) verwendet^{105,106,107}. Hierfür wurden Endothelzellen in weiße 96-well-Platten oder in 24-well-Platten mit einer Konfluenz von 60 % ausplattiert (siehe 4.1.3) und 45 min vor der Elastase-Behandlung mit dem blockierenden Antikörper inkubiert. Zusätzlich wurden

täglich 50 µg/ml des blockierenden Antikörpers zu den Zellen hinzugegeben. Anschließend erfolgten Caspase-3/7-Aktivitätsmessungen (siehe 4.1.6) und Zelltod / Apoptose Messungen mittels Durchflusszytometrie (siehe 4.1.7).

4.1.6 Messung der Caspase-3/7-Aktivität und Zell-Viabilität in eukaryotischen Zellen

Apoptose Messung

Die Zellen wurden in weiße 96-*well*-Platten mit einer Konfluenz von 60 % ausplattiert (siehe 4.1.3) und an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit verschiedenen Konzentrationen an Elastase bzw. mit 1 µM Staurosporin (Positivkontrolle) in maximal 70 µl Vollmedium behandelt. Anschließend wurde ein *Caspase-Glo*[®] 3/7 Reagenz bzw. *CellTiter-Glo*[®] Reagenz hinzugefügt, welches ein zur Caspase-3/7-Aktivität bzw. zum ATP-Gehalt proportionales Chemilumineszenzsignal generiert. Hierbei entsprach die Menge an zugesetztem Reagenz der Menge an Medium. Die Messung erfolgte in einem Mikroplattenlesegerät. Wenn angegeben, wurden 30 µM des RIP-1 Inhibitors Necrostatin-1 in das Zellkulturmedium hinzugegeben und täglich erneuert.

Zell-Viabilitätsmessung

Zur Bestimmung von Zellen, die die Membranintegrität verloren haben, wurde der *CytoTox-ONE*[™] Homogenous Membran Integrity Assay verwendet. Hierfür wurden die Zellen in schwarze 96-*well*-Platten ausplattiert. Nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen an Elastase für maximal drei Tage wurde ein *CytoTox-ONE*[™] Reagenz hinzugefügt, welches ein zur im Zellkulturüberstand freigesetzten Lactatdehydrogenase (LDH) proportionales Fluoreszenzsignal induziert. Zur Bestimmung des Gesamt-LDH-Gehalts der Zellen wurden jeweils einige Proben unmittelbar vor der Messung nach Angaben des Herstellers lysiert. Die Menge an zugesetztem Reagenz entsprach der Menge an Medium. Die Messungen erfolgten gemäß den Herstellerangaben, wobei die empfohlenen Reagenzmengen bei allen Assays halbiert wurden.

4.1.7 Überprüfung des PAR-1-Knockdowns mittels Durchflusszytometrie

Für die Überprüfung des PAR-1-Knockdowns wurde die Durchflusszytometrie (FACS) verwendet. Diese ermöglicht die hochfrequente Untersuchung einzelner Zellen in einem Flüssigkeitsstrom. Eine Hauptanwendung besteht darin, mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Antikörpern bestimmte Eigenschaften (z.B. quantitative Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen) von Zellen zu dokumentieren. Zusätzlich werden durch die Lichtbeugung und -streuung Informationen über die Zellgröße und die Granularität der Zellen gewonnen. Hierfür wurden EA.hy 926-Zellen 24 Stunden nach der Transfektion (siehe 0) mittels 0.2 % EDTA in PBS aus den Wells herausgelöst, mit Vollmedium die Reaktion gestoppt und in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation (700 x g, 4°C, 5 min) wurde der Überstand abgenommen, das Pellet in PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und in 1 ml Vollmedium aufgenommen. Anschließend wurden 8×10^4 Zellen in PBS nach Herstellerangaben für 30 min auf Eis mit einem α -Thrombin R (PAR-1)-PE gekoppeltem Antikörper (siehe 3.7.1) gefärbt und nach erneuter Zentrifugation (5 min, 700 g, 4°C) und Aufnahme des Pellets in 300 μ l PBS mittels FACS analysiert. Zur Überprüfung unspezifischer Effekte, die durch die Transfektion bzw. den aktivierten RNAi-Signalweg verursacht werden könnten, wurde parallel eine Kontroll-siRNA mit unbekannter Zufalls-Sequenz transfiziert.

4.1.8 Messung apoptotischer Zellen mittels Durchflusszytometrie

Elastase-induzierter Zelltod / Apoptose wurde in Anlehnung an Riccardi *et al.*¹¹⁰ mit Hilfe des SubG1 Assays im FACS untersucht. Für die Versuchsdurchführung wurden EA.hy 926-Zellen in 24-well-Platten mit einer Konfluenz von 60 % ausplattiert (siehe 4.1.3) und an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit verschiedenen Konzentrationen an Elastase bzw. mit 1 μ M Staurosporin (Positivkontrolle) in maximal 300 μ l Vollmedium behandelt. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde das Inkubationsmedium in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt, die Zellen mit PBS gewaschen, mittels Trypsin aus der Kulturschale herausgelöst (siehe 4.1.1) und zu dem Inkubationsmedium im Reaktionsgefäß hinzugefügt. Einer Zentrifugation (800 x g, 4°C, 5 min) folgte die Entfernung des Überstandes und das Resuspendieren des Pellets in 200 μ l PBS. Die Fixierung der Zellen erfolgte in 1200 μ l eiskaltem 80 %-igem Ethanol, wonach diese für mindestens 20 min bzw. maximal 7 Tage bei -20°C gelagert wurden. Zur Entfernung

des Ethanols aus der Probe wurde diese zweimal mit PBS gewaschen und zentrifugiert (800 x g, 4°C, 5 min). Im Anschluss an die zweite Zentrifugation wurden die Zellen in 290 µl PBS aufgenommen und 10 µg/ml RNase A für eine Stunde bei RT hinzugefügt. Es folgte eine abschließende Inkubation mit 0.5 µg/ml Propidiumiodid (PI) für 15 min bei RT im Dunkeln. Die Messungen wurden am *FACSCanto™* II durchgeführt. Sofern angegeben, wurden 30 µM des RIP-1 Inhibitors Necrostatin-1 während der Elastase-Behandlung in das Zellkulturmedium hinzugegeben und täglich erneuert.

4.1.9 Messung der Autophagie mittels Durchflusszytometrie

Während des Prozesses der Autophagosom-Bildung wird das Protein LC3 (*microtubule-associated protein 1 light chain 3*) vom proLC3 zum LC3-I prozessiert, welches im fertigen Autophagosom mit Phosphatidylethanolamin konjugiert als LC3-II vorliegt und einen verlässlichen Marker für vollständige Autophagosomen darstellt. Zur Untersuchung der Autophagosomen-Bildung wurde ein LC3-II-PE konjugierter Antikörper verwendet (siehe 3.7.1). Zellen wurden mit einer Konfluenz von 60 % in *24-well* Platten ausplattiert (siehe 4.1.3) und mit Elastase bzw. 7-Ketocholesterol (10 µg/ml, 16 h, Positivkontrolle) behandelt. Nach 24 Stunden erfolgte das Herauslösen der Zellen mittels Trypsin aus den Zellkulturschalen, gefolgt von der Aufnahme in Vollmedium, Überführung in 1.5 ml Reaktionsgefäße und Zentrifugation (10 min, 650 x g, 4°C). Nach Fixierung in 4 %-igem Paraformaldehyd (10 min, 37°C), einer 1-minütigen Inkubation auf Eis und erneuter Zentrifugation (650 x g, 4°C) wurden die Zellen mittels eiskaltem 90 %-igem Methanol für 30 min auf Eis permeabilisiert, wonach diese für mindestens 20 min bzw. maximal 7 Tage bei -20°C gelagert wurden. Zur Entfernung des Methanols aus der Probe wurde diese mit 0.5 % BSA in PBS gewaschen und zentrifugiert (800 x g, 10 min, 4°C). Anschließend erfolgte das Blocken in 0.5 % BSA in PBS (10 min, RT) und die Färbung entsprechend den Herstellerangaben, als auch die Messung am *FACSCanto™* II.

Als Ergänzung zur eben beschriebenen Methode wurde ein *Cyto-ID®* Autophagy Detection Kit verwendet. Die Untersuchung der Autophagie in lebenden Zellen erfolgte mittels eines bei 488 nm anregbarem grün fluoreszierenden Detektionsreagenzes. Hierfür wurden Zellen mit einer Konfluenz von 60 % in *24-well* Platten ausplattiert (siehe 4.1.3), für unterschiedliche Zeiten mit 50 µg/ml Elastase bzw. mit 500 nM Rapamycin und 10 µM

Chloroquin (24 Stunden, Positivkontrolle) behandelt, nach Herstellerangaben gefärbt und gemessen.

Die Messungen erfolgten am *FACSCanto™* II, welches mit Diva Software (BD Biosciences) ausgestattet war. Dabei wurden jeweils 10.000 *events* für die entsprechenden Excitations- / Emissionswellenlängen erfasst (PI = 535 / 617 nm, PE = 496 / 578 nm, *Cyto-ID®* Green Detection Reagent = 463 / 534 nm).

4.1.10 Nachweis apoptotischen Zelltodes mittels Konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)

Zum Nachweis und Quantifizierung apoptotischen Zelltodes auf Einzelzellebene wurde ein *In Situ* Cell Death Detection Kit, basierend auf der Markierung von DNA Strangbrüchen (TUNEL; *TdT-mediated dUTP-X nick end labeling*), verwendet. Hierfür wurden 1×10^4 Zellen in schwarze 96-*well*-Platten mit einer Konfluenz von 60 % ausplattiert (siehe 4.1.3) und für zwei Tage mit verschiedenen Konzentrationen an Elastase bzw. mit 1 mg/ml Etoposid (Positivkontrolle) in Vollmedium behandelt. Die Färbung erfolgte nach Herstellerangaben. Die Zellen wurden anschließend mittels *ProLong®* Gold Antifade eingebettet.

Für die konfokale Lasermikroskopie wurde ein Zeiss LSM-710 mit ZEN2011 Software verwendet und die Zellen unter einem C-Aprochromat 40x/1.20 W Korr M27 Objektiv betrachtet. Die Excitations- / Emissionswellenlängen lagen bei 540 nm / 570 - 620 nm. Ein Zellkern wurde als positiv gewertet, sobald dieser ≥ 3 Doppelstrangbrüche aufwies.

4.1.11 Messung der CHOP- und cCaspase-3-Intensität in fixierten Zellen am CLSM

Für die Quantifizierung und Lokalisierung der endogenen Proteine CHOP und cCaspase-3 in ihrer zellulären Umgebung wurden fluoreszenzmarkierte Antikörper verwendet. Hierfür wurden 1.4×10^5 Zellen auf Glasplättchen in 24-*well*-Platten ausgesät, um eine Konfluenz von 80 % zu erhalten. Am Folgetag fand die Behandlung mit Elastase für unterschiedliche Zeitspannen und Konzentrationen statt. Die Fixierung der Zellen erfolgte mittels dreiminütiger Inkubation in eiskaltem Methanol und anschließender 30-sekündiger

Behandlung in eiskaltem Aceton. Nach Rehydrierung der Zellen in PBS und Blocken unspezifischer Bindungen für 15 min mit dem Background Buster, wurden die Zellen nach dreimaligem Waschen mit PBS über Nacht bei 4°C im Dunkeln mit einem Primärantikörper gegen CHOP bzw. cCaspase-3 (siehe 3.7.1) in 1x PBS mit 1 % BSA und 0.3 % *Triton*TM X-100, nach Herstellerangaben, inkubiert. Sofern der Primärantikörper nicht bereits fluoreszenzmarkiert war, wurden die Zellen dreimal gewaschen und eine Stunde im Dunkeln bei RT mit einem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper behandelt. Nach zweimaligem Waschen, Aufnahme der Zellen für fünf Minuten in PBS mit DRAQ5[®] (1:1000) und DAPI (1:1000), wurden diese mit *ProLong*[®] Gold Antifade auf einem Objektträger eingebettet und mikroskopiert. Der Nachweis phosphorylierter Proteine erfolgte, nach vorheriger Behandlung mit Elastase, mittels 20-minütiger Fixierung in 4 % Paraformaldehyd mit PhosSTOP (10x). Bei PhosSTOP handelt es sich um einen Phosphatase Inhibitor Cocktail, der Proteine vor einer Dephosphorylierung schützt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in 1x PBS mit 0.25 % *Triton*TM X-100 für fünf Minuten permeabilisiert, bevor diese für eine Stunde in 1x PBS mit 3 % BSA und 0.2 % *Triton*TM X-100 (pH 7.2) geblockt wurden. Die Inkubation des Primärantikörpers über Nacht bei 4°C und des fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers ein Stunde im Dunkeln bei RT erfolgte ebenfalls in der blockierenden Lösung. Zur Überprüfung der spezifischen Bindung des Antikörpers an das phosphorylierte Protein wurden Zellen nach der Fixierung und vor dem Permeabilisieren für 30 min bei 30°C mit 400 U Lambda Phosphatase und anschließend mit 5 U Alkaline Phosphatase bei 37°C für eine Stunde inkubiert.

Für die konfokale Lasermikroskopie wurde ein Zeiss LSM-710 mit ZEN2011 Software verwendet und die Zellen unter einem Plan / Apochromat 63x/1.40 oil DIC Objektiv bzw. einem C-Apochromat 40x/1.20 W Korr M27 Objektiv betrachtet. Die entsprechenden Wellenlängen wurden sequenziell aufgezeichnet und die Abwesenheit von Kreuz-Emissionen sichergestellt. Alternativ wurde ein spezielles Verfahren (λ -Modus) zur parallelen Spektraldetektion und anschließendem *Linear Unmixing* in die drei Kanäle Alexa Fluor[®] 488, CyTM3 und DRAQ5[®] benutzt. Diese Methode erlaubt die optische Trennung von Farbstoffen mit stark überlappenden Emissions-Spektren, so dass eine Vielzahl von Farbstoffen kombiniert und gleichzeitig analysiert werden können. Excitations- / Emissionswellenlängen der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe: Alexa Fluor[®] 488 = 496 / 519 nm, CyTM3 = 552 / 570 nm und DRAQ5 647 / 680 nm.

4.2 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

4.2.1 Extraktion der Gesamzell-RNA aus eukaryotischer Zellen

Für die Extraktion von RNA aus eukaryotischen Zellen (*24-well*) wurde das peqGOLD Total RNA Kit von Peqlab verwendet. Dabei wurde stets nach Angaben des Herstellers verfahren. Die RNA wurde in 50 µl RNase-freiem Wasser eluiert.

4.2.2 Bestimmung des Nukleinsäuregehalts

Die Konzentration und Reinheit von RNA erfolgte durch die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm unter Zuhilfenahme des NanoDrop 2000 Spectrophotometers. Der Messvorgang wurde entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Das Verhältnis (Ratio) von Extinktion der Probe bei 260 nm zu 280 nm entspricht dabei der Reinheit der Nukleinsäureproben und zeigt die Verunreinigung durch Protein-Rückstände aus der Präparation an. Dies ergibt sich aus der Absorption von Nukleinsäuren bei 260 nm und jener von Proteinen bei 280 nm. Der verwendete OD_{260} / OD_{280} -Wert lag stets über 1.8, so dass von einer geringen Verunreinigung der Proben ausgegangen werden konnte.

4.2.3 cDNA-Synthese mittels Reverser Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Zur quantitativen Analyse der Genexpression mittels quantitativer *real-time* RT-PCR (siehe 4.2.4) ist es notwendig, die zuvor aus den Zellen extrahierte RNA in cDNA (*complementary* DNA) umzuschreiben. Die cDNA-Synthese erfolgte mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase. Alle RT-PCRs wurden mit dem *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* gemäß Empfehlungen des Herstellers in einem Thermal Cycler durchgeführt. Für die cDNA-Synthese wurden 80 ng RNA eingesetzt.

4.2.4 Quantitative *real-time* RT-PCR (qRT-PCR)

Die Quantifizierung einer spezifischen mRNA aus Gesamtzell-RNA erfolgte mittels quantitativer *real-time* RT-PCR. Es handelt sich hierbei um eine PCR mit drei sequenzspezifischen Primern, von denen eine (die mittlere sogenannte *TaqMan*[®] Sonde) am 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff (6-Carboxyfluorescein, FAM) und am 3'-Ende mit einem *Quencher* (Carboxytetramethylrhodamin, TAMRA) markiert ist. Solange die Sonde an die komplementäre cDNA gebunden und intakt ist, wird durch die räumliche Nähe von Fluoreszenzmarkierung und *Quencher* kein Fluoreszenzsignal emittiert. Während der Extensionsphase der PCR wird die Sonde durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase gespalten. Folglich entfernen sich Fluoreszenzfarbstoff und *Quencher* räumlich voneinander. Dies erst ermöglicht die Detektion der FAM-Emission. Das vom Detektor erfasste Signal ist direkt proportional zur Menge der amplifizierten cDNA und somit zur ursprünglichen mRNA-Menge. Für die Quantifizierung wird die Expressionsrate des analysierten Gens zunächst mittels $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode gegen die Expressionsrate einer oder zweier konstitutiv exprimierten mRNAs (z.B. β -Actin und PolR II α) aus derselben Probe normalisiert. Anschließend erfolgt die Berechnung einer geänderten Expression durch den relativen Vergleich von behandelten und unbehandelten Proben. Die Reaktionen wurden in einem Volumen von 20 μ l angesetzt und im StepOnePlus Real-Time PCR System Cyler gemessen (Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2: Reaktionsansatz und Reaktionsprofil der qRT-PCR

Reaktionsansatz (20 μ l)		Reaktionsprofil		
2x Puffer	10 μ l	95°C	1 min	1 x
dNTPs (0.2 mM)	0.4 μ l	95°C	1 min	45 x
<i>sense</i> -Primer (10 pmol/ μ l)	1 μ l	95°C	30 sek	
<i>antisense</i> -Primer (10 pmol/ μ l)	1 μ l	60°C	1 min	
<i>TaqMan</i> [®] -Sonde (10 pmol/ μ l)	1 μ l	4°C	∞	
<i>Taq</i> -Polymerase	0.5 μ l			
DEPC-behandeltes Wasser	3.1 μ l			
cDNA (aus RT-PCR-Ansatz)	3 μ l			

Der Ansatz für die CHOP-, PAR-1-, PolR II α - und β -Actin-mRNA unterschied sich geringfügig. Statt des aufgeführten 1 μ l Primer wurde jeweils nur 1 μ l eines vordesignten Primer-Mixes verwendet, der sowohl sense- und antisense-Primer als auch die Sonde enthielt (siehe 3.8). Die *Taq*-Polymerase wurde freundlicher Weise von AG Kleinert zur Verfügung gestellt (Institut für Pharmakologie, Universitätsmedizin Mainz).

4.3 Proteinbiochemische Arbeitsmethoden

4.3.1 Herstellung von Gesamtprotein-Extrakten aus eukaryotischen Zellen und humanen Karotisproben

Zur Präparation von Proteinextrakten aus eukaryotischen Zellen wurde das Zellkultur-Medium abgenommen, in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (650 x g, 5 min, 4°C). Der Überstand wurde abgezogen und verworfen, und das Pellet im 1.5 ml Reaktionsgefäß auf Eis gelagert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und durch Zugabe von 60-100 μ l RIPA-Lysepuffer (siehe 3.5) bzw. Laemmli-Lysepuffer (siehe 3.4) pro 24-*well* bzw. 200 μ l pro 12-*well* lysiert. Der RIPA-Puffer enthielt den Protease-Inhibitor Cocktail *Halt*[™] (1x), EDTA (1x) und PhosSTOP (10x). Dem Laemmli-Puffer wurde β -Mercaptoethanol (0.05 %), *Halt*[™] (1x), PhosSTOP (10x) und Benzonase (1 μ l / 24-*well*) zugesetzt. Mithilfe einer Pipettenspitze wurden die Zellen mechanisch vom Boden der Platte abgelöst und die erhaltene Suspension in das auf Eis stehende 1.5 ml Reaktionsgefäß mit dem Pellet aus dem Überstand überführt. Während der nachfolgenden Inkubation (20 min, 4°C) wurden die Zellen durch das Detergenz aufgeschlossen. Bis zum Gebrauch wurden die Proben bei -20°C gelagert. Wurden die Proben in RIPA-Lysispuffer aufgenommen, erfolgte die Proteinkonzentrationsbestimmung mit Hilfe eines *BCA*[™]-Tests (siehe 4.3.2). Anschließend wurden eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (siehe 4.3.3) und Western Blot Analysen (siehe 4.3.4) durchgeführt. Die in Laemmli-Lysispuffer aufgenommenen Proben wurden vollständig auf das SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen.

70 mg, der aus den Patienten entnommenen Gewebeproben (siehe 4.5.1) wurden in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß gegeben, zweimal in PBS gewaschen und anschließend in flüssigem

Stickstoff tiefgefroren. Mit Hilfe eines Mörsers und unter ständiger Zugabe von flüssigem Stickstoff wurde das Gewebe pulverisiert, in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß überführt und in 200 µl Laemmli-Lysepuffer (0.05 % β-Mercaptoethanol, 1x *Halt*[™], 10x PhosSTOP, 8 µl Benzonase) für 30 min auf Eis lysiert. Nach anschließender Zentrifugation der Zelllysate (30 min, 12.000 x g, 4°C) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Bis zum Gebrauch wurden die Proben bei -20°C gelagert.

4.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Test

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Gesamtzellextrakten erfolgte mittels *BCA*[™] Protein Assay Kit nach Angaben des Herstellers. Proteine bilden mit Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex (Biuret-Reaktion). Durch die anschließende Reduktion des Komplexes zu Cu^+ -Ionen entsteht mit Bicinchoninsäure (BCA) ein violetter Farbkomplex, dessen Adsorption bei 562 nm photometrisch in einem Fluometer gemessen wurde. Hierbei entspricht die reduzierte Menge an Kupferionen der Proteinmenge. Zur Eichung und als Vergleichsproben dienten Proteinlösungen mit bekannter Konzentration.

4.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung und Identifizierung von Proteinen (siehe 4.3.4) wurde die eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli ¹¹¹ verwendet. Durch die Behandlung der zu untersuchenden Proteinlösung mit dem Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) kommt es zur Denaturierung sowie zur Überlagerung der Eigenladung von Proteinen und Ausbildung von negativ geladenen SDS-Protein-Komplexen. Da SDS proportional zum Molekulargewicht der Proteine bindet, weisen diese ein konstantes Masse-Ladungsverhältnis auf. Somit ist die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine im elektrischen Feld proportional zu ihrem Molekulargewicht.

Für die SDS-PAGE-Experimente wurde das Mini-*PROTEAN*[®]III System von BioRad oder das *PerfectBlue* Doppelsystem Twin ExW S von Peqlab verwendet. Folgende Gelsysteme aus Trenngel und Sammelgel kamen zum Einsatz:

Tabelle 4.3: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gele im BioRad Mini Gel

	12 %-iges Trenngel	5 %-iges Sammelgel
ddH ₂ O	3.3 ml	2.2 ml
30 % Bisacrylamid	4.0 ml	0.67 ml
1.5 M Tris, pH 8.8	2.5 ml	---
0.5 M Tris, pH 6.8	---	1.0 ml
10 %-iges SDS	0.1 ml	0.04 ml
10 %-iges APS	0.1 ml	0.04 ml
TEMED	0.004 ml	0.004 ml

Tabelle 4.4: Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gele im Peqlab *PerfectBlue* ExW S Gel

	12 %-iges Trenngel	5 %-iges Sammelgel
ddH ₂ O	8.25 ml	4.40 ml
30 % Bisacrylamid	10 ml	1.34 ml
1.5 M Tris, pH 8.8	6.25 ml	---
0.5 M Tris, pH 6.8	---	2.0 ml
10 %-iges SDS	0.25 ml	0.08 ml
10 %-iges APS	0.25 ml	0.08 ml
TEMED	0.025 ml	0.01 ml

Das 12 %-ige Trenngelgemisch wurde zu zwei Dritteln in die abgedichteten Glasplatten gefüllt und zur Vermeidung von Luftblasen direkt im Anschluss mit Isopropanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation des Trenngels wurde der Alkohol entfernt, das zur besseren Erkennbarkeit der Taschen mit Bromphenolblau (in 0.5 M Tris, pH 6.8) versetzte 5 %-ige Sammelgel zwischen die Platten gegossen und ein Kamm eingesetzt. Die zuvor auf eine gemeinsame Konzentration eingestellten Proteinproben wurden vor dem Auftragen mit 5 x SDS-Ladepuffer versetzt (sofern in RIPA-Lysepuffer lysiert (siehe 4.3.1)). Sowohl in RIPA-, als auch in Laemmli-Lysepuffer aufgenommene Proben wurden anschließend im Thermomixer (5 min, 95°C) denaturiert. Als Größenstandard wurde zusätzlich ein Proteinmarker aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte für beide

Gelsysteme unter Verwendung von 1 x SDS-Laufpuffer bei einer konstanten Spannung von 100 V (ca. 1-2 h).

4.3.4 Western Blot (WB): Immunologischer Nachweis zur Identifizierung von Proteinen

Durch Western Blot Analysen können bestimmte Proteine aus einem Proteingemisch mit Hilfe von spezifischen Antikörpern detektiert werden. Per SDS-PAGE (siehe 4.3.3) aufgetrennte Proteine werden in einem senkrecht zum Polyacrylamid-Gel angelegten elektrischen Feld auf eine PVDF-Membran transferiert. Nachdem freie Bindungsstellen auf der Membran blockiert wurden, kann das Protein mit spezifischen Antikörpern (Primärantikörper) detektiert werden. Der entstandene Antigen-Antikörper-Komplex wird dann mittels eines Enzym-gekoppelten Sekundärantikörpers sichtbar gemacht. Das an den Sekundärantikörper gekoppelte Enzym, hier eine Meerrettich-Peroxidase (HRP, *horseradish peroxidase*), katalysiert die Umsetzung eines zugegebenen Substrats zu seiner oxidierten Form, bei der eine Lumineszenz entsteht, welche detektiert werden kann. Die Visualisierung erfolgt schließlich durch Belichtung eines Positivfilms oder im digitalen *ChemiDoc XRS Imaging* Detektionssystem. Letzteres erlaubt eine genaue Quantifizierung der Signale über einen hohen Intensitätsbereich und erfasst >50-fache Unterschiede in Bandenintensitäten.

Je nach Anwendung wurden verschiedene Transfersysteme verwendet. In der Regel wurde ein *Semi-Dry*-Blotsystem verwendet. Dazu wurden die SDS-Gele nach der Elektrophorese zunächst für etwa 15 min in Kathodenpuffer (siehe 3.5) unter leichtem Schütteln äquilibriert. Die auf Gelgrößen zugeschnittenen PVDF-Membranen wurde kurz in Methanol aktiviert, in Wasser gewaschen und anschließend für 15 min in Anodenpuffer II äquilibriert. Zum elektrischen Transfer wurden auf die Anodenplatte zwei in Anodenpuffer I getränkte und zwei in Anodenpuffer II getränkte *Whatman*® 3 MM Papiere aufeinandergeschichtet, auf die dann die äquilibrierte PVDF-Membran, das Polyacrylamid-Gel und vier in Kathodenpuffer getränkte *Whatman*® 3 MM Papiere geschichtet wurden. Mit dieser Anordnung ist die Transferrichtung von der Kathode zur Anode gewährleistet. Der Transfer erfolgte je bei 3 mA/cm² SDS-Gel für etwa 25 min.

Zur Detektion des Proteins CHOP wurde eine Mini-Trans-Blot Zelle verwendet. Hierbei wurde in einem *Tank-Blot-System* (Naßblot) das Protein auf eine PVDF-Membran transferiert. Die SDS-Gele als auch die aktivierten und gewaschenen PVDF-Membranen wurden in kaltem Transferpuffer (siehe 3.5) für 15 min unter leichtem Schütteln äquilibriert. Zwei Blatt *Whatman*[®] 3 MM Papiere wurden in Transferpuffer angefeuchtet, das Gel auf die Papiere und anschließend die Membran luftblasenfrei auf das Gel gelegt. Abschließend wurden erneut zwei Blatt *Whatman*[®] 3 MM Papiere oben aufgelegt. Unten und oben wurde jeweils ein getränkter Schwamm aufgelegt, alles in einer Halterkassette verschlossen und in einen Mini-Trans-Blot Zentralkern eingesteckt. Anschließend wurde die Mini-Trans-Blot Zelle mit eiskaltem Transferpuffer befüllt, ein Kühlaggregat eingesetzt und ein Rührfisch zugegeben. Der Träger wurde so eingehängt, dass die Reihenfolge negativer Pol (Kathode, schwarz) - Papier - Gel - Membran - Papier - positiver Pol (Anode rot) eingehalten wurde. Transferkammer wurde in ein Eisbad auf einen Magnetrührer gestellt und der Transfer erfolgte bei 200 mA für 1.5 Stunden.

Um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu verhindern wurde die Membran nach dem Transfer für eine Stunde je nach Antikörper gemäß der entsprechenden Herstellerempfehlung in 5 %-igem Milchpulver oder in 5 %-igem BSA in TBS / Tween gesättigt. Anschließend wurde die Membran über Nacht bei 4°C in einer Lösung des Primärantikörpers (siehe 3.7.1) in 5 %-igem Milch- bzw. BSA-Puffer in end-over-end Rotation inkubiert. Am Folgetag wurde viermal mit TBS / Tween gewaschen und anschließend die Membran in einer Lösung des Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers (siehe 3.7.2) in Milchpulverlösung für eine Stunde bei RT geschwenkt. Nach erneuten Waschschrritten mit TBS / Tween (3 x 5 min, RT) und TBS (2 x 5 min, RT) wurde der Blot mit Hilfe eines ECL-Systems (*Western Lightning*[®] Chemiluminescence Reagent Plus bzw. *WesternBright*[™] Sirius) durch Belichtung eines Röntgenfilms und mittels des digitalen *ChemiDoc XRS Imaging Systems* visualisiert. Die Quantifizierung der Banden erfolgte durch die Software *QuantityOne 4.6.7*.

4.4 Isolierung von murinen Peritoneal-Makrophagen (mPM)

Für die Untersuchung der Elastase-induzierten Apoptose in Makrophagen wurden diese Zellen aus dem Peritoneum von C57Bl6/J-Wildtyp (WT) Mäusen (12-17 Wochen alt) isoliert und mittels Caspase-3/7 Assay (siehe 4.1.6) analysiert. Hierbei wurden die Versuchstiere durch etwa 5-minütige inhalative Anästhesierung mit Isofluran narkotisiert und getötet, gemäß §4 Abs. 1 und §6 Abs. 1 Nr. 4 des Tierschutzgesetzes.

Nach Betäuben, Töten und Desinfizieren der Maus mit 70 % Ethanol wurde das Peritoneum ohne es zu verletzen unter einer Sterilbank zugänglich gemacht und die Peritoneallavage mit einer 23 G Kanüle und einer mit 10 ml kaltem PBS gefüllten Spritze durchgeführt. Ohne das Fettgewebe oder Organe anzusaugen wurde die Zellsuspension wieder aus dem Bauchraum abgezogen, in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gelagert. Die Peritoneallavage wurde ein weiteres Mal durchgeführt und die Zellsuspension in ein separates 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Einer Zentrifugation (800 x g, 10 min, 4°C) folgend wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet in DMEM/F12 Medium (+10 % FCS + 1x Penicillin / Streptomycin) aufgenommen, die Zellzahl bestimmt und 3×10^5 Zellen in weiße 96-well-Platten ausgesät. Die Zellen wurden für 2 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert. Nach zweimaligem Spülen mit warmen PBS wurden nicht adhärente Zellen abgezogen und die mPM mit 100 µl Medium kultiviert.

Es folgte eine Behandlung an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit verschiedenen Konzentrationen an Elastase bzw. mit 1 µM Staurosporin (Positivkontrolle) in maximal 70 µl Vollmedium. Am letzten Tag der Inkubation wurde die Caspase-3/7 Aktivität (siehe 4.1.6) bestimmt.

4.5 Histologische Arbeitsmethoden

Im Rahmen gefäßchirurgischer Karotisendarterektomie der Arteria carotis interna (inneren Karotisarterie/Halsschlagader) wurden etwa 40 Gewebeproben atherosklerotischer Läsionen von Patienten mit Karotisstenose an der Universitätsmedizin Mainz in der Herz-, Thorax-, Gefäßchirurgie, Sektion Gefäßchirurgie, von Prof. Dr. B. Dorweiler entnommen und die

klinischen Daten jedes einzelnen Patienten dokumentiert (Tabelle 5.1). Die Einverständniserklärungen der Patienten sowie die Genehmigung der Ethikkommission lagen jeweils vor dem Durchführen des Eingriffs vor.

4.5.1 Entnahme von Gewebeproben und Aufbewahrung

Die entnommenen Gewebeproben (Plaques) wurden sofort nach der Entnahme in 4 % Formalin fixiert. Anschließend erfolgte das manuelle Zuschneiden der Plaque-Zylinder in maximal 3 cm lange Teilstücke und das jeweilige Einbetten in Paraffinwachs. Mit Hilfe eines Mikrotoms wurde das Segment mit maximaler Lumenreduktion in 3 µm dicke Paraffinschnitte (perpendikular zum Lumen) geschnitten, auf *Superfrost®Plus* Objektträger transferiert, an der Luft getrocknet und bis zur immunhistochemischen Färbung (siehe 4.5.3) bei RT im Dunkeln gelagert. Als Kontrollen dienten Gewebeproben aus der Karotis- und Oberschenkelarterie. Diese stammen von Patienten ohne klinische Hinweise auf atherosklerotische Erkrankungen (vaskuläres Trauma, Organspender).

4.5.2 Histopathologie

Für die morphologische Analyse der Gewebeproben wurde jeder zehnte Gewebeschnitt eines Patienten sowohl mit Hämatoxylin und Eosin (HE-Färbung) angefärbt, als auch eine Masson-Goldner-Färbung angefertigt.

Für die HE-Färbung wurden die Schnitte für 30 min oder ü.N. bei 60°C im Wärmeschränk gelagert, 3 x kurz durch Xylol getaucht (entparaffiniert) und anschließend mittels einer absteigenden Isopropanolreihe (100 %, 100 %, 96 %, 70 %, 50 %; jeweils 5 min) entwässert. Nach kurzem Schwenken in destilliertem Wasser (Aqua dest.) erfolgte eine Inkubation in Hämatoxylin-Lösung (5 min), einem 15-minütigem Spülen („Bläuen“) unter fließendem Leitungswasser und einer abschließenden Färbung in einer Eosin-Lösung (3 min). Einem kurzen Spülen in Aqua dest. folgte ein kurzer Durchlauf einer aufsteigenden Isopropanolreihe (50 %, 70 %, 96 %, 100 %, 100 %) und durch Xylol (3 x 5 min). Mittels Entellan wurden die Schnitte luftblasenfrei mit Deckgläschen eingedeckt und unter einem Abzug trocknen gelassen.

Für die Masson-Goldner-Trichromfärbung wurden die Gewebeschnitte entparaffiniert, entwässert und in Hämatoxylin-Lösung nach Weigert (5 min) inkubiert. Nach kurzem Spülen in destilliertem Wasser, 10-minütigem Bläuen in Leitungswasser und erneut in destilliertem Wasser erfolgte die Inkubation in Ponceau S (7 min). Dreimaligem Spülen in 1 % Essigsäure folgte eine Färbung in Goldner-Lösung II (10 min) und dreimaliges Spülen in 1 % Essigsäure. Abschließend wurden die Schnitte in Lichtgrün (5 min) gefärbt, 1 x in 1 % Essigsäure und 2 x in 100 % Isopropanol gespült, 3 x durch Xylol gezogen und mittels Entellan eingedeckt.

Von jeweils fünf gefärbten Schnitten pro Patient, die eine maximale Lumenreduktion aufwiesen, wurden repräsentative Übersichtsbilder angefertigt. Für die mikroskopischen Aufnahmen wurde ein Zeiss Axioplan Mikroskop mit einer Olympus XC30 Kamera und eine Olympus CellSense Imaging Software verwendet. Die anschließende Quantifizierung der Kappendicke, Fläche des nekrotischen Kerns, sowie der totalen Plaqueläche erfolgte ebenfalls mit der Olympus CellSense Imaging Software. Hierbei wurde der nekrotische Kern als amorphes Material mit Cholesterin-kristalliner Struktur definiert. Die fibröse Kappe wurde identifiziert und der schmalste Teil (minimale Kappendicke), als auch der Teil mit einer repräsentativen Kappendicke vermessen¹¹². Für weitere detaillierte Analysen (siehe 4.5.3) wurden lediglich von 10 Patienten entnommene Gewebeproben verwendet, die bei der histopathologischen Untersuchung die Kriterien für Ruptur-gefährdete oder rupturierte Plaques erfüllten und wurden zusätzlich nach der AHA-Klassifikation eingestuft¹¹³.

4.5.3 Immunhistochemische Färbungen

In der Immunhistochemie (IHC) wird die Affinität von Antikörpern zu einem speziellen Antigen verwendet, um deren Verteilung am histologischen Schnitt sichtbar zu machen. Der primäre Antikörper bindet an das dazustellende Antigen und um diese Bindung nachzuweisen, wird der erste Antikörper mit einem biotinylierten sekundären Antikörper markiert. Hierbei richtet sich der Sekundärantikörper gegen das F_c-Fragment des Primärantikörpers. An den Sekundärantikörper wird durch eine Verbindung zwischen Biotin und Avidin ein Meerrettich-Peroxidase-Komplex (HRP, *horseradish peroxidase*) angelagert. Zur Visualisierung des gesamten Antikörper-Komplexes wird das Chromogen DAB (3,3'-Diaminobenzidin) verwendet, welches an die Peroxidase des HRP bindet.

3-4 repräsentative Paraffinschnitte eines Patienten wurden pro Antikörper (siehe 3.7.1) angefärbt. Hierbei wurde eine Plaque-Zylinderlänge von durchschnittlich 300-450 µm verwendet. Nach dem Entparaffinieren in Wärmeschrank und Xylol, Entwässerung in einer absteigenden Isopropanolreihe (siehe 4.5.2) und Rehydrierung der Schnitte in PBS (20 min) wurde die endogene Peroxidase-Aktivität mittels 3 %-ige Wasserstoffperoxid-Lösung (20 min) geblockt. Die Schnitte wurden 3 x in PBS (10 min) gespült und mit 10 % Normalserum aus der Ziege in einer Feuchtkammer behandelt, um unspezifische Bindungen zu verhindern und somit eine Hintergrundfärbung zu vermeiden. Einer 1-stündigen Inkubation des Primärantikörpers bei RT in der Feuchtkammer folgte ein Waschschriff in PBS und die Inkubation mit einem HRP-konjugiertem Sekundärantikörper (10 min) aus dem LSAB™2 Kit. Die Paraffinschnitte wurden 2 x mit PBS gespült und ein Verstärkersystem (LSAB™2 Kit; 10 min) hinzugegeben. Die gebundenen Antikörper wurden nun mit Hilfe von DAB (10 min) sichtbar gemacht und anschließend in PBS gewaschen. Zur Gegenfärbung wurden die Kerne mit Hämatoxylin angefärbt. Einer aufsteigenden Isopropanolreihe, Spülen in Xylol, folgte letztlich das Eindecken mittels Entellan. Die Schnitte wurden bei RT im Dunkeln gelagert.

Bei einigen Antikörpern mussten vor dem Blocken der endogenen Peroxidase-Aktivität die Antigene demaskiert werden (*antigen retrieval*). Bei Verwendung der cCaspase-3 und ATF3 Antikörper wurden die Schnitte für 20 min in Citratpuffer (pH 6.0) erhitzt (95°C, Dampfgarer) und für CHAC-1 wurden die Schnitte für 10 min bei RT mit einer *Ready-to-Use* Proteinase K *Solution* vorverdaut. Für Färbungen mit CHOP wurden die Schnitte nach dem Blocken der endogenen Peroxidase-Aktivität für 20 min in Retrieve-All Antigen Unmasking System 2: Basic Solution erhitzt (95°C, Dampfgarer). Ein *EnVision™* Detection Systems Peroxidase/DAB wurde nach Herstellerangaben für den KDEL (GRP78 und GRP94) Antikörper verwendet.

TUNEL Assay

Zum Nachweis apoptotischen Zelltodes wurde ein *ApopTaq®* Peroxidase *In Situ* Apoptosis Detection Kit, basierend auf der Markierung von DNA Strangbrüchen (TUNEL; *TdT-mediated dUTP-X nick end labeling*), verwendet.

Hierfür wurden die Paraffinschnitte entparaffiniert, in einer absteigenden Ethanolreihe (100 %, 100 %, 96 %, 70 %; jeweils 3-5 min) entwässert, in PBS rehydriert und mit *Ready-to-Use* Proteinase K *Solution* (15 min, RT) vorverdaut. Nach 2 x Waschen in PBS wurden die Schnitte mit 3 %-iger Wasserstoffperoxid-Lösung inkubiert und erneut 2 x in PBS gespült. Die

anschließende Äquilibrierung, Inkubation mit TdT Enzym und Anti-Digoxigenin Konjugat, sowie das Waschen der Schnitte erfolgte nach Herstellerangaben. Für die Visualisierung wurde DAB verwendet und erneut 3 x in PBS gespült. Die Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte in 0.5 %-igem Methylgrün. Die Schnitte wurden 3 x in Aqua dest. gewaschen und jeweils 10 x in N-Butanol getaucht (2 x) und 1 x für 30 sek. in N-Butanol stehen gelassen. Abschließend wurden die Schnitte 3 x durch Xylol gezogen und mittels Entellan luftblasenfrei eingedeckt.

Von jedem Antikörper wurde pro Patient ein Übersichtsbild (25x Vergrößerung) aufgenommen und jeweils fünf repräsentative Bilder der Schulterregion (200x Vergrößerung) für jeden der 3-4 angefärbten Schnitte. Die semiquantitative Analyse erfolgt mittels Auszählung der positiv gefärbten Zellen mit Hilfe der frei erhältlichen ImageJ Software (<http://rsb.info.nih.gov/ij> 1 /disclaimer.html). Für CHAC-1 Färbungen wurden die positiv gefärbten Flächen mittels der CellSens Imaging Software quantifiziert. Hierfür wurden ebenfalls 5 Bilder der Schulterregion (200x Vergrößerung) von jedem der 3-4 angefärbten Schnitte angefertigt. Um nicht-spezifische Bindungen auszuschließen wurden Kontrollfärbungen angefertigt, bei denen der Primäantikörper entweder weggelassen oder durch Kontroll-IgG ersetzt wurde. Als Positivkontrollen dienten menschliche Tonsille oder Pankreas, die laut Antikörper-Datenblatt gesichert die Zielproteine exprimiert.

4.5.4 Doppelimmunhistochemie

Für die simultane Detektion von zwei unterschiedlichen Antigenen auf einem Paraffinschnitt wurde das *EnVision™* G|2 Doublestain System nach Herstellerangaben verwendet. Das Visualisierungssystem basiert auf HRP mit DAB als Chromogen (Braunfärbung) und alkalischer Phosphatase (AP) mit Permanentrot als Chromogen (Rotfärbung). Hierfür wurden von jedem Patienten 2 repräsentative Paraffinschnitte verwendet.

4.6 Statistik

Zur Erstellung der in Kapitel 5 gezeigten Graphiken wurden die Programme *GraphPad Prism 5* (San Diego, USA), *QuantityOne 4.6.7* (BioRad), *ZEN2011* (Zeiss), und *CellSens Imaging* (Olympus) verwendet. Die statistische Auswertung der experimentellen Daten erfolgte mit *GraphPad Prism 5* mittels *One-way ANOVA* und nachfolgendem *Tukey-Test* (bei Normalverteilung der Daten) oder *Kruskal-Wallis-Test* (bei nicht-parametrischen Verteilung der Daten) überprüft. Das Signifikanzniveau α wurde mit 0.05 festgelegt. Die Messdaten wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) aus *n* unabhängigen Experimenten angegeben. *Adobe Photoshop CS5* wurde für die Bildbearbeitung der Western Blots verwendet, wobei (falls notwendig) nur Helligkeit und / oder Kontrast simultan für alle Bereiche eines Blots geändert wurde.

5 Ergebnisse

5.1 *In vitro* Charakterisierung der Rolle der Elastase in humanen Endothelzellen

Pathomorphologisch sind Plaqueruptur und Plaqueerosion die häufigsten Ursachen der Atherothrombose und damit kardial bedingter Todesfälle. Als auslösende Faktoren für Plaqueruptur und –erosion werden erhöhte Zelltodraten von Makrophagen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen angesehen, sowie ein verstärkter Abbau der extrazellulären Matrix^{28,30,114}. Die Elastase besitzt aufgrund der pro-apoptischen Wirkung auf Gefäßwandzellen^{29,33,115}, sowie ihrer proteolytischen Eigenschaft²⁸ hohes Pathogenitätspotential für die der Atherothrombose zugrunde liegende Plaqueruptur bzw. –erosion. Die molekulare Charakterisierung des intrazellulären Signalweges der Elastase-induzierten Apoptose ist jedoch bisher nicht aufgeklärt und soll daher im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, um einen potentiell beschleunigenden Einfluss auf die atherosklerotische Läsionsprogression zu charakterisieren.

5.1.1 Elastase induziert Apoptose in humanen Endothelzellen

Vorherige Studien belegten ein Elastase-induziertes Absterben von Endothelzellen, klärten jedoch den zugrundeliegenden Mechanismus unzureichend auf. Dies war zunächst Gegenstand der hier präsentierten Untersuchungen. Hierfür wurden primäre humane Gefäßendothelzellen aus der Aorta (HAoECs) mit steigenden Konzentrationen und verschiedenen Zeiten mit Elastase behandelt und anschließend die Caspase-3/7-Aktivität bestimmt (siehe 4.1.6, Abbildung 5-1). Hierbei stellte sich heraus, dass bei Behandlung mit steigenden Konzentrationen an Elastase, 30 µg/ml nach bereits 24 Stunden einen signifikanten Anstieg der Caspase-3/7-Aktivität und somit auch des Zelltodes zu verzeichnen war (Abbildung 5-1a). Jedoch führten höhere Konzentrationen zu einer Abnahme der Caspase-3/7-Aktivität. Dies war vermutlich auf eine zu hohe Elastase-Konzentration zurück zu führen, so dass die stärkste Induktion der Caspase-3/7 bereits vor dem Messzeitpunkt lag

und nur noch überwiegend spät-apoptotische Zellreste („apoptotic bodies“) vorlagen. Geringere Konzentrationen an Elastase (10 µg/ml) induzierten nach 48 Stunden einen deutlichen Caspase-3/7-Anstieg (Abbildung 5-1b).

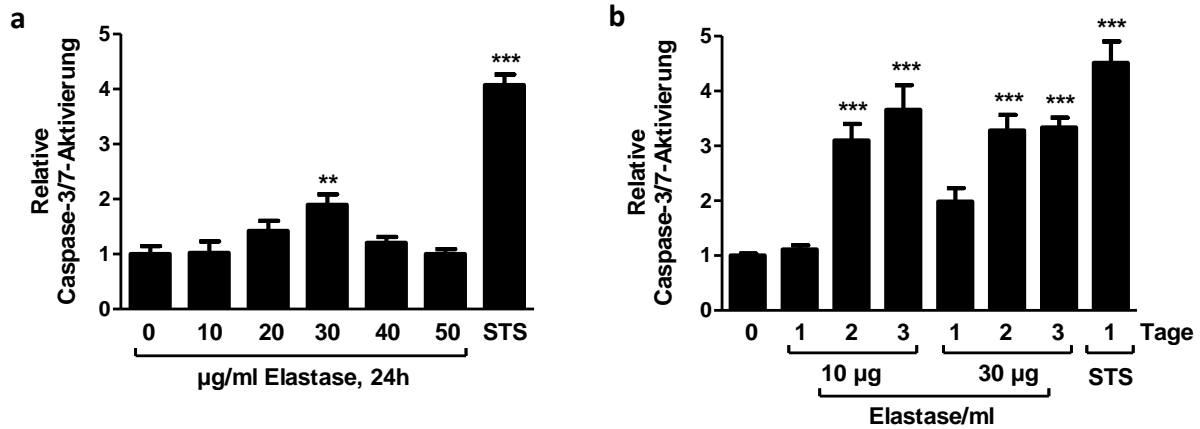
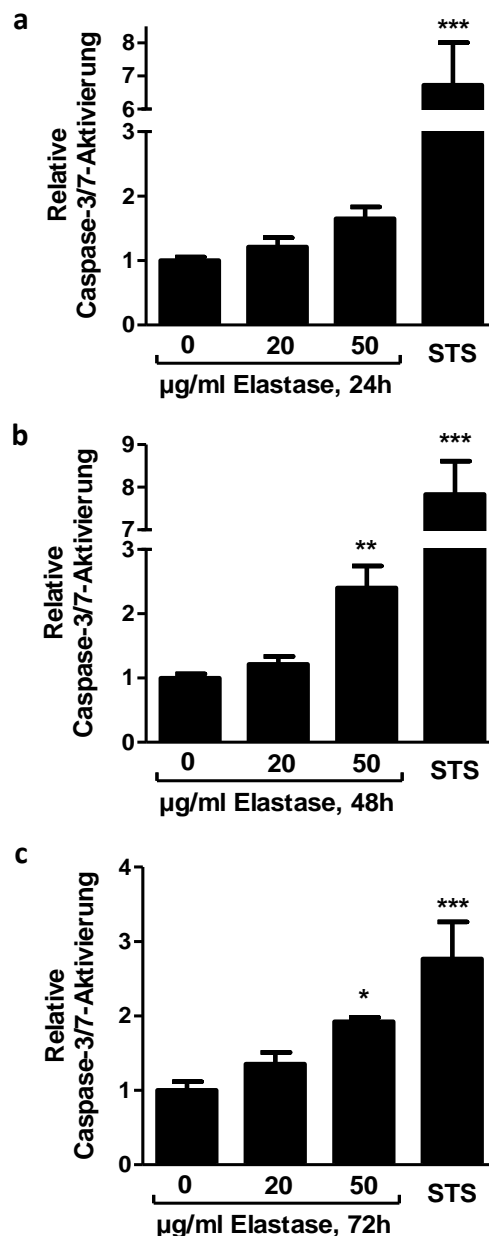


Abbildung 5-1: Elastase induziert eine Caspase-3/7-Aktivierung in primären humanen Aorten-Endothelzellen (HAoECs).

(a) HAoECs wurden 24 h mit den angegebenen Konzentrationen an Elastase oder mit Staurosporin (STS; 1 µM) behandelt und auf ihre Caspase-3/7-Aktivität untersucht. (b) Die Caspase-3/7-Aktivierung wurde in den primären Zellen nach Elastase-Behandlung für die genannten Zeiten oder mit den genannten Konzentrationen bestimmt. Staurosporin (STS; 1 µM) diente als Positivkontrolle. Für die Darstellung wurden die behandelten Zellen auf die jeweils unbehandelten normalisiert. Die Graphen repräsentieren eine Zusammenfassung von drei unabhängigen Experimenten jeweils in Dreifach-Werten (Mittelwert ± SEM; **: p<0.01; ***: p<0.001; 1-way-ANOVA).

Für die weiteren Analysen wurde die immortalisierte humane Endothelzellenlinie EA.hy 926 verwendet. Da diese widerstandsfähiger als die primären Zellen sind und höhere Konzentrationen sowie Dauer der Behandlung benötigen, wurden diese Parameter angepasst und die Caspase-3/7-Aktivitätsmessungen wiederholt (Abbildung 5-2). Abbildung 5-2b und c zeigen einen deutlichen Anstieg der Caspase-3/7-Aktivität 48 und 72 Stunden nach der Behandlung mit 50 µg/ml Elastase, wohingegen 20 µg/ml weitestgehend sublethal über die drei Tage blieb. Somit induzierten Elastase-Konzentrationen von ≥30 µg/ml die Apoptose von Endothelzellen. Dieses Resultat wurde mit zwei weiteren unabhängigen Methoden bestätigt. Die eine Methode basierte auf der Untersuchung apoptotischer DNA-Doppelstrangbrüche mittels eines TUNEL-Kits, welche im konfokalen Lasermikroskop analysiert wurden (siehe 4.1.10, Abbildung 5-3a). In der prozentualen Auswertung mehrerer Experimente konnte nach 48 Stunden in den Elastase-behandelten Endothelzellen (30 µg/ml und 40 µg/ml) im Vergleich zu den naiven Zellen ein deutlicher Anstieg der Doppelstrangbrüche beobachtet werden (Abbildung 5-3b). Dies spricht für einen apoptotischen Signalweg und gegen einen nekrotischen. Eine weitere Methode zur Analyse des Elastase-induzierten Zelltodes erfolgte in Anlehnung an Riccardi *et al.*¹¹⁰ mittels des

sogenannten SubG1 Assay am FACS (siehe 4.1.8 und Abbildung 5-4a). Die Detektion der toten Zellen erfolgte nach Elastase-Behandlung mit Hilfe eines Propidiumiodid (PI)-Farbstoffes, welcher in die DNA interkaliert. Durch diese PI Farbstoff Markierung kann die untersuchte Zellsuspension in die Zellzyklusstadien G₀/G₁, G₂/M und S sowie die apoptotischen Sub-G₁ Stadien eingeteilt werden. Abbildung 5-4b zeigt, dass eine Inkubation mit 50 µg/ml Elastase einen zeitabhängigen Anstieg der PI-positiven Zellen und somit



apoptotischen Zelltod hervorrief.

Abbildung 5-2: Elastase induziert eine Caspase-3/7-Aktivierung in immortalisierten humanen Endothelzellen. EA.hy 926-Zellen wurden mit den angegebenen Konzentrationen an Elastase für 24 h (a) 48 h (b) und 72 h (c) behandelt und auf ihre Caspase-3/7-Aktivität untersucht. Staurosporin (STS; 1 µM, 24 h) diente als Positivkontrolle. Für die Darstellung

Ergebnisse

wurden die behandelten Zellen auf die jeweils unbehandelten normalisiert. Die Graphen repräsentieren eine Zusammenfassung von drei unabhängigen Experimenten jeweils in Dreifach-Werten (Mittelwert \pm SEM; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ ***: $p < 0.001$; 1-way-ANOVA).

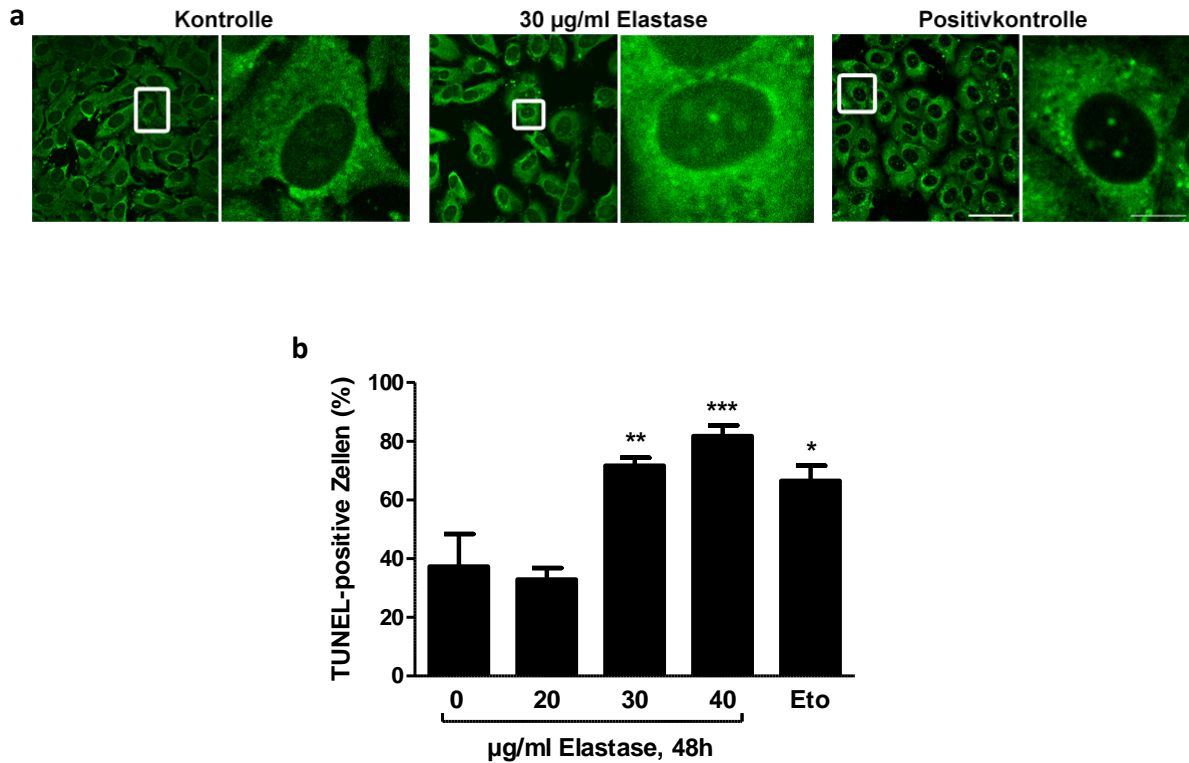
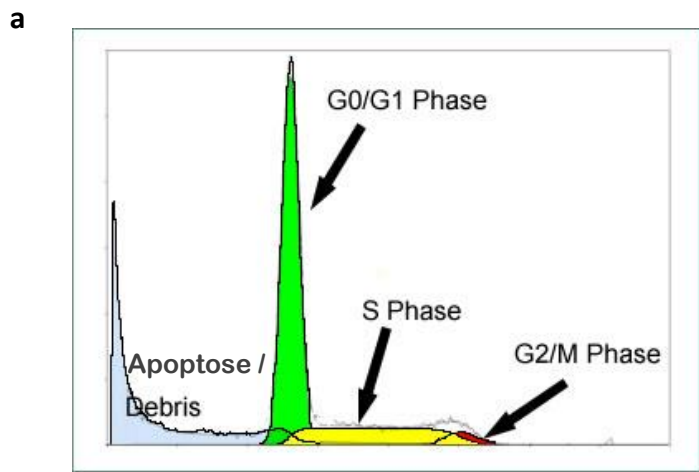


Abbildung 5-3: Elastase induziert Doppelstrangbrüche in EA.hy 926-Zellen. (a) EA.hy 926-Zellen wurden 48 h mit den angegebenen Konzentrationen an Elastase oder Etoposid (Eto, 1 μM , 24 h, Positivkontrolle) behandelt. Anschließend wurden die DNA-Doppelstrangbrüche mit dem *ApopTag*[®] Peroxidase *In Situ* Apoptosis Detection Kit sichtbar gemacht und die Zellen unter einem konfokalen Lasermikroskop analysiert. Die Gesamtzellzahl wurde bestimmt und die positiv-markierten Zellen ins Verhältnis gesetzt. Markierte Bereiche der Zellen wurden jeweils rechts daneben vergrößert dargestellt (Skalierung in Übersicht = 50 μm , Skalierung in Detailansicht = 10 μm). Die Abbildung repräsentiert jeweils einen von fünf unabhängigen Versuchen, welche in (b) zusammengefasst sind. (Mittelwert \pm SEM; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ ***: $p < 0.001$; 1-way-ANOVA).



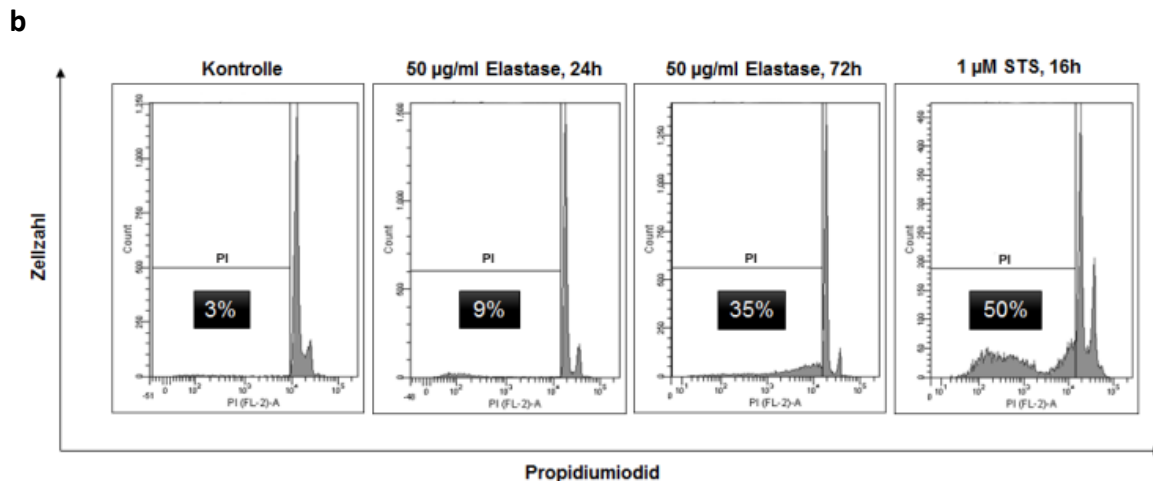


Abbildung 5-4: EA.hy 926-Zellen weisen nach Elastase-Behandlung eine erhöhte Zelltodrate auf. (a) Schematische Darstellung eines SubG1 Histogramms (Quelle: Phoenix Flow Systems, CA, USA). (b) Für den SubG1 Assay wurden EA.hy 926-Zellen für unterschiedliche Zeiten mit Elastase (50 µg/ml) oder Staurosporin (STS, 1 µM, 16 h, Positivkontrolle) behandelt, mit Propidiumiodid (PI) gefärbt und am FACSCanto™ II analysiert. Vor dem großen Peak befinden sich die PI-positiven Zellen. Die Abbildung repräsentiert jeweils einen von vier unabhängigen Versuchen.

Somit legen drei unabhängige experimentelle Ansätze nahe, dass humane neutrophile Elastase Endothelzell-Apoptose induziert. Die nachfolgenden Untersuchungen analysierten die Spezifität des Prozesses, indem die Induktion von Autophagie, Nekrose und Nekroptose geprüft wurden.

5.1.2 Elastase induziert Autophagie in humanen Endothelzellen

Autophagie ist ein vorwiegend zellprotektiver Signalweg, welcher jedoch bei andauernder Stimulation den Zelltod verursachen kann¹¹⁶. Ob der durch Elastase ausgelöste Zelltod eine autophagische Komponente enthält, wurde anschließend in Endothelzellen untersucht. Während der Doppelmembranbildung der Autophagosomen wird das Protein LC3 exprimiert und im Laufe der Vakuolenschließung von LC3-I zu LC3-II prozessiert⁹⁰. Folglich dokumentiert die LC3-I zu LC3-II Konversion die Induktion der Autophagie. Dieses Protein wurde in EA.hy 926-Zellen nach 24-stündiger Behandlung mit Elastase mittels eines LC3-II-PE gekoppelten Antikörpers im FACS detektiert (siehe 4.1.9, Abbildung 5-5a). Die quantitative Auswertung mehrerer Experimente zeigte einen signifikanten Anstieg des LC3-II-Proteins nach der Behandlung mit 50 µg/ml Elastase (Abbildung 5-5b). Als Ergänzung zur eben beschriebenen Methode wurde ein *Cyto-ID*® Autophagy Detection Kit verwendet. Die

Untersuchung autophagischer Aktivität in lebenden Zellen erfolgte ebenfalls mittels FACS (Abbildung 5-5c). Auch hier zeigte die prozentuale Auswertung einen starken Anstieg der autophagischen Aktivität 48 Stunden nach einer Behandlung mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Elastase (Abbildung 5-5d). Diese Resultate zeigen, dass Elastase-exponierte Endothelzellen ebenfalls Autophagie induzieren.

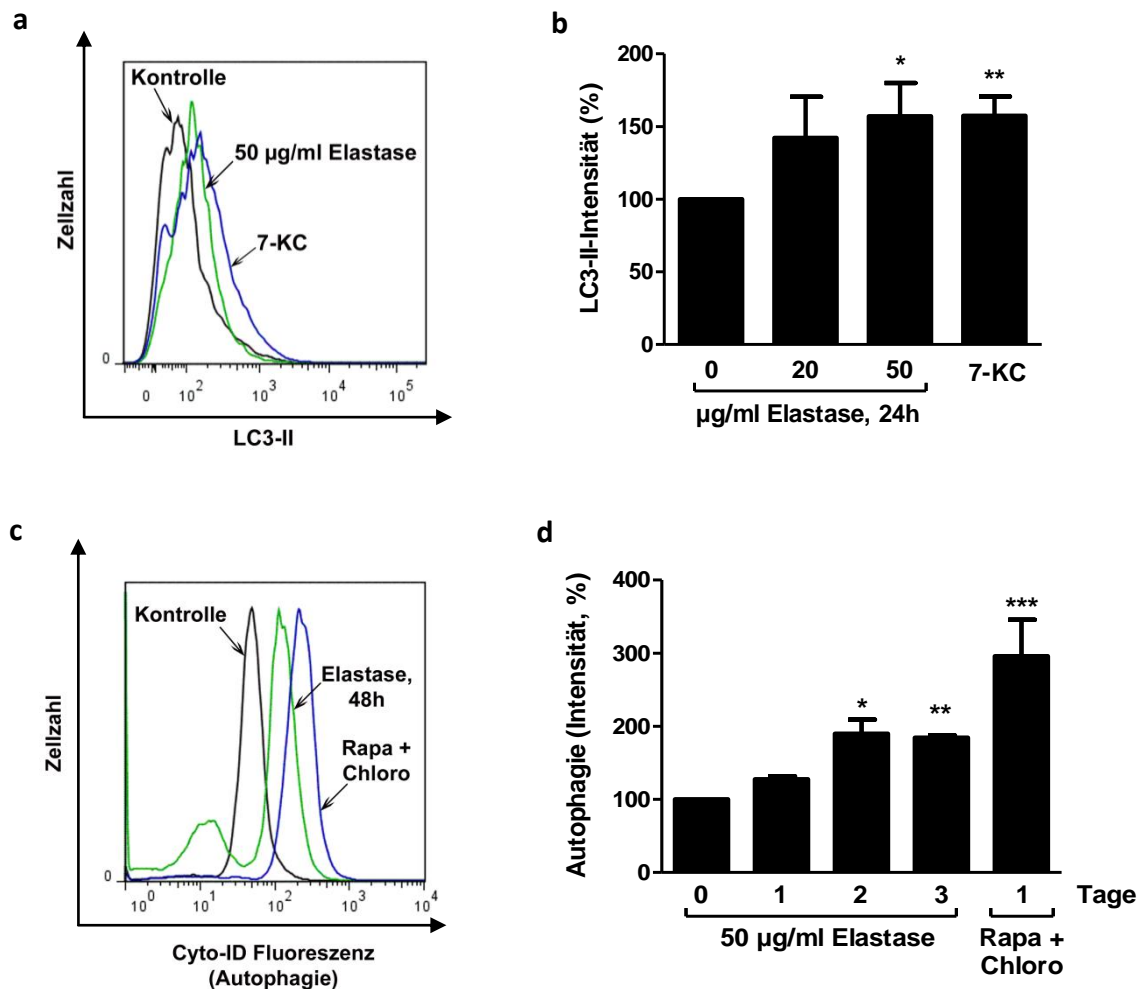


Abbildung 5-5: Elastase induziert Autophagie in EA.hy 926-Zellen. (a) Die genannten Zellen wurden für 24 h mit Elastase (20 oder 50 $\mu\text{g/ml}$) oder 7-Ketocholesterol (7-KC, 10 $\mu\text{g/ml}$, 16 h; Positivkontrolle) behandelt, mit einem LC3-II-PE konjugiertem Antikörper angefärbt und anschließend im *FACSCanto™* II (Ex / Em = 488 / 575 nm) detektiert. Hierbei repräsentiert die Abbildung eine von drei unabhängigen Experimenten, welche in (b) zusammengefasst sind. (c) EA.hy 926-Zellen wurden für die oben genannten Zeiten mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Elastase behandelt. Eine Kombination aus Rapamycin (Rapa, 500 nM) und Chloroquin (Chloro, 10 μM) für 24 h diente als Positivkontrolle. Anschließend wurden die Zellen mit einem *Cyto-ID®* Fluoreszenzfarbstoff (Enzo, *Autophagy Detection Kit*) angefärbt und im *FACSCanto™* II (Ex / Em = 463 / 534 nm) detektiert. Die Abbildung repräsentiert eins von vier unabhängigen Experimenten, welche in (d) zusammengefasst sind. Für die Quantifizierungen wurden die behandelten Zelllinien auf die jeweils unbehandelten normalisiert und die naiven als 100 % dargestellt. In den Experimenten wurden jeweils 10.000 Zellen gemessen (Mittelwert \pm SEM; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$ ***: $p < 0.001$; 1-way-ANOVA).

5.1.3 Nekrose und Nekroptose sind beim endothelialen Zelltod nicht beteiligt

Bei der Nekrose kommt es zu einem unkontrollierten Freisetzen intrazellulärer Bestandteile durch Desintegration der Plasmamembran. Dies wirkt stark pro-inflammatorisch und stellt einen zur Apoptose grundsätzlich unterschiedlichen Zelltod dar. Um diese Art des Zelltodes zu untersuchen wurde die Zytotoxizität der Elastase anhand der Aktivität des Enzyms Laktatdehydrogenase (LDH) im Zellüberstand bestimmt, ein zytoplasmatisches Protein, welches nur bei Schädigung der Zellmembran in den Zellüberstand übergehen kann. In EA.hy 926-Zellen wurde nach Behandlung mit Elastase die Zytotoxizität gemessen und auf die Aktivität der gesamten, in den Zellen vorhandenen Laktatdehydrogenase bezogen (siehe 4.1.6, Abbildung 5-6). Dadurch ist die Laktatdehydrogenase-Aktivität im Überstand zum Anteil der toten Zellen proportional. Auch nach dreitägiger Elastase-Behandlung war keine Freisetzung des LDH-Proteins zu beobachten und somit auch keine Nekrose induziert.

Des Weiteren wurde die Nekroptose, definiert als RIP3-abhängige regulierte Nekrose, mit Hilfe des selektiven nicht-apoptotischen Inhibitors, Necrostatin-1 untersucht. Dieser allosterische Inhibitor blockiert das für die Nekroptose essentielle RIPK1 (*receptor-interacting protein kinase 1*). Hierfür wurden die Endothelzellen mit Necrostatin-1 vorbehandelt, anschließend mit Elastase inkubiert und Caspase-3/7 bzw. SubG1 als *read-out* benutzt. Sollte die Nekroptose im Elastase-induzierten, endothelialen Zelltod involviert sein, würde in den Necrostatin-1 behandelten Zellen eine reduzierte Caspase-3/7-Aktivität bzw. eine geringere Zelltodrate zu erwarten sein. Jedoch konnte in beiden unabhängigen experimentellen Ansätzen weder eine veränderte Caspase-3/7-Aktivität (Abbildung 5-7a) noch eine verminderte Zelltodrate beobachtet werden (Abbildung 5-7b). Der Inhibitor selbst hatte keinen Einfluss auf die Zellen (Abbildung 5-8). Insgesamt können für den Elastase-induzierten Zelltod somit Nekrose und Nekroptose ausgeschlossen werden.

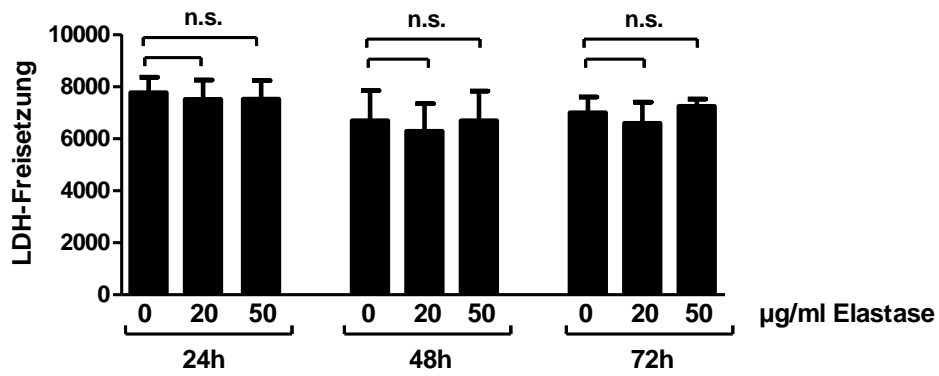


Abbildung 5-6: Elastase führt nicht zur Freisetzung von Lactatdehydrogenase (LDH). EA.hy 926-Zellen wurden für 24 h, 48 h und 72 h mit den oben genannten Konzentrationen an Elastase behandelt und das freigesetzte LDH wurde mit Hilfe des *CytoTox-ONE™* Reagenzes im Medium nachgewiesen. Die Graphen zeigen jeweils eine Zusammenfassung von drei unabhängigen Experimenten (Mittelwert ± SEM; n.s.: $p > 0.05$; 1-way-ANOVA).

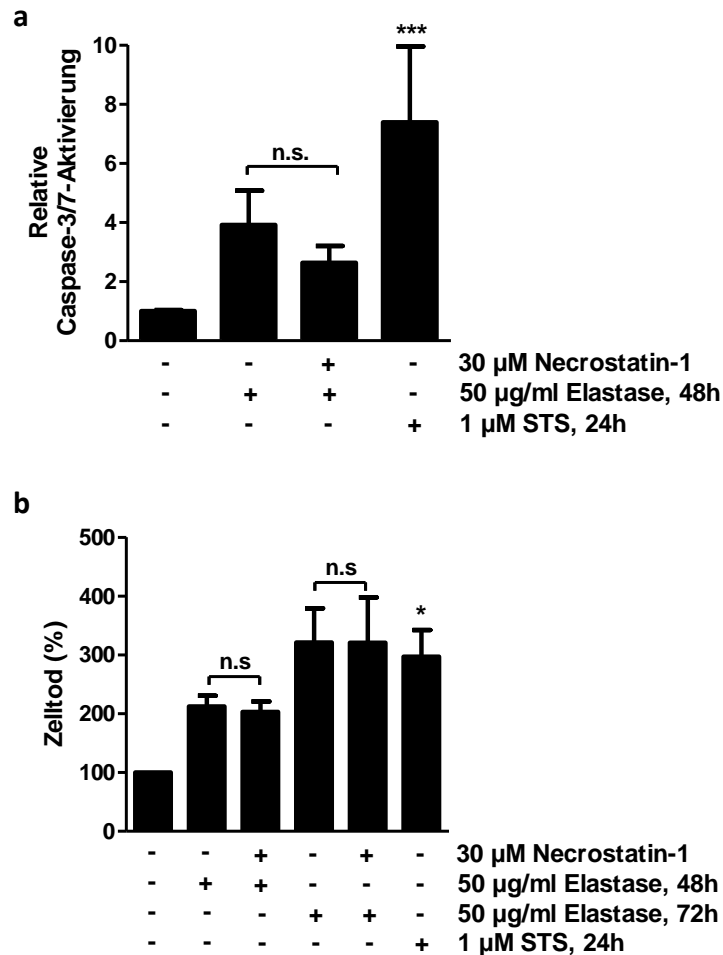


Abbildung 5-7: Necrostatin-1 verhindert nicht den Elastase-induzierten Zelltod. EA.hy 926-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit Elastase (50 µg/ml) mit oder ohne Necrostatin-1 (30 µM) und Staurosporin (STS, 1 µM, 24 h, Positivkontrolle) behandelt und die Caspase-3/7-Aktivität (**a**) als auch der Zelltod mittels SubG1 Assay im *FACSCanto™ II* wurde bestimmt (**b**). Für die Darstellungen wurden die behandelten Zellen auf die jeweils unbehandelten normalisiert. Die Graphen repräsentieren eine Zusammenfassung von drei unabhängigen Experimenten (Mittelwert ± SEM; n.s.: $p > 0.05$; *: $p < 0.05$; ***: $p < 0.001$; 1-way-ANOVA).

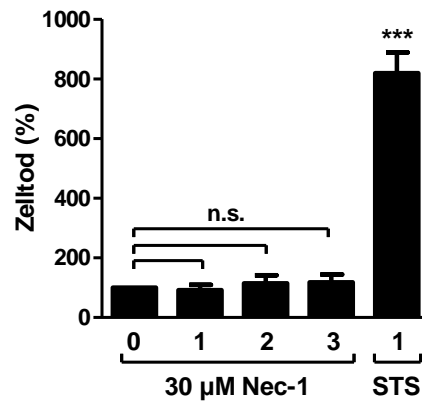


Abbildung 5-8: Necrostatin-1 alleine hat keinen Einfluss auf die Endothelzellen. EA.hy 926-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit Necrostatin-1 (Nec-1; 30 µM) oder Staurosporin (STS, 1 µM, 24 h, Positivkontrolle) behandelt und der Zelltod mittels SubG1 Assay im *FACSCanto™* II bestimmt. Für die Darstellungen wurden die behandelten Zellen auf die jeweils unbehandelten normalisiert und die naiven als 100 % dargestellt. Die Graphen repräsentieren eine Zusammenfassung von drei unabhängigen Versuchen (Mittelwert ± SEM; n.s.: $p > 0.05$; ***: $p < 0.001$; 1-way-ANOVA).

5.1.4 Elastase aktiviert den Stress-Signalweg *unfolded protein response* (UPR)

Anschließend wurde zur Charakterisierung des intrazellulären Signalweges des Elastase-induzierten Zelltodes der endoplasmatische Retikulum (ER)-Stress Signalweg UPR (*unfolded protein response*) untersucht, da dieser bekanntermaßen eng mit Atherosklerose und der Plaquestabilität assoziiert ist^{45,41,46,30}. Von den drei UPR-Transmembranrezeptoren IRE1 (*inositol-requiring enzyme 1*), ATF6 (*activating transcription factor 6*) und PERK (*protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase*) ist lediglich letzterer durch freies Cholesterin induzierbar³⁷ und endet in der Apoptose. Dies wiederum spielt in der Atherosklerose eine wichtige Rolle und war Grund den Fokus dieser Arbeit auf diesen Rezeptor mit nachgeschaltetem Signalweg zu legen (Abbildung 5-9).

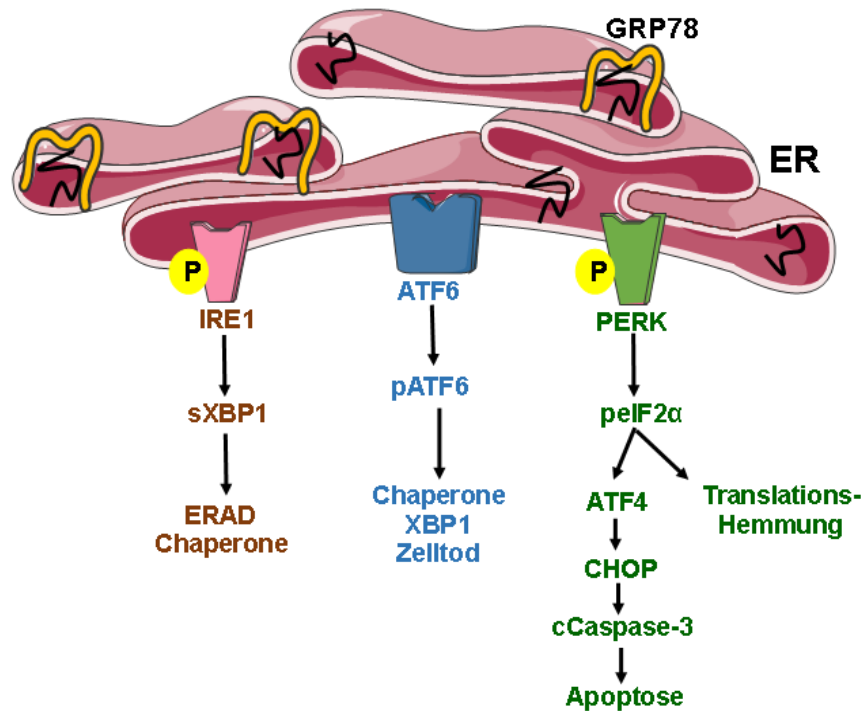


Abbildung 5-9: Schematische Darstellung des UPR (*unfolded protein response*) Signalweges. ER-Stress kann die ER-Transmembran-Sensoren IRE1, ATF6 und PERK aktivieren. Eine Störung der Ca^{2+} -Homöostase, oxidativer Stress, Lipidüberladung oder ungefaltete Proteine sind auslösende Faktoren für die Aktivierung des ER-Stress Signalweges UPR. IRE1 führt zum Spleißen der XBP1-mRNA (*spliced* XBP1, sXPB1) und zur Aktivierung von Chaperonen sowie von Proteindegradierungsprozessen. ATF6 wird durch Prozessierung (pATF6) aktiviert und induziert ebenfalls Chaperone und XBP1, was bei anhaltendem Stress zum Zelltod führen kann. PERK phosphoryliert eIF2a (phospho-eIF2a) und induziert den Transkriptionsfaktor ATF4. Im Zellkern führt der ER-Stress-Signalweg zur CHOP-Expression, gefolgt von der Apoptose.

Die Aktivierung von PERK stellt sich durch eine Phosphorylierung dar. Diese wurde anhand der Proteinphosphorylierung im konfokalen Lasermikroskop (CLSM) untersucht. Hierfür wurde zunächst die Spezifität des verwendeten Antikörpers untersucht, welcher gegen das phosphorylierte Protein gerichtet war. Dazu wurden EA.hy 926-Zellen mit Tunicamycin, welches den UPR-Stress-Signalweg aktiviert, mit oder ohne Vorbehandlung mit alkalischer Phosphatase und Lambda-Phosphatase inkubiert und anschließend im konfokalen Lasermikroskop analysiert (siehe 4.1.11). Wie Abbildung 5-10 zeigt, führte die PERK-Dephosphorylierung durch die Vorbehandlung mit den Phosphatasen zu einem Ausbleiben der Erkennung durch den anti-phospho-PERK Antikörper. Dies belegt die Spezifität des Antikörpers gegen phosphoryliertes PERK.

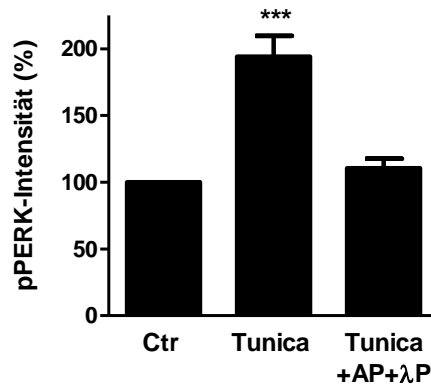


Abbildung 5-10: Spezifität des anti-phospho-PERK Antikörpers. EA.hy 926-Zellen wurden nach dem Fixieren in 4 % PFA für 30 min mit 10 µg/ml Tunicamycin (Tunica) mit oder ohne Vorbehandlung mit alkalischer Phosphatase (AP, 60 min) und Lambda Phosphatase (λP, 30 min) behandelt und mit einem primären Antikörper gegen humanes pPERK (sekundärer Antikörper Alexa Fluor® 488) gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DRAQ5 angefärbt. Anschließend wurden die Zellen unter einem konfokalen Lasermikroskop analysiert (Daten nicht gezeigt) und quantifiziert. Der Graph zeigt die Zusammenfassung von zwei unabhängigen Experimenten mit insgesamt jeweils 45 Einzelwerten. Für die Darstellungen wurden die behandelten Zellen auf die jeweils unbehandelten (Ctr) normalisiert und die naiven als 100 % dargestellt (Mittelwert ± SEM; ***: $p < 0.001$; 1-way-ANOVA).

Anschließend wurde geprüft, ob Elastase die endotheliale PERK-Phosphorylierung induziert. Hierfür wurden die Endothelzellen für verschiedene Zeiten mit Elastase (20 und 50 µg/ml) oder Tunicamycin als Positivkontrolle behandelt, fixiert und mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen pPERK und einem Kernmarker-Farbstoff gefärbt. Anschließend wurden die Zellen mit einem konfokalen Lasermikroskop analysiert (Abbildung 5-11a), wobei stets identische Einstellungen benutzt wurden, um die Vergleichbarkeit unterschiedlicher Proben zu gewährleisten. In unbehandelten Zellen war das grün gefärbte pPERK schwach im gesamten Cytosol verteilt, wohingegen nach einer Behandlung mit Elastase oder Tunicamycin die Intensität zunahm. Die Quantifizierung zeigte bereits einen signifikanten Anstieg der PERK-Phosphorylierung nach 30-minütiger Behandlung mit Elastase bzw. der Positivkontrolle (Abbildung 5-11b). Da aktives PERK nachfolgend den Transkriptionsfaktor eIF2α durch Phosphorylierung inaktiviert, wurde dieser Prozess durch Western Blot Analysen untersucht. Die Behandlung der Endothelzellen mit Elastase (20 µg/ml) für verschiedene Zeiten zeigte nach ca. 7 Stunden ein Anstieg des phosphorylierten eIF2α (Abbildung 5-12). Auch die mRNA-Expression von sXBP1 (*spliced X-box binding protein 1*) und des UPR-Chaperons GRP78 wurden untersucht, welche einer Aktivierung der PERK-parallelen Signaltransduktoren IRE1 bzw. ATF6 nachgeschaltet sind. Hierfür wurden EA.hy 926-Zellen für verschiedene Zeiten mit Elastase behandelt und die mRNA-Expressionen mittels quantitativer *real-time* RT-PCR (qRT-PCR) ermittelt (siehe 4.2.4, Abbildung 5-13a und b). In den Endothelzellen nahm die sXBP1- und GRP78-mRNA zwar über die Zeit zu, war aber

erst nach drei Tagen signifikant. Western Blot Analysen bestätigten einen Anstieg der Expression auf Proteinebene (Abbildung 5-13c).

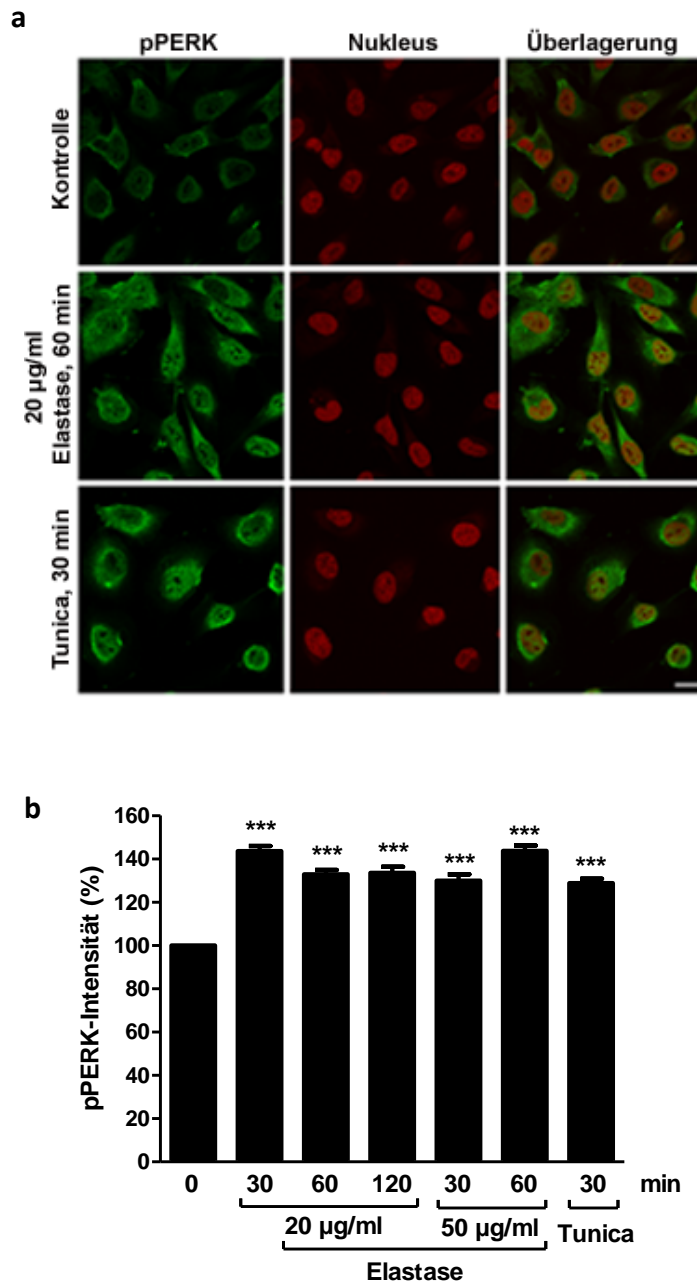


Abbildung 5-11: Elastase induziert die Phosphorylierung und Aktivierung von PERK. (a) Naive EA.hy 926-Zellen wurden für die oben angegebenen Zeiten und Konzentrationen an Elastase oder Tunicamycin (Tunica, 10 µg/ml, 30 min, Positivkontrolle) behandelt, mit 4 % PFA fixiert und mit einem primären Antikörper gegen humanes pPERK (grün, sekundärer Antikörper Alexa Fluor® 488) gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DRAQ5 gefärbt (in rot dargestellt). Anschließend wurden die Zellen unter einem konfokalen Lasermikroskop analysiert (Skalierung = 200 µm). Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen, welche in **(b)** zusammengefasst sind. Die Intensität des pPERK Signals (grün) ist ein Maß der PERK-Aktivierung. Für die Quantifizierungen wurden die behandelten Zellen auf die unbehandelten normalisiert und die naiven als 100 % dargestellt (Mittelwert ± SEM; ***: $p < 0.001$; 1-way-ANOVA).

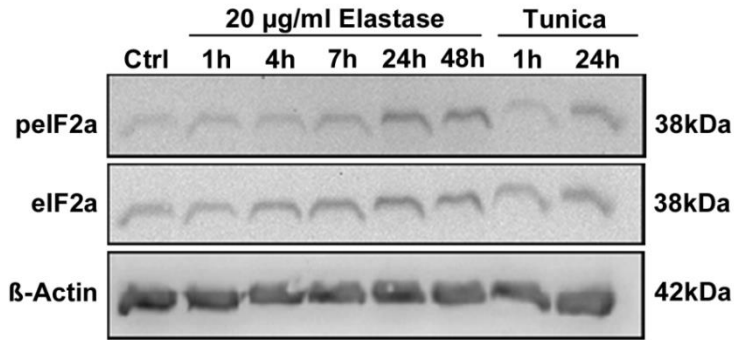


Abbildung 5-12: Elastase induziert die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors eIF2α in Endothelzellen. EA.hy 926-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit Elastase oder Tunicamycin (Tunica, 10 µg/ml, Positivkontrolle) behandelt. Die Zellysate wurden durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Proteine (je 70 µg) mittels Western Blot die phospho-eIF2α (pEIF2α)- und eIF2α-Expression untersucht. β-Actin dient als Ladekontrolle. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Versuchen.

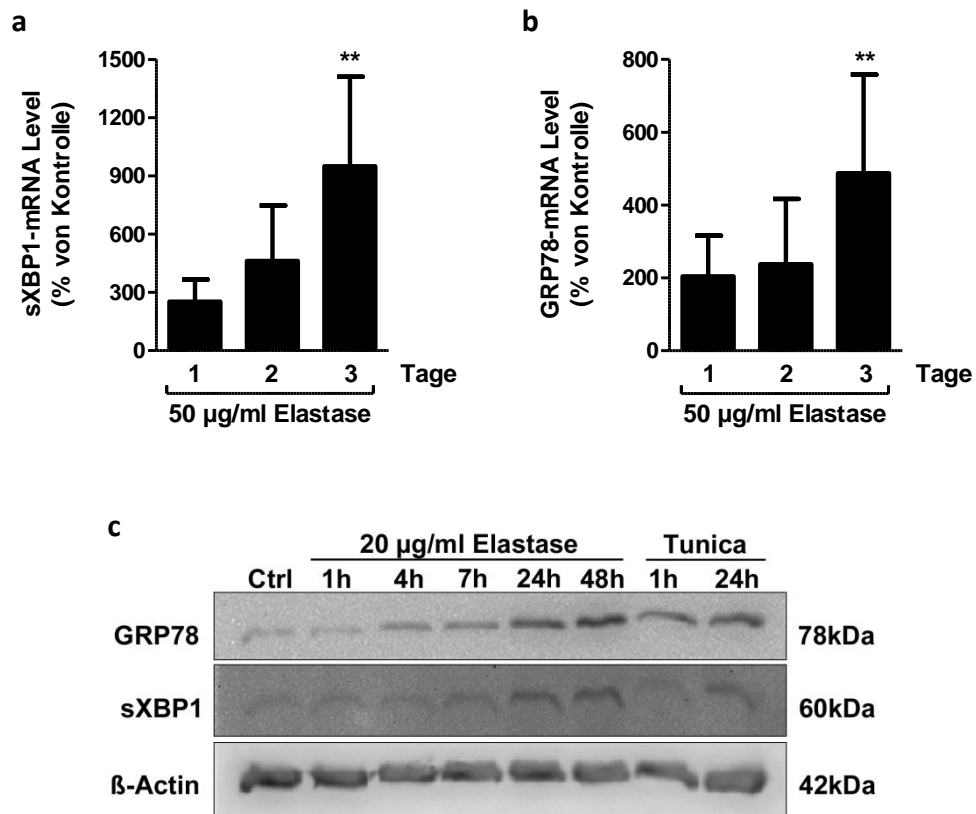


Abbildung 5-13: Elastase induziert die Expression von sXBP1 und GRP78 in EA.hy 926-Zellen. EA.hy 926-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit Elastase (50 µg/ml) behandelt und anschließend mittels qRT-PCR auf *spliced* XBP1 (sXBP1)- (a) und GRP78-mRNA Expression (b) analysiert, während GAPDH zur Normalisierung der Expression diente. Für die Darstellungen wurden die unbehandelten Zellen (nicht gezeigt) als 100 % angenommen und die behandelten Zellen auf diese normalisiert. Die Graphen zeigen eine Zusammenfassung von drei unabhängigen Experimenten (Mittelwert ± SEM; **: p<0.01; 1-way-ANOVA). (c) Die oben genannten Zellen wurden zusätzlich mittels Western Blot auf die sXBP1- und GRP78-Expression untersucht. β-Actin dient als Ladekontrolle. Tunicamycin (Tunica, 1 µg/ml, 1 h und 24 h) diente als Positivkontrolle. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen.

Lang-anhaltende Aktivierung des UPR induziert die Expression des pro-apoptotischen Proteins CHOP. Da CHOP normalerweise eine kurze Halbwertszeit besitzt, zeigt eine Zunahme der Expression ein Andauern des Stresses bzw. den Übergang in eine pro-apoptotische Situation an ¹¹⁷. Daher wurde im Folgenden analysiert, ob Elastase die CHOP-Expression beeinflusst. Hierfür wurden EA.hy 926-Zellen für verschiedene Zeiten mit Elastase oder mit Tunicamycin (Positivkontrolle) behandelt. Die qRT-PCR-Analyse zeigte einen zeitabhängigen Anstieg der CHOP-mRNA nach Elastase-Behandlung in EA.hy 926-Zellen (Abbildung 5-14a und b). Konform mit diesen Ergebnissen konnte auch eine Zunahme des pro-apoptotischen CHOP nach Behandlung mit Elastase in Western Blot Analysen bestätigt werden (siehe 4.3.4 und Abbildung 5-14c). Zur weiteren Untersuchung der CHOP-Expression, aber auch der Kollokalisierung mit eintretender Apoptose, wurde eine Immunfluoreszenzdoppelfärbung herangezogen. Hierfür wurden die Endothelzellen für verschiedene Zeiten mit Elastase oder Tunicamycin und Staurosporin (Positivkontrolle) behandelt, fixiert und mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper gegen CHOP und einem gegen cCaspase-3, sowie einem Kernmarker-Farbstoff gefärbt. Anschließend wurden die Zellen mit einem konfokalen Lasermikroskop analysiert (siehe 4.1.11, Abbildung 5-15a). In unbehandelten Zellen war das grün gefärbte CHOP und die orange gefärbte cCaspase-3 schwach im gesamten Cytosol verteilt, wohingegen nach einer Behandlung mit Elastase oder der Positivkontrolle die Intensitäten deutlich zunahmten. Die dazugehörigen Quantifizierungen zeigten einen signifikanten Anstieg der CHOP-Intensität nach 24 Stunden und der cCaspase-3 nach zwei Tagen (Abbildung 5-15b und c).

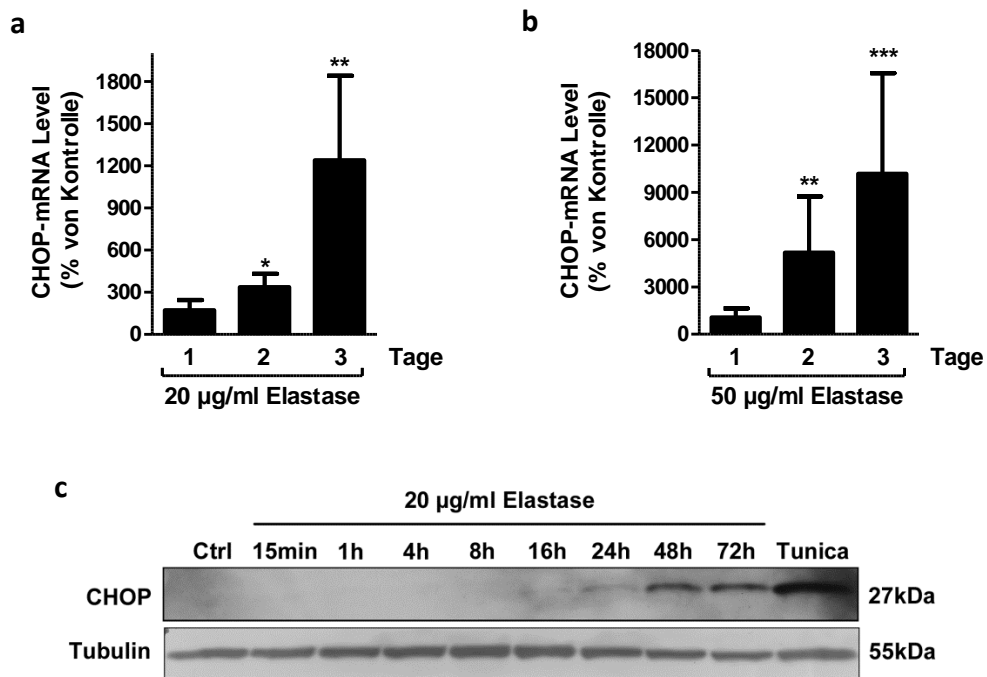


Abbildung 5-14: Elastase induziert pro-apoptisches CHOP in Endothelzellen. EA.hy 926-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit 20 µg/ml Elastase **(a)** und 50 µg/ml Elastase **(b)** behandelt und mittels qRT-PCR auf die CHOP-mRNA Expression untersucht. GAPDH diente hierbei zur Normalisierung der Expression. Für die Darstellungen wurden die unbehandelten Zellen (Kontrolle, nicht gezeigt) als 100 % angenommen und die behandelten Zellen auf diese normalisiert. Die Graphen zeigen eine Zusammenfassung von je drei unabhängigen Experimenten (Mittelwert ± SEM; *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001; 1-way-ANOVA). **(c)** Die oben genannten Zellen wurden zusätzlich mittels Western Blot auf die CHOP-Expression untersucht. α-Tubulin diente als Ladekontrolle. Tunicamycin (Tunica, 10 µg/ml, 8 h) diente als Positivkontrolle. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängigen Versuchen.

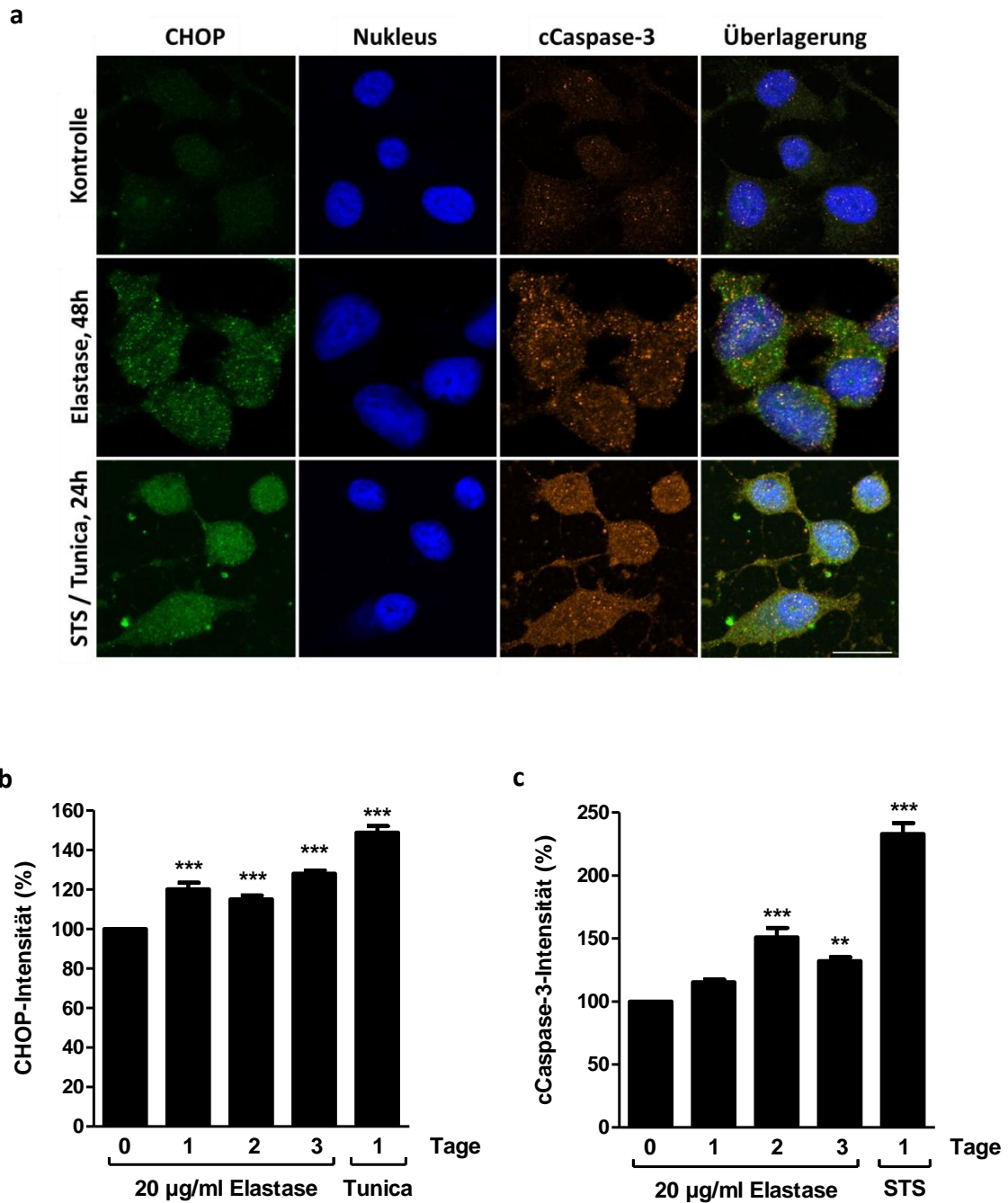


Abbildung 5-15: Erhöhte CHOP- und cCaspase-3-Intensität in EA.hy 926-Zellen nach Elastase-Behandlung. Immunfluoreszenzdoppelfärbung von humanem CHOP (grün, sekundärer Antikörper Cy3) und cCaspase-3 (orange, Alexa Fluor® 488 konjugiert) in naiven EA.hy 926-Zellen. Diese wurden zuvor für die angegebenen Zeiten mit Elastase (20 µg/ml) behandelt und eine Inkubation mit Tunicamycin (Tunica, 10 µg/ml) und Staurosporin (STS, 5 µM) für 8h diente als Positivkontrolle. Die Zellkerne wurden mit DRAQ5 gefärbt (in blau dargestellt). Anschließend wurden die Zellen unter einem konfokalen Lasermikroskop analysiert (Skalierung = 100 µm). Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten, welche in **(b)** und **(c)** zusammengefasst sind. Für die Quantifizierungen wurden die behandelten Zellen auf die unbehandelten normalisiert und die naiven als 100 % dargestellt (Mittelwert ± SEM; *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001; 1-way-ANOVA).

5.1.5 Der *Knockdown* von CHOP verhindert den Elastase-induzierten Zelltod

Nachfolgend wurde geprüft, ob das CHOP Protein essentiell für die Elastase-induziert Endothelzell-Apoptose ist. Zunächst wurde die Effizienz des *Knockdowns* von CHOP untersucht. Hierfür wurde CHOP in EA.hy 926-Zellen durch RNA-Interferenz herunter reguliert oder die Zellen mit einer unspezifischen Kontroll-siRNA behandelt und anschließend die mRNA-Expression untersucht (siehe 4.1.4 und 4.2.4). Abbildung 5-16a (Kontrolle) zeigt eine etwa 75 %-ige Herabregulation in Zellen mit CHOP-siRNA im Vergleich zu Kontroll-siRNA behandelten Zellen unter basalen Bedingungen. Anzumerken ist jedoch, dass ungestresste Zellen eine ohnehin sehr marginale CHOP-mRNA Expression aufweisen. Wurden Endothelzellen nach der RNA-Interferenz zusätzlich mit Elastase oder Tunicamycin (Positivkontrolle) behandelt, zeigten die Kontrollen erwartungsgemäß eine Zunahme der CHOP-mRNA Expression, wohingegen dies in den CHOP-siRNA behandelten Zellen um ≥ 90 % gesenkt wurde (Abbildung 5-16a). Der effiziente *Knockdown* von CHOP zeigte sich ebenfalls in einem parallel durchgeführten Western Blot (Abbildung 5-16b). Hier war nach Tunicamycin-Behandlung in den CHOP-defizienten Zellen, im Gegensatz zu den Zellen mit der Kontroll-siRNA, keine CHOP-Induktion zu verzeichnen.

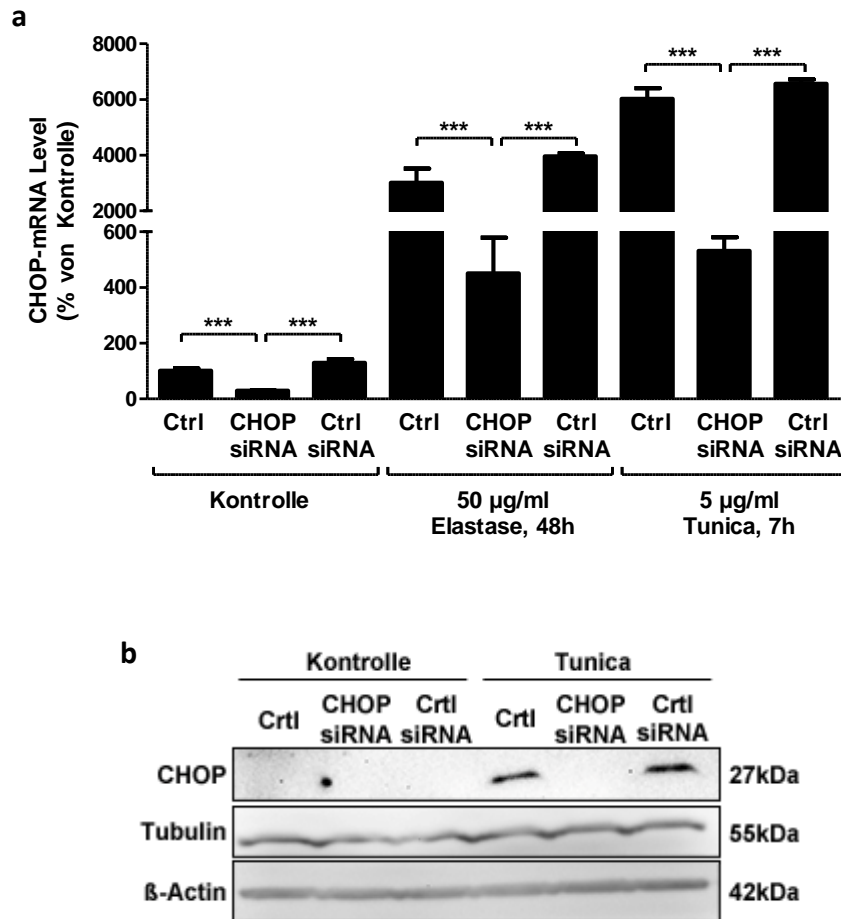


Abbildung 5-16: Herunterregulation von CHOP durch siRNA verringert dessen Induktion / Expression nach Elastase-Behandlung. (a) EA.hy 926-Zellen wurden 24 h nach der Transfektion mit CHOP / unspezifischer Kontroll-siRNA (Ctrl siRNA) für zwei Tage mit 50 µg/ml Elastase oder Tunicamycin (5 µg/ml, 7 h, Positivkontrolle) behandelt und anschließend mittels qRT-PCR auf ihre CHOP-mRNA Expression untersucht. GAPDH und β-Actin dienten hierbei zur Normalisierung der Expression. Für die Darstellungen wurden die unbehandelten Zellen (Kontrolle) als 100 % angenommen und die behandelten Zellen auf diese normalisiert. Die Graphen zeigen eine Zusammenfassung von je zwei unabhängigen Versuchen (Mittelwert ± SEM; ***: $p < 0.001$; 1-way-ANOVA). **(b)** Die eben genannten Zellen wurden nach der Transfektion mit siRNA und Behandlung mit Elastase zusätzlich mittels Western Blot (150 µg Protein) mit Antikörpern gegen CHOP, α-Tubulin und β-Actin (interne Kontrollen) auf ihre CHOP-Expression untersucht. Tunicamycin (Tunica, 5 µg/ml, 24 h) diente als Positivkontrolle. Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Ergebnis.

Anschließend wurde untersucht, ob der CHOP-Knockdown den Elastase-induzierten Zelltod verhindern kann. Hierfür wurde CHOP in EA.hy 926-Zellen durch RNA-Interferenz herunter reguliert oder die Zellen mit einer unspezifischen Kontroll-siRNA behandelt. Anschließend folgte eine Elastase-Behandlung und der Zelltod wurde nach 48 Stunden mittels Caspase-3/7-Aktivität, sowie SubG1 Assay im FACS analysiert (siehe 4.1.6 und 4.1.8). Die CHOP-Defizienz verhinderte die Elastase-induzierte Apoptose in den Endothelzellen. Dies zeigte sich durch eine signifikante Unterdrückung in der Caspase-3/7-Aktivität und geringeren Zelltodrate in Zellen mit CHOP-siRNA im Vergleich zu Zellen mit unspezifischer Kontroll-siRNA (Abbildung 5-17a und b). Des Weiteren wurde der intrazelluläre ATP-Gehalt nach dem

RNAi-vermittelten *Knockdown* und nach gleichzeitiger Behandlung mit Elastase bestimmt (siehe 4.1.6). Auch hier zeigte sich, dass die CHOP-Herunterregulation den ATP-Gehalt nicht veränderte und den Elastase-induzierten Zelltod nicht verstärkte (Abbildung 5-18).

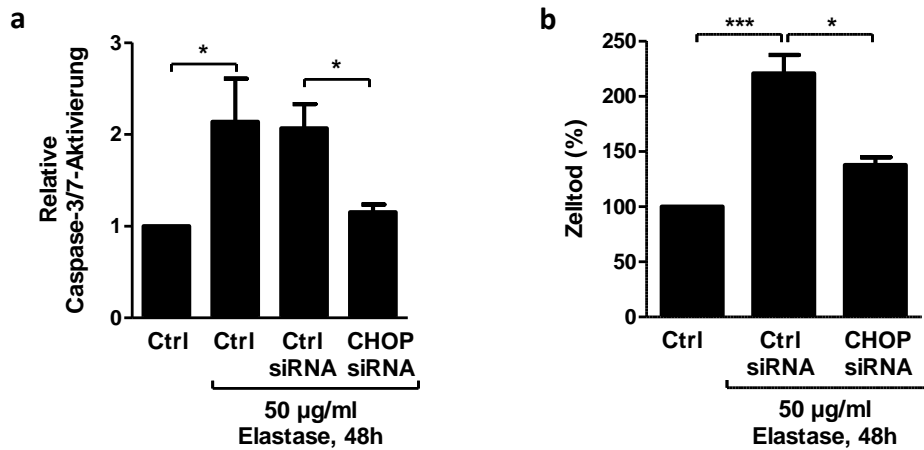


Abbildung 5-17: Eine CHOP-Defizienz in EA.hy 926-Zellen verhindert Elastase-induzierten Zelltod. 24 h nach Transfektion mit CHOP bzw. unspezifischer Kontroll-siRNA (Ctrl siRNA) wurden die genannten Zellen mit Elastase (50 µg/ml, 48 h) behandelt und sowohl die Caspase-3/7-Aktivität (**a**) als auch der Zelltod mittels SubG1 Assay (**b**) bestimmt. Für die Darstellung wurden die behandelten Zellen auf die jeweils unbehandelten (Ctrl) normalisiert. Die Graphen repräsentieren eine Zusammenfassung von jeweils drei unabhängigen Experimenten (Mittelwert ± SEM; *: p<0.05; ***: p<0.001; 1-way-ANOVA).

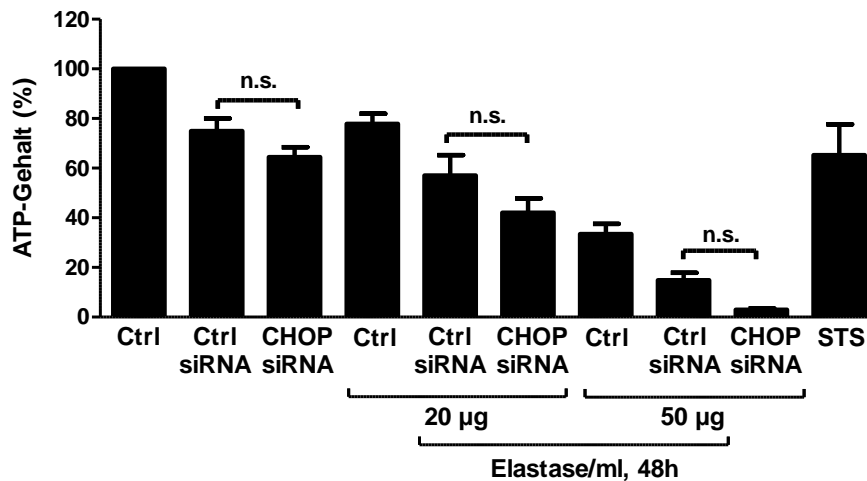


Abbildung 5-18: Die CHOP-Defizienz ändert nicht den ATP-Gehalt von EA.hy 926-Zellen. EA.hy 926-Zellen wurden mit CHOP bzw. unspezifischer Kontroll-siRNA (Ctrl-siRNA) transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen für mit Elastase (20 und 50 µg/ml, 48 h) oder Staurosporin (STS, 1 µM, 24 h, Positivkontrolle) behandelt. Nach insgesamt drei Tagen wurden die Zellen auf ihren ATP-Gehalt untersucht, welcher als Maß für die Zellviabilität diente. Für die Darstellung wurde der ATP-Gehalt der unbehandelten Kontrolle (Ctrl) als 100 % gesetzt und die behandelten Zellen auf diese normalisiert. Der Graph zeigt eine Zusammenfassung von drei unabhängigen Experimenten (Mittelwert ± SEM; n.s.: p>0,05; **: p<0.01; 1-way-ANOVA).

5.1.6 PAR-1 ist nicht an dem Elastase-induzierten Zelltod beteiligt

Frühere Arbeiten implizierten, dass der Rezeptor PAR-1 (Protease-aktivierter Rezeptor-1) am Elastase-induzierten Endothelzelltod beteiligt sein könnte^{118,119}. Dieser gehört zu einer Gruppe von 4 Transmembran-Rezeptoren (PAR-1 bis -4), die eine Rolle unter anderem bei inflammatorischen Prozessen und bei der Atherosklerose spielen^{100,102}. In Bezug auf kardiovaskuläre Fragestellungen schien PAR-1 ein vielversprechender Kandidat zu sein: der Rezeptor wird auf Endothelzellen exprimiert^{99,120,121}, induziert in Endothelzellen Apoptose¹²² und besitzt zudem eine Schnittstelle für Elastase^{100,101}. Die Notwendigkeit der enzymatischen Elastase Funktion und potentiellen Interaktion mit einem Rezeptor wie PAR-1 wird zudem dadurch unterstützt, dass nur enzymatisch-aktive Elastase, aber nicht hitze-inaktivierte Elastase die Endothelzell-Apoptose induziert (Abbildung 5-19).

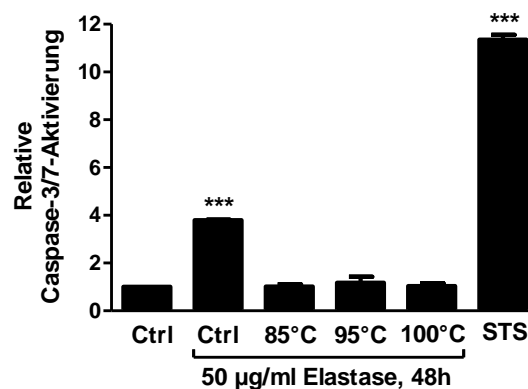


Abbildung 5-19: Die enzymatische Aktivität / katalytische Wirksamkeit der Elastase ist essentiell für die Endothelzell-Apoptose. Naive EA.hy 926-Zellen wurden für 48 h mit hitzebehandelter oder -unbehandelter Elastase (50 µg/ml) oder Staurosporin (STS, 1 µM, Positivkontrolle) inkubiert und anschließend auf ihre Caspase-3/7-Aktivierung hin untersucht. Der Graph zeigt ein repräsentatives Ergebnis von zwei unabhängigen Versuchen. Für die Quantifizierungen wurden die behandelten Zellen auf die unbehandelte Kontrolle (Ctrl) normalisiert (Mittelwert ± SEM; ***: p<0.001; 1-way-ANOVA).

Um eine Beteiligung des PAR-1 in der Elastase-induzierten Apoptose zu untersuchen, wurde dieser durch RNA-Interferenz in Endothelzellen herunter reguliert und sowohl die Aktivierung des UPR, als auch der Zelltod nach der Elastase-Behandlung analysiert. Zuvor wurde jedoch die Effizienz des *Knockdowns* bestimmt. Hierfür wurde PAR-1 in Endothelzellen durch RNA-Interferenz herunter reguliert oder die Zellen mit einer unspezifischen Kontroll-siRNA behandelt. Anschließend erfolgte die Untersuchung der mRNA-Expression mittels qRT-PCR bzw. die PAR-1-Expression mit einem fluoreszenzmarkierten Antikörper im FACS (siehe 4.1.4, 4.1.7). Sowohl auf mRNA- (95 %), als

auch auf Proteinebene (60 %) konnte ein effizienter *Knockdown* erreicht werden (Abbildung 5-20a und b).

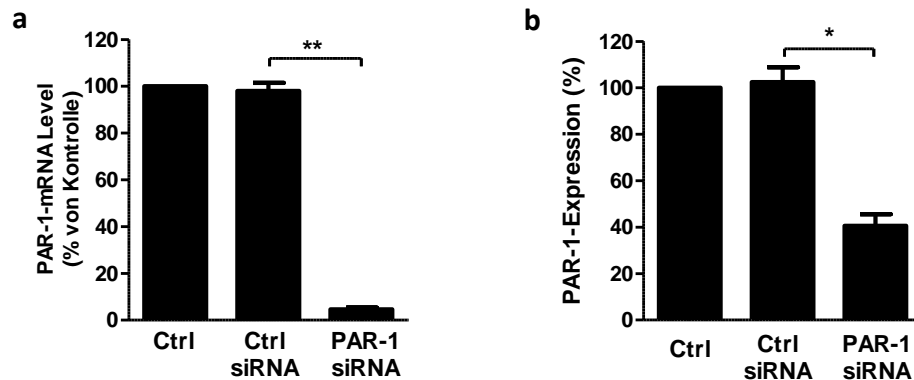


Abbildung 5-20: Überprüfung der PAR-1-Defizienz in EA.hy 926-Zellen. (a) EA.hy 926 Zellen wurden 24 h nach der Transfektion mit PAR-1 bzw. unspezifischer Kontroll-siRNA (Ctrl siRNA) mittels qRT-PCR auf ihren PAR-1-mRNA Expression untersucht. PolR II α und β -Actin dienten hierbei zur Normalisierung der Expression. Der Graph zeigt eine Zusammenfassung von zwei unabhängigen Experimenten. (b) EA.hy 926-Zellen wurden wie in (a) behandelt und mittels PE-gekoppelten anti-PAR-1 Antikörper im FACS auf PAR-1-Expression untersucht. Der Graph zeigt eine Zusammenfassung von vier unabhängigen Versuchen. Für die Darstellungen wurden die unbehandelten Zellen (Ctrl) als 100 % angenommen und die behandelten Zellen auf diese normalisiert. (Mittelwert \pm SEM; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; 1-way-ANOVA).

Die PAR-1-Defizienz verursachte jedoch keine Änderung in der Elastase-induzierten Aktivierung des UPR in Endothelzellen. Dies zeigte sich dadurch, dass zwischen Elastase-behandelten Zellen mit siRNA gegen PAR-1 oder unspezifischer Kontroll-siRNA kein signifikanter Unterschied in der Expression der UPR-Marker sXBP1, GRP78 oder CHOP zu beobachten war (Abbildung 5-21a, b und c). Des Weiteren konnte der PAR-1-*Knockdown* in Elastase-behandelten Zellen weder die Caspase-3/7-Aktivität (Abbildung 5-22a), noch den Anteil an toten Zellen (Abbildung 5-22b), im Vergleich zu den Zellen mit Kontroll-siRNA, reduzieren. Zusätzlich wurde der intrazelluläre ATP-Gehalt nach dem RNAi-vermittelten *Knockdown* und nach gleichzeitiger Behandlung mit Elastase bestimmt (siehe 4.1.6). Auch hier zeigte sich, dass die PAR-1-Defizienz den ATP-Gehalt nicht veränderte und den Elastase-induzierten Zelltod nicht reduziert (Abbildung 5-23).

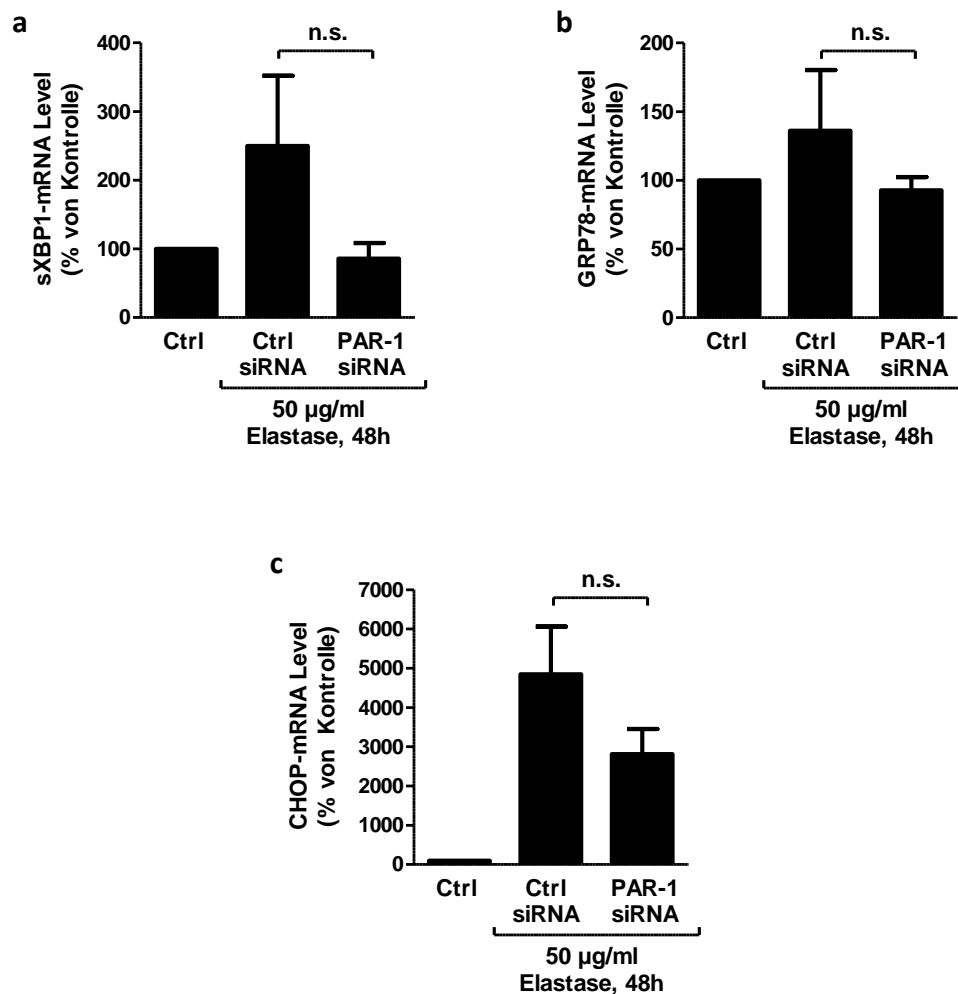


Abbildung 5-21: Die PAR-1-Defizienz verhindert nach einer Elastase-Behandlung nicht die gesteigerte Expression von CHOP in Endothelzellen. EA.hy 926-Zellen wurden 24 h nach der Transfektion mit PAR-1 bzw. unspezifischer Kontroll-siRNA (Ctrl siRNA) für 48 h mit 50 µg/ml Elastase behandelt und anschließend mittels qRT-PCR auf (spliced) sXBP1- **(a)**, GRP78- **(b)** und CHOP-mRNA Expression **(c)** untersucht. PolR II α und β -Actin dienten hierbei zur Normalisierung der Expression. Für die Darstellungen wurden die unbehandelten Zellen (Ctrl) als 100 % angenommen und die behandelten Zellen auf diese normalisiert. Der Graph zeigt eine Zusammenfassung von vier unabhängigen Experimenten (Mittelwert \pm SEM; n.s.: $p > 0.05$; 1-way-ANOVA).

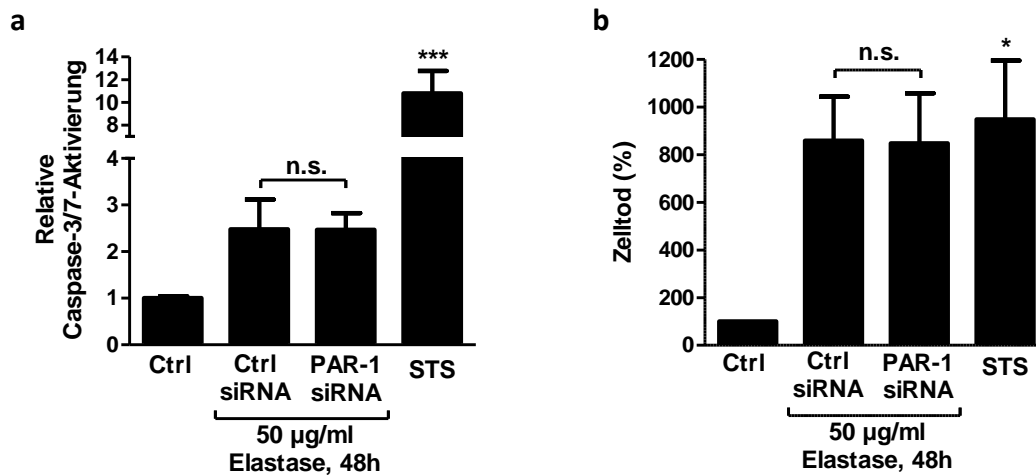


Abbildung 5-22: PAR-1-Defizienz verhindert weder die Elastase-induzierte Caspase-3/7-Aktivierung noch den Zelltod von EA.hy 926-Zellen. 24 h nach der Transfektion mit PAR-1 bzw. unspezifischer Kontroll-siRNA (Ctrl siRNA) wurden EA.hy 926-Zellen mit Elastase (50 µg/ml, 48 h) behandelt und sowohl die Caspase-3/7-Aktivität (**a**) als auch der Zelltod mittels SubG1 Assay (**b**) bestimmt. Staurosporin (STS, 1µM, 24 h) diente als Positivkontrolle. Für die Darstellung wurden die behandelten Zellen auf die jeweils unbehandelten (Ctrl) normalisiert. Die Graphen repräsentieren eine Zusammenfassung von jeweils vier bzw. fünf unabhängigen Experimenten (Mittelwert ± SEM; n.s.: p>0.05; *: p<0.05; ***: p<0.001; 1-way-ANOVA).

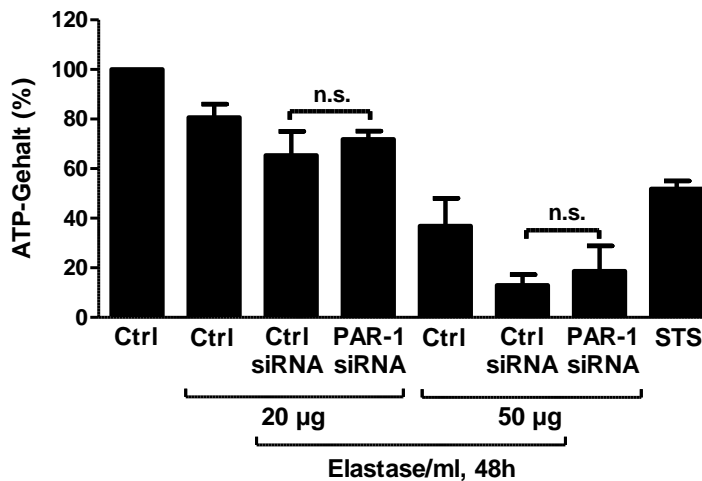


Abbildung 5-23: Die PAR-1-Defizienz kann den Zelltod von EA.hy 926-Zellen nicht vermindern. EA.hy 926-Zellen wurden mit PAR-1 bzw. unspezifischer Kontroll-siRNA (Ctrl-siRNA) transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen für mit Elastase (20 und 50 µg/ml, 48 h) oder Staurosporin (STS, 1 µM, 24 h, Positivkontrolle) behandelt. Nach insgesamt drei Tagen wurden die Zellen auf ihren ATP-Gehalt untersucht, welcher als Maß für die Zellviabilität diente. Für die Darstellung wurde der ATP-Gehalt der unbehandelten Kontrolle (Ctrl) als 100 % gesetzt und die behandelten Zellen auf diese normalisiert. Der Graph zeigt eine Zusammenfassung von vier unabhängigen Experimenten (Mittelwert ± SEM; n.s.: p>0,05; 1-way-ANOVA).

5.1.7 PAR-2 ist nicht an dem Elastase-induzierten Zelltod beteiligt

Auch für PAR-2 gab es Hinweise auf eine Beteiligung in der Elastase-induzierten Apoptose. Dieser wird ebenfalls, wie PAR-1, auf Endothelzellen exprimiert^{99,102,120} und kann durch Elastase aktiviert werden^{123,124,125}. Es wurde daher untersucht, ob eine PAR-2 Blockierung in Endothelzellen den Elastase-induzierten Zelltod vermindert. Hierfür wurde PAR-2 mit Hilfe eines blockierenden Antikörpers^{105,106,107} in EA.hy 926-Zellen blockiert (siehe 4.1.5) und nach zweitägiger Behandlung mit Elastase die Caspase-3/7 (Abbildung 5-24a) als auch der Zelltod mittels SubG1 Assay (Abbildung 5-24b) analysiert. Hierbei zeigte die PAR-2 Blockierung keine Beeinflussung des Zelltodes.

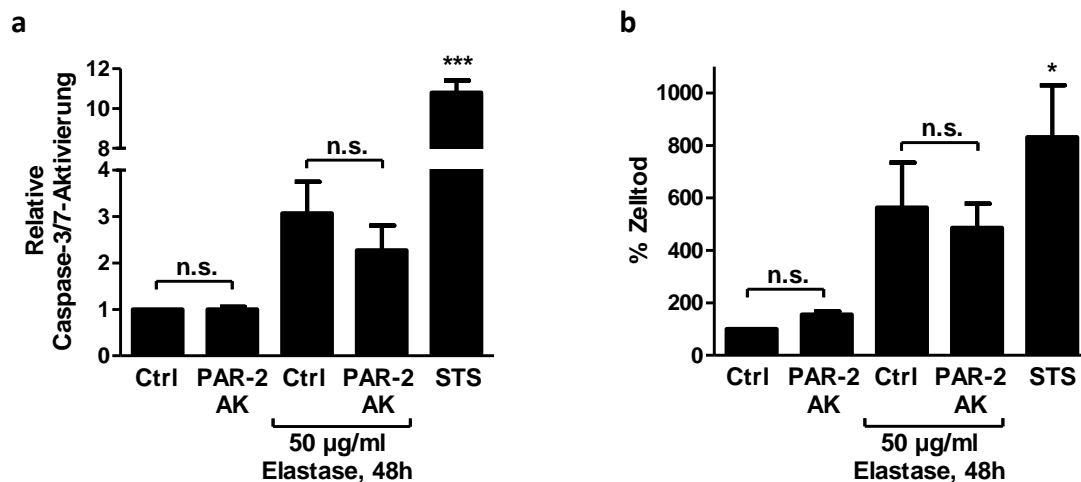


Abbildung 5-24: PAR-2-Defizienz verhindert nach der Elastase-Behandlung weder eine Caspase-3/7-Aktivierung noch den Zelltod von EA.hy 926-Zellen. Die genannten Zellen wurden 45 min vor der Elastase-Behandlung (50 µg/ml, 48 h) mit einem PAR-2 blockierendem Antikörper (100 µg/ml) behandelt und die Caspase-3/7-Aktivität (a) sowie Zelltod mittels SubG1 Assay (b) untersucht. Staurosporin (STS, 1µM, 24 h) diente als Positivkontrolle. Für die Darstellung wurden die behandelten Zellen auf die jeweils unbehandelten (Ctrl) normalisiert. Die Graphen repräsentieren eine Zusammenfassung von jeweils drei bzw. zwei unabhängigen Experimenten (Mittelwert ± SEM; n.s.: p>0.05; *: p<0.05; ***: p<0.001; 1-way-ANOVA).

5.1.8 Charakterisierung der Rolle der Elastase in glatten Gefäßmuskelzellen und Makrophagen

Elastase, welche unter anderem von Makrophagen sekretiert wird ^{23,31}, kann nicht nur in Endothelzellen ^{28,29,33}, sondern auch in glatten Muskelzellen (SMCs) ³² Apoptose auslösen. Die Plaqueruptur ist nach gegenwärtigen Einschätzungen maßgeblich durch das Absterben von SMCs und Makrophagen verursacht ¹²⁶. Hierbei ist die Wirkung der ER-Stress-induzierten Apoptose von Makrophagen in der fortgeschrittenen Läsion bereits einschlägig belegt ¹³. Im Folgenden wurde die Wirkung der Elastase sowohl auf glatte Muskelzellen, als auch auf Makrophagen untersucht. Da es sich um primäre Zellen handelte, wurden hierzu leicht erniedrigte Elastase-Konzentrationen genutzt, ähnlich der Ergebnisse mit HAoECs (siehe 5.1.1). Hierzu wurden primäre humane glatte Muskelzellen aus der koronaren Arterie (HCASMCs) für verschiedene Zeiten mit Elastase behandelt und zunächst die mRNA-Expression von sXBP1, GRP78 und CHOP untersucht (siehe 4.2.4, Abbildung 5-25: Elastase induziert den UPR in primären glatten Muskelzellen.a-c). Elastase induziert in HCASMCs nach 48 Stunden einen signifikanten Anstieg der mRNA-Expression und aktiviert dadurch den UPR. Entgegen des Prozesses in Endothelzellen reagierten HCASMCs nicht mit einer Induktion der Apoptose. So konnte nach einer dreitägigen Behandlung mit Elastase weder eine Caspase-3/7-Aktivität noch eine erhöhte Zelltodrate in den glatten Muskelzellen verzeichnet werden (Abbildung 5-26: Elastase induziert weder Caspase-3/7-Aktivität noch Zelltod von HCASMCs, jedoch Autophagie.a und b), wohingegen die Autophagie bei 10 µg/ml Elastase nach 72 Stunden und bei 30 µg/ml bereits nach 48 Stunden signifikant zunahm (Abbildung 5-26c). Auch Makrophagen, die aus dem Peritoneum von C57BL/6J WT-Mäusen isoliert wurden, zeigten nach der Elastase-Behandlung keine Caspase-3/7-Aktivität (Abbildung 5-27).

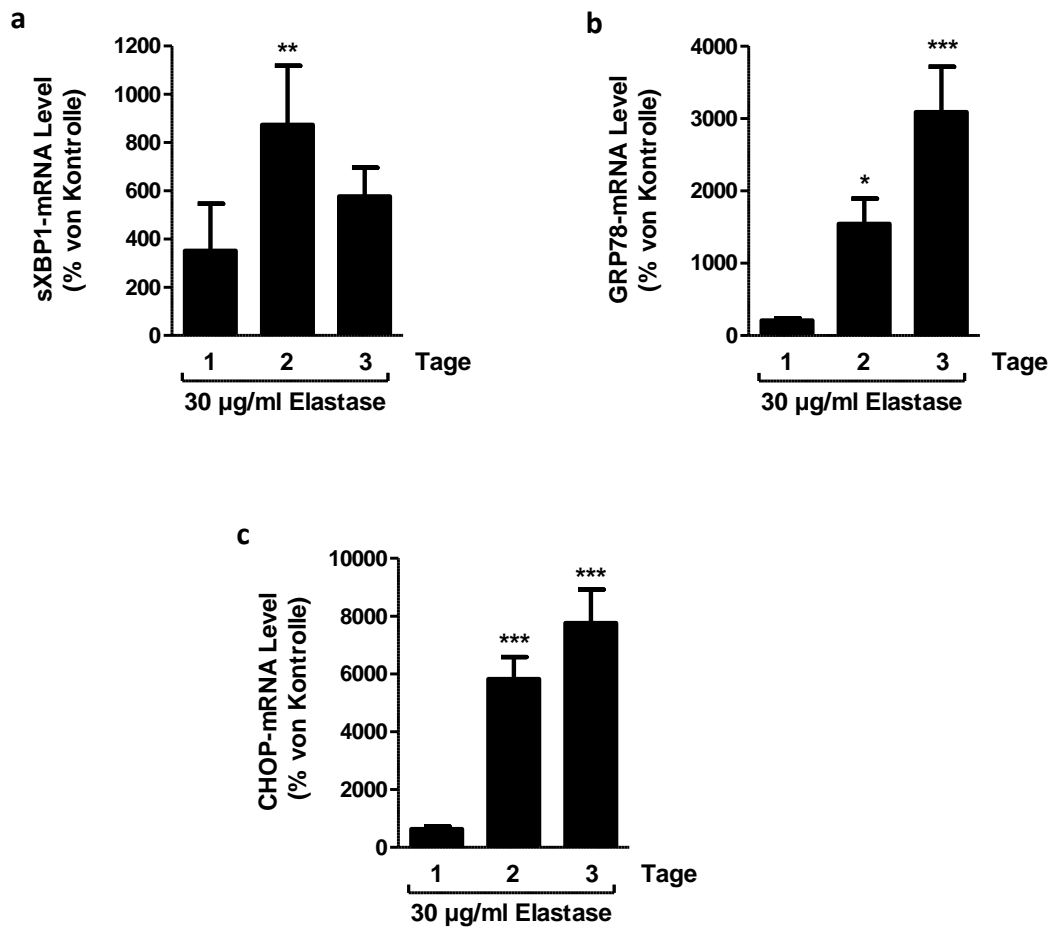


Abbildung 5-25: Elastase induziert den UPR in primären glatten Muskelzellen. Primäre humane glatte Muskelzellen aus der koronaren Arterie (HCASMC) wurden für die angegebenen Zeiten mit Elastase (30 µg/ml) behandelt und anschließend mittels qRT-PCR auf sXBP1- **(a)**, GRP78- **(b)** und CHOP-mRNA Expression **(c)** analysiert; β -Actin diente der Normalisierung. Für die Darstellungen wurden die unbehandelten Zellen (nicht gezeigt) als 100 % angenommen und die behandelten Zellen auf diese normalisiert. Die Graphen zeigen eine Zusammenfassung von je drei unabhängigen Experimenten (Mittelwert \pm SEM; *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; 1-way-ANOVA).

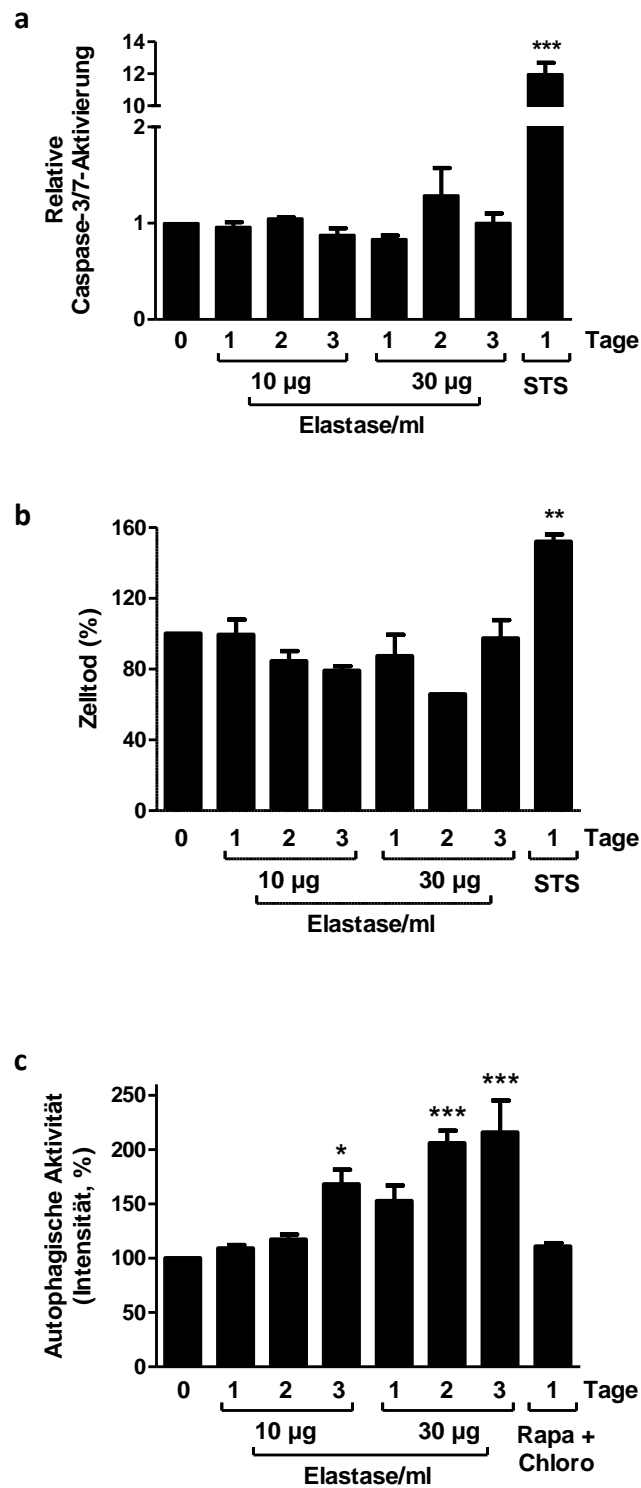


Abbildung 5-26: Elastase induziert weder Caspase-3/7-Aktivität noch Zelltod von HCASMCs, jedoch Autophagie. HCASMCs wurden für die genannten Zeiten oder mit den genannten Konzentrationen an Elastase behandelt und auf Caspase-3/7-Aktivierung (**a**), Zelltod (mittels SubG1 Assay, (**b**)) und Induktion der Autophagie (mittels *Cyto-ID*[®] Autophagy Detection Kit von Enzo, (**c**)) bestimmt. Staurosporin (STS; 1 µM) bzw. Rapamycin / Chloroquin (500 nM Rapa + 10 µM Chloro) dienten als Positivkontrollen. Für die Darstellungen wurden die behandelten Zellen auf die jeweils unbehandelten normalisiert. Die Graphen repräsentieren eine Zusammenfassung von drei unabhängigen Experimenten (Mittelwert ± SEM; *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001; 1-way-ANOVA).

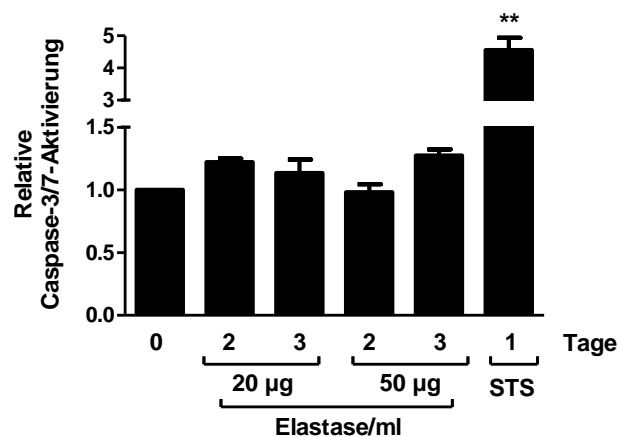


Abbildung 5-27: Elastase induziert keine Caspase-3/7-Aktivierung in murinen Peritoneal-Makrophagen. Peritoneal-Makrophagen wurden aus C57Bl6/J-Mäusen (Wildtyp) isoliert und für die genannten Zeiten oder mit den genannten Konzentrationen an Elastase behandelt und auf Caspase-3/7-Aktivierung untersucht. Staurosporin (STS; 1 µM) diente als Positivkontrolle. Für die Darstellung wurden die behandelten Zellen auf die jeweils unbehandelten normalisiert. Der Graph repräsentiert eine Zusammenfassung von drei unabhängigen Experimenten (Mittelwert ± SEM; **: $p < 0.01$; 1-way-ANOVA).

5.2 *Ex vivo* Charakterisierung der Rolle der Elastase in humanen Gewebeproben

Erhöhte Elastase-Konzentrationen konnten bereits in Karotisplaques gemessen werden^{23,31}. Auch war es Dorweiler *et al.*^{127,128} gelungen, in einem *in vitro*-Modell der Gefäßwand die subendotheliale Infiltration von Makrophagen mit Freisetzung von Elastase zu simulieren und einen Elastase-induzierten Endothelzelltod nachweisen. Der zugrunde liegende Mechanismus, der an der Elastase-induzierten Apoptose bzw. potentiell an der Plaqueruptur/-erosion beteiligt ist, blieb jedoch unbekannt und sollte in dieser Arbeit charakterisiert werden. Daher wurde der *in vitro* in Endothelzellen involvierte Signalweg UPR sowie die Apoptose in humanen Karotischgewebeproben atherosklerotischer Läsionen analysiert und auch die Anwesenheit der Elastase und der Elastase-sekretierenden Makrophagen untersucht.

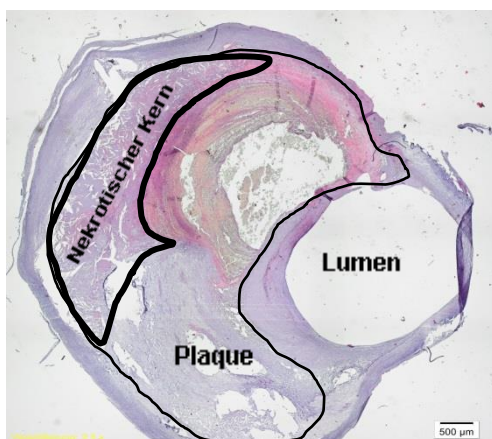
5.2.1 Histopathologie von humanen Karotisplaques

Die Analysen erfolgten an 10 ausgewählten Karotisplaques, von denen die klinischen Daten jedes einzelnen Patienten dokumentiert wurden (Tabelle 5.1). Diese Plaques wurden gemäß histologischer Kriterien als „Ruptur-gefährdet“ klassifiziert. Hierzu wurden diese zum einen nach der AHA-Klassifikation¹¹³ eingeteilt (siehe 1.1) und zum anderen wurden Kriterien der Oxford Plaque-Studie verwendet, welche zur Klassifizierung von Karotisplaques gelten. Analog dieser Kriterien gilt ein Plaque als Ruptur-gefährdet, wenn die repräsentative Kappendicke eines Plaques einen Grenzwert von 500 µm und die minimale Kappendicke einen Wert von 200 µm nicht überschreitet¹¹², sowie die Größe des nekrotischen Kerns über 25 % der Gesamt-Plaquesfläche liegt¹³⁰. Um die verschiedenen Gewebestrukturen unterscheiden zu können, wurde hierfür jede zehnte Gewebeprobe eines Patienten sowohl mit Hämatoxylin und Eosin (HE-Färbung), als auch mit Masson-Goldner angefärbt und Übersichtsbilder angefertigt (Abbildung 5-28a). Hämatoxylin färbte saure (basophilen) Strukturen blau (Zellkerne, DNA, Ribosomen, raues ER), wohingegen Eosin basische (acidophilen) Strukturen rot anfärbte (Zellplasmaproteine, Mitochondrien, glattes ER, Kollagen, Keratin)¹³¹. Bei der Masson-Goldner Färbung wurden vier Farbstoffe verwendet (siehe 4.5.2). Hierbei konnten kollagenes Bindegewebe (grün), Zellkerne (braunschwarz), Cytoplasma (rot), Erythrozyten (orangerot) und Muskulatur (blaßrot) unterschieden werden¹³². An jeweils fünf gefärbten Schnitten, die eine maximale Lumenreduktion aufwiesen, erfolgte die Messung der Plaquegröße, des nekrotischen Kerns und der Kappendicke (siehe 4.5.1 und 4.5.2). Wie Abbildung 5-28b, c und d zeigen, erfüllten alle 10 untersuchten Karotisplaques die erforderlichen Kriterien für Ruptur-gefährdete Plaques. Patient Nummer 5 überschritt zwar die minimale Kappendicke, erfüllte jedoch die anderen beiden Kriterien deutlich. Bei Anwendung der AHA-Klassifikation nach Sary *et al.*¹¹³ wurden drei Karotisproben in die Gruppe IV (Atherom mit nekrotischem Kern) und sieben in die Gruppe VI (Läsion mit Oberflächendefekt) eingeteilt (siehe 1.1).

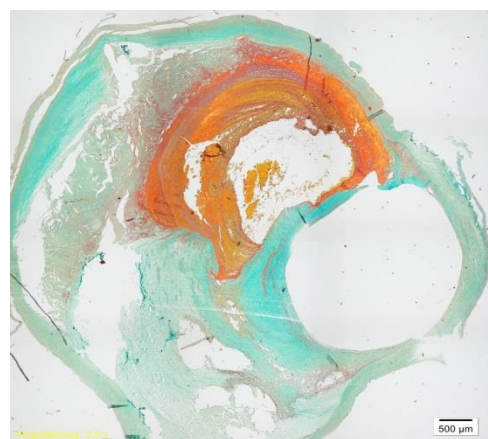
Tabelle 5.1: Patientencharakteristika (n = 10)

Alter	73 ± 6 Jahre	Bereich 62 - 84 Jahre
Männer	5	
Risikofaktoren	n	%
Hypertonie	10	100
Nikotinabusus	3	30
Hyperlipidämie	6	60
Diabetes mellitus	4	40
Koronare Gefäßerkrankung	3	30
Medikationen		
Statine	5	50
ASS	10	100
Grad der Karotisstenose	88 ± 7 %	Bereich 75 – 99 %

a



Hämatoxylin & Eosin



Masson-Goldner

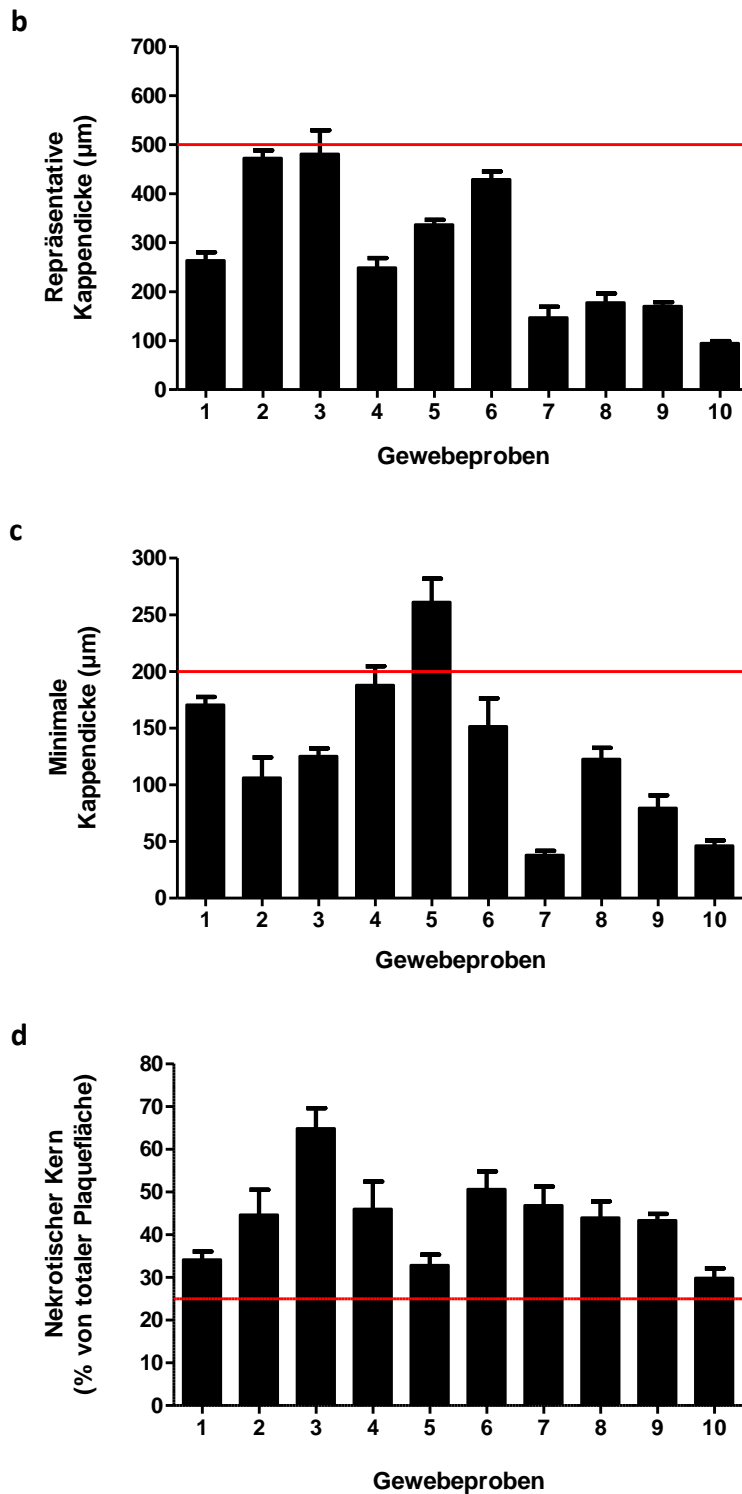


Abbildung 5-28: Quantitative Auswertung der morphologischen Untersuchungen von humanen Karotisplaques. Jeder zehnte Paraffinschnitt der 10 humanen Karotis-Gewebebeispiele wurden HE und Masson-Goldner gefärbt. Jeweils 5 Färbungen pro Patient wurden für die Quantifizierung herangezogen, Übersichtsbilder angefertigt (a) und anschließend die repräsentative Kappendicke (b), die minimale Kappendicke (c) und die Größe des nekrotischen Kerns (d) analysiert. Die rote Linie beschreibt für jeden Parameter den Grenzwert für Ruptur-gefährdete Plaques (Mittelwert ± SEM).

5.2.2 Lokalisation von Elastase und Makrophagen in humanen Karotisplaques

Die Elastase wird als eigenständiger Mediator der Läsionsprogression angesehen²⁸ und konnte bereits in erhöhten Konzentrationen in Karotisplaques gemessen werden^{133,31}. Daher wurden in den 10 Ruptur-gefährdeten Plaques die Anwesenheit der Elastase sowie der Elastase-sekretierenden Makrophagen analysiert. Hierfür wurden jeweils 3-4 Gewebeschnitte eines Patienten mit Antikörpern gegen Elastase oder CD68 (Makrophagen) angefärbt und von jeder Färbung fünf repräsentative Aufnahmen der Schulterregion angefertigt. Die semiquantitative Auswertung der positiven Braunfärbung zeigte, dass im Vergleich zu den Kontrollen (Oberschenkelarterie, CFA; Karotisarterie, CCA; interne Karotisarterie angrenzend an den Plaque, ICA) sowohl die Makrophagen (Abbildung 5-29a) als auch die Elastase (Abbildung 5-29b) in Ruptur-gefährdeten Plaques signifikant erhöht waren.

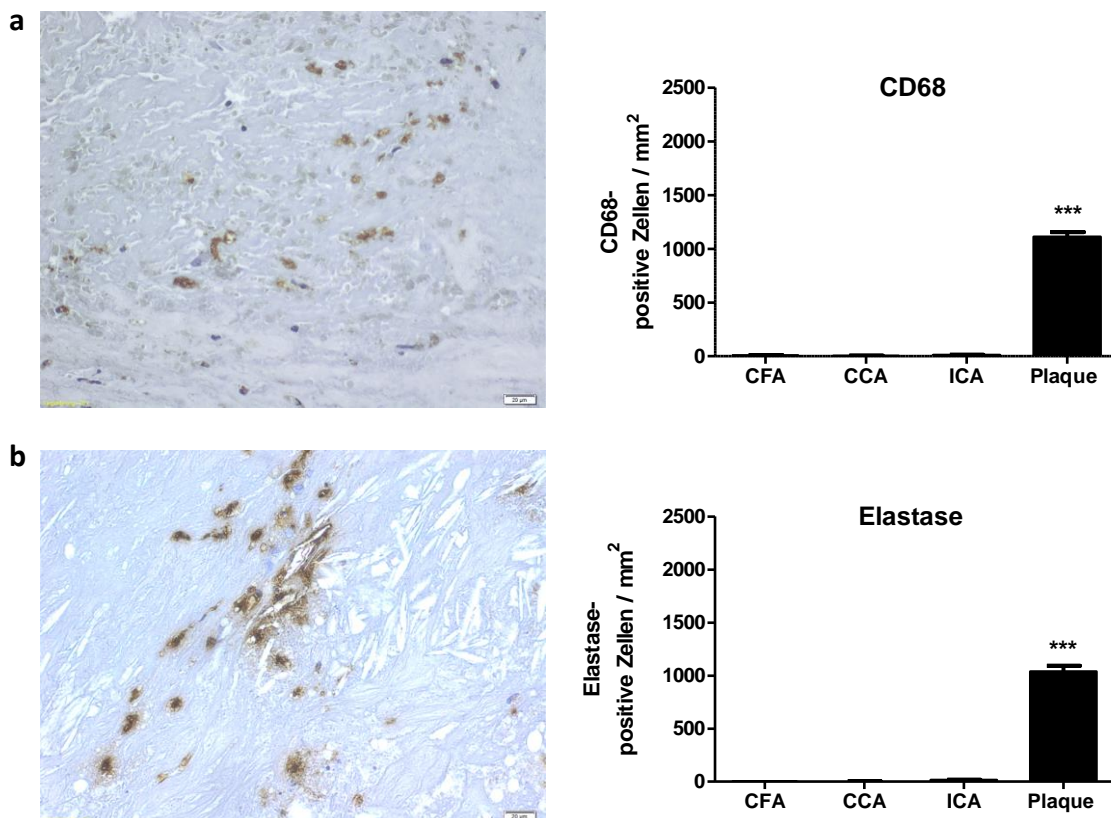


Abbildung 5-29: Semiquantitative Analysen von CD68- (Makrophagen) und Elastase-Marker in humanen Karotisplaques. Gezeigt ist ein repräsentatives Bild (Vergrößerung = 200x, Skalierung = 20 µm) mit positiver Braunfärbung der Marker CD68 (Makrophagen, **(a)**) und Elastase (**(b)**) sowie die Ergebnisse der Quantifikation aller zehn Gewebeproben (Plaque, rechts). Als Kontrollen diente eine Oberschenkelarterie (CFA, *common femoral artery*), Karotisarterie (CCA, *common carotid artery*) und interne Karotisarterie angrenzend an den Plaque (ICA, *internal carotid artery*). In der Quantifizierung sind die positiv-gezählten Zellen pro mm² abgebildet (Mittelwert ± SEM; ***: p<0.001 für Plaque versus alle Kontrollen; 1-way-ANOVA).

5.2.3 Aktivierung von Zelltod-Markern in humanen Karotisplaques

Zur Überprüfung erhöhter Zelltodraten in den humanen Ruptur-gefährdeten Karotisplaques wurden 3-4 Gewebeschnitte eines Patienten entweder mit einem Antikörper gegen cCaspase-3 angefärbt oder die toten Zellen mit Hilfe eines TUNEL-Kits sichtbar gemacht. Anschließend wurden von jeder Färbung fünf repräsentative Aufnahmen der Schulterregion angefertigt und die braungefärbten Zellen pro mm² quantifiziert. Abbildung 5-30a und b zeigen, dass sowohl die cCaspase-3, als auch die TUNEL-positiven Zellen in den Karotisplaques signifikant erhöht sind, im Vergleich zu den Kontrollen.

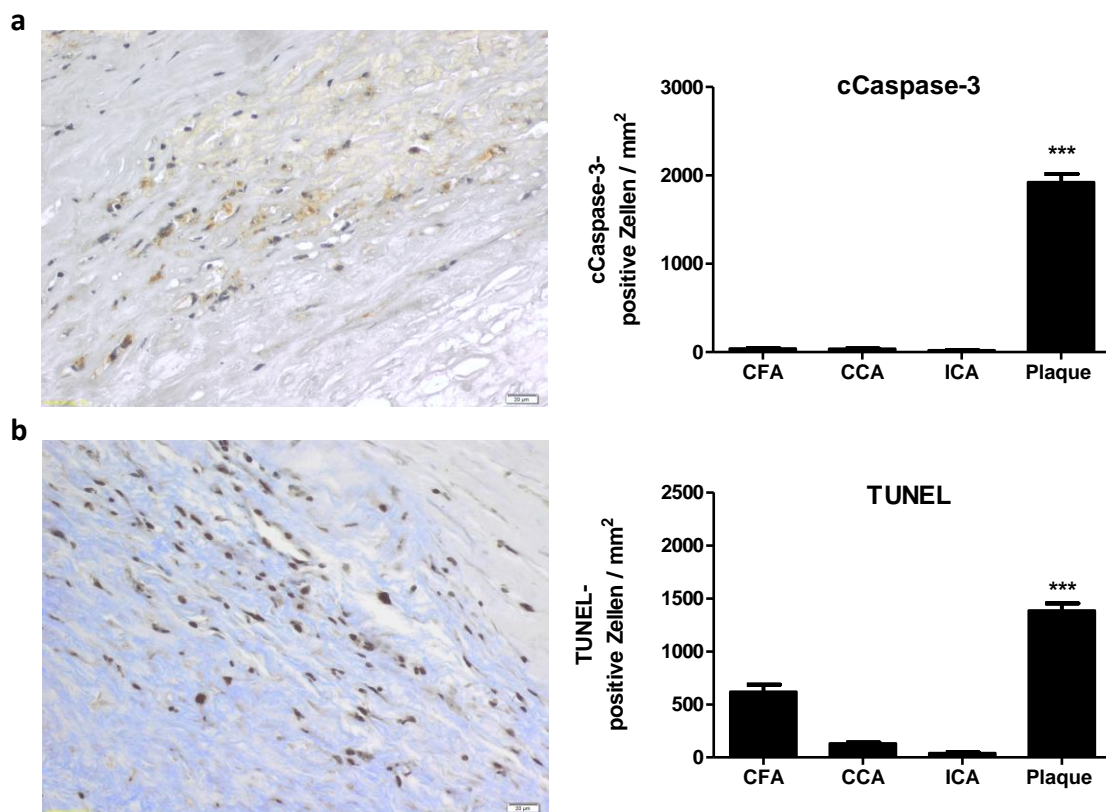


Abbildung 5-30: Semiquantitative Analysen von Zelltod-Markern in humanen Karotisplaques. Gezeigt ist ein repräsentatives Bild (Vergrößerung = 200x, Skalierung = 20 µm) mit positiver Braunfärbung der Marker cleaved Caspase-3 (**a**) und TUNEL (**b**), sowie die Ergebnisse der Quantifikation aller zehn Gewebeprobe (Plaque, rechts). Als Kontrollen diente eine Oberschenkelarterie (CFA, *common femoral artery*), Karotisarterie (CCA, *common carotid artery*) und interne Karotisarterien angrenzend an den Plaque (ICA, *internal carotid artery*). In der Quantifizierung sind die positiv-gezählten Zellen pro mm² abgebildet (Mittelwert ± SEM; ***: $p < 0.001$ für Plaque versus alle Kontrollen; 1-way-ANOVA).

5.2.4 Aktivierung von UPR-Markern in humanen Karotisplaques

Anschließend wurde zur Charakterisierung des intrazellulären Signalweges des Elastase-induzierten Zelltodes der ER-Stress Signalweg UPR untersucht, da dieser bekanntermaßen eng mit Atherosklerose und der Plaquestabilität assoziiert ist ^{45,41,46,30}. Dazu wurden die Ruptur-gefährdeten Plaques mit Antikörpern gegen KDEL (GRP78 / GRP94), ATF3 und CHOP angefärbt, repräsentative Aufnahmen der Schulterregion angefertigt und die braungefärbten Zellen pro mm² semiquantitativ ausgewertet. Für einen zusätzlichen Beleg der CHOP-Expression wurde CHAC-1, ein nachgeschalteter Transkriptionsfaktor, analysiert ¹³⁴. Die flächige Färbung von CHAC-1 wurde prozentual pro Fläche berechnet. Die Abbildung 5-31a-d zeigen eine erhöhte Expression, evident als gesteigerte Anfärbung der genannten Antigene, in Plaques relativ zu den Kontrollen. Zusätzlich bestätigte eine Western Blot Analyse die erhöhte CHOP-Expression in den Karotisplaques (Abbildung 5-32a und b).

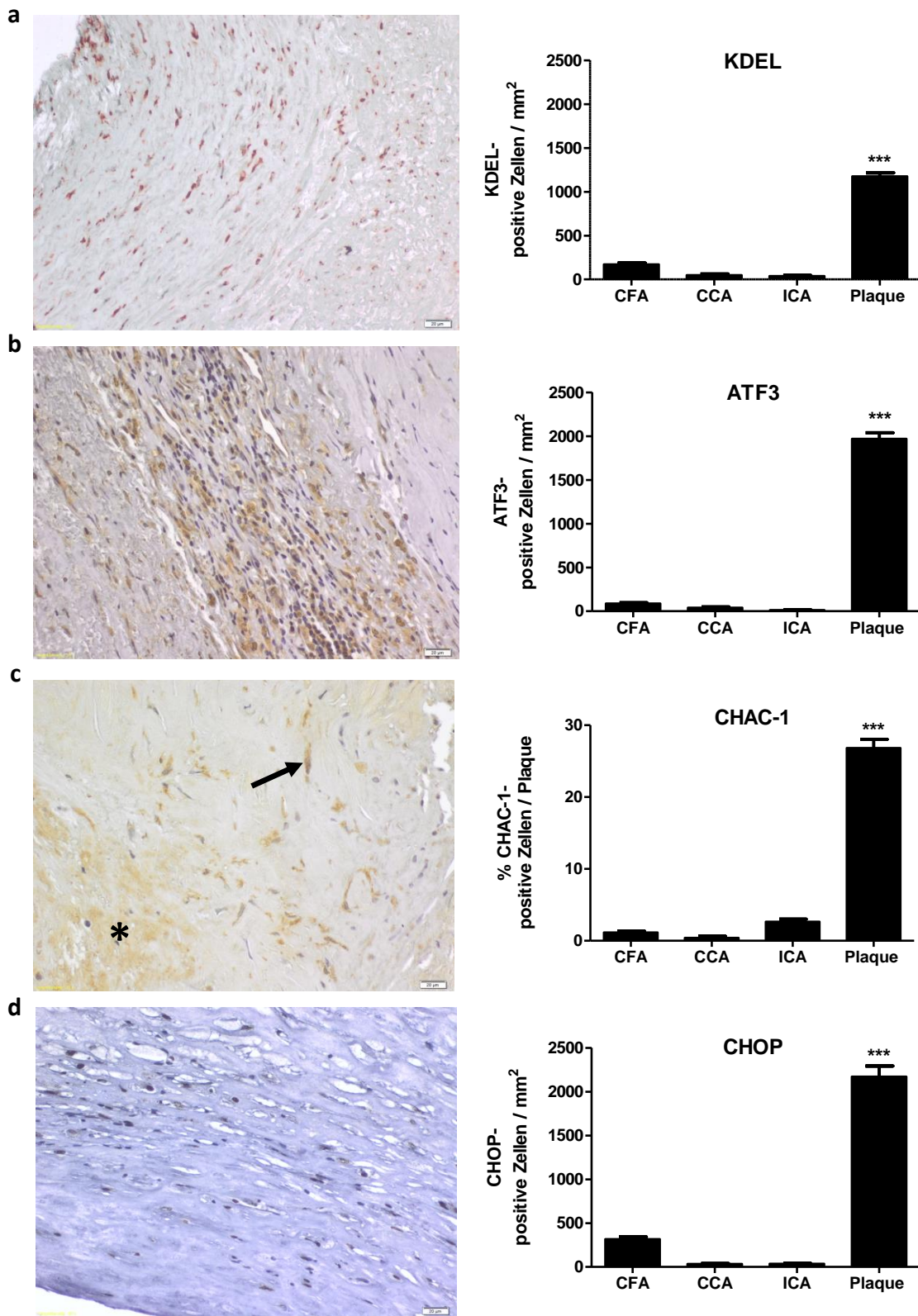


Abbildung 5-31: Semiquantitative Analysen von UPR-Markern in humanen Karotisplaques. Gezeigt ist ein repräsentatives Bild (Vergrößerung = 200x, Skalierung = 20 µm) mit positiver Braunfärbung der UPR-Marker KDEL (a), ATF3 (b), CHAC-1 (c) und CHOP (d), sowie die Ergebnisse der Quantifizierung aller zehn Gewebeproben (Plaque, rechts). Eine besondere Färbeeigenschaft kommt CHAC-1 zuteil, die sowohl Zellulär (Pfeil) als auch im nekrotischen Kern (Stern) vorkommt. Als Kontrollen diente eine Oberschenkelarterie (CFA, *common femoral artery*), Karotisarterie (CCA, *common carotid artery*) und interne Karotisarterien angrenzend an den Plaque (ICA, *internal carotid artery*). In der Quantifizierung sind die positiv-gezählten Zellen pro mm² abgebildet. Für CHAC-1 wurde die positiv-gefärbte Fläche pro totale Bildfläche dargestellt (Mittelwert ± SEM; ***: p<0.001 für Plaque versus alle Kontrollen; 1-way-ANOVA).

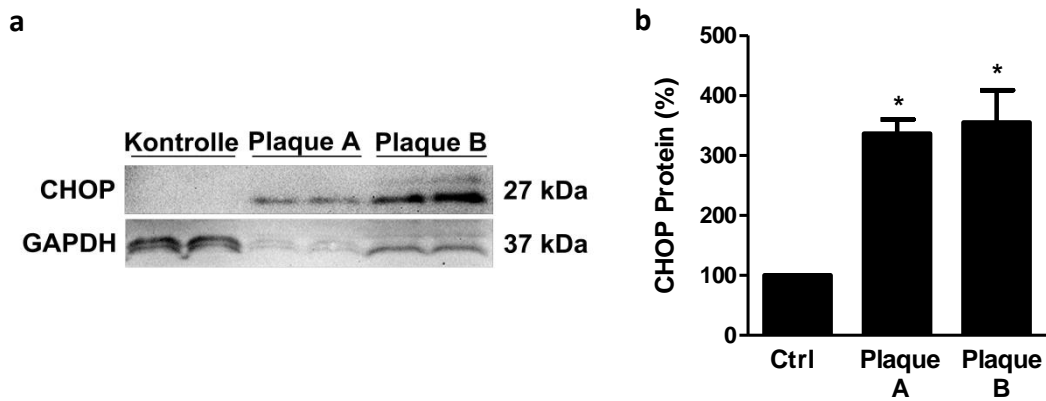


Abbildung 5-32: Erhöhte CHOP-Expression in humanen Karotisplaques. Aus zwei Karotisplaques (Plaque A und Plaque B) und einer Karotisarterie (Kontrolle, Ctrl) wurden Proteinlysate gewonnen (siehe 4.3.1), durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und mittels Western Blot auf die CHOP-Expression untersucht. GAPDH diente als Ladekontrolle (a). Die Banden wurden mittels *QuantityOne* quantifiziert und die Intensitäten auf die Intensitäten auf die Ladekontrolle (GAPDH) und auf die Kontrolle normalisiert, welche als 100 % angenommen wurden (b). Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis in Doppelwerten (Mittelwert \pm SEM; *: $p < 0.05$; 1-way-ANOVA).

Zusätzlich wurde in Endothelzellen der Karotisplaques Marker für die Elastase (Abbildung 5-33a), der UPR-Aktivierung (KDEL; Abbildung 5-33b), sowie der Apoptose (cCaspase-3; Abbildung 5-33c) nachgewiesen. Abbildung 5-34 zeigt die Übersichtsbilder der einzelnen immunhistologischen Färbungen und Abbildung 5-35 die Kontrollfärbungen.

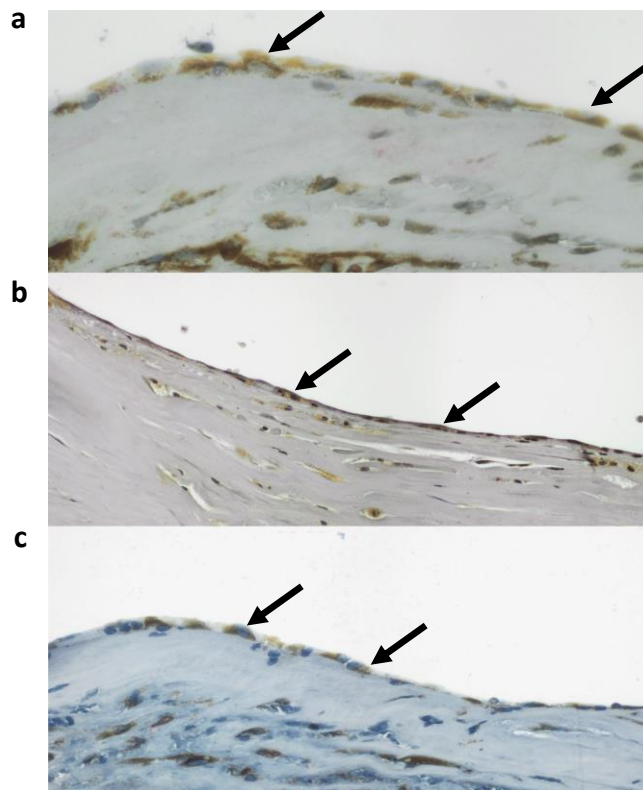


Abbildung 5-33: In Endothelzellen sind ebenfalls Elastase-, UPR- und Apoptose-Marker exprimiert. Marker für Elastase (a), UPR-Aktivierung (KDEL; b) und Apoptose (cCaspase-3; c) wurde mittels immunhistochemischer Färbungen in Endothelzellen von humanen Karotisplaques nachgewiesen. Die Pfeile zeigen an jeweils einem (von 5) repräsentativen Paraffinschnitt die positiven Färbungen (braun) an (Vergrößerung = 400x).

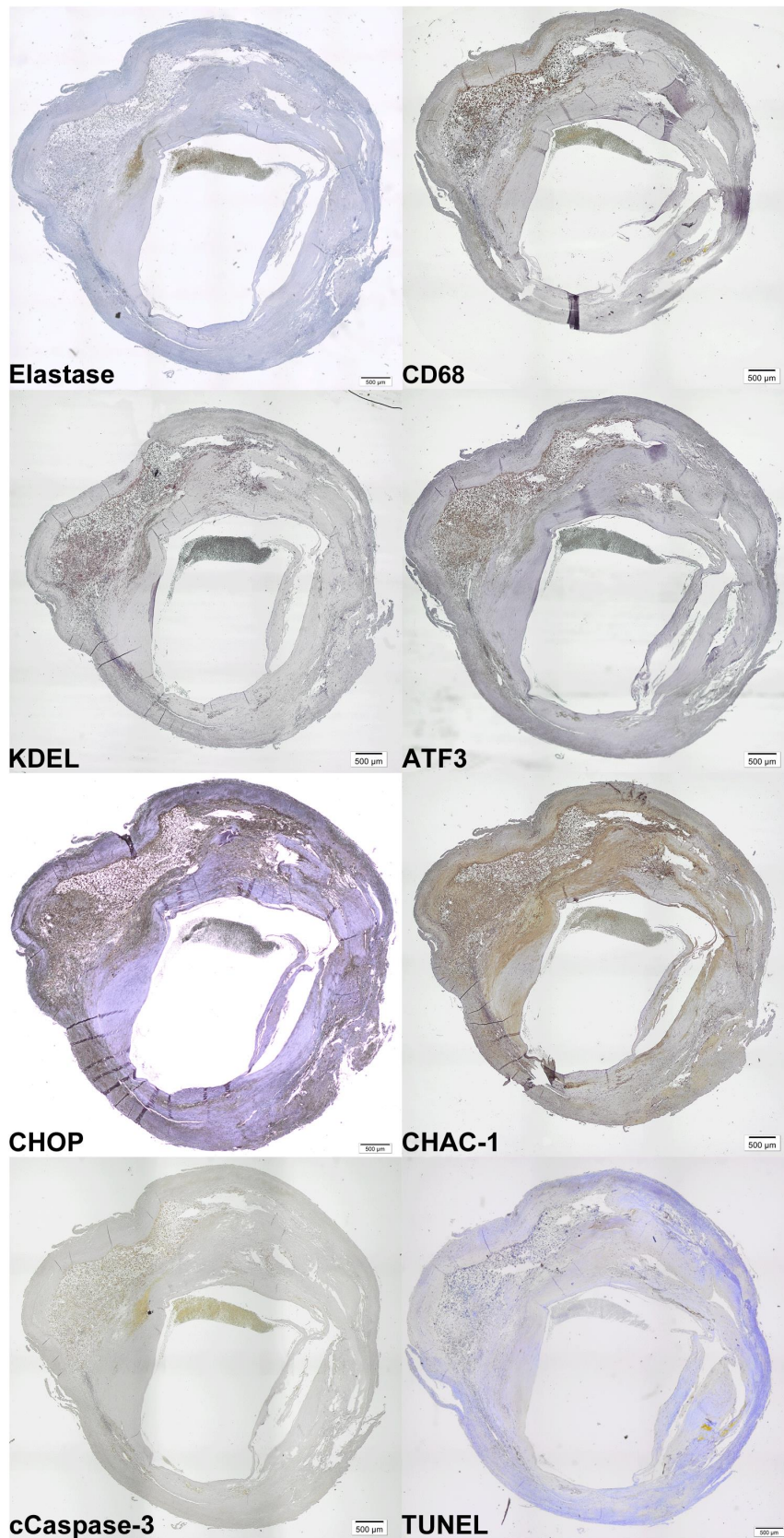


Abbildung 5-34: Übersichtsbilder der einzelnen immunhistologischen Färbungen. Totale Querschnittsbilder eines repräsentativen Plaques welche immunhistochemisch mit Markern für Elastase, Makrophagen (CD68), UPR (KDEL, ATF3, CHOP, CHAC-1) und Apoptose (cCaspase-3, TUNEL) gefärbt wurden (Vergrößerung = 25x, Skalierung = 500 µm).

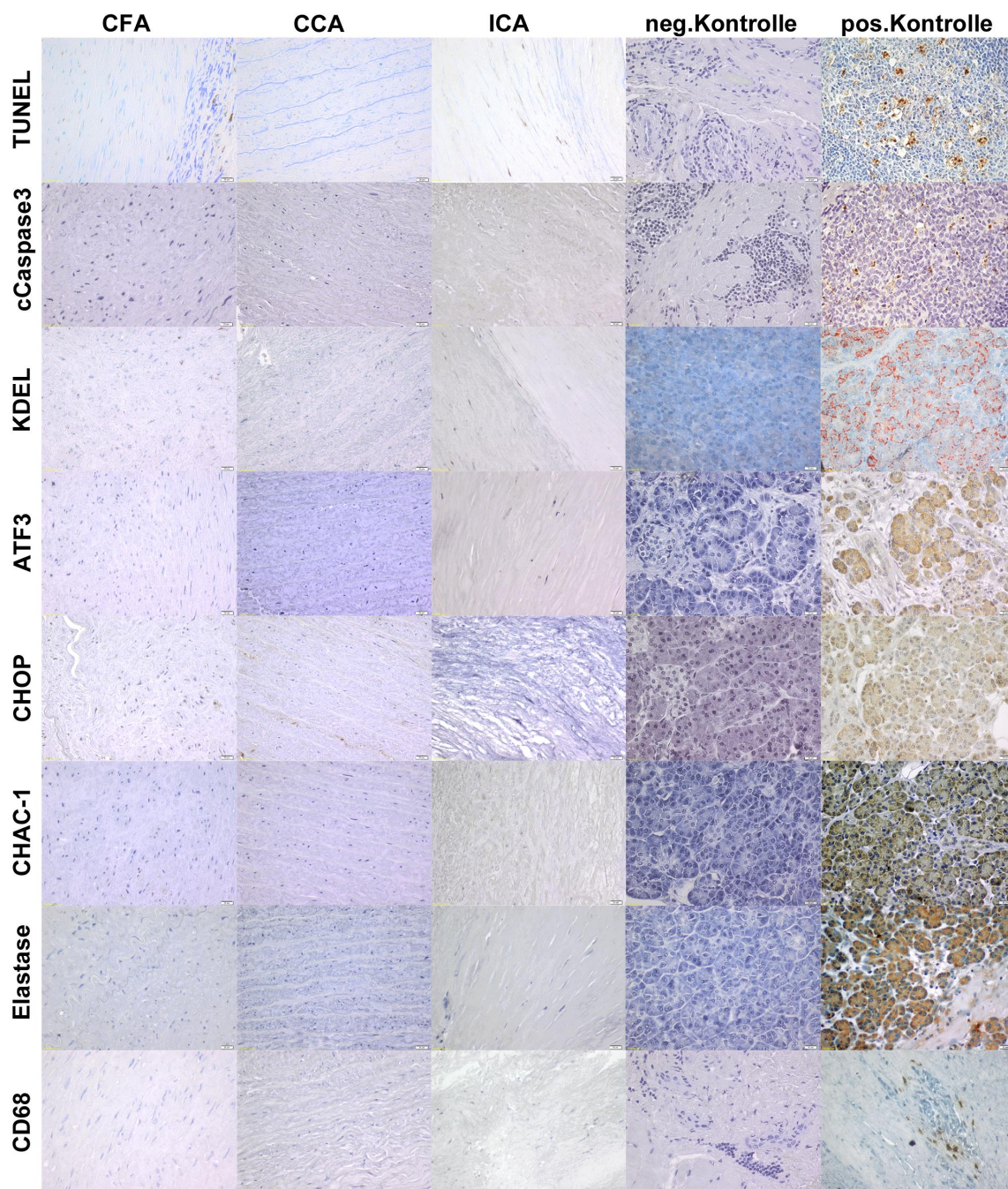


Abbildung 5-35: Immunhistologische Kontrollfärbungen von Kontrollgewebe, sowie negative / positive Kontrollen.

Färbungen von repräsentativen Schnitten von Kontrollgewebe und negative / positive Kontrollen für jeden in den semiquantitativen Analysen verwendeten Antikörper. Als Kontrollen diente eine Oberschenkelarterie (CFA, *common femoral artery*), Karotisarterie (CCA, *common carotid artery*) und interne Karotisarterien angrenzend an den Plaque (ICA, *internal carotid artery*). Ebenfalls sind die Negativkontrollen (neg.Kontrolle; Kontroll-IgG anstelle des Primärantikörpers) und Positivkontrollen (pos. Kontrolle) gezeigt. Tonsille wurde für TUNEL, cCaspase-3, CD68 und Pankreas für die UPR-Marker und Elastase verwendet (Vergrößerung = 200x).

5.2.5 Kolokalisationsanalysen an humanen Karotisplaques

In Einzelfärbungen konnte zuvor gezeigt werden, dass sowohl die Elastase, Makrophagen, Apoptose und der UPR (Abbildung 5-29 - Abbildung 5-31) in humanen Karotisplaques signifikant erhöht sind. Um diese Befunde zu bekräftigen, wurden Kolokalisationsanalysen angefertigt. Zunächst sollte die UPR-Aktivierung in apoptotischen Zellen untersucht werden. Hierbei konnte bei Färbung angrenzender Gewebeschnitte mit einem CHOP Antikörper und einem TUNEL-Kit ein überwiegend identisches Färbemuster verzeichnet werden (Abbildung 5-36a), welches durch die semiquantitative Analyse bestätigt wurde (Abbildung 5-36b). Auch eine doppelimmunhistochemische Färbung mit KDEL (GRP78 / GRP94) und cCaspase-3 bestätigte die Kolokalisation von UPR-Markern mit apoptotischen Zellen (Abbildung 5-37a).

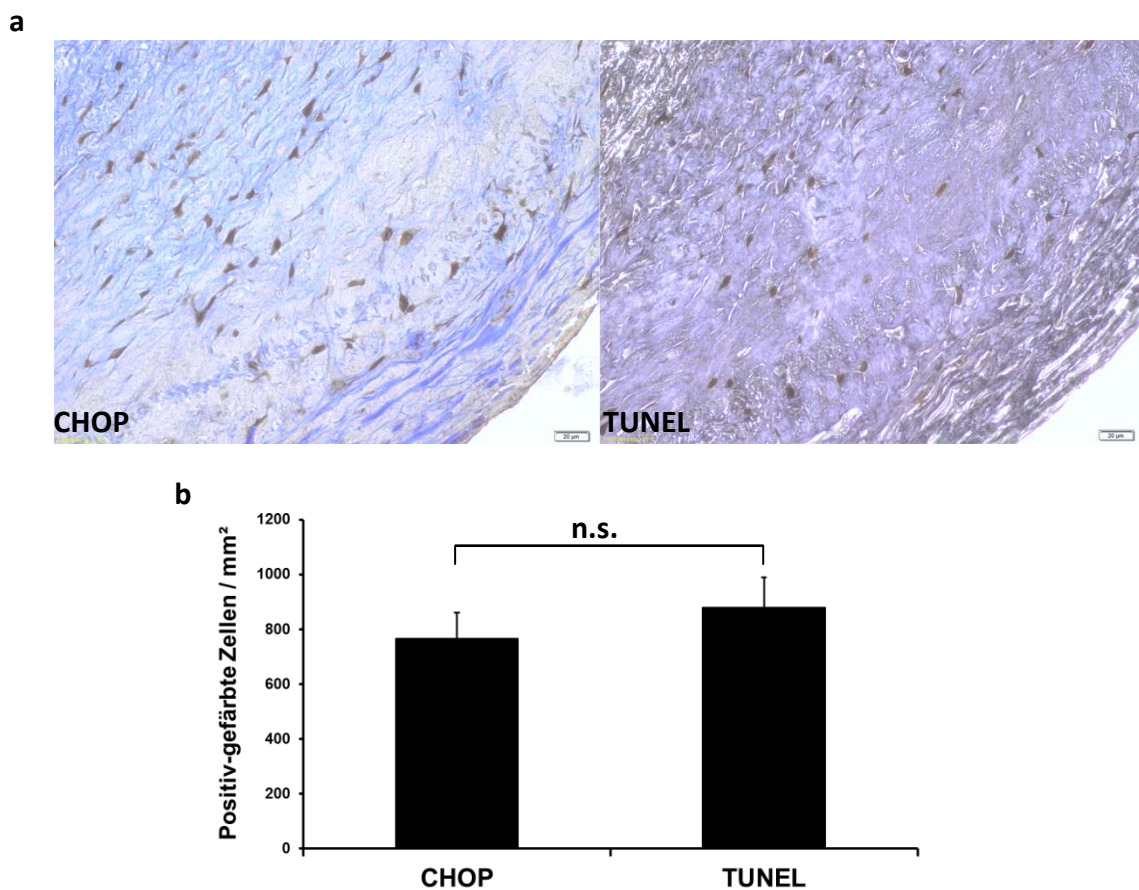


Abbildung 5-36: Kolokalisation von CHOP und TUNEL in angrenzenden Paraffinschnitten von humanen Karotisplaques. (a) Gezeigt ist jeweils ein repräsentatives Bild angrenzender Paraffinschnitte (Vergrößerung = 200x, Skalierung = 20 µm) mit positiver Braunfärbung der Marker CHOP und TUNEL. In (b) ist die semiquantitative Auswertung mit fünf weiteren Schnitten dargestellt (Mittelwert ± SEM; n.s.: $p > 0.05$; 1-way-ANOVA).

Es konnte außerdem mit Hilfe der Doppelimmunhistochemie gezeigt werden, dass es in glatten Muskelzellen (SMC) lediglich zu einer schwachen (Abbildung 5-37b, links), jedoch in den Makrophagen (CD68) zu einer starken UPR-Aktivierung kommt (Abbildung 5-37b, rechts).

Auch die Kolokalisation der Elastase mit Elastase-sekretierenden Makrophagen wurde in den Karotisplaques analysiert. Dabei zeigte sich eine deutliche Überlappung der beiden Marker (Abbildung 5-38a). Des Weiteren konnte eine Kolokalisation der Elastase mit dem UPR-Marker KDEL (GRP78 / GRP94) (Abbildung 5-38b) und der Apoptose (cCaspase-3) verzeichnet werden (Abbildung 5-38c). Diese Resultate untermauern die zuvor aufgestellte Hypothese, dass Elastase in humanen Karotisplaques die UPR-vermittelte Apoptose induziert, obgleich die Kausalität offen bleibt.

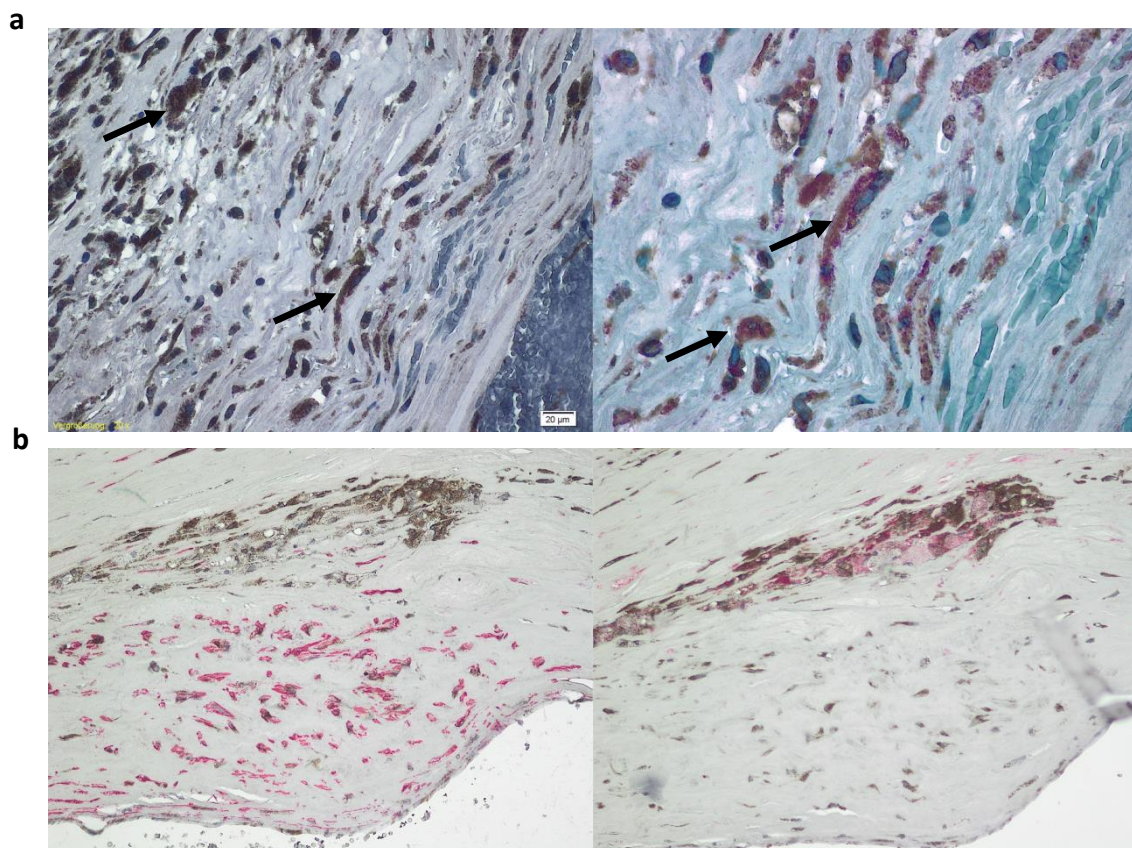


Abbildung 5-37: UPR-Marker KDEL (GRP78 / GRP94) kolokalisiert mit Apoptose-Marker cCaspase-3 und Makrophagen (CD68) in humanen Karotisplaques. (a) Um die Kolokalisation von Apoptose und UPR-Aktivierung in denselben Paraffinschnitten zu evaluieren wurden doppelimmunhistochemische Färbungen angefertigt. Der Apoptose-Marker cCaspase-3 ist in braun und der UPR-Marker KDEL (GRP78 / GRP94) in rot dargestellt. Die Pfeile zeigen die Doppelfärbungen in zwei repräsentativen Schnitten an (links 200x Vergrößerung, rechts 400x Vergrößerung). **(b)** Kolokalisationsanalyse zweier repräsentativer Paraffinschnitte mittels Doppelimmunhistochemie von UPR-Aktivierung (KDEL, braun) mit glatten Muskelzellen (α -Actin, rot) auf der linken Seite und von UPR-Aktivierung (KDEL, braun) mit Makrophagen (CD68, rot) auf der rechten Seite (Vergrößerung = 100x).

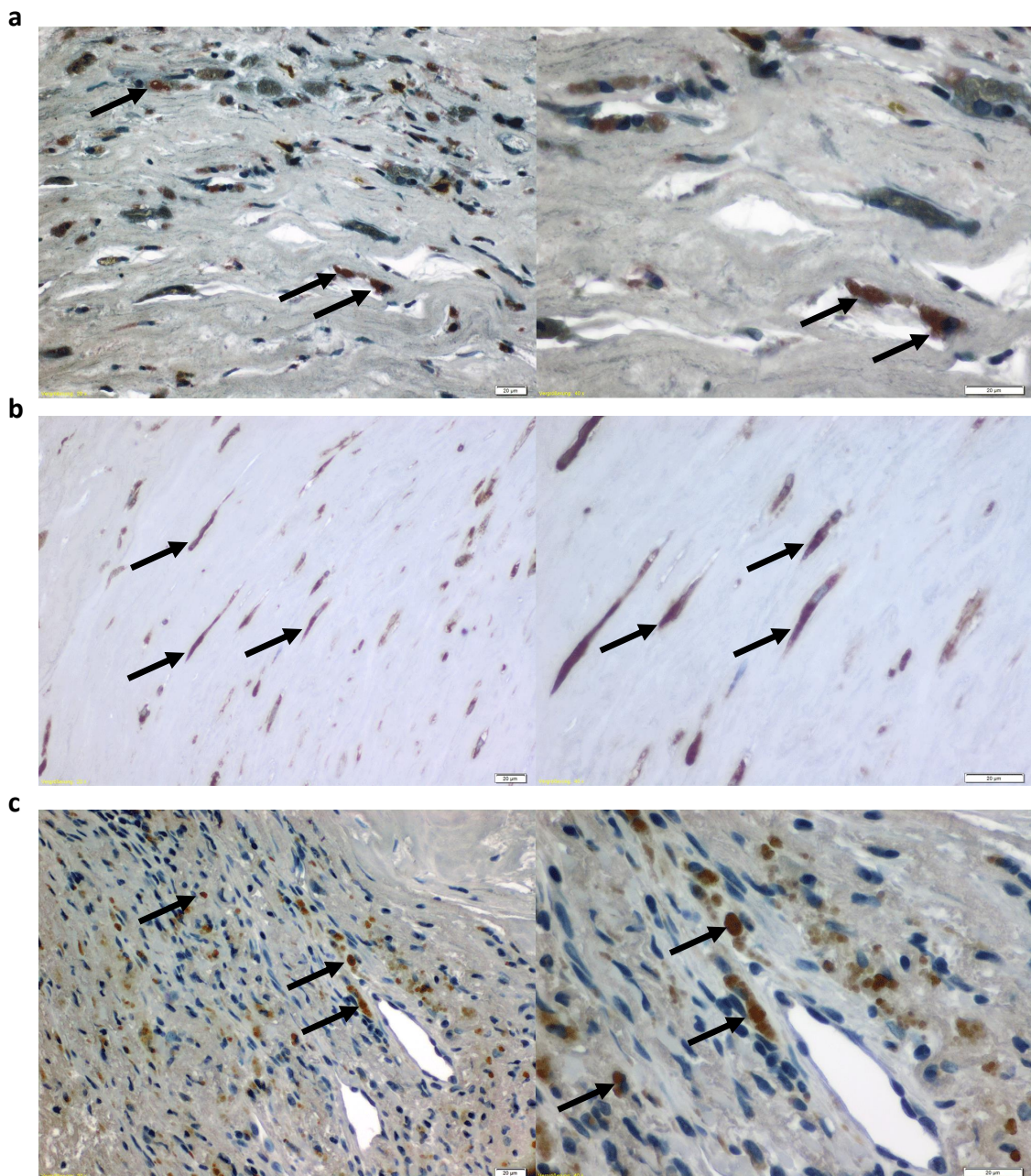


Abbildung 5-38: Elastase kolokalisiert mit Makrophagen (CD68), KDEL (GRP78 / GRP94) und Apoptose-Markern. (a) Um die mögliche Sekretionsquelle der Elastase zu eruieren wurden doppelimmunhistochemische Färbungen mit Elastase-(rot) und Makrophagen-Marker (braun) durchgeführt. Des Weiteren wurde die Kolokalisation von Elastase (rot) mit der UPR-Aktivierung (KDEL, braun) (b) und die von Elastase (rot) mit Apoptose (cCaspase-3, braun) (c) untersucht. Die Pfeile zeigen die Doppelfärbungen in jeweils zwei repräsentativen Schnitten an (links 200x Vergrößerung, rechts 400x Vergrößerung).

6 Diskussion

6.1 *In vitro* Charakterisierung der Rolle der Elastase in humanen Endothelzellen

Die neutrophile Elastase spielt eine entscheidende Rolle im Prozess der atherosklerotischen Läsionsprogression, jedoch waren die zugrunde liegenden zellulären Signalwege und die Art der Zellschädigung ebenso unbestimmt wie die primär reaktiven Zelltypen der Gefäßwand. In dieser Arbeit wurde erstmalig gezeigt, dass neutrophile Elastase in Endothelzellen die Autophagie und insbesondere den PERK-CHOP Arm des zellulären Stress-Signalwegs UPR aktiviert. Dies induziert nachfolgend die Expression des pro-apoptotischen Proteins CHOP, welches wiederum die endotheliale Apoptose bewirkt. Dieser *in vitro* Befund aus Zellkultur-Arbeiten korrelierte *ex vivo* mit Proben humaner Karotis-Plaques. Zudem legen die erlangten Befunde nahe, dass sich Endothelzellen in ihrer Reaktion auf Elastase von glatten Muskelzellen oder auch Makrophagen unterscheiden (Abbildung 6-1).

6.1.1 Elastase induziert Apoptose in humanen Endothelzellen

Elastase, eine von Makrophagen und Granulozyten sekretierte Serinprotease²³, wird als eigenständiger Mediator der atherosklerotischen Läsionsprogression angesehen²⁸. Die Elastase besitzt aufgrund ihrer pro-apoptotischen Wirkung auf Gefäßwandzellen und proteolytischen Eigenschaft der extrazellulären Matrix gegenüber hohes Pathogenitätspotential für die der Atherothrombose zugrunde liegenden Plaqueruptur bzw. –erosion^{28,29}. So konnte bereits in atherosklerotischen Plaques neutrophile Elastase in erhöhten Konzentrationen vorgefunden werden^{23,31}. Als auslösende Faktoren der Plaqueruptur bzw. –erosion werden erhöhte Zelltodraten u.a von Endothelzellen angesehen^{28,30}. Dass die Apoptose von Endothelzellen erheblich zur Instabilität von atherosklerotischen Plaques beiträgt, konnte in Untersuchungen an Kaninchen demonstriert werden, in denen eine Endothelzellapoptose zu luminalen Thrombusbildungen führte³¹. Obgleich in mehreren Studien adressiert^{29,33}, wurde die durch Elastase induzierte Art des

Zellstress oder Zelltod molekularbiologisch nur unzureichend analysiert bzw. ergab divergente Ergebnisse. Jedoch ermöglicht nur ein Verständnis der zellulären und molekularbiologischen Prozesse die Möglichkeit, diesen Prozess ggf. therapeutisch zu beeinflussen.

In dieser Arbeit wurde die Elastase-induzierte Apoptose anhand von drei unabhängigen Experimenten aufgedeckt. So konnte anhand der zeit- und dosisabhängigen Caspase-3/7-Aktivität in primären Endothelzellen (HAoEC) die Apoptose nachgewiesen und in der immortalisierten Endothel-Zelllinie EA.hy 926 wiederholt werden. Zusätzlich wurde die konfokale Lasermikroskopie (CLSM) verwendet, welche die Elastase-induzierten Doppelstrangbrüche aufzeigte. Abschließend konnte mit Hilfe des SubG1 Assays am FACS die DNA-Fragmentierung in den EA.hy 926-Zellen untersucht werden. Dies begründete die Schlussfolgerung, dass Elastase in Endothelzellen einen apoptotischen Zelltod induziert.

Um die Selektivität dieses Prozesses zu überprüfen, wurde dies von anderen Formen des Zelluntergangs differenziert. Der Verlust der Membran-Integrität ist typisch für eine nekrotische Form des Zelltods⁷⁸ und führt zur unkontrollierten Freisetzung intrazellulärer Komponenten wie z.B. der Laktatdehydrogenase (LDH). Die LDH-Aktivität in Überständen Elastase-behandelter Endothelzellen war jedoch nicht von Kontrollen zu unterscheiden, so dass eine Induktion der Nekrose ausgeschlossen werden kann. Auch die Nekroptose, ein Caspase-unabhängiger programmierter nekrotischer Zelltod⁷⁷ konnte nahezu ausgeschlossen werden, da der Nekroptose-Inhibitor Necrostatin-1 den Elastase-induzierten Endothelzelltod (Caspase-3/7-Aktivierung, SubG1) nicht verhinderte. So wäre bei einer Beteiligung der Nekroptose nach Inkubation mit dem pharmakologischen Inhibitor im SubG1 Assay ein reduzierter Zelltod nach Elastase-Behandlung zu erwarten, konnte hier jedoch nicht bestätigt werden. Da die Nekroptose eng mit dem extrinsischen Apoptose-Signalweg verbunden ist, können Zellen bei einer Blockierung der Nekroptose auf die Caspase-abhängige Apoptose ausweichen (siehe 1.3.2). Dieses wurde mit dem Caspase-3/7-Assay überprüft, wobei eine Erhöhung der Caspase-3/7-Aktivität nicht beobachtet werden konnte. Diese beiden read-outs geben somit keinen Anhalt für Beteiligung der Nekroptose in Endothelzellen nach einer Elastase-Behandlung.

6.1.2 Die Signalkaskade des Elastase-induzierten UPR

Nachdem gezeigt wurde, dass Elastase in EA.hy 926-Zellen Apoptose induziert, stellte sich die Frage nach dem intrazellulären Signalweg. Hierfür war es notwendig die proapoptotische Wirkung der Elastase genauer zu betrachten. Es gibt zahlreiche Hinweise, in denen der ER-Stress Signalweg UPR (*unfolded protein response*) mit atherosklerotischer Läsionsprogression sowie der Plaquestabilität in Verbindung gebracht wird^{46,30,42}. So konnte bereits in Tierversuchen der ER-Stress induzierte Zelltod mit einer atherosklerotischen Progression nachgewiesen werden^{46,30}, sowie eine Beteiligung in humanen kardiovaskulären Erkrankungen wie dem akuten Koronarsyndrom^{45,1,41}. Es fehlten jedoch Studien, welche die kausale Beziehung zwischen Elastase und UPR bzw. UPR und Elastase-induzierter Endothelzell-Apoptose auf das zerebrovaskuläre Syndrom beschreiben.

Der ER-Stress Signalweg UPR bestimmt das Zellüberleben in diversen Stress-Situationen und ist relevant bei inflammatorischen Prozessen und z.B. kardiovaskulären Erkrankungen^{43,135}. Damit stellt er einen wichtigen *therapeutisches Target* dar und wird in Kapitel 6.3 diskutiert. Von den drei Transmembranrezeptoren des UPR kann lediglich PERK (*protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase*) durch freies Cholesterin aktiviert werden³⁷. Dies spielt für die Atherosklerose eine wichtige Rolle und legte den Fokus dieser Arbeit auf PERK mit seinem nachgeschaltetem Signalweg. PERK induziert die Expression des pro-apoptotischen CHOP, das wiederum aktiviert die Caspase-3/7 und endet in der Apoptose (siehe 1.2)^{136,137,41}. So konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Elastase nach bereits 30 Minuten die endotheliale PERK- und nach 7 Stunden die eIF2 α -Phosphorylierung induziert. Auch wurden das UPR-Chaperon GRP78 und der UPR-Faktor sXBP1 erhöht vorgefunden. Dem ER-Chaperon GRP78 kommt eine anti-apoptotische und Homöostase-kontrollierende Rolle zu. Dieses besitzt u.a die Aufgabe die beim ER-Stress akkumulierenden ungefalteten oder missgefalteten Proteine neu zu falten oder diese für die Degradierung zugänglich zu machen. Ebenso konnte für den UPR-Faktor sXBP1 neben einer pro-apoptotischen, eine anti-apoptotische Wirkung mit Induktion von GRP78, sowie Proteindegredierung nachgewiesen werden¹³⁸. So verwundert es nicht, dass beide Faktoren nach einer Elastase-Behandlung in den Endothelzellen erhöht werden, um dem induzierten Stress entgegenzuwirken. Trotz der anti-apoptotischen Mechanismen der Endothelzellen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Elastase eine UPR-vermittelte Apoptose induziert. Zum einen war eine erhöhte CHOP-

Expression, sowohl auf mRNA, als auch auf Proteinebene, zu beobachten. Auch konnte mit Hilfe konfokaler Mikroskopie eine Kollokalisierung von CHOP und cCaspase-3 in EA.hy 926-Zellen nach Elastase-Behandlung gezeigt werden. Zum anderen schwächt eine Blockierung der CHOP-Expression durch RNA-Interferenz die nachfolgende Caspase-3/7-Aktivierung ab und reduzierte zudem den Zelltod. In vorherigen Studien konnte zwar in einem Mausmodell nach Inaktivierung von CHOP eine reduzierte Apoptose in atherosklerotischen Läsionen mit erhöhter Plaquestabilität demonstriert werden ¹³⁹, jedoch standen in jener Arbeit die Makrophagen stark im Vordergrund und es wurden keine Aussagen bzgl. endothelialer Prozesse gemacht. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Elastase die UPR-Aktivierung, und hier insbesondere die CHOP-Expression induziert, wodurch es zu einem erhöhten Zelltod von Endothelzellen kommt. Da der endotheliale Zelltod in atherosklerotischen Plaques zu einer Plaqueruptur oder auch Plaqueerosion, und schließlich zu einem Myokardinfarkt bzw. Apoplex führen kann, sind diese Befunde von hohem therapeutischem Nutzen zur Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen. Sowohl die Elastase, als auch die UPR-Faktoren werden im Kapitel 6.3 als *therapeutische targets* diskutiert.

In weiteren Studien müsste geklärt werden, ob weitere Faktoren des UPR, wie ATF6 und sXBP1 zu einer Erhöhung der CHOP-Expression führen (siehe 1.2) und an dem Elastase-induzierten Zelltod beteiligt sind. Weiterhin müsste aufgedeckt werden, ob anti-apoptotische Faktoren eine Rolle spielen. Denn die Apoptose kann neben der Aktivierung pro-apoptotischer Signalwege auch im Umkehrschluss durch Inhibition anti-apoptotischer Signalwege induziert werden ^{40,46}. Hierfür wäre die Untersuchung einer Suppression von relevanten anti-apoptotischen Signalwegen, wie der Bcl-2-Familie, der IAPs (Inhibitor of Apoptosis Proteine) und des Transskriptionsfaktors STAT3, welcher die Expression von Bcl-2 und IAP steuert, notwendig. Diese Ergebnisse könnten darauf schließen, ob Elastase eine Mitochondrien-abhängige (intrinsische) oder -unabhängige (extrinsische) Apoptose vermittelt. Unterstützend wären Versuche, die Auskunft über das mitochondriale Membranpotential und Cytochrom c Freisetzung geben.

6.1.3 Elastase-induzierte Autophagie in Endothelzellen

Autophagie ist – ähnlich dem UPR - ein vorwiegend zellprotektiver Signalweg, welcher jedoch bei andauernder Stimulation den Zelltod verursachen kann ¹¹⁶. Nachdem in dieser Arbeit zuvor Nekrose und Nekroptose als mögliche Zelltodarten ausgeschlossen werden konnten, wurde die Autophagie mittels FACS-Analysen untersucht. Einer 24-stündigen Behandlung der EA.hy 926-Zellen mit Elastase konnte eine Steigerung der LC3-II-Intensität beobachtet werden. Die Konversion von LC3-I zu LC3-II nimmt bei der Autophagosomen-Bildung eine wichtige Schlüsselrolle ein. So konnten vorherige Studien beschreiben, dass PERK-eIF2 α eine Beteiligung bei der Konversion von LC3-I zu LC3-II innehat ⁹⁰ und hier die erhöhte Induktion der LC3-II-Intensität erklären könnte. Zusätzlich konnte mit Hilfe einer weiteren FACS-Analyse, welche die Autophagie mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoff detektiert, eine über drei Tage zunehmende Intensität nach der Elastase-Behandlung detektieren. Diese Induktion geht mit der Caspase-3/7-Aktivierung und dem Zelltod konform, aber auch mit den induzierten UPR-Faktoren. Hierfür könnte der induzierte ATF4/CHOP-Signalweg des UPR eine Erklärung sein, welcher essentiell für die Stress-induzierte Autophagie ist ^{140,141,85,87}. Ein präziser Mechanismus, wie der UPR und die Autophagie interagieren ist jedoch bisher unbekannt. Die in dieser Arbeit demonstrierte Induktion der Autophagie legt eine Interaktion mit der Elastase-induzierten UPR-vermittelten Apoptose nahe. So geht der zellprotektive Signalweg, die Autophagie ^{142,143,144}, aufgrund des anhaltenden Stresses in einen pro-apoptischen Signalweg über, welcher im programmierten Zelltod endet ¹⁴⁴. In welcher Wechselbeziehung Apoptose und Autophagie bzw. Autophagie und UPR jedoch wirklich stehen gilt in nachfolgenden Studien zu untersuchen. So könnte eruiert werden, ob eine Inhibition der Autophagie den Zelltod mindert und die Elastase-induzierte UPR-Antwort beeinflusst. Dafür könnte mit Hilfe des Inhibitors 3-Methyladenin (3-MA) die Autophagie gehemmt und der Zelltod, sowie die Expression von UPR-Faktoren untersucht werden. Zusätzlich sollte eine Inhibition der Autophagie mit siRNA gegen ATG5 (*autophagy related gene 5*) durchgeführt werden.

6.1.4 PAR-1 und PAR-2 sind nicht an dem Elastase-induzierten Zelltod beteiligt

Nachdem demonstriert werden konnte, dass die katalytische Wirksamkeit der Elastase für die UPR-vermittelte Apoptose unerlässlich ist, stellte sich die Frage nach dem beteiligten Rezeptor. In früheren Studien fanden sich im Hinblick auf die Elastase-induzierte Apoptose starke Hinweise für eine Beteiligung des PAR-1 Rezeptors^{118,119}. Dieser gehört zu einer Gruppe von 4 Transmembran-Rezeptoren (PAR-1 bis -4), die eine Rolle bei inflammatorischen Prozessen und bei der kardiovaskulären Erkrankungen spielen^{100,102}. In Bezug auf kardiovaskuläre Fragestellungen scheint PAR-1 ein vielversprechender Kandidat zu sein. So konnte gezeigt werden, dass der Rezeptor auf Endothelzellen exprimiert^{99,120,121} wird, bei der Endothelzellapoptose mitwirkt¹²² und zudem Schnittstellen für Elastase aufweist^{100,101}. PAR-1 besitzt in Bezug auf kardiovaskuläre Fragestellungen einen hohen klinischen Stellenwert, da der spezifische pharmakologische PAR-1 Antagonist Vorapaxar (ZONTIVITY®) in zwei Post-Hoc Studien (TRACER und TRA 2°P-TIMI 50) - zum Koronarsyndrom und der Atherosklerose - reduzierte atherothrombotische Ereignisse aufweisen konnte^{145,146}. Jedoch konnte in der vorliegenden Arbeit eine Beteiligung des PAR-1 an Elastase-induzierter UPR / Apoptose in Endothelzellen ausgeschlossen werden. So hatte der PAR-1-*Knockdown* weder Einfluss auf die Elastase-vermittelte Induktion der UPR-Faktoren sXBP1, GRP78 und CHOP, noch auf den Zelltod. Somit kann eine Beteiligung des PAR-1 Rezeptors bei der Elastase-induzierten, UPR-vermittelten Apoptose vermutlich ausgeschlossen werden. Auch schien der PAR-2 Rezeptor ein guter Kandidat für eine Beteiligung in der Elastase-induzierten Apoptose zu sein. Ebenso wie PAR-1 wird dieser auf Endothelzellen exprimiert^{102,99,120} und kann durch Elastase aktiviert werden^{123,124,125}. Doch auch hier zeigte sich, dass die Inaktivierung des PAR-2 Rezeptors mit Hilfe eines blockierenden Antikörpers^{105,106,107} die Apoptose von Endothelzellen nicht verhindern konnte. Um experimentelle Fehler auszuschließen, sollte der effektive *Knockdown* des PAR-2 nach Behandlung mit dem blockierenden Antikörper mittels Western Blot Analysen und / oder FACS untersucht werden. Da diese Experimente an der immortalisierten Zelllinie EA.hy 926 durchgeführt wurden und eine veränderte Expression der Rezeptoren auf primären HAOECs nicht ausgeschlossen werden kann, empfiehlt es sich diese Experimente an den primären Zellen zu wiederholen, um mögliche Interpretationsfehler auszuschließen.

Obgleich das benutzte Protokoll auf publizierten Daten basiert, liegt ein weiterer Schwachpunkt im experimentellen Vorgehen darin, dass die erfolgreiche Blockade des PAR-2 nicht durch eine Positivkontrolle verifiziert wurde. Folglich basieren die Schlussfolgerungen zur Beteiligung von PAR-1 und PAR-2 nur auf jeweils einem experimentellen Ansatz. Zudem kann nicht ausgeschlossen werden, dass beide Rezeptoren gleichzeitig involviert sind und kompensatorisch wirken, da jeweils nur einer der beiden inhibiert worden ist, auch wenn es für diese Option aktuell keinen begründeten Anhalt gibt.

6.1.5 Elastase induziert UPR-vermittelte Apoptose spezifisch in Endothelzellen

Für kardiovaskuläre Erkrankungen ist bereits die ER-Stress-induzierte Apoptose in Makrophagen und glatten Muskelzellen der Gefäßwand (SMCs) beschrieben. So zeigten Studien in humanen Koronarplaques eine starke Expression der UPR-Faktoren CHOP und GRP78 mit anschließender Apoptose in SMCs und Makrophagen⁴⁵. Auch in atherosklerotischen Plaques von Apolipoprotein (Apo)E-defizienten Mäusen konnten diese Befunde bestätigt werden⁴⁴. Da der ER-Stress als ein Hauptfaktor in der Instabilität und Vulnerabilität von atherosklerotischen Plaques angesehen wird³⁰ und auch in einem Mausmodell demonstriert werden konnte¹⁴⁷, stellte sich die Frage nach der Rolle / Wirkung der Elastase in SMCs und Makrophagen. Daher wurden die in Endothelzellen involvierten Signalwege UPR, Autophagie und Apoptose in gleicher Weise in glatten Muskelzellen aus der koronaren Arterie (HCASMCs) und Makrophagen (mPM) analysiert.

In primären HCASMCs induzierte Elastase den UPR Signalweg. Hier zeigten die UPR-Faktoren sXBP1 und CHOP ähnliche Intensitäten der mRNA-Expression wie bei den Endothelzellen. Lediglich das Chaperon GRP78 verzeichnete ab dem zweiten Tag eine 7-fache Erhöhung der Expression in Vergleich zu den EA.hy 926-Zellen. Wie bereits zuvor erwähnt nimmt GRP78 eine anti-apoptotische Funktion in der Zelle ein und kann vermutlich in den HCASMCs dem Elastase-induzierten Stress stärker entgegen wirken als in den Endothelzellen^{142,143,144}. Auch ist der zellprotektive Signalweg, die Autophagie, deutlich induziert und demonstriert ebenfalls die anti-apoptotische Wirkung der Zellen gegen den Elastase-induzierten Stress. Denn obwohl die CHOP-Expression in den HCASMCs vergleichbar zu der in den Endothelzellen ist, konnte in dieser Arbeit weder in HCASMCs noch in Makrophagen ein

Zelltod beobachtet werden. Dies ist zwar in Anbetracht der vorliegenden Studie von Oltmanns *et. al.*³² überraschend, könnte aber an den dort verwendeten humanen glatten Muskelzellen aus den Atemwegen liegen. Diese Zellen verhalten sich möglicherweise anders als SMCs aus der Koronararterie, welche hier in dieser Arbeit verwendet wurden. Auch liegt die Vermutung nahe, dass zwar Stressoren, wie 7-Ketocholesterol und freies Cholesterin in vaskulären Gefäßzellen eine CHOP-vermittelte Apoptose zu induzieren vermögen^{148,149,30}, jedoch Elastase in diesen Gefäßzellen keine UPR-vermittelte Apoptose hervorrufen kann. Zwar zeigte sich eine deutliche Induktion der mRNA, aber es bleibt unklar, wie stark dies auf Proteinebene ausfällt. Zudem sind noch weitere Analysen nötig, um die genaue Rolle der Elastase in HCASMCs und Makrophagen zu klären. Hierbei könnte zunächst überprüft werden, ob die Zellen evtl. einen Caspase-unabhängigen Zelltod sterben und welcher Zelltodtypus beteiligt ist. Caspase-unabhängige Methoden, wie eine Annexin V / 7-AAD-Färbung für FACS als auch TUNEL-Methode für konfokale Lasermikroskopie, bieten sich hierfür an. Da in fortgeschrittenen Plaques Makrophagen nekrotisch werden^{13,150,151} und ein Absterben von SMCs zu einem zunehmenden nekrotischen Kern führt¹⁵², ist eine Untersuchung der Nekrose und Nekroptose sinnvoll. Des Weiteren müsste in Makrophagen auch die Expression der UPR-Faktoren nach Elastase-Behandlung ermittelt werden. Zusätzlich sind weitere Experimente an SMCs und Makrophagen nötig, um die explizite Rolle der Autophagie im Elastase-vermittelten Signalweg zu klären. Zwar wurde in SMCs nach 7-Ketocholesterol-Behandlung Autophagie beobachtet und ein Zelltodmechanismus diskutiert¹⁵³, so wird jedoch die Rolle der Autophagie als Zelltod- bzw. Zellprotektivermechanismus bis heute kontrovers angesehen und kann bisher nicht eindeutig geklärt werden⁸⁶. Denn ob die Autophagie oder andere Zelltodarten nach Elastase-Behandlung das Überleben oder den Tod der Zellen vermittelt, ist gerade im Hinblick auf atherosklerotische Plaques besonders wichtig. Das Absterben der Gefäßwandzellen würde unweigerlich zu einer Destabilisierung der atherosklerotischen Plaques führen^{43,23,45}, wohingegen das Überleben der Zellen die Stabilität der Plaques sichern könnte. So ist beispielsweise bekannt, dass sowohl Apoptose, aber auch ein Verlust der Autophagie in vaskulären SMCs die zur reduzierten Kollagenproduktion führt, die Plaquestabilität negativ beeinflusst^{154,152,155}. Aber auch in Mäusen mit einer Makrophagen-spezifischen ATG5-Deletion und somit einer Blockierung der Autophagie, konnten in den Plaques eine erhöhte Apoptose, oxidativer Stress und Nekrose nachgewiesen werden¹⁵⁶. Eine Induktion der Autophagie hingegen durch mTOR-Inhibitoren

wie z.B. Tacrolimus oder Everolimus, führen mittels autophagischen Zelltod zu einer Reduktion von Makrophagen und folglich zu einer Stabilisierung der Plaques, wobei SMCs unbeeinträchtigt bleiben^{157,158,159}. Denn es wird generell angenommen, dass Makrophagen bei der Destabilisierung und Ruptur von atherosklerotischen Plaques eine Rolle spielen, wohingegen SMCs zur Plaquestabilität beitragen¹⁶⁰. Der Eingriff in die Autophagie muss jedoch auch kritisch betrachtet werden. So führt die Induktion der Autophagie in Makrophagen ebenfalls zu einer verstärkten Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-6, Rantes oder TNF α . Dieser Cocktail an Zytokinen hat wiederum das Potential in SMCs Zelltod zu induzieren und erhöhen die inflammatorische Infiltration von Leukozyten in die Plaques¹⁵⁸.

6.2 Charakterisierung des Einflusses der Elastase auf die atherosklerotische Läsionsprogression

Erstmalig konnte der im Rahmen dieser Arbeit aufgedeckte UPR-vermittelte Signalweg der Elastase an humanem Plaquematerial der Arteria carotis interna gezeigt werden. Zahlreichen Hinweisen zufolge wird der ER-Stress Signalweg UPR mit atherosklerotischer Läsionsprogression als auch der Plaquestabilität in Verbindung gebracht^{46,30,42}. Bereits in Tierversuchen konnte der ER-Stress-induzierte Zelltod mit einer atherosklerotischen Progression assoziiert werden^{46,30}. Jedoch findet sich lediglich eine Studie, die eine Beteiligung des ER-Stress in humanen kardiovaskulären Erkrankungen wie dem akuten Koronarsyndrom beschreibt⁴⁵. Somit fehlten bisher Studien, welche die kausale Beziehung zwischen UPR und Elastase-induzierte Apoptose auf das zerebrovaskuläre Syndrom untersuchen. Dies und die biomedizinische Relevanz für den Menschen wird im Folgenden diskutiert.

Akute ischämische Ereignisse sind in etwa zu 70% der Fälle auf Plaquerupturen zurückzuführen, daher lag der Fokus dieser Arbeit auf humanen Ruptur-gefährdeten Karotisplaques. Daher wurden die im Rahmen gefäßchirurgischer Karotisendarterektomie der Halsschlagader entnommenen Gewebeproben anhand von HE- und Masson-Goldner-Färbungen histopathologisch untersucht und mit Hilfe der Kriterien der Oxford Plaque-Studie

selektiert, welche zur Klassifizierung von Karotisplaques gelten. Analog dieser Kriterien gilt ein Plaque als Ruptur-gefährdet, wenn die repräsentative Kappendicke eines Plaques einen Grenzwert von 500 μm und die minimale Kappendicke einen Wert von 200 μm nicht überschreitet ¹¹², sowie die Größe des nekrotischen Kerns über 25 % der Gesamt-Plaquerfläche liegt ¹³⁰. Von 40 Patienten entnommene Gewebeproben erfüllten 10 diese Kriterien und bei Anwendung der AHA-Klassifikation nach Stary *et al.* ¹¹³ konnten drei Karotis-Proben in die Gruppe IV (Atherom mit nekrotischem Kern; asymptomatisch) und sieben in die Gruppe VI (Läsion mit Oberflächendefekt; symptomatisch) eingeteilt werden.

Die 10 Ruptur-gefährdeten Karotisplaques wurden für die weiteren Untersuchungen verwendet und so konnte in der Schulterregion anhand immunhistologischer Färbungen vermehrt Elastase- und Makrophagen-positive Zellen in fast identischer Menge identifiziert werden. Zwei Studien wurden ebenfalls erhöhte Konzentrationen der Elastase und polymorphkernige neutrophile Leukozyten in Karotisplaques aufgezeigt ^{23,31}, und untermauern die in dieser Arbeit gefundenen Daten. Dies legt die Vermutung nahe, dass Makrophagen an der Sekretion der Elastase beteiligt sind, was in der Schulterregion mit einer starken inflammatorischen Aktivität einhergeht. Es mehren sich auch Hinweise, dass Granulozyten ebenfalls an der Sekretion von Elastase beteiligt sein könnten ^{127,128}. Jedoch konnte dies in dieser Arbeit nicht bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Auch die fast identische Anzahl an Makrophagen- und der Elastase-positiven Zellen sprechen potentiell dagegen.

Des Weiteren wurden in dieser Arbeit erhöhte Zelltod-Raten in den Plaques aufgedeckt, welche ein Schlüsselement der Plaqueprogression in Richtung Ruptur darstellen. Dies lässt die Vermutung nahe, dass die sekretierte Elastase in der Schulterregion vermehrt zum Absterben der umliegenden Zellen führt. Die Beteiligung andere Proteasen wie der Matrix Metalloproteinasen (MMPs) können jedoch nicht ausgeschlossen werden und bedarf weiterer Experimente. So ist beschrieben, dass neutrophile Elastase zur Aktivierung von MMPs beitragen kann und diese gemeinsam die extrazelluläre Matrix eines Plaques degradieren ¹³³.

Erstmals konnte hier die Aktivierung des pro-apoptischen UPR-CHOP Signalweges in Karotisplaques demonstriert werden. Hierbei lag der Fokus auf vier etablierten UPR-Faktoren, welche im PERK-CHOP Signalweg involviert sind: GRP78 und GRP94 (detektiert mittels C-terminaler Retentionssequenz KDEL) ^{161,45,162}, ATF3 ^{134,137,163} und CHOP ^{45,162}. Für

einen zusätzlichen Beleg der CHOP-Expression wurde CHAC-1, ein nachgeschalteter pro-apoptotischer Transkriptionsfaktor, hinzugenommen¹³⁴. Auch ein CHOP Western Blot aus humanem Plaquematerial bestätigte die immunhistochemischen Befunde und bekräftigte nochmals die gesteigerte Expression dieses pro-apoptotischen Faktors und damit die Aktivierung des UPR in der Schulterregion der Karotisplaques. Da sich in der Schulterregion ein hoher Makrophagenanteil befindet²³, wurden zudem die Endothelzellen in den Karotisplaques auf ihre Elastase, UPR-Aktivierung und Apoptose untersucht, und konnten folglich erhöht vorgefunden werden. Dies bekräftigt wiederum die zuvor in dieser Arbeit beschriebenen *in vitro* Ergebnisse. Um die Daten zu verifizieren, wäre eine Erhöhung der Patientenzahlen ratsam, da bei der Anfertigung der Paraffinschnitte die einschichtige Endothelzellschicht nicht immer intakt bleibt. Des Weiteren bestätigten Kolokalisationsanalysen an Karotisplaques, dass die UPR-Aktivierung mit der Apoptose, übereinstimmend und erhöht exprimiert vorzufinden ist. Auch konnte gezeigt werden, dass die UPR-Aktivierung überwiegend in den Makrophagen und weniger in den SMCs lokalisiert ist, da diese auch seltener in der Schulterregion vorkommen^{23,45}. Die zusätzlich angefertigten Kolokalisationsanalysen von Elastase mit Makrophagen-, UPR- oder Apoptose-Markern untermauerten die vorherigen Befunde der Einzelfärbungen. Diese immunhistochemischen Färbungen implizieren verstärkt, dass die Elastase von Makrophagen sekretiert wird, was zu einer Induktion des UPR und schließlich zum Zelltod der umliegenden vaskulären Zellen führt. Auch hier wären weitere Analysen an den Endothelzellen, sowie die generelle Erhöhung der Patientenzahlen empfehlenswert.

Eine Einschränkung der immunhistochemischen Auswertung liegt möglicherweise in der Zusammenfassung der beiden unterschiedlichen Stary Plaque-Typen (Gruppe IV und Gruppe VI). Hiermit wurden Plaquemorphologie und individueller klinischer Status (asymptomatisch und symptomatisch) zusammengenommen, zeigten jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen auf. Um aber mögliche Interpretationsfehler ausschließen zu können wären in weiteren Analysen eine Trennung der Gruppen sowie die Erhöhung der Patientenzahlen empfehlenswert. Auch war es aufgrund der operativen Karotisendarterektomie (hochgradiger Stenose) nicht möglich eine Kontrollgruppe mit einem früheren Stadium der Plaqueentwicklung (moderate Stenose) einzuschließen. Kritisch betrachtet besteht daher die Möglichkeit, dass die Aktivierung der Apoptose und des UPR,

die in dieser Arbeit beobachtet wurden, zum Teil auch auf ein Plaque Remodeling (im Gefäß stattfindende Umbauprozesse) zurückzuführen sind.

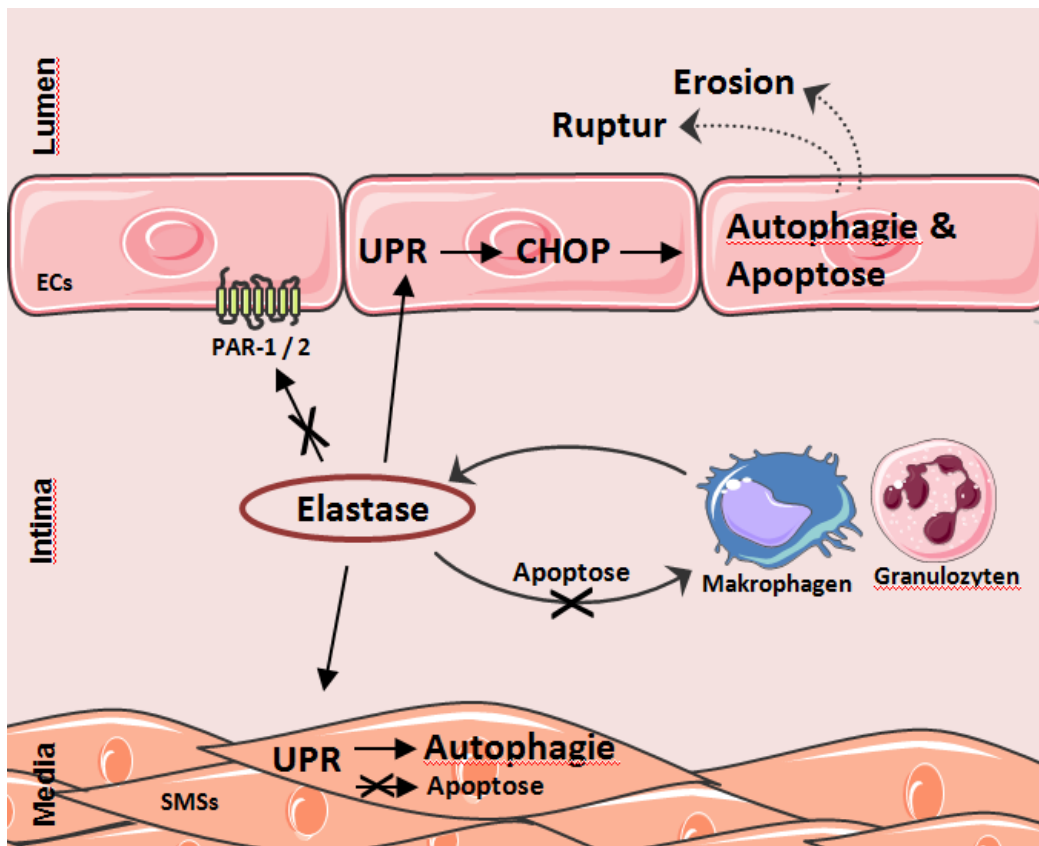


Abbildung 6-1: Zusammenfassung der Ergebnisse. Die von Makrophagen und Granulozyten sekretierte Elastase aktiviert in Endothelzellen (ECs) den PERK-CHOP Signalweg des *unfolded protein response* (UPR) und induziert sowohl Autophagie als auch Apoptose. Dies kann folglich die der Atherothrombose zugrunde liegenden Plaqueruptur bzw. -erosion hervorrufen. Eine mögliche Beteiligung der Protease-aktivierten Rezeptoren (PAR)-1/2 in ECs konnte ausgeschlossen werden. Auch aktiviert die neutrophile Elastase den UPR in glatten Muskelzellen (SMCs) und induziert Autophagie, jedoch keine Apoptose. In Makrophage vermag die Elastase hingegen keine Apoptose zu induzieren.

Von einer Verifizierung der *in vitro* und *ex vivo* Ergebnisse dieser Arbeit in Mausmodellen wurde abgesehen. Es gibt bereits hinreichende Belege in ApoE- und Ldlr-defizienten Mäusen, dass eine Aktivierung des PERK-CHOP-Signalweges des UPR in atherosklerotischen Läsionen stattfindet und die Ausbildung eines nekrotischen Kerns fördert^{44,147,161}. Auch Experimente an CHOP-defizienten Mäusen würden lediglich bereits existierenden Daten duplizieren, in denen sowohl eine Reduktion der Apoptoserate als auch der Plaqueprogression aufgezeigt werden konnte^{139,164}. Um die Rolle der Elastase in einem Tiermodell zu untersuchen wäre eine Doppel-*Knockout*-Maus mit einer Elastase-Defizienz und einem atherogenem Hintergrund (ApoE- oder Ldlr-Defizienz) denkbar. Dieses Modell ist bisher jedoch weder in der Literatur beschrieben noch kommerziell erhältlich.

6.3 Elastase und ER-Stress als *therapeutisches Target*?

Die im Rahmen dieser Arbeit aufgedeckten Ergebnisse ermöglichen eine neue Sicht auf das Pathogenitätsprofil der neutrophilen Elastase. So war zwar bekannt, dass diese aufgrund ihrer proteolytischen Eigenschaften auf die extrazelluläre Matrix und pro-apoptotischen Wirkung auf Gefäßwandzellen eine entscheidende Rolle im Prozess der atherosklerotischen Plaqueprogression spielt, jedoch waren die zugrunde liegenden zellulären Signalwege und die Art der Zellschädigung ebenso unbestimmt wie die primär reaktiven Zelltypen der Gefäßwand. Hier konnte erstmalig gezeigt werden, dass in humanen Ruptur-gefährdeten Karotisplaques die neutrophile Elastase mit Markern des UPR und der Apoptose kolokalisiert. Des Weiteren konnte die Elastase in Endothelzellen den PERK-CHOP Arm des zellulären Stress-Signalweges UPR aktivieren und zur Expression des pro-apoptotischen Proteins CHOP beitragen, wodurch es zu einer erhöhten endothelialen Apoptose kommt. Da der Elastase-induzierte Zelltod von Endothelzellen in atherosklerotischen Plaques nicht nur eine Plaqueruptur, sondern auch eine Plaqueerosion erklären kann, welche zu einem Myokardinfarkt bzw. Apoplex führen, sind diese Befunde von hohem therapeutischem Nutzen zur Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen und untermauern stark einen potentiellen Einsatz pharmakologischer Elastase-Inhibitoren²⁸.

So wird Sivelestat (Elaspol®), ein in Japan zugelassener Inhibitor der humanen neutrophilen Elastase, bereits bei akutem Lungenversagen und ischämischen Reperfusionsschäden eingesetzt¹⁷¹ und vorläufige Studien belegen ebenfalls eine Verbesserung bei Nervenschmerzen¹⁷². Ein weiterer Inhibitor, AZD9668, wurde bereits in zwei klinischen Studien zu chronisch entzündlicher Lungenerkrankung untersucht. Diese Medikamente könnten möglicherweise auch bei kardiovaskulären Erkrankungen einen therapeutischen Nutzen aufweisen. Neben diesen Inhibitoren wird nun auch rekombinantes Elafin, ein endogener neutrophile Elastase-Inhibitor, bereits erfolgreich in klinischen Studien bei Gefäßschädigungen untersucht¹⁷³. So konnte in Tiermodellen schon gezeigt werden, dass eine Elafin-Überexpression die Infiltration von Neutrophilen und der damit verbundenen Elastase-Aktivität deutlich reduzieren konnte¹⁷⁴. Aufgrund der wichtigen Rolle der Elastase im Menschen sind weitere Inhibitoren bereits in der Entwicklung und Testung¹⁷⁵.

Auch sind eine Reihe von Therapeutika, die auf molekulare Komponenten des ER-Stress und auf ER-Stress-induzierte Apoptose abzielen, bereits bekannt⁴⁰. Der UPR kann auf zwei Arten

beeinflusst werden. Zum einen mittels Aktivierung von Komponenten des adaptiven UPR-Mechanismus und zum anderen durch die Inaktivierung von denen, die in die pro-apoptischen Prozesse überleiten. Zu ersterem gehören u.a. GRP78, GRP94, Proteasome oder chemische Chaperone. Chemische Chaperone stabilisieren Proteine in ihrer nativen Konformation, indem sie die Eigenschaften nativer ER-Chaperone nachahmen¹⁶⁵. So wiesen murine Makrophagen nach Behandlung mit chemischen Chaperonen eine erhöhte Resistenz gegen ER-Stress auf¹⁶⁶ und verlangsamten die Läsionsprogression in Ldlr-defizienten Mäusen¹⁶⁷. Die Substanz Salubrinal ist ein indirekter Inhibitor von eIF2 α , da es die eIF2 α Dephosphorylierung verhindert und dadurch die über phospho-eIF2 α induzierte Blockierung der Proteinsynthese aufrechterhält^{168,169}. So konnte gezeigt werden, dass Salubrinal in Myozyten aus dem Herzen in der Lage ist die ER-Stress induzierte Apoptose zu verhindern, indem es die Synthese des pro-apoptischen CHOP und der Caspase-12 inhibiert und GRP78 in Neuronen aktiviert^{170,168}. Jedoch aktiviert Salubrinal in Pankreatischen β -Zellen den ATF4-CHOP Mechanismus, was zu einem gesteigertem ER-Stress und Apoptose führt¹⁶⁹. Dadurch, dass verschiedene Zelltypen unterschiedlich auf Salubrinal ansprechen, limitiert dies Salubrinal in seinem therapeutischen Nutzen bzw. der therapeutischen Breite¹⁷⁰. Die genauen Mechanismen der einzelnen Substanzen sind bisher nicht vollständig bekannt und bedürfen weiterer Untersuchungen. Da CHOP entscheidend bei der Induktion der ER-Stress-vermittelten Apoptose beteiligt ist, wäre die Entwicklung von CHOP-Inhibitoren von großem Nutzen in der Prävention von Atherosklerose¹³⁹. Bis heute sind keine pharmakologischen Agenzien spezifisch für CHOP vorhanden. In Anbetracht möglicher anti-ER-Stress Strategien darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass der UPR auch ein anti-apoptischer Signalweg ist. Somit ist es eine Notwendigkeit zu verstehen, wie der UPR mit anderen Signalwegen interagiert, um für den anti-apoptischen Signalweg genutzt werden zu können. Die in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse heben das pathophysiologische Potential des ER-Stresses in der Plaqueprogression hervor³⁰ und unterstützen dadurch das Bestreben, den ER-Stress als potentiell *therapeutisches Target* in der Prävention von kardiovaskulären Erkrankungen einzubinden^{41,40}.

7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der humanen neutrophilen Elastase in der atherosklerotischen Läsionsprogression untersucht. Die Elastase wird aufgrund ihrer pro-apoptotischen Wirkung auf Gefäßzellen, sowie ihrer proteolytischen Eigenschaften auf die fibröse Kappe atherosklerotischer Plaques als eigenständiger Mediator der Läsionsprogression angesehen. Damit besitzt die von Makrophagen und Granulozyten sekretierte Elastase hohes Pathogenitätspotential für die Atherosklerose zugrunde liegende Plaqueruptur und Plaqueerosion.

Es wurden der noch ungeklärte Mechanismus der Elastase und die Beteiligung möglicher Rezeptoren an der Läsionsprogression untersucht. In diesem Rahmen konnte erstmals gezeigt werden, dass Elastase in Endothelzellen die Aktivierung des pro-apoptotischen Signalweges PERK-CHOP des UPR, sowie die Apoptose induziert und dem UPR eine kausale Beteiligung an der Elastase-induzierten Apoptose zugeschrieben werden. Andere Zelltodarten, wie Nekrose und Nekroptose, konnten hingegen ausgeschlossen werden. Gleichzeitig wurde eine gesteigerte Aktivität der Autophagie gezeigt, welche vermutlich durch den UPR hervorgerufen wurde. Eine mögliche Beteiligung der Rezeptoren PAR-1 und PAR-2 konnte ausgeschlossen und eine Endothelzell-spezifische UPR-vermittelte Apoptose der Elastase gegenüber anderen vaskulären Gefäßzellen demonstriert werden. Die hier erlangten Daten liefern wertvolle Hinweise auf die Rolle der Elastase und des UPR in kardiovaskulären Erkrankungen. Kürzlich wurde aufgedeckt, dass neutrophile Elastase in Karotisplaques vermehrt vorkommt und in dieser Arbeit zusätzlich bestätigt. Auch wurde hier erstmalig gezeigt, dass in humanen Ruptur-gefährdeten Karotisplaques der pro-apoptotische ER-Stress Signalweg PERK-CHOP aktiviert ist und sowohl mit Elastase als auch mit Apoptose kolokalisiert. Die Ergebnisse belegen eine pathophysiologisch-bedeutende Rolle der Elastase-induzierten UPR-vermittelten Apoptose in der Atherosklerose und geben Aufschluss über den potentiell beschleunigten Einfluss auf die Läsionsprogression in Plaque.

Die Aufklärung des zugrunde liegenden Signalweges / Mechanismus unterstützt den ER-Stress als potentielles therapeutisches Target in der Prävention von kardiovaskulären Erkrankungen und zeigt eine mögliche Ausweitung des Einsatzspektrums von Elastase- bzw. UPR-Inhibitoren auf.

8 Literatur

1. Dickhout JG, Colgan SM, Lhotak S, Austin RC. Increased endoplasmic reticulum stress in atherosclerotic plaques associated with acute coronary syndrome: A balancing act between plaque stability and rupture. *Circulation*. 2007;116:1214-1216
2. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature*. 2000;407:233-241
3. Williams KJ, Tabas I. The response-to-retention hypothesis of early atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15:551-561
4. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115-126
5. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. 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*. 1994;89:2462-2478
6. Ross R, Glomset J, Harker L. Response to injury and atherogenesis. *Am J Pathol*. 1977;86:675-684
7. Tabas I, Garcia-Cardena G, Owens GK. Recent insights into the cellular biology of atherosclerosis. *J Cell Biol*. 2015;209:13-22
8. Hansson GK, Libby P, Tabas I. Inflammation and plaque vulnerability. *J Intern Med*. 2015;278:483-493
9. Taniyama Y, Griendling KK. Reactive oxygen species in the vasculature: Molecular and cellular mechanisms. *Hypertension*. 2003;42:1075-1081
10. Blankenberg S, Barbaux S, Tiret L. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2003;170:191-203
11. Daugherty A, Webb NR, Rateri DL, King VL. Thematic review series: The immune system and atherogenesis. Cytokine regulation of macrophage functions in atherogenesis. *J Lipid Res*. 2005;46:1812-1822
12. Schrijvers DM, De Meyer GR, Kockx MM, Herman AG, Martinet W. Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages is impaired in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:1256-1261
13. Tabas I. Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis: The importance of lesion stage and phagocytic efficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:2255-2264
14. Libby P. Molecular and cellular mechanisms of the thrombotic complications of atherosclerosis. *J Lipid Res*. 2009;50 Suppl:S352-357
15. Farb A, Burke AP, Tang AL, Liang TY, Mannan P, Smialek J, Virmani R. Coronary plaque erosion without rupture into a lipid core. A frequent cause of coronary thrombosis in sudden coronary death. *Circulation*. 1996;93:1354-1363
16. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. *N Engl J Med*. 1997;336:973-979
17. Simes J, Furberg CD, Braunwald E, Davis BR, Ford I, Tonkin A, Shepherd J. Effects of pravastatin on mortality in patients with and without coronary heart disease across a broad range of cholesterol levels. The prospective pravastatin pooling project. *Eur Heart J*. 2002;23:207-215
18. Yusuf S. [after the hope study. Ace inhibitor now for every diabetic patient?. Interview by dr. Dirk einecke]. *MMW Fortschritte der Medizin*. 2000;142:10

19. Lonn E, Yusuf S, Dzavik V, Doris C, Yi Q, Smith S, Moore-Cox A, Bosch J, Riley W, Teo K, Investigators S. Effects of ramipril and vitamin e on atherosclerosis: The study to evaluate carotid ultrasound changes in patients treated with ramipril and vitamin e (secure). *Circulation*. 2001;103:919-925
20. Piccolo R, Giustino G, Mehran R, Windecker S. Stable coronary artery disease: Revascularisation and invasive strategies. *Lancet*. 2015;386:702-713
21. Calvet D, Mas JL. Recent advances in carotid angioplasty and stenting. *International journal of stroke : official journal of the International Stroke Society*. 2016;11:19-27
22. Owen CA, Campbell EJ. The cell biology of leukocyte-mediated proteolysis. *J Leukoc Biol*. 1999;65:137-150
23. Dollery CM, Owen CA, Sukhova GK, Krettek A, Shapiro SD, Libby P. Neutrophil elastase in human atherosclerotic plaques: Production by macrophages. *Circulation*. 2003;107:2829-2836
24. von Nussbaum F, Li VM. Neutrophil elastase inhibitors for the treatment of (cardio)pulmonary diseases: Into clinical testing with pre-adaptive pharmacophores. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2015;25:4370-4381
25. Delbosc S, Rouer M, Alsac JM, Louedec L, Philippe M, Meilhac O, Whatling C, Michel JB. Elastase inhibitor azd9668 treatment prevented progression of experimental abdominal aortic aneurysms. *Journal of vascular surgery*. 2016;63:486-492 e481
26. Altes TA, Cloft HJ, Short JG, DeGast A, Do HM, Helm GA, Kallmes DF. 1999 arrs executive council award. Creation of saccular aneurysms in the rabbit: A model suitable for testing endovascular devices. American roentgen ray society. *AJR. American journal of roentgenology*. 2000;174:349-354
27. Brinjikji W, Ding YH, Kallmes DF, Kadirvel R. From bench to bedside: Utility of the rabbit elastase aneurysm model in preclinical studies of intracranial aneurysm treatment. *Journal of neurointerventional surgery*. 2015
28. Henriksen PA, Sallénave JM. Human neutrophil elastase: Mediator and therapeutic target in atherosclerosis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008;40:1095-1100
29. Preston GA, Zarella CS, Pendergraft WF, 3rd, Rudolph EH, Yang JJ, Sekura SB, Jennette JC, Falk RJ. Novel effects of neutrophil-derived proteinase 3 and elastase on the vascular endothelium involve in vivo cleavage of nf-kappab and proapoptotic changes in jnk, erk, and p38 mapk signaling pathways. *J Am Soc Nephrol*. 2002;13:2840-2849
30. Tabas I. The role of endoplasmic reticulum stress in the progression of atherosclerosis. *Circ Res*. 2010;107:839-850
31. Marino F, Tozzi M, Schembri L, Ferraro S, Tarallo A, Scanzano A, Legnaro M, Castelli P, Cosentino M. Production of il-8, vegf and elastase by circulating and intraplaque neutrophils in patients with carotid atherosclerosis. *PLoS One*. 2015;10:e0124565
32. Oltmanns U, Sukkar MB, Xie S, John M, Chung KF. Induction of human airway smooth muscle apoptosis by neutrophils and neutrophil elastase. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2005;32:334-341
33. Yang JJ, Kettritz R, Falk RJ, Jennette JC, Gaido ML. Apoptosis of endothelial cells induced by the neutrophil serine proteases proteinase 3 and elastase. *Am J Pathol*. 1996;149:1617-1626
34. Garcia-Touchard A, Henry TD, Sangiorgi G, Spagnoli LG, Mauriello A, Conover C, Schwartz RS. Extracellular proteases in atherosclerosis and restenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:1119-1127

35. Smith FB, Fowkes FG, Rumley A, Lee AJ, Lowe GD, Hau CM. Tissue plasminogen activator and leucocyte elastase as predictors of cardiovascular events in subjects with angina pectoris: Edinburgh artery study. *Eur Heart J.* 2000;21:1607-1613
36. Urra H, Dufey E, Lisbona F, Rojas-Rivera D, Hetz C. When er stress reaches a dead end. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1833:3507-3517
37. Feng B, Yao PM, Li Y, Devlin CM, Zhang D, Harding HP, Sweeney M, Rong JX, Kuriakose G, Fisher EA, Marks AR, Ron D, Tabas I. The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages. *Nat Cell Biol.* 2003;5:781-792
38. Logue SE, Cleary P, Saveljeva S, Samali A. New directions in er stress-induced cell death. *Apoptosis.* 2013;18:537-546
39. Rutkowski DT, Kaufman RJ. A trip to the er: Coping with stress. *Trends in cell biology.* 2004;14:20-28
40. Chistiakov DA, Sobenin IA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Role of endoplasmic reticulum stress in atherosclerosis and diabetic macrovascular complications. *BioMed research international.* 2014;2014:610140
41. Minamino T, Komuro I, Kitakaze M. Endoplasmic reticulum stress as a therapeutic target in cardiovascular disease. *Circ Res.* 2010;107:1071-1082
42. Zhou AX, Tabas I. The upr in atherosclerosis. *Semin Immunopathol.* 2013
43. Minamino T, Kitakaze M. Er stress in cardiovascular disease. *J Mol Cell Cardiol.* 2010;48:1105-1110
44. Zhou J, Lhotak S, Hilditch BA, Austin RC. Activation of the unfolded protein response occurs at all stages of atherosclerotic lesion development in apolipoprotein e-deficient mice. *Circulation.* 2005;111:1814-1821
45. Myoishi M, Hao H, Minamino T, Watanabe K, Nishihira K, Hatakeyama K, Asada Y, Okada K, Ishibashi-Ueda H, Gabbiani G, Bochaton-Piallat ML, Mochizuki N, Kitakaze M. Increased endoplasmic reticulum stress in atherosclerotic plaques associated with acute coronary syndrome. *Circulation.* 2007;116:1226-1233
46. Scull CM, Tabas I. Mechanisms of er stress-induced apoptosis in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31:2792-2797
47. Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Annual review of biochemistry.* 2000;69:217-245
48. Nagata S. Apoptotic DNA fragmentation. *Experimental cell research.* 2000;256:12-18
49. Fink SL, Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: Mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun.* 2005;73:1907-1916
50. Leist M, Jaattela M. Four deaths and a funeral: From caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2:589-598
51. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol.* 1992;148:2207-2216
52. Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature.* 2000;407:784-788
53. Pop C, Salvesen GS. Human caspases: Activation, specificity, and regulation. *J Biol Chem.* 2009;284:21777-21781
54. Wajant H. The fas signaling pathway: More than a paradigm. *Science.* 2002;296:1635-1636
55. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. Cytotoxicity-dependent apo-1 (fas/cd95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (disc) with the receptor. *EMBO J.* 1995;14:5579-5588

56. Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, Shevchenko A, Mann M, Krammer PH, Peter ME. Flice is activated by association with the cd95 death-inducing signaling complex (disc). *EMBO J.* 1997;16:2794-2804
57. Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of bid by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the fas pathway of apoptosis. *Cell.* 1998;94:491-501
58. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell.* 1998;94:481-490
59. Takahashi A, Hirata H, Yonehara S, Imai Y, Lee KK, Moyer RW, Turner PC, Mesner PW, Okazaki T, Sawai H, Kishi S, Yamamoto K, Okuma M, Sasada M. Affinity labeling displays the stepwise activation of ice-related proteases by fas, staurosporine, and crma-sensitive caspase-8. *Oncogene.* 1997;14:2741-2752
60. Wang C, Youle RJ. The role of mitochondria in apoptosis*. *Annual review of genetics.* 2009;43:95-118
61. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: Requirement for datp and cytochrome c. *Cell.* 1996;86:147-157
62. Nakano K, Vousden KH. Puma, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Molecular cell.* 2001;7:683-694
63. Oda E, Ohki R, Murasawa H, Nemoto J, Shibue T, Yamashita T, Tokino T, Taniguchi T, Tanaka N. Noxa, a bh3-only member of the bcl-2 family and candidate mediator of p53-induced apoptosis. *Science.* 2000;288:1053-1058
64. Acehan D, Jiang X, Morgan DG, Heuser JE, Wang X, Akey CW. Three-dimensional structure of the apoptosome: Implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Molecular cell.* 2002;9:423-432
65. Adrain C, Martin SJ. The mitochondrial apoptosome: A killer unleashed by the cytochrome seas. *Trends in biochemical sciences.* 2001;26:390-397
66. Cain K, Bratton SB, Cohen GM. The apaf-1 apoptosome: A large caspase-activating complex. *Biochimie.* 2002;84:203-214
67. Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis.* 2007;12:913-922
68. Riedl SJ, Salvesen GS. The apoptosome: Signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8:405-413
69. Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicotera P, Lipton SA. Apoptosis and necrosis: Two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with n-methyl-d-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:7162-7166
70. Shaheen M, Cheema Y, Shahbaz AU, Bhattacharya SK, Weber KT. Intracellular calcium overloading and oxidative stress in cardiomyocyte necrosis via a mitochondriocentric signal-transducer-effector pathway. *Experimental and clinical cardiology.* 2011;16:109-115
71. Proskuryakov SY, Konoplyannikov AG, Gabai VL. Necrosis: A specific form of programmed cell death? *Experimental cell research.* 2003;283:1-16
72. Weerasinghe P, Buja LM. Oncosis: An important non-apoptotic mode of cell death. *Exp Mol Pathol.* 2012;93:302-308
73. Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, Kroemer G. Cell death modalities: Classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ.* 2007;14:1237-1243

74. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, El-Deiry WS, Golstein P, Green DR, Hengartner M, Knight RA, Kumar S, Lipton SA, Malorni W, Nunez G, Peter ME, Tschopp J, Yuan J, Piacentini M, Zhivotovskiy B, Melino G, Nomenclature Committee on Cell D. Classification of cell death: Recommendations of the nomenclature committee on cell death 2009. *Cell Death Differ.* 2009;16:3-11
75. Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: Towards a molecular definition. *Trends in biochemical sciences.* 2007;32:37-43
76. Festjens N, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. Necrosis, a well-orchestrated form of cell demise: Signalling cascades, important mediators and concomitant immune response. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1757:1371-1387
77. Sawai H. Characterization of tnf-induced caspase-independent necroptosis. *Leukemia research.* 2014;38:706-713
78. Han J, Zhong CQ, Zhang DW. Programmed necrosis: Backup to and competitor with apoptosis in the immune system. *Nature immunology.* 2011;12:1143-1149
79. Sun L, Wang H, Wang Z, He S, Chen S, Liao D, Wang L, Yan J, Liu W, Lei X, Wang X. Mixed lineage kinase domain-like protein mediates necrosis signaling downstream of rip3 kinase. *Cell.* 2012;148:213-227
80. Wang H, Sun L, Su L, Rizo J, Liu L, Wang LF, Wang FS, Wang X. Mixed lineage kinase domain-like protein mlkl causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by rip3. *Molecular cell.* 2014;54:133-146
81. Wang Z, Jiang H, Chen S, Du F, Wang X. The mitochondrial phosphatase pgam5 functions at the convergence point of multiple necrotic death pathways. *Cell.* 2012;148:228-243
82. Degterev A, Hitomi J, Germscheid M, Ch'en IL, Korkina O, Teng X, Abbott D, Cuny GD, Yuan C, Wagner G, Hedrick SM, Gerber SA, Lugovskoy A, Yuan J. Identification of rip1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nature chemical biology.* 2008;4:313-321
83. Takahashi N, Duprez L, Grootjans S, Cauwels A, Nerinckx W, DuHadaway JB, Goossens V, Roelandt R, Van Hauwermeiren F, Libert C, Declercq W, Callewaert N, Prendergast GC, Degterev A, Yuan J, Vandenabeele P. Necrostatin-1 analogues: Critical issues on the specificity, activity and in vivo use in experimental disease models. *Cell Death Dis.* 2012;3:e437
84. Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, Cuny GD, Mitchison TJ, Moskowitz MA, Yuan J. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nature chemical biology.* 2005;1:112-119
85. Deegan S, Saveljeva S, Gorman AM, Samali A. Stress-induced self-cannibalism: On the regulation of autophagy by endoplasmic reticulum stress. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70:2425-2441
86. Scarlatti F, Granata R, Meijer AJ, Codogno P. Does autophagy have a license to kill mammalian cells? *Cell Death Differ.* 2009;16:12-20
87. Sano R, Reed JC. Er stress-induced cell death mechanisms. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1833:3460-3470
88. Mizushima N. Methods for monitoring autophagy. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36:2491-2502

89. Satoo K, Noda NN, Kumeta H, Fujioka Y, Mizushima N, Ohsumi Y, Inagaki F. The structure of atg4b-*lc3* complex reveals the mechanism of *lc3* processing and delipidation during autophagy. *EMBO J*. 2009;28:1341-1350
90. Kouroku Y, Fujita E, Tanida I, Ueno T, Isoai A, Kumagai H, Ogawa S, Kaufman RJ, Kominami E, Momoi T. Er stress (perk/eif2alpha phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced *lc3* conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell Death Differ*. 2007;14:230-239
91. Dunn WA, Jr. Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation. *Trends in cell biology*. 1994;4:139-143
92. Klionsky DJ. Cell biology: Regulated self-cannibalism. *Nature*. 2004;431:31-32
93. Coughlin SR. How the protease thrombin talks to cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:11023-11027
94. Heilker R, Wolff M, Tautermann CS, Bieler M. G-protein-coupled receptor-focused drug discovery using a target class platform approach. *Drug discovery today*. 2009;14:231-240
95. Trejo J. Protease-activated receptors: New concepts in regulation of g protein-coupled receptor signaling and trafficking. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003;307:437-442
96. Tsao P, Cao T, von Zastrow M. Role of endocytosis in mediating downregulation of g-protein-coupled receptors. *Trends in pharmacological sciences*. 2001;22:91-96
97. Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, Hunter GD, Plevin R. Proteinase-activated receptors. *Pharmacol Rev*. 2001;53:245-282
98. Marutsuka K, Hatakeyama K, Yamashita A, Asada Y. Role of thrombogenic factors in the development of atherosclerosis. *Journal of atherosclerosis and thrombosis*. 2005;12:1-8
99. Leger AJ, Covic L, Kuliopulos A. Protease-activated receptors in cardiovascular diseases. *Circulation*. 2006;114:1070-1077
100. Mihara K, Ramachandran R, Renaux B, Saifeddine M, Hollenberg MD. Neutrophil elastase and proteinase-3 trigger g protein-biased signaling through proteinase-activated receptor-1 (par1). *J Biol Chem*. 2013;288:32979-32990
101. Xiao YP, Morice AH, Compton SJ, Sadofsky L. N-linked glycosylation regulates human proteinase-activated receptor-1 cell surface expression and disarming via neutrophil proteinases and thermolysin. *J Biol Chem*. 2006;281:22991-23002
102. Barnes JA, Singh S, Gomes AV. Protease activated receptors in cardiovascular function and disease. *Mol Cell Biochem*. 2004;263:227-239
103. Minami T, Sugiyama A, Wu SQ, Abid R, Kodama T, Aird WC. Thrombin and phenotypic modulation of the endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:41-53
104. Nelken NA, Soifer SJ, O'Keefe J, Vu TK, Charo IF, Coughlin SR. Thrombin receptor expression in normal and atherosclerotic human arteries. *J Clin Invest*. 1992;90:1614-1621
105. Ahamed J, Versteeg HH, Kerver M, Chen VM, Mueller BM, Hogg PJ, Ruf W. Disulfide isomerization switches tissue factor from coagulation to cell signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:13932-13937
106. Shi X, Gangadharan B, Brass LF, Ruf W, Mueller BM. Protease-activated receptors (par1 and par2) contribute to tumor cell motility and metastasis. *Mol Cancer Res*. 2004;2:395-402
107. Ruf W, Dorfleutner A, Riewald M. Specificity of coagulation factor signaling. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 2003;1:1495-1503

108. Sontheimer EJ. Assembly and function of rna silencing complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6:127-138
109. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide rnas mediate rna interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 2001;411:494-498
110. Riccardi C, Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat Protoc.* 2006;1:1458-1461
111. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature.* 1970;227:680-685
112. Redgrave JN, Gallagher P, Lovett JK, Rothwell PM. Critical cap thickness and rupture in symptomatic carotid plaques: The oxford plaque study. *Stroke.* 2008;39:1722-1729
113. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. 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.* 1995;92:1355-1374
114. Virmani R, Burke AP, Farb A, Kolodgie FD. Pathology of the vulnerable plaque. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47:C13-18
115. Jerke U, Hernandez DP, Beaudette P, Korkmaz B, Dittmar G, Kettritz R. Neutrophil serine proteases exert proteolytic activity on endothelial cells. *Kidney international.* 2015;88:764-775
116. Martinet W, Agostinis P, Vanhoecke B, Dewaele M, De Meyer GR. Autophagy in disease: A double-edged sword with therapeutic potential. *Clinical science.* 2009;116:697-712
117. Oyadomari S, Mori M. Roles of chop/gadd153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ.* 2004;11:381-389
118. Suzuki T, Moraes TJ, Vachon E, Ginzberg HH, Huang TT, Matthay MA, Hollenberg MD, Marshall J, McCulloch CA, Abreu MT, Chow CW, Downey GP. Proteinase-activated receptor-1 mediates elastase-induced apoptosis of human lung epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005;33:231-247
119. Suzuki T, Yamashita C, Zemans RL, Briones N, Van Linden A, Downey GP. Leukocyte elastase induces lung epithelial apoptosis via a par-1-, nf-kappab-, and p53-dependent pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2009;41:742-755
120. Ramachandran R, Hollenberg MD. Proteinases and signalling: Pathophysiological and therapeutic implications via pars and more. *Br J Pharmacol.* 2008;153 Suppl 1:S263-282
121. Alberelli MA, De Candia E. Functional role of protease activated receptors in vascular biology. *Vascular pharmacology.* 2014;62:72-81
122. Quan L, Jian Z, Ping Z, Weiming L. Proteinase-activated receptor-1 mediates allogeneic cd8(+) t cell-induced apoptosis of vascular endothelial cells. *Med Oncol.* 2009;26:379-385
123. Ramachandran R, Mihara K, Chung H, Renaux B, Lau CS, Muruve DA, DeFea KA, Bouvier M, Hollenberg MD. Neutrophil elastase acts as a biased agonist for proteinase-activated receptor-2 (par2). *J Biol Chem.* 2011;286:24638-24648
124. Zhou J, Perelman JM, Kolosov VP, Zhou X. Neutrophil elastase induces muc5ac secretion via protease-activated receptor 2. *Mol Cell Biochem.* 2013;377:75-85
125. Zhao P, Lieu T, Barlow N, Sostegni S, Haerteis S, Korbmacher C, Liedtke W, Jimenez-Vargas NN, Vanner SJ, Bunnett NW. Neutrophil elastase activates protease-activated

- receptor-2 (par2) and transient receptor potential vanilloid 4 (trpv4) to cause inflammation and pain. *J Biol Chem*. 2015;290:13875-13887
126. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. The road ahead. *Cell*. 2001;104:503-516
127. Dorweiler B, Torzewski M, Dahm M, Ochsenhirt V, Lehr HA, Lackner KJ, Vahl CF. A novel in vitro model for the study of plaque development in atherosclerosis. *Thromb Haemost*. 2006;95:182-189
128. Dorweiler B, Torzewski M, Dahm M, Kirkpatrick CJ, Lackner KJ, Vahl CF. Subendothelial infiltration of neutrophil granulocytes and liberation of matrix-destabilizing enzymes in an experimental model of human neo-intima. *Thromb Haemost*. 2008;99:373-381
129. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. 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. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1995;15:1512-1531
130. Redgrave JN, Lovett JK, Gallagher PJ, Rothwell PM. Histological assessment of 526 symptomatic carotid plaques in relation to the nature and timing of ischemic symptoms: The oxford plaque study. *Circulation*. 2006;113:2320-2328
131. Ramulu S, Kale AD, Hallikerimath S, Kotrashetti V. Comparing modified papanicolaou stain with ayoub-shklar and haematoxylin-eosin stain for demonstration of keratin in paraffin embedded tissue sections. *Journal of oral and maxillofacial pathology : JOMFP*. 2013;17:23-30
132. Mettenleiter TC, Rauh I. A glycoprotein gx-beta-galactosidase fusion gene as insertional marker for rapid identification of pseudorabies virus mutants. *Journal of virological methods*. 1990;30:55-65
133. Dollery CM, Libby P. Atherosclerosis and proteinase activation. *Cardiovasc Res*. 2006;69:625-635
134. Mungrue IN, Pagnon J, Kohannim O, Gargalovic PS, Lusis AJ. Chac1/mgc4504 is a novel proapoptotic component of the unfolded protein response, downstream of the atf4-atf3-chop cascade. *J Immunol*. 2009;182:466-476
135. Kim I, Xu W, Reed JC. Cell death and endoplasmic reticulum stress: Disease relevance and therapeutic opportunities. *Nature reviews. Drug discovery*. 2008;7:1013-1030
136. Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8:519-529
137. Hotamisligil GS. Endoplasmic reticulum stress and atherosclerosis. *Nat Med*. 2010;16:396-399
138. Wang M, Wey S, Zhang Y, Ye R, Lee AS. Role of the unfolded protein response regulator grp78/bip in development, cancer, and neurological disorders. *Antioxid Redox Signal*. 2009;11:2307-2316
139. Thorp E, Li G, Seimon TA, Kuriakose G, Ron D, Tabas I. Reduced apoptosis and plaque necrosis in advanced atherosclerotic lesions of apoe^{-/-} and ldlr^{-/-} mice lacking chop. *Cell Metab*. 2009;9:474-481
140. Rzymiski T, Milani M, Singleton DC, Harris AL. Role of atf4 in regulation of autophagy and resistance to drugs and hypoxia. *Cell Cycle*. 2009;8:3838-3847
141. B'Chir W, Maurin AC, Carraro V, Averous J, Jousse C, Muranishi Y, Parry L, Stepien G, Fafournoux P, Bruhat A. The eif2alpha/atf4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic acids research*. 2013;41:7683-7699

142. Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, Swanson PE. Cell death. *N Engl J Med.* 2009;361:1570-1583
143. Choi AM, Ryter SW, Levine B. Autophagy in human health and disease. *N Engl J Med.* 2013;368:651-662
144. De Meyer GR, Grootaert MO, Michiels CF, Kurdi A, Schrijvers DM, Martinet W. Autophagy in vascular disease. *Circ Res.* 2015;116:468-479
145. Diehl P, Bode C, Duerschmied D. Clinical potential of vorapaxar in cardiovascular risk reduction in patients with atherosclerosis. *Therapeutics and clinical risk management.* 2015;11:1133-1138
146. Tantry US, Liu F, Chen G, Gurbel PA. Vorapaxar in the secondary prevention of atherothrombosis. *Expert review of cardiovascular therapy.* 2015:1-13
147. Tsukano H, Gotoh T, Endo M, Miyata K, Tazume H, Kadomatsu T, Yano M, Iwawaki T, Kohno K, Araki K, Mizuta H, Oike Y. The endoplasmic reticulum stress-c/ebp homologous protein pathway-mediated apoptosis in macrophages contributes to the instability of atherosclerotic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2010;30:1925-1932
148. Pedruzzi E, Guichard C, Ollivier V, Driss F, Fay M, Prunet C, Marie JC, Pouzet C, Samadi M, Elbim C, O'Dowd Y, Bens M, Vandewalle A, Gougerot-Pocidallo MA, Lizard G, Ogier-Denis E. Nad(p)h oxidase nox-4 mediates 7-ketocholesterol-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *Mol Cell Biol.* 2004;24:10703-10717
149. Kedi X, Ming Y, Yongping W, Yi Y, Xiaoxiang Z. Free cholesterol overloading induced smooth muscle cells death and activated both er- and mitochondrial-dependent death pathway. *Atherosclerosis.* 2009;207:123-130
150. Tabas I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. *Nat Rev Immunol.* 2010;10:36-46
151. Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell.* 2011;145:341-355
152. Van Herck JL, De Meyer GR, Martinet W, Bult H, Vrints CJ, Herman AG. Proteasome inhibitor bortezomib promotes a rupture-prone plaque phenotype in apoe-deficient mice. *Basic Res Cardiol.* 2010;105:39-50
153. Martinet W, De Bie M, Schrijvers DM, De Meyer GR, Herman AG, Kockx MM. 7-ketocholesterol induces protein ubiquitination, myelin figure formation, and light chain 3 processing in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:2296-2301
154. Clarke MC, Figg N, Maguire JJ, Davenport AP, Goddard M, Littlewood TD, Bennett MR. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induces features of plaque vulnerability in atherosclerosis. *Nat Med.* 2006;12:1075-1080
155. Jia G, Cheng G, Agrawal DK. Autophagy of vascular smooth muscle cells in atherosclerotic lesions. *Autophagy.* 2007;3:63-64
156. Liao X, Sluimer JC, Wang Y, Subramanian M, Brown K, Pattison JS, Robbins J, Martinez J, Tabas I. Macrophage autophagy plays a protective role in advanced atherosclerosis. *Cell Metab.* 2012;15:545-553
157. Verheye S, Martinet W, Kockx MM, Knaapen MW, Salu K, Timmermans JP, Ellis JT, Kilpatrick DL, De Meyer GR. Selective clearance of macrophages in atherosclerotic plaques by autophagy. *J Am Coll Cardiol.* 2007;49:706-715

158. Schrijvers DM, De Meyer GR, Martinet W. Autophagy in atherosclerosis: A potential drug target for plaque stabilization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31:2787-2791
159. Martinet W, Verheye S, De Meyer GR. Everolimus-induced mtor inhibition selectively depletes macrophages in atherosclerotic plaques by autophagy. *Autophagy.* 2007;3:241-244
160. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature.* 2002;420:868-874
161. McAlpine CS, Bowes AJ, Khan MI, Shi Y, Werstuck GH. Endoplasmic reticulum stress and glycogen synthase kinase-3beta activation in apolipoprotein e-deficient mouse models of accelerated atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012;32:82-91
162. Lhotak S, Zhou J, Austin RC. Immunohistochemical detection of the unfolded protein response in atherosclerotic plaques. *Methods Enzymol.* 2011;489:23-46
163. Hai T, Jalgaonkar S, Wolford CC, Yin X. Immunohistochemical detection of activating transcription factor 3, a hub of the cellular adaptive-response network. *Methods Enzymol.* 2012;490:175-194
164. Gao J, Ishigaki Y, Yamada T, Kondo K, Yamaguchi S, Imai J, Uno K, Hasegawa Y, Sawada S, Ishihara H, Oyadomari S, Mori M, Oka Y, Katagiri H. Involvement of endoplasmic stress protein c/ebp homologous protein in arteriosclerosis acceleration with augmented biological stress responses. *Circulation.* 2011;124:830-839
165. Engin F, Hotamisligil GS. Restoring endoplasmic reticulum function by chemical chaperones: An emerging therapeutic approach for metabolic diseases. *Diabetes Obes Metab.* 2010;12 Suppl 2:108-115
166. Erbay E, Babaev VR, Mayers JR, Makowski L, Charles KN, Snitow ME, Fazio S, Wiest MM, Watkins SM, Linton MF, Hotamisligil GS. Reducing endoplasmic reticulum stress through a macrophage lipid chaperone alleviates atherosclerosis. *Nat Med.* 2009;15:1383-1391
167. Dong Y, Zhang M, Liang B, Xie Z, Zhao Z, Asfa S, Choi HC, Zou MH. Reduction of amp-activated protein kinase alpha2 increases endoplasmic reticulum stress and atherosclerosis in vivo. *Circulation.* 2010;121:792-803
168. Boyce M, Py BF, Ryazanov AG, Minden JS, Long K, Ma D, Yuan J. A pharmacoproteomic approach implicates eukaryotic elongation factor 2 kinase in er stress-induced cell death. *Cell Death Differ.* 2008;15:589-599
169. Fu HY, Okada K, Liao Y, Tsukamoto O, Isomura T, Asai M, Sawada T, Okuda K, Asano Y, Sanada S, Asanuma H, Asakura M, Takashima S, Komuro I, Kitakaze M, Minamino T. Ablation of c/ebp homologous protein attenuates endoplasmic reticulum-mediated apoptosis and cardiac dysfunction induced by pressure overload. *Circulation.* 2010;122:361-369
170. Liu CL, Li X, Hu GL, Li RJ, He YY, Zhong W, Li S, He KL, Wang LL. Salubrinal protects against tunicamycin and hypoxia induced cardiomyocyte apoptosis via the perk-eif2alpha signaling pathway. *Journal of geriatric cardiology : JGC.* 2012;9:258-268
171. Sparks DL, Woeltz VM, Markesbery WR. Alterations in brain monoamine oxidase activity in aging, alzheimer's disease, and pick's disease. *Archives of neurology.* 1991;48:718-721
172. Weyer AD, Stucky CL. Repurposing a leukocyte elastase inhibitor for neuropathic pain. *Nat Med.* 2015;21:429-430
173. Alam SR, Newby DE, Henriksen PA. Role of the endogenous elastase inhibitor, elafin, in cardiovascular injury: From epithelium to endothelium. *Biochem Pharmacol.* 2012;83:695-704

174. Zaidi SH, You XM, Ciura S, O'Blenes S, Husain M, Rabinovitch M. Suppressed smooth muscle proliferation and inflammatory cell invasion after arterial injury in elafin-overexpressing mice. *J Clin Invest.* 2000;105:1687-1695
175. Abdel-Magid AF. Neutrophil elastase inhibitors as potential anti-inflammatory therapies. *ACS medicinal chemistry letters.* 2014;5:1182-1183

Tabelle 8.1: Übersicht der Publikationen

Jünger als 5 Jahre	47
5-10 Jahre	54
Älter als 10 Jahre	74

9 Publikationsliste

Originalarbeiten:

Grechowa I., Horke S., Wallrath A., Vahl CF., Dorweiler B. Human neutrophil elastase induces endothelial cell apoptosis by activating the PERK-CHOP branch of the unfolded protein response. *eingereicht*

Krüger M., Amort J., Wilgenbus P., Helmstädter JP., **Grechowa I.**, Julia Ebert J., Tenzer S., Moergel M., Witte I., Horke S. The tumor-protective protein PON2 is regulated through Wnt / GSK3 β / β -catenin signaling. *eingereicht*

Dorweiler B.*, **Grechowa I.***, Wallrath A., Vahl CF., Horke S. Activation of the proapoptotic unfolded protein response in plaques of the human carotid artery. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2014 Sep;48(3):248-57.

Vorträge:

Grechowa I., Horke S., Vahl C.-F., Dorweiler B. Elastase-induzierte Aktivierung der “unfolded protein response” und Apoptose in humanen Endothelzellen, 31. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Gefäßchirurgie (DGG), Münster, 2015.

Grechowa I., Horke S., Dorweiler B. Elastase-triggered activation of the “unfolded protein response” & apoptosis in human endothelial cells. *European Society for Vascular Surgery Spring Meeting (ESVS)*, Frankfurt, 2015.

Dorweiler B., **Grechowa I.**, Wallrath A., Horke S., Vahl CF. Activation of proapoptotic stress-pathway „unfolded protein response“ in plaques of the internal carotid artery. *European Society for Vascular Surgery Spring Meeting (ESVS)*, Frankfurt, 2013.

Dorweiler B., **Grechowa I.**, Wallrath A., Horke S., Vahl CF. Inflammation und Atherosklerose – Aktivierung des proapoptotischen Stresspathway „unfolded protein response“ in Plaques der A. carotis interna. 130. Kongreß der Deutschen Gesellschaft für Chirurgie (DGCH), München, 2013.

Dorweiler B., **Grechowa I.**, Wallrath A., Horke S., Vahl CF. Inflammation and Atherosclerosis – Activation of proapoptotic stress-pathway "unfolded protein response" in plaques of the internal carotid artery. 42. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie (DGTHG), Freiburg, 2013.

Dorweiler B., **Grechowa I.**, Wallrath A., Horke S., Vahl CF. Inflammation und Atherosklerose – Aktivierung des proapoptotischen Stresspathway "unfolded protein response" in Plaques der A. carotis interna. 28. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Gefäßchirurgie und Gefäßmedizin e. V. (DGG), Wiesbaden, 2012.

Abstracts:

Grechowa I., Dorweiler B., Wallrath A., Horke S. Elastase-activated stress response of vascular cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology / Peripheral Vascular Diseases (ATVB)*, San Francisco, CA, USA, 2015.

Grechowa I., Wallrath A., Dorweiler B., Horke S. Elastase controls atherosclerotic plaque stability by activation of the unfolded protein response. 80. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie e.V. (DGPT), Hannover, 2014.

Grechowa I., Wilgenbus P., Förstermann U., Wallrath A., Dorweiler B., Horke S. Elastase - a less favorable Teammate in atherosclerosis. 79. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie e.V. (DGPT), Halle / Saale, 2013.

*bezeichnet geteilte Erstautorenschaft