

**Pathogenetische Bedeutung der Glutathionperoxidase-1
in der arteriellen Gefäßwand**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie
Der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Fei Cheng
geb. am 27.04.1978 in Shanghai, V.R. China

Mainz 2012

Tag der mündlichen Prüfung: 16.10.2012

Abstract

Pathogenetic impact of Glutathione Peroxidase-1 on the arterial vascular wall

Glutathione peroxidase-1 (GPx-1) is an important antioxidant enzyme which plays a protective role in the atherogenic process. We have shown previously that GPx-1 deficiency accelerates atherosclerosis and increases lesion cellularity in apolipoprotein E-deficient (ApoE^{-/-}) mice. Here, we studied (1) the expression of GPx-isoforms in the aortae of GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} and ApoE^{-/-} control mice during atherosclerotic lesion development and (2) the effect of GPx-1 deficiency on foam cell formation and proliferation of peritoneal macrophages in order to understand how GPx-1 unfolds its protective function in atherogenesis.

At 8 weeks of age female GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} mice and ApoE^{-/-} control mice were placed on an atherogenic Western-type diet (WTD) for another 6 and 12 weeks, respectively. The expression of different GPx isoforms was investigated by *in situ*-hybridization (ISH). GPx-1, GPx-3 and GPx-4 expression was confined to macrophages from atherosclerotic lesions of ApoE^{-/-} mice, whereas smooth muscle cells exhibited no detectable expression. Female ApoE^{-/-} and GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} mice were placed on a standard chow diet for 5 months. Oil red O staining showed that OxLDL (oxidized LDL) and E-LDL (enzyme-modified LDL) enhanced macrophage-derived foam cell formation. In addition, quantitative measurement revealed an increased cholesterol accumulation in peritoneal macrophages of GPx-1 deficient mice after OxLDL incubation. This result proved that GPx-1 deficiency increases OxLDL intake and foam cell formation. Deficiency of GPx-1 led to increased proliferative activity of peritoneal macrophages (BrdU based chemiluminescence assay). The MCSF- and OxLDL-induced macrophage proliferation was mediated by the ERK1/2 (extracellular-signal regulated kinase 1/2) signaling pathway as demonstrated by ERK1/2 inhibitors PD98059 and U0126. p38-MAPK (p38 mitogen-activated protein kinase) inhibitor SB203580 increased the cell proliferation and decreased the caspase-3/7 activity independently of GPx-1 levels. By use of Western blot analysis on cell lysates, a short-term phosphorylation of ERK1/2-cascade but not p38-MAPK and JNK (c-Jun N-terminal kinase) was detected as early as five minutes after stimulation with MCSF and/or OxLDL in GPx-1 deficient macrophages.

In summary, deficiency of GPx-1 has a significant impact on macrophage foam cell formation and proliferation via the ERK1/2 pathway. GPx-1 deficiency increases MCSF- and OxLDL-induced ERK1/2 phosphorylation in macrophages, whereas the p38-MAPK pathway contributes to the suppression of macrophage proliferation and promotes apoptosis. Thus atherosclerotic lesion progression is accelerated in apolipoprotein E-deficient mice.

Inhaltsverzeichnis

Verzeichnis der Abbildungen	VII
Verzeichnis der Tabellen	IX
Verzeichnis der Abkürzungen	X
I. Einleitung	1
1. Atherosklerose	1
1.1 <i>Morphologie der Atherosklerose</i>	1
1.1.1 Die gesunde Arterienwand	1
1.1.2 Die arteriosklerotische Läsion	2
2. Lipoprotein	2
2.1 <i>Zusammensetzungen der Lipoproteine</i>	2
2.2 <i>Fettstoffwechsel</i>	4
3. Atherogenese	6
3.1 <i>Initiation und Progression der Atherosklerose</i>	6
3.2 <i>Plaquestabilität</i>	7
4. Oxidativer Stress	8
4.1 <i>Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)</i>	8
4.1.1 Oxidantien	9
4.1.2 Die Generierung der ROS	11
4.2 <i>Antioxidantien</i>	12
4.3 <i>Oxidativer Stress und Makrophagen in der Atherosklerose</i>	13
5. Glutathionperoxidase	15
5.1 <i>Selen und Selenoprotein</i>	15
5.2 <i>Die Glutathionperoxidase Familie</i>	16
5.3 <i>Glutathionperoxidase und Atherosklerose</i>	18
5.3.1 Glutathionperoxidase-1 und kardiovaskuläre Erkrankungen	18
5.3.2 Potentielle Rolle der Glutathionperoxidase-1 bei der Atherogenese.....	19
6. MAPK-Signaltransduktionswege	20
6.1 <i>Der ERK Signaltransduktionsweg</i>	21
6.2 <i>p38-MAPK Signaltransduktionsweg</i>	22
6.3 <i>JNK/SAPK Signaltransduktionsweg</i>	23

7.	Mausmodelle in der Atheroskleroseforschung	24
7.1	<i>ApoE Knock-Out Mausmodell</i>	24
7.2	<i>GPx-1 defizientes Mausmodell</i>	25
7.3	<i>SOD2 defizienten Mausmodell</i>	25
8.	Fragestellung	26
II.	Materialien	27
1.	Geräte	27
1.1	<i>Mikroskope</i>	27
1.2	<i>Zentrifugen</i>	27
1.3	<i>Zellkultur</i>	27
1.4	<i>Western Blot</i>	27
1.5	<i>PCR und Gelelektrophorese</i>	27
1.6	<i>in-situ Hybridisierung</i>	28
1.7	<i>Sonstiges</i>	28
2.	Verbrauchsmaterialien	29
2.1	<i>Plastikware</i>	29
2.2	<i>Materialien für in-situ Hybridisierung</i>	30
2.3	<i>Materialien für Western Blot</i>	30
3.	Chemikalien	30
3.1	<i>Puffer und Lösung</i>	31
3.2	<i>Medien und Sonstiges</i>	34
3.3	<i>Kits</i>	36
3.4	<i>Antikörper</i>	36
3.4.1	Primäre Antikörper	36
3.4.2	Sekundäre Antikörper	37
3.5	<i>Oligonukleotide</i>	37
4.	Bakterien und Vektoren	39
4.1	<i>Bakterienstämme</i>	39
4.2	<i>Vektoren</i>	39
5.	Mausfutter	39
6.	Software	40

III.	Methoden	41
1.	Etablierung und Zucht der Mausstämmen	41
1.1	<i>Generierung des GPx-1 defizienten Mausstammes</i>	41
1.2	<i>Generierung des SOD2^{+/-} Mausstammes</i>	42
1.3	<i>Haltung der Mausstämmen</i>	42
1.4	<i>Genotypisierung der Mausstämmen</i>	42
1.4.1	DNA Isolation und PCR	42
1.4.2	Agarose-Gelelektrophorese	44
1.5	<i>Diäten</i>	45
2.	In situ-Hybridisierung	45
2.1	<i>Präparation der Maus</i>	46
2.2	<i>Einbetten und Schneiden des Gewebes</i>	46
2.3	<i>Synthese der radiomarkierten RNA Probe</i>	46
2.4	<i>In-situ Hybridisierung</i>	48
3.	Zellkultur	49
4.	Präparation der modifizierten Lipoprotein	49
4.1	<i>LDL Präparation</i>	49
4.2	<i>LDL- Cholesterin Bestimmung</i>	51
4.3	<i>Generierung von modifizierten Lipoproteine</i>	52
4.3.1	Enzymatische Modifikation von LDL zu E-LDL	52
4.3.2	Oxidation von LDL zu Ox-LDL	52
5.	Färbung der Mausmakrophagen	52
5.1	<i>Zellbehandlung</i>	52
5.2	<i>Immunhistochemische Färbung mit F4/80 Antikörper</i>	53
5.3	<i>Oil-Red-O-Färbung</i>	53
6.	Zelluläre Cholesterinbestimmung	54
6.1	<i>Chloesterinbestimmung</i>	54
6.2	<i>Proteinbestimmung</i>	55
7.	BrdU Proliferationsassay	55
8.	Bestimmung der Kaspaseaktivität	57
9.	Western Blot	57
9.1	<i>Gewinnung der Proben</i>	58
9.2	<i>SDS-PAGE</i>	58
9.3	<i>Blot</i>	59
9.4	<i>Färbung</i>	60
9.4.1	Ponceau-Rot-Färbung	60
9.4.2	Coomassie-Färbung	60

9.5	<i>Blocken, Waschen, Antikörperbindung</i>	60
9.6	Detektion	61
9.7	Stripping der Membran	62
10.	Gene Expression	62
10.1	<i>Päparation der Maus</i>	62
10.2	<i>RNA Isolierung</i>	62
10.2.1	RNA Isolierung mit RNeasy Mini Kit	62
10.2.2	DNase Verdau	63
10.3	<i>cDNA Synthese</i>	64
10.4	<i>Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration</i>	65
10.5	<i>Semiquantitative Real Time-PCR</i>	65
10.5.1	Detektion der PCR Produkte in Echtzeit	66
10.5.2	Relative Quantifizierung	67
10.5.3	<i>Real-Time-Detection PCR</i>	68
10.6	<i>Gelelektrophorese</i>	69
10.6.1	DNA-Gelelektrophorese	69
10.6.2	RNA-Gelelektrophorese	69
11.	Auswertung	70
IV.	Ergebnisse	71
1.	Etablierung des GPx-1^{-/-} ApoE^{-/-} DKO Mausmodells	71
2.	Untersuchung der GPx Isoform in einem GPx-1^{-/-} ApoE^{-/-} Mausmodell	72
2.1	<i>Atheroskleroseinduktion mittels einer fettreichen Western Type Diät im DKO Mausmodell</i>	72
2.2	<i>Lokalisierung der mRNA der GPx-Isoformen</i>	72
2.2.1	GPx-1	73
2.2.2	GPx-2	73
2.2.3	GPx-3	73
2.2.4	GPx-4	74
3.	In vitro Untersuchungen an isolierten Peritonealmakrophagen	79
3.1	<i>Der Einfluss von GPx-1 Defizienz auf modifizierten LDL induzierte Schaumzellebildung aus Peritonealmakrophagen</i>	79
3.1.1	Der Effekt von GPx-1 Defizienz auf OxLDL induzierte Schaumzellbildung	79

3.1.2	Der Effekt von GPx-1 Defizienz auf E-LDL induzierte Schaumzellbildung	82
3.2	<i>Immunhistologische Färbung der Peritonealmakrophagen</i>	83
3.3	Der Einfluss von verschiedenen Stimuli auf die Proliferation von Makrophagen	83
3.3.1	MCSF fördert die Proliferation der Makrophagen	84
3.3.2	Der Einfluss von OxLDL auf die Proliferation von Makrophagen	86
3.4	<i>Der Einfluss von MAPK-Kinasen auf die Proliferation von Makrophagen</i>	87
3.4.1	Die Effekte von MAPK-Inhibitoren auf die MCSF oder OxLDL- Induzierte Makrophageproliferation	88
3.4.2	Die Effekte von p38-Inhibitoren auf die MCSF oder OxLDL-induzierte Kaspase-3/7 Aktivität in Mausperitonealmakrophagen	90
3.5	<i>Die Wirkung von MCSF auf die MAPK-Signaltransduktion in isolierten Peritonealmakrophagen</i>	91
3.5.1	Peritonealmakrophagen der DKO Mäuse weisen auf eine erhöhte Signaltransduktion des ERK1/2-Pathways nach Stimulation mit MCSF hin	91
3.5.2	Kein signifikanter Einfluss von MCSF auf die p38- und SAPK/JNK- Signalwege in Peritonealmakrophagen	91
3.5.3	Der Einfluss des p38-Inhibitors auf die MCSF-induzierte ERK- und JNK-Signaltransduktion in isolierten Peritonealmakrophagen	95
3.6	<i>Die Wirkung von OxLDL auf die MAPK Signaltransduktion in isolierten Peritonealmakrophagen</i>	95
3.7	<i>Genexpressionsuntersuchungen in isolierten Peritonealmakrophagen nach Stimulation mit OxLDL</i>	98
V.	Diskussion	99
1.	Lokalisierung der GPx-Isoformen mRNA in den Mausearten	99
2.	Der Effekt von GPx-1 auf die Schaumzellbildung	101
3.	Einfluss der GPx-1 auf die Proliferation von Peritonealmakrophagen	101
4.	Peritonealmakrophagen von SOD2^{+/-} Mäusen zeigen keine erhöhte proliferative Reaktion auf MCSF	102

5.	Die Wirkung der MAPK-vermittelten Signaltransduktion auf das Wachstum der Peritonealmakrophagen und der Effekt der GPx-1 auf die MAPK-Kaskade	102
5.1	<i>Der Einfluss der MAPK-Aktivität auf die Makrophagenproliferation</i>	102
5.2	<i>Der Effekt der GPx-1 auf die MCSF/OxLDL inudzierte MAPK-Signaltransduktion</i>	105
	Zusammenfassung	108
	Literaturverzeichnis	109
	Danksagung.....	119
	Anhang	120
	Erklärung	121

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1.1	Oxidative Modifikationshypothese für die Entwicklung der Atherosklerose	7
Abb. 1.2	Potentielle Rolle bei der ROS vermittelten Oxidation von LDL in der frühen Atherogenese	14
Abb. 1.3	Katalytischer Zyklus der Glutathionperoxidasen-1	17
Abb. 1.4	Mitogenaktivierte Proteinkinase Kaskade	20
Abb. 3.1	Genkonstrukt zur Generierung der GPx-1 defizienten Maus	41
Abb. 3.2	Reaktion der Cholesterinbestimmung mittels CHOD-PAP Reagenz	51
Abb. 3.3	Schema zur Durchführung des BrdU Proliferationsassays	56
Abb. 3.4	Chemilumineszenz Reaktion von Lumigen PS-3 mit POD	61
Abb. 3.5	Prinzip der SYBR Green I basierten Detektion der PCR-Produkte in der RTD PCR	66
Abb.4.1	Kreuzungsschema für die Generierung der ApoE/GPx-1 homozygoten DKO Maus	71
Abb. 4.2	Detektion der GPx-1 mRNA Expression mittels <i>in situ</i> -Hybridisierung in GPx-1 ^{-/-} ApoE ^{-/-} und ApoE ^{-/-} Mäusen	75
Abb. 4.3	Detektion der GPx-2 mRNA Expression mittels <i>in situ</i> -Hybridisierung in GPx-1 ^{-/-} ApoE ^{-/-} und ApoE ^{-/-} Mäusen	76
Abb. 4.4	Detektion der GPx-3 mRNA Expression mittels <i>in situ</i> -Hybridisierung in GPx-1 ^{-/-} ApoE ^{-/-} und ApoE ^{-/-} Mäusen	77
Abb. 4.5	Detektion der GPx-4 mRNA Expression mittels <i>in situ</i> -Hybridisierung in GPx-1 ^{-/-} ApoE ^{-/-} und ApoE ^{-/-} Mäusen	78
Abb. 4.6	Der Effekt der GPx-1 Defizienz auf OxLDL-inudzierte Schaumzellbildung	81
Abb. 4.7	Der Effekt der GPx-1 Defizienz auf die E-LDL-inudzierte Schaumzellbildung.	82
Abb. 4.8	Immunzytologische Färbung von isolierten Peritonealmakrophagen mit anti-F4/80 Antikörper	83

Abb. 4.9	Schema zur Durchführung des BrdU Proliferationsassays	84
Abb. 4.10	MCSF induzierte Makrophagepoliferation in GPx-1-defizienten Mäusen	85
Abb. 4.11	MCSF induzierte Makrophagepoliferation in SOD2-defizienten Mäusen	85
Abb. 4.12	OxLDL induzierte Makrophagepoliferation in GPx-1-difizienten Mäusen	86
Abb. 4.13	MAPK Signaltransduktionswege	87
Abb. 4.14	Einfluss der MAPK-Inhibitoren auf die MCSF- oder OxLDL- induzierte Proliferation der Mausperitonealmakrophagen	89
Abb. 4.15	Einfluss des p38-Inhibitors SB203580 auf die Makrophageproliferation	89
Abb. 4.16	Einfluss des p38-Inhibitors SB203580 auf die Kaspase-3/7 Aktivität der Peritonealmakrophage	90
Abb. 4.17	Western Blot Analyse der ERK Aktivierung in MCSF-induzierten Peritonealmakrophagen	92
Abb. 4.18	Western Blot Analyse der p38-MAPK und SAPK/JNK Aktivierung in MCSF-induzierten Peritonealmakrophagen	93
Abb. 4.19	Western Blot Analyse der cPLA ₂ Aktivierung in MCSF-induzierten Peritonealmakrophagen	94
Abb. 4.20	Western Blot Analyse des Einflusses des p38-Inhibitors auf den MAPK-Signalweg in MCSF-induzierten Peritonealmakrophagen	96
Abb. 4.21	Western Blot Analyse der Aktivierung des ERK1/2-Signalwegs in OxLDL-und/oder MCSF induzierten Makrophagen	97
Abb. 4.22	RTD-PCR Analyse für die OxLDL-vermittelte CSF1-Expression in Makrophagen	98
Abb. 5.1	„Crosstalk“ und „Feedback“ zwischen p38 α und anderen Signaltransduktionswege in der Zellproliferation	104
Abb. 5.2	Die GPx-1-Defizienz (GPx-1 ^{-/-}) übt signifikanten Einfluss auf die Schaumzellbildung und die Proliferation von Mausperitonealmakrophagen aus	107

Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1.1	Klassifikation der verschiedenen atherosklerotischen Läsionstypen	2
Tab. 1.2	Eigenschaften der Lipoproteine	3
Tab. 1.3	Wichtige Enzyme und nichtenzymatische Systeme für die Generierung der ROS und ihre Lokalisation in der Gefäßwand	9
Tab. 1.4	Wichtige Enzyme und nichtenzymatische System für die Generierung der ROS	11
Tab. 1.5	Vorkommen und Funktion der wichtigsten Selenoproteine	16
Tab. 2.1	Puffer und Lösung	31
Tab. 2.2	Verwendete Medien und Zusätze	34
Tab. 2.3	Verwendete Medikamente und Sonstiges	35
Tab. 2.4	verwendete primäre Antikörper von der Firma Cell Signaling	37
Tab. 2.5	Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide	38
Tab. 3.1	Ansatzschema für die PCR zur GPx-1 und ApoE Typisierung	43
Tab. 3.2	PCR Programm für die GPx-1 und ApoE Typisierung	43
Tab. 3.3	PCR Ansatzschema für GPx-1, GPx-2, GPx-3, GPx-4	47
Tab. 3.4	PCR Programm für Amplifikation der GPx-1, GPx-2, GPx-3, GPx-4	47
Tab. 3.5	Hybridisierungstemperatur und verwendete Gewebe für GPx Gene	48
Tab. 3.6	Rezept für Gel zur SDS-PAGE	59
Tab. 3.7	RTD-PCR Ansatzschema für CSF1 und 18s rRNA	68
Tab. 3.8	RTD-PCR Programm für CSF1 und 18s rRNA	69

Verzeichnis der Abkürzungen

AA	Archidonsäure
Abb.	Abbildung
ABCA1	<i>ATP-binding Cassette Transporter A1</i>
Ang II	Angiotensin II
AP-1	<i>Activator Protein-1</i>
ApoA	Apolipoprotein A
ApoB	Apolipoprotein B
ApoC	Apolipoprotein C
ApoE	Apolipoprotein E
ASK1	<i>Apoptosis Signal-regulating Kinase 1</i>
ATF	<i>Activating Transcription Factor</i>
Bad	<i>Bcl-2-Antagonist of Cell Death</i>
BBM	Makrophagen aus Knochenmark
Bcl-2	B-Zelle Lymphoma 2
Bcl-xl	B-Zelle Lymphoma-extragroß
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
BMK	<i>Big MAP-Kinase</i>
bp	Basenpaar
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serum Albumin
CCL ₄	Kohlenstofftetrachlorid
CCR2	Chemokin (C-C motif)-Rezeptor 2
Cdc42	<i>Cell division control protein 42</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CETP	Cholesterinester-Transferprotein
Chol	Cholesterin
CM	Chylomikrone
COX	Cyclooxygenasen
cPLA ₂	zytoplasmatische Phospholipase A ₂
CREB	<i>cAMP Response Element-binding Protein</i>
cRNA	komplementäre Ribonukleinsäure
CRP	C-reaktives Protein
CSF	<i>Colony Stimulating Factor</i>

C _T	<i>Cycle Threshold</i>
CVD	kardiovaskuläre Erkrankung
DAB	Diacylbenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIO	Iodothyronindeiodinase
DKO	Doppel-Knock-Out
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Deoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
e	Elektronen
EC	endotheliale Zelle
EC-SOD	extrazelluläre Superoxiddismutase
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	EGF-Rezeptor
E-LDL	enzymatisches modifizierte LDL
eIFa4E	eukaryotischer Initiationsfaktor 4E
Elk-1	<i>E twenty-six (ETS)-like transcription factor 1</i>
eNOS	endotheliale Stickstoff-Synthese
ER	Estrogenrezeptoren
ERK	<i>extracellular signal-related kinases</i>
ET-1	Endothelin-1
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FCS	fötale Käblerserum
GADPH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
gDNA	genomische DNA
GDP	Guanosindiphosphat
GIT	Gastrointestinaltrakt
GITC	Guanidinisoithiocyanat
GM-CSF	<i>Granulocyte/Makrophage Colony-stimulating Factor</i>
GPCR	<i>G Protein-coupled Receptor</i>
GPx	Glutathionperoxidase
Grb2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>

GSH	Glutathion
GSK	Glykogensynthase-Kinase
GSSG	Glutathiondisulfid
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HDL	<i>High-density Lipoproteine</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HOCl	Hypochlorsäure
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosly-Transferase
Hsp	Hitzeschockprotein
HWS	Halswirbelsäule
IκBα	NFκB-Inhibitor
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule-1</i>
IDL	<i>Intermediate-density Lipoproteine</i>
IFN _γ	Interferon-gamma
IgG	Immunglobulin G
IKK	Inhibitor-κB-Kinase
IL	Interleukin
iNOS	indizierbare Stickstoff-Synthese
JNK/SAPK	<i>C-Jun N-Terminal Kinase / Stress-activated Protein Kinase</i>
ISH	<i>in situ</i> -Hybridisierung
KBr	Kaliumbromid
kDa	Kilodalton
KO	Knock-Out
LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase
LDL	<i>Low-Density Lipoprotein</i>
LDLR	LDL-Rezeptor
LO	Lipoxygenase
LOO [·]	Lipidperoxyradikal
LOOH	Lipidhydroperoxid
LOX	Lipoxygenasen
LPL	Lipoproteinlipase
LPS	Lipopolysaccharid
min	Minute
MAP	Mikrotubulus-assoziierte Protein

MAPK	<i>Mitogen-activated Protein Kinase</i>
MCP-1	Monozyten chemoattraktives Protein-1
MCSF	<i>Macrophage Colony-stimulating Factor</i>
β-ME	β-Mercaptoethanol
MEK (MAPKK)	MAP-Kinase-Kinase
MEKK (MAPKKK)	MAP-Kinase-Kinase-Kinase
MK	MAPK-aktivierte Proteinkinase
MKP	MAP-Kinase-Phosphatase
MLK	<i>Mixed-Lineage Kinase</i>
mm	Millimeter
mmLDL	minimal modifiziertes LDL
MMP	Matrixmetallproteinasen
MnSOD	Mangane- Superoxiddismutase
MNK	<i>MAPK-interacting kinase</i>
mRNA	<i>messenger-Ribonukleinsäure</i>
msec	Millisekunde
MSK	Mitogen- und Stress-aktivierte Proteinkinase
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NFκB	Nuklearfaktor ' <i>kappa-light-chain-enhancer</i> ' der aktiviert B-Zelle
NGF	<i>Nerve Growth Factor</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NO ₂	Stickstoffdioxid
NOX	NADPH-Oxidase
Nrf2	Nuklearfaktor (<i>erythroid-derived 2</i>)-like 2
O ₂ ^{••}	Superoxidradikal
¹ O ₂	Singlett-Sauerstoff
O ₃	Ozon
•OH	Hydroxylradikal
ONOO ⁻	Peroxynitrit
ORO	Öl-Rot O
OxLDL	oxidiertes LDL
p90RSK (RSK)	90 kDa ribosomale S6-Kinase
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAI-1	Plasminogenaktivator Inhibitor-1
PAK1	<i>p21 Protein-activated Kinase 1</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalz

PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PFA	Paraformaldehyd
PGK	Phosphoglyceratkinase
PHGPx	Phospholipidhydroperoxide GPx
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PLTP	Phospholipid-Transferprotein
PTEN	Phosphatase und Tensin-Homolog
POD	Peroxidase
PP2A	<i>Protein Phosphatase 2</i>
Rac	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate</i>
Raf	<i>rapidly growing fibrosarcoma</i>
Ras	Rat sarcoma
RCT	reverser Cholesterintransport
RHS	retikulohistiozytäres System
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNS	reaktiven Stickstoffspezies
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RTD-PCR	<i>Real-Time-Detection-PCR</i>
RTK	<i>Receptor Tyrosin Kinase</i>
SAPK	<i>Stress-activated Protein Kinase</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Se	Selen
Sec	Selenocystein
Ser	Serin
SMase	Sphingomyelinase
SMCs	glatte Muskelzellen
SOD	Superoxiddismutase
SPC	<i>Statistical Process Control</i>
SR-A	Scavenger-Rezeptor A
SR-BI	Scavenger-Rezeptor B I

STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
T3	3,5,3'-Trijodothyronin
T4	Thyroxin
Tab.	Tabelle
TAB1	<i>TAK1-binding Protein</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAK1	<i>TGF-β-activating Kinase 1</i>
<i>Taq</i>	Bakterium <i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Tris-gepufferte Kochsalz
TBST	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween 20
TNF	Tumornekrosefaktor
TG	Triglyzeride
tg	Transgen
Thr	Threonin
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
TrxR	Thioredoxinreduktase
Tyr	Tyrosin
α -TOH	alpha-Tocopherol
UTP	Uridintriphosphat
UV/VIS	Ultraviolettes und sichtbares Licht
V	Voltage
VCAM-1	<i>Vascular Adhesion Molecule-1</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VLDL	<i>Very-low-density Lipoproteine</i>
VMCs	vaskuläre glatte Muskelzellen
WT	Wildtyp
WTD	Western Typ Diät

I. Einleitung

1. Atherosklerose

Atherosklerose, eine progressiv verlaufende Erkrankung, ist die wichtigste kardiovaskuläre Erkrankung (CVD) und die führende Ursache für Morbidität und Mortalität in der westlichen Welt. Es handelt sich um eine Form der chronischen Entzündung, die aus der Interaktion zwischen modifizierten Lipoproteinen, Makrophagen, T-Zellen und den normalen zellulären Elementen der Arterienwand resultiert. Am Ende kann dieser entzündliche Prozess zur Entwicklung von komplexen Läsionen oder Plaques in der Gefäßwand führen. Plaqueruptur und Thrombose können zu akuten klinischen Komplikationen wie Herzinfarkt oder Schlaganfall führen.³⁻⁵

Aus zahlreichen epidemiologischen und klinischen Studien wurden Hypertonie, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie, Übergewicht oder Rauchen bereits hinreichend als Risikofaktoren für die Entstehung und die Entwicklung der Atherosklerose beschrieben. Ein erhöhter Plasmacholesterinspiegel, insbesondere von *Low-Density Lipoprotein* (LDL) Cholesterin, ist einer der Hauptrisikofaktoren für Atherosklerose.⁶

1.1 Morphologie der Atherosklerose

1.1.1 Die gesunde Arterienwand

Die gesunde Arterienwand besteht aus drei Schichten, die – von luminal nach abluminal – als *Tunica intima*, *Tunica media* und *Tunica adventitia* bezeichnet werden. *Tunica intima* und *Tunica media* werden durch die so genannte *Lamina elastica interna* voneinander getrennt, die für gewöhnlich der *Tunica media* zugerechnet wird. Die *Tunica media* setzt sich aus alternierenden Schichten von glatten Muskelzellen (SMCs) und elastischem Bindegewebe zusammen. Die *Tunica adventitia* besteht aus Bindegewebe und enthält Nerven und kleine Gefäße, so genannte *vasa vasorum*, welche die äußere *Tunica media* nutritiv versorgen.

Für die Entstehung der atherosklerotischen Läsion ist die Struktur der *Tunica intima* bedeutsam. Sie reicht vom Gefäßendothel bis zum luminalen Rand der *Tunica media*. Die Dicke der *Tunica intima* im arteriellen Gefäßbett des Menschen ist variabel. Dicke Segmente repräsentieren physiologische Adaptationen an Blutdruck und Wandspannung. Sie finden sich deshalb bevorzugt an Orten, an denen im Blutstrom Turbulenzen entstehen,

und werden als „adaptive Intimaverdickungen“ bezeichnet. In diesem Bereich wird die physiologische Zweischichtung der menschlichen *Tunica intima* deutlich. Sie besteht aus einer dem Lumen zugewandten *Lamina fibroelastica*, die sich vorwiegend aus Bindegewebe zusammensetzt, und einer der *Tunica media* zugewandten *Lamina fibromuscularis*, die verstreut angeordnete SMCs enthält. In der *Lamina fibromuscularis* der Gefäßwandintima beginnt die Proliferation glatter Muskelzellen als eines der entscheidenden zellulären Ereignisse in der frühen Atherogenese. Fortgeschrittene atherosklerotische Läsionen des Menschen entstehen nahezu ausschließlich auf dem Boden adaptiver Intimaverdickungen, die somit als Prädilektionsstellen der Atherosklerose angesehen werden können.⁷

1.1.2 Die arteriosklerotische Läsion

Nach dem „Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis“ der „American Heart Association“ werden atherosklerotische Plaques nach morphologischen Kriterien in verschiedene Typen eingeteilt (Tab. 1.1).⁸

Tabelle 1.1 Klassifikation der verschiedenen atherosklerotischen Läsionstypen

Typ	Bezeichnung	Stadium	Lokalisation
I	<i>initial lesion</i>	<i>early lesion:</i>	<i>Tunica intima</i>
II	<i>fatty streak</i>	Vorläufer fortgeschrittener Läsion	
III	<i>preatheroma</i>	<i>intermediate lesion:</i> Übergang von der frühen zur fortgeschrittenen Läsion	
IV	<i>atheroma</i>	<i>advanced lesion:</i> fortgeschrittenen Läsion (klinische Symptomatik)	gesamte Arterienwand: <i>Tunica intima,</i> <i>Tunica media,</i> <i>Tunica adventitia</i>
V	<i>fibroatheroma</i>		
VI	<i>complicated lesion</i>		

2. Lipoproteine

2.1 Zusammensetzungen der Lipoproteine

Weil Lipide wasserunlöslich sind, müssen sie entweder als Einzelmoleküle an spezifische Transportproteine gebunden werden, oder bilden mizellare Komplexe mit Proteinen, so genannte Lipoproteine. Die einzelnen Partikel des Lipoproteins bestehen aus einem zentralen Lipidkern und einer Hülle. *Core*-Lipide sind die apolaren Cholesterinester, Triglyzeride und andere fettlösliche Substanzen, wie z.B. Vitamine. Die Hülle besteht aus

den polaren Phospholipiden, freiem Cholesterin, Fettsäuren sowie den Apolipoproteinen.⁹ Nach ihrer Dichten werden die Lipoproteine in sechs Hauptfraktionen aufgetrennt: Chylomikronen (CM), *Very-low-density Lipoproteine* (VLDL), *Intermediate-density Lipoproteine* (IDL), *Low-density Lipoproteine* (LDL), *High-density Lipoproteine* (HDL_E, HDL₂ und HDL₃)⁹ (Tab. 1.2).

Tabelle 1.2 Eigenschaften der Lipoproteine

Lipoprotein	Größe (nm)	Dichte (kg/l)	Apolipoproteinbestandteil
CM	< 10 ⁴	< 1,000	ApoA-IV, ApoB-48, ApoC-I, ApoC-II, ApoC-III, ApoE
VLDL	50	< 1,006	ApoB-100, ApoC-I, ApoC-II, ApoC-III, ApoC IV, ApoE
IDL	30	< 1,019	ApoC-I, ApoC-II, ApoC-III, ApoC IV
LDL	21	< 1,063	ApoB-100
HDL _E	12	< 1,125	ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, ApoC-IV, ApoE
HDL ₂	10	< 1,125	ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, ApoC-IV
HDL ₃	8	< 1,210	ApoA-I, ApoA-II, ApoA-IV, ApoC-IV, ApoD

Der Proteinanteil der Lipoproteine, das Apolipoprotein, ist zudem ein Ligand für verschiedene Rezeptoren und Cofaktor für Enzyme. Es gibt den Lipidmizellen zusätzliche Stabilität und spielt im Stoffwechsel der Lipide eine entscheidende Rolle.

Apolipoprotein A (ApoA) ist das Hauptapolipoprotein im HDL-Partikel. Neben seiner Aufgabe als Lipidstabilisator ist ApoA-I auch ein klassischer Aktivator der Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase (LCAT). ApoA-II wirkt bei der zellulären Cholesterinaufnahme mit und kann die hepatische Triglyceridlipase (HTGL) aktivieren.⁹

Apolipoprotein B-100 (ApoB-100) ist das einzige Apolipoprotein der LDL, ApoB-100 kommt auch in VLDL Partikeln vor. Jedes LDL-Partikel enthält ein Molekül ApoB-100, das als Ligand für den LDL-Rezeptor (LDLR) fungiert. ApoB-100 vermittelt die Bindung von LDL an den LDL-Rezeptor, wodurch die Aufnahme von LDL in die Zellen stattfinden kann.¹⁰

ApoB-48, das aminoternale Ende des ApoB-100, entsteht durch *RNA-editing* (ein gewebsspezifischer C zu U Austausch, in der editierten RNA entsteht ein *Stop-Codon*, was in der Translation zu einer verkürzten Isoform des ApoB führt). Es wird nur im Dünndarm synthetisiert und kommt in Chylomikronen vor. ApoB-48 ist essentiell für die Aufnahme

von Lipiden aus der Nahrung.⁹ ApoB fördert zudem die Cholesterinakkumulation in den Arterien durch die Bindung an Proteoglykane der extrazellulären Matrix.

Apolipoprotein E (ApoE) ist ein Bestandteil von Chylomikronen sowie VLDL und agiert als Ligand für die Rezeptor-vermittelte Aufnahme dieser Partikel. Es kommt jedoch auch in HDL vor und bildet dort eine eigene Lipoproteinklasse, zusammen mit ApoA-I.⁹

2.2 Fettstoffwechsel

Im Stoffwechsel der Lipoproteine des Plasmas werden ein exogenes, ein endogenes und ein reverses Cholesterintransportsystem unterschieden.

Der exogene Weg transportiert Lipide, die mit der Nahrung aufgenommen wurden. Nach ihrer Resorption werden die Nahrungslipide in der Dünndarmmukosa mit Apolipoproteinen komplexiert. Dadurch entstehen Chylomikronen (CM), die an die Lymphe abgegeben und über den Ductus thoracicus in den venösen Kreislauf gelangen. Hier werden die Chylomikronen hauptsächlich von der Lipoproteinlipase (LPL) hydrolysiert. Nach ihrer Sekretion in den Blutkreislauf nehmen CM aus dem Blut Apolipoprotein C (ApoC) aus HDL auf. ApoC-II ist der Kofaktor der endothelialen LPL, diese spaltet die Triglyzeride im Kern der Chylomikronen in freie Fettsäuren und β -Monoglyzeride, die vor allen vom Fettgewebe und der Muskulatur aufgenommen werden. Im Verlauf der Lipolyse nehmen die Chylomikronen ApoE aus HDL auf, während sie überschüssige Oberflächenkomponenten wie Apolipoproteine A-I, A-IV, C und Phospholipide als „*Surface-Remnants*“ an HDL abgeben. „*Chylomicron-Remnants*“, das Produkt dieses Umbaus, sind reich an Cholesterinestern und ApoE. Sie werden über Lipoproteinrezeptoren von der Leber aufgenommen.⁹

Der endogene Weg wird von den Lipoproteinen hepatischen Ursprungs beschriftet. Im Hungerzustand versorgt dieser Weg periphere Gewebe mit Triglyzeriden und Cholesterin. Triglyzeridreiche Lipoproteine werden zuerst von der Leber als **VLDL** sezerniert. Dann wird die Struktur der VLDL in einer Reihe von Reaktionen so moduliert, dass sie entweder als „*Remnants*“ aus der Zirkulation entfernt oder in **LDL** umgewandelt werden. LDL werden entweder über LDL-Rezeptor (LDLR) oder über den „*Scavenger Pathway*“ abgebaut.⁹

ApoB-100 ist die integrale Proteinkomponente der VLDL-Partikel. Der Zusammenbau der **VLDL** erfolgt über einen relativ komplizierten Syntheseweg: ApoB wird an den

Ribosomen synthetisiert und in das endoplasmatische Retikulum verlagert, dort werden Lipide auf das ApoB übertragen, dann gelangen die neu gebildeten VLDL in den Golgi-Apparat. Die Verfügbarkeit von Lipiden in der Leberzelle bestimmt die jeweilige Zusammensetzung der VLDL-Partikel, was auch die relative Heterogenität der Partikel erklärt.

In der Zirkulation ändern die VLDL-Partikel ihre Zusammensetzung. Zuerst nehmen sie weitere Moleküle ApoE und ApoC aus den HDL auf. Außerdem werden, vermittelt durch das Phospholipid-Transferprotein (PLTP), Phospholipide im Austausch gegen Cholesterin auf HDL übertragen. Die LPL hydrolysiert ca. 90% der Triglyzeride der VLDL-Partikel, wobei der größte Teil der ApoC und ein Teil des freien Cholesterins in die HDL-Partikel zurücktransferiert wird. Das freie Cholesterin wird durch die mit dem HDL assoziierte LCAT verestert und kann später wieder, durch das Cholesterinestertransferprotein (CETP) vermittelt, auf die ApoB enthaltenden Lipoproteinpartikel zurücktransferiert werden.

„VLDL-Remnants“, das Produkt nach Hydrolyse der Triglyzeride, sind reich an Cholesterinester sowie ApoE. Sie werden entweder über den LDL-Rezeptor in der Leber aufgenommen oder über Zwischenstufen intermediärer Dichte (IDL) mittels einer Delipidierungskaskade in LDL überführt. VLDL-Remnants, die in LDL umgewandelt werden, verlieren dabei den ApoE Anteil und nehmen, vermittelt durch CETP, Cholesterinester aus HDL auf.

Beim Gesunden transportiert LDL mehr als zwei Drittel des Cholesterins im Plasma. LDL entsteht aus der Umwandlung von VLDL, kann aber auch direkt von der Leber sezerniert werden. Normalerweise werden ca. zwei Drittel des LDL über LDL-Rezeptor abgebaut, der Rest wird über andere Wege verstoffwechselt. Die Leber leistet den größten Beitrag zum Rezeptor-vermittelten Katabolismus der LDL-Partikel, das übrige LDL gelangt in periphere Gewebe, wo das Cholesterin als Membranbaustein und als Vorläufermolekül für die Synthese von Steroidhormonen oder Vitamin D verwendet wird. Ein Drittel des LDL wird unabhängig vom LDLR über den „Scavenger Pathway“ abgebaut. Im Gegensatz zum LDLR ist der „Scavenger Pathway“ nicht sättigbar. Über einer Schwellenkonzentration von ca. 200 mg/dl LDL-Cholesterin sind alle LDLR gesättigt und die weitere Zunahme der LDL-Aufnahme erfolgt über den „Scavenger Pathway“. Diesem Weg liegen auf zellulärer Ebene mehrere Mechanismen zugrunde: adsorptive Endozytose über niedrigaffine Rezeptoren, Pinozytose und Aufnahme von LDL über Scavenger-Rezeptoren, die vor allem auf Makrophagen und anderen Zellen des retikulohistiozytären Systems (RHS) exprimiert werden.⁹

Der reverse Cholesterintransport (RCT) dient dem Transport von Cholesterin aus der Peripherie zur Leber, über diese wird das Cholesterin ausgeschieden. Ist der Cholesteringehalt der peripheren Zellen zu hoch, so kommt es zum Ausfluss des Cholesterins, zur Aufnahme in HDL und zum Rücktransport zur Leber. Naszierende scheinchenförmige HDL werden aus Leber und Intestinum ins Blut sezerniert. HDL nehmen freies Cholesterin über den *ATP-binding-Cassette-Transporter A1* (ABCA1) aus peripheren Organen und Makrophagen auf, und reifen zu zirkulierenden HDL.¹¹ Dort wird es durch LCAT verestert und durch CETP im Austausch gegen Triglyzeride (TG) an VLDL und LDL abgegeben. Diese gelangen nach rezeptorvermittelter Endozytose in die Leber und laden dort ihr Cholesterin ab.

HDL-Partikel können aber auch direkt Cholesterin in die Leber und in endokrine Organe schleusen. Das geschieht einerseits über den Zelloberflächenrezeptor Scavenger-Rezeptor B I (SR-BI), der die selektive Aufnahme von Cholesterinestern aus HDL vermittelt. Außerdem kann über den relativ unspezifischen Scavenger-Rezeptor CD36 Cholesterin aus HDL in die Zelle aufgenommen werden.⁹

3. Atherogenese

3.1 *Initiation und Progression der Atherosklerose*

Atherosklerose ist eine chronische inflammatorische Erkrankung, und Folge der Insudation von LDL in die arteriellen Intima. Native LDL besitzen keine inflammatorische Aktivität. Durch biochemische Modifikation werden die Lipoproteine atherogen. In der Vergangenheit wurden zahlreiche Hypothesen entwickelt, um die Atherogenese zu erklären. Davon sind zwei unterschiedliche Hypothese für die Modifikation der Lipoprotein bekannt: die weit verbreitete Oxidationshypothese (Abb. 1.1) und die seltenere E-LDL Hypothese. Die E-LDL Hypothese postuliert, dass die LDL durch die Reaktion von ubiquitären hydrolytischen Enzymen (enzymatisch modifizierte LDL, E-LDL) und nicht durch Oxidation modifiziert werden. Im Hinblick auf den Unterschied zwischen Initiation und Progression der atherosklerotischen Läsion, ist es wahrscheinlich, dass sich beide Modifikationarten der Lipoproteine nicht ausschließen, sondern ergänzen. Entsprechend dieses Prinzips wären E-LDL wichtiger für die Initiation der Atherosklerose, während laut Torzewski und Lackner die oxidative Modifikation der LDL für die Diagnose und Prognose diese Erkrankung hilfreich wäre.¹²

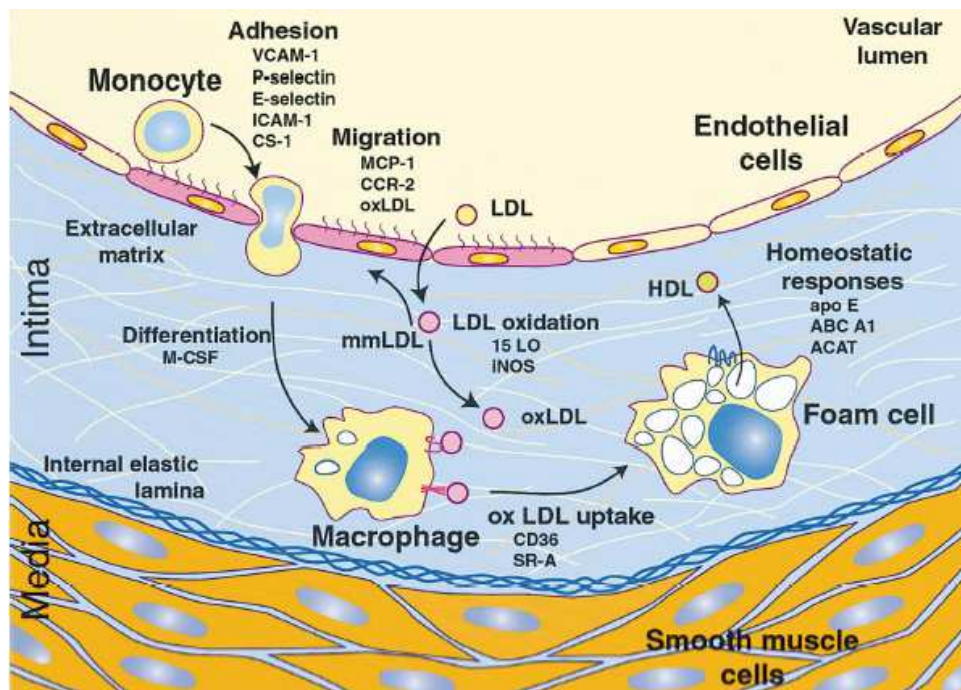


Abbildung 1.1 Oxidative Modifikationshypothese für die Entwicklung der Atherosklerose.¹³ Der zentrale Schritt bei der Entstehung einer atherosklerotischen Läsion ist die Oxidation von LDL. Unter nicht pathologischen Bedingungen tritt LDL in den subendothelialen Raum ein und verlässt diesen wieder. Findet allerdings unter der Bedingung erhöhten oxidativen Stresses eine Modifikation des LDL durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) statt, wird zunächst mmLDL gebildet und dann zum OxLDL weiter modifiziert, das dann im subendothelialen Raum zurückgehalten wird.¹⁴ Dort wirkt das OxLDL chemotaktisch auf Monozyten, T-Lymphozyten und Gewebsmakrophagen. Das mmLDL selbst kann die Adhäsion der zirkulierenden Monozyten an die Endothelzellen und anschließende Transmigration in den subendothelialen Raum forcieren.¹⁵ Zusätzlich induziert OxLDL die Expression und Sekretion von Zelladhäsionsmolekülen wie P-Selectin, *Vascular Cell Adhesion Protein 1* (VCAM-1) und *Inter-Cellular Adhesion Molecule 1* (ICAM-1) durch Endothelzellen.¹⁶ OxLDL kann die Synthese und Freigabe von *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1) in SMCs und Endothelzellen induzieren, was zur Rekrutierung von inflammatorischen Zellen führt. Dieser Prozess löst die Produktion von ROS aus, was wiederum zur Folge hat, dass die Oxidation von LDL weitergeführt wird. Im subendothelialen Raum differenzieren die adhärenen Monozyten durch MCSF in gewebständige Makrophagen. mmLDL stimuliert die Sekretion von MCSF durch Endothelzellen.¹⁷ Makrophagen nehmen OxLDL über den Scavenger-Rezeptor-Weg auf und Cholesterolester akkumulieren im Zytoplasma.^{13, 18} Die Akkumulation von Cholesterin im Zytoplasma der Makrophagen führt zur Formation von Schaumzellen, ein Kennzeichen der frühen „fatty streak“ Läsion.¹⁹

3.2 Plaquestabilität

Nach der Entstehung von „fatty streak“ Läsionen wandern glatte Muskelzellen in die Intima und den subendothelialen Raum ein. Die glatten Muskelzellen (SMCs) können proliferieren, modifiziertes Lipoprotein aufnehmen und sich in Schaumzellen umwandeln; produzieren extrazelluläre Matrix-Proteine, wie z.B. Kollagen, und führen zur Entwicklung der fibrösen Kappe.^{3, 4} Die Nekrose der Makrophagen- und SMC-abgeleiteten Schaumzellen führt zur Bildung eines nekrotischen Kerns und zur Akkumulation des extrazellulären Cholesterins.¹³ Die typische atherosklerotische Plaque (Atheroma oder Fibröse Plaque) besitzt einen nekrotischen Kern mit extrazellulären Lipiden. Darüber

befindet sich eine fibröse Kappe.²⁰ Eine stabile Plaque besteht meist aus einem kleinen Lipidkern und einer dicken fibromuskulären Kappe mit SMCs und extrazellulärer Matrix. Dies führt zu einer signifikanten Reduktion des Gefäßlumens, mit der möglichen Konsequenz einer Stenose oder eines Gefäßverschlusses. Eine instabile Plaque besitzt typischerweise einen großen Lipidkern und eine dünne Kappe mit vielen inflammatorische Zellen, besonders im Bereich der sog. Schulter.²¹ In der Schulter, die Übergangsbereich zu der noch erhaltenen Gefäßstruktur, ist die Läsion besonders anfällig für eine Ruptur. Die Akkumulation der Makrophagen und T-Lymphozyten in dieser Region spielt eine große Rolle bei der Plaqueruptur. Makrophagen sezernieren Matrix Metalloproteasen (MMP) und neue Gefäße werden gebildet, die zu einer Instabilisierung der Plaque führt. Die Plaqueruptur setzt Plaquelipide und Gewebefaktoren im Blut frei, wodurch es zur Plättchenadhärenz, Thrombusbildung und nachfolgendem akuten Koronarsyndrom kommen kann.^{13, 21}

4. Oxidativer Stress

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind in die Entstehung von Krankheiten wie Krebs, inflammatorischen und kardiovaskulären Erkrankungen involviert. ROS sind ein unvermeidbares Nebenprodukt der zellulären Respiration und führen zur Oxidation von Lipiden, Nukleinsäuren und Proteinen. Zellen haben selbst komplizierte antioxidative Systeme, um die Menge an ROS zu regulieren. Die Störung der Homöostase führt zum oxidativen Stress und zum Gewebeschaden.²² Unter oxidativen Stress versteht man das Ungleichgewicht zwischen oxidativen und antioxidativen Mechanismen.¹⁶

4.1 Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)

Reaktive Sauerstoffspezies entstehen permanent in biologischen Systemen sowohl aufgrund des Sauerstoffmetabolismus in physiologischen Prozessen, als auch infolge pathologischer Prozesse. Durch die mitochondriale Atmungskette wird O_2 zu H_2O reduziert; in diesem Prozess kann die unvollständige Reduktion von O_2 zur Erzeugung von ROS wie dem Superoxidradikal ($O_2^{\cdot -}$) führen. Ein weiterer Teil der ROS entsteht in den Zellen durch verschiedene Enzyme, z.B. durch die NADPH-Oxidase und die Myeloperoxidase.²³ Zusätzlich sind Umwelteinflüsse wie z.B. UV-Strahlung, Wärmebelastung, Ozon (O_3), Stickstoffdioxid (NO_2), Kohlenstofftetrachlorid (CCl_4) und Chemotherapie eine weitere Ursache für die zelluläre Erzeugung von ROS und oxidativem Stress.²²

4.1.1 Oxidantien

Zu den ROS zählen die Sauerstoff-enhaltenden freien Radikale mit unpaaren Elektronen (1e-Oxidantien). Außerdem gehören noch nicht radikale molekulare Oxidantien (2e-Oxidantien) in die Gruppe der ROS.¹⁶ (Tab. 1.3)

Tabelle 1.3 Typische Oxidation in biologischen Systemen und entsprechend Antioxidantien^{16, 22}

	Name der Oxidantien	Formel	Reaktion	Antioxidantien
1e-Oxidation	Superoxid-	$O_2^{\cdot -}$	$O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot -}$	SOD
	Hydroperoxyradikal	HO_2^{\cdot}		GPx-4
	Hydroxylradikal	$\cdot OH$	$Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + \cdot OH + OH^-$ $Cu^+ + H_2O_2 \rightarrow Cu^{2+} + \cdot OH + OH^-$	Harnsäure
	Peroxyradikal, Alkoxyradikal	RO_2^{\cdot} , RO^{\cdot}	$LH + \cdot OH \rightarrow L^{\cdot} + H_2O$ $L^{\cdot} + O_2 \rightarrow LOO^{\cdot}$ $LOO^{\cdot} + LH \rightarrow L^{\cdot} + LOOH$ $LOO^{\cdot} + \alpha\text{-TOH} \rightarrow L^{\cdot} + \alpha\text{-TO}^{\cdot}$	Trx, α -TOH, Harnsäure, Ubiquinol-10
	Stickstoff, Stickstoffdioxid	$\cdot NO$, $\cdot NO_2$	$2L\text{-Arginin} + 3NADPH + 4O^2 \rightarrow$ $2L\text{-Citrullin} + 4H_2O + 2NO$	Harnsäure, γ -TOH
	Thiylradikale Perthiylradikale	RS^{\cdot} , RSS^{\cdot}		Peroxiredoxin
	Übergangsmetallionen	Fe, Cu		Ferritin, Metallothionein
2e-Oxidation	Wasserstoffperoxid	H_2O_2	$2O_2^{\cdot -} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$	Katalase, GPx-1, Trx
	Singlett Sauerstoff	1O_2	$O_2 + h\nu \rightarrow ^1O_2$	β -Karotin, Harnsäure, Ascorbinsäure
	Ozon	O_3		
	Hypochlorit, Hypochlorsäure	$\cdot OCl$, $HOCl$	$H_2O_2 + Cl^- + H^+ \rightarrow HOCl + H_2O$	α -TOH
	Peroxynitrit, Peroxynitritsäure	$ONOO^{\cdot}$, $ONOOH$	$2O_2^{\cdot -} + \cdot NO \rightarrow ONOO^{\cdot}$	GPx, GSH, α -TOH
	Akylperoxynitrit, Dinitrogen Trioxid, Nitrylchloride, Nitrylion,	$OONO$, N_2O_3 , NO_2Cl , NO_2^+		
	Nitrosothiol	RSNO		

Unter inflammatorischen Bedingungen können Zellen Superoxid ($O_2^{\cdot -}$) und Stickstoff ($\cdot NO$) generieren, diese zwei freien Radikale können miteinander eine Verbindung eingehen und **Peroxynitrit** ($ONOO^{\cdot -}$) bilden. Peroxynitrit führt zu DNA-Schäden und zur Lipidoxidation. Selen-Verbindungen sollen vor Peroxynitrit-Schaden zu schützen.^{22, 24}

Die elektronische Anregung von Molekülsauerstoff erzeugt den **Singlett-Sauerstoff** (1O_2). Der Singlett-Sauerstoff ist keine radikale Spezies, aber sehr aktiv. Agenzien wie UV-Strahlung und Ozon, sowie Peroxidase-vermittelte Reaktionen, Peroxynitrit-Reaktionen und H_2O_2 -Reaktionen können Singlett-Sauerstoff erzeugen. Besonders Nukleinsäuren, Proteine, Lipide und Sterole werden vom Singlett-Sauerstoff geschädigt. Antioxidantien wie β -Karotin und Ascorbinsäure (Vitamin C) können den Singlett-Sauerstoff kompensieren.²²

Das **Wasserstoffperoxid** (H_2O_2) ist eine nicht radikale Spezies und entsteht aus der Dismutation von Superoxid durch SOD oder durch die Aktivität von diversen Oxidasen wie Glucoseoxidase. H_2O_2 ist relativ stabil. Es kann direkt durch Membranen diffundieren und hat eine deutlich längere Halbwertszeit, wodurch es in einer größeren Distanz von seinem Entstehungsort seine biologische Wirkung entfalten kann. Den größten oxidativen Schaden bewirkt H_2O_2 allerdings durch den Übergangsmetall-katalysierten Abbau, wodurch das hoch-reaktive Hydroxylradikal entsteht. Die Reduktion von H_2O_2 erfolgt mittels zellulärer Enzyme wie Katalase und Glutathionperoxidase (GPx), die H_2O_2 zu H_2O reduzieren können.^{16, 22}

Das **Hydroxylradikal** ($\cdot OH$) ist die reaktivste schädliche ROS. Die primäre Quelle des zellulären Hydroxylradikal sind Fenton oder Fenton-Typ Reaktionen mit Cu^+ und Fe^{2+} . Das Hydroxylradikal reagiert mit Molekülen sofort nach seiner Entstehung und oxidiert Lipide, Proteine und Nukleinsäuren. Die Störung der Metallhomöostase und erhöhte Konzentrationen freier Metallionen führt zur signifikant erhöhten Generierung von Hydroxylradikalen und oxidativem Stress.^{22, 25}

Des Weiteren kann ein freies Radikal ein Wasserstoffatom von einem nichtradikalischen Molekül abstrahieren. Dadurch wird ein neues Radikal generiert und löst eine Kettenreaktion aus. Solche Radikal-induzierten nicht enzymatischen Kettenreaktionen sind häufig in biologischen Systemen und spielen zum Beispiel eine wichtige Rolle bei der Lipidperoxidation. Das **Lipidperoxyradikal** (LOO^{\cdot}) ist ein wichtiger Kettenträger für die Lipidperoxidation und eine Zwischenspezies des Lipidhydroperoxid ($LOOH$).¹⁶

4.1.2 Die Generierung der ROS

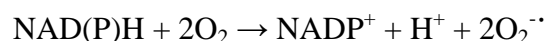
Es gibt verschiedene Enzyme und nicht enzymatische Systeme im Säugetierorganismus, die ROS generieren können. (Tab. 1.4)

Tabelle 1.4 Wichtige Enzyme und nichtenzymatische Systeme für die Generierung der ROS und ihre Lokalisation in der Gefäßwand¹⁶.

Oxidantien	ROS	Funktion	Lokalisation
NADPH-Oxidase	$O_2^{\cdot -}$	Reduziert O_2 zu $O_2^{\cdot -}$	Phagozyten, EC, SMCs
Xanthinoxidase	$O_2^{\cdot -}$	generiert $O_2^{\cdot -}$ durch Oxidation von Xanthin	EC
NO-Synthese	$O_2^{\cdot -}$, $\cdot NO$, $ONOO^{\cdot -}$	entkoppelte eNOS (wegen $BH_4 \downarrow$) reduziert O_2 zu $O_2^{\cdot -}$, $O_2^{\cdot -}$ reagiert mit $\cdot NO$ zu $ONOO^{\cdot -}$	EC
Myeloperoxidase	HOCl	katalysiert die Bildung von $Cl^{\cdot -}$ zu HOCl	
Lipoxygenasen		Oxidation von Fettsäuren, Bildung von biologisch aktiven Lipiden	Monozyten
Mitochondriale Respiration	$O_2^{\cdot -}$	generiert $O_2^{\cdot -}$ durch die mitochondriale Elektronentransportkette	
Übergangsmetalle Fe, Cu	$\cdot OH$	Starke Katalysatoren der Hydroperoxidevermittelten Oxidation von Lipiden	

EC: Endothelzellen, SMCs: glatte Muskelzellen

Die **NADPH-Oxidase** (NOX) spielt eine wichtige Rolle für die Generierung von ROS im Gefäßsystem. NOX ist das wichtigste Superoxid-generierende Enzym in der Gefäßwand und kann durch verschiedene Stimuli aktiviert werden. In Phagozyten wie Neutrophilen, Monozyten und Makrophagen vermittelt nur die aktivierte NADPH-Oxidase die Produktion von großen Mengen lysosomaler Superoxidradikale. Diese phagozytäre NADPH-Oxidase ist am Wirtsabwehrsystem beteiligt. Die nicht phagozytäre NADPH-Oxidase, die in Zellen wie vaskulären glatten Muskelzellen (VSMCs), Fibroblasten und Endothelzellen exprimiert wird, kann sowohl NADH als auch NADPH für die Generierung von $O_2^{\cdot -}$ verwenden (Reaktion s.u.) und hat eine geringere Aktivität bei der Generierung von $O_2^{\cdot -}$. In Gefäßzellen kann NADPH-Oxidase auch durch verschiedene Stimuli, z.B. *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF), TNF- α , IL-1 sowie OxLDL aktiviert werden.^{16, 26}



Die Myeloperoxidase und die Lipoxygenase sind zwei weitere wichtige prooxidante Enzyme mit proatherogener Wirkung. Neben diesen zwei Enzymen spielen noch weitere für die Generierung von ROS eine Rolle, z.B. Cytochrom P450 Isoenzyme, Hämoxygenase, Glukoseoxidase und die Xanthinoxidase, die je nach Expressionsniveau einen Einfluss auf den oxidativen Stress in der Gefäßwand haben.¹⁶

4.2 Antioxidantien

Unter Antioxidantien versteht man Substanzen mit Wirkung gegen ROS²⁷, die zum einen aus verschiedenen antioxidativen Enzymen wie den Superoxiddismutasen (SOD), Katalase, Glutathionperoxidasen (GPxs), Glutathionreduktase, Glutathion S-Transferase, Thioldisulfid, Oxidoreduktase und Peroxiredoxine bestehen. Zum anderen kommen nicht enzymatisch antioxidativ wirkende Proteine bzw. Peptide wie Schwefel- und Selenenthaltende Verbindungen und schließlich Spurennährstoffe wie β -Karotin, α -Tocopherol (α -TOH) und Ascorbinsäure (Vitamin C) hinzu^{16, 28} (s. Tab. 1.2).

Es gibt drei Isoformen von **Superoxiddismutase** (SOD) in Säugern: die Cu/Zn-SOD, die Mn-SOD und die extrazelluläre SOD (EC-SOD). Die Cu/Zn-SOD kommt in allen Zellen vor, bevorzugt im Cytosol. Die Mn-SOD befindet sich überwiegend im Mitochondrium und trägt ca. 10 % zur zellulären SOD-Aktivität bei. Auch die extrazelluläre EC-SOD hat Cu und Zn im aktiven Zentrum. Signifikante Mengen von EC-SOD wurden in der normalen Gefäßwand außerhalb der Zellen nachgewiesen, wobei das Enzym von glatten Muskelzellen synthetisiert wird. Eine Hauptfunktion der Cu/Zn-SOD scheint der Schutz vor $O_2^{\cdot-}$ -induzierter Inaktivierung von NO aus dem Endothel zu sein.¹⁶ Unerwartet waren deshalb die Daten bezüglich der SOD-KO Mäuse. Die Deletion der EC-SOD ist weder bei ApoE^{-/-} noch bei LDLR^{-/-} Mäuse proatherogen²⁹. Weiterhin hatte die Überexpression von Cu/Zn- und EC-SOD keine atheroprotektive Funktion.³⁰ Dies passt mit der Tatsache zusammen, dass sich in einem NOX-KO Mausmodell keine Reduktion der Atherosklerose feststellen lässt.³¹ Allerdings konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression der EC-SOD die Neointima-Bildung in einem Restenosemodell hemmt.³²

Glutathionperoxidase (GPx) und **Katalase** sind zwei weitere antioxidative Enzyme in der Gefäßwand. Die Katalase ist ein intrazelluläres Enzym, das ebenso wie GPx-1 H_2O_2 reduzieren kann. In der Gefäßwand ist die Aktivität der Katalase allerdings relativ niedrig. Sie spielt hauptsächlich bei einem relativ hohen Niveau an oxidativem Stress eine Rolle.¹⁶ Katalase-defiziente ApoE^{-/-} Mäuse haben mehr atherosklerotische Läsionen als entsprechende Kontrollmäuse.³³

Auch die nicht enzymatischen Antioxidantien Ascorbat, α -TOH und Glutathion (GSH) spielen eine wichtige Rolle bei dem Schutz vor oxidativem Stress in der Gefäßwand. **Glutathion** ist ein Schwefel-enthaltendes Tripeptid aus den Aminosäuren Glutamat, Cystein und Glycin, mit intrazellulären Konzentrationen von 1 – 15 mM.^{24, 34} Als ein entgiftendes Agens für endogene Radikalspezies und ein essentieller Kofaktor für GPx spielt GSH eine sehr wichtige Rolle für das antioxidative System in der Zelle.²² Eine

zusätzliche wichtige Funktion nimmt Glutathion bei der Proteinfaltung und im Ascorbatmetabolismus ein.¹⁶ Das **Ascorbat** (Vitamin C) ist ein Kofaktor für diverse Hydroxylasen und ist in der Gefäßwand für die Synthese des Kollagens von Bedeutung. Quantitativ betrachtet spielt das Ascorbat für die früheste Abwehr von oxidativen Schäden im Plasma sowie bei der Verhinderung der Lipidperoxidation die wichtigste Rolle.^{16, 35} Das **alpha-Tocopherol** (α -TOH, eine Form des Vitamin E) hat aufgrund seiner lipophilen Struktur die Eigenschaft, sich in Membranen oder Lipoproteinen einzulagern. Es ist ein bedeutendes Antioxidans, welches aus isoliertem LDL extrahiert werden kann. Dort hat es die Funktion, die Radikal-induzierte Lipidperoxidation zu kontrollieren. Neben seiner Rolle als *Scavenger* für Peroxylradikale wie LOO^\bullet kann das α -TOH ebenso mit $^1\text{O}_2$, HOCl und ONOO^- reagieren.¹⁶

4.3 Oxidativer Stress und Makrophagen in der Atherosklerose

OxLDL moduliert verschiedene zelluläre Prozesse wie Adhäsion, Migration, Apoptose, Genexpression und die Induktion der Signaltransduktionskaskaden, die die Schaumzellbildung und Makrophagenproliferation beeinflussen können.³⁶ Der Makrophage kann ROS produzieren und LDL oxidieren. Oxidativ modifizierte LDL werden durch Scavenger-Rezeptoren und CD36 in die Zelle aufgenommen. Makrophagen können auch native LDL durch klassische Rezeptoren oder Pinozytose aufnehmen. Anders als der klassische LDL-Rezeptor werden OxLDL-Rezeptoren nicht durch den intrazellulären Cholesteringehalt reguliert. Das OxLDL kann auch die Expression von Scavenger-Rezeptoren auf Makrophagen wie z.B. CD36, SR-A erhöhen.^{15, 16, 37} Andererseits wird die LDL-Oxidation durch Makrophagen sowohl durch LDL-assoziierte Antioxidantien als auch durch die Balance zwischen zellulären Antioxidanten und zellulären Oxygenasen (z.B. NOX, LOX) beeinflusst.³⁸ Antioxidanten, die an LDL gebunden sind (z.B. Vitamin E, Carotinoide) oder die im Plasma vorkommen (z.B. Vitamin C, Flavonoide), können die Oxidation von LDL inhibieren. Zelluläre Antioxidantien, die sich in Arterienzellen (z.B. Makrophagen) ansammeln, wie z.B. SOD, Katalase, reduziertes GSH und GPx, blockieren die Zell-vermittelte Oxidation der LDL.^{39, 40} (Abb. 1.2)

Monozyten/Makrophagen sind eine wichtige Quelle des NADPH-Oxidase-abgeleiteten O_2^- in atherosklerotischen Läsionen.⁴¹ Es wird vermutet, dass Makrophagen-vermittelte LDL-Oxidation komplett von der O_2^- -Produktion durch NADPH-Oxidase abhängig ist. (Abb. 1.2) Kalzium, Proteinkinase C (PKC), Phospholipase C (PLC) und *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1* (Rac1) führen zur Aktivierung/Phosphorylierung und

Translokation der NADPH-Oxidase in die Membran.⁴² Können die ROS aufgrund einer Defizienz im antioxidativen Schutzsystem (z.B. SOD, Katalase und GPx) nicht ausreichend abgebaut werden, reagiert das überschüssige O_2^- mit freiem NO und bildet ONOO⁻. Dadurch wird die Konzentration an freiem NO in der Gefäßwand deutlich gesenkt, und es entsteht toxisches ONOO⁻.^{1, 16} ONOO⁻ verursacht verschiedene schädliche Effekte, z.B. die Generierung von reaktiven Stickstoffspezies (RNS) und nitrosiertem Stress sowie die mitochondriale Dysfunktion, die direkte Auswirkung auf die Apoptose und die Plaqueinstabilität und -ruptur haben.^{43, 44} Zusätzlich können auch oxidierte Cyclooxygenasen (COX) und Lipoxygenasen (LOX) zur Bildung von Superoxiden beitragen und die Funktion der Makrophagen und die Entwicklung der Atherosklerose beeinflussen.¹³

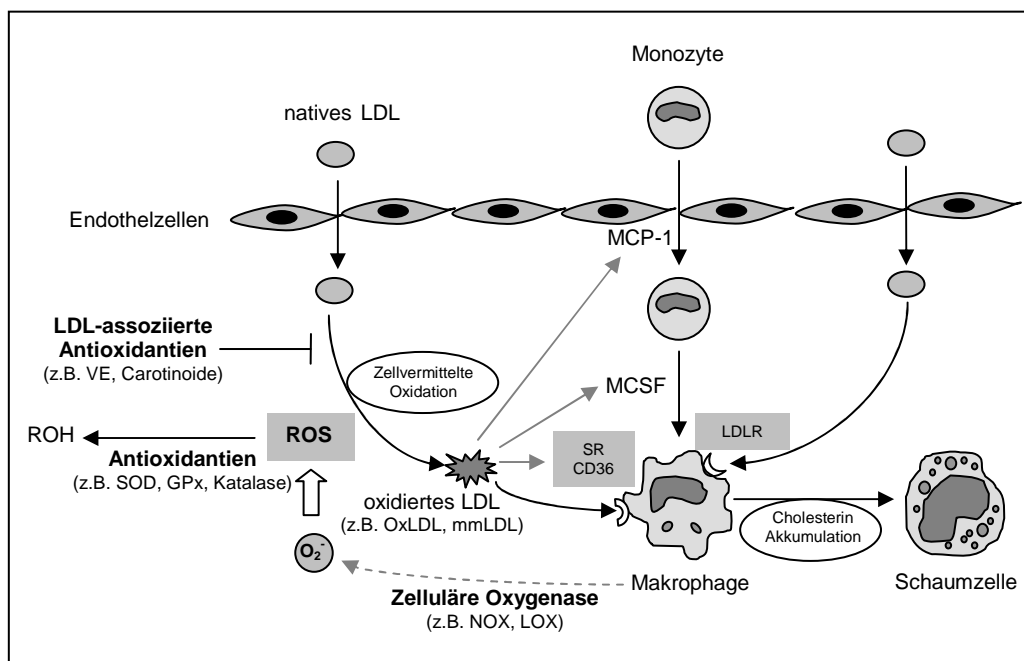


Abbildung 1.2 Potentielle Rolle bei der ROS vermittelten Oxidation von LDL in der frühen Atherogenese. (modifiziert nach Ochsenhirt¹). VE: Vitamin E, SOD: Superoxiddismutase, NOX: NADPH-Oxidase, LOX: Lipoxygenase, SR: Scavenger-Rezeptor, LDLR: LDL-Rezeptor, MCP-1: *Monocyte Chemoattractant Protein-1*, MCSF: *Macrophage Colony-Stimulating Factor*

Durch die Stress-aktivierten Signalwege führt die Produktion von ROS auch zur Veränderung der Zellfunktion, z.B. bei Adhäsion, Proliferation und Motilität. Oxidativer Stress stimuliert die Endothelsekretion und -expression der MCP-1 und MCSF durch den NFκB-Signalweg.^{15, 16} Die Aktivierung der PKC ist gekoppelt mit einem Kalzium-Anstieg im OxLDL-induzierten Wachstum der Makrophagen.⁴⁵ Die OxLDL-induzierte Expression von GM-CSF durch PKC führt zur Aktivierung der PI3K, die für die

Makrophagenproliferation wichtig ist.⁴⁶ Abhängig vom p38-MAPK- oder JNK-Signalweg kann OxLDL die Apoptose-typischen morphologischen Veränderungen sowie die DNA-Fragmentierung in kultivierten Makrophagen induzieren.⁴⁷ mmLDL hingegen kann zum anhaltenden Überleben von Schaumzellen in der Läsion durch den PI3K/Akt-Signalweg beitragen.⁴⁸

5. Glutathionperoxidase

5.1 Selen und Selenoprotein

Selen (Se), ein wichtiges Spurenelement des Menschen, ist hauptsächlich für seine antioxidativen, anti-inflammatorischen und antiviralen Eigenschaften bekannt, sowie für seine therapeutische Wirkung.^{49, 50} Ein eindrucksvolles Beispiel für seine Bedeutung ist das Auftreten der Keshan-Erkrankung, einer Kardiomyopathie, die endemisch in bestimmten Se-armen Gebieten von China auftritt. Sie ist mit Se-Ersatz vollständig vermeidbar.⁵¹ Die Hauptform des Selens in den Säugetierproteinen ist die Aminosäure Selenocystein (Sec, U), die durch das TGA Codon kodiert wird. Es wird ein spezifischer Mechanismus benutzt, um das UGA Codon in der mRNA zu dekodieren, wodurch das Selen als Teil des Sec in die Polypeptidkette cotranslational aufgenommen wird. Es gibt keinen freien Pool für Sec in den Zellen. Während des Proteinkatabolismus wird Sec zum elementaren Selen abgebaut.^{52, 53}

Im humanen Genom sind 25 Gene für Selenoproteine identifiziert worden, die hauptsächlich in zwei Gruppen entsprechend der Position von Sec eingeordnet werden können.⁵⁴ Bei der einen Gruppe Selenoproteine ist Sec sehr nah am C-Terminus des Proteins gelegen, z.B. bei den Thioredoxinreduktasen (TrxRs) oder Selenoproteinen S, R, O, I und K. Die andere Gruppe (einschließlich Glutathionperoxidasen (GPxs), Iodothyronideiodinasen (DIOs), den Selenoproteinen H, M, N, T, V und W, SPS2, Sep15) trägt Sec im N-terminalen Teil und besitzt meist eine Thioredoxin-Faltblattstruktur. Selenoproteine spielen eine Rolle bei der Oxidoreduktion, in der Redox-Signaltransduktion, bei der antioxidativen Abwehr, im Schilddrüsenhormon-Stoffwechsel und bei der Immunantwort.⁵³ Einige Selenoproteine sind antioxidative Enzyme. Sie mildern den ROS-induzierten Zellstress.⁵⁵ TrxRs, GPxs und DIOs sind die drei am eingehendsten untersuchten Selenoprotein-Familien, die an den Redox-Reaktionen beteiligt sind (s. Tab. 1.5). Sec ist Bestandteil des aktiven Zentrums des Enzyms, das für die katalytische Aktivität wichtig ist.⁵³

Tabelle 1.5 Vorkommen und Funktion der wichtigsten Selenoproteine (modifiziert nach Ochsenhirt)^{1, 56}

Selenoprotein	Lokalisation	Funktion
GPx-1 (cGPx)	Ubiquitär	Antioxidanz
GPx-2 (GIGPx)	Dünndarm, Leber	Oxidationsschutz im GIT
GPx-3 (pGPx)	Niere	Antioxidanz
GPx-4 (PHGPx)	Ubiquitär	Spermienreifung, Schutz von Biomembranen
GPx-6	Olfaktorisches Epithel, Embryo	
TrxR-1	Ubiquitär	Reduktion von Trx
mitochondriale TrxR	Ubiquitär	Reduktion von Trx
testikuläre TrxR	Testis	Reduktion von Trx
homologe TrxR	Unbekannt	unbekannt
DIOs Typ I	Schilddrüse, ZNS, Leber, Niere, ZNS	T4 → T3
DIOs Typ II	Schilddrüse, Hypophyse, Gehirn, Placenta	T4 → T3
DIOs Typ III	Haut, Placenta, ZNS	Inaktivierung von T3 und T4

5.2 Die Glutathionperoxidase Familie

GPxs sind bekannt als eine Hauptkomponente des antioxidativen Systems. Beim Menschen gibt es fünf Sec-enthaltende GPxs: die ubiquitäre cytosolische GPx (GPx-1), die gastrointestinal-spezifische GPx (GPx-2), die Plasma GPx (GPx-3), die ubiquitäre Phospholipidhydroperoxide GPx (GPx-4, PHGPx) und die für das olfaktorische Epithel und embryonales Gewebe spezifische GPx (GPx-6).⁵⁷ GPx-1 bis GPx-3 sind homotetramere Proteine aus vier identischen 22-25 kDa große Untereinheiten, während GPx4 ein 20-22 kDa monomeres Enzym ist.^{53, 57} GPx-6 konnte bisher nur im Embryo und im olfaktorischen Epithel nachgewiesen werden, über die Funktion dieser Isoform ist noch nichts bekannt.⁵⁸ Neben diesen fünf Glutathionperoxidasen gibt es bis dato noch zwei weitere bekannte Isoformen, GPx-5 und GPx-7, die allerdings kein Selenocystein im aktiven Zentrum tragen.⁴⁹ Alle Isoformen der GPxs reduzieren Peroxide bzw. Peroxynitrite zu den entsprechenden Alkoholen bzw. Nitriten unter Verwendung des Kofaktors Glutathion (GSH). Die Lokalisation, Substratspezifität und der Syntheseort aber sind bei jeder GPx unterschiedlich.⁵⁵ GPx-1 bis GPx-3 katalysieren nur die Reduktion von Wasserstoff-peroxiden und organischen Hydroperoxiden, während GPx-4 auch Phospholipid- und Cholesterin-Hydroperoxide direkt in der Membran reduzieren kann.^{53, 59}

GPx-1 ist eines der am häufigsten und ubiquitär exprimierten Selenoproteine.^{60, 61} Es reagiert sehr empfindlich auf Veränderungen des Se-Status. Bei niedriger Se-

Konzentration werden das mRNA- und Proteinniveau dramatisch reduziert.⁶² Zusätzlich zur Se-Konzentration können andere Faktoren wie oxidativer Stress die Expression von GPx-1 beeinflussen. Oxidativer Stress reduziert das GPx-1-Niveau.⁶³ Die GPx-1 reduziert durch Oxidation des Selenols zu Selensäure im aktiven Zentrum Peroxide zu dem entsprechenden Alkohol. Die Selensäure wird anschließend über einen komplexen Mechanismus unter Verbrauch des Kofaktors Glutathion regeneriert. Dabei wird zunächst ein Glutathion durch die Bildung einer kovalenten Bindung mit der Selensäure oxidiert, die dabei unter Wasserabspaltung reduziert wird. Durch die Oxidation von einem weiteren Glutathion wird das reduzierte Selenol wieder freigesetzt, wobei oxidiertes di-Glutathion (GSSG) entsteht. Das di-Glutathion wird dann durch das Enzym Glutathionreduktase wieder in die reduzierte Form überführt und steht somit für einen weiteren katalytischen Zyklus zur Verfügung. (s. Abb. 1.3) Für die Reduktion des oxidierten Glutathions benötigt die Glutathionreduktase den Kofaktor NADPH.⁶⁴ Zusätzlich kann GPx-1 Fettsäureperoxide innerhalb von Phospholipiden nur nach Spaltung durch die Phospholipase A2 reduzieren.⁶⁵

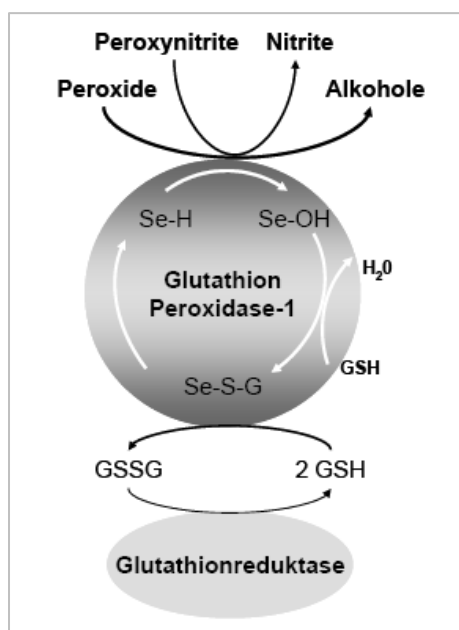


Abbildung 1.3 Katalytischer Zyklus der Glutathionperoxidase-1^{1, 2}
GSH: Glutathion, SeH: Selenol, SeOH: Selensäure

GPx-2, deren Struktur- und Substratspezifität ähnlich derjenigen der GPx-1 ist, wird aufgrund ihrer Lokalisation auch als gastrointestinale GPx bezeichnet, da sie nur im Dünndarm und in der Leber exprimiert wird.⁵⁷ Die wichtige Rolle von GPx-2 besteht darin, das Darmepithel vor oxidativem Stress zu schützen.⁵⁵

GPx-3 (Plasma GPx) ist glykosyliert und kommt in ihrer höchsten Konzentration im Plasma vor. Sie wird hauptsächlich in der Niere synthetisiert und anschließend in das

Plasma sezerniert. Die höchste mRNA Konzentration findet sich zwar in der Niere, sie ist allerdings auch zum Teil in der Lunge, dem Herz und in anderen Geweben nachweisbar.^{66, 67} In der Niere wird die GPx-3 am stärksten im Endothel des proximalen Tubulus exprimiert. Es wird vermutet, dass die GPx-3 eine Rolle beim Schutz der proximalen Tubuli vor lokal entstehenden Peroxiden übernimmt.⁶⁸ Zusätzlich dient GPx-3 als lokale Quelle des extrazellulären Antioxidantiensystems.⁶⁹

GPx-4 (PHGPx) kommt in zytosolischen, mitochondrialen und nuklearen Isoformen mit differenzialer Gewebeverteilung vor.⁷⁰ Es ist ein wichtiges Antioxidans in Zellen und ist beteiligt an der zellulären Differenzierung während der embryonalen Entwicklung.^{49, 71} Im Unterschied zu anderen GPx kann GPx-4 als einziges Enzym membranständige Phospholipidperoxide reduzieren und scheint damit zusätzlich eine wichtige antiapoptotische Funktion zu haben.⁵⁵ Außerdem spielt GPx-4 eine besondere Rolle für die Spermio-genese, indem sie in den Spermien die Funktion eines Strukturproteins übernimmt.

5.3 *Glutathionperoxidase und Atherosklerose*

Protektive Effekte von Selen-abhängigen GPxs gegenüber Atherosklerose-relevanten Prozessen sind bekannt.⁷² Einige dieser Effekte sind die Inhibition der oxidativen Modifikation von LDL, die Inhibition der putativen proatherogenen 15-Lipoxygenase (15-LOX) durch den PHGPx-katalysierten Abbau der Hydroperoxide⁷³ und die Modifikation der Zytokin-induzierten Expression von Adhäsionsmolekülen.⁷³⁻⁷⁵ Innerhalb der GPx-Familie ist GPx-1 das wichtigste intrazelluläre Selenoprotein, das gegen oxidativen Stress wirkt.

5.3.1 *Glutathionperoxidase-1 und kardiovaskuläre Erkrankungen*

Das Protein GPx-1 wird in den Blutgefäßen exprimiert und hat Einfluss auf kardiovaskuläre Erkrankungen.⁷⁶ Es wurde kürzlich gezeigt, dass bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit unabhängig von den traditionellen Risikofaktoren oder der Atherosklerose, eine niedrige Aktivität des GPx-1 in roten Blutzellen mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse einhergeht.⁷⁷ GPx-1 Aktivität ist niedriger oder abwesend in den atherosklerotischen Plaques der Arteria carotis. Eine inverse Korrelation zwischen der GPx-1 Aktivität in der atherosklerotischen Läsion und der Atheroprogression wurde beim Menschen nachgewiesen.⁷⁸ Infiziert man GPx-1^{-/-} Mäusen mit dem Cocksackie-Virus Stamm B3, entwickeln die Mäuse eine Myokarditis. Diese Herzmuskelentzündung führt wahrscheinlich zu einem erhöhten zellulären oxidativen Stress.⁷⁹

5.3.2 Potentielle Rolle der Glutathionperoxidase-1 bei der Atherogenese

Die wichtigste **extrazelluläre Funktion** der GPx-1 bei der Entstehung der Atherosklerose ist ihre schützende Wirkung gegen ROS. GPx-1 kann die ROS-vermittelte Oxidation von LDL inhibieren. Zusätzlich ist bekannt, dass ein Mangel am bioaktiven Stickoxid (NO) in GPx-1 KO Mäusen eine Endotheldysfunktion verursachen kann, was auf eine vaskulär schützende Wirkung von GPx-1 hinweist. Bezüglich ROS und Endotheldysfunktion spielt die Beziehung zwischen GPx-1 und Homocystein eine große Rolle.^{2, 80}

Bei der **intrazellulären Funktion** der GPx-1 in der Atherogenese sind zwei Aspekte von Bedeutung: die Inhibition der 5-Lipoxygenase (5-LO) und die Beeinflussung der Signaltransduktionswege. Prostaglandin I₂ ist ein potenter Vasodilator und Inhibitor der Plättchenaggregation.⁸¹ Die GPx-1 inhibieren die Prostanoidsynthese in verschiedenen Zellen, einschließlich Endothelzellen, Plättchen und Leukozyten.⁸² 5-LO ist ein wichtiges proatherogenes Enzym und wird von GPx-1 in Monozyten spezifisch inhibiert. GPx-1 kann in die Entstehung der Eicosanoide eingreifen, indem es zum einen Lipidhydroperoxide direkt reduziert und zum anderen die Aktivität der Lipoxygenasen (LO) und der COX beeinflussen und damit die Produktion der Eicosanoide verhindern kann. Lipidhydroperoxide können ein Fe im aktiven Zentrum der Enzyme oxidieren und diese damit in die aktive Form überführen. In Anwesenheit der GPx-1 wird die Verfügbarkeit der Lipidhydroperoxide herabgesetzt, wodurch die Lipoxygenasen in der inaktiven Form verbleiben.⁸³

Die Fähigkeit der GPx-1, ROS wie z.B. H₂O₂ zu inaktivieren, hat auch Einfluss auf die Aktivierung der ROS-abhängigen zellulären Signaltransduktion.² Die intrazelluläre und Gewebe-Konzentration der GPx-1 beeinflusst die Apoptose und das Überleben der Zellen durch die Phosphorylierung der Proteinkinase und die Oxidantien-vermittelte NFκB-Aktivierung.⁶¹ Überexpression von GPx-1 kann die H₂O₂-induzierte Zellapoptose inhibieren.⁶⁹ In Mausmodell wurde gezeigt, dass die Überexpression der GPx-1 unter Hypoxie die p38-MAPK Phosphorylierung verhindert.⁸⁴ Dagegen führt die niedrige GPx-1 Aktivität in Se-defizienten Mäusen zu einer Verminderung der JNK-Phosphorylierung.⁸⁵ Die Überexpression der GPx-1 supprimiert die H₂O₂ oder TNF-α induzierte NFκB-Aktivierung in verschiedenen Zelllinien.⁶⁹ Da NFκB an der Regulation vieler proatherogener Faktoren, z.B. inflammatorischer Zytokine, Chemokine oder Adhäsions-moleküle beteiligt ist, könnte GPx-1 auch auf diesem Weg die Atherogenese beeinflussen.²

6. MAPK-Signaltransduktionswege

Mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAPKs) sind eine Gruppe von Prolin-gesteuerten Serin/Threonin spezifischen Proteinkinasen, die durch verschiedene extrazelluläre Stimuli wie z.B. Wachstumsfaktoren, UV-Strahlung, inflammatorische Zytokine und oxidativen Stress aktiviert werden und die Signaltransduktion von der Zelloberfläche zum Nucleus vermitteln.⁸⁶ MAPKs werden in allen Zelltypen exprimiert und regulieren zellspezifische biologische Reaktionen. Zusammen mit anderen Signalwegen können MAPKs die Aktivität der spezifischen Transkriptionsfaktoren sowie der regulatorischen Proteine regulieren. Deshalb spielen MAPK-Familien eine wichtige Rolle in vielschichtigen physiologischen und pathologischen zellulären Phänomenen, wie Inflammation, Zellproliferation, -differenzierung, -entwicklung, -apoptose, -transformation und Tumorzellinvasion und -metastasierung.⁸⁶⁻⁸⁸

In Säugertierzellen sind drei MAPKs bekannt: *extracellular-signal regulated kinase 1/2* (ERK1/2, p44/42 MAPK), p38-MAPK und *C-Jun N-terminal kinase / stress-activated protein kinase* (JNK/SAPK).^{87, 89} Jede Kaskade besteht aus drei Enzymen, die nacheinander aktiviert werden, nämlich MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MEKK oder MAPKKK), MAP-Kinase-Kinase (MEK, MAPKK) und MAP-Kinase (MAPK). In diesem System phosphorylieren und aktivieren MAPKKKs die MAPKKs, die wiederum die MAPKs phosphorylieren und aktivieren. MEKs sind dualspezifische Enzyme, die Serin/Threonin- und Tyrosinreste-Reste der MAPK phosphorylieren können. Bis jetzt sind 20 MEKKs, 7 MEKs und 12 MAPKs bekannt^{88, 89} (Abb. 1.4).

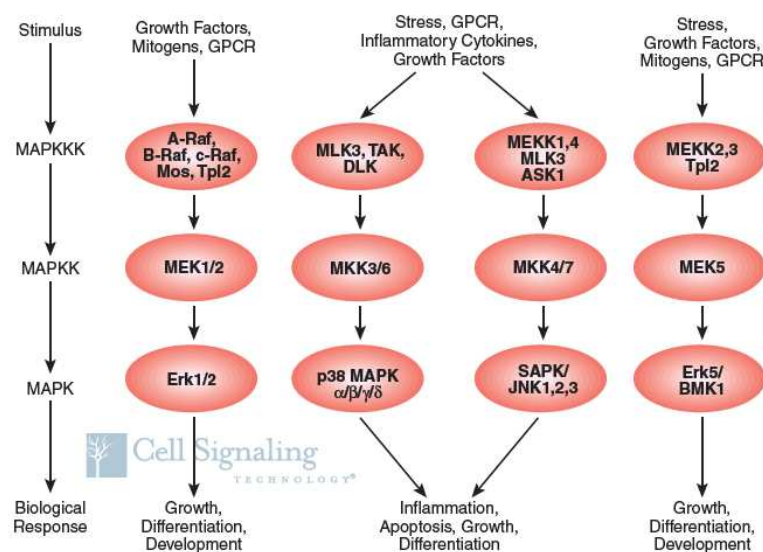


Abbildung 1.4 Mitogenaktivierte Proteinkinase Kaskade (www.cellsignal.com/pathways/map-kinase.jsp)

6.1 Der ERK Signaltransduktionsweg

ERK1 (p42) und ERK2 (p44) sind die bekanntesten MAP-Kinasen. Die klassische ERK-Familie spielt eine entscheidende Rolle in der Kontrolle der Mitogenese. Die Aktivität von ERK1/2 wird durch Mitogene und Wachstumsfaktoren wie z.B. *Epidermal Growth Factor* (EGF), über Tyrosinkinase-Rezeptoren (RTKs, z.B. EGFR) stimuliert. Aktivierte RTK haben eine Bindungsstelle für Adapterproteine wie Grb2 und Shc. Die Anlagerung der Adapterproteine führt zur Verlagerung des Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (SOS, *Son of Sevenless*) an die Plasmamembran. SOS aktiviert **Ras** durch den Austausch von GDP zu GTP.⁸⁸ Ras, ein kleines GTP-bindendes Protein, ist ein *Upstream*-Molekül für verschiedene Signaltransduktionswege inklusive Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt und RalEGF/Ral.⁹⁰ Das Ras-GTP bindet direkt am **Raf**, eine MAPKKK. Raf lagert sich an die Plasmamembran an, wodurch die Kinaseaktivität erhöht wird. Raf ist eine Serin/Threonin-Kinase und kommt in Zellen als Multiproteinkomplex aus Raf, Hsp90 und 14-3-3 vor.⁸⁸ Gene in anderen Signalwegen (z.B. PI3K, PTEN, Akt) können auch die Aktivität von Raf regulieren.⁹¹ Auch G Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) können zur Aktivierung der MAPKs führen.⁸⁹ Die Stimulierung von GPCRs führt zur Tyrosin-Phosphorylierung der RTK, z.B. von EGFR.⁹² Neben RTKs können sich Integrin-basiertes Scaffold und β -Arrestin-Scaffold an der GPCRs-stimulierten MAPK-Kaskade beteiligen. Zusätzlich spielen die Proteinkinase-C (PKC) und Kalzium eine große Rolle bei der ERK-Aktivierung. Die Aktivierung von PLC γ und erhöhtes intrazelluläres Ca²⁺ führen zur Aktivierung der PKC, die aktivierte PKC kann wiederum Ras aktivieren oder Raf-1 direkt phosphorylieren.⁹³

In der klassischen **Raf/MEK/ERK-Kaskade** phosphoryliert die aktivierte Raf-Kinase die MEK an Ser²¹⁸ und Ser²²², die aktivierte MEK phosphoryliert wiederum ERK1/2 an Thr¹⁸³ und Tyr¹⁸⁵ (am TEY-Motiv), dadurch wird ihre enzymatische Aktivität erhöht. Weiterhin können MEK1 sowie die Mos-Proteinkinase, die während der meiotischen Reifung der Eizellen exprimiert wird, MEK aktivieren. Verschiedene zytoplasmatische Proteine sind als Substrate von ERK bekannt. Das wichtige Downstream der aktivierten ERKs sind die 90kDa ribosomale S6-Kinase (p90RSK), die zytoplasmatische Phospholipase A₂ (cPLA₂), Mitogen- und Stress-aktivierte Proteinkinasen 1 und 2 (MSK1/2) und das Mikrotubulus-assoziierte Protein (MAP). Solche Substrate binden an anderen Proteine oder DNA und wirken als Phosphotransferase und Phosphatase. Die aktivierte ERK transloziert in den Nukleus und phosphoryliert verschiedene Transkriptionsfaktoren, z.B. c-Fos, Elk-1, c-Jun, die die Genexpression regulieren können.⁸⁹ ERK phosphoryliert auch viele andere Proteine, z.B. Cyclin D1 und p21, die am Zellzyklus beteiligt sind. Des Weiteren kann ERK die Inhibitor- κ B-Kinase (IKK)

phosphorylieren und aktivieren. IKK phosphoryliert ihrerseits den NF- κ B-Inhibitor I κ B, was zu der Polyubiquitinierung und dem Abbau der I κ B führt. Dadurch können NF- κ B Moleküle in den Zellkern gelangen und ihre spezifischen Funktionen als Transkriptionsfaktor ausüben.⁹⁴ Die Raf/MEK/ERK-Kaskade und Raf selbst können durch die Phosphorylierung verschiedener Moleküle, z.B. CREB, Bad, Kaspase-9 die Zellen vor Apoptose schützen.^{89, 91} Dadurch hat die Raf/MEK/ERK-Kaskade diverse zellspezifische Wirkungen auf das Zellwachstum, die Zelldifferenzierung und -proliferation, den Schutz vor Apoptose und den Zellzyklus.^{88, 89, 95}

6.2 p38-MAPK Signaltransduktionsweg

Die p38-MAP Kinase hat 4 Isoformen, nämlich p38 α (SAPK2a), p38 β (SAPK2b), p38 γ (SAPK3, ERK6) und p38 δ (SAPK4). p38 α ist ein 38 kDa Protein. Die Stimulation mit Lipopolysaccharid (LPS) führt zur schnellen Phosphorylierung der p38. p38 α und p38 β werden ubiquitär exprimiert, während p38 γ im Muskel und p38 δ in Pankreas, Dünndarm und Hoden sowie CD4⁺ T-Zellen gefunden wurde. Die p38-MAPKs werden durch extrazelluläre Stimuli aktiviert, z.B. durch UV-Strahlung, Wärmeshock, osmotischen Stress, LPS, Wachstumsfaktoren (z.B. MCSF), proinflammatorische Zytokine (z.B. IL-1, TNF- α) und einige Mitogene. Die Aktivierung der p38-Kinase erfolgt mittels dualer Phosphorylierung am Sequenzmotiv Thr-Gly-Tyr (TGY).^{88, 96} Als Reaktion auf extrazelluläre Stimuli lösen verschiedene MAPKKs, wie die TAK1 (TGF- β -aktivierte Kinase 1), MLK3 (*Mixed-Lineage Kinase 3*), die p38-Kaskade aus. Einige MAPKK wie ASK1 (*Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1*) und MEKK4 können sowohl die p38- als auch die JNK-Kaskade aktivieren.⁹⁷ MKK3 und MKK6 liegen direkt downstream solcher Kinasen. Durch die Bindung an MEKK1 oder MLK1 können GTP-bindende Proteine der Rho-Familie, wie z.B. Rac1 und Cdc42, die Aktivität der MAPKKs regulieren.^{96, 98}

Drei MAPKKs (MKKs) können p38-MAPK an Threonin- und Tyrosin-Resten phosphorylieren. MKK6 kann alle p38-Kinasen phosphorylieren, während MKK3 nur p38 $\alpha/\gamma/\delta$ aktivieren kann. MKK4, ein JNK-Kinase, kann auch p38 α/δ in spezifischen Zelltypen aktivieren.^{96, 97} Unabhängig von der MAPKK kann p38 α durch Autophosphorylierung nach Interaktion mit TAB1 (TAK1-bindendes Protein) aktiviert werden.⁹⁹ Nach der Aktivierung transloziert p38 in den Nukleus und phosphoryliert verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie p53 und Myc, usw.⁹⁶ In der p38-Kaskade werden verschiedene Proteinkinasen aktiviert, um die Genexpression zu kontrollieren, z.B. MK2/3 (MAPK-aktivierte Proteinkinase 2 und 3) und MNK1/2 (*MAPK-interacting Kinase 1/2*). MK2/3 sind im posttranskriptionale Modifikation der Genexpression beteiligt; zusätzlich

phosphoryliert und aktiviert MK2 das *Heat Shock Protein* (z.B. Hsp27).^{97, 100} MNK1/2 können die Proteinsynthese durch die Phosphorylierung des eukaryotischen Initiationsfaktors 4E (eIF4E) regulieren.¹⁰¹ Sowohl bei der p38- als auch bei der ERK-Kaskade werden die MSK1/2, cPLA₂ und p90RSK aktiviert, was zur schnellen Aktivierung der Transkriptionsfaktoren wie z.B. CREB und ATF-1 führt.^{89, 102} Auch viele zytosolische Proteine, z.B. cPLA₂, Cyclin D1, Bcl-2-Familie-Protein und Wachstumsfaktor-Rezeptoren, sind Substrate für p38α.^{96, 103}

Der p38-MAPK Signaltransduktionsweg spielt eine große Rolle bei der Regulation von Zellüberleben, Zellapoptose, Zelldifferenzierung, Zellzyklus und Zellentwicklung sowie bei der inflammatorischen Reaktion. Innerhalb der p38-MAPK Familie ist p38α, ein Suppressor der Zellproliferation, die am besten erforschte Kinase. p38α inhibiert die Zellproliferation unter physiologischen Bedingungen in diversen Zelltypen *in vivo*. Eine andere wichtige Funktion der p38α ist die Förderung der Zelldifferenzierung. In der Lunge spielt die Aktivierung von p38α bei der Inhibition der Stamm- und Progenitorzellen eine wichtige Rolle. p38α erhöht außerdem die Zellapoptose und verstärkt den Alterungsprozess.¹⁰⁴ Jedoch ist die Rolle von p38α bei der Apoptose abhängig von Zelltyp und Stimuli.^{95, 105}

6.3 JNK/SAPK Signaltransduktionsweg

Die Proteinkinase, die an c-Jun-Kinase bindet und sie phosphoryliert, wird in Humanzellen als JNK (*c-Jun-N-Termianl Kinase*) bezeichnet, während sie in Zellen der Ratte Stress-aktivierte-Proteinkinase (SAPK) genannt wird.¹⁰⁶ Die JNK-Familie besteht aus 3 Isoformen, nämlich JNK1, JNK2 und JNK3. JNK1 und JNK2, die in Humanzellen als 46 und 55 kDa Kinase identifiziert wurden, werden ubiquitär in verschiedenen Geweben exprimiert. JNK3 wird überwiegend im Nervensystem exprimiert.^{106, 107} Die JNK/SAPK-Kaskade wird durch UV-Strahlung, inflammatorische Zytokine (z.B. IL-1), Wachstumsfaktoren (EGF, NGF), Proteinsyntheseinhibitoren, oxidativen Stress und Stimulation des T-Zellen-Rezeptor aktiviert.^{107, 108}

Die Aktivierung der JNK-Kinase wird durch zwei G-Proteine, Cdc42 und Rac, vermittelt. Aktivierte cdc42 und Rac binden an die Serin/Threonin-Proteinkinase PAK1 und die folgende Aktivierung von PAK1 vermittelt die Aktivierung von MEKK1, einer MAPKKK.^{88, 109} Cdc42 und Rac vermitteln außerdem die Aktivierung von anderen MAPKKKs (MLK) durch verschiedene Rezeptoren wie z.B. TNF und Fas.⁹⁵ MAPKKKs phosphorylieren und aktivieren MAPKKs (MKK4 und MKK7) an Ser²¹⁹ und Ser²²³. Es gibt viele MAPKKKs in der JNK/SAPK-Kaskade, wie MLKs, ASK1, TAK1 und MEKK4,

die auch die p38-MAPK-Kaskade aktivieren können.^{89, 97} MEKK1 ist die einzige MAPKKK, die nur MKK4 stimuliert und selten Wirkung auf die p38-MAPK hat.^{108, 110}

Aktivierte MKK4/7 können JNK1/2 durch Phosphorylierung von Threonin- und Tyrosin-Resten (am TPY-Motiv) aktivieren.⁸⁸ Aktivierte JNK1/2 bindet an die N-Terminalregion der c-Jun Kinase und phosphoryliert die c-Jun an Ser⁶³ und Ser^{73, 86, 106}. Diese Phosphorylierung, besonders an Ser⁷³, verstärkt die Fähigkeit der c-Jun, die Transkription zu aktivieren.¹¹¹ Zusätzlich zur c-Jun kann JNK/SAPK weitere Transkriptionsfaktoren, z.B. p53 und Myc, sowie andere Moleküle, z.B. Bcl-2 und Bcl-xL phosphorylieren^{89, 107}. Die Stress-aktivierte JNK führt zur Induktion der AP-1 (*Activator Protein-1*) - abhängigen Zielgene und ist an verschiedenen zellulären Prozessen, wie Zellproliferation, Zellüberleben, Zellapoptose, Zelldifferenzierung, Zellmigration, Zelltransformation, Inflammation und DNA-Reparatur beteiligt. Neben dem p38 MAPK-Weg spielt auch der JNK-Signalweg eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle der Zellapoptose.^{112, 113}

7. Mausmodelle in der Atheroskleroseforschung

Experimentelle Untersuchungen über die Effekte der Determinanten, die die Entwicklung und den Fortschritt der Atherosklerose beeinflussen, werden meist an Mausmodellen durchgeführt, wobei sich besonders die ApoE und die LDLR Knock-Out (KO) Mausmodelle eignen. Durch die Kreuzung der ApoE^{-/-} oder LDLR^{-/-} Mäusen mit dem jeweils interessierenden Mausstamm kann man einen Doppel-Knock-Out (DKO) oder transgenen Mausstamm für ein bestimmtes Gen generieren. Solche Mausstämme sind die Basis der heute gängigen Mausmodelle in Bereich der Atheroskleroseforschung.

7.1 ApoE Knock-Out Mausmodell

ApoE ist ein amphipathisches Glykoprotein, das eine Schlüsselrolle im Lipoproteintransport spielt (s. Kap. I.2.1). In ApoE-defizienten Mäuse erreicht der Plasmacholesterinspiegel das 4-5-fache desjenigen von Wildtyp-Mäusen, es entwickeln sich spontan atherosklerotische Läsionen, auch wenn die Mäuse mit einer normalen Haltungsdiät gefüttert werden. Die Läsionen in ApoE KO Mäusen ähneln humanen atherosklerotischen Läsionen und entwickeln sich von einem initialen „*fatty streak*“ bis hin zu einer „*complicated lesion*“. Die Entwicklung der Läsion kann durch eine fett- und cholesterinreiche Diät beschleunigt werden.¹¹⁴

7.2 GPx-1 defizientes Mausmodell

Für verschiedene Glutathionperoxidasen existieren bereits KO Mausstämme (GPx-1, GPx-2 sowie GPx-4), anhand derer die Funktion der GPx näher untersucht werden kann. Die GPx-1 defiziente Maus bietet ein Modell für die Untersuchung bezüglich der Rolle von GPx-1 in der zellulären antioxidativen Abwehr. Die homozygote GPx-1 KO (GPx^{-/-}) Maus ist phänotypisch unauffällig. Das Gewebe dieser Maus zeigt weder eine verringerte Rate im Umsatz der extrazellulären H₂O₂ noch eine erhöhte Menge an Proteincarbonylgruppen oder eine verstärkte Lipidperoxidation in Vergleich zur Wild-Typ Maus.¹¹⁵ In funktionellen Untersuchungen zeigten sich allerdings deutliche Unterschiede zwischen dem GPx-1-defizienten Mausstamm und dem Wild-Typ. In GPx-1 KO Mäusen wurde eine deutlich verstärkte diastolische Dysfunktion nach Ischämie und Reperfusion nachgewiesen.¹¹⁶ Heterozygote GPx-1 Defizienz (GPx-1^{+/-}) führt zur endothelialen Dysfunktion und signifikanten funktionellen sowie strukturellen kardiovaskulären Abnormitäten.¹¹⁷ Eine Assoziation scheint es auch zwischen der GPx-1 Defizienz und der Hyperhomocysteinämie zu geben. Damit zusammenhängend konnte auch in der GPx-1 defizienten Maus gezeigt werden, dass eine zusätzliche milde Hyperhomocysteinämie den Zustand der endothelialen Dysfunktion verstärkt.¹¹⁸

In Vorstudien konnten wir zeigen, dass ApoE^{-/-} Mäuse mit einem Mangel an GPx-1 eine beschleunigte Atheroskleroseentwicklung mit erhöhter Zellularität (Makrophagen und SMCs) sowie vermindertem Kollagen in der Läsion aufweisen. Erhöhte ROS-Konzentration wurde ebenso in diesen GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} (GPx-1 DKO) Mäuse detektiert.¹¹⁹ Ein ähnlich proatherogener Effekt der GPx-1 Defizienz wurde auch in diabetischen ApoE^{-/-} Mäusen mit erhöhter Expression an NADPH-Oxidase, NFκB sowie proinflammatorischen und profibrotische Molekülen (VCAM-1, VEGF) nachgewiesen.¹²⁰

7.3 SOD2 defizientes Mausmodell

MnSOD (SOD2) dient als die primäre Abwehr gegen mitochondriales Superoxid. Die dilatative Kardiomyopathie wurde in SOD2-defizienten Mäusen nachgewiesen. SOD2-Defizienz führte zu erhöhter Suszeptibilität gegenüber oxidativem mitochondrialen Schaden in Neuronen des zentralen Nervensystems, Kardiomyozyten und metabolisch aktiven Geweben nach postnatale Sauerstoffexposition.¹²¹ Untersuchungen des Einfluss der SOD2 auf die Atherosklerose an verschiedenen Mausmodellen zeigen widersprüchliche Ergebnisse.¹²²⁻¹²⁴ Da SOD2^{-/-} Tiere innerhalb von 21 Tagen nach der Geburt absterben, wurden SOD2^{+/-} Tiere für unsere Untersuchungen verwendet.

8. Fragestellung

In dieser Arbeit haben wir ein GPx-1 defizientes Mausmodell verwendet, um die Mechanismen der atheroprotektive Funktion von GPx-1 zu klären. Alle Untersuchungen basieren auf einem Vergleich zwischen den proatherogenen GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} (DKO) Mäusen und ApoE^{-/-} Kontrollmäusen, sowie zwischen GPx-1^{-/-} (KO) Mäusen und dem Wildtyp C57/BL6. Dazu wurden folgende Fragestellungen angegangen:

- 1) Die Lokalisierung der GPx-Isoform in der Gefäßwand mittels in situ-Hybridisierung
- 2) Wirkung der GPx-1 auf die Schaumzellbildung und zelluläre Lipoproteinaufnahme
- 3) Beeinflussung der Proliferation von Makrophagen durch verschiedene Stimuli unter Einfluss von GPx-1
- 4) Analyse der einer unterschiedlichen Proliferation zugrunde liegenden Signaltransduktionsmechanismen
- 5) Der Effekt von GPx-1 auf die zellulären Signaltransduktionswege (z.B. MAPK)
- 6) Einfluss der GPx-1 auf die Genexpression verschiedener pro und antiatherogenen Faktoren (z.B. MCSF) als Antwort auf unterschiedliche Stimuli (z.B. OxLDL)

II. Materialien

1. Geräte

1.1 Mikroskope

Steromikroskop Leica MZ 6 mit Kamera Hitachi HV-C20 (Fa. Leica, Wetzlar)

Mikroskop Leica DM 2000 mit Kamera Leica DFC 280 (Fa. Leica, Wetzlar)

Fluoreszenzmikroskop Leica DM IL (Fa. Leica, Wetzlar)

1.2 Zentrifugen

Eppendorf Centrifuge 5415R (Fa. Eppendorf, Hamburg)

Hettich Zentrifuge 22 R (Fa. Hettich, Tuttlingen)

Heraeus Varifuge 3.0R (Fa. Kendro, Burladingen)

XL-90 Ultrazentrifuge mit Type 70 Ti Roter (Fa. Beckmann, Krefeld)

Mini Centrifuge MCF-2360 (Fa. LMS, Tokyo, Japan)

1.3 Zellkultur

CO₂-begasbarer Brutschrank: Modell Heraeus Hera cell 150 (Fa. Thermo Scientific, Langenselbold)

Werkbank: Hera Safe (Fa. Thermo Scientific, Langenselbold)

1.4 Western Blot

Netzgerät: Power Pac Basic Power Supply (Fa. BioRad, Hercules, USA)

Gelkammer: Mini Protean System Comb (Fa. BioRad, Hercules, USA)

Gelelektrophorese: Mini-Protean Tetra Cell (Fa. BioRad, Hercules, USA)

Blot: Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Fa. BioRad, Hercules, USA)

Scanner: CanoScan 5600F (Fa. Canon, Krefeld)

1.5 PCR und Gelelektrophorese

Geldokumentationssystem: Gel Doc XR (Fa. BioRad, Krefeld)

Gelkammer: Mini Sub Cell GT (Fa. BioRad, Krefeld)

NanoDrop Spectrofotometer ND-1000 (Fa. NanoDrop Technologies, Wilmington, USA)

Netzgerät: Power Pac 300 (Fa. BioRad, Krefeld)

Thermo-Cycler: GeneAmp[®] PCR System 9700 (Fa. Perkin Elmer LAS, Rodgau-Jügesheim)

Real time-PCR: LightCycler 2.0 (Fa. Roche, Mannheim)

1.6 in-situ Hybridisierung

Einbettautomat TP 1020 (Fa. Leica Microsystems CMS, Wetzlar)

Entwicklungsmaschine für Röntgenfilme FPM 3800 AD (Fa. Fujifilm Photofilm Europe, Düsseldorf)

Handmonitor LB 122 (Fa. Berthold Technologies, Wildbach)

Hybridisierungssofen HB-1000 Hybridizer (Fa. UVP, Upland, CA)

Mikrotom RM 2255 (Fa. Leica Microsystems CMS, Wetzlar)

Schüttelinkubator: Inkubator 1000 / Unimax 1010 (Fa. Heidolph Instrument, Schwabach)

Szintillationszähler: Triathler TM Multilabel Tester (Fa. Hidex, Turku, Finnland)

1.7 Sonstiges

Autoklav WEBECO EA (Fa. Webeco, Selmsdorf)

Beheizbarer Magnetrührer: Heidolph MZ Hei-Standard (Fa. Heidolph, Schwabach)

Dispergiergeräte: Ultraturrax[®] Tube Drive Workstation (Fa. IKA Werke, Staufen)

Lumino- und Fluoreszenzmeter: Fluoroskan Ascent (Fa. Thermo Labsystems, Waltham, MA)

Magnetrührstäbchen Set II (Fa. Roth, Karlsruhe)

Mikroplatten-Reader Sunrise[™] (Fa. Tecan, Crailsheim)

Mikroplatten-Photometer: Multiskan Ascent (Fa. Thermo Labsystem, Waltham, MA)

Mikrowelle SHARP Typ (Fa. Sharp)

pH Meter: pH211 Microprocessor (Fa. Hanna instruments, Kehl/Rhein); pH-Einstabmesskette senTix 81 (Fa. WTW Weilheim)

Photometer: WPA 2100 Diode array Spectrophotometer Biowave (Fa. Biochrom, Cambridge, UK)

Pipetten Eppendorf Research (Fa. Eppendorf, Hamburg)

Rotationsmischer test-tube-rotator (Fa. Snijders Scientific BV, Tilburg, NL)

Rotlichtlampe (Fa. Roth, Karlsruhe)

Schüttler: Heidolph Polymax 1040, Rotamax 120 (Fa. Heidolph, Schwabach)

Ultraschall-Homogenisator: Sonopuls HD 2070 (Fa. Bandelin electeonic, Berlin)

Vortex Genie 2 (Fa. Scientific Industries, NY, USA)

Waage: Sartorius MC1 Analytic AC120S (Fa. AS-Wägtechnik, Garching)

Waage: MC1 Laboratory LC6200 (Fa. AS-Wägtechnik, Garching)

Wärmerblock: HLC HTML-133 (Fa. HLC, Bovenden)

Wasserbad Julabo SW23 (Fa. Julabo, Seelbach)

2. Verbrauchsmaterialien

2.1 Plastikwaren

96-well Nunc Maxi Sorp Immunoplaten (Fa. Thermo Fischer, Denmark)

96-well Nunc steril Nunclon Surface MicroWell Plates (Fa. Thermo Fischer, Denmark)

96-well pureGrade Mikrotiterplatten mit F-Boden, schwarz (Fa. Brand, Wertheim)

96-well CellGrade Premium Mikrotiterplatten, weiße, steril (Fa. Brand, Wertheim)

Mikrotiterplatte 96 Well (Fa. Beckman Coulter, Krefeld)

Nunc Lab-Tek Chamber Slide Objektträger mit Permanox Slide (Fa. Nalge Nunc, NY, USA)

Nunc Nunclon Surface Zellkulturschalen 60 x 15 mm (Fa. Thermo Fischer, Denmark)

Nunc Nunclon Surface Zellkulturschale 92 x 17 mm (Fa. Thermo Fischer, Denmark)

PCR-Reaktionsgefäße 0,2 ml (Fa. Brand, Wertheim)

Omnifix 100 Solo U-100 Insulin Luer 1 ml (Fa. B. Braun Melsungen, Melsungen)

Petrischalen (Fa. Greiner Bio-one, Frickenhausen)

Pipettenspitzen (Fa. Starlab, Ahrensburg / Fa. Sarstedt, Nümbrecht)

PP Zentrifugenröhrchen 15 ml und 50 ml (Fa. VWR, Darmstadt)

Reaktionsgefäße 1,5 ml (Fa. Eppendorf, Hamburg / Fa. Starlab, Ahrensburg)

Schraubdeckeldosen 100 ml (Fa. Roth, Karlsruhe)

Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml (Fa. Greiner bio-one, Frickenhausen)

Spritzen, Luer Lock 10 ml (Fa. Becton Dickinson, Heidelberg)

Sterilfilter Millex GP, 0,22 µm Porendurchmesser (Fa. Millipore, Schwalbach)

UV-Küvette mikro 2,5 ml (Fa. Brand, Wertheim)

Venenverweilkanüle Braunüle (Fa. B. Braun Melsungen, Melsungen)

Zellschaber 25 cm (Fa. Greiner Bio-one, Frickenhausen)

Zentrifugationssäulen CentriSep (Fa. Princeton Separation, Adelphia, NJ, USA)

Zentrifugengefäße (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht)

2.2 Materialien für in-situ Hybridisierung

Autoradiographiefilm Kodak BOMAX MR (Fa. Eastman Kodak, Rochester, NY, USA)

Chirurgisches Nahtmaterial (Fa. Resorba, Nürnberg)

Deckgläser #1, 24 x 55 mm (Fa. Gerhard Menzel, Braunschweig)

Einmalskalpell #23 (Fa. Aesculap, Tuttlingen)

Hybridisierungsdeckgläser Hybri-Slip 22 x 22 mm (Fa. Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim)

Jet-Biopsie-Einbettkassette (Fa. Leica Microsystems, Nussloch)

Trocknungsmittel MiniPax (Fa. Multisorb Technologies, Buffalo, USA)

Objektträger Superfrost Plus (Fa. Gerhard Menzel, Braunschweig)

Parafilm (Fa. Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL, US)

2.3 Materialien für Western Blot

Filter Paper (Trans-Blot) 15 x 20 cm (Fa. Biorad, Hercules, USA)

Blotmembran: Hybond ECL 30 cm x 3 m (Fa. Amersham Biosciences, Freiburg)

Hyperfilm ECL 18 x 24 cm (Fa. GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)

3. Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben, stammten die verwendeten Chemikalien von den Firmen Sigma-Aldrich (Deisenhofen), Carl Roth (Karlsruhe), Braun (Melsungen), Invitrogen (Karlsruhe), Merk (Darmstadt), Biorad (Krefeld) und Applichem (Darmstadt). Weitere verwendete Chemikalien werden an gegebener Stelle im Text aufgeführt. Alle Chemikalien hatten mindestens den Reinheitsgrad „zur Analyse, ACS“ oder, wenn erhältlich, den Reinheitsgrad „für die Molekularbiologie“.

Der Begriff „H₂O“ wird für Wasser verwendet, das über eine Milli-Q-Plus Filteranlage (Millipore) gereinigt wurde. Als aqua dest wird im Folgenden bidestilliertes Wasser der Firma B. Braun Melsungen AG (Melsungen) bezeichnet.

Als „autokalviert“ bezeichnete Lösungen und Materialien wurden für 20 Minuten bei 121°C und 1 bar Überdruck autoklaviert. Als „steril filtriert“ bezeichnete Lösungen wurden durch einen 0,22 µm Filter (Millex-GS, Millipore) filtriert.

3.1 Puffer und Lösung

Alle Rezepte für Puffer und Lösung sind in Tabelle 2.1 gezeigt.

Tabelle 2.1 Puffer und Lösung

40% Acrylamid / Bisacrylamid	Acrylamid / Bisacrylamid 37,5:1 (2.6 % c)
Blockierlösung	5 % Magermilchpulver in TBST Lösung
Coomassie-Lösung	0,05 % Brilliant Blau (G250) 25 % Isopropanol 10 % Essigsäure
denaturierender Lysepuffer (Western Blot)	50 mM Tris-HCl 5 mM EDTA 1% SDS aqua dest auf 100 ml aufgefüllt pH 7,4 steril filtriert
Dialyse-Puffer	150 mM NaCl 5 mM Tris-Base 2,7 mM EDTA pH 7,3 - 7,4
Entwickler (ISH)	400 ml dH ₂ O (50°C) 81 g D-19 Kodak Developer 507 ml H ₂ O (RT)
Entwickler (Western Blot)	100 ml Kodak GBX Developer 900 ml H ₂ O
EDTA - Stocklösung	0,5 M
Ethidiumbromid - Stammlösung	500 µg/ml
Fixier-Lösung (ISH)	100 ml Kodak Rapid Fixer-Lösung A 11 ml Kodak Rapid Fixer-Lösung B 290 ml dH ₂ O
Fixier-Lösung (Western Blot)	100 ml Kodak GBX Fixer 900 ml H ₂ O

10 x Gelladepuffer (DNA)	10 % Glycerin (v/v) 0,4 % Bromphenolblau (w/v) ad 50 ml dH ₂ O
Glyoxalmix	56 µl 40% deionisiertes Glyoxal 8 µl Natriumphosphat-Stammlösung 200 µl DMSO 8 µl 10% SDS
KBr Lösung	19,2 g KBr 2 ml 5% EDTA H ₂ O auf 100 ml aufgefüllt pH 7,0
Ladepuffer (RNA)	1% Bromphenolblau 30% Glycerin (v/v)
Laufpuffer (Western Blot)	192 mM Glycin 25 mM Tris-Base 0.1 % SDS
Light KBr Lösung	9 g KBr 20 ml 5 % EDTA H ₂ O auf 1 L aufgefüllt pH 7,0
Medium Stripping Puffer	200 mM Glycine 0,1 % SDS 1% Tween 20 H ₂ O auf 500 ml aufgefüllt pH 2,2
3 M Natriumacetat-Lösung (NaAc)	3 M NaAc pH 5,2 steril filtriert
0,5 M Natriumphosphat-Stammlösung	0,5 M NaH ₂ PO ₄ 0,5 M Na ₂ HPO ₄
0,5% Oil red O – Stammlösung (ORO)	0,5 g Oil red O 100 ml Isopropanol

Oil red O - Gebrauchslösung	3 ml ORO - Stammlösung 2 ml dH ₂ O mischen und 2 Tage stehen lassen filtrieren, ca. 1 Woche haltbar
4% Paraformaldehyd-Lösung (PFA)	500 ml 10 x PBS 4 L dH ₂ O Paraformaldehyd 4% (w/v) H ₂ O 5 L aufgefüllt pH 7,2
10 x PBS	1,37 M NaCl 27 mM KCl 43 mM Na ₂ HPO ₄ 14 mM KH ₂ PO ₄ H ₂ O auf 1 L aufgefüllt
4 x Probenpuffer (Western Blot)	12,5 ml Tris-HCl (pH 6.8) 10 ml Glycerol 2 g SDS 1,5 g DTT 0,5 mg Bromphenolblau H ₂ O auf 50 ml aufgefüllt
RNase A-Lösung	10 ml 5 x RNase-Digestion-Puffer 40 ml dH ₂ O 50 µl RNase A (450 U / ml)
50x TAE (Tris-Acid -EDTA)	242 g Tris-Base 57,1 ml Eisessig 7,2 g Na ₂ -Ethylendiamintetraessigsäure ad 1 L dH ₂ O pH 8,5
TBS	13 mM Tris 150 mM NaCl H ₂ O auf 1 L aufgefüllt
TBST	0,1 % Tween 20 in TBS Lösung
Transferpuffer (Western Blot)	25 mM Tris 192 mM Glycin 20% MeOH 0,1 % SDS

3.2 Medien und Sonstiges

Die Bakterienmedien werden nach der Zubereitung autoklaviert. Zur Herstellung der Agarplatten wird der LB-Agar auf 60°C heruntergekühlt und Petrischalen (Durchmesser 85 mm) etwa zur Hälfte mit diesem befüllt. Die Substanzen für das LB-Medium werden in H₂O gelöst und steril filtriert. 200 µl - Aliquots werden bei -20°C eingelagert.

Tabelle 2.2 Verwendete Medien und Zusätze

Medien	
LB-Agar	20 g Agar-Agar ad 1 L LB-Medium
LB-Medium	20 g LB-Broth H ₂ O auf 1 L aufgefüllt pH 7,0
Zellkulturmedium (für Peritonealmakrophagen)	Dulbecco's MEM (Fa. Biochrom, Berlin) 10 % FCS Gold (Fa. PAA, Pasching) 1 % Penicillin/Streptomycin 2 mM L-Glutamin
Medienzusätze	
Ampicillin	100 mg/ml Ampicillin-Stammlösung in H ₂ O (Arbeitskonzentration: 100 µg/ml)
IPTG (Isopropyl-β-D-Thio-Galactopyranosid)	20 mM IPTG in H ₂ O (Arbeitskonzentration: 0,2 mM)
Kanamycin	100 mg/ml Kanamycin-Stammlösung in H ₂ O (Arbeitskonzentration: 100 µg/ml)
X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-D-Galactosid)	40 mg/ml X-Gal in DMF (Arbeitskonzentration: 65 µg/ml)

Tabelle 2.3 Verwendete Medikamente und Sonstiges

Accutase	Accutase (Fa. PAA, Pasching) in Dulbecco's PBS mit 0.5 mM EDTA aliquotiert, -20°C
Cholesterol Esterase	2 mg/ml Stocklösung (Fa. Roche)
CuSO₄	1 M CuSO ₄ Stammlösung in H ₂ O frisch hergestellt (Endkonzentration: 25 µM)
MCSF (Recombinant murine Macrophage-Colony Stimulating Factor)	10 µg MCSF (Fa. Biozol, Eching) 100 µl aqua dest (Endkonzentration: 100 ng/µl) aliquotiert, -20°C
PD98059 (MEK Inhibitor)	5 mg PD98059 748 µl DMSO (Endkonzentration: 25 mM) vor Licht schützen aliquotiert, -20°C
Protease Inhibitor Cocktail	Stocklösung 5 ml in 100 µl aliquotiert, -20°C
SB203580 (p38 Inhibitor)	1 mg PD98059 530 µl DMSO (Endkonzentration: 5 mM) vor Licht schützen aliquotiert, -20°C
3 % Thioglycolat	1 g Thioglycolate Broth 33 ml 0,9 % NaCl steril filtriert 4 Wochen haltbar bei 4°C
Trypsin	Trypsin (Fa. Serva) in H ₂ O (Endkonzentration: 1 mg/ml) steril filtriert
Trypsininhibitor	Trypsininhibitor in PBS (Endkonzentration: 1 mg/ml) steril filtriert
U0126 (MEK1 Inhibitor)	1 mg U0126 in 496 µl DMSO (Endkonzentration: 5 mM) vor Licht schützen aliquotiert, -20°C

3.3 Kits

BrdU Cell Proliferation ELISA Kit, chemoluminescent (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim)
Caspase-Glo[®] 3/7 Assay (Fa. Promega Corporation, Madison, USA)
Chol Reagenz (Fa. Abbott Laboratories, Wiesbaden)
CHOL CHOD-PAP (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim)
Calbiochem Cholesterol/Cholesteryl Ester Quantitation Kit (Fa. Merck Chemicals, Darmstadt)
DC Protein Assay Kit II (Fa. Biorad, Hercules, USA)
DNA-free[™] Kit (Ambion, Fa. Applied Biosystems, Austin, USA)
ECL-Plus Western Blot Detection Kit (Amersham, Fa. GE, Buckinghamshire, UK)
LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Kit (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim)
LSAB[®] + Kit, HRP (Fa. Universal Dako Cytomation, Carpinteria, CA)
Geneclean[®] II-Kit (Fa. Qiagen, Solon, OH, USA)
MAXIscript In vitro Transcription (Ambion, Fa. Applied Biosystems, Austin, USA)
mRNAlocator in situ Hybridization Kit (Ambion, Fa. Applied Biosystems, Austin, USA)
Oligo dT-Primer (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
Plasmid Mini Kit (Fa. Qiagen, Hilden)
RNase-Free DNase Set (Fa. Qiagen, Hilden)
RNeasy Maxi Kit (Fa. Qiagen, Hilden)
RNeasy Mini Kit (Fa. Qiagen, Hilden)
Superscript III Reverse Transkriptase Kit (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
TOPO TA Cloning Kit (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)

3.4 Antikörper

3.4.1 Primäre Antikörper

monoklonaler Ratte anti-Maus F4/80 IgG (Fa. Acris, Herford)
Anti-CD3 Antibody (R&D System, Minneapolis, USA)
Anti-Actin Antibody (Fa. Sigma, St. Louis, USA)
Alle anderen primären Antikörper wurden von der Firma Cell Signaling (New England Biolabs, Frankfurt) synthetisiert. (s.Tab.2.4)

Tabelle 2.4 verwendete primäre Antikörper der Firma Cell Signaling (F: Durchflusszytometrie, W: Western-Blot, IHC-P: Immunhistochemie-Paraffin, IP: Immunpräzipitation, IF: Immunfluoreszenz, IC: Immunzytochemie)

Antikörper	Anwendung	Molekulargewicht (kDa)	Quelle
β -Actin	W, IHC-P	45	Rabbit
cPLA2	W, IP	95	Rabbit
MEK1/2	W, IP	45	Rabbit
p38 MAPK	W, IHC-P, IF-IC, F	43	Rabbit
p44/42 MAPK	W, IHC-P, IF-IC, F	42, 44	Rabbit
RSK1/RSK2/RSK3	W	90	Rabbit
SAPK/JNK	W	46, 54	Rabbit
Phospho-cPLA2 (Ser505)	W, IP	95	Rabbit
Phospho-MEK1/2 (Ser217/221)	W, IP	45	Rabbit
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)	W, IP, IF-IC, F	43	Rabbit
Phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)	W, IP, IF-IC, F	42,44	Rabbit
Phospho-p90RSK (Thr573)	W, IF-IC	90	Rabbit
Phospho-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185)	W, IP, IHC-P	46,54	Rabbit

3.4.2 Sekundäre Antikörper

Goat Anti-Rabbit IgG-POD, F(ab')₂ Fragment (Fa. Sigma, St. Louis, USA)

Goat Anti-Rabbit IgG Antikörper (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)

3.5 Oligonukleotide

Die Oligonukleotidsequenzen werden mittels der PSQ Assay Design-Software 1.0.6 (Fa. Biotage AB, Uppsala, Schweden) erstellt. Die Amplifikationsprimer für die in situ-Hybridisierung wurden von der Firma Metabion international (Martinsried) bezogen. Alle anderen Primer wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) synthetisiert.

Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden in aqua dest so gelöst, dass jeweils eine Ausgangskonzentration von 10 $\mu\text{mol/L}$ erreicht wurde. Für den Ansatz werden die Primer mit aqua dest zu 1 $\mu\text{mol/L}$ verdünnt.

Tabelle 2.5 Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide

Primer	Sequenz	Bp
Amplifikationsprimer (Real-time PCR)		
CSF1 forward	5' – ATC CTC TGA CCC CCA GAT CC – 3'	20
CSF1 reverse	5' – GGC TCC TCC ACT TCC ACT TGT AG – 3'	23
18s rRNA forward	5' – GAT ACC GCA GCT AGG AAT AAT G – 3'	22
18s rRNA reverse	5' – GCG CAA TAC GAA TGC C – 3'	16
Sequenzierprimer		
T7 promotor	5' - TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG - 3'	20
T7 terminator	5' - GCT AGT TAT TGC TCA GCG G - 3'	19
Amplifikationsprimer (ISH)		
GPx-1 1 forward	5' - AGT ATG TGT GCT GCT CGG CTC T - 3'	22
GPx-1 2 reverse	5' - CCA GTA ATC ACC AAG CCA ATG C - 3'	22
GPx-1 3 forward	5' - TGC TGC TCA TTG AGA ATG TC - 3'	20
GPx-1 4 reverse	5' - AGT GAA ACC ACC TTT CAT TAG G - 3'	22
GPx-2 1 forward	5' - GGG GAG AAG ATA GAC TTC AAT ACG - 3'	24
GPx-2 2 reverse	5' - TAT TGG ACT CTA AAG CAG ACT GG - 3'	23
GPx-2 3 forward	5' - CGT TCT ACG ATC TCA GTG CC - 3'	20
GPx-2 4 reverse	5' - ACA ACT TCT CAG ACA TCT CCC - 3'	21
GPx-3 1 forward	5' - TCG ATG GGG AGG AAT ACA TT - 3'	20
GPx-3 2 reverse	5' - TTG GGC TCA TTT GGA ACA G - 3'	19
GPx-3 3 forward	5' - TTC CTG AAG AAC TCC TGC CC - 3'	20
GPx-3 4 reverse	5' - TCC TTC ATA GAG ACA CCA CCC C - 3'	22
GPx-4 1 forward	5' - AAG CGG GGA CGC TGC AGA - 3'	19
GPx-4 2 reverse	5' - CCT TCC TCC GGC AGG GAT - 3'	18
GPx-4 3 forward	5' - AGT ACT GCA ACA GCT CCG AG - 3'	20
GPx-4 4 reverse	5' - TGG TTT TCA GGC AGA CCT TC - 3'	20

4. Bakterien und Vektoren

4.1 Bakterienstämme

- *E. coli* One Shot TOP 10 Chemically Competent Cells (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
- *E. coli* XL10-Gold Ultracompetent Cells (Fa. Stratagene, La Jolla, CA, USA)

4.2 Vektoren

- pCR 2.1-TOPO Vektor 4 kb (Fa. Invitrogen, Karlsruhe)
LacZ α -Gen, multiple cloning site, Ampicillin- und Kanamycinresistenz, T7-Promotor

5. Mausfutter (Fa. Ssniff/Soest)

Die Futterzusammensetzung entspricht in ihrem Anteil an Aminosäuren, Vitaminen, Mineralstoffen und Spurenelementen im Wesentlichen der vom *American Institute of Nutrition* publizierten Experimentaldiät. Der Nährstoffgehalt wird in Bezug auf den Futtermischungsgesamtgehalt als Prozent (%) dargestellt.

Haltungsdiät

ssniff® EF R/M

- Rohnährstoffe [%]

Trockensubstanz 96,2; Rohprotein (N x 6,25) 12,3; Rohfett 4,1; Rohfaser 5,0; Rohasche 2,9; N-freie Extraktstoffe 71,9; Stärke 44,7; Zucker 25,7

- Fettsäuren [%]

C 14:0 0,02; C 16:0 0,43; C 16:1 0,02; C 18:0 0,19; C 18:1 1,06; C 18:2 2,12; C 18:3 0,26; C 20:0 0,02

Western Type Diät

ssniff® EF R/M nach TD88137 modifiziert

- Rohnährstoffe [%]

Trockensubstanz 97,0; Rohprotein (N x 6,25) 17,1; **Rohfett 21,2**; Rohfaser 5,0; Rohasche 4,5; N-freie Extraktstoffe 49,3; Stärke 14,5; **Zucker 32,8**

- Fettsäuren [%]
C 4:0 0,80; C 6:0 0,53; C 8:0 0,29; C 10:0 0,63; C 12:0 0,72; C 14:0 2,21; C 16:0 5,74; C 16:1 0,38; C 17:0 0,13; C 18:0 2,04; C 18:1 4,6; C 18:2 0,38; C 18:3 0,11; C 20:0 0,04; C 20:1 0,02
- Cholesterol [mg/kg] 2.071

6. Software

Leica IM50 Image Manager (Fa. Leica, Wetzlar)

Image Pro (Fa. Media Cybernetics, Silver Spring, USA)

MP Navigator EX 2.0 (Fa. Canon, Krefeld)

Photoshop CS (Fa. Adobe, München)

Quantity One 4.5 (Fa. Biorad, Hercules, USA)

Ascent Software 2.6 (Fa. Thermo Labsystems, Finland)

PSQ Assay Design Software 1.0 (Fa. Biotage, Uppsala, Sweden)

LightCycler Software 4.05 (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim)

SPSS Statistics 17.0 (SPSS, Fa. IBM, Chicago, USA)

III. Methoden

1. Etablierung und Zucht der Mausstämme

1.1 Generierung des GPx-1 defizienten Mausstammes

Der GPx-1 defiziente Mausstamm wurde von Ye Shi Ho¹¹⁵ zur Verfügung gestellt. Das Konstrukt, das für die Generierung des Mausstammes verwendet wurde, wird in Abbildung 3.1 gezeigt. Das Konstrukt beinhaltete eine Neomycin Resistenzkassette, die in das Exon 2 des GPx-1 Gens inseriert wurde. Zusätzlich enthielt der Vektor eine Herpes-Thymidinkinase Sequenz am 3' Ende für die negative Selektion mittels Ganciclovir. Das Konstrukt wurde in embryonale Stammzellen transfiziert, und die Stammzellen, die durch homologe Rekombination des Konstruktes mit dem GPx-1 Gen erfolgreich das KO Konstrukt inseriert hatten, wurden durch negative Selektion mittels G418 und Ganciclovir selektioniert. Die so erhaltenen Klone wurden durch Mikroinjektion in C57BL/6 Mäuse inkorporiert. Aus dem heterozygoten GPx-1 KO Mausstamm wurde durch weitere Zucht ein homozygoter KO Mausstamm generiert.

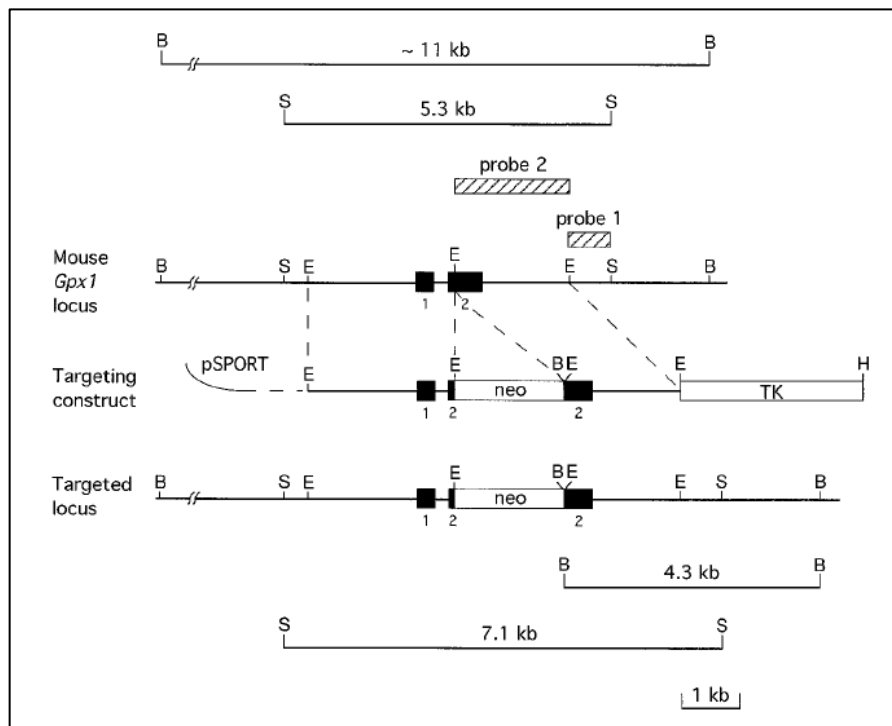


Abbildung 3.1 Genkonstrukt zur Generierung der GPx-1 defizienten Maus¹¹⁵

1.2 Generierung des SOD2^{+/-} Mausstammes

In unserer Studie wurde zusätzlich ein SOD2^{+/-} Mausmodell verwendet, dessen SOD2-Defizienz nicht mit der Konzentration von H₂O₂ einhergeht. Bei KO Mausstamm SOD2 (MnSOD) ersetzt ein humans HPRT Minigen, welches unter der transkriptionellen Regulation des PGK Promoters steht, die Exon 1 und 2, sowie den Sequenzbereich ca. 500 bp 5' terminal von Exon1. Die ersetzte Region kodiert für die Transkriptions- und Translations-Startstelle, die mitochondriale Targetingsequenz und eine der drei Histidine die direkt an den Mangan Kofaktor binden. Der heterozygote SOD2^{+/-} Stamm wurde kommerziell beim *The Jackson Laboratory* bezogen (offizielle Stammbezeichnung: B6.129S7-Sod2^{tm1Leb}/J, Stock 2973). Der genetische Hintergrund ist C57BL/6J.¹²¹

1.3 Haltung der Mausstämme

Die verwendeten Mäuse wurden in der Zentralen Versuchstiereinrichtung (ZVTE) der Johannes-Gutenberg-Universität gemäß strengen SPC Konditionen und Standard-Tierhaltungsbedingungen in einem 12 h Hell-Dunkel Zyklus mit einer Anzahl von 4-5 Mäusen pro Käfig gehalten. Wasser und Futter waren *ad libitum* vorhanden.

C57BL/6J-ApoE T1L Knockout Mäuse (ApoE^{-/-}), zurückgekreuzt auf den C57BL/6J Stamm für 10 Generationen, wurden vom *Jackson Laboratory* (Bar Harbor, USA) erworben. Beide ApoE und GPx-1 Knockout-Mutanten wurden erfolgreich durch Inzucht vermehrt. Der GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} Stamm wurde durch die Generierung eines F2 Hybrids aus den ApoE^{-/-} und GPx-1^{-/-} Elternstämmen hergestellt. Der GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} Stamm wurde dann durch Inzucht vermehrt. Heterozygotes SOD2^{+/-} Männchen wurden mit C57BL/6J Weibchen verpaart. Es ist eine Genotypisierung der Nachkommen erforderlich. Die Genotypisierung der Mausstämme erfolgte jeweils mittels PCR.

1.4 Genotypisierung der Mausstämme

1.4.1 DNA Isolation und PCR

Für die Genotypisierung der Mausstämme wurde DNA aus Vollblut mittels des DNA Isolation Kits (High pure PCR Template Preparation Kit, Roche) isoliert. 3 µl der isolierten genomischen DNA wurden anschließend für die PCR eingesetzt. Dazu wurde folgender Ansatz gemacht (Tab. 3.2). Für die PCR Läufe wurden verschiedene Programme (Tab. 3.1) gewählt.

Die PCR-Läufe zur Identifizierung von Wildtyp (WT) und Knockout (KO) wurden für die beiden zu untersuchenden Genotypen (GPx-1 und ApoE) jeweils in einem Ansatz gemacht. Dabei erhielt man für GPx-1 WT Genotyp eine 294 bp und für den KO ein 509 bp Fragment. Für ApoE erhielt man für den WT Genotyp ein 255 bp und für den KO ein 245 bp Fragment.

Tabelle 3.1 PCR Programm für die GPx-1 und ApoE Genotypisierung

Gen	GPx-1		ApoE	
	Temperatur	Zeit	Temperatur	Zeit
Einmalige Denaturierung	95°C	60 sec	95°C	60 sec
Denaturierung	95°C	10 sec	95°C	10 sec
Annealing	60°C	5 sec	66 °C	5 sec
Amplifizierung	72°C	10 sec	72°C	10 sec
Zyklen	40		40	

Tabelle 3.2 Ansatzschema für die PCR zur GPx-1 und ApoE Genotypisierung

GPx-1	Volumen
H ₂ O	3 µl
MgCl ₂ (1 mM)	2 µl
GPx FINN (10 µM)	2 µl
R3N (5 µM)	1 µl
RpgKN (5 µM)	1 µl
Hybrid	3 µl
DNA	3 µl

ApoE	Volumen
H ₂ O	4 µl
MgCl ₂ (0,5 mM)	1 µl
DMSO	1 µl
OIMR 180 (10 µM)	4 µl
OIMR 181 (10 µM)	2 µl
OIMR 182 (10 µM)	2 µl
Hybrid	3 µl
DNA	3 µl

1.4.2 Agarose-Gelelektrophorese

Das PCR-Produkt kann durch Agarose-Gelelektrophorese anhand seiner Größe identifiziert werden. Die Länge des PCR-Produkts kann durch einen Vergleich mit einer DNA-Leiter, die DNA-Fragmente bekannter Größe enthält und parallel zur Probe im Gel mitläuft, bestimmt werden.

Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode, um die Nukleinsäure-Stränge (RNA oder DNA) nach ihrer Größe zu trennen und um ihre Größe durch Vergleich mit Strängen bekannter Größe zu bestimmen. Aufgrund ihres Zucker-Phosphat-Rückgrats ist die RNA oder DNA negativ geladen. Diese Tatsache macht man sich bei der DNA-Gelelektrophorese zu Nutze. Die DNA-Moleküle bewegen sich im elektrischen Feld zur Anode und werden in einer Agarosematrix nach ihrer Größe aufgetrennt.

Die Abtrennung erfolgt in horizontalen Agarosegelen, die mit 0,03 µg Ethidiumbromid (EtBr) pro ml Gel versetzt wurden. Ethidiumbromid interpoliert zwischen den Basenpaaren des DNA-Doppelstranges. Auf diese Weise wird das DNA-Molekül im UV-Licht (Wellenlänge $\lambda = 254$ nm) sichtbar.

Die Größenordnung der einzelnen Banden ermöglicht ein zusätzlich aufgetragener Marker. Die verwendeten Marker (DNA Molecular Weight Marker, Roche) bestehen aus mit geeigneten Restriktionsenzymen verdauten Plasmiden und Lambda DNA. Diese Restriktionsfragmente besitzen eine Größe zwischen 19 und 21226 bp. Der Vergleich der Laufweiten der Banden von Marker und Probe lassen Rückschlüsse auf das Molekulargewicht der Fragmente zu.

Bei TBE (Tris-Borate-EDTA)-Gelen handelt es sich um analytische, bei TAE (Tris-Acetat-EDTA)-Gelen um präparative Gele. Während die Auflösung sowie Spannungstoleranz bei TBE-Gelen höher ist, enthalten TAE-Gele kein Borat, das die DNA-Banden-Isolierung aus dem Gel nach der GeneClean II-Methode ungünstig beeinflussen kann.

Die amplifizierte DNA und der Marker wurden auf ein 1 % Agarosegel aufgetragen und für ca. 60 min bei ca. 100 V (10 V/cm²) in TAE Laufpuffer in einer Gelkammer (Wide Mini-sub Cell GT, Biorad) laufen gelassen. Das Gel wurde anschließend unter einem UV-Transilluminator (Gel Doc XR, Biorad) abfotografiert und ausgewertet.

– Herstellung eines 1 % Agarosegels:

1 g Agarose (Fa. Starlab, Ahrensburg) wurden in 100 ml 1 x TAE Puffer gelöst und in der Mikrowelle für 3 min aufgekocht. Die Lösung wurde auf ca. 50 °C abgekühlt und 0,03

$\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid (3 μl Stammlösung auf 100 ml) hinzugefügt. Das Gel wurde in einen Gelträger gegossen, ein Kamm für die Auftragstaschen eingesetzt und polymerisierte anschließend aus.

1.5 Diäten

Für jeden *in vitro* Versuch wurden jeweils 5 weibliche GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} Mäuse und ApoE^{-/-} Kontrolltiere für 5 Monate auf normaler Haltungsdiät gehalten.

Außerdem wurden für die *in-situ* Hybridisierung jeweils 3 weibliche GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} Mäuse und ApoE^{-/-} Kontrollmäuse im Alter von 8 Wochen für 6 und 12 Wochen auf Western Typ Diät (WTD) gesetzt.

2. In-situ Hybridisierung

Die *in-situ* Hybridisierung (ISH) ist eine molekularbiologische Methode, um Nukleinsäuren, also RNA oder DNA, in Geweben, einzelnen Zellen oder auf Metaphase-Chromosomen nachzuweisen. Dabei wird eine künstlich hergestellte Sonde aus einer Nukleinsäure eingesetzt, die über Basenpaarungen an die nachzuweisende Nukleinsäure hybridisiert, also bindet. Die Bezeichnung „*in situ*“ wird verwendet, da der Nachweis direkt in der jeweiligen Struktur durchgeführt wird, und nicht etwa biochemisch im Reagenzgefäß. Die ISH beruht auf der Paarung von komplementären Basen auf zwei Nukleinsäure-Einzelsträngen. Einer der beiden Stränge kommt dabei von einer zuvor hergestellten und markierten Sonde, der andere liegt im Präparat vor und soll nachgewiesen werden.

Das RNA-RNA-Hybrid ist sehr stabil und sensitiv für den Nachweis der mRNA-Expression in Geweben bzw. Zellen, besonders für gering exprimierte mRNA. In dieser Arbeit wurde eine radioaktiv-markierte RNA-Sonde mit mRNA auf 5 μm dicken Paraffin-Gewebeschnitten von Aortenbogen, Aortensinus, Leber, Dünndarm, Lunge und Niere hybridisiert. Die radioaktive Sonde wurde mit dem β -Strahler ³³P markiert. Der ³³P hat eine gute Auflösung und Strahlungsdichte.

Nach Entwicklung der mehrere Wochen an der Photoemulsion (Hypercoat LM-1) exponierten Schnitte wurde eine HE-Färbung durchgeführt. Die histologischen Präparate wurden unter dem Mikroskop (Leica DM 2000) betrachtet und abfotografiert. Bei erfolgter Hybridisierung fällt durch die β -Strahlung des ³³P-Isotops elementares Silber aus der

Photoemulsion aus. Dies ist als schwarze Körnung auf den Schnitten sichtbar. Durch die HE-Gegenfärbung kann man die Lokalisation des Isotops und damit des Hybrides sowie der mRNA im Gewebe sehen.

2.1 Präparation der Maus

Die Mäuse mit WTD wurden mittels CO₂ getötet und anschließend die Bauchhöhle eröffnet. Das Herz wurde zuerst mit Nitrolingual infus. Lösung und danach mit 4 % PFA Lösung gespült. Zunächst wurden Leber, Dünndarm, Niere und nach der Eröffnung des Brustraumes die Lunge entnommen. Das Herz wurde mit der Aorta am Aortenbogen bis zur iliakalen Bifurkation nach unten frei präpariert. Alle Gewebe wurden sofort nach der Entnahme in einen 50 ml Falcon mit 4 % PFA überführt und für 12 h bei RT fixiert.

Nach der Fixierung wurden die drei Abgänge der Aorta (*A. innominata*, *A. communis sinistra*, *A. subclavia sinistra*) am Herz freigelegt, die Aorta wurde entnommen und am Aortensinus vom Herz abgetrennt. Anschließend wurde der Aortenbogen unterhalb des Abganges der linken *A. subcalvia* von der Aorta abgetrennt und vom umgebenden Fett- und Bindegewebe freipräpariert. Das Herz wurde durchgeschnitten und der obere Teil mit dem Aortensinus mit NaCl Lösung vorsichtig gespült, um Gerinnsel zu entfernen. Der freipräparierte Aortenbogen, Herzsinus und andere Gewebe (ca. 5 mm dick) wurden in einer Jet-Biopsie-Einbettkassette bis zum Einbetten in 4 % PFA gelagert.

2.2 Einbetten und Schneiden des Gewebes

Das Mausgewebe wurde mittels des Einbettautomaten TP 1020 (Leica) entwässert und in Paraffin eingebettet. Die Paraffinblöcke wurden zum Aushärten 10 min bei 4°C inkubiert. Von den Paraffinblöcken wurden mittels des Mikrotom RM 2255 (Leica) 5 µm dicke Schnitte hergestellt, auf Superfrost Plus Objektträger (Gerhard Menzel) aufgezogen und 2 h bei 50 °C fixiert. Die Schnitte wurden, wenn nicht am Tag der Hybridisierung geschnitten, vor der Hybridisierung 20 min bei 50 °C inkubiert.

2.3 Synthese der radiomarkierten RNA Probe

Die cDNA-Templates von verschiedenen Mausgeweben (s. Kap. III.10), nämlich Leber für GPx-1, Dünndarm für GPx-2, Lunge für GPx-3 und GPx-4 wurden im Thermo-Cycler (GeneAmp PCR System 9700, Perkin) mit entsprechendem Programm (Tabelle 3.4) amplifiziert. Die Ansätze für die PCR-Amplifikation wurden wie folgt zusammenpipettiert

(Tabelle 3.3) und zentrifugiert. Die Amplifikationsprimer wurden von Metabion bezogen (Tabelle 2.5). Bei der Polymerase handelt es sich um die *Taq*-Polymerase (5 U/ μ l) der Firmen Qiagen.

Tabelle 3.3 PCR Ansatzschema für GPx-1, GPx-2, GPx-3, GPx-4

Komponente	Volumen / Reaktion
10 mM dNTPs	1 μ l
10 pmol forward primer	2 μ l
10 pmol reverse primer	2 μ l
10 x Puffer (Qiagen)	5 μ l
<i>Taq</i> -Polymerase	1 U
ggf. 5 x Q-Solution (Qiagen)	10 μ l
DNA	20 – 200 ng
H ₂ O	ad 50 μ l

Tabelle 3.4 PCR Programm für Amplifikation der GPx-1, GPx-2, GPx-3, GPx-4

Programm	Temperatur	Zeit
Einmalige Denaturierung	94°C	5 min
Denaturierung	94°C	45 sec
Annealing	56°C	45 sec
Elongation	72°C	1 min
Zyklen	38	
Terminale Elongation	72°C	7 min

Um die entsprechenden großen PCR-Produkte in der Klonierungsreaktion einzusetzen, wurden die PCR-Produkte durch Gelelektrophorese aufgetrennt (s.Kap.III.1.4.2) und einzelne Banden ausgeschnitten, wodurch andere PCR-Produkte entfernt wurden. Danach folgt die Aufreinigung restringierter DNA. Das GeneClean II Kit (Qbiogene) wurde verwendet, um die Banden aus TAE-Gelen zu isolieren.

Die PCR-Produkte der GPx-Isoformen wurden in den pCR2.1TOPO-Vektor kloniert, um das DNA-Fragment für die ISH zu vermehren. Nach erfolgter Transformation und Amplifikation in XL10-Gold ultrakompetenten Zellen wurde das Insert wieder aus dem Vektor herausgeschnitten. Die Plasmid-DNA wurde mit dem Plasmid-Mini Kit (Qiagen)

isoliert und durch die Restriktionsendonuklease BamHI (New England Biolabs) linearisiert. Der Erfolg des Verdauung wurde mittels Gelelektrophorese überprüft, danach wurden die entsprechende Banden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem GeneClean II Kit isoliert und aufgereinigt.

Um mRNA in situ zu nachweisen, muss eine komplementäre cRNA (antisense-cRNA) vom entsprechenden DNA-Template für GPx-1, GPx-2, GPx-3 und GPx-4 transkribiert werden. Die sense-Probe wurde parallel als negative Kontrolle verwendet. Die sense- und antisense-cRNA wurden vom linearisierten Plasmid-Template mittels des T7-RNA-Polymerase MAXIscript in-vitro Transcription Kit (Ambion) und [α - 33 P]UTP (GE Healthcare) transkribiert. Das pTRI- β -Actin wurde als Kontrolltemplate transkribiert. Die radioaktiv markierten cRNA-Proben wurden über eine CentriSep-Säule (Princeton Separation) aufgereinigt, und die Probe bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Das ausführliche Protokoll für diesen Teil findet sich bei Häuser (2011).¹²⁵

2.4 In-situ Hybridisierung

Die ^{33}P markierte sense- und antisense-cRNA für GPx-1, GPx-2, GPx-3 und GPx-4 wurde auf den Gewebeschnitten hybridisiert. Die Hybridisierung wurde nach dem Protokoll des mRNAlocator In-Situ Hybridization Kit von Ambion durchgeführt. Die radioaktiv markierten cRNA-Sonden wurden mit Hybridisierungslösung auf 5×10^4 cpm/ μl verdünnt und für 20 min bei 60°C denaturiert. Diese Lösung wurde auf den Schnitt pipettiert und mit einem Hybri-Slip (Sigma) bedeckt. Die Schnitte wurden in vorgewärmten feuchten Kammern für 16 h inkubiert. Die Hybridisierungstemperaturen der verschiedenen Sonden sind in Tab 3.5 gezeigt. Nach der Posthybridisierungsbehandlung wurden die Objektträger in die Hypercoat-Emulsion (0,09 g Ag/g Hypercoat LM-1 Emulsion, GE) getaucht und für 3 Wochen bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach der Entwicklung und Fixierung wurden die Objektträger mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt (HE Färbung) und unter dem Mikroskop analysiert.¹²⁵

Tabelle 3.5 Hybridisierungstemperatur und verwendete Gewebe für GPx Gene

Gen	verwendete Gewebe	Hybridisierungstemperatur
GPx-1	Leber, Niere, Herz, Aorta	55°C
GPx-2	Dünndarm, Herz, Aorta	55°C
GPx-3	Lunge, Niere, Herz, Aorta	$52,5^{\circ}\text{C}$
GPx-4	Lunge, Herz, Aorta	55°C

3. Zellkultur

Alle Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C, 5% CO₂ und wasserdampfgesättigter Atmosphäre unter sterilen Bedingungen kultiviert. Arbeiten an Zellkulturen fanden an einer sterilen Werkbank unter Verwendung steriler Medien, Lösungen und sterilisierter Pipetten statt, um Kontamination mit Pilzen oder Bakterien zu vermeiden. Vor Arbeitsbeginn erfolgte eine gründliche Desinfektion der Hände und verwendeten Waren.

Isolierung von Mausperitonealmakrophagen

Zur Isolierung von peritonealen Mausmakrophagen wurde zunächst bei den Mäusen eine milde Peritonitis induziert. Dazu wurde den Mäusen 1 ml einer 3 % Thioglykolat-Lösung intraperitoneal injiziert. Nach 4 Tagen wurden die Mäuse mit CO₂ getötet. Zur Isolation der Zellen wurden 8 ml Zellkulturmedium (DMEM mit 10 % FCS und Antibiotika wie L-Glutamin, Penicillin/Streptomycin) mit einer 26 G Kanüle in das Peritoneum injiziert und das Peritoneum leicht geklopft, um die Zellen abzulösen. Anschließend wurde das Medium mittels einer 19 G Kanüle aspiriert und die Zellen in der Suspension 5 min bei 1500 rpm (460 x g) zentrifugiert. Das Pellet wurde für Western Blot in 9 ml Medium aufgenommen und in drei 60 mm Zellkulturschalen (*Nunclon Surface*) ausplattiert. Für den Proliferationsassay wurde das Pellet in 10 ml Medium aufgenommen und in einer 92 mm Zellkulturschale (*Nunclon Surface*) ausplattiert. Nach 3 h Plastikadhärenz wurden die nicht adhären Zellen durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt und die Peritonealmakrophagen für 72 h mit 10 ng/ml murinem *Macrophage Colony-Stimulating Factor* (MCSF) stimuliert.

4. Präparation der modifizierten Lipoproteine

4.1 LDL Präparation

Menschliches LDL hat eine Dichte von 1,019 bis 1,062 g/ml und eine Größe von 18 bis 25 nm. Die Isolierung von LDL erfolgte aus humanem, nicht lipämischem Blutplasma, das von der Transfusionszentrale der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität zur Verfügung gestellt wurde. Bei den 18 bis 65 Jahre alten Spendern war kein Bluthochdruck, keine koronare Herzkrankheit oder Diabetes mellitus bekannt und sie nahmen keine Medikamente ein. Bei der Präparation wurde soweit möglich aseptisch gearbeitet. Grundprinzip der Isolation ist die Auftrennung über einen Kaliumbromid (KBr)-Dichtegradienten wie von Havel et al beschrieben.¹²⁶

Um zunächst das VLDL abzutrennen, wurde das Plasma in 40 ml Ultrazentrifugenröhrchen gefüllt und zugeschweißt, dann bei 10 °C, 45000 rpm für 24 h zentrifugiert. Dabei sammelten sich die schwereren Lipoproteine wie LDL und HDL am Boden des Röhrchens als gelbbraune, zähflüssige Schicht, während das weiß-trübe VLDL ganz oben aufschwamm.

Die Röhrchen wurden mit einer 18 G Kanüle seitlich angestochen und das VLDL wurde mittels einer 10 ml Spritze entnommen. Dann wurden die Röhrchen aufgeschnitten und das Rest-Plasma ohne VLDL ausgegossen und gut gemischt. Im nächsten Zentrifugationsschritt wurde LDL von HDL abgetrennt. Zuerst wurde das Volumen (V_1) für das Plasma ohne VLDL gemessen. Um die Dichte (D_1) der Lipoproteinfraktion zu bestimmen wurde 1 ml der Fraktion entnommen und gewogen. Dann wurde KBr ($X_1 = V_1 \times 0,3265$ g) zum Plasma hinzugeben und gelöst, die Dichte des Plasma-KBr (D_2) wurde bestimmt, 1 ml Plasma-KBr wurde entnommen und gewogen. Die Plasma-KBr Lösung wurde in 40 ml Röhrchen geteilt und mit Light KBr-Lösung (Dichte 0,009 g/ml) unterschichtet. Die Ultrazentrifugation erfolgte wiederum für einen Tag unter den oben angegebenen Bedingungen.

Am nächsten Tag hatte sich das LDL als orangegelbe Schicht oben abgesetzt und wurde seitlich mit der Kanüle entnommen, das HDL blieb als bräunliche Schichte am Boden. Das Volumen (V_2) der LDL-KBr Fraktion wurde gemessen, 1 ml LDL-KBr Lösung wurde entnommen um die Dichte des LDL-KBr (D_3) zu messen. Dann wurde die Lipidfraktion mit KBr (X_2) auf die Dichte des LDL-KBr (D_3) gebracht (s. Formel 1) und mit Light KBr-Lösung unterschichtet.

$$X_2 = (D_2 - D_3) / (D_2 - D_1) \times 0,3265 \times V_2 \text{ (g)} \quad \text{(Formel 1)}$$

Nach der 24 h Ultrazentrifugation wurde die LDL-Fraktion wie oben beschrieben gesammelt, das Volumen (V_3) und die Dichte (D_4) wurden gemessen. Die Lipidfraktion wurde mit KBr (X_3) auf die Dichte 1,15 gebracht (s. Formel 2) und oben mit KBr-Lösung (Dichte 0,192 g/ml) überschichtet.

$$X_3 = (D_4 - 1,15) / (D_4 - D_1) \times 0,3265 \times V_3 \text{ (g)} \quad \text{(Formel 2)}$$

Nach einem Tag Ultrazentrifugation wurde die LDL-Fraktion gesammelt (s.o.) und bei 4 °C im Dialysepuffer 3 - 4 Tagen dialysiert.

4.2 LDL-Cholesterin Bestimmung

Die Bestimmung des LDL-Cholesterins erfolgte mittels der kommerziell erhältlichen Tests CHOD-PAP von Roche. Bei der CHOD-PAP Methode werden Cholesterin und Cholesterinester mit Detergenzien aus Lipoproteinen und nachfolgend das Cholesterin mittels der Cholesterinesterase freigesetzt. Das gesamte freie Cholesterin wird dann mittels Cholesterinoxidase enzymatisch oxidiert und das dabei entstehende H_2O_2 in einer Peroxidase katalysierten Reaktion zu dem farbigen Produkt „Quinoneimin“ umgesetzt, dessen Konzentration photometrisch ermittelt werden kann. (Abb. 3.2)

10 μl des Lipoproteins (z.B. LDL) wurden in einer Mikro-Einmalküvette (Fa. Brand) zu 1 ml CHOL-Reagenz (Roche) gegeben und gut gemischt, nach 15 Min Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurde die Absorption des Gemisches bei 546 nm im Photometer gemessen und daraus nach Firmenprotokoll der Cholesteringehalt berechnet.

Chol. Konzentration = OD \times Faktor 8,53 (mg/ml)

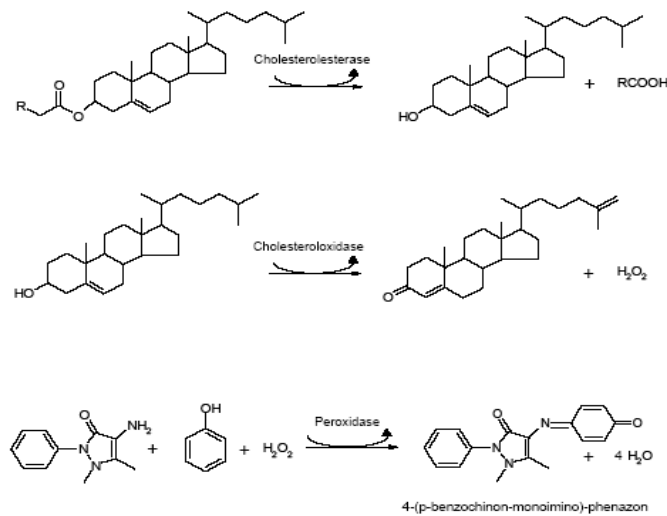


Abbildung 3.2 Reaktion der Cholesterinbestimmung mittels CHOD-PAP Reagenz

4.3 Generierung von modifizierten Lipoproteinen

4.3.1 Enzymatische Modifikation von LDL zu E-LDL

Beim Enzymverdau von LDL wurde zuerst das Apolipoprotein B durch eine Protease abgespalten. 1 ml LDL wurde in einem Eppendorfgefäß mit Trypsin (1,7 µg je mg Cholesterin) bei 37 °C übernacht geschüttelt. Die nun zugänglichen Cholesterinester im Inneren des LDL-Partikels wurden dann mittels Cholesterinesterase zu freiem Cholesterin und freien Fettsäuren gespalten. Um den Abbau der Cholesterinesterase sowie unerwünschte proteolytische Aktivität des fertigen E-LDL zu vermeiden, wurde Trypsininhibitor (2,5 µg je mg Cholesterin) im Überschuss zugegeben. Dann wurde 40 µg/ml Cholesterinesterase aus *Candida cylindracea* (Roche) zugegeben und bei 37 °C für 24 - 48 h bis zur deutlichen Trübung geschüttelt. Das fertige E-LDL wurde steril filtriert und bei 4°C gelagert.

4.3.2 Oxidation von LDL zu OxLDL

Zugabe von Kupfer-Ionen katalysiert die Oxidation des Lipoproteins. Zunächst wurde das aus dem Dialysepuffer stammende EDTA im LDL entfernt, da es mit Kupfer-Ionen einen stabilen Komplex eingeht. Dazu wurde die dialysierte LDL-Fraktion im Dialysepuffer ohne EDTA bei 4 °C für 3 - 4 Tagen dialysiert. Dann wurde 25 µM CuSO₄ in 1 ml LDL zugegeben und für 24 - 72 h bei 37 °C bis zur weißlichen Trübung geschüttelt. (Die Lösung darf nicht sofort nach Zugabe des CuSO₄ trüb werden.) Nach der Beendigung der Inkubation wurde 0,5 mM EDTA zugegeben, um weitere Oxidation zu verhindern. Das fertige OxLDL wurde steril filtriert und bei 4°C gelagert.

5. Färbung der Mausmakrophagen

5.1 Zellbehandlungen

Die Zellen wurden nach der Ablösung mit Accutase (s. Kap. III.7) auf einen 8-well Chamber Slide Objektträger (*Permanox Slide*) ausplattiert und adhären anschließend für 24 h. Anschließend wurde das Medium abgezogen und die Zellen mit 4 % PFA für 30 Min bei RT oder für 24 H bei 4°C fixiert. Vor der Färbung wurde die PFA-Lösung abgesaugt.

5.2 Immunzytologische Färbung mit F4/80 Antikörper

Zum Nachweis, dass es sich bei den isolierten Zellen um Makrophagen handelt, wurde eine immunzytologische Färbung des Makrophagen-Oberflächenantigens F4/80 mittels LSAB[®] + Kit, Peroxidase (LSAB + Kit, HRP, Universal Dako Cytomation) durchgeführt.

Die vorbereiteten zytologische Präparate (s. Kap. III.5.1) wurden zuerst für 10 Sekunden in Aqua dest eingetaucht. Nach 5 min Blockierung mit Peroxidase wurden alle Schnitte mit PBS-Puffer einmal kurz und dann weitere 5 min gewaschen. Der Primärantikörper (RatteTM anti-Maus F4/80, Acris) der Maus wurde zuerst mit Verdünnungsmedium (REALTM Antibody Diluent, Dako) 1:100 oder 1:500 verdünnt. Anschließend wurden die Schnitte mit dem Primärantikörper für 30 min inkubiert und der überschüssige Antikörper wie oben beschrieben mit PBS entfernt. Die Inkubation mit dem Biotin-konjugiert sekundären Antikörper „Link“ (biotinyl. Link Universal, Dako) erfolgte für 15 min bei RT, der überschüssige Antikörper wurde wiederum mit PBS entfernt.

Die Entwicklung der Schnitte erfolgte mittels der Inkubation mit Streptavidin Peroxidase (Streptavidin-HRP, Dako) für 15 min, dann wurden die Schnitte mit PBS gewaschen. Die Farbentwicklung erfolgte mittels der Substrat-Chromogen Lösung. Dazu wurde 1 ml DAB Substratpuffer mit 2 Tropfen (20 µl) DAB Chromogen gemischt. Die Inkubation erfolgte bei RT für 5 - 15 min, es wurde wiederum mit PBS gewaschen. Anschließend wurde eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin durchgeführt. Dazu wurden die Schnitte 5 min mit Hämatoxylin inkubiert und für 5 Min unter fließendem Leitungswasser gespült. Ein Tropfen Glycerin-Gelatine (Sigma) wurde auf den trockenen Objektträger gegeben und mit dem Deckglas eingedeckt.

5.3 Oil-Red-O Färbung

Oil Red O (ORO) ist ein lipophiler Farbstoff, der in Zellen eindringt und neutrale Fette und Cholesterinester rot anfärbt. An unverestertes Cholesterin bindet ORO nicht. Zur ORO-Färbung wurde der Objektträger mit den fixierten Zellen (s. Kap. III.5.1) zuerst in Aqua dest und dann in 50 % Isopropanol kurz gespült. Danach wurde die ORO-Lösung auf das Präparat gegeben und für 10 - 15 Min inkubiert. Nach einmaligem Waschen mit aqua dest wurde der Schnitt für 3 Min mit Hämatoxylin inkubiert und für 10 Min unter fließendem Leitungswasser gespült. Schließlich wurden die Schnitte mit Glycerin-Gelatine eingedeckt.

6. Zelluläre Cholesterinbestimmung

6.1 Cholesterinbestimmung

Die Bestimmung des zellulären Cholesterins erfolgte mittels des kommerziell erhältlichen *Cholesterol/Cholesteryl Ester Quantitation Kit* (Fa. Calbiochem). Zunächst wurden die Cholesterinester in der Probe durch die im Kit enthaltene Cholesterinesterase zu Cholesterin hydrolysiert. Weiterhin enthält der Kit Cholesterinoxidase, die das freie Cholesterin zu Cholest-4-en-3-on und H₂O₂ oxidiert. Das H₂O₂ reagiert mit einer empfindlichen Cholesterin-Probe im Kit zum pinkfarbenen fluoreszierenden Farbstoff Resorufin, der mittels Spektrophotometrie bei 570 nm oder durch Fluorometrie bei einer Exzitationswellenlänge von 535 nm und einer Emissionswellenlänge von 587 nm detektiert werden kann. Der fluorometrische Assay kann Konzentrationen bis hinab zu 0,02 - 1 µg/well ermitteln und ist ~10fach empfindlicher als der kolorimetrische Assay.

Zur Bestimmung der zellulären Lipide wurden Zellen in drei 60 mm Zellkulturschalen (*Nunclon Surface*) ausgesät und für 72 h mit 100 ng/ml murinem MCSF stimuliert. (s. Kap. III.3) Nach 72 h Inkubation wurden die Zellen mit dem Stimulus (z.B. OxLDL, E-LDL) für weitere 24 h inkubiert. Nach der Behandlung wurde das Medium abgezogen und die Platte wurde zweimal mit PBS gewaschen. Dann wurde 100 µl eiskalter Cholesterinreaktionspuffer aus dem *Cholesterol/Cholesteryl Ester Quantitation Kit* (Fa. Calbiochem) als Lysepuffer auf jede Platte gegeben. Die Zelllysate wurden mit einem Zellschaber zusammengeschabt und in Eppendorfgefäße pipettiert. Um die Zellen weiter zu homogenisieren und aufzubrechen wurden die Zelllysate 1 min gevortext und eine weitere Minute mit Ultraschall sonifiziert. Der Proteingehalt der Proben wurde mit dem DC-Protein Assay bestimmt (s. Kap. III.6.2).

Die zu testenden Zelllysate wurden in einer schwarzen undurchsichtigen 96-Well Flachbodenplatte (Nunc) vorgelegt. Der Cholesterinstandard im Kit wurde mit Cholesterin-Reaktionspuffer vorverdünnt und entsprechend dem Protokoll des Kits wurde eine Standardkurve (40 – 200 µl µg/ml) erstellt. Das Reaktionsgemisch wurde frisch angesetzt (2 µl Cholesterin Probe, 2 µl Enzymmix, 2 µl Cholesterinesterase und 44 µl Cholesterin-Reaktionspuffer / Well). Je Well wurden 50 µl Probe oder Standard und 50 µl Reaktionsgemisch zugegeben, als Leerwert diente Cholesterinreaktionspuffer. Die Platte wurde für eine Stunde bei 37 °C lichtgeschützt inkubiert. Die Absorption wurde bei 450 - 650 nm im Mikroplatten-Reader (Sunrise™, Tecan) bestimmt und anhand des Standards die Cholesterinkonzentration der Proben berechnet. Sofern die Cholesterinkonzentration < 40 µg/ml war, wurden alle Probe mit dem Cholesterinreaktionspuffer verdünnt und der Test

wiederholt. Zur Detektion wurde die Fluoreszenz im Fluoroskan Ascent (Thermo) mit einer Exzitationswellenlänge von 485 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm gemessen und die Cholesterinkonzentration wurde anhand einer Standardgerade (4 - 20 µg/ml) kalkuliert. Der zelluläre Cholesteringehalt wurde als Gesamtcholesterin pro zelluläres Protein (µg/mg) dargestellt.

6.2 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration wurde unter Verwendung des DC-Protein Assays (BioRad) in Anlehnung an die Methode nach Lowry bestimmt. Dieser Assay basiert auf zwei Proteinreaktionen mit einer alkalischen Kupfertartrat-Lösung und einem Folin-Reagenz. Der erste Schritt beruht auf der Reaktion zwischen dem Protein und Kupfer in alkalischer Lösung. In einem zweiten Schritt wird das gelbe Folin-Reagenz durch das Kupfer-behandelte Protein reduziert. Die resultierende intensive Blaufärbung wird zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Photometrie bei 405 - 750 nm gemessen.

Als Vergleichsprotein bei der Ermittlung der Standardkurve wurde bovines Serum Albumin (BSA) verwendet. 1,52 mg/ml BSA aus dem Kit wurde im Aqua dest gelöst und eine 1:1 Verdünnungsreihe in einer 96-Well Mikrotiterplatte erstellt. Je 5 µl Probe oder Standard wurden pro Well verwendet, als Leerwert diente der Lysepuffer. Zuerst wurde eine Mischung aus Lösung A (alkalische Kupfertartrat-Lösung) mit 1:50 verdünnter Lösung S frisch eingesetzt. Wenn die Probe kein Detergenz enthielt, wurde nur Lösung A verwendet. Dann wurden 25 µl vorbereitete Mischung und 200 µl Lösung B (Folin Reagenz) in jedes Well gegeben. Zum Mischen wurde die Platte kurz gerüttelt und für 15 Min bei RT inkubiert. Die Absorption wurde bei 450 nm im ELISA-Reader (Multiskan Ascent, Fa. Thermo) bestimmt und anhand des Standards der Proteingehalt der Proben mit Hilfe des Programms Ascent 2.6 (Fa. Thermo) berechnet.

7. BrdU Proliferationsassay

Zur Untersuchung der Proliferation der Makrophagen nach Stimulation wurde der *BrdU Cell Proliferation ELISA (chemiluminescent) Kit* von Roche verwendet. Der Assay beruht auf dem Einbau von Bromdesoxyuridin (BrdU) anstelle von Thymidin in DNA von proliferierenden Zellen. Das eingebaute BrdU kann mittels eines Antikörpers basierten Chemilumineszenz-Assays nachgewiesen werden.

Für den Proliferationsassay wurden die Makrophagen nach 72 h Inkubation mit MCSF (s. Kap. III.3) durch 10 min Inkubation mit Accutase und anschließendem leichtem Schaben mit einem Zellschaber von der Platte abgelöst. Nach 5 min Zentrifugation bei 1500 rpm (460 x g) wurde das Pellet in 1 ml Medium aufgenommen und die Zellzahl mit der Trypanblau-Färbung bestimmt. Jeweils $2,5 \times 10^4$ Zellen wurden pro Well in eine weiße undurchsichtige 96-well Mikrotiterplatte (Nunc) ausplattiert und nach 1 Stunde Vorinkubation mit dem ERK-Inhibitor (z.B. PD98059, U0126) oder p38-Inhibitor (SB203580) für weitere 24 - 48 h mit dem Stimulus (z.B. MCSF oder OxLDL) und BrdU inkubiert. Der Proliferationsassay wurde mittels des Kits von Roche laut Protokoll durchgeführt. Dazu wurden nach Ablauf der Inkubation mit BrdU der Überstand abgesaugt und die Zellen mit Fix Denat (70 % Ethanol) für 30 min bei RT fixiert. Die fixierten Zellen wurden dann mit PBS gewaschen und pro Well 100 μ l anti-BrdU-POD Antikörper (1:100 Verdünnung in der Antibody Dilution Solution) dazugegeben, 4 x für 5 min mit PBS gewaschen und pro Well 50 μ l Detektionsreagenz (Luminol) dazu pipettiert. Das Detektionsreagenz enthält Substrat B und Substrat A. Substrat B wurde 1:100 mit Substrat A verdünnt und muss 5 min vor Zugabe vorbereitet werden. Innerhalb von 10 min wurde die Platte am Fluoroskan Ascent Luminometer ausgelesen (Einstellung: Messung der Chemilumineszenz für 300 msec). Als Kontrollen wurden Zellen ohne Zugabe von BrdU (Hintergrundkontrolle) und nur Medium (Blank) verwendet (Abb. 3.3).

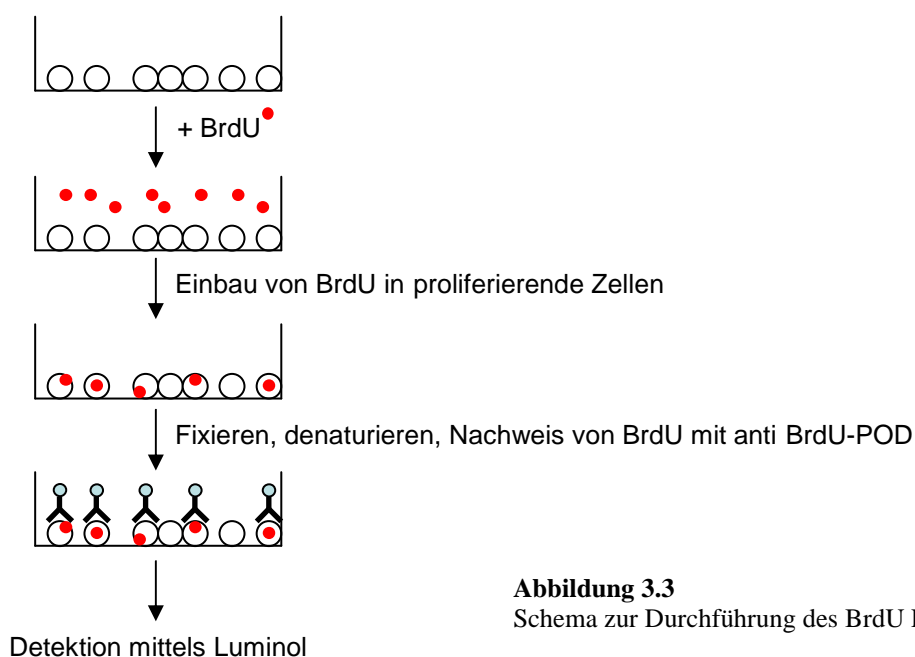


Abbildung 3.3
Schema zur Durchführung des BrdU Proliferationsassays

8. Bestimmung der Kaspaseaktivität

Um die Apoptosesrate der Makrophagen zu analysieren, wurde die Aktivität der Kaspasen 3 und 7 mittels des *Caspase-Glo*[®] 3/7 Assay (Fa. Promega) bestimmt. Dieses Assay enthält ein Enzym (Luciferase) das von den Kaspasen 3 und 7 gespalten werden kann. Die aktive Form der Kaspasen 3 und 7 spaltet ein Asparaginsäure enthaltendes Peptid von der inaktiven Luciferase ab, dadurch wird das Aminoluciferin freigegeben. Dies Substrat emittiert ein Lumineszenz-Signal, proportional zu seiner Menge, und damit proportional zur Menge der aktiven Kaspasen. Die Bestimmung der Chemolumineszenz erfolgt im Fluoroskan. $1,5 \times 10^4$ kultivierte Peritonealmakrophagen (s. Kap. III.7) wurden pro Well in eine weiße undurchsichtige 96-well Mikrotiterplatte (Brand) ausplattiert und nach 1 Stunde Vorinkubation mit dem p38-Inhibitor (SB203580) für weitere 24 - 48 h mit dem Stimulus (z.B. MCSF oder OxLDL) inkubiert und die Kaspaseaktivität bestimmt. Die Bestimmung wurde entsprechend dem Protokoll vom *Caspase-Glo 3/7 Assay* durchgeführt.

9. Western Blot

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

Die im Gel aufgetrennten Proteine wandern durch das Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine Nitrocellulose-Membran (**Blot**). Dort lassen sie sich anfärben oder durch die Bindung von Antikörpern an die Membran spezifisch markieren. Die Antikörper können durch verschiedene Verfahren sichtbar gemacht werden, z.B. indem ein zweiter, mit Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelter Antikörper an den ersten bindet und ein durch Peroxidase spaltbares Chemilumineszenz-Substrat zugegeben wird. Wo die Antikörper

gebunden sind, spaltet die Peroxidase das Substrat und das entstehende Licht belichtet einen aufgelegten Röntgenfilm.

9.1 Gewinnung der Proben

Zellen für Western Blot wurden in drei 60 mm Zellkulturschalen (*Nunclon Surface*) ausgesät und für 72 h mit murinem MCSF (100 ng/ml) stimuliert (s. Kap. III.3). Nach 72 h Inkubation wurden die Zellen mit dem Stimulus (z.B. MCSF, OxLDL) für entsprechende Zeit inkubiert, evtl. nach Vorbehandlung mit dem ERK-Inhibitor (z.B. PD98059, U0126) oder p38-Inhibitor (SB203580). Nach der Inkubation wurde das Medium abgezogen und die Platte zweimal mit PBS gewaschen. Um die Proteinfunktionalität zu bewahren, wurde der Protease-Inhibitor-Cocktail (Sigma) 1:10 mit eiskaltem, denaturierendem Lysepuffer (s. Tab. II.2.1) gemischt und je 150 µl auf jede Platte gegeben. Der Protease-Inhibitor-Cocktail hemmt die meisten Proteasen in der Zelle. Er kann die Degradierung von Proteinen inhibieren, während SDS im Lysepuffer denaturiert. Die Zelllysate wurden mit einem Zellschaber zusammengeschaubt und in Eppendorfgefäße pipettiert. Um die Zellen weiter aufzubrechen wurden die Zelllysate für 1 min gevortext und mit dem Ultraschall sonifiziert. Der Proteingehalt der Proben wurde mit dem DC-Protein Assay bestimmt (s. Kap. III.6.2) und bis zur Analyse bei -20°C eingefroren.

9.2 SDS-PAGE

Die Elektrophorese wird in einem Polyacrylamidgel durchgeführt, das mit SDS geladen und chemisch inert ist. Für die analysierten Proteingrößen erwies sich ein 10 % Gel als geeignet. In einem Gießständer wurde zunächst ein 10 % Trenngel gegossen, mit Isopropanol überschichtet, um eine glatte, blasenfreie Oberfläche zu erhalten und für 1 Stunde zur Polymerisation stehen gelassen. Dann wurde das Isopropanol ausgegossen, das restliche Isopropanol mit Filterpapier aufgesaugt und das 5 % Sammelgel darauf gegossen, in das dann der Probenkamm vorsichtig eingesetzt wurde (s. Tab. 3.6). Das Gel wurde vor Verwendung zur Polymerisation für mindestens 2 h stehen gelassen oder in feuchten Papiertüchern übernacht bei 4°C gelagert.

Tabelle 3.6 Rezept für Gel zur SDS-PAGE

Bestandteil	Ansatz	Menge (für zwei Gele)	
		Sammelgel (5 % PAA)	Trenngel (10 % PAA)
40% Acrylamid /Bisacrylamid		682,5 µl	2,12 ml
1,0 M Tris-HCl		700 µl (pH 6,8)	3,15 ml (pH 8,9)
dH ₂ O		4,08 ml	2,93 ml
20% (w/v) SDS-Lösung		28 µl	42 µl
TEMED		7 µl	7 µl
10% Ammoniumperoxodisulfat		35 µl	35 µl

Vor dem Gellauf wurden die Zelllysate mit Lysepuffer verdünnt und mit dem Probenpuffer (4 ×) auf die Endkonzentration (0,4 mg/ml) eingestellt. Zusätzlich werden reduzierende Thiole wie Dithiothreitol (DTT) dem Probenpuffer zugesetzt, um Disulfidbrücken durch Reduktion zu spalten. Um Sekundär- und Tertiärstrukturen durch das Unterbrechen von Wasserstoffbrücken und das Strecken der Moleküle aufzubrechen, wurden die Proben direkt vor dem Auftragen für 5 Min bei 95°C erhitzt.

Zur Gelelektrophorese wurde der Kamm aus dem Sammelgel gezogen, die Apparatur mit Laufpuffer gefüllt, so dass beide Elektrodendrähte der Elektrophoresekammer mit Flüssigkeit bedeckt waren, und die entstandenen Taschen im Gel mit Laufpuffer von Gel-Resten freigespült. Dann wurden je 5 µl Proteinmarker (PageRuler Prestained Protein Ladder, Fa. Fermentas) und 20 µl Proben in die Taschen eingefüllt. Es wurde darauf geachtet, die Taschen nicht zu überfüllen, damit es nicht zur Verunreinigung von Proben kam.

Die Kammer wurde an eine Spannungsquelle angeschlossen und die Proben wurden zunächst bei 80 V in das Gel einlaufen gelassen. Die Spannung wurde auf 100 V erhöht, sobald die Proben sich im Sammelgel befanden.

9.3 Blot

Nach ca. 2 h Lauf wurde das Gel aus der Elektrophoresekammer entnommen, das Sammelgel abgetrennt und das Trenngel mit einer Hybond ECL Blotmembran (GE), zwei Faserpads und zwei Filterpapieren (Biorad) bei 4 °C in Transferpuffer 15 min bis 1 h eingeweicht und äquilibriert. Die Proteine sind durch das SDS negativ geladen und wandern zum Pluspol, die Membran muss also zum Pluspol (weiße Seite) gerichtet sein,

das Gel zum Minuspol (graue Seite). Von außen nach innen wurde ein befeuchteter Faserpad, Filterpapier sowie die äquilibrierte Blotmembran auf die weiße Seite der Kassette gelegt. Das äquilibrierte Trenngel wurde blasenfrei auf die Membran und wieder von innen nach außen mit einem befeuchteten Filterpapier und einem Faserpad abgedeckt. Die Kassette und eine gefrorene Bio-eis-Kühlunit wurden in die Blotapparatur gelegt. Dann wurde die Apparatur mit Transferpuffer gefüllt, so dass die ganze Kassette mit Flüssigkeit bedeckt war, und für 2 h ein Strom von 350 mA angelegt.

9.4 Färbung

9.4.1 Ponceau-Rot-Färbung

Die Membran wurde mit Ponceau-Rot gefärbt, um zu überprüfen, ob das Protein auf die Membran übertragen wurde. Ponceau-Rot (Ponceau-S Lösung, Sigma) bindet reversibel an die positiv geladenen Amino-gruppen der Proteine. Eine Ponceau-Rot-Färbung ist sehr leicht mit Wasser auszuwaschen, um die Membran für die Immundetektion mit Antikörpern weiterzuverwenden. Die Membran wurde nach dem Blot entnommen und kurz mit Ponceau-S-Lösung (Fa. Applichem) bedeckt, dann mit Wasser abgespült, bis die Proteinbanden auf der Membran sich rosa vom weißen Hintergrund abhoben. Nach der Färbung wurde die Membran mit TBST gespült, um Ponceau-S zu entfernen.

9.4.2 Coomassie-Färbung

Auf SDS-Gelen, die nicht für einen Western-Blot verwendet wurden, wurden die aufgetrennten Proteine durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Der Triphenylmethan-Farbstoff Coomassie-Brillantblau färbt Proteine unspezifisch, indem er an basische Seitenketten von Aminosäuren bindet. Zum Anfärben wurden die Gele für 15 Min bei RT mit der Coomassie-Lösung geschüttelt. Zur Entfärbung wurde die Coomassie-Lösung abgossen und das Gel bei RT mit Wasser geschüttelt.

9.5 Blocken, Waschen, Antikörperbindung

Um die unspezifische Bindung der Antikörper an die Nitrocellulosemembran zu verhindern, wurde diese zuerst mit Protein abgesättigt. Dazu wurde eine 5%ige Lösung Magermilchpulver in TBST verwendet. Die Membran wurde mit der Blockierlösung für eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 4 °C geschüttelt, danach zum Abwaschen überschüssigen Proteins einmal mit TBST geschüttelt.

Der verwendete erste Antikörper (s. Tab. 2.4) wurde, soweit nicht anders angegeben, in 5 ml 5%iger BSA-TBST-Lösung 1:1000 verdünnt und auf die Membran gegeben. Diese wurde über Nacht bei 4 °C langsam geschüttelt. Danach wurde die Membran dreimal für 20 Min mit TBST gewaschen, um Reste des ersten Antikörpers zu entfernen.

Dann wurde der zweite Antikörper (anti-rabbit IgG) verdünnt, auf die Membran gegeben und für eine Stunde bei RT geschüttelt. War der erste Antikörper aus dem Kaninchen gewonnen, wurde als zweiter Antikörper das HRP-konjugierte anti-rabbit IgG (Fa. Sigma) mit TBST 1:2000 verdünnt.

Nach Inkubation mit dem zweiten Antikörper wurde die Membran 3 x 20 Min mit TBST gewaschen, dann wurde das Antikörpersignal detektiert.

9.6 Detektion

Die Detektion erfolgt mit ECL Plus Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare). Die Peroxidase am zweiten Antikörper katalysiert dabei die Oxidation von Luminol, bei der Licht frei wird. (Abb. 3.4) 50 µl Substrat B wurden in 2 ml Substrat A gegeben, die Mischung wurde auf die Membran gegeben und für 2 Min inkubiert. Nach Abtropfen überschüssiger Detektionslösung wurde die Membran zwischen zwei Folien in die Kassette eingeklebt und ein Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, GE Healthcare) aufgelegt. Der Film wurde nach Bedarf einige Sekunden bis hin zu einigen Stunden belichtet, entwickelt, fixiert, gespült, trocken gelassen und gescannt.

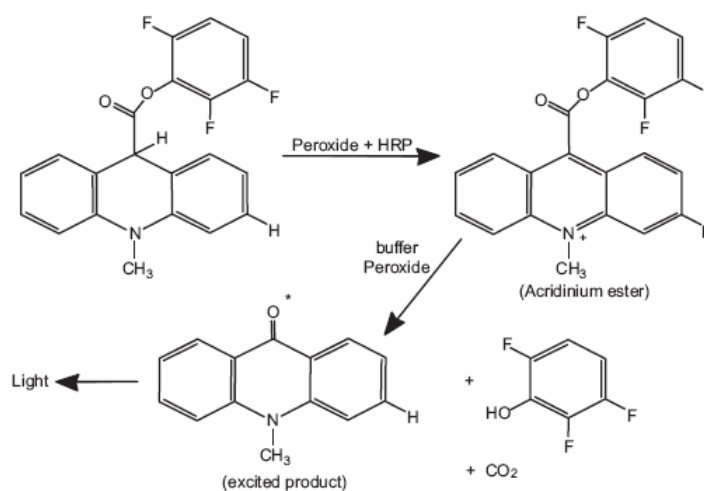


Abbildung 3.4 Chemilumineszenz-Reaktion von Lumigen PS-3 mit POD

9.7 Stripping der Membran

Um verschiedene Proteine nachzuweisen, wurden die gebundenen Antikörper wieder von der Membran entfernt (*Stripping*) und durch andere ersetzt. Zum *Stripping* wurde die Membran mit *Stripping*-Puffer für 1 Stunde bei RT geschüttelt, danach dreimal mit TBST für 20 Min gewaschen und erneut geblockt. Die Bindung und Detektion anderer Antikörper konnte nun wie bereits beschrieben durchgeführt werden. (s. Kap. III. 6.6)

10. Bestimmung der Genexpression

10.1 Präparation der Maus

Die Mäuse wurden unter einer Isofluran-Kurzarkose durch HWS-Luxation getötet und anschließend wurde die Bauchhöhle eröffnet. Zunächst wurden Leber, Dünndarm, Niere und nach der Eröffnung des Brustraumes die Lunge entnommen. Der Dünndarm wurde mit PBS durchgespült. Proximal wurde das Herz mit PBS durchgespült und freigelegt, die Aorta am Aortenbogen entlang nach unten frei präpariert. Die Aorta wurde entnommen und am Aortensinus vom Herz abgetrennt. Alle Gewebe wurden sofort nach der Entnahme in Schalen mit kaltem PBS überführt. Die Schalen wurden auf Eis gelagert.

Dünndarm, Niere, Leber und Lunge wurden zerkleinert und in 50 ml Falcons überführt. Die entnommenen Gewebe wurden ausgewogen, die Falcons wurden auf Trockeneis zwischengelagert und bei -80 °C eingefroren, wenn die Gewebe nicht sofort weiter für RNA-Isolierung verwendet wurden.

10.2 RNA Isolierung

10.2.1 RNA Isolierung mittels RNeasy Mini Kit

Die RNA aus Gewebe und Peritonealmakrophagen wurde mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen isoliert. Dieses Kit wird zur Aufreinigung von RNA, die länger als 200 bp ist (z.B. mRNA) verwendet. Die RNA bindet an eine Kieselgel-Membran, während Kontaminanten in mehreren Schritten ausgewaschen werden. Die Gewebeprobe wird in RLT-Puffer lysiert und mit dem Sonopuls Ultraschall homogenisiert. Der RLT-Puffer ist ein Guanidinisothiocyanat (GITC)-haltiger Puffer mit hoher Denaturierungsaktivität. GITC kann RNasen schnell inaktivieren und die Isolation intakter RNA ermöglichen. Weitere

RNA-Anteile (tRNA oder rRNA), die kleiner als 200 bp sind, können nicht an die Silicamembran binden und werden dadurch ausgewaschen.

RNA-Gewinnung aus der Mausgewebe

Das vorbereitete Mausgewebe (≤ 30 mg) wurde in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es wurden in 600 μ l RLT Puffer verdünnt β -Mercaptoethanol (β -ME) 1:100 zugegeben, im Anschluss wurde das Gewebe mit Hilfe eines Ultraturrax Dispergiergerätes (IKA) homogenisiert. Das Lysat wurde mit einem Volumenanteil 70 %igen Ethanol durch Pipettieren gemischt. Es wurden max. 700 μ l Lysat auf die Säule gegeben und 15 Sekunden bei $8000 \times g$ und RT zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Es folgte die Verdauung der DNA mit dem RNase-Free DNase Set (Qiagen). Vor und nach dem Verdau wurden jeweils 350 μ l RW1 Puffer auf die Säule gegeben und bei obigen Bedingungen zentrifugiert, der Durchfluss wurde verworfen. Die Säule wurden zweimal mit 500 μ l RPE Puffer durch Zentrifugation für 15 sec bzw. 2 min bei $8000 \times g$ gewaschen. Die Säule wurde 1 min bei max. Geschwindigkeit trocken zentrifugiert und zu Elution der RNA in ein neues Reaktionsgefäß wurden 30 – 50 μ l RNase-freies Wasser auf die Säule gegeben und für 1 Minute bei $8000 \times g$ zentrifugiert. Die isolierte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

RNA-Gewinnung aus der Mausperitonealmakrophagen

Zellen für die RTD-PCR (*Real Time Detection PCR*) wurden in drei 60 mm Zellkulturschalen (*Nunclon Surface*) ausgesät und für 72 h mit murinem MCSF (100 ng/ml) stimuliert (s. Kap. 3). Nach 72 h Inkubation wurden die Zellen mit dem Stimulus (z. B. OxLDL) inkubiert. Nach der Behandlung wurde das Medium abgezogen und die Platte wurde dreimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Dann wurden 600 μ l RLT Puffer auf jede Platte gegeben. Die Zelllysate wurden mit Zellschaber gesammelt, in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und mit einer Spritze und einer 20er Nadel homogenisiert. Wenn die Zelllysate nicht sofort für die RNA-Isolierung verwendet wurden, wurden sie bei -80 °C eingefroren oder es wurde wie oben beschrieben mit Hilfe des RNeasy Mini Kits RNA aus dem Zelllysate isoliert und bei -80 °C gelagert.

10.2.2 DNase Verdau

Genomische DNA (gDNA) kann die Ergebnisse der RTD-PCR (*Real Time Detection PCR*) verfälschen. Um eventuelle Verunreinigungen durch gDNA zu entfernen, wurde deshalb ein zusätzlicher Verdau durch DNase I mit anschließender Aufreinigung der RNA durchgeführt.

DNase Verdau auf der Säule

Während der RNA Isolierung mit RNeasy Mini Kit wurde auf der Säule ein DNA-Verdau mit Hilfe vom RNase-Free DNase Set (Qiagen) durchgeführt.

Lyse und Homogenisierung der Probe und die Bindung von RNA an die RNeasy Membran wurde entsprechend dem Protokoll des RNeasy Mini Kits durchgeführt. Nach dem Waschen mit einem verringerten Volumen des RW1 Puffers wurde die RNA während ihrer Bindung an die RNeasy Membran mit DNase I behandelt. Dazu wurde 10 µl DNase I Stock Solution mit 70 µl RDD Puffer gemischt. 350 µl RW1 Puffer wurden auf die Säule gegeben und 15 sec bei $8000 \times g$ zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, dann wurden 80 µl DNase I- Inkubationsgemisch direkt auf die Membran der Säule gegeben und für 15 Min bei RT inkubiert. Die DNase wurde durch Waschen mit 350 µl RW1 Puffer entfernt. Das Waschen mit RPE Puffer und die Eluierung von RNA wurden dann entsprechend dem Standardprotokoll durchgeführt.

DNase Verdau nach der RNA Isolierung

Wenn kein DNase-Verdau **auf der Säule** durchgeführt wurde, erfolgte dieser nach der RNA Konzentrationsbestimmung mit dem DNA-free™ Kit (Ambion). Bei diesem System wird zuerst DNA durch DNase verdaut und dann die DNase durch einen Inaktivator inaktivieren, so dass weder eine Erhitzung oder EDTA-Zugabe noch eine Phenol-Chloroform-Extraktion zur Enzymfernung nötig sind. Das *DNase Inactivation Reagent* besteht aus einer fest-flüssigen Suspension, die vor Gebrauch zunächst durch vortexen aufgeschwemmt werden muss.

Die 44 µl RNA-Probe wurde mit 5 µl $10 \times$ DNase I Puffer und 1 µl rDNase (2 U) gemischt und für 30 Min bei 37 °C inkubiert. Durch Zugabe vom 5 µl *DNase Inactivation Reagent* und sorgfältiger Mischung wurde die Reaktion gestoppt. Nach einer Zentrifugation für 1,5 Min bei $10000 \times g$ konnte der Überstand abgenommen, in ein sauberes Eppendorfgefäß überführt und die aufgereinigte RNA bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert werden.

10.3 cDNA Synthese

Die cDNA (komplementäre DNA) wird mittels des Enzyms Reverse Transkriptase aus einzelsträngiger RNA synthetisiert. Diese cDNA wird als Matrize für Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) zur Amplifikation der DNA verwendet.

Unter Verwendung des SuperScript™ III Reverse Transkriptase Kits sowie des Oligo-dT-Primers der Firma Invitrogen wird die RNA aller Gewebetypen revers zu cDNA transkribiert. Der Oligo-dT-Primer (12–18 dTs) ist komplementär zum Poly-A-Schwanz der eukaryotischen mRNA und steht nur für die Reverse Transkription zu Verfügung.

Es werden maximal 4 µg RNA in maximal 12 µl H₂O eingesetzt. Liegt die RNA Konzentration über 5 µg / 12 µl, so wird die RNA entsprechend mit Wasser verdünnt. Zu 12 µl RNA wurden 1 µl Oligo (dT) Primer (0,5 µg/µl) und 1 µl dNTPs (10 mM) gegeben. Der Ansatz wurde 5 min bei 65 °C denaturiert, und wurde im Anschluss 1 min auf Eis abgekühlt. Die Ansätze wurden kurz an zentrifugiert, bevor der Transkriptionsmix zugegeben wurde. Der Transkriptionsmix setzt sich folgendermaßen zusammen:

- 4 µl 5 x First Strand Buffer
- 1 µl DTT (0,1 M)
- 1 µl SuperScript III Reverse Transkriptase (200 U/µl)

Der Transkriptionsmix wurde durch vorsichtiges Pipettieren gemischt, zur jeweiligen Probe gegeben und erneut durch Pipettieren gemischt. Der Ansatz wurde kurz an zentrifugiert. Die reverse Transkription findet 1 h bei 50 °C statt. Im Anschluss wurde die reverse Transkriptase 15 min bei 70 °C inaktiviert. Die Ansätze wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

10.4 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Bestimmung der DNA- und RNA-Konzentration erfolgte mittels des UV/VIS-Spektralphotometers (NanoDrop ND 1000). Dieses Gerät kann 1 µl Probe mit hoher Richtigkeit und Reproduzierbarkeit messen.

1 µl Probe wurde direkt auf die Faseroptik pipettiert, die Messung kann über den PC kontrolliert und gespeichert werden.

10.5 Semiquantitative Real Time-PCR

Die *Real-Time-Detection-PCR* (RTD-PCR) ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht, und die Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen durchgeführt, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden. Die

Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Während eines Laufs wird anhand von erhaltenen Fluoreszenzsignalen die Quantifizierung zu Beginn der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen. Diese Methode unterscheidet sich somit von anderen quantitativen PCR-Methoden, die erst nach Ablauf der PCR eine quantitative Auswertung, meist unter Einbeziehung einer gelelektrophoretischen Auftrennung der PCR-Fragmente, vornehmen.

10.5.1 Detektion der PCR Produkte in Echtzeit

Die RTD-PCR wird mit dem *LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I* Kit (Roche) oder *QuantiTect[®] SYBR Green PCR Kit* (Qiagen) im *LightCycler[®] 2.0 Real-Time PCR detection system* der Firma Roche durchgeführt.

SYBR Green I

SYBR Green I ist ein Fluoreszenzfarbstoff, er bindet an die doppelsträngige DNA, wodurch die Fluoreszenz dieser Farbstoffe ansteigt. Die Zunahme der DNA korreliert daher mit der Zunahme der Fluoreszenz von Zyklus zu Zyklus. Die Messung findet am Ende der Elongation in jedem Zyklus statt (Abb. 3.5).

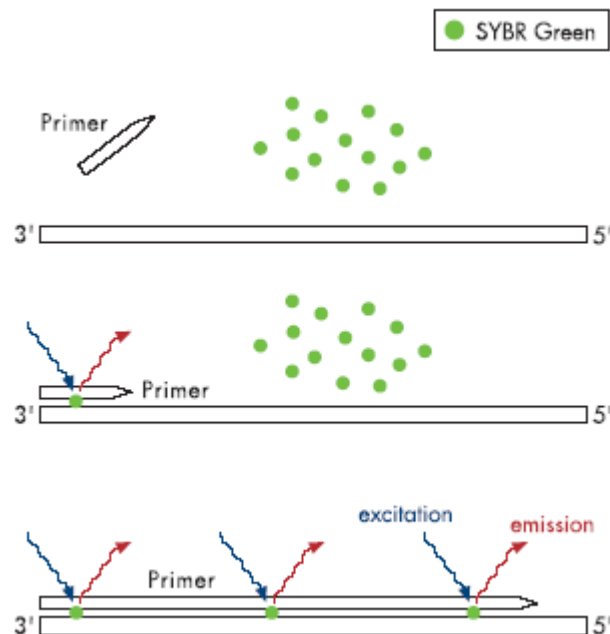


Abbildung 3.5 Prinzip der SYBR Green I basierten Detektion der PCR-Produkte in der RTD-PCR.

Schmelzkurve

Nach abgelaufener PCR wird eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, anhand derer die Fragmentlängen und dadurch die Spezifität bestimmt werden können. Bei einer Schmelzkurvenanalyse wird die DNA aufgeschmolzen, indem die Temperatur langsam kontinuierlich erhöht wird (50 °C → 95 °C). Bei einer für das Fragment spezifischen Schmelztemperatur denaturiert der Doppelstrang zu zwei einzelsträngigen Molekülen. Dabei wird der SYBR Green I freigesetzt, und es wird eine Fluoreszenzabnahme registriert. Da die doppelsträngige DNA von spezifischen PCR-Produkten einen höheren Schmelzpunkt hat als unspezifisch entstehende Primerdimere, ist eine Unterscheidung möglich. Die Höhe des Peaks der Schmelzkurve gibt annähernd Auskunft über die Menge des gebildeten Fragments.

10.5.2 Relative Quantifizierung

Die relative Quantifizierung vergleicht zwei Ratios: die Ratio der Menge eines Target-Gens zu einem Referenz-Gen in einer unbekannt Probe wird mit der Ratio der gleichen Gene in einer Standard-Probe verglichen. Das Ergebnis einer relativen Quantifizierung wird als normalisierte Ratio dargestellt, die Menge des Target-Gens wird mit Hilfe einer externen Standardkurve mittels LightCycler Software 4.05 (Roche) berechnet.

C_T-Wert

Um immer am Anfang der exponentiellen Phase messen zu können, wird häufig der C_T-Wert (*Cycle Threshold* für Schwellenwert-Zyklus) bzw. der C_P-Wert (*Crossing Point*) verwendet, der den Zyklus beschreibt, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz ansteigt.

Referenz-Gen

Es wird mindestens ein Referenz-Gen (z.B. GAPDH, Actin, 18S rRNA) zusätzlich bestimmt, um einen relativen Mengen-Vergleich durchzuführen (relative Quantifizierung). Normalerweise werden *Housekeeping* oder *Maintenance* Gen als endogene Referenz ausgewählt. Target- und Referenz-Gen werden von der gleichen Probe amplifiziert. Das ideale Referenz-Gen ist leicht zu detektieren, und seine Expression sollte unter verschiedenen experimentellen Bedingungen oder in verschiedenen Geweben nicht variieren.

Standardkurve

Proben mit bekannter Konzentration werden verwendet, um eine Standardkurve zu erstellen. Es besteht eine lineare, umgekehrt proportionale Beziehung zwischen dem Logarithmus der eingesetzten Menge und dem C_T -Wert. Ist die Ausgangsmenge bekannt, kann eine Standardkurve durch Auftragen des Logarithmus der Ausgangsmenge gegen die C_T -Werte erstellt werden. Die Standardkurve wird unter Verwendung einer Verdünnungsreihe von mindestens 5 verschiedenen Konzentrationen des Standards erzeugt.

10.5.3 Real-Time-Detection PCR

Die Detektion der Expression des MCSF (CSF1) nach Stimulation mit OxLDL in Mausperitonealmakrophagen erfolgte durch RTD-PCR mit dem LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Kit (Roche). Die Expression des Gens wurde im Vergleich zum Expressionsniveau des Referenz-Gens (18S rRNA) berechnet. Als Standard und Kalibrator wurde die cDNA der Lunge verwendet.

Die Ansätze für die RTD-PCR wurden in einer Kapillare wie folgt (Tab. 3.7) zusammenpipettiert. Jede Probe wurde mit zumindest 3 verschiedenen Verdünnungen $3 \times$ wiederholt. Für die Läufe der RTD-PCR im *LightCycler*[®] 2.0 (Roche) wurden verschiedene Programme (Tab. 3.8) gewählt. Die Amplifikationsprimer wurden von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) synthetisiert (s. Tab. 2.5). Die Annealingtemperatur richtet sich nach dem Temperatur-optimum des Primers.

Tabelle 3.7 RTD-PCR Ansatzschema für CSF1 und 18S rRNA

Komponente (Roche)	Volumen/Reaktion	Endkonzentration
10 x LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I	2 μ l	1 x
25 mM MgCl ₂	1,6 μ l	2 mM
forward primer	2 μ l	0,5 μ M
reverse primer	2 μ l	0,5 μ M
H ₂ O	10,4 μ l	
cDNA Probe	2 μ l	ca. 0,1 μ g/ μ l
Gesamt-Volumen	20 μ l	

Tabelle 3.8 RTD-PCR Programm für CSF1 und 18s rRNA

Programm	Zyklus	Schritt	Temp.	Zeit
Pre-Inkubation	1	Denaturierung	95°C	10 min
Amplifikation	45	Denaturierung	95°C	10 sec
		Annealing	56°C	10 sec
		Elongation	72°C	10 sec
Schmelzkurve	1	Annealing	65°C	15 sec
Kühlung	1	Kühlung	40°C	30 sec

10.6 Gelelektrophorese

PCR-Produkte und RNA können durch die Agarose-Gelelektrophorese anhand ihrer Größe identifiziert werden (s. Kap. III.1.4.2).

10.6.1 DNA-Gelelektrophorese

Nach dem RTD-PCR Lauf wurden die Reaktionskapillaren in 1,5 ml Reaktionsgefäß gelegt und kurz zentrifugiert. Danach wurden 20 µl des DNA-Produkts mit 6 µl 3 × Ladepuffer gemischt. Die DNA-Proben und der Marker wurden auf ein 1,2 % Agarosegel in einer Gelkammer (Wide Mini-sub Cell GT) aufgetragen und für ca. 60 min bei 100 V in TAE Laufpuffer laufen gelassen. Das Gel wurde anschließend unter einem UV-Transilluminator (Gel Doc XR) photographiert.

10.6.2 RNA-Gelelektrophorese

Die isolierte RNA wird zuerst mit Glyoxal und DMSO denaturiert, um Sekundärstrukturen aufzulösen und eine Degradation durch RNase A zu verhindern. Dazu wurde 5 µl RNA (< 30 µg) mit 10,8 µl Glyoxal-Mix gemischt und 1 h bei 50 °C inkubiert.

Um die RNasen aus der Gelkammer (Wide Mini-sub Cell GT) zu entfernen, wurde diese zuerst mit Wasser und Seife gewaschen. Dann wurde die Gelkammer 15 min mit 10 % H₂O₂, 5 min in DEPC-H₂O, 15 min mit 70 % EtOH und wieder 5 min mit DEPC-H₂O gespült.

Die glyoxalisierten RNA Proben wurden anzentrifugiert und mit 5 μ l Ladepuffer gemischt, dann auf ein 1 bis 1,4 %iges Agarosegel in der Gelkammer aufgetragen und für ca. 1 h bei 70 V in 10 mM Natriumphosphat-Puffer laufen gelassen.

Nach dem Gellauf wurde das Gel durch 15-minütige Inkubation mit 0,1 N NaOH deglyoxalisiert und durch 2 x 15 min Inkubation mit 3 M NaAc (pH 5,2) gesäuert. Dann wurde das Gel 15 min in EtBr-Lösung gefärbt, 15 min in aqua dest entfärbt und anschließend unter einem UV-Transilluminator (Gel Doc XR) ausgewertet.

11. Auswertung

Fotoaufnahmen der gefärbten Schnitte erfolgte am Mikroskop (Leica DM 2000) mittels des Programms Leica IM50 Image Manager.

Unter dem UV-Transilluminator (Biorad Gel Doc XR) wurden die Gele für die Elektrophorese ausgewertet. Sie können zudem fotografisch festgehalten werden und am PC bearbeitet werden (Quantity One 4.5, Biorad).

Die Filme für den Western Blot wurden mit dem Scanner (CanoScan 5600F) gescannt und die relative Intensität der Banden wurde mit Hilfe von Programm Quantity One 4.5 quantifiziert. Quantitative Ergebnisse der phosphorylierten ERK1/2, p38-MAPK, SAPK/JNK, MEK1/2, p90RSK und cPLA₂ wurden auf die nicht-phosphorylierten ERK1/2, p38 MAPK, SAPK/JNK, MEK1/2, RSK1/2/3 und cPLA₂ normalisiert.

Alle Daten wurden als Mittelwert \pm Standardabweichung von mindestens drei separaten Experimenten dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgt mittels des Zweistichproben-t-Tests. Statistische Unterschiede wurden als signifikant angenommen, wenn $p < 0,05$ ist.

IV. Ergebnisse

1. Etablierung des GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} DKO Mausmodells

Um einen Mausstamm zu generieren, der auf dem genetischen Hintergrund der ApoE-defizienz zusätzlich die Defizienz von GPx-1 trägt, wurden ApoE^{-/-} Männchen mit GPx-1^{-/-} Weibchen gekreuzt. In der F1 Generation erhielt man ApoE/GPx-1 heterozygote KO Mäuse. Diese Mäuse wurden weiter verpaart und ergaben in der F2 Generation zu einem Anteil von 1:16 den gewünschten ApoE/GPx-1 homozygoten DKO Genotyp (Abb. 4.1).

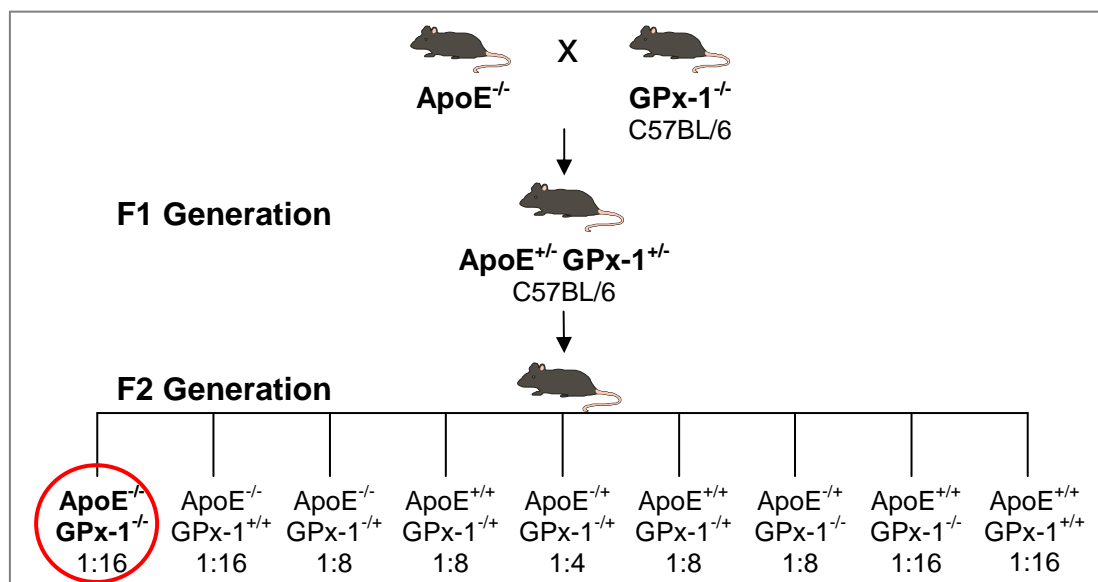


Abbildung 4.1 Kreuzungsschema für die Generierung der ApoE/GPx-1 homozygoten DKO Maus

Die Genotypisierung erfolgte mittels PCR der aus den Schwanzspitzen isolierten DNA. Die PCR mit den Primern für den Wildtyp (WT) und den ApoE sowie GPx-1 KO wurde jeweils in einem Ansatz durchgeführt. Für den GPx-1 WT erhielt man ein Fragment von 294 bp und für den KO ein 509 bp Fragment. Für ApoE erhielt man für den WT ein 255 bp und für den KO ein 245 bp Fragment. (s. Kap. III.1.4) Der GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} Mausstamm wurde durch Inzucht vermehrt. Der ApoE^{-/-} Mausstamm wurde als Kontrolle für alle Experimente verwendet.

2. Untersuchung der GPx-Isoformen im GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} Mausmodell

In Voruntersuchungen konnten wir zeigen, dass ein Mangel an GPx-1 die Atheroskleroseentwicklung in ApoE^{-/-} Mäusen beschleunigt und modifiziert. Die atherosklerotischen Läsionen in GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} Mäuse zeigten eine erhöhte Zellularität bei Makrophagen und glatten Muskelzellen.¹¹⁹ Aus diesem Grund wollten wir zuerst mittels *in situ*-Hybridisierung (ISH) klären, in welchen Zellen die verschiedenen Isoformen der GPx (GPx-1, GPx-2, GPx-3, GPx-4) in GPx-1 defizienten Mäusen und ApoE^{-/-} Kontrolltieren exprimiert werden. Auf diese Weise sollte einerseits überprüft werden, ob alle Protagonisten der Atherosklerose (z.B. Makrophagen, glatte Muskelzell) auch hinsichtlich der Expression der GPx-1 von Bedeutung sind, andererseits nach Hinweisen für eine evtl. gegenregulatorische Herauf- oder Herabregulation der übrigen GPx-Isoformen gesucht werden.

2.1 Atheroskleroseinduktion mittels einer fettreichen Western Type Diät

Das ApoE^{-/-} Atherosklerosemodell hat den Vorteil, dass unter Fütterung mit der fettreichen Western Typ Diät (WTD) relativ schnell größere Läsionen im Bereich des Aortenbogens und der Aorta *en face* entstehen. Nach 12 Wochen auf WTD enthalten die atherosklerotischen Läsionen von GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} Mäusen mehr Makrophagen als die der ApoE^{-/-} Mäuse, während nach 24 Wochen auf WTD die Makrophagenanteile in den Läsionen beider Mausgruppe ähnlich sind.¹¹⁹ Deshalb wurde die Atherosklerose im DKO und ApoE^{-/-} Mausmodell durch 6 bzw. 12 Wochen WTD induziert. Für die ISH wurden GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} Weibchen und ApoE^{-/-} Kontrollweibchen ab einem Alter von 8 Wochen für 6 und 12 Wochen auf WTD gesetzt

2.2 Lokalisierung der mRNA der GPx-Isoformen

Es wurde die Expression von verschiedenen Isoformen der GPx (GPx-1, GPx-2, GPx-3, GPx-4) während der Atheroskleroseentwicklung in den Aorten von GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} Mäusen und ApoE^{-/-} Kontrolltieren untersucht. Da geeignete paraffingängige Antikörper gegen sämtliche interessierende GPx-Isoformen nicht verfügbar sind, wurde zu diesem Zweck die *in situ*-Hybridisierung (ISH) etabliert.

2.2.1 GPx-1

GPx-1 mRNA wurde mittels ISH in Läsionen des Aortenbogens und des Aortensinus der ApoE^{-/-} Mäuse nach 6 und 12 Wochen WTD detektiert, um die zelluläre Herkunft der GPx-1 Genexpression in murinen atherosklerotischen Läsionen zu lokalisieren. Nach 6 (Abb. 4.2 A, oberes linkes Panel) und 12 Wochen (Abb. 4.2 C, oberes linkes Panel) auf WTD wurde eine starke GPx-1 mRNA Expression in ApoE^{-/-} Mäuse detektiert. In ApoE^{-/-} Mäusen wurde die GPx-1 überwiegend in Makrophagen, nicht aber in glatten Muskelzellen exprimiert. Wie erwartet, war GPx-1 in Aorten der GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} Mäuse nicht vorhanden (Abb. 4.2 A und C, unteres linkes Panel). Durch die Hybridisierung der Antisenseprobe zur murinen GPx-1 wurde die GPx-1 Expression in der Leber der ApoE^{-/-} Mäuse (Abb. 4.2 B, oberes linkes Panel), aber nicht in der Leber der GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} Mäuse (Abb. 4.2 B, unteres linkes Panel) nachgewiesen. In der Niere wurde GPx-1 in der Nierenrinde und im äußeren Nierenmark der ApoE^{-/-} Mäuse (Abb. 4.2 D, oberes linkes Panel), aber nicht in der Niere der GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} Mäuse (Abb. 4.2 D, unteres linkes Panel) exprimiert. Keine Hybridisierung wurde mit der Sensekontrolle für GPx-1 gefunden.

2.2.2 GPx-2

Weder in den Läsionen des Aortenbogens von GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} (Abb. 4.3 A, unteres linkes Panel) noch von ApoE^{-/-} Mäusen (Abb. 4.3 A, oberes linkes Panel) war nach 6 Wochen WTD eine spezifische Expression von GPx-2 mRNA nachweisbar. Die bräunliche Farbe ist unspezifischer Hintergrund. Kontrollschnitte zeigten die Expression von GPx-2 mRNA im Dünndarm von ApoE^{-/-} (Abb. 4.3 B, oberes linkes Panel) und GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} Mäusen (Abb. 4.3 B, unteres linkes Panel). Die Hybridisierung mit der Sensesonde für GPx-2 zeigte kein Signal (Abb. 4.3, rechte Panels).

2.2.3 GPx-3

GPx-3 wurde in Makrophagen und Adipozyten der Mauseorta von GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} Mäusen (Abb. 4.4 A, unteres linkes Panel) und von ApoE^{-/-} Kontrolltieren (Abb. 4.4 A, oberes linkes Panel) nach 6 Wochen WTD exprimiert, wobei in Makrophagen-reichen Läsionen GPx-3 sowohl bei den GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} Mäusen als auch bei den ApoE^{-/-} Kontrolltieren ähnlich exprimiert wurde. Verglichen mit der Läsion zeigte sich eine höhere Expression von GPx-3 mRNA im Fettgewebe beider GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-} Mäuse (Abb. 4.4 B, linke Panels). Es wurde keine Hybridisierung mit der entsprechenden Sensekontrolle für GPx-3 gefunden (Abb. 4.4, rechte Panels).

2.2.4 GPx-4

In den Aorten von GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} (Abb. 4.5 A, unteres linkes Panel) und ApoE^{-/-} Weibchen (Abb. 4.5 A, oberes linkes Panel) wurde nach 12 Wochen WTD eine auf Makrophagen und Adipozyten konzentrierte GPx-4 Expression nachgewiesen. Im Vergleich zur Läsion zeigte sich eine höhere Expression von GPx-4 mRNA im Fettgewebe sowohl bei GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} (Abb. 4.5 B, unteres linkes Panel) als auch bei ApoE^{-/-} Mäusen (Abb. 4.5 B, oberes linkes Panel), während in Makrophagen die GPx-4 eine stärkere Expression in den GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} Mäusen gegenüber den ApoE^{-/-} Kontrolltieren zeigte. In der Niere war die Expression der GPx-4 nur im Nierenmark der ApoE^{-/-} Mäuse nachweisbar (Abb. 4.5 C, linkes Panel). Für GPx-4 zeigte sich keine spezifische Hybridisierung mit der Sensesonde (Abb. 4.5, rechte Panele).

Zusammenfassung der ISH-Ergebnisse: GPx-1 wurde vorwiegend in Makrophagen der atherosklerotischen Läsion von ApoE^{-/-} Mäusen exprimiert, während GPx-3 und GPx-4 sowohl in Makrophagen als auch im Fettgewebe der Mauseaorta von GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-} Mäusen exprimiert wurden. Insofern liegt es nahe, zumindest im Modell der GPx-1-defizienten Maus für Zellkulturversuche vorrangig Monozyten bzw. Makrophagen und nicht etwa glatte Muskelzellen zu verwenden.

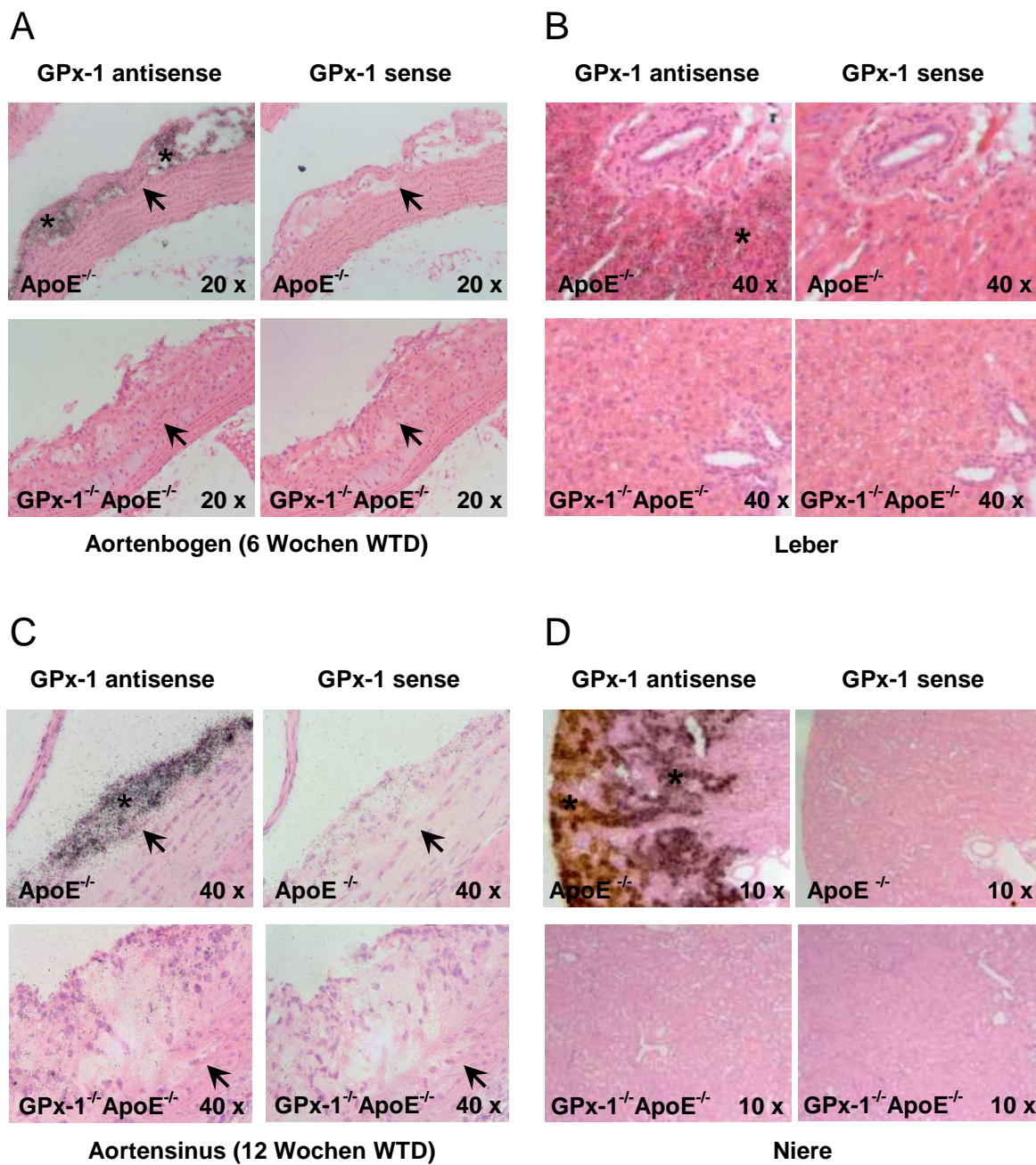


Abbildung 4.2 Detektion der GPx-1 mRNA Expression mittels *in situ*-Hybridisierung in GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-} Mäusen. Links: anti-sense Sonde, Rechts: sense Sonde. Expression von GPx-1 in Makrophagenreichen Läsionen des Aortenbogens (**A, oberes linkes Panel, ***) und des Aortensinus (**C, oberes linkes Panel, ***) von ApoE^{-/-} Mäusen nach 6 (**A**) bzw. 12 (**C**) Wochen WTD. Die Aortengewebe von GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} Mäusen zeigen keine Expression von GPx-1 mRNA (**A, C, unteres linkes Panel**). Die Grenze zwischen Intima und Media ist durch Pfeilspitzen markiert. Das Gefäßlumen befindet sich jeweils oben links. GPx-1 mRNA ist nachweisbar mittels Hybridisierung der antisense Sonde auf der Leber von ApoE^{-/-} Mäusen (**B, oberes linkes Panel, ***), nicht aber von GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} Mäusen (**B, untere Panels**). In der Niere ist GPx-1 mRNA in der Nierenrinde und im äußeren Nierenmark von ApoE^{-/-} Mäusen (**D, oberes, linkes Panel, ***), nicht aber von GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} Mäusen exprimiert (**D, unteres linkes Panel**). Kein Signal wird mit der entsprechenden Sensekontrolle für GPx-1 gefunden.

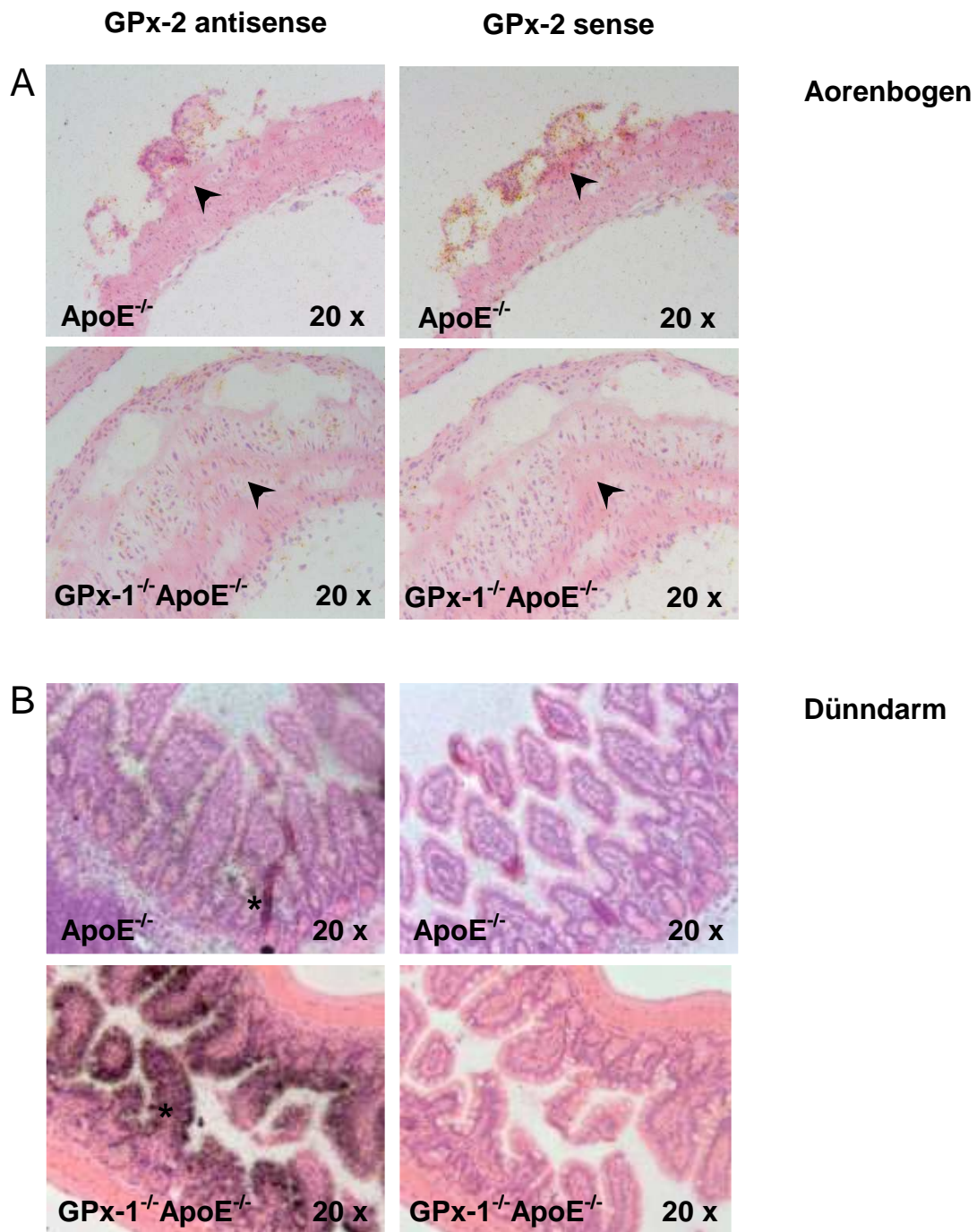


Abbildung 4.3 Detektion der GPx-2 mRNA Expression mittels *in situ*-Hybridisierung in GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-} Mäusen. Links: anti-sense Sonde, Rechts: sense Sonde. Eine spezifische Expression von GPx-2 ist weder in den Läsionen des Aortenbogens von ApoE^{-/-} (**A, oberes linkes Panel**) noch von GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} Mäusen (**A, unteres linkes Panel**) nach 6 Wochen Haltung auf WTD nachweisbar. Das Gefäßlumen befindet sich oben links. Die Grenze zwischen Intima und Media ist durch Pfeilspitzen markiert. Kontrollschnitte zeigen die Expression von GPx-2 im Dünndarm (**B, ***) von ApoE^{-/-} (**B, oberes linkes Panel**) und GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} Mäusen (**B, unteres linkes Panel**). Für GPx-2 zeigt sich keine Hybridisierung mit der sense Sonde.

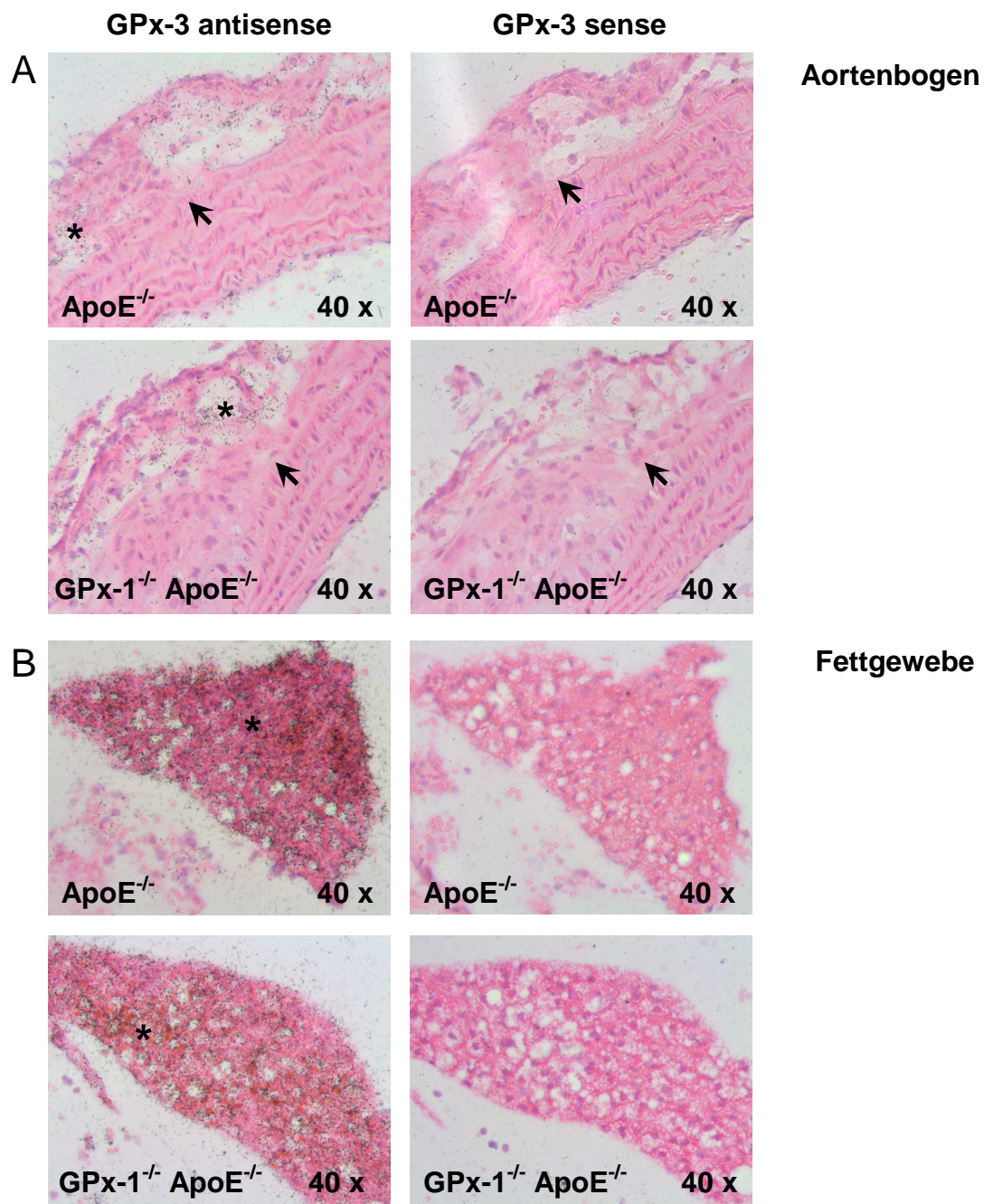


Abbildung 4.4 Detektion der GPx-3 mRNA Expression mittels *in situ*-Hybridisierung in GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-} Mäusen. Links: anti-sense Sonde, Rechts: sense Sonde. In Aorten wurde die Expression von GPx-3 in Makrophagen-reichen Läsionen des Aortenbogens (*) der ApoE^{-/-} (**A, oberes linkes Panel**) und GPx-1^{-/-} ApoE^{-/-} (**A, unteres linkes Panel**) Mäuse nach 6 Wochen WTD nachgewiesen. Außerdem wird GPx-3 mRNA im Fettgewebe (*) der ApoE^{-/-} (**B, oberes linkes Panel**) und GPx-1^{-/-} ApoE^{-/-} Mäuse (**B, unteres linkes Panel**) exprimiert. Das Gefäßlumen befindet sich oben links. Die Grenze zwischen Intima und Media ist durch Pfeilspitzen markiert. Die Hybridisierung mit der Sensesonde für GPx-3 zeigt kein Signal.

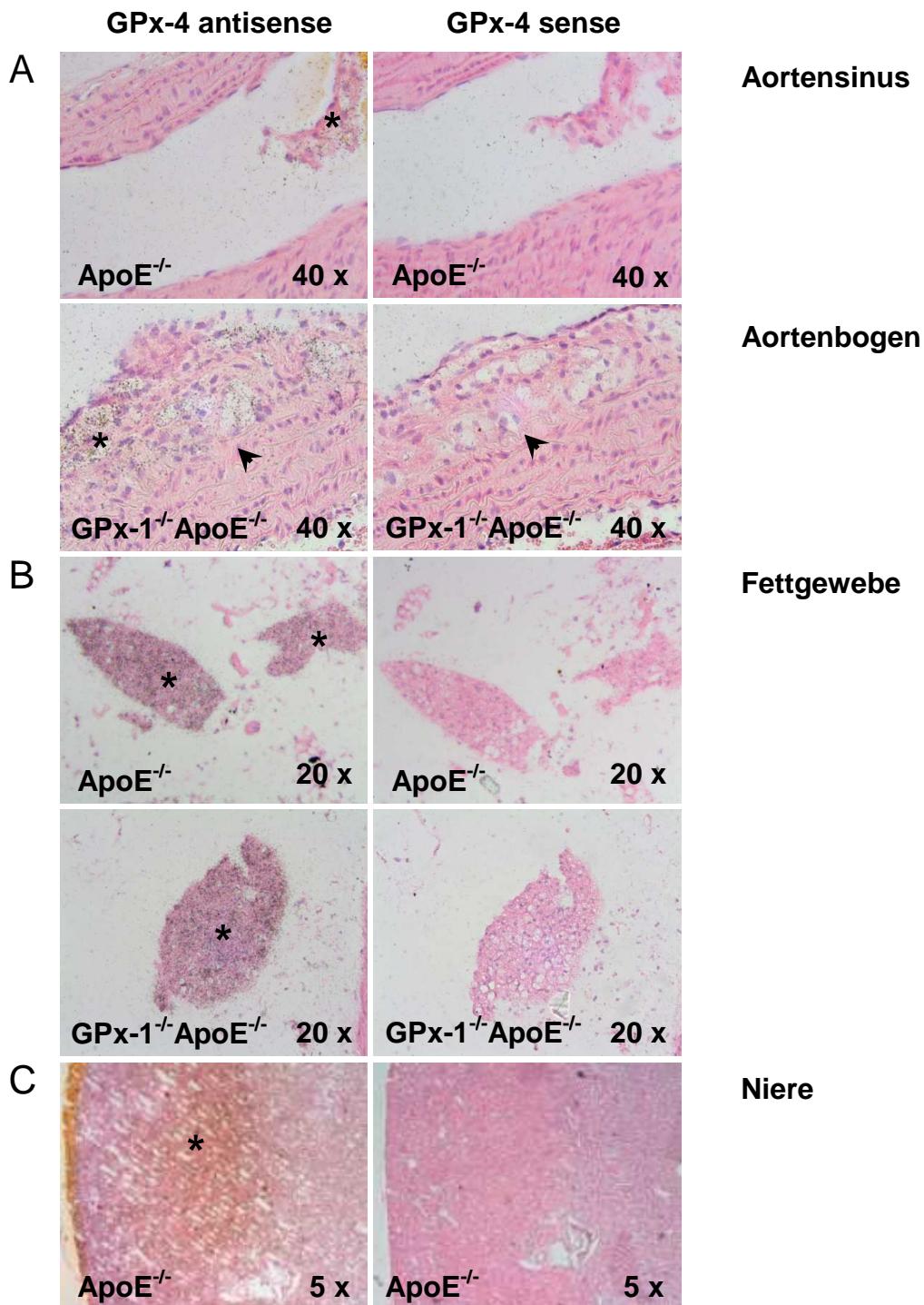


Abbildung 4.5 Detektion der GPx-4 mRNA Expression mittels *in situ*-Hybridisierung in GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-} Mäusen. Links: anti-sense Sonde, Rechts: sense Sonde. In Aorten wurde die Expression von GPx-4 in Makrophagen-reichen Läsionen des Aortenbogens und des Aortensinus (*) von ApoE^{-/-} (A, oberes linkes Panel) und GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} (A, unteres linkes Panel) Mäusen nach 12 Wochen Haltung auf WTD nachgewiesen. Das Gefäßlumen befindet sich oben links. Die Grenze zwischen Intima und Media ist durch Pfeilspitzen markiert. GPx-4 mRNA wurde auch im Fettgewebe (*) der ApoE^{-/-} (B, oberes linkes Panel) und GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} Mäuse (B, unteres linkes Panel) gefunden. GPx-4 mRNA wurde durch Hybridisierung mit der antisense Sonde auf der Niere von ApoE^{-/-} (C, linkes Panel) kontrolliert. In der Niere wurde GPx-4 im Nierenmark der ApoE^{-/-} Mäuse (C, *) exprimiert. Für GPx-4 zeigt sich keine spezifische Hybridisierung mit der Sensekontrolle.

3. In vitro Untersuchungen an isolierten Peritonealmakrophagen

Unsere Voruntersuchungen haben gezeigt, dass ein Mangel an GPx-1 die Entwicklung der Atherosklerose in ApoE^{-/-} Mäusen beschleunigt und modifiziert. Außerdem zeichnen sich die atherosklerotischen Läsionen der DKO Mäuse innerhalb des Aortenbogens durch eine erhöhte Zellularität und einen geringeren Gehalt an extrazellulärer Matrix nach 12 Wochen WTD aus.¹¹⁹ Um dem Zusammenhang zwischen diesem Phänotyp und der Defizienz von GPx-1 nachzugehen, wurden verschiedene funktionelle Untersuchungen an den Mäusen durchgeführt, die auf normaler Haltdungsdiät gehalten wurden (jeweils 5 Mäuse pro Mausstamm).

3.1 *Der Einfluss der GPx-1 Defizienz auf die durch modifiziertes LDL induzierte Schaumzellbildung in Peritonealmakrophagen*

Die Akkumulation von Cholesterin in Makrophagen und die nachfolgende Schaumzellbildung sind ein Kennzeichen der frühen atherosklerotischen Läsion.¹²⁷ Makrophagen sind in der Lage, LDL zu oxidieren.¹²⁸ Dieser Prozess ist abhängig vom antioxidativen System in Makrophagen, bei dem GPx und Glutathion (GSH) eine wichtige Rolle in der Zell-vermittelten Oxidation von LDL spielen.¹²⁹ Deshalb sollte untersucht werden, ob die Makrophagen durch eine erhöhte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies in GPx-1 defizienten Mäusen vermehrt Lipoprotein aufnehmen.

3.1.1 **Der Effekt der GPx-1 Defizienz auf die OxLDL induzierte Schaumzellbildung**

Die oxidative Modifikation von LDL führt zur erhöhten Aufnahme von modifizierten Lipoproteinen über die Scavenger-Rezeptoren in Makrophagen und begünstigt so die Akkumulation von Cholesterin in Zellen und damit die Schaumzellbildung.^{130, 131} In atherosklerotischen Läsionen akkumulieren sowohl Cholesterinester-Tröpfchen als auch unverestertes, freies Cholesterin.

Um den Einfluss der GPx-1 Defizienz auf die OxLDL-induzierte Schaumzellbildung zu untersuchen, wurden die isolierten Mausperitonealmakrophagen mit 10 ng/ml MCSF für 3 Tage differenziert, und dann mit 5 und 10 µg/ml OxLDL für 24 h inkubiert. Die Darstellung der **Schaumzellen** erfolgte mittels der *Oil-Red-O* (ORO) Färbung. Die sich

dabei in den Zellen ansammelnden Lipidtröpfchen lassen sich mit ORO anfärben. ORO ist ein so genanntes Lysochrom, ein lipophiler Farbstoff, der sich an Fette anlagert. Es ist spezifisch für Triglyzeride und Cholesterinester, unverestertes Cholesterin färbt es dagegen nicht.¹³²

Die ORO-Färbung zeigte die Akkumulation der intrazellulären Lipidtröpfchen bzw. die Schaumzellbildung. Peritonealmakrophagen von GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} Mäusen zeigten eine qualitative Tendenz zu umfangreicheren ORO-positiven Fetttröpfchen im Vergleich zu ApoE^{-/-} Mäusen nach 24 h Inkubation mit 5 µg/ml bzw. 10 µg/ml OxLDL. Die Schaumzellen enthielten meist eine Vielzahl von kleinen roten Tropfen je Zelle. (Abb. 4.6 A)

Die OxLDL-induzierte Schaumzellbildung wurde durch quantitative Analyse des zellulären Cholesteringehalts bestätigt. Die **Cholesterinaufnahme** von Mausperitonealmakrophagen nach 24 h Inkubation mit 5 µg/ml bzw. 10 µg/ml OxLDL wurde mittels der Gesamtcholesterinbestimmung der Zelllysate überprüft.

Ein erhöhter Cholesterinspiegel wurde nach Stimulation mit 5 µg/ml bzw. 10 µg/ml OxLDL detektiert ($p < 0,05$, Abb. 4.6 B, *). Die Behandlung mit 10 µg/ml OxLDL führte zu einer signifikanten Erhöhung des gesamten Cholesteringehaltes in Makrophagen der GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} Mäuse im Vergleich zu ApoE^{-/-} Kontrollmäusen ($p < 0,05$), während die Inkubation mit 5 µg/ml OxLDL lediglich einen statistisch nicht signifikanten höheren Cholesteringehalt in Makrophagen der GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} Mäuse zu Folge hatte (Abb. 4.6 B). Diese Ergebnisse zeigten, dass der Mangel an GPx-1 die OxLDL-induzierte Schaumzellbildung verstärkt, was mit einem erhöhten zellulären Lipidspiegel in Peritonealmakrophagen der ApoE^{-/-} Mäuse verbunden ist.

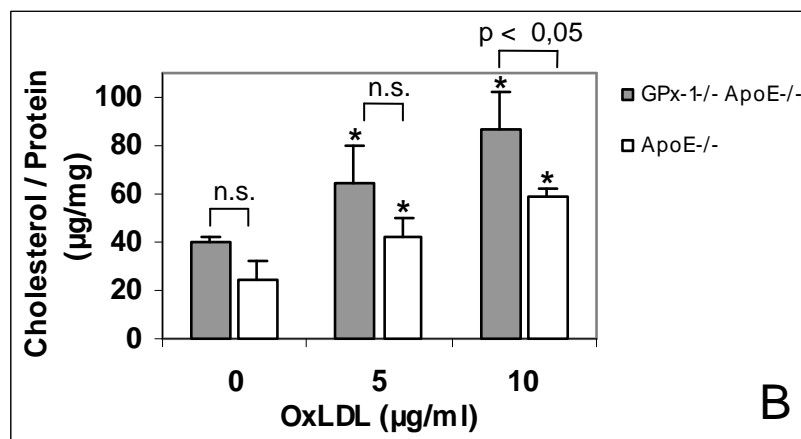
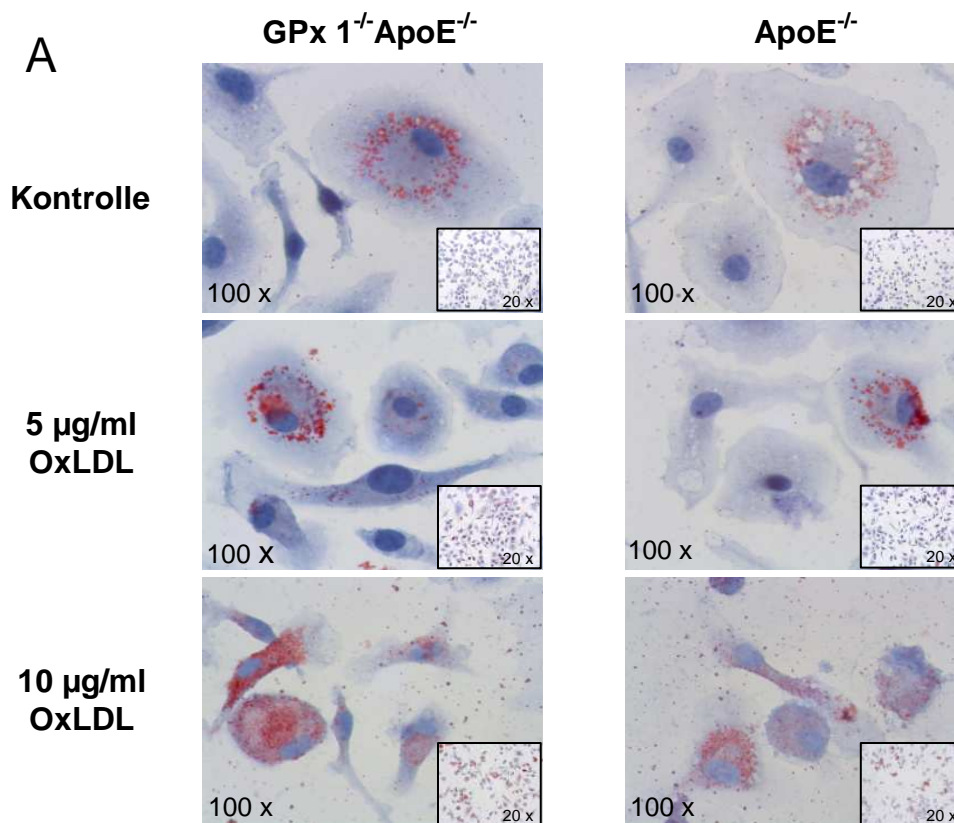


Abbildung 4.6 Der Effekt der GPx-1 Defizienz auf die OxLDL-induzierte Schaumzellbildung. Nach 3 Tagen Differenzierung mit MCSF wurden die Mausperitonealmakrophagen mit 5 bzw. 10 µg/ml OxLDL für 24h inkubiert. Die mit 4 % PFA fixierten Zellen wurden mit Öl-Rot-O gefärbt und fotografiert. **A**, Repräsentative Beispiele der ORO-Färbung nach Transformation der Peritonealmakrophagen zu Schaumzellen (Vergrößerung x 100, Insert, x 20). **B**, Quantitative Bestimmung des zellulären Cholesteringehaltes in Peritonealmakrophagen. Nach der Inkubation mit OxLDL wurden die Zellen lysiert und homogenisiert und der Gesamtcholesteringehalt durch Fluoreszenzmessung quantifiziert. Die Ergebnisse werden als Gesamtcholesterin bezogen auf den zellulären Proteingehalt dargestellt (*Mean ± SD*, n = 4). (*) zeigt einen statistischen signifikanten Unterschied in Vergleich mit den unbehandelten Zellen innerhalb der gleichen Mausgruppe ($p < 0,05$).

3.1.2 Der Effekt der GPx-1 Defizienz auf E-LDL induzierte Schaumzellbildung

Es wurde bereits gezeigt, dass E-LDL die Schaumzellbildung von Makrophagen induziert.¹³³ E-LDL ist der stärkste in der Läsion nachweisbare Schaumzellbildner.¹² Zusätzlich weisen Makrophagen nach Behandlung mit E-LDL einen erhöhten Cholesteringehalt auf.¹³⁴

Peritonealmakrophagen von GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} Mäusen und ApoE^{-/-} Kontrolltiere zeigten eine starke Ansammlung großer, roter Lipidtröpfchen nach 24 h Behandlung mit 5 µg/ml oder 10 µg/ml E-LDL (Abb. 4.7). Wir vermuten, dass ein Mangel an antioxidativen GPx-1 die Aufnahme des enzymatischen modifizierten Lipoproteins und die Umwandlung der Peritonealmakrophagen der ApoE^{-/-} Mäuse zu Schaumzellen verstärkt.

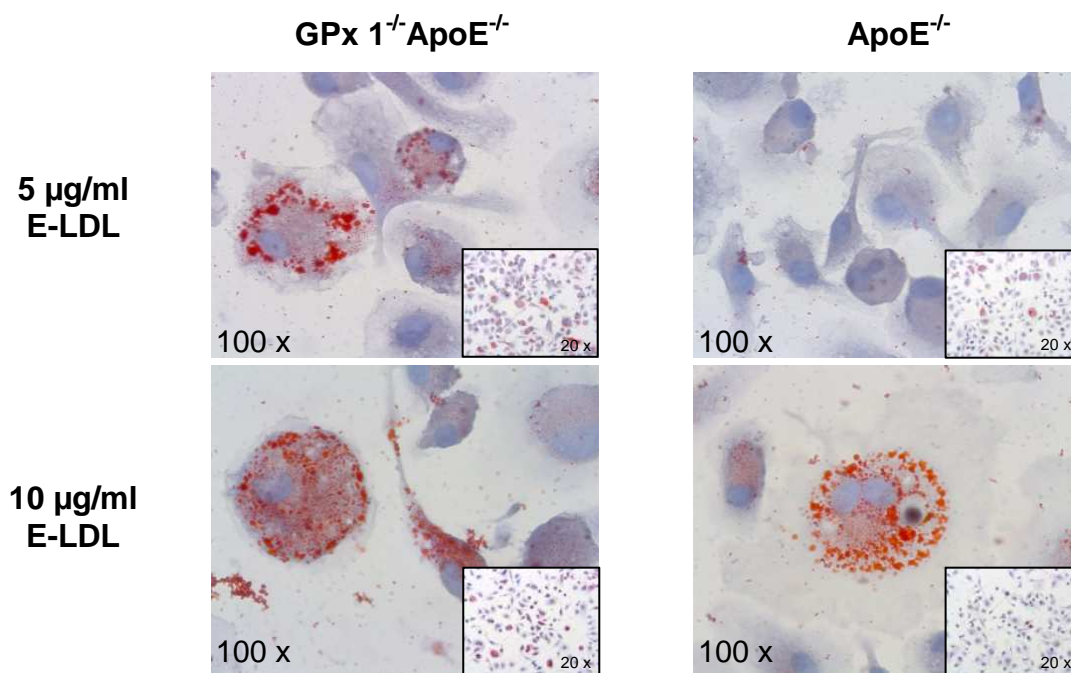


Abbildung 4.7 Effekt der GPx-1 Defizienz auf die E-LDL-induzierte Schaumzellbildung. Nach 3 Tagen Differenzierung mit MCSF wurden die Mausperitonealmakrophagen mit 5 bzw. 10 µg/ml E-LDL, resp. für 24h inkubiert. Die mit 4 % PFA fixierten Zellen wurden mit Öl-Rot-O gefärbt und fotografiert. Repräsentative Beispiele der ORO-Färbung nach Transformation der Peritonealmakrophagen zu Schaumzellen (Vergrößerung x 100, Insert, x 20).

3.2 Immunzytologische Färbung der Peritonealmakrophagen

Um nachzuprüfen, ob es sich bei den isolierten Zellen um Makrophagen handelte, wurden die Makrophagen auf Chamber Slide Objektträger ausplattiert und eine immunzytologische Färbung mit einem anti-F4/80 Antikörpern durchgeführt. Bei F4/80 handelt es sich um ein Oberflächenantigen, das spezifisch auf aktivierten Makrophagen exprimiert wurde.

Die Abbildung 4.8 zeigt die Färbung der Makrophagen mit dem anti-F4/80 Antikörper sowie mit einem anti-CD3 Kontrollantikörper. Es zeigte sich, dass die Färbung spezifisch für den F4/80 Antikörper ist und man deshalb davon ausgehen kann, dass es sich bei den isolierten Zellen um Makrophagen handelt.

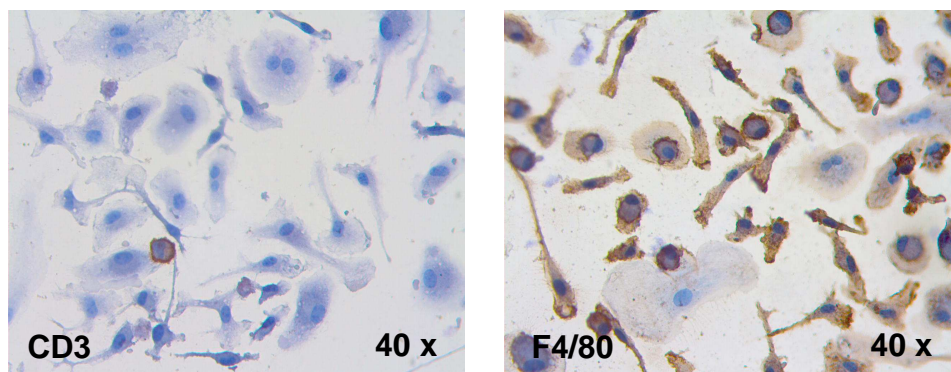


Abbildung 4.8 Immunzytologische Färbung von isolierten Peritonealmakrophagen mit anti-F4/80 Antikörper. Isolierte Peritonealmakrophagen wurden mit 4% PFA fixiert und mit einem Ratte anti-F4/80 Antikörper gefärbt (rechtes Panel, braun). Als Negativkontrolle wurde ein Hase anti-CD3 Antikörper verwendet, die braun gefärbten Zellen sind Lymphozyten (linkes Panel, braun).

3.3 Der Einfluss verschiedener Stimuli auf die Proliferation von Makrophagen

Es ist bekannt, dass durch die Hemmung von GPx-1 die Konzentration von H_2O_2 erhöht ist. Erhöhter oxidativer Stress induziert häufig eine erhöhte Proliferationsrate in verschiedenen Zelltypen. Vor allem für H_2O_2 ist bekannt, dass es die Proliferation induzieren kann.¹³⁵ Auch in atherosklerotischen Plaques könnte dieses Phänomen eine große Rolle spielen. In unserer vorliegende Studie wiesen die Plaques innerhalb des Aortenbogens der GPx-1/ApoE DKO Mäuse eine erhöhte Zellularität mit einer Zunahme der Makrophagenanteile in frühen atherosklerotischen Läsionen gegenüber den Läsionen der Kontrolltiere auf.¹¹⁹

Für die erhöhten Makrophagenanteile in der Läsion stellt sich die Frage, ob vermehrt Makrophagen in die Läsion eingewandert sind oder ob aufgrund erhöhten oxidativen

Stresses in der Läsion die Proliferation der Makrophagen vermehrt ist. Aus diesem Grund wurde die Proliferationsrate von isolierten Peritonealmakrophagen nach Stimulation mit verschiedenen Agenzien ermittelt. Bei den Mäusen wurde durch Injektion mit Thioglykollat 3 Tage zuvor eine milde Peritonitis induziert. Der Nachweis der Proliferation der Peritonealmakrophagen erfolgte mittels eines BrdU Proliferationsassay, bei dem in proliferierenden Zellen in der S-Phase BrdU statt Thymidin in die DNA eingebaut wurde, das dann von einem anti-BrdU Antikörper detektiert werden kann. Der Versuch wurde an 20 Wochen alten DKO und ApoE^{-/-} Mäusen mit normaler Haltungsdiät (jeweils 5 pro Gruppe) durchgeführt. (Abb. 4.9)

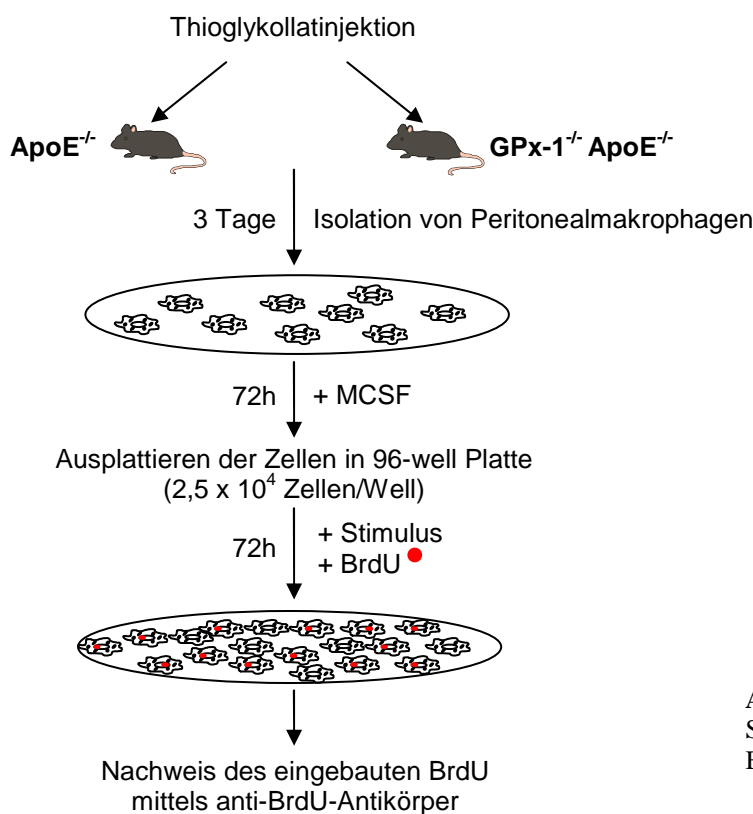


Abbildung 4.9
Schema zur Durchführung des BrdU Proliferationsassays

3.3.1 MCSF fördert die Proliferation der Makrophagen

Die Proliferationsrate aus isolierten Peritonealmakrophagen der GPx-1 defizienten Mäuse und WT-Mäuse nach Inkubation mit *Macrophage-Colony-Stimulating Factor* (MCSF) wurde ermittelt. Abbildung 4.10 zeigt das Ergebnis des Proliferationsassays. Es zeigte sich, dass MCSF die Proliferation der Makrophagen sowohl von GPx-1^{-/-} ApoE^{-/-} als auch ApoE^{-/-} Mäusen signifikant erhöht ($p < 0,05$, Abb. 4.10 A, *). Außerdem zeigten Peritoneal-makrophagen von GPx-1^{-/-} ApoE^{-/-} Mäusen eine erhöhte Proliferationsrate

gegenüber den Makrophagen der ApoE^{-/-} Kontrollmäuse ($p < 0,05$). Ähnlich induziert MCSF signifikant die Proliferation der Makrophagen von GPx-1^{-/-} und B6/J Mäusen ($p < 0,05$, Abb. 4.10 B, *). Makrophagen von GPx-1^{-/-} Mäusen zeigten dabei eine stärkere BrdU-Aufnahme als Makrophagen von B6/J Kontrollmäusen ($p < 0,05$). Wir vermuten, dass MCSF die Proliferation der Makrophagen induziert und ein erhöhter oxidativer Stress bei GPx-1 Defizienz die MCSF-induzierte Makrophagenproliferation verstärkt.

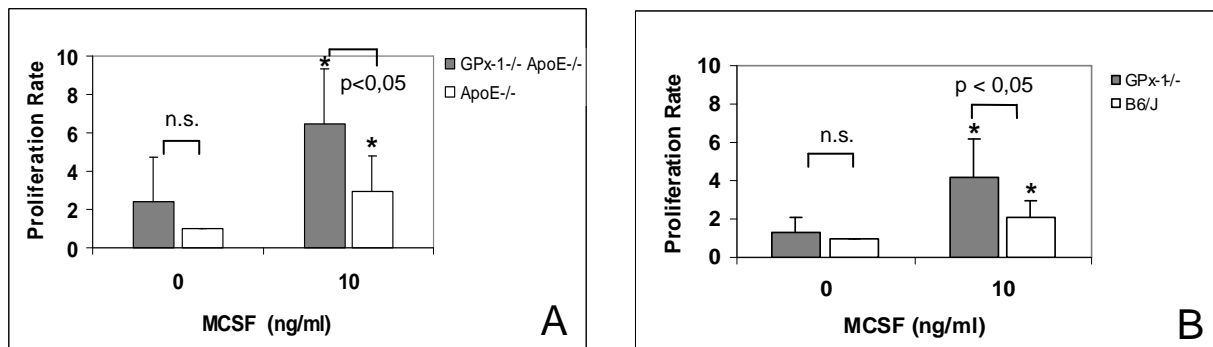


Abbildung 4.10 MCSF induzierte Makrophagenproliferation. Nach Differenzierung von isolierten Peritonealmakrophagen der GPx-1^{-/-} ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-} Mäuse (A) oder GPx-1^{-/-} und B6/J Mäuse (B) mit 10 ng/ml MCSF für 3 Tage wurden die resultierenden Makrophagen ($2,5 \times 10^4$ Zellen/Well) mit MCSF und BrdU für 48 h inkubiert. Danach wurde die proliferative Aktivität mit einem BrdU-basierten Chemilumineszenz-Assay ermittelt und als Proliferationsrate im Vergleich zur Kontrolle (Zellen der WT-Kontrollmaus ohne Behandlung mit MCSF) ermittelt ($Mean \pm SD$, $n = 5$). (*) zeigt signifikanter Unterschied zwischen den behandelten Zellen und den Zellen ohne Behandlung mit MCSF innerhalb der gleichen Mausgruppen ($p < 0,05$).

In unserer Studie wurde auch ein SOD2^{+/-} Mausmodell verwendet, dessen SOD2-Defizienz nicht mit einer Veränderung der Konzentration von H₂O₂ einhergeht. Es wurden keine unterschiedlichen Proliferationsraten der Peritonealmakrophagen zwischen der SOD2^{+/-} Mäuse und der B6/J Kontrollmäuse detektiert. (Abb. 4.11)

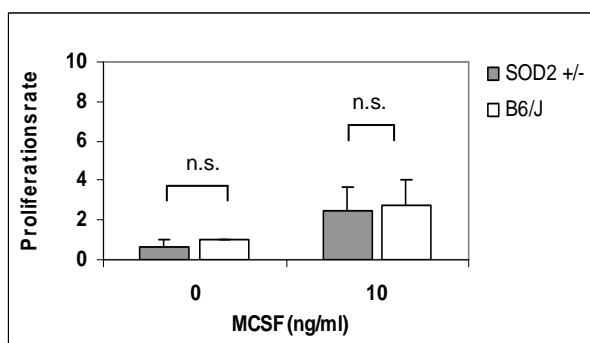


Abbildung 4.11 MCSF induzierte Makrophagenproliferation. Nach Differenzierung von isolierten Peritonealmakrophagen der entsprechenden Mäuse mit 10 ng/ml MCSF für 3 Tage wurden die resultierenden Makrophagen ($2,5 \times 10^4$ Zellen) mit MCSF und BrdU für 48h inkubiert. Danach wurde die Proliferationsaktivität mit einem BrdU-basierten Chemilumineszenz-Assay ermittelt und als Proliferationsrate im Vergleich zur Kontrolle (Zellen der WT-Maus ohne Behandlung mit MCSF) dargestellt ($Mean \pm SD$,

3.3.2 Der Einfluss von OxLDL auf die Proliferation von Makrophagen

Die Stimulation der Zellen mit 10 bzw. 20 $\mu\text{g/ml}$ OxLDL hatte einen signifikanten Einfluss auf die Proliferation der Makrophagen von GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} Mäusen (Abb. 4.12 A, *). Kein proliferativer Effekt hingegen wurde bei der Stimulation der Peritonealmakrophagen von ApoE^{-/-} (Abb. 4.12 A), GPx-1^{-/-} und B6/J Mäusen (Abb. 4.12 B) mit OxLDL beobachtet. Allerdings zeigten sowohl die Makrophagen von GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} Mäusen gegenüber ApoE^{-/-} Kontrollmäusen (Abb. 4.12 A), als auch die Makrophagen von GPx-1^{-/-} Mäusen gegenüber dem Wildtyp (Abb. 4.12 B) einen erhöhten Einbau von BrdU in die DNA ($p < 0,05$).

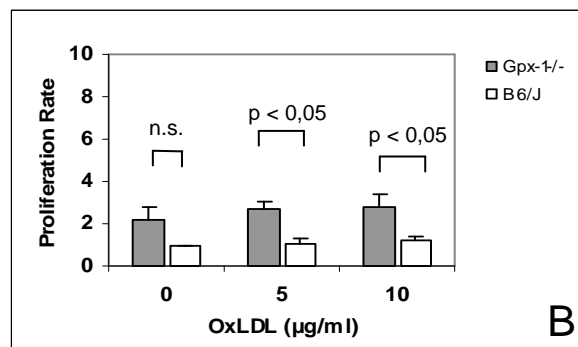
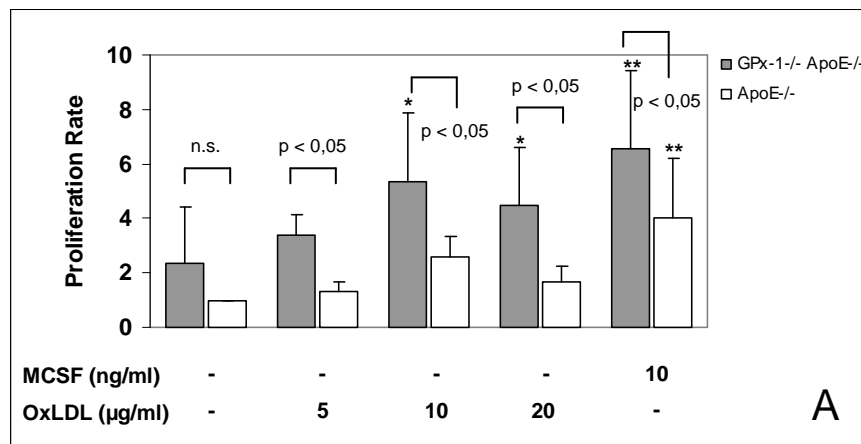


Abbildung 4.12 OxLDL induzierte Makrophagenproliferation. Nach Differenzierung von isolierten Peritonealmakrophagen der GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-} Mäuse (A) oder GPx-1^{-/-} und B6/J Mäuse (B) mit 10 ng/ml MCSF für 3 Tage wurden die resultierenden Makrophagen ($2,5 \times 10^4$ Zellen/Well) mit 5, 10 bzw. 20 $\mu\text{g/ml}$ OxLDL oder 10ng/ml MCSF und BrdU für 48 h inkubiert. Danach wurde die proliferative Aktivität mit einem BrdU-basierten Chemilumineszenz-Assay ermittelt und als Proliferationsrate im Vergleich zur Kontrolle (Zellen der WT-Kontrollmaus ohne Behandlung mit OxLDL) ermittelt ($Mean \pm SD$, $n = 4$).

3.4 Der Einfluss von MAPK-Inhibitoren auf die Proliferation von Makrophagen

MAPK Familien (ERK, p38, JNK/SAPK) spielen eine große Rolle in der Regulierung der zellulären Proliferation, Differenzierung, Entwicklung, Migration und Apoptose als Antwort auf verschiedene extrazelluläre Stimuli.^{136, 137} (Abb. 4.13)

Es ist bereits bekannt, dass ROS die MAPK-Signaltransduktionswege in verschiedenen Zelltypen aktivieren kann.¹³⁸⁻¹⁴⁰ Unsere Untersuchungen konzentrierten sich auf die Rolle der MAPK-Aktivierung im Rahmen der Proliferation und Apoptose der Makrophagen und den Einfluss von GPx-1 auf die MAPK-Signaltransduktionswege in Makrophagen.

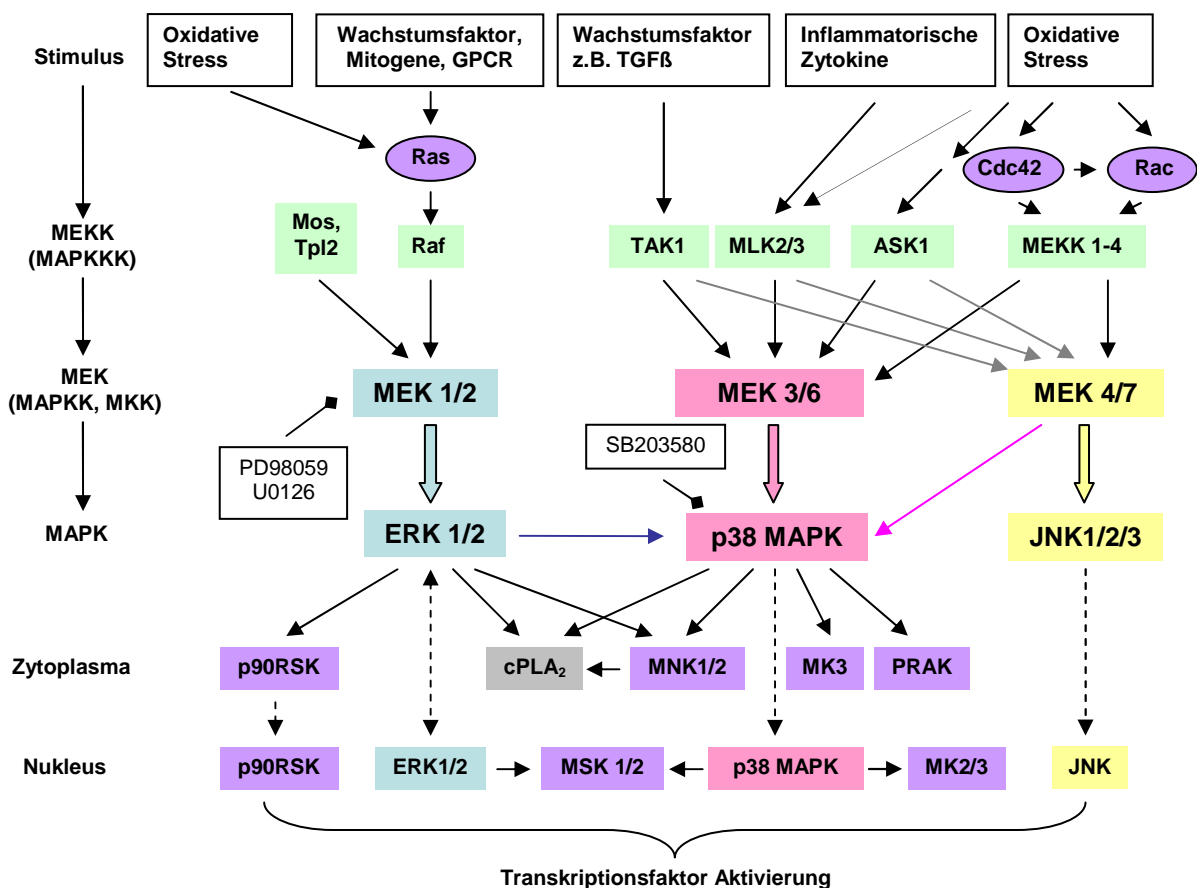


Abbildung 4.13 MAPK Signaltransduktionswege: MAPK werden durch verschiedene extrazelluläre Stimuli aktiviert und vermitteln eine Reihe mehrstufiger Signaltransduktionswege vom Zytosol zum Nucleus. **ERK1/2:** extracellular signal-related kinases, **p38 MAPK:** p38 mitogen-activated protein kinase, **JNK:** c-Jun-N-terminal kinase, **GPCR:** G-Protein gekoppelter Rezeptor, **TAK1:** TGF-β-activated kinase 1, **ASK1:** Apoptosis signal regulated kinase 1, **MLK:** Mixed-Lineage Kinase 3, **p90RSK:** p90 ribosomal S6 kinase, **MNK1/2:** MAPK interacting serine/threonine kinase, **MSK:** mitogen- and stress-activated protein kinase, **cPLA₂:** cytoplasmic phospholipase A2, **MK:** MAPK-activated protein kinase, **PD98059:** MEK1/2-Inhibitor, **U0126:** MEK1/2-Inhibitor, **SB203580:** p38-Inhibitor

3.4.1 Die Effekte von MAPK-Inhibitoren auf die MCSF oder OxLDL-induzierte Makrophagenproliferation

MEK1/2 ist die *upstream* ERK-Kinase, die ERK1/2 aktivieren kann. PD98059 und U0126 können die Aktivität von MEK1/2 selektiv inhibieren, dadurch wird die Aktivierung von ERK1/2 gehemmt oder verhindert. Das Pyridinylimidazol SB203580 bindet mit hoher Affinität an die p38-MAPK nahe der ATP-bindenden Stelle, wodurch die p38-MAPK inaktiv wird. Um die Beeinflussung von MAPK-Signalwegen wie z.B. ERK, p38 auf die MCSF oder OxLDL-induzierte Makrophagenproliferation zu erklären, wurden Peritonealmakrophagen von GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-} Mäusen zuerst mit den MEK1/2-Inhibitoren PD98059 und U0126 oder dem ATP-kompetitiven p38-Inhibitor SB203580 vorinkubiert und dann die BrdU-Aufnahme in Makrophagen ermittelt.

Die Vorbehandlung mit PD98059 inhibierte signifikant die MCSF ($p < 0,01$, Abb. 4.14 A links) und OxLDL- ($p < 0,05$, Abb. 4.14 A rechts) induzierte Proliferation der Peritonealmakrophagen von GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} Mäusen. U0126 inhibierte lediglich die MCSF- ($p < 0,05$, Abb. 4.14 A links), nicht aber OxLDL- (Abb. 4.14 A rechts) induzierte Proliferation der Makrophagen in GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} Mäusen signifikant. In Gegensatz zum MEK1/2-Inhibitor erhöhte SB203580 sowohl die MCSF- ($p < 0,05$, Abb. 4,13 A link) als auch die OxLDL- ($p < 0,05$, Abb. 4.14 A recht) induzierte Proliferation der Peritonealmakrophagen von GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} Mäuse signifikant. Die Vorbehandlung mit PD98059, nicht aber U0126 inhibierte signifikant die MCSF-induzierte Proliferation der Peritonealmakrophagen in ApoE^{-/-} Kontrollmäusen ($p < 0,01$, Abb. 4.14 B link), während kein Inhibitionseffekt durch PD98059 und U0126 auf die OxLDL-induzierte Proliferation der Makrophagen der ApoE^{-/-} Mäuse zu verzeichnen war (Abb. 4.14 B rechts). SB203580 stimulierte die MCSF ($p < 0,05$, Abb. 4,14 B links) und OxLDL- ($p < 0,05$, Abb. 4.14 B rechts) induzierte Proliferation der Peritonealmakrophagen von ApoE^{-/-} Mäuse signifikant.

SB203580 erhöhte die Proliferationsrate der Peritonealmakrophagen von GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} Mäuse ($p < 0,05$, Abb. 4.15 links) und ApoE^{-/-} Kontrollmäuse signifikant ($p < 0,01$, Abb. 4.15 rechts). Wir vermuten, dass die Inhibition der p38-Aktivierung zur vermehrten Proliferation oder verringerten Apoptose der Makrophagen führt.

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Aktivierung des ERK-Signalwegs an der Proliferation der Makrophagen beteiligt ist. Die MCSF/OxLDL-induzierte Proliferation der Peritonealmakrophagen der GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} Mäuse ist sehr empfindlich gegenüber der Inhibition des ERK-Signalwegs. In Gegensatz dazu fördert die Inhibition der p38-MAPK die MCSF und OxLDL-induzierten Proliferation der Makrophagen.

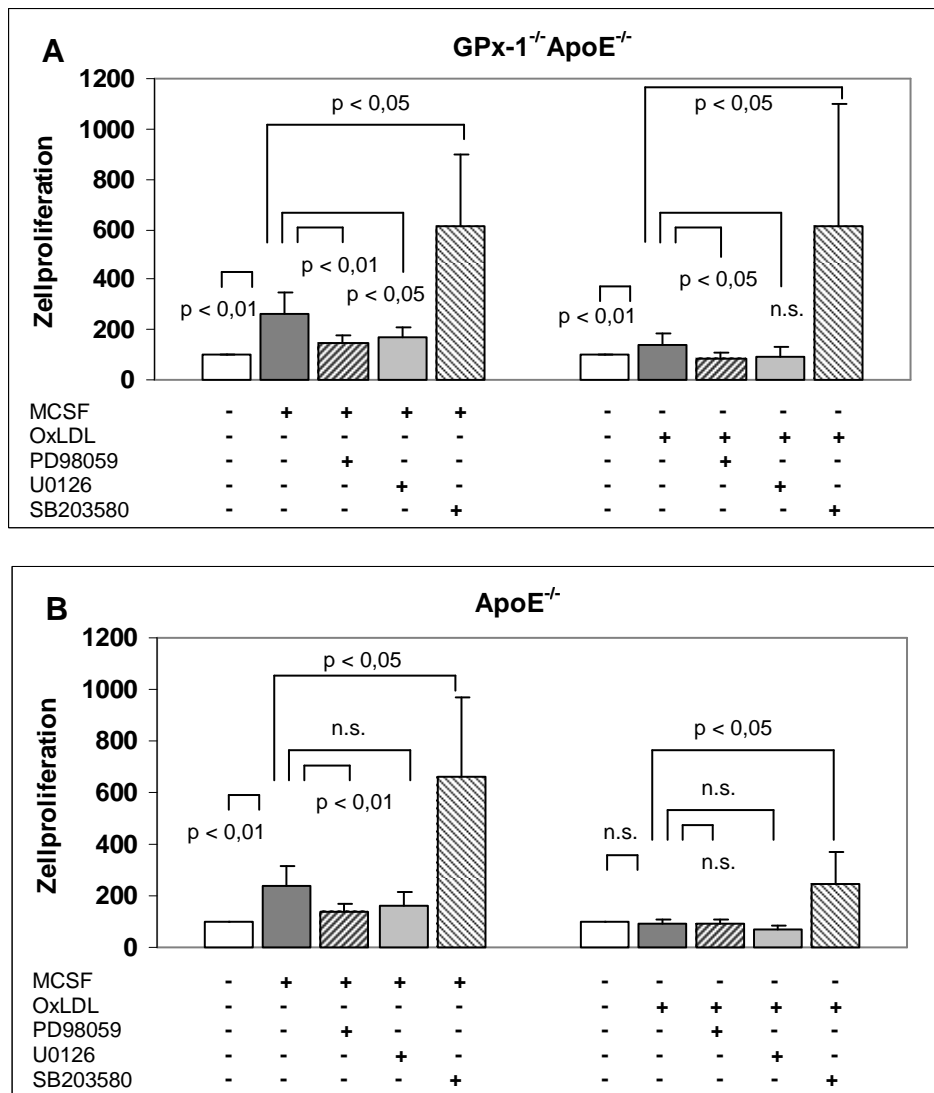


Abbildung 4.14 Einfluss der MAPK-Inhibitoren auf die MCSF- oder OxLDL-induzierte Proliferation der Mausperitonealmakrophagen. Nach 3 Tagen Differenzierung von isolierten Peritonealmakrophagen wurden die Makrophagen ($2,5 \times 10^4$ Zellen/Well) von GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} Mäusen (**A**) und ApoE^{-/-} Kontrollmäusen (**B**) mit 75 μ M PD98059, 15 μ M U0126 oder 15 μ M SB203580 für 1h vorinkubiert und dann mit 10 ng/ml MCSF (**links**) oder 10 μ g/ml OxLDL (**rechts**) und BrdU für 48 h inkubiert. Danach wurde die Proliferationsrate mit einem BrdU-basierten Chemilumineszenz-Assay ermittelt und prozentual im Vergleich zur proliferativen Aktivität der unbehandelten Zellen (100 %) dargestellt (*Mean \pm SD*, n = 3-5).

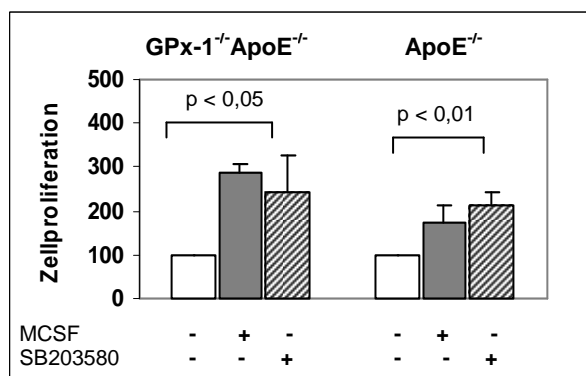


Abbildung 4.15 Einfluss des p38-Inhibitors SB203580 auf die Makrophageproliferation. Nach 3 Tagen Differenzierung von isolierten Peritonealmakrophagen wurden die Makrophagen ($2,5 \times 10^4$ Zellen/Well) von GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} Mäusen (**links**) und ApoE^{-/-} Kontrollmäusen (**rechts**) mit 15 μ M SB203580 für 1h vorinkubiert und dann mit BrdU für 48 h inkubiert. Danach wurde die Proliferations-rate mit einem BrdU-basierten Chemilumineszenz-Assay ermittelt und prozentual im Vergleich zur proliferativen Aktivität der unbehandelten Zellen (100 %) dargestellt (*Mean \pm SD*, n=3).

3.4.2 Die Effekte von p38-Inhibitoren auf die MCSF- oder OxLDL-induzierte Kaspase-3/7 Aktivität in Mausperitonealmakrophagen

Die Asparaginsäure-spezifische Cysteinprotease (Kaspase) Familie spielt eine entscheidende Rolle bei der Apoptose in Säugetierzellen. Die p38-MAPK vermittelt die Aktivierung der Kaspase-9 und Kaspase-3 durch verschiedene Stimuli.^{141, 142} Um den Einfluss des p38-MAPK Signalweg auf die MCSF oder OxLDL-induzierte Apoptose der Makrophagen zu erklären, wurden der Effekt von SB203580 auf die Kaspase-3/7 Aktivität in Makrophagen von GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} Mäuse (Abb. 4.16, links) und ApoE^{-/-} Kontrollmäuse (Abb. 4.16, rechts) untersucht. In Makrophagen wurde einen Inhibitionseffekt vom SB203580 auf die Kaspase-3/7 Aktivität beobachtet ($p < 0,01$), während MCSF die Kaspase-3/7 Aktivität signifikant erhöhte ($p < 0,05$, *). OxLDL hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivierung der Kaspasen 3 und 7. SB203580 inhibierte sowohl die MCSF- ($p < 0,05$) als auch die OxLDL- ($p < 0,01$) induzierte Kaspase-3/7 Aktivität in Peritonealmakrophagen beider Mausgruppen signifikant.

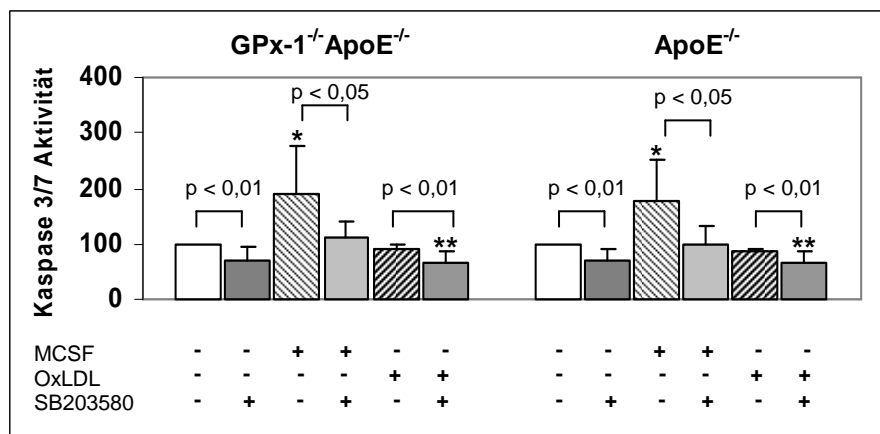


Abbildung 4.16 Einfluss des p38-MAPK Inhibitors SB203580 auf die Kaspase-3/7 Aktivität in Peritonealmakrophagen. Nach 3 Tagen Differenzierung wurden die Peritonealmakrophagen ($2,5 \times 10^4$ Zellen/Well) von GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} Mäusen (**links**) und ApoE^{-/-} Kontrollmäusen (**rechts**) mit $15 \mu\text{M}$ SB203580 für 1 h vorinkubiert und dann mit 10 ng/ml MCSF oder $10 \mu\text{g/ml}$ OxLDL für 48 h inkubiert. Danach wurde die Kaspase-3/7 Aktivität ermittelt und prozentual im Vergleich zur Aktivität der unbehandelten Zellen (100 %) dargestellt ($\text{Mean} \pm \text{SD}$, $n=5$). (*) zeigt signifikanter Unterschied zwischen den behandelten Zellen und den unbehandelten Zellen innerhalb der gleichen Mausgruppen (*, $p < 0,05$ und **, $p < 0,01$).

3.5 Die Wirkung von MCSF auf die MAPK-Signaltransduktion in isolierten Peritonealmakrophagen

Unsere Ergebnisse zeigten, dass die Beteiligung von MAPK eine Voraussetzung für die MCSF-induzierte Proliferation der Makrophagen ist. Ob das MCSF die Aktivierung der MAPK in Makrophagen der GPx-1 defizienten ApoE^{-/-} Mäuse beeinflussen kann, ist noch nicht geklärt. Deshalb wurden nach der Induktion mit MCSF die Phosphorylierungsniveaus von ERK, p38-MAPK und SAPK/JNK in Makrophagen mittels Western Blot und entsprechenden Antikörpern nachgewiesen.

3.5.1 Peritonealmakrophagen der DKO Mäuse zeigen eine erhöhte Signaltransduktion des ERK1/2-Pathways nach Stimulation mit MCSF

Wir haben das Phosphorylierungsniveau von **ERK1/2** in Peritonealmakrophagen mittels Antikörper gegen phosphoryliertes ERK und ERK bestimmt. MCSF induzierte signifikant die ERK1/2-Phosphorylierung in Makrophagen von GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} Mäusen im Vergleich zu ApoE^{-/-} Kontrollmäusen nach 5 min Inkubation mit MCSF ($p < 0,05$, Abb. 4.17 A). Diese Wirkung ging nach 15 min wieder auf das Ausgangsniveau zurück.

In der ERK-Kaskade wurde ERK1/2 durch **MEK1/2** aktiviert und kann dann **p90RSK** wiederum aktivieren. Weitere Untersuchungen erfolgten daher mit Hilfe der Antikörper gegen phosphorylierte MEK1/2, phosphorylierte p90RSK und MEK sowie p90RSK. Die maximalen Niveaus der phosphorylierten MEK (Abb. 4.17 B, *) und p90RSK (Abb. 4.17 C, *) wurden nach 5 Min Stimulation mit MCSF ermittelt und waren in Makrophagen von GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} Mäuse deutlich höher im Vergleich zu ApoE^{-/-} Mäusen ($p < 0,05$).

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass MCSF eine verstärkte, zeitabhängige Phosphorylierung von ERK1/2, MEK1/2 sowie p90RSK in den Makrophagen der GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} Mäuse induziert und die Signaltransduktion durch MEK/ERK-Kaskade vermittelt.

3.5.2 Kein signifikanter Einfluss von MCSF auf die p38-MAPK und SAPK/JNK Signalwege in Peritonealmakrophagen

Die Phosphorylierungsniveaus von **p38-MAPK** und **SAPK/JNK** in Peritonealmakrophagen wurden mittels Western Blot mit den Antikörpern gegen phosphorylierte p38-MAPK, phosphorylierte SAPK/JNK sowie p38-MAPK, SAPK/JNK quantifiziert. Im Gegensatz zum ERK erhöhte MCSF die Phosphorylierung von p38-MAPK (Abb. 4.18 A) und SAPK/JNK (Abb. 4.18 B) nicht signifikant, die Phosphorylierungsniveaus waren in den Peritonealmakrophagen der GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-} Mäuse ähnlich. Diese

Ergebnisse zeigten, dass MCSF keine signifikante Wirkung auf die Aktivierung der p38-MAPK und SAPK/JNK Signalwegen in Mausperitonealmakrophagen hatte.

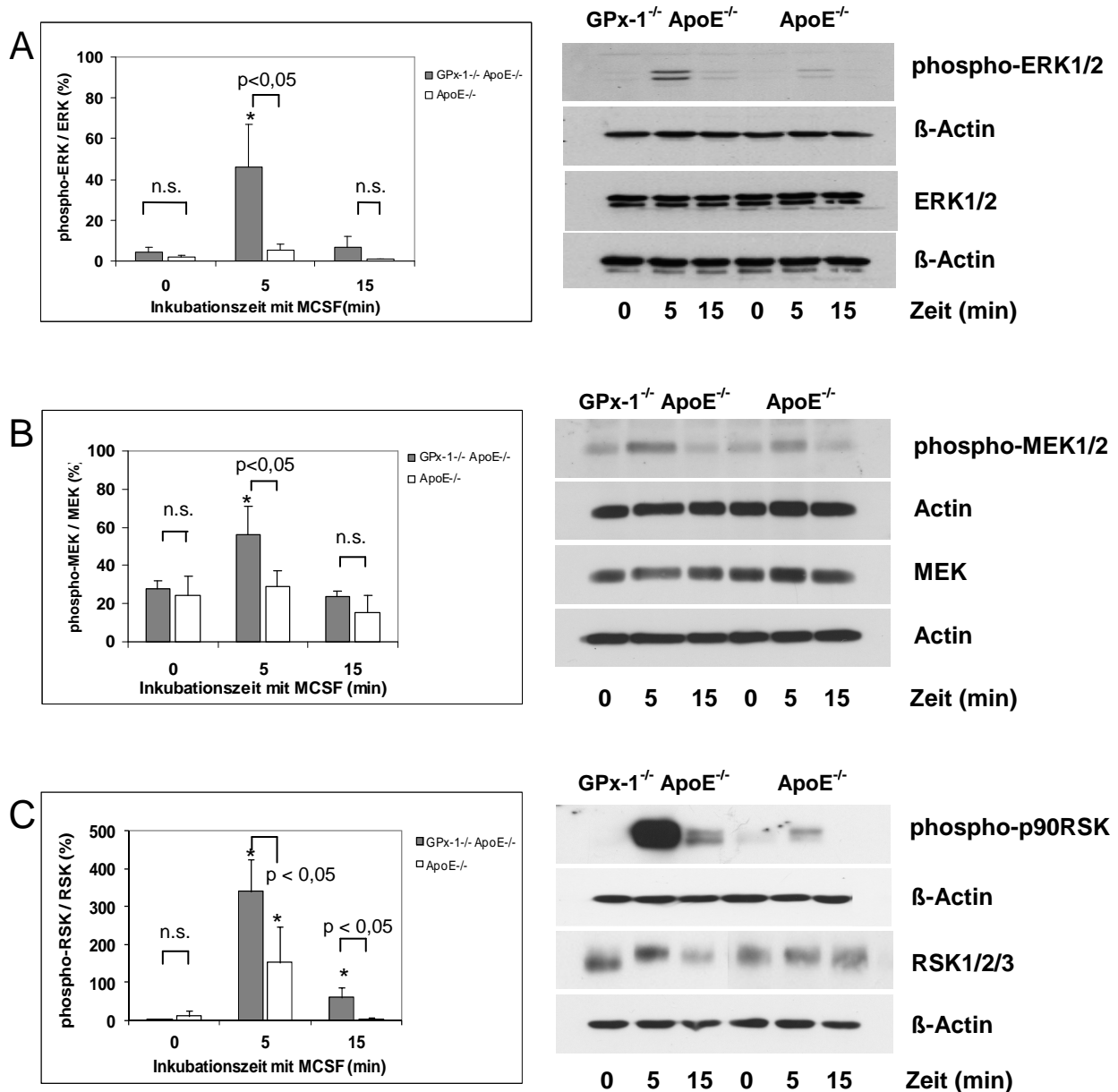


Abbildung 4.17 Western Blot-Analyse des ERK-Signalwegs in MCSF-induzierten Peritonealmakrophagen. Nach 3 Tagen Differenzierung mit MCSF wurden die Peritonealmakrophagen erneut mit 10 ng/ml MCSF für 5 und 15 min inkubiert. Zelluläres Protein wurde extrahiert und Proteinproben (0,4 mg/ml) mittels Western Blot mit spezifischen anti-phospho-ERK1/2 oder anti-ERK1/2 (A), anti-phospho-MEK1/2 oder anti-MEK1/2 (B) bzw. anti-phospho-p90RSK oder anti-RSK1/2/3 (C) Antikörpern analysiert (**rechte Panels**: repräsentative Experimente). β -Actin oder Actin wurde als Kontrolle verwendet. Die Banden wurden densitometrisch ausgewertet und als Intensität des phosphorylierten ERK1/2 (A), MEK1/2 (B) bzw. p90RSK (C) relativ zur Intensität des nicht-phosphorylierten ERK1/2, MEK1/2 bzw. p90RSK angegeben (**linke Panels**, $Mean \pm SD$, $n = 3$). (*) zeigt statistisch signifikante Unterschiede im Vergleich mit den unbehandelten Zellen innerhalb der gleichen Mausgruppe ($p < 0,05$).

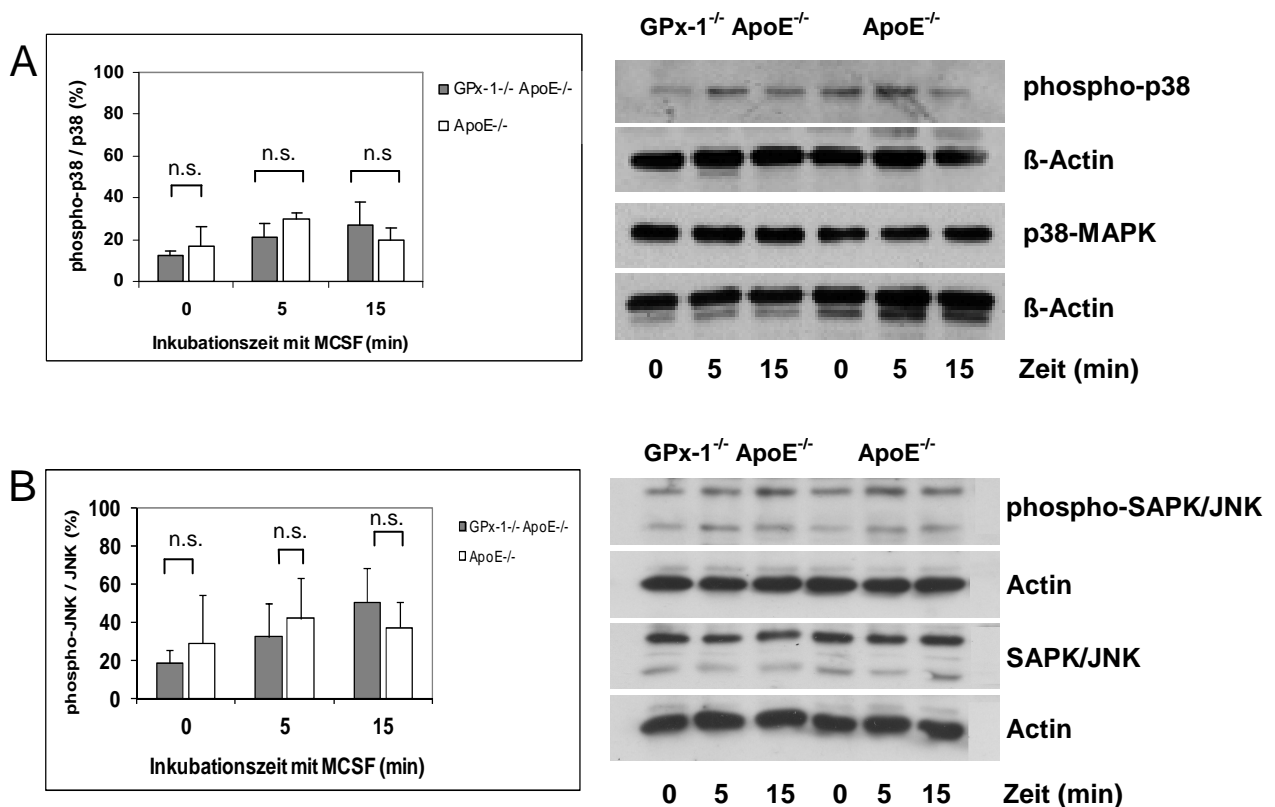


Abbildung 4.18 Western Blot Analyse der p38-MAPK und SAPK/JNK Aktivierung in MCSF-induzierten Peritonealmakrophagen. Nach 3 Tagen Differenzierung mit MCSF wurden die Peritonealmakrophagen wieder mit 10 ng/ml MCSF für 5 und 15 min inkubiert. Zelluläres Protein wurde extrahiert und Proteinproben (0.4 mg/ml) mittels Western Blot mit spezifischen anti-phospho-p38 oder anti-p38-MAPK (**A**) und anti-phospho-SAPK/JNK oder anti-SAPK/JNK (**B**) Antikörpern analysiert (**rechte Panels**: repräsentative Experimente). β -Actin oder Actin wurde als Kontrolle verwendet. Die Banden wurden densitometrisch ausgewertet und als Intensität des phosphorylierten p38 (**A**) und SAPK/JNK (**B**) relativ zur Intensität des nicht-phosphorylierten p38 und SAPK/JNK angegeben (**linke Panels**, $Mean \pm SD$, $n = 3$).

cPLA₂ ist ein wichtiges *downstream*-Substrat der aktivierten ERK und p38-Kinasen bei der MAPK-Signaltransduktion. Die Produktion der Archidonsäure (AA) durch cPLA₂ ist ein wichtiger Regulator der Monozyten/Makrophagen NADPH-Oxidase Aktivität. cPLA₂ spielt eine wichtige Rolle in der α_2 -Makroglobulin-induzierten Mitogenese und Proliferation der Mausperitonealmakrophagen.¹⁴³ Da aktivierte ERK1/2 und p38-MAPK in der Lage sind, cPLA₂ zu phosphorylieren, wurde die Wirkung von MCSF auf das Phosphorylierungsniveau von cPLA₂ mittels Antikörpern gegen phosphorylierte-cPLA₂ und cPLA₂ geprüft. MCSF induzierte die cPLA₂-Phosphorylierung in Makrophagen der beiden Mausgruppen nach 1 h, 14 h und 24 h signifikant ($p < 0,05$, Abb. 4.19 B, C, *). Allerdings konnte kein Unterschied zwischen GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} Mäusen und ApoE^{-/-} Kontrolltieren beobachtet werden. (Abb. 4.19)

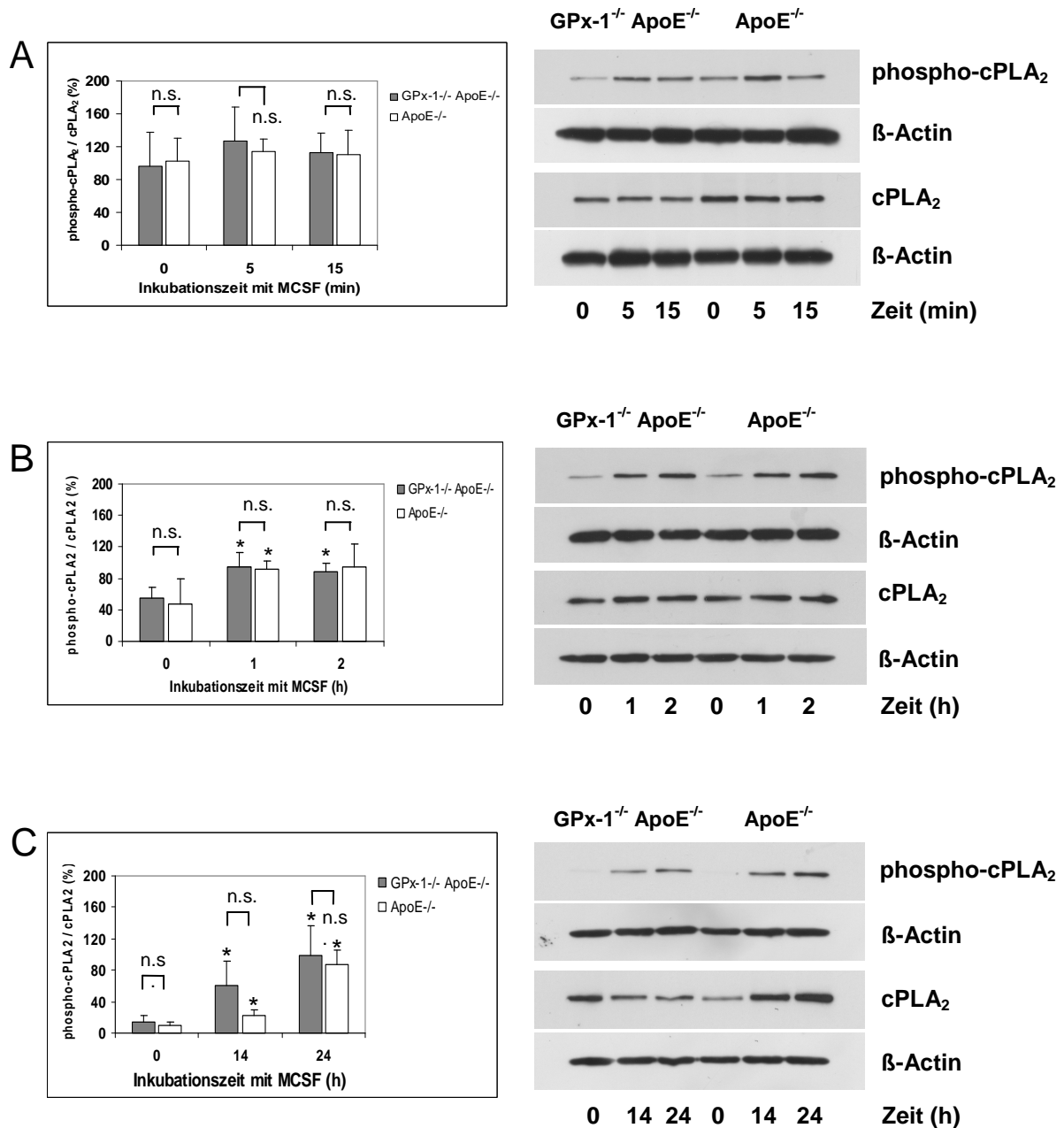


Abbildung 4.19 Western Blot Analyse der cPLA₂ Aktivierung in MCSF-induzierten Peritonealmakrophagen. Nach 3 Tagen Differenzierung wurden die Peritonealmakrophagen mit 10 ng/ml MCSF für 5 und 15 min (A), 1 und 2 h (B) bzw. 14 und 24 h (C) inkubiert. Zelluläres Protein wurde extrahiert und Proteinproben (0,4 mg/ml) mittels Western Blot mit spezifischen anti-phospho-cPLA₂ oder anti-cPLA₂ Antikörpern analysiert (rechts: repräsentative Experimente). β -Actin wurde als Kontrolle verwendet. Die Banden wurden densitometrisch ausgewertet und als Intensität des phosphorylierten cPLA₂ relativ zur Intensität des nicht-phosphorylierten cPLA₂ angegeben (links, *Mean* \pm *SD*, *n* = 3 - 5). (*) zeigt einen statistischen signifikanten Unterschied in Vergleich zu den unbehandelten Zellen innerhalb der gleichen Mausgruppe (*p* < 0,05).

3.5.3 Der Einfluss des p38-MAPK Inhibitors auf die MCSF-induzierte ERK- und JNK-Signaltransduktion in isolierten Peritonealmakrophagen

Nach 1 h Vorinkubation mit SB203580 und 5 min Stimulation mit MCSF wurde eine signifikante Erhöhung der ERK1/2-Phosphorylierung in Peritonealmakrophagen der beiden Mausgruppen nachgewiesen ($p < 0,01$, Abb. 4.20 A, **). Zusätzlich wurde ERK1/2 in Makrophagen der ApoE^{-/-} Mäuse im Vergleich zu GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} Tiere stärker phosphoryliert ($p < 0,01$, Abb. 4.20 A). SB203580 erhöhte das Phosphorylierungsniveau der JNK nach Stimulation mit MCSF gegenüber unbehandelten Zellen in ApoE^{-/-} Mäusen ($p < 0,01$, *), nicht aber in GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} Mäusen. (Abb. 4.20 B) Allerdings wurde kein Unterschied bei der JNK-Aktivierung nach der Behandlung mit SB203580 zwischen GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-} Mäusen beobachtet. Die Ergebnisse zeigten, dass die Inhibition von p38-MAPK zur verstärkten Phosphorylierung von ERK und JNK in den Makrophagen der ApoE^{-/-} Mäuse führt.

3.6 Die Wirkung von OxLDL auf die MAPK Signaltransduktion in isolierten Peritonealmakrophagen

Es ist bekannt, dass MAPK in Makrophagen durch OxLDL aktiviert werden.¹⁴⁴ Auf diesen Grund sollte der Effekt von GPx-1 auf die OxLDL-induzierte MAPK-Signaltransduktion in Mausperitonealmakrophagen geklärt werden. Nach 5 min Inkubation mit OxLDL (10 µg/ml) waren die Phosphorylierungsniveaus von MEK1/2 ($p < 0,05$, Abb. 4.21, A), ERK1/2 ($p < 0,05$, Abb. 4.21, B) und p90RSK ($p < 0,01$, Abb. 4.21, C) in Makrophagen der GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} Mäuse höher als in ApoE^{-/-} Kontrolltieren, unabhängig davon, ob die Zellen mit MCSF inkubiert wurden oder nicht. Allerdings war die Wirkung von OxLDL auf die Aktivierung der MEK1/2 und ERK1/2 nicht signifikant. Eine deutlich erhöhte Phosphorylierung der p90RSK nach Stimulation mit OxLDL wurde in GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} Mäuse beobachtet ($p < 0,05$, *). OxLDL und MCSF zusammen phosphorylierten ERK1/2 ($p < 0,05$, Abb. 4.21, B, *) und p90RSK ($p < 0,05$, Abb. 4.21, C, *) in Makrophagen der beiden Mausgruppen signifikant, während die Aktivität der MEK1/2 nur in GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} Mäuse deutlich erhöht war ($p < 0,01$, Abb. 4.21, A, **).

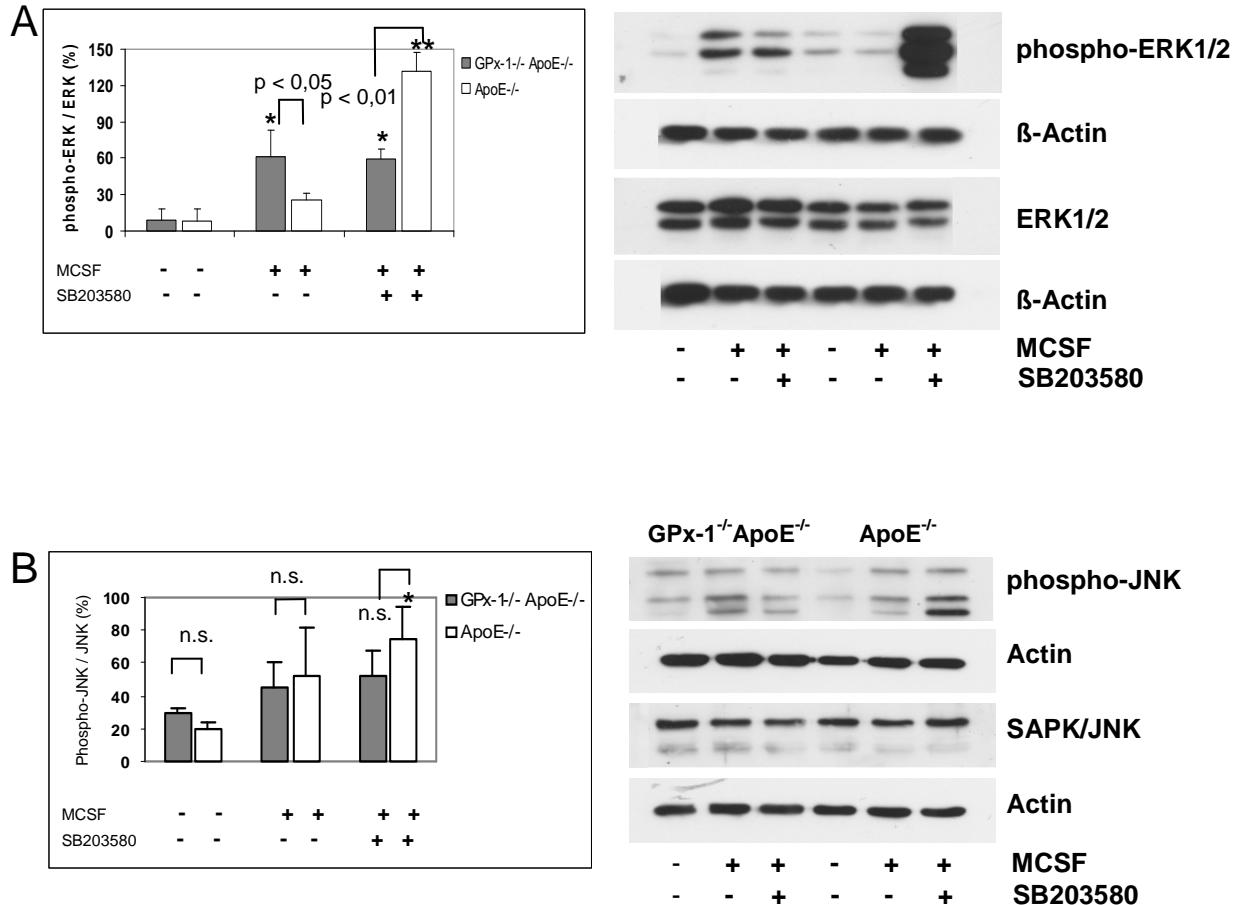


Abbildung 4.20 Western Blot Analyse des Einflusses des p38-Inhibitors auf den MAPK-Signalweg in MCSF-induzierten Peritonealmakrophagen. Nach 3 Tagen Differenzierung mit MCSF wurden die Peritonealmakrophagen mit 15 μ M SB203580 für 1 h vorinkubiert und dann mit 10 ng/ml MCSF für 5 min inkubiert. Zelluläres Protein wurde extrahiert und Proteinproben (0,4 mg/ml) mittels Western Blot mit spezifischen anti-phospho-ERK1/2 oder anti-ERK1/2 (**A**) und anti-phospho-SAPK/JNK oder anti-SAPK/JNK (**B**) Antikörpern analysiert (**rechte Panels**: repräsentative Experimente). β -Actin oder Actin wurde als Kontrolle verwendet. Die Banden wurden densitometrisch ausgewertet und als Intensität des phosphorylierten ERK1/2 (**A**) und JNK (**B**) relativ zur Intensität des nicht-phosphorylierten ERK1/2 und JNK angegeben (**linke Panels**, $Mean \pm SD$, $n = 3 - 5$). (*) zeigt einen statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich zu den unbehandelten Zellen innerhalb der gleichen Mausgruppe ($p < 0,05$). Bei der dritten schwachen Bande handelt es sich um eine unterphosphorylierte ERK oder JNK-Bande.

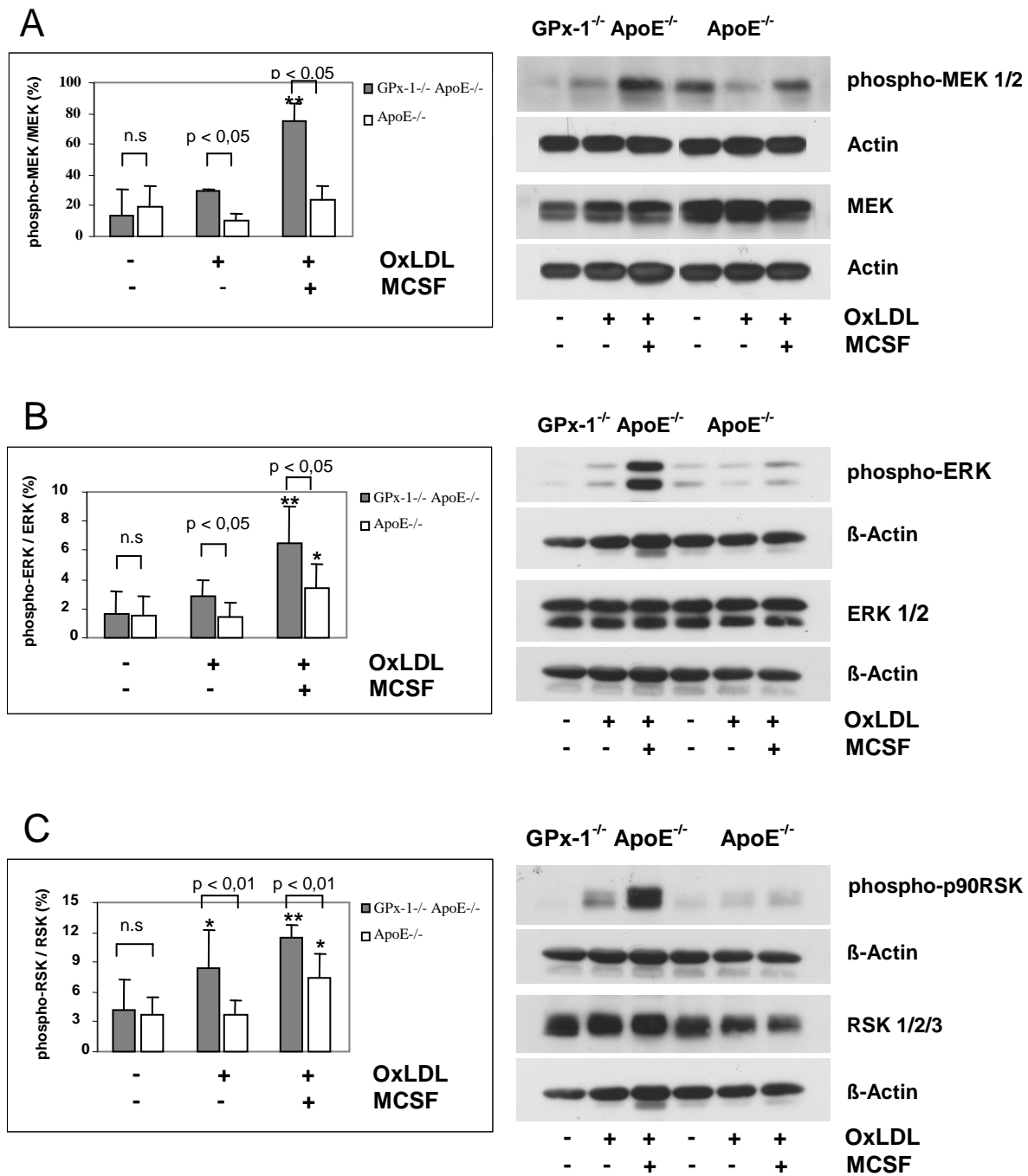


Abbildung 4.21 Western Blot Analyse der Aktivierung des ERK1/2-Signalwegs in OxLDL- und/oder MCSF-induzierten Makrophagen. Nach 3 Tagen Differenzierung mit MCSF wurden die Peritonealmakrophagen mit 10 $\mu\text{g/ml}$ OxLDL und/oder 10 ng/ml MCSF für 5 min inkubiert. Zelluläres Protein wurde extrahiert und Proteinproben (0.4 mg/ml) mittels Western Blot mit anti-phospho-MEK1/2 oder anti-MEK1/2 (A), anti-phospho-ERK1/2 oder anti-ERK1/2 (B) bzw. anti-phospho-p90RSK oder anti-RSK1/2/3 (C) Antikörpern analysiert (rechte Panel: repräsentative Experimente). β -Actin oder Actin wurde als Kontrolle verwendet. Die Banden wurden densitometrisch ausgewertet und als Intensität des phosphorylierten MEK1/2 (A), ERK1/2 (B) bzw. p90RSK (C) relativ zur Intensität der nicht-phosphorylierten ERK1/2, MEK1/2 bzw. p90RSK darstellt (linke Panels, $\text{Mean} \pm \text{SD}$, $n = 5$). (*) zeigt einen statistischen signifikanten Unterschied in Vergleich zu den unbehandelten Zellen innerhalb der gleichen Mausgruppe (*, $p < 0,05$ und **, $p < 0,01$).

3.7 Genexpressionsuntersuchungen in isolierten Peritonealmakrophagen nach Stimulation mit OxLDL

Wir vermuten, dass der erhöhte oxidativen Stress durch die Deletion von GPx-1 die OxLDL-induzierte Cholesterinakkumulation in Makrophagen und Schaumzellbildung fördern kann. Der oxidative Stress kann außerdem die endotheliale Sekretion des MCSF stimulieren und zur Adhäsion und Differenzierung von Monozyten führen.¹⁴⁵ *In-vitro* Untersuchungen zeigten, dass oxidierte Lipide wie OxLDL die MCSF und GM-CSF Expression induzieren können. MCSF und GM-CSF spielen eine wichtige Rolle in der OxLDL-induzierten Proliferation von Makrophagen.^{37, 146, 147} Deshalb sollte im GPx-1 defizienten Mausmodell überprüft werden, ob OxLDL die Expression der MCSF in Makrophagen mit erhöhten ROS beeinflusst.

Wie bereits beschrieben, wurden Peritonealmakrophagen mit oder ohne 10µg/ml OxLDL für 24 h inkubiert. Die Quantifizierung der Expression der MCSF (CSF1) mRNA erfolgte mittels *real-time PCR*. Das Expressionsniveau von CSF1 wurde auf das Expressionsniveau des Referenzgens 18S rRNA bezogen. Die OxLDL-Inkubation verdoppelte das CSF1 mRNA-Niveau in Makrophagen von GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} Mäuse gegenüber unbehandelten Zellen, während keine stimulierende Wirkung auf die Expression der CSF1 in ApoE^{-/-} zu beobachten war (Abb. 4.22).

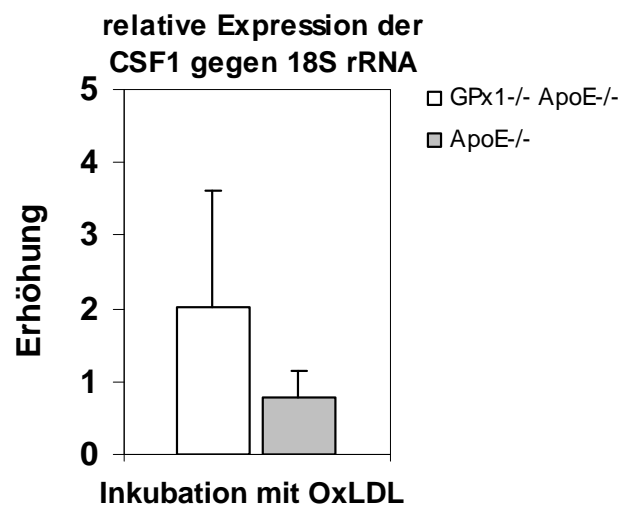


Abbildung. 4.22 RTD-PCR Analyse für die OxLDL-vermittelte CSF1-Expression in Makrophagen. Nach 3 Tagen Vorinkubation mit MCSF wurden Peritonealmakrophagen von GPx1^{-/-}ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-} Mäusen mit 10 µg/ml OxLDL für 24 h inkubiert. Nach RNA-Isolierung wurde die CSF1-Expression durch *real-time PCR* (RTD-PCR) quantifiziert. Die Erhöhung der relativen Expression von CSF1 gegen 18S rRNA in OxLDL-stimulierten Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen ist in der Abbildung dargestellt (*Mean* ± *SD*, n = 3).

V. Diskussion

Nach den Ergebnissen unserer Vorstudie führt die GPx-1-Defizienz unter einer cholesterinreichen Westerntyp-Diät (WTD) zu einer beschleunigten Atherosklerose-entwicklung. Besonderes Kennzeichen der atherosklerotischen Läsionen der GPx-1^{-/-} ApoE^{-/-} Tiere ist die in den frühen Stadien stark erhöhte Zellularität (Makrophagen und glatten Muskelzellen).¹¹⁹ Um die Mechanismen der atheroprotektiven Funktion der GPx-1 auf der zellulären Ebene weiter zu klären, wurde in der vorliegenden Arbeit (1) die zelluläre Herkunft der GPx innerhalb der atherosklerotischen Läsionen identifiziert, (2) die Wirkung der GPx-1-Defizienz auf die Schaumzell-Bildung untersucht und (3) der Effekt der GPx-1-Defizienz auf die Signaltransduktionswege, die eine Rolle bei der Zellproliferation spielen, geklärt.

Diese Studie zeigte folgende Ergebnisse: Die Isoformen der GPx (GPx-1, GPx-3, GPx-4) wurden vorwiegend in Makrophagen, aber nicht in glatten Muskelzellen der atherosklerotischen Läsion von ApoE^{-/-} Mäuse exprimiert. Der Mangel an GPx-1 erhöhte die OxLDL-induzierte Schaumzellbildung und führte zu erhöhter proliferativer Aktivität von Peritonealmakrophagen. OxLDL selbst hatte keinen signifikanten Effekt auf die Makrophagenproliferation. Durch die Inhibition der ERK1/2 und p38-MAPK Signalwege und Überprüfung der Phosphorylierungsniveaus der ERK-Kaskade wurde nachgewiesen, dass bei GPx-1 Defizienz die ERK-Kaskade an der MCSF- und OxLDL-induzierten Makrophagenproliferation beteiligt war.

1. Lokalisierung der GPx-Isoformen mRNA in den Mauseorten

Um die Mechanismen und die Funktion der antioxidativen Enzyme während der Entwicklung der atherosklerotischen Läsion zu klären, ist es notwendig, die Expressionsniveaus und die Lokalisation solcher Enzyme zu untersuchen. 't Hoen et al. haben die mRNA Expression der pro- und antioxidativen Enzyme in Aortenbogen und der Aorta descendens mittels RTD-PCR bestimmt. Die Expression der antioxidativen Enzyme ist in der Mauseorta in früher Phase der Atherosklerose erhöht, geht aber während der Progression der Atherosklerose zurück.¹⁴⁸ Aufgrund der verwendeten Methodik konnte die zelluläre Herkunft der GPx-1 mRNA nicht identifiziert werden. Allerdings scheint in der

frühen Phase (im Alter von 6 – 12 Wochen) die Expression der verschiedenen antioxidativen Enzyme mit dem Expressionsniveau von CD68 positiv zu korrelieren, während sie nach 12 Wochen negativ korreliert.¹⁴⁸ Unsere Untersuchungen zeigten, dass die GPx-1 in atherosklerotischen Läsionen von ApoE^{-/-} Tieren überwiegend in Makrophagen, nicht aber z. B. in glatten Muskelzellen (SMCs) exprimiert wurde. Kürzlich wurde berichtet, dass mit dem Fortschreiten der Läsion die relative Anzahl der Makrophagen abnimmt.¹¹⁹ Deshalb könnte der Anstieg in der GPx-1 Expression in der Aorta der ApoE^{-/-} Maus nach 6 und 12 Wochen WTD also unter anderem auf vermehrter Einwanderung der Makrophagen in die Läsion zurückzuführen sein, die zumindest zu Beginn der Atherogenese GPx-1 exprimieren. Insofern reflektiert die kürzlich beschriebene Abnahme der Expression der GPx-1 während der Progression der Atherosklerose in der Mausaorta¹⁴⁸ eher eine Abnahme des Makrophagenanteils im Verlauf, als eine „Hochregulation“ in frühen Stadien. Dieses Ergebnis legt nahe, dass Expressionsuntersuchungen von Gewebehomogenaten ausschließlich mittels quantitativer PCR ohne gleichzeitige *in situ*-Hybridisierung (ISH) mit definitiver Lokalisation zu einer Fehlinterpretation der Expression antioxidativer Enzyme während der Atheroprogression führen.

Die GPx-3 sowie die GPx-4 zeigten eine auf Makrophagen und Adipozyten konzentrierte Expression, während die GPx-2 nicht exprimiert wurde. In Makrophagen wurde GPx-3 sowohl bei den ApoE^{-/-} Mäusen als auch bei den GPx-1^{-/-} ApoE^{-/-} Mäusen ähnlich stark exprimiert, während GPx-4 eine stärkere Expression in den GPx-1-defizienten Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren zeigte. Wir vermuten, dass der Mangel an GPx-1 durch die anderen GPx kompensiert werden kann. So ist zum Beispiel für die GPx-2^{-/-} Maus bekannt, dass im Darm die GPx-1 kompensatorisch hochreguliert wird.¹⁴⁹ Da GPx-4 die einzige Isoform mit der Fähigkeit zur Reduktion von Lipidperoxiden ist, erklärt dies möglicherweise den eher moderaten Einfluss einer GPx-1-Defizienz auf die Atheroskleroseprogression. Diese vorläufigen Ergebnisse müssen jedoch durch weitere Versuche mit entsprechender semi-quantitativer PCR bestätigt werden.

2. Der Effekt von GPx-1 auf die Schaumzellbildung

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass in der atherosklerotischen Läsion GPx-1 vorwiegend in Makrophagen exprimiert wurde (s.o). Wir konzentrierten uns daher auf Makrophagen, um zu untersuchen, ob der Mangel an GPx-1 die Schaumzellbildung beeinflussen kann.

Es wurde gezeigt, dass der Mangel an GPx-1 die OxLDL-induzierte Schaumzellbildung signifikant verstärkte. Diese Daten ergänzen die Berichte anderer Arbeitsgruppen. Guo et al. haben in der Aorta und in glatten Muskelzellen von GPx-1 defizienten Mäusen eine erhöhte Konzentration an OxLDL nachgewiesen. Sowohl die Oxidation von LDL nach Inkubation mit LDL als auch die OxLDL-induzierte Apoptose wurden signifikant erhöht.¹⁵⁰ Anders als bei Guo et al.¹⁵⁰ wurden die Makrophagen in unserer Studie jedoch mit bereits *in vitro* oxidierten LDL inkubiert, was bei GPx-1-Defizienz einen deutlichen Effekt auf die zelluläre Lipid-Aufnahme hat.

Wir konnten zusätzlich nachweisen, dass bei GPx-1-Defizienz die E-LDL-induzierte Schaumzellbildung verstärkt wurde. Dieses Ergebnis unterstützt das neue Model der Atherogenese: Enzymatische und oxidative Modifikation der Lipoprotein ergänzen sich während dieses Prozesses.¹²

3. Einfluss der GPx-1 auf die Proliferation von Peritonealmakrophagen

Die Untersuchungen zeigten, dass OxLDL selbst keinen signifikanten Effekt auf die Proliferation der Peritonealmakrophagen hatte. Der Mangel an GPx-1 erhöhte die Proliferationsrate der Makrophagen, unanhängig davon, ob die Zellen mit MCSF oder mit OxLDL (bei niedrigen Konzentrationen bis zu 20µg/ml) inkubiert wurden. Diese Ergebnisse weisen auf den wichtigen Einfluss des oxidativen Stresses bei GPx-1 Defizienz auf die Makrophagenproliferation hin. Dagegen wurde bei Makrophagen ohne GPx-1-Defizienz eine signifikante Wirkung von OxLDL auf die Proliferation nur bei höheren Dosen (ab 20 µg/ml) beobachtet.^{37, 45, 136, 151, 152} Ein anderes Beispiel für den additiven Effekt der OxLDL auf den oxidativen Stress bei GPx-1-Defizienz bezieht sich auf die Phosphorylierung der p90RSK, ein wichtiges *downstream* Substrat der ERK1/2 (s. Kap. V. 5.2).

4. Peritonealmakrophagen von SOD2^{+/-} Mäusen zeigen keine erhöhte proliferative Reaktion auf MCSF

In unserer Studie konnten wir jedoch keine erhöhten Proliferationsraten der Peritonealmakrophagen in SOD2^{+/-} Mäusen beobachtet werden. SODs spielen offenbar nur eine marginale Rolle bei der Entstehung früher Läsionen. Weder eine Defizienz noch eine Überexpression der zytoplasmatischen oder extrazellulären SOD führte zu einer relevanten Beeinflussung der Atherogenese.^{29, 30, 32} Kürzlich wurde die Hypothese aufgestellt, dass innerhalb der ROS dem langlebigen H₂O₂ (Substrat der Katalase und der GPx-1) bei der Progression atherosklerotischer Läsionen eine größere Bedeutung zukommt als dem sehr kurzlebigen Superoxid (Substrat der SODs).¹⁵³

5. Die Wirkung der MAPK-vermittelten Signaltransduktion auf das Wachstum der Peritonealmakrophagen und der Effekt der GPx-1 auf die MAPK-Kaskade

5.1 der Einfluss der MAPK-Aktivität auf die Makrophagenproliferation

Wie werden die extrazellulären Signale von MCSF oder OxLDL übermittelt, die eine zelluläre proliferative Reaktion induzieren? Hierbei spielt vermutlich die MAPK-Familie eine Rolle. p44/42 MAPK (ERK1/2, *extracellular-Signal regulated Kinase 1/2*), p38 MAPK (*p38 Mitogen activated Protein Kinase*) und JNK/SAPKs (*Jun N-terminal Kinase / Stress-activated Protein Kinase*) sind die drei wichtigsten MAPK-Subfamilien. Die Untersuchung des Einflusses der MAPK-Aktivität auf die MCSF- und OxLDL-induzierte Makrophagen-proliferation und des Effektes der GPx-1 auf den MAPK Signaltransduktionsweg weist darauf hin, dass die MCSF und OxLDL-induzierte Proliferation der Peritonealmakrophagen in GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} Mäusen extrem empfindlich gegenüber der Inhibition des ERK1/2-Signalwegs ist, während die Inhibition von p38-MAPK die Proliferation der Makrophagen von GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} Mäusen und ApoE^{-/-} Mäusen stimuliert.

Unsere Ergebnisse ergänzen eine Vielzahl der Zelltypen, in denen die Aktivierung der ERK1/2 durch oxidativen Stress bereit beschrieben wurde, um GPx-1-defiziente Makrophagen. Die Aktivierung der ERK1/2 durch H₂O₂ oder das Superoxid-Anion wurde in VSMC, pulmonalen Epithelzellen, V79 Fibroblastzellen, usw. nachgewiesen.^{138, 154-156}

ERK1/2 beteiligte sich an der OxLDL-induzierten Proliferation von Makrophagen der C3H/He Mäuse.¹³⁶ Des Weiteren wurde die Expression und Aktivierung von ERK1/2 in atherosklerotischen Läsionen von Cholesterin-gefütterten Kaninchen nachgewiesen; die phosphorylierte ERK1/2 kolokalisierte dort mit den proliferierenden Zellen (inklusive Makrophagen).¹⁵⁷

Die letztgenannte Beobachtung (Stimulation der Makrophagenproliferation durch p38 MAPK-Inhibition) unterstreicht die kontroverse Rolle der p38-MAPK bei der Zellproliferation und der Kontrolle des Zellzyklus. Senokuchi et al. zeigten, dass OxLDL die p38-MAPK in Peritonealmakrophagen der C3H/He Mäuse aktivierte und der p38-Inhibitor die OxLDL-induzierte Makrophagenproliferation inhibierte. Senokuchi et al. zeigten aber auch, dass GM-MCSF die MEK/ERK-Kaskade aktiviert. ERK1/2 kann durch negative Regulation des p38-MAPK Signalwegs die Makrophagenproliferation reduzieren.¹³⁶ Der Effekt dieses „*Cross-talks*“ zwischen ERK1/2 und der p38-MAPK Kaskade bei der GM-MCSF-induzierten Makrophageproliferation ist noch nicht geklärt. Abbildung 5.1 zeigt „*Cross-talks*“ und „*Feedback*“ zwischen p38 α und anderen Signaltransduktionswege in der Zellproliferation. Unsere Daten zeigten, dass die Hemmung des p38-Signaltransduktionswegs durch p38-Inhibitor SB203580 (bei hoher Konzentration ab 15 μ M) zu vermehrter Proliferation oder verringerter Aktivität der Kaspasen-3 und 7 im Rahmen der Apoptose der Makrophagen führte. Ähnlich wurde eine Dualfunktion der p38-MAPK in Erythroleukämiezellen von Birkenkamp et al. nachgewiesen. Die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass SB203580 den apoptotischen Prozess inhibiert und die zelluläre Aktivierung vermittelt.¹⁵⁸ Darüberhinaus haben Hui et al. die suppressive Funktion der p38 α für die Proliferation in vielen Kultursystemen unter Verwendung von p38 α defizienten Zellen nachgewiesen.¹⁰⁴ SB203580 selbst erhöht die Formononetin-induzierte Proliferation der Endothelzellen.¹⁵⁹ Die p38-MAPK reguliert die Aktivität der Kaspase-3 während der Anti-Fas-Antikörper/Actinomycin D-induzierten Apoptose in Hepatomzellen herauf.¹⁴¹ Die Aktivierung der p38-MAPK spielt eine große Rolle bei der Proliferation der T-Lymphozyten durch die Stimulation mit mitogenen Zytokinen wie z.B. Interleukin-2 (IL-2) und Interleukin-7 (IL-7).¹⁶⁰ Andererseits inhibiert die Expression der Cdc42Hs, der konstitutiv aktiven Form des kleinen GTP-bindenden Proteins, in NIH3T3 Fibroblasten durch den p38-MAPK Signalweg den Zellzyklus beim Übergang von der G1 in die S-Phase.¹⁶¹ Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass die Rolle der p38-MAPK im Ablauf des Zellzyklus offenbar stark abhängig vom Zelltyp ist.

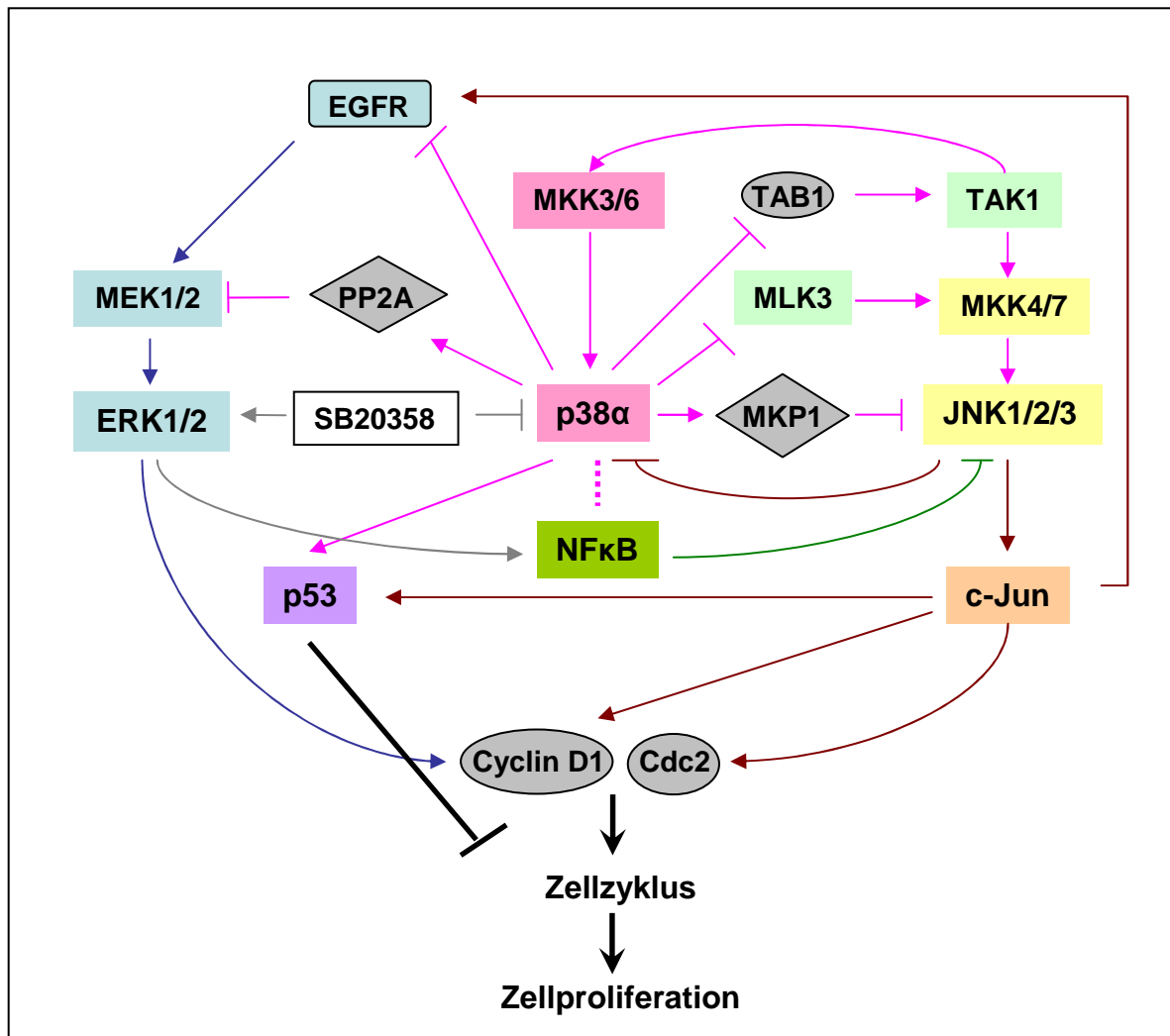


Abbildung 5.1 „Crosstalk“ und „Feedback“ zwischen p38α und anderen Signaltransduktionswege in der Zellproliferation. In normalen Zellen führt die p38-Signaltransduktion zur sofortigen Inaktivierung der ERK1/2 durch die *Protein Phosphatase 2* (PP2A). Die p38-MAPK kann die JNK-Aktivität durch die Phosphorylierung der MLK3 und des TAK1-bindenden Proteins (TAB1) negativ regulieren. Dadurch kann p38α die Expression der Cyclin D1 und Cdc2 inhibieren und wiederum den Zellzyklus negativ regulieren. Die Hochregulation dieser zwei Proteine ist vermutlich von der JNK/c-Jun Kaskade abhängig. Die MEK1/ERK-Kaskade kann ebenso die Aktivität von Cyclin D1 hochregulieren. p38α erhöht außerdem das Proteinniveau der MAPK Phosphatase 1 (MKP1), einer JNK-Phosphatase in Myoblasten. Der JNK/c-Jun Signalweg ist ein rückgekoppelter Inhibitor für die p38α-Aktivität in Fibroblasten und Hepatozyten. p38α kann die Zellproliferation durch die Herabregulation der EGFR oder die Heraufregulation der p53-Aktivität einschränken. EGFR und p53 können durch den JNK/c-Jun Signalweg reguliert werden.¹⁰⁴ Zusätzlich kann die Aktivität der JNK durch den anti-apoptischen Faktor NFκB inhibiert werden. Die p38 MAPK reguliert die Transkriptionsaktivität von NFκB, und die Aktivierung ist abhängig von Zelltyp und/oder Stimulus. Der SB203580-induzierte ERK-Signalweg erhöht die Transkriptionsaktivität von NFκB.¹⁵⁸

5.2 Der Effekt der GPx-1 auf die MCSF/OxLDL induzierte MAPK-Signaltransduktion

Um den Effekt von GPx-1 Defizienz auf die MCSF und/oder OxLDL-induzierte Aktivierung der MAPK in Makrophagen zu klären, haben wir die Phosphorylierungsniveaus der MEK1/2, ERK1/2, p90RSK, p38-MAPK und SAPK/JNK in MCSF und/oder OxLDL induzierten Peritonealmakrophagen mittels Western Blot ermittelt. Wir haben bereits durch die Inhibitionsuntersuchungen nachgewiesen, dass die Aktivierung von ERK1/2 eine wichtige Rolle in der MCSF- und OxLDL-induzierten Proliferation der GPx-1 defizienten Makrophagen spielt. Entsprechend dieser Ergebnisse wurde eine signifikante, kurzzeitig erhöhte Phosphorylierung der MEK1/2 und ERK1/2 nach Stimulation mit MCSF in GPx-1 defizienten Makrophagen beobachtet. Dieser Effekt der GPx-1 wurde auch nach 5 min Stimulation mit OxLDL festgestellt, sowohl mit als auch ohne MCSF. Dies passt zu der Hypothese, dass ein frühes Maximum der ERK-Aktivierung (3-5 min) durch MCSF, GM-CSF und IL-3 die Proliferation der Zellen induziert.^{136, 162, 163} In Gegensatz dazu führt ein spätes Maximum (ca. 15 min) durch LPS zur Aktivierung der Zelldifferenzierung und zur Produktion inflammatorischer Zytokine.¹⁶² Besonders RSK, ein wichtiges Substrat der ERK, wurde sowohl durch MCSF als auch OxLDL sehr deutlich phosphoryliert. RSK ist bekannt als ein ubiquitärer und versatiler Vermittler der ERK-Signaltransduktion bei biologischen Funktionen inklusive der Regulierung der Genexpression, der mRNA-Stabilität und der Translation sowie der Zellproliferation und des Zellüberlebens.¹⁶⁴

Da ERK1/2 durch MEK1/2 aktiviert wird und selbst p90RSK weiter aktiviert, weisen unsere Ergebnisse aus Western Blot und Inhibitionsuntersuchung darauf hin, dass der ERK1/2-Signaltransduktionsweg empfindlich ist gegenüber einem durch GPx-1-Defizienz verursachten erhöhten oxidativen Stress und eine vermehrte Proliferation der Mausperitonealmakrophagen zur Folge hat. Andererseits sind die p38-MAPK und JNK/SAPK Signalwege nicht so empfindlich wie ERK1/2 gegenüber oxidativem Stress bei GPx-1 Defizienz. Hier gibt es eine gewisse Diskrepanz zur Literatur, nach der ROS, wie Singulett-Sauerstoff, Wasserstoffperoxid, Stickoxid und Peroxynitrit die Aktivierung von JNK- und p38-Signaltransduktionswegen induzieren können.¹⁶⁵⁻¹⁶⁷

Die zytoplasmatische Phospholipase A₂ (cPLA₂), deren Expression ebenfalls untersucht wurde, ist ein wichtiges Substrat der aktivierten ERK1/2 und der p38-MAPK. OxLDL kann cPLA₂ in Endothelzellen durch MAPK-Signalwege aktivieren.¹⁶⁸ Wir konnten zeigen, dass auch MCSF eine dauerhafte Aktivierung der cPLA₂ in Mäuseritonealmakrophagen stimuliert. Es wurde jedoch kein Effekt der GPx-1 Defizienz auf die Aktivität der cPLA₂ nachgewiesen. Die OxLDL-induzierte cPLA₂-Genexpression wird durch verschiedene Wege wie z.B. ERK1/2, p38 MAPK und SAPK/JNK coreguliert.^{169, 170} Der ERK-Weg scheint zwar notwendig, aber allein nicht ausreichend zu sein, um cPLA₂ zu induzieren. Außerdem ist die Aktivierung der MAPK-Kaskade als Antwort auf oxidativen Stress abhängig vom Zelltyp.¹⁶⁸ Die Aktivierung des JNK- und p38-Signaltransduktionswegs durch die Zwischenprodukte des reaktiven Sauerstoffs wird vermutlich durch Ras, ASK1 und MEKK1 vermittelt.⁹¹ Möglicherweise ist in Mäuseritonealmakrophagen die Aktivierung der p38-MAPK und JNK/SAPK durch MCSF unabhängig von H₂O₂.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die GPx-1-Defizienz einen signifikanten Einfluss auf die Schaumzellbildung hat und durch die ERK1/2-Kaskade die Makrophagenproliferation beeinflusst (Abb. 5.2). Dieser Sachverhalt könnte als Ausgangspunkt für weitere Studien zur Entwicklung neuer therapeutischer Strategien gegen Atherosklerose dienen.

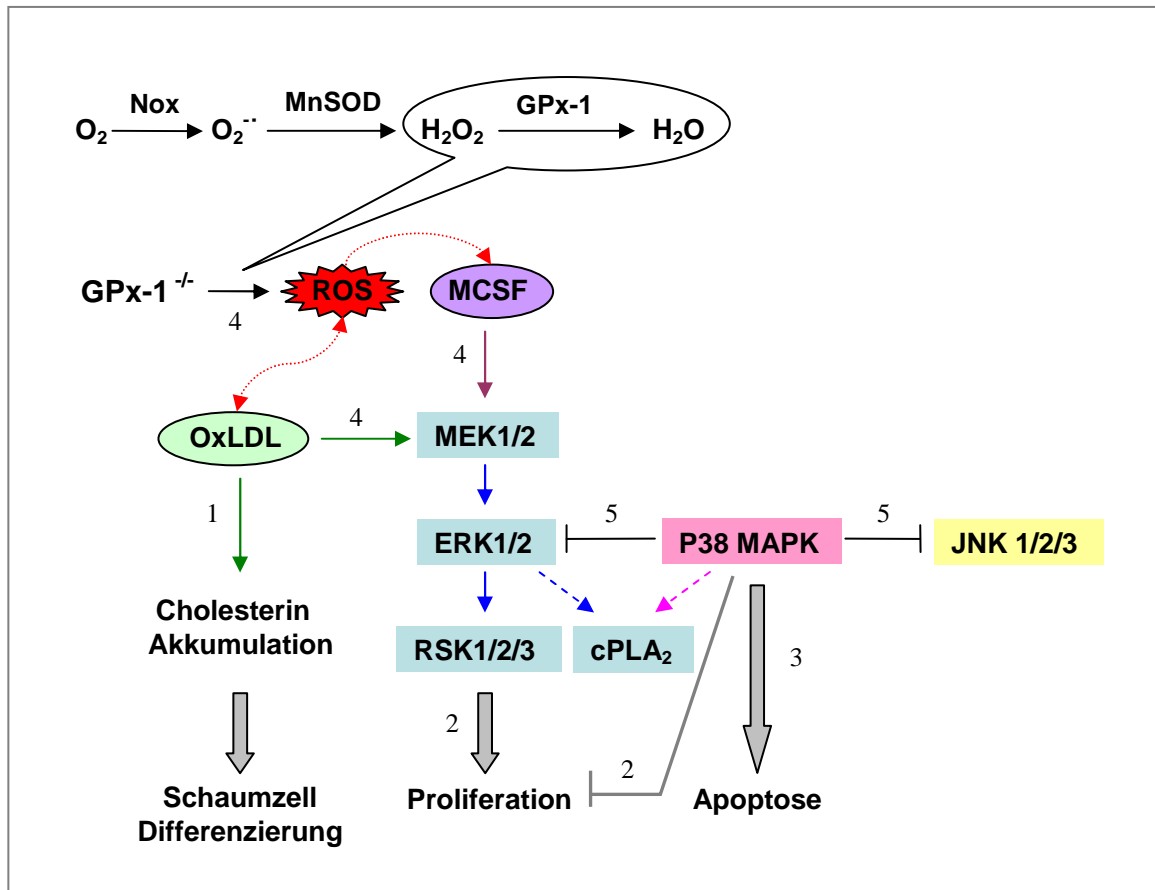


Abbildung 5.2 Die GPx-1-Defizienz ($GPx-1^{-/-}$) übt signifikanten Einfluss auf die Schaumzellbildung und die Proliferation von Mausepitonealmakrophagen aus. 1) In GPx-1 defizienten Makrophagen ist die OxLDL-induzierte Cholesterinakkumulation verstärkt. 2) Die Proliferation der Makrophagen wird über den ERK1/2 Signaltransduktionsweg positiv, und über den p38-MAPK-Weg negativ reguliert. 3) Die Apoptose der Makrophagen wird über den p38-MAPK-Weg positiv reguliert. 4) MCSF und OxLDL induzieren die Aktivierung des ERK1/2 Signaltransduktionswegs. Die MEK/ERK/RSK-Kaskade ist empfindlich gegenüber oxidativen Stress (ROS) bei GPx-1-Defizienz. 5) Die p38-MAPK reguliert die Aktivierung der ERK1/2 und JNK1/2/3 negativ.

Zusammenfassung

Die antioxidative Aktivität des Enzyms Glutathionperoxidase-1 (GPx-1) schützt vor Atherosklerose und ihren Folgeerkrankungen. In einer Vorstudie konnten wir zeigen, dass der Mangel an GPx-1 die Atheroskleroseentwicklung in Apolipoprotein E defizienten (ApoE^{-/-}) Mäusen beschleunigt und modifiziert. Allerdings sind die Verteilung der GPx-1 in atherosklerotischen Läsionen und die Mechanismen für den erhöhten Makrophagengehalt in der Läsion noch nicht geklärt. Deshalb haben wir (1) die *in-situ* Expression der GPx-Isoformen in atherosklerotischen Läsionen von GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-} Mäusen und (2) den Einfluss der GPx-1 Defizienz auf die Schaumzellbildung und Proliferation der Peritonealmakrophagen in ApoE^{-/-} Mäusen untersucht.

Die GPx-1^{-/-}ApoE^{-/-} und ApoE^{-/-} Weibchen wurden für 6 und 12 Wochen auf einer atherogenen „Western-type“ Diät gehalten. Die *in situ*-Hybridisierung zeigte, dass die verschiedenen Isoformen der GPx (GPx-1, GPx-3, GPx-4) vorwiegend in Makrophagen, nicht jedoch in glatten Muskelzellen der atherosklerotischen Läsionen von ApoE^{-/-} Mäusen exprimiert wurden. Für die *in vitro* Untersuchungen wurden 5 Monate alte, GPx-1 defiziente und Wildtyp-Mäuse, gehalten auf Normaldiät, verwendet. Die Öl-Rot-O Färbung zeigte, dass die GPx-1 Defizienz die OxLDL (oxidiertes LDL) - und E-LDL (enzymatisch modifiziertes LDL) - induzierte Schaumzellbildung förderte. Darüber hinaus war die OxLDL-induzierte Cholesterinakkumulation (zellulärer Cholesterinester/Cholesterin-Gehalt) in GPx-1 defizienten Makrophagen verstärkt, sodass ein Mangel an GPx-1 die Aufnahme von OxLDL durch Monozyten und damit die Umwandlung in Schaumzellen beschleunigt. Hinsichtlich der Proliferation zeigte sich, dass MCSF (*Macrophage Colony-Stimulating Facotr*) ein stärkerer Stimulus als OxLDL ist. Ein Mangel an GPx-1 fördert die Proliferation zusätzlich. Daran ist die ERK1/2 (*extracellular-signal regulated kinase 1/2*) - Kaskade beteiligt, denn es wurde eine schnelle Phosphorylierung der ERK1/2-Kaskade durch MCSF und/oder OxLDL nachgewiesen. Entsprechend reduzieren ERK1/2-Inhibitoren die proliferative Aktivität der Makrophagen. Die Hemmung der p38-MAPK (*p38 mitogen-activated protein kinase*) führt zur vermehrten Proliferation und bei gleichzeitig verringerter Caspase-3/7 Aktivität der Makrophagen unabhängig von der Expression der GPx-1. Ein Mangel an GPx-1 hat auch keinen Einfluss auf die MCSF-vermittelte Aktivierung der p38-MAPK und JNK (*c-Jun N-terminal kinase*).

Zusammenfassend läßt sich feststellen, dass die GPx-1-Defizienz einen signifikanten Einfluss auf die Schaumzellbildung und Proliferation von Makrophagen hat, was zur Beschleunigung der Atherosklerose und zu vermehrter Zellularität der entstehenden atherosklerotischen Läsionen führt. Die Proliferation wird über den ERK1/2 Signaltransduktionsweg positiv und über den p38-MAPK Weg negativ reguliert, wobei die ERK1/2-Kaskade empfindlich gegenüber oxidativem Stress bei GPx-1-Defizienz ist.

Literaturverzeichnis

1. Ochsenhirt V. Der Einfluß der Glutathionperoxidase-1 auf die Atheroskleroseprogression im Mausmodell *Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz*; 2009.
2. Lackner KJ, Blankenberg S. Atherosclerosis, oxidative stress and glutathione peroxidase-1: a new kid on the block. *Ital Heart J.* 2004;5:169-172.
3. Steinberg D, Witztum JL. Lipoproteins, Lipoprotein, Oxidation, and Atherogenesis. *K.R. Chien, ed. (Philadelphia: W.B. Saunders Co.).* 1999.
4. Ross R. Atherosclerosis -- an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999;340(2):115-126.
5. Navab M, Berliner JA, Watson AD, Hama SY, Territo MC, Lusis AJ, Shih DM, Van Lenten BJ, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Fogelman AM. The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16(7):831-842.
6. National Cholesterol Education Program. Second report of the Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel II). *Bethesda, Md.: National Heart, Lung, and Blood Institute (NIH publication no. 93-3095).* 1993.
7. Stary HC, Blankenhorn DH, Chandler AB, Glagov S, Insull WJ, Richardson M, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD. A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb.* 1992;12(1):120-134.
8. Stary HC. Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(5):1177-1178.
9. Schwandt P, Parhofer K. Handbuch der Fettstoffwechselstörungen. 2006.
10. Scott J. The molecular and cell biology of apolipoprotein B. *Mol Biol Med.* 1989;6:65-80.
11. Bodzioch M, Orso E, Klucken J, Langmann T, Böttcher A, Diederich W, Drobnik W, Barlage S, Büchler C, Porsch-Ozçürümez M, Kaminski WE, Hahmann HW, Oette K, Rothe G, Aslanidis C, Lackner KJ, Schmitz G. The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nat Genet.* 1999;22:347-351.
12. Torzewski M, Lackner KJ. Initiation and progression of atherosclerosis - enzymatic or oxidative modification of low-density lipoprotein? *Clin Chem Lab Med.* 2006;44(12):1389-1394.
13. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis: The Road Ahead. *Cell.* 2001;101(4):503-516.
14. Liao F, Berliner JA, Mehrabian M, Navab M, Demer LL, Lusis AJ, Fogelman AM. Minimally modified low density lipoprotein is biologically active in vivo in mice. *J Clin Invest.* 1991;87:2253-2257.
15. Kaplan M, Aviram M. Oxidized Low Density Lipoprotein: Atherogenic and Proinflammatory Characteristics during Macrophage Foam Cell Formation. An Inhibitory role for Nutritional Antioxidants and Serum Paraoxonase. *Clin Chem Lab Med.* 1999;37:777-787.
16. Stocker R, Keane JFJ. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev.* 2004;84(4):1381-1478.

17. Rajavashisth TB, Andalibi A, Territo MC, Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ. Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. *Nature*. 1990;344:254-257.
18. Yamada Y, Doi T, Hamakubo T, Kodama T. Scavenger receptor family proteins: roles for atherosclerosis, host defence and disorders of the central nervous system. *Cell Mol Life Sci*. 1998;54(7):628-640.
19. Kruth HS. Macrophage foam cells and atherosclerosis. *Front Biosci*. 2001;6:D429-455.
20. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162(1):156-159.
21. Fan J, Watanabe T. Inflammatory reactions in the pathogenesis of atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*. 2003;10(2):63-71.
22. Battin EE, Brumaghim JL. Antioxidant activity of sulfur and selenium: a review of reactive oxygen species scavenging, glutathione peroxidase, and metal-binding antioxidant mechanisms. *Cell Biochem Biophys*. 2009;55:1-23.
23. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:29-38.
24. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact*. 2006;160:1-40.
25. Park S, Imlay JA. High levels of intracellular cysteine promote oxidative DNA damage by driving the fenton reaction. *J Bacteriol*. 2003;185:1942-1950.
26. Pagano PJ, Clark JK, Cifuentes-Pagano ME, Clark SM, Callis GM, Quinn MT. Localization of a constitutively active, phagocyte-like NADPH oxidase in rabbit aortic adventitia: enhancement by angiotensin II. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:14483-14488.
27. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. New York: Oxford University Press; 1999.
28. van Poppel G, Kardinaal A, Princen H, Kok FJ. Antioxidants and coronary heart disease. *Ann Med*. 1994;26:429-434.
29. Sentman ML, Brännström T, Westerlund S, Laukkanen MO, Ylä-Herttuala S, Basu S, Marklund SL. Extracellular superoxide dismutase deficiency and atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:1477-1482.
30. Tribble DL, Gong EL, Leeuwenburgh C, Heinecke JW, Carlson EL, Verstuyft JG, Epstein CJ. Fatty streak formation in fat-fed mice expressing human copper-zinc superoxide dismutase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:1734-1740.
31. Kirk EA, Dinauer MC, Rosen H, Chait A, Heinecke JW, LeBoeuf RC. Impaired superoxide production due to a deficiency in phagocyte NADPH oxidase fails to inhibit atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:1529-1535.
32. Laukkanen MO, Kivelä A, Rissanen T, Rutanen J, Karkkainen MK, Leppanen O, Bräsen JH, Ylä-Herttuala S. Adenovirus-mediated extracellular superoxide dismutase gene therapy reduces neointima formation in balloon-denuded rabbit aorta. *Circulation*. 2002;106:1999-2003.
33. Yang H, Roberts LJ, Shi MJ, Zhou LC, Ballard BR, Richardson A, Guo ZM. Retardation of atherosclerosis by overexpression of catalase or both Cu/Zn-superoxide dismutase and catalase in mice lacking apolipoprotein E. *Circ Res*. 2004;95:1075-1081.
34. Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. *Free Radic Biol Med*. 1999;27:916-921.
35. Frei B. Ascorbic acid protects lipids in human plasma and low-density lipoprotein against oxidative damage. *Am J Clin Nutr*. 1991;54:1113S-1118S.

36. Berliner JA, Heinecke JW. The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis. *Free Radic Biol Med.* 1996;20:707-727.
37. Sakai M, Kobori S, Miyazaki A, Horiuchi S. Macrophage proliferation in atherosclerosis. *Current Opinion in Lipidology.* 2000;11:503-509.
38. Aviram M. Interaction of oxidized low density lipoprotein with macrophages in atherosclerosis, and the antiatherogenicity of antioxidants. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1996;34:599-608.
39. Halliwell b. Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr.* 1996;16:33-50.
40. Aviram M. Macrophage Foam Cell Formation During Early Atherogenesis Is Determined by the Balance Between Pro-Oxidants and Anti-Oxidants in Arterial Cells and Blood Lipoproteins. *Antioxid Redox Signal.* 1999;1:585-594.
41. Cathcart MK. Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocytes/macrophages: Contributions to atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:23-28.
42. Cathcart MK, McNally AK, Morel DW, Chisolm GM. Superoxide anion participation in human monocyte-mediated oxidation of low-density lipoprotein and conversion of low-density lipoprotein to a cytotoxin. *J Immunol.* 1989;142:1963-1969.
43. Tiwari RL, Singh V, Barthwal MK. Macrophages: An Elusive Yet emerging Therapeutic Target of Atherosclerosis. *Medicinal research Reviews.* 2007;28:483-544.
44. Mocellin S, Bronte V, Nitti D. Nitric oxide, a double-edged sword in cancer biology: Searching for therapeutic opportunities. *Med Res Rev.* 2007;27:317-352.
45. Matsumura T, Sakai M, Kobori S, et al. Two intracellular signaling pathways for activation of protein kinase C are involved in oxidized low density lipoprotein-induced macrophage growth. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:3013-3020.
46. Biwa T, Sakai M, Matsumura T, Kobori S, Kaneko K, Miyazaki A, Hakamata H, Horiuchi S, Shichiri M. Sites of action of protein kinase C and phosphatidylinositol 3-kinase are distinct in oxidized low density lipoprotein-induced macrophage proliferation. *J Biol Chem.* 2000;275:5810-5816.
47. Bjorkerud S, Bjorkerud B. Apoptosis is abundant in human atherosclerotic lesions, especially in inflammatory cells (macrophages and T cells), and may contribute to the accumulation of gruel and plaque instability. *Am J Pathol.* 1996;149:367-380.
48. Boullier A, Li Y, Quehenberger O, Palinski W, Tabas I, Witztum JL, Miller YI. Minimally oxidized LDL offsets the apoptotic effects of extensively oxidized LDL and free cholesterol in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:1169-1176.
49. Papp LV, Lu J, Holmgren A, Khanna KK. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid Redox Signal.* 2007;9:775-806.
50. Rayman MP. The importance of selenium to human health. *Lancet.* 2000;356:233-241.
51. Zhou BF, Stamler J, Dennis B, Moag-Stahlberg A, Okuda N, Robertson C, Zhao L, Chan Q, Elliott P. Nutrient intakes of middle-aged men and women in China, Japan, United Kingdom, and United States in the late 1990s: the INTERMAP study. *J Hum Hypertens.* 2003;17:623-630.
52. Gladyshev VN. Selenoproteins and selenoproteomes. In: Hatfield DL, Berry MJ, Gladyshev VN, eds. *Selenium: Its molecular biology and role in human health.* New York: Springer; 2006.
53. Lu J, Holmgren A. Selenoproteins. *J Biol Chem.* 2009;284:723-737.

54. Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehtabm O, Guigó R, Gladyshev VN. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science*. 2003;300:1439-1443.
55. Reeves MA, Hoffmann PR. The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation. *Cell Mol Life Sci*. 2009;66:2457-2478.
56. Alissa EM, Bahijri SM, Ferns GA. The controversy surrounding selenium and cardiovascular disease: a review of the evidence. *Med Sci Monit*. 2003;9:9-18.
57. Wingler K, Böcher M, Flohé L, Kollmus H, Brigelius-Flohé R. mRNA stability and selenocysteine insertion sequence efficiency rank gastrointestinal glutathione peroxidase high in the hierarchy of selenoproteins. *Eur J Biochem*. 1999;259:149-157.
58. Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehtab O, Guigó R, Gladyshev VN. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science*. 2003;300:1439-1443.
59. Ursini F, Heim S, Kiess M, Maiorino M, Roveri A, Wissing J, Flohé L. Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science*. 1999;285:1393-1396.
60. Cheng WH, Ho YS, Ross DA, Valentine BA, Combs GF, Lei XG. Cellular glutathione peroxidase knockout mice express normal levels of selenium-dependent plasma and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases in various tissues. *J Nutr*. 1997;127:1445-1450.
61. Lei XG, Cheng WH, McClung JP. Metabolic regulation and function of glutathione peroxidase-1. *Annu Rev Nutr*. 2007;27:41-61.
62. Müller C, Wingler K, Brigelius-Flohé R. 3'UTRs of glutathione peroxidases differentially affect selenium-dependent mRNA stability and selenocysteine incorporation efficiency. *Biol Chem*. 2003;384:11-18.
63. Cheng W, Fu YX, Porres JM, Ross DA, Lei XG. Selenium-dependent cellular glutathione peroxidase protects mice against a pro-oxidant-induced oxidation of NADPH, NADH, lipids, and protein. *FASEB J*. 1999;13:1467-1475.
64. Flohé L. Glutathione peroxidase. *Basic Life Sci*. 1988;49:663-668.
65. Grossmann A, Wendel A. Non-reactivity of the selenoenzyme glutathione peroxidase with enzymatically hydroperoxidized phospholipids. *Eur J Biochem*. 1983;135:549-552.
66. Takahashi K, Avissar N, Whitin J, Cohen H. Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme. *Arch Biochem Biophys*. 1987;256:677-686.
67. Yamamoto Y, Takahashi K. Glutathione peroxidase isolated from plasma reduces phospholipid hydroperoxides. *Arch Biochem Biophys*. 1993;305:541-545.
68. Brigelius-Flohé R. Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radic Biol Med*. 1999;27:951-965.
69. Arthur JR. The glutathione peroxidases. *Cell Mol Life Sci*. 2000;57:1825-1835.
70. Conrad M, Schneider M, Seiler A, Bornkamm GW. Physiological role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in mammals. *Biol Chem*. 2007;388:1019-1025.
71. Yant LJ, Ran Q, Rao L, Van Remmen H, Shibatani T, Belter JG, Motta L, Richardson A, Prolla TA. The selenoprotein GPX4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults. *Free Radic Biol Med*. 2003;34:496-502.
72. Brigelius-Flohé R, Kluth D, Banning A. Is there a future for antioxidants in atherogenesis? *Mol Nutr Food Res*. 2005;49:1083-1089.
73. Schnurr K, Belkner J, Ursini F, Schewe T, Kühn H. The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase controls the activity of the 15-lipoxygenase with

- complex substrates and preserves the specificity of the oxygenation products. *J Biol Chem.* 1996;271:4653-4658.
74. de Haan JB, Bladier C, Griffiths P, Kelner M, O'Shea RD, Cheung NS, Bronson RT, Silvestro MJ, S W, Zheng SS, Beart PM, Hertzog PJ, Kola I. Mice with a homozygous null mutation for the most abundant glutathione peroxidase, Gpx1, show increased susceptibility to the oxidative stress-inducing agents paraquat and hydrogen peroxide. *J Biol Chem.* 1998;273:22528-22536.
 75. Brigelius-Flohé R, Banning A, Schnurr K. Selenium-dependent enzymes in endothelial cell function. *Antioxid Redox Signal.* 2003;5:205-215.
 76. Kobayashi S, Inoue N, Azumi H, Seno T, Hirata K, Kawashima S, Hayashi Y, Itoh H, Yokozaki H, Yokoyama M. Expressional changes of the vascular antioxidant system in atherosclerotic coronary arteries. *J Atheroscler Thromb.* 2002;9:184-190.
 77. Blankenberg S, Rupprecht HJ, Bickel C, Torzewski M, Hafner G, Tiret L, Smieja M, Cambien F, Meyer J, Lackner KJ. Glutathione peroxidase 1 activity and cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2003;349:1605-1613.
 78. Lapenna D, de Gioia S, Ciofani G, Mezzetti A, Uchino S, Calafiore AM, Napolitano AM, Di Ilio C, F C. Glutathione-related antioxidant defenses in human atherosclerotic plaques. *Circulation.* 1998;97:1930-1934.
 79. Beck MA, Esworthy RS, Ho YS, Chu F. Glutathione peroxidase protects mice from viral-induced myocarditis. *FASEB J.* 1998;12:1143-1149.
 80. Dayal S, Brown KL, J WC, Oberley LW, Arning E, Bottiglieri T, Faraci FM, Lentz SR. Deficiency of glutathione peroxidase-1 sensitizes hyperhomocysteinemic mice to endothelial dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1996-2002.
 81. Reiss AB, Edelman SD. Recent insights into the role of prostanoids in atherosclerotic vascular disease. *Curr Vasc Pharmacol.* 2006;4:395-408.
 82. Hammarberg T, Kuprin S, Rådmark O, Holmgren A. EPR investigation of the active site of recombinant human 5-lipoxygenase: inhibition by selenide. *Biochemistry.* 2001;40:6371-6378.
 83. Straif D, Werz O, Kellner R, Bahr U, Steinhilber D. Glutathione peroxidase-1 but not -4 is involved in the regulation of cellular 5-lipoxygenase activity in monocytic cells. *Biochem J.* 2000;349:455-461.
 84. Emerling BM, Plataniias LC, Black E, Nebreda AR, Davis RJ, Chandel NS. Mitochondrial reactive oxygen species activation of p38 mitogen-activated protein kinase is required for hypoxia signaling. *Mol Cell Biol.* 2005;25:4853-4862.
 85. Cheng WH, Zheng X, Quimby FR, Roneker CA, Lei XG. Low levels of glutathione peroxidase 1 activity in selenium-deficient mouse liver affect c-Jun N-terminal kinase activation and p53 phosphorylation on Ser-15 in pro-oxidant-induced apoptosis. *Biochem J.* 2003;370:927-934.
 86. Moriguchi T, Gotoh Y, Nishida E. Roles of the MAP Kinase Cascade in Vertebrates. *Advances in Pharmacology.* 1996;36:121-137.
 87. Cobb MH. MAP kinase pathways. *Progress in Biophysics & Molecular Biology.* 1999;71:479-500.
 88. Mohan C. Signal Transduction: A Short Overview of Its Role in Health and Disease. *MAP Kinase Signaling: Synergistic Response to Upstream Signals.* San Diego, California: Merck; 2009.
 89. Zhang W, Liu HT. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res.* 2002;12:9-18.

90. Peyssonnaud C, Provot S, Felder-Schmittbuhl MP, Calothy G, Eychène A. Induction of postmitotic neuroretina cell proliferation by distinct Ras downstream signaling pathways. *Mol Cell Biol.* 2000;20:7068-7079.
91. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, Lehmann B, Terrian DM, Milella M, Tafuri A, Stivala F, Libra M, Basecke J, Evangelisti C, Martelli AM, Franklin RA. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1773:1263-1284.
92. Pierce KL, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. New mechanisms in heptahelical receptor signaling to mitogen activated protein kinase cascades. *Oncogene.* 2001;20:1532-1539.
93. Buhl AM, Osawa S, Johnson GL. Mitogen-activated protein kinase activation requires two signal inputs from the human anaphylatoxin C5a receptor. *J Biol Chem.* 1995;270:19828-19832.
94. Zhao Q, Lee FS. Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinases 2 and 3 activate nuclear factor-kappaB through IkappaB kinase-alpha and IkappaB kinase-beta. *J Biol Chem.* 1999;274:8355-8358.
95. McCubrey JA, Lahair MM, Franklin RA. Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways. *Antioxid Redox Signal.* 2006;8:1775-1789.
96. Zarubin T, Han J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res.* 2005;15:11-18.
97. Cuadrado A, Nebreda AR. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J.* 2010;429:403-417.
98. Zhang S, Han J, Sells MA, Chernoff J, Knaus UG, Ulevitch RJ, Bokoch GM. Rho family GTPases regulate p38 mitogen-activated protein kinase through the downstream mediator Pak1. *J Biol Chem.* 1995;270:23934-23936.
99. Ge B, Gram H, Di Padova F, Huang B, New L, Ulevitch RJ, Luo Y, Han J. MAPKK-independent activation of p38alpha mediated by TAB1-dependent autophosphorylation of p38alpha. *Science.* 2002;295:1291-1294.
100. Stokoe D, Engel K, Campbell D, Cohen P, Gaestel M. Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins. *FEBS Lett.* 1992;313:307-313.
101. Mahalingam M, Cooper JA. Phosphorylation of mammalian eIF4E by Mnk1 and Mnk2: tantalizing prospects for a role in translation. *Prog Mol Subcell Biol.* 2001;27:132-142.
102. Arthur JS. MSK activation and physiological roles. *Front Biosci.* 2008;13:5866-5879.
103. Shi Y, Gaestel M. In the cellular garden of forking paths: how p38 MAPKs signal for downstream assistance. *Biol Chem.* 2002;383:1519-1536.
104. Hui L, Bakiri L, Stepniak E, Wagner EF. p38alpha: a suppressor of cell proliferation and tumorigenesis. *Cell Cycle.* 2007;6:2429-2433.
105. Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science.* 1995;270:1326-1331.
106. Hibi M, Lin A, Smeal T, Minden A, Karin M. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev.* 1993;7:2135-2148.
107. Nishina H, Wada T, Katada T. Physiological roles of SAPK/JNK signaling pathway. *J Biochem.* 2004;136:123-126.
108. Su B, Karin M. Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression. *Curr Opin Immunol.* 1996;8:402-411.

109. Coso OA, Chiariello M, Yu JC, Teramoto H, Crespo P, Xu N, Miki T, Gutkind JS. The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell*. 1995;81:1137-1146.
110. Lin A, Minden A, Martinetto H, Claret FX, Lange-Carter C, Mercurio F, Johnson GL, Karin M. Identification of a dual specificity kinase that activates the Jun kinases and p38-Mpk2. *Science*. 1995;268:286-290.
111. Karin M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1996;351:127-134.
112. Matsuzawa A, Ichijo H. Stress-responsive protein kinases in redox-regulated apoptosis signaling. *Antioxid Redox Signal*. 2005;7:472-481.
113. Owuor ED, Kong AN. Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways. *Biochem Pharmacol*. 2002;64:765-770.
114. Knowles JW, Maeda N. Genetic modifiers of atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 Nov;20(11):2336-45. 2000;20:2336-2345.
115. Ho YS, Magnenat JL, Bronson RT, Cao J, Gargano M, Sugawara M, Funk CD. Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia. *J Biol Chem*. 1997;272:16644-16651.
116. Yoshida T, Maulik N, Engelman RM, Ho YS, Magnenat JL, Rousou JA, Flack JERd, Deaton D, K DD. Glutathione peroxidase knockout mice are susceptible to myocardial ischemia reperfusion injury. *Circulation*. 1997;96:II-216-220.
117. Beck MA, Esworthy RS, Ho YS, Chu FF. Glutathione peroxidase protects mice from viral-induced myocarditis. *FASEB J*. 1998;12:1143-1149.
118. Dayal S, Brown KL, Weydert CJ, Oberley LW, Arning E, Bottiglieri T, Faraci FM, Lentz SR. Deficiency of glutathione peroxidase-1 sensitizes hyperhomocysteinemic mice to endothelial dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1996-2002.
119. Torzewski M, Ochsenhirt V, Kleschyov AL, Oelze M, Daiber A, Li HG, Rossmann H, Tsimikas S, Reifenberg K, Cheng F, Lehr H-A, Blankenberg S, Förstermann U, Münzel T, Lackner KJ. Deficiency of Glutathione Peroxidase-1 Accelerates the Progression of Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:850-857.
120. Lewis P, Stefanovic N, Pete J, Calkin AC, Giunti S, Thallas-Bonke V, Jandeleit-Dahm KA, Allen TJ, Kola I, Cooper ME, de Haanm J. Lack of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase-1 accelerates atherosclerosis in diabetic apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2007;115:2178-2187.
121. Lebovitz RM, Zhang H, Vogel H, Cartwright JJr, Dionne L, Lu N, Huang S, Matzuk MM. Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93(18):9782-9787.
122. Lee YH, Boelsterli UA, Lin Q, Chung MC. Proteomics profiling of hepatic mitochondria in heterozygous Sod2^{+/-} mice, an animal model of discreet mitochondrial oxidative stress. *Proteomics*. 2008;8(3):555-568.
123. Harrison CM, Pompilius M, Pinkerton KE, Ballinger SW. Mitochondrial oxidative stress significantly influences atherogenic risk and cytokine-induced oxidant production. *Environ Health Perspect*. 2011;119(5):676-681.
124. Ohashi M, Runge MS, Faraci FM, Heistad DD. MnSOD deficiency increases endothelial dysfunction in ApoE-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26(10):2331-2336.

125. Häuser F. Die funktionelle Bedeutung von MSP und Lactadherin im Rahmen der Atherosklerose *Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz*; 2011.
126. Havel RJ, Eder HA, BRAGDON JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest.* 1955;34:1345-1353.
127. Navab M, Fogelman AM, Berliner JA, Territo MC, Demer LL, Frank JS, Watson AD, Edwards PA, Lusis AJ. Pathogenesis of atherosclerosis. *Am J. Cardiol.* 1995;28:18C-23C.
128. Mitchinson MJ, Ball RY, Carpenter KLH, Enright JH. Macrophages and ceroid in human atherosclerosis. *Eur Heart J.* 1990;E Suppl 11:116-121.
129. Aviram M. Interaction of Oxidized Low Density Lipoprotein with Macrophages in Atherosclerosis, and the Antiatherogenicity of Antioxidants. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1996;34:599-608.
130. Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest.* 1991;88:1785-1792.
131. Aviram M. Oxidative modification of low density lipoprotein and atherosclerosis. *Isr J Med Sci.* 1995;31:241-249.
132. Kruth HS, Fry DL. Histochemical detection and differentiation of free and esterified cholesterol in swine atherosclerosis using filipin. *Exp Mol Pathol.* 1984;40:288-294.
133. Bhakdi S, Dorweiler B, Krichmann R, Torzewski J, Weise E, Tranum-Jensen J, Walev I, Wieland E. On the pathogenesis of atherosclerosis: Enzymatic transformation of human low density lipoprotein to an atherogenic moiety. *J Exp Med.* 1995;182:1959-1971.
134. Kapinsky M, Torzewski M, Büchler C, Duong CQ, Rothe G, Schmitz G. Enzymatically degraded LDL preferentially binds to CD14(high) CD16(+) monocytes and induces foam cell formation mediated only in part by the class B scavenger-receptor CD36. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:1004-1010.
135. Cordon D, Reidy MA, Benditt EP, Schwartz SM. Cell proliferation in human coronary arteries. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87:4600-4604.
136. Senokuchi T, Matsumura T, Sakai M, Matsuo T, Yano M, Kiritoshi S, Sonoda K, Kukidome D, Nishikawa T, Araki E. Extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase mediate macrophage proliferation induced by oxidized low-density lipoprotein. *Atherosclerosis.* 2004;176:233-245.
137. Seger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* 1995;9:726-735.
138. Kim BY, Han MJ, Chung AS. Effects of reactive oxygen species on proliferation of Chinese hamster lung fibroblast (V79) cells. *Free Radic Biol Med.* 2001;30:686-698.
139. Conde de la Rosa L, Schoemaker MH, Vrenken TE, Buist-Homan M, Havinga R, Jansen PL, Moshage H. Superoxide anions and hydrogen peroxide induce hepatocyte death by different mechanisms: involvement of JNK and ERK MAP kinases. *J Hepatol.* 2006;44:918-929.
140. Tournier C, Thomas G, Pierre J, Jacquemin C, Pierre M, Saunier B. Mediation by arachidonic acid metabolites of the H₂O₂-induced stimulation of mitogen-activated protein kinases (extracellular-signal-regulated kinase and c-Jun NH₂-terminal kinase). *Eur. J Biochem.* 1997;244:587-595.
141. Wang Y, Sun L, Xia C, Ye L, Wang B. P38MAPK regulates caspase-3 by binding to caspase-3 in nucleus of human hepatoma Bel-7402 cells during anti-Fas antibody- and actinomycin D-induced apoptosis. *Biomed Pharmacother.* 2009;63:343-350.
142. Zhuang SG, Demirs JT, Kochevar IE. p38 Mitogen-activated Protein Kinase Mediates Bid Cleavage, Mitochondrial Dysfunction, and Caspase-3 Activation during Apoptosis Induced by Singlet Oxygen but Not by Hydrogen Peroxide. *J Biol Chem.* 2000;275(34):25939-25948.

143. Misra UK, Pizzo SV. Regulation of cytosolic phospholipase A2 activity in macrophages stimulated with receptor-recognized forms of alpha 2-macroglobulin: role in mitogenesis and cell proliferation. *J Biol Chem.* 2002;277:4069-4078.
144. Kusuhara M, Chait A, Cader A, Berk BC. Oxidized LDL stimulates mitogen-activated protein kinases in smooth muscle cells and macrophages. *Thromb Vasc Biol.* 1997;17:141-148.
145. Rajavashisth TB, Yamada H, Mishra NK. Transcriptional activation of the macrophage-colony stimulating factor gene by minimally modified LDL. Involvement of nuclear factor-Kappa B. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:1591-1598.
146. Biwa T, Hakamata H, Sakai M, Miyazaki A, Suzuki H, Kodama T, Shichiri M, Horiuchi S. Induction of murine macrophage growth by oxidized low density lipoprotein is mediated by granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *J. Biol. Chem.* 1998;273:28305-28313.
147. Bork RW, Swenson KL, Mehrabian M, Lulis AJ, Fogelman AM, Edwards PA. Mechanisms controlling competence gene expression in murine fibroblasts stimulated with minimally modified LDL. *Arterioscler Thromb.* 1992;12:800-806.
148. 't Hoen PA, Van der Lans CA, Van Eck M, Bijsterbosch MK, Van Berkel TJ, Twisk J. Aorta of ApoE-deficient mice responds to atherogenic stimuli by a prelesional increase and subsequent decrease in the expression of antioxidant enzymes. *Circ Res.* 2003;93:262-269.
149. Esworthy RS, Aranda R, Martín MG, Doroshov JH, Binder SW, Chu FF. Mice with combined disruption of Gpx1 and Gpx2 genes have colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2001;281:G848-855.
150. Guo Z, Van Remmen H, Yang H, Chen X, Mele J, Vijg J, Epstein C, Ho YS, Richardson A. Changes in expression of antioxidant enzymes affect cell-mediated LDL oxidation and oxidized LDL-induced apoptosis in mouse aortic cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:1131-1138.
151. Hamilton JA, Myers D, Jessup W, Cochrane F, Byrne R, Whitty G, Moss S. Oxidized LDL can induce macrophage survival, DNA synthesis, and enhanced proliferative response to CSF-1 and GM-CSF. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:98-105.
152. Martens JS, Reiner NE, Herrera-Velit P, Steinbrecher UP. Phosphatidylinositol 3-kinase is involved in the induction of macrophage growth by oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem.* 1998;273(9):4915-4920.
153. Rhee SG. Cell signaling. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science.* 2006;312:1882-1883.
154. Jiménez LA, Zanella C, Fung H, Janssen YM, Vacek P, Charland C, Goldberg J, Mossman BT. Role of extracellular signal-regulated protein kinases in apoptosis by asbestos and H₂O₂. *Am J Physiol.* 1997;273:1029-1035.
155. Buder-Hoffmann S, Palmer C, Vacek P, Taatjes D, Mossman B. Different accumulation of activated extracellular signal-regulated kinases (ERK 1/2) and role in cell-cycle alterations by epidermal growth factor, hydrogen peroxide, or asbestos in pulmonary epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001;24:405+413.
156. Blanc A, Pandey NR, Srivastava AK. Synchronous activation of ERK 1/2, p38mapk and PKB/Akt signaling by H₂O₂ in vascular smooth muscle cells: potential involvement in vascular disease (review). *Int J Mol Med.* 2003;11(2):229-234.
157. Hu Y, Dietrich H, Metzler B, Wick G, Xu Q. Hyperexpression and activation of extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) in atherosclerotic lesions of cholesterol-fed rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(1):18-26.

158. Birkenkamp KU, Tuyt LM, Lummen C, Wierenga AT, Kruijer W, Vellenga E. A dual function for p38 MAP kinase in hematopoietic cells: involvement in apoptosis and cell activation. *Br J Pharmacol.* 2000;131:99-107.
159. Huh J-E, Nam D-W, Baek Y-H, Kang JW, Park D-S, Choi D-Y, Lee J-D. Formononetin accelerates wound repair by the regulation of early growth response factor-1 transcription factor through the phosphorylation of the ERK and p38 MAPK pathways. *International Immunopharmacology.* 2011;11:46-54.
160. Crawley JB, Rawlinson L, Lali FV, Page TH, Saklatvala J, Foxwell BM. T cell proliferation in response to interleukins 2 and 7 requires p38MAP kinase activation. *J Biol Chem.* 1997;272(23):15023-15027.
161. Molnár A, Theodoras AM, Zon LI, Kyriakis JM. Cdc42Hs, but not Rac1, inhibits serum-stimulated cell cycle progression at G1/S through a mechanism requiring p38/RK. *J Biol Chem.* 1997;272(20):13229-13235.
162. Valledor AF, Comalada M, Xaus J, Celada A. The differential time-course of extracellular-regulated kinase activity correlates with the macrophage response toward proliferation or activation. *J Biol Chem.* 2000;275:7403-7409.
163. Comalada M, Xaus J, Sánchez E, Valledor A, Celada A. Macrophage colony-stimulating factor-, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-, or IL-3-dependent survival of macrophages, but not proliferation, requires the expression of p21(Waf1) through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *Eur J Immunol.* 2004;34(8):2257-2267.
164. Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2011;75(1):50-83.
165. Klotz LO, Pellieux C, Briviba K, Pierlot C, Aubry JM, Sies H. Mitogen-activated protein kinase (p38-, JNK-, ERK-) activation pattern induced by extracellular and intracellular singlet oxygen and UVA. *Eur. J Biochem.* 1999;260:917-922.
166. Guyton KZ, Liu Y, Gorospe M, Xu Q, Holbrook NJ. Activation of mitogen-activated protein kinase by H₂O₂. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem.* 1996;271:4138-4142.
167. Lander HM, Jacovina AT, Davis RJ, Tauras JM. Differential activation of mitogen-activated protein kinases by nitric oxide-related species. *J Biol Chem.* 1996;271:19705-19709.
168. Lupo G, Nicotra A, Giurdanella G, Anfuso CD, Romeo L, Biondi G, Tirolo C, Marchetti B, Ragusa N, Alberghina M. Activation of phospholipase A(2) and MAP kinases by oxidized low-density lipoproteins in immortalized GP8.39 endothelial cells. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1735:135-150.
169. Lupo G, Assero G, Anfuso CD, Nicotra A, Palumbo M, Cannavò G, Renis M, Ragusa N, Alberghina M. Cytosolic phospholipase A2 mediates arachidonoyl phospholipid hydrolysis in immortalized rat brain endothelial cells stimulated by oxidized LDL. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1585(1):19-29.
170. van Rossum GS, Klooster R, van den Bosch H, Verkleij AJ, Boonstra J. Phosphorylation of p42/44(MAPK) by various signal transduction pathways activates cytosolic phospholipase A(2) to variable degrees. *J Biol Chem.* 2001;276(31):28976-28983.

Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die mich auf vielfältige Weise bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Anhang

Teile der Ergebnisse dieser Arbeit werden in folgende Publikationen eingehen

Macrophages as main source of glutathione peroxidase-1 in murine atherosclerotic lesions: implications for atherogenesis (noch nicht publiziert)

Publikationen

1. Torzewski M, Ochsenhirt V, Kleschyov AL, Oelze M, Daiber A, Li H, Rossmann H, Tsimikas S, Reifenberg K, Cheng F, Lehr HA, Blankenberg S, Förstermann U, Münzel T, Lackner KJ. Deficiency of glutathione peroxidase-1 accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 (27):850-7
2. Torzewski M, Reifenberg K, Cheng F, Wiese E, Küpper I, Crain J, Lackner KJ, Bhakdi S. No effect of C-reactive protein on early atherosclerosis in LDLR^{-/-} / human C-reactive protein transgenic mice. *Thromb Haemost.* 2008 (99):196-201
3. Torzewski M, Navarro B, Cheng F, Canisius A, Schmit T, Bhakdi S, Urban R, Lackner KJ. Investigation of Sudan IV staining areas in aortas of infants and children: possible prelesional stages of atherogenesis. *Atherosclerosis.* 2009 (206):159-67
4. Reifenberg K, Cheng F, Orning C, Crain J, Küpper I, Wiese E, Protschka M, Blessing M, Lackner KJ, Torzewski M. Overexpression of TGF- β 1 in Macrophages Reduces and Stabilizes Atherosclerotic Plaques in ApoE-Deficient Mice. *PLoS One.* 2012 (7):e40990

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten und nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegen.

Mainz, den 24.05.2012

Fei Cheng