

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
Der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl

Wirkung atherogener Lipoproteine
auf den Zellzyklus von Endothelzellen

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg
vorgelegt von
Annette Dorothea Buck, geb. Schürle
aus München

Würzburg, Mai 2006

Referent: Univ.- Prof. Dr. med. J. Galle

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. M. Gekle

Dekan: Univ.- Prof. Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 09.08.2006

Die Promovendin ist Ärztin der Humanmedizin

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

I Einleitung	1
I.1 Die Atherosklerose.....	1
I.1.1 Definition der Atherosklerose	1
I.1.2 Die Atherogenese als stadienhafter Verlauf.....	2
I.2 Die Lipoproteine	4
I.2.1 Der Lipoproteinmetabolismus und seine Bedeutung für die Atherogenese	4
I.2.2 Der Einfluss von oxidiertem low density Lipoprotein auf die Atherogenese ...	5
I.3 Der Zellzyklus.....	7
I.3.1 Definition des Zellzyklus	7
I.3.2 Zellzyklusregulierende Proteine.....	9
I.3.3 Die Rolle von p27 ^{Kip1} im Zellzyklus.....	10
I.4 Zielsetzung.....	11
II Material und Methoden	12
II.1 Material.....	12
II.1.1 Chemikalien und Reagenzien.....	12
II.1.2 Zellkultur.....	13
II.1.3 Antikörper und Oligonukleotide	13
II.1.4 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	13
II.1.5 Lösungen und Kits	14
II.2 Methoden.....	15
II.2.1 Die Zellkultur	15
II.2.2 Die Isolation und Oxidation von LDL	15
II.2.3 Die Bestimmung der Proliferation von HUVEC	16
II.2.3.1 Der 3H-Thymidin-Assay	16
II.2.3.2 Der MTT-Assay	17
II.2.3.3 Die Zellzählung.....	17
II.2.4 Bestimmung der LDH-Freisetzung.....	17

II.2.5 Detektion der p27 ^{Kip1} -Expression durch eine Western Blot-Analyse	17
II.2.6 Die Antisense-Oligonukleotid-Technik	19
II.2.6.1 Das Oligonukleotid-Design.....	20
II.2.7 Regulation der p27 ^{Kip1} -Expression durch transiente Transfektion von HUVEC mit Antisense Oligonukleotiden	21
II.2.8 Bestimmung der Transfektionseffizienz in der Durchflusszytometrie	21
II.2.9 Beurteilung der Transfektion mit Oligonukleotiden an einem Konfokal-Laser-Mikroskop.....	22
II.2.10 Statistik.....	23
III Ergebnisse	24
III.1 Zellkultur HUVEC	24
III.2 Proliferation humaner Endothelzellen nach Inkubation mit OxLDL.....	25
III.2.1 Messung der Proliferation von HUVEC mittels 3H-Thymidin-Assay	25
III.2.2 Messung der Proliferation von HUVEC mittels Zellzählung.....	27
III.2.3 Messung der Proliferation von HUVEC mittels MTT-Assay	28
III.3 Bestimmung der Transfektionseffizienz von Oligonukleotiden in der FACS-Analyse.....	29
III.4 Einfluss einer Inkubation mit OxLDL und einer Transfektion mit Antisense-Oligonukleotiden auf die LDH-Freisetzung von Endothelzellen.....	33
III.5 Darstellung der Transfektion von Oligonukleotiden an einem Konfokalmikroskop.....	34
III.6 Einfluss von oxidiertem LDL auf die Proteinexpression von p27 ^{Kip1}	36
III.7 Western Blot-Analyse der Proteinexpression von p27 ^{Kip1} nach Transfektion mit Oligonukleotiden und Inkubation mit OxLDL.....	38
III.8 3H-Thymidin-Inkorporation nach Transfektion mit Oligonukleotiden und Stimulation mit OxLDL	39
III.9 MTT-Assay nach Transfektion mit Oligonukleotiden und Stimulation mit OxLDL	39
IV Diskussion	42
IV.1 OxLDL stimuliert die Proliferation humaner Endothelzellen.....	42
IV.2 P27 ^{Kip1} als Vermittler mitogener Signale des Zellzyklus.....	43

IV.3 Einfluss von OxLDL auf die Proteinexpression von p27 ^{Kip1}	44
IV.4 Inhibition der p27 ^{Kip1} -Expression durch Antisense-Oligonukleotid-Transfektion in HUVEC	46
IV.5 Untersuchung der Proliferationsinduktion durch OxLDL nach Reduktion der p27 ^{Kip1} -Expression mittels Antisense-Oligonukleotid-Transfektion	47
IV.6 Die Zytotoxizität von OxLDL.....	48
IV.7 Klinische Aspekte	49
V Zusammenfassung	50
VI Literaturverzeichnis.....	51
Danksagung	
Lebenslauf	

Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammonium Peroxydisulfat
BSA	Bovines Serum Albumin
CD	Cluster of differentiation
CuSO ₄	Kupfersulfat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBM	Endothelial Cell Basal Medium
ECL	Enhanced ChemiLuminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
FACS	Fluorescence activated cell sorter / Durchflußzytometrie
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluoreszinoisothiocyanat
h	Stunde
H	Wasserstoff
H ₂ O	Wasser
HCL	Wasserstoffchlorid
HDL	High density Lipoprotein
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
IDL	Intermediate density Lipoprotein
LDH	Lactatdehydrogenase
LDL	Low density Lipoprotein
mA	Milliampère
MBq	Megabequerel
µl	Mikroliter
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2Thiazyl)-2,5-Diphenyl-2H-Tetrazolium Bromid
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
ODN	Oligonukleotide
OxLDL	Oxidiertes low density Lipoprotein

PBS	Phosphate buffered saline
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
Tween	Polyoxyethylensorbitanmonolaurate
VLDL	Very low density Lipoprotein

I Einleitung

I.1 Die Atherosklerose

I.1.1 Definition der Atherosklerose

Die Atherosklerose ist ein Sammelbegriff für Arterienerkrankungen, bei denen ein fibröser Umbau zu einer Verdickung, Verhärtung und Elastizitätsverlust der Gefäßwand führt (Riede et al. 1995). Ihre wichtigste Manifestationsform ist die Atherosklerose (Hach-Wunderle 2001), die die größeren Arterien vom elastischen und muskulären Typ betrifft. Die Atherosklerose kann zu den epidemiologisch relevanten Krankheitsbildern der koronaren Herzerkrankung, cerebralen und peripher vaskulären Erkrankungen führen. Der Herzinfarkt als Folge einer koronaren und der Schlaganfall als Folge einer zerebralen Durchblutungsstörung stehen dabei in der Mortalitätsstatistik der westlichen Industrienationen mit an vorderster Stelle (Statistisches Bundesamt Deutschland 2005). Da es sich bei der Atherosklerose um einen über Jahre ablaufenden Prozess handelt, kommt der Minimierung von Risikofaktoren in präventiver Hinsicht besondere Bedeutung zu. In groß angelegten Studien (Framingham Heart Study, PROCAM) konnten bislang folgende Risikofaktoren der Atherosklerose identifiziert werden: Alter, Arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Nikotinabusus, eine positive Familienanamnese für eine frühzeitige koronare oder cerebrale Gefäßerkrankung und eine Dyslipidämie (Assmann et al. 1996). Eine Dyslipidämie liegt bei erhöhtem LDL oder Gesamtcholesterin und erniedrigtem HDL-Serumspiegel vor. Neben diesen voneinander unabhängigen Hauptrisikofaktoren wurden in den letzten Jahren einige weitere Faktoren identifiziert, die zu einer Atherosklerose prädisponieren. Dazu zählen ethnische Charakteristika, psychosoziale Variablen, Postmenopause, Infektion mit Chlamydia pneumoniae und anderen Erregern, Stress, Bewegungsmangel, Adipositas, erhöhtes Serumtriglyzerid, erhöhtes Serumlipoprotein (a), Hyperhomozysteinämie, Hyperfibrinogenämie und Entzündungsmarker wie CRP (Frohlich et al. 2002, Fruchart et al. 2004).

I.1.2 Die Atherogenese als stadienhafter Verlauf

Die Atherogenese ist nicht nur eine Anhäufung von Lipiden (Ross 1999), sondern ein komplexer chronischer, teilweise reversibler proliferativer und inflammatorischer Prozess der Gefäßzellen. Als pathogenetisches Modell dient die „response-to-injury“-Hypothese, die 1986 von Ross aufgestellt wurde und 1993 und 1999 von ihm modifiziert wurde. Demnach führt die wiederholte und andauernde Schädigung des Gefäßendothels zur pathologischen Kompensationsreaktion der Atherosklerose. Das Endothel kann dabei durch eine Vielzahl von Faktoren geschädigt werden, wie Bluthochdruck, lokaler Wirbelbildung, lokalem Sauerstoffmangel und Änderung der Blutzusammensetzung, z.B. erhöhtes Cholesterin.

Die Atherogenese verläuft stadienhaft:

Am Beginn steht eine endotheliale Dysfunktion. Hierbei führt eine Endothelschädigung zu einer gestörten Endothelfunktion im Rahmen der Aufrechterhaltung des Gefäßtonus durch verminderte Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO), sowie eine vermehrte Freisetzung von Superoxidanionen durch oxidiertes LDL (Galle et al. 2000). Die Folge ist eine Vasokonstriktion. Außerdem können geschädigte Endothelzellen die Blutplättchen- und Leukozytenadhäsion, die Hemmung der Migration und Proliferation glatter Muskelzellen und das Eindringen von LDL sowie die Degradation von VLDL nicht mehr regulieren (Nickening et al. 2004).

Im zweiten Stadium der „Fettstreifen“-Läsionen („fatty streak“) kommt es über eine Permeabilitätssteigerung der Endothelzellen zu einem Intimaödem mit Einlagerung von Lipoproteinen in die Gefäßwand. Dabei ist die Einlagerung der Lipoproteine in den subendothelialen Raum von der Konzentration der Lipoproteine abhängig und bedarf keiner rezeptorvermittelten Endozytose (Steinberg et al. 1989, Young et al. 1994). Makrophagen, glatte Muskelzellen und T-Lymphozyten wandern konsekutiv ein. Die beteiligten Zellen produzieren nach Aktivierung eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, Hormonen und Zytokinen. Diese bewirken eine weitere Akkumulation von Makrophagen in der Gefäßwand und eine Proliferation glatter Muskelzellen. Tief in den „Fettstreifen“ liegende glatte Muskelzellen können apoptotisch werden, was eine weitere Makrophagen-Invasion zur Folge hat (Kockx et al. 1998). Es entsteht eine so

genannte Neointima. Durch Phagozytose der im Überschuss vorhandenen Lipoproteine wandeln sich die Makrophagen charakteristischerweise zu Schaumzellen um. Übersteigt das extrazellulär verbleibende LDL die Phagozytose-Kapazität der Makrophagen, wird das verbleibende LDL oxidiert und damit toxisch verändert. In oxidiert Form wird es unreguliert über einen Scavenger Rezeptor von den Makrophagen aufgenommen (Creutzig 2004). Wie Autopsiestudien zeigten, können bereits in der Kindheit erste Stadien einer atherosklerotischen Läsion in Form von „Fettstreifen“ (Fatty streaks) gefunden werden (Strong et al. 1999). Sie nehmen mit dem Alter zu und sind mit den kardiovaskulären Risikofaktoren assoziiert (McGill et al. 2000).

Im fibrösen Plaquestadium setzen sich die Einwanderung von Makrophagen und T-Lymphozyten, sowie die Proliferation glatter Muskelzellen fort. Dies geht mit einer Anlagerung von Thrombozyten, Kollagen, Proteoglykanen sowie einer gesteigerten Produktion extrazellulärer Matrix einher. Es bildet sich eine Nekrose zentral aus. Eine Kalzifizierung kann um die Nekrose herum auftreten. Diese Plaque wird auch Atherom genannt. Durch Ansammlung von zellulären und azellulären Elementen kann sie im Gefäßlumen raumfordernd wirken. Meist werden solche Plaques durch eine fibröse Kappe und einer darüber liegenden Endothelschicht von dem Gefäßlumen abgegrenzt.

Es folgt das Stadium der fortgeschrittenen Plaqueläsion: Durch Fortbestehen der Entzündungsprozesse wird die Plaque zunehmend instabil. Die Entzündung ist längst nicht mehr protektiv, d.h. zur Beseitigung eines schädlichen Agens, sondern wurde durch die entzündliche, fibroproliferative Reaktion zu einem eigenen Krankheitsprozess. Bei Progression oben aufgeführter Prozesse kann das Atherom durch Verkalkung, Ulzeration, Thrombenbildung oder durch alleinige Größenzunahme zu einer Gefäßstenose führen und damit klinisch manifest werden.

I.2 Die Lipoproteine

I.2.1 Der Lipoproteinmetabolismus und seine Bedeutung für die Atherogenese

Lipoproteine bestehen aus verestertem und unverestertem Cholesterin, Triglyceriden und den lösungsvermittelnden Phospholipiden und Proteinen. Der Proteinanteil wird Apolipoprotein oder auch Apoprotein bezeichnet. Die verschiedenen Apolipoproteine dienen als Kofaktoren für Enzyme und als Liganden für Rezeptoren.

Lipoproteine werden nach ihrer Dichte in fünf Hauptgruppen eingeteilt:

Die Chylomikronen, das very low density Lipoprotein (VLDL), das intermediate density Lipoprotein (IDL), das low density Lipoprotein (LDL) und das high density Lipoprotein (HDL).

Der Lipoproteinmetabolismus kann in einen exogenen und in einen endogenen Stoffwechselfad eingeteilt werden. Der exogene Pfad beginnt mit der intestinalen Absorption von Cholesterin und Fettsäuren. In den Enterozyten werden freie Fettsäuren mit Glycerol zu Triglyceriden verknüpft. Das Cholesterin wird durch die Acyl-Cholesterol-Acyltransferase zu Cholesterinester verestert. Cholesterinester und Triglyceride lagern sich zu Chylomikronen zusammen und werden mit der Lymphe in die Peripherie transportiert. Dort werden von den Chylomikronen freie Fettsäuren durch die endothelständige Lipoproteinlipase hydrolysiert und zur Energiegewinnung genutzt oder im Fettgewebe gespeichert. Der Rest der nun cholesterinreichen Chylomikronen wird von der Leber aufgenommen.

Der endogene Stoffwechselweg des Lipidmetabolismus beginnt mit der Synthese von VLDL in der Leber. Die Funktion der VLDL ist der Transport von Lipiden aus der Leber in die extrahepatischen Gewebe. VLDL enthalten einen Kern aus Triglyceriden (60% des Gewichts) und Cholesterinester (20% des Gewichts). Durch Hydrolyse der Triglyceride in der Peripherie entstehen IDL. Diese werden wieder von der Leber aufgenommen und in LDL umgewandelt. LDL dienen dem Transport von Cholesterin in die extrahepatischen Gewebe. LDL enthalten einen Kern von Cholesterinester und nur eine geringe Menge an Triglyceriden. HDL hingegen haben die Aufgabe, Cholesterin aus dem extrahepatischen Gewebe zur Leber zu transportieren. Darin wird im Allgemeinen die antiatherogene Wirkung von HDL gesehen.

An der Oberfläche von low density Lipoproteinen findet sich das Apolipoprotein B-100, ein Ligand für den LDL-Rezeptor AO B/E. LDL kann sowohl von hepatischem als auch extrahepatischem Gewebe aufgenommen werden. Hepatisches LDL kann zu Gallensäuren umgewandelt werden und so in das Darmlumen sezerniert werden. LDL, das von extrahepatischem Gewebe aufgenommen wurde, kann für die Synthese von Steroidhormonen und Zellmembranen verwendet werden oder in veresterter Form gespeichert werden.

Die zelluläre Aufnahme von LDL wird über einen negativen Feedback-Mechanismus des LDL-Rezeptors reguliert. Zellen mit positiver Cholesterin-Balance unterdrücken die Rezeptorexpression. Umgekehrt führt ein verminderter Gehalt an Cholesterin in der Zelle zu einer vermehrten Expression des LDL-Rezeptors und so zu einer vermehrten Aufnahme von Cholesterin in die Zelle. Das wiederum führt zu einer Reduktion der Plasmacholesterinkonzentration. Zuletzt genannter Mechanismus wirkt auch bei therapeutischer Senkung des Cholesterins mittels der 3-Hydroxy-3methyl-Glutarsäure (HMG-CoA)-Reduktase-Hemmer.

Zirkulierendes LDL kann zudem über einen unregulierten Scavenger-Rezeptor in Makrophagen und einige andere Gewebe gelangen. Dieser Aufnahmeweg kann zu massiver intrazellulärer Anreicherung von Cholesterin führen und damit zur Bildung von so genannten Schaumzellen („foam cells“) (Febbraio et al. 2001). Schaumzellen tragen wesentlich zu einer atheromatösen Plaquebildung bei. Der wichtigste dieser Scavenger-Rezeptoren scheint CD36 zu sein, der auch als Scavenger-Rezeptor B bezeichnet wird (Endemann et al. 1993). Eine Aufnahme durch diesen Rezeptor setzt die chemische Modifikation der LDL-Partikel voraus durch enzymatische, nicht-oxidative Veränderungen (Klouche et al. 2000), Oxidation (Witzum 1994), Glykosilierung oder Glycooxidation.

I.2.2 Der Einfluss von oxidiertem low density Lipoprotein auf die Atherogenese

Eine Oxidation von LDL kann in verschiedenen Zellen innerhalb der Arterie auftreten, z.B. in Endothelzellen, Makrophagen, glatten Muskelzellen und T-Lymphozyten. Durch einen Oxidationsprozess wird die Aminosäure Lysin des Apoproteins B modifiziert. Es wird angenommen, dass die oxidative Modifikation von LDL vorwiegend in Mikrodomänen der Intima stattfindet, da diese von Antioxidantien des Plasmas nicht

erreicht werden (Steinberg et al. 1989). Im Plasma ist LDL gerade wegen der vielen Antioxidantien wahrscheinlich nur in geringem Ausmaß oxidiert. Außerdem wird modifiziertes LDL rasch durch hepatische Sinuszellen entfernt, da diese über reichlich Scavenger-Rezeptoren verfügen (Witzum 1994). Eine Oxidation von LDL hat die Bildung von Isoprostanen zur Folge. Dies sind chemisch stabile, durch freie Radikale katalysierte Produkte der Arachnidonsäure. Es sind strukturelle Isomere der konventionellen Prostaglandine (Morrow et al. 1990).

Verschiedene Mechanismen wurden bislang identifiziert, über die oxidiertes LDL die Atherosklerose-Entstehung fördert: OxLDL bewirkt über Aktivierung und Induktion von Adhäsionsmolekülen, wie Monocyte- β 1-integrin, Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) (Libby et al. 2002), Monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) (Cushing et al. 1990), Makrophagen Kolonie-Stimulierender Faktor (M-CSF), Granulozyten Kolonie-Stimulierender Faktor (G-CSF) (Rajavashisth et al. 1990) eine vermehrte Bindung von Monozyten und T-Zellen an das Endothel. Monozyten entwickeln sich daraufhin zu Gewebemakrophagen. Zusätzlich reduziert OxLDL die Mobilität von Makrophagen, so dass diese in der Gefäßwand verbleiben. Bei erhöhtem LDL-Cholesterinspiegel kommt es schließlich zu einer massiven Akkumulation von modifiziertem LDL in Makrophagen. Diese mit Cholesterin angereicherten Zellen wandeln sich zu Schaumzellen um. Solche Schaumzellen können platzen und damit OxLDL, intrazelluläre Enzyme und Sauerstoffradikale freisetzen, die die Gefäßwand weiter schädigen können. Die Wirkung von OxLDL auf Monozyten besteht des Weiteren in einer Stimulation der Interleukin-1-Sekretion, welches wiederum die Proliferation von glatten Muskelzellen anregt (Witzum 1994). Die Arbeitsgruppe um Witzum beschäftigte sich auch mit der Immunogenität von OxLDL. Demnach finden sich im Plasma und in Plaqueläsionen Antikörper gegen Epitope von OxLDL. Zusätzlich wurden CD4-positive Zellen aus humanen atherosklerotischen Plaques isoliert. Bei Exposition mit OxLDL proliferieren bis zu 10% dieser Klone und setzen Zytokine frei. Somit induziert OxLDL sowohl eine humorale als auch zellvermittelte Immunantwort, wie es typisch für entzündliche Läsionen ist (Witzum 1994).

Bei hohen Cholesterinspiegeln kann es durch vermehrte Produktion von freien Sauerstoffradikalen zu einer Inaktivierung von NO kommen. Daneben hat OxLDL

einen direkten inhibitorischen Effekt auf die endothelabhängige Vasodilatation (Mangin et al. 1993). Über eine Inhibition der NO-Synthese durch OxLDL kommt es zu einer Vasokonstriktion (Yang et al. 1994).

Des Weiteren verursacht OxLDL eine verstärkte Plättchenaggregation und Thromboxanfreisetzung. Dies trägt zu einer Vasokonstriktion und intravaskulären Thrombusbildung bei. An Endothelzellen (Drake et al. 1991 und Fei et al. 1993) und Monozyten (Brand et al. 1994) bewirkt OxLDL außerdem die Expression von hohen Mengen an Gewebefaktor und Plasminogen Aktivator Inhibitor (Latron et al. 1991).

Nicht zuletzt kann stark oxidiertes LDL die Endothelzellmigration inhibieren und dadurch möglicherweise die Heilung von ulzerierten Plaques in fortgeschrittenen Läsionen hemmen (Murugesan et al. 1993). Klinische Studien zeigten, dass bei gleicher Serumkonzentration von Gesamtcholesterin, HDL und LDL der OxLDL-Spiegel mit dem Schweregrad eines akuten Koronarsyndroms korreliert und dass die am stärksten betroffenen Läsionen einen höheren Prozentsatz an OxLDL-positiven Makrophagen enthalten (Ehara et al. 2001).

Therapeutisch eingesetzte Cholesterinsenker und Antioxidantien, die eine LDL-Oxidation mindern, können manche dieser Veränderungen nicht nur verhindern, sondern sogar teilweise rückgängig machen.

I.3 Der Zellzyklus

I.3.1 Definition des Zellzyklus

Der Zellzyklus dient der Regulation von Proliferation, Apoptose und Differenzierung von Zellen. Der Zellzyklus stellt eine kontrollierte Abfolge von Ereignissen dar, die in allen eukaryotischen Zellen beinahe identisch ablaufen. Es ist ein irreversibler Prozess, der nur in eine Richtung ablaufen kann. Der Zellzyklus wird in verschiedene Phasen unterteilt: Sich nicht teilende, d.h. ruhende Zellen befinden sich in der G₀-Phase. Sie treten in den Zellzyklus in die G₁-Phase ein. G₁ (Gap 1) ist eine Wachstumsperiode mit vermehrter Protein- und RNA-Synthese, während der sich die Zelle auf die DNA-Synthese vorbereitet. Während der S-Phase (DNA-Synthese) wird das genetische Material repliziert. Schließlich wird in der G₂-Phase (Gap 2) die DNA-Replikation überprüft, und Fehler werden korrigiert (Harrison's 1998). Diese ersten drei Phasen

werden auch als Interphase bezeichnet. Während der M-Phase (Mitose) werden die replizierten Chromosomen separiert, so dass zwei neue Nuklei entstehen. Das Zytoplasma wird durch die Zytokinese auf die beiden Tochterzellen verteilt. Damit ist die Zellteilung beendet. Im Anschluss kann die Zelle erneut in den Zellzyklus eintreten oder in die G0-Phase übertreten und damit den Zellzyklus verlassen.

Rasch proliferierende humane Zellen teilen sich innerhalb 24h. Der Zellzyklus von HUVEC, die als Testzellen in der vorliegenden Arbeit dienten, dauert etwa 22 Stunden: Die G1-Phase benötigt ca. 10-12 Stunden, die S-Phase etwa 6 Stunden, die G2-Phase etwa 4 Stunden und die Mitose etwa 1 Stunde (Clonetics, Walkersville, MD, USA). Die meisten differenzierten Zellen sind so genannte postmitotische Zellen, die nicht mehr in den Zellzyklus eintreten, z.B. Neurone. Einige differenzierte Zellen können jedoch nach entsprechender Stimulation erneut in den Zellzyklus eintreten, wie z.B. Fibroblasten oder Lymphozyten.

Während der späten G1-Phase stellt der Restriktionspunkt einen entscheidenden Augenblick im Ablauf des Zellzyklus dar (Pardee 1989). Danach reagieren Zellen nicht mehr auf extrazelluläre Signale, sondern vollenden den Zellzyklus unter alleiniger Kontrolle von Zellzyklusproteinen (Shankland et al. 2000). Werden jedoch Wachstumsfaktoren vor Erreichen des Restriktionspunktes entzogen, kommt es zum Abbruch des Zellzyklus in der G1-Phase.

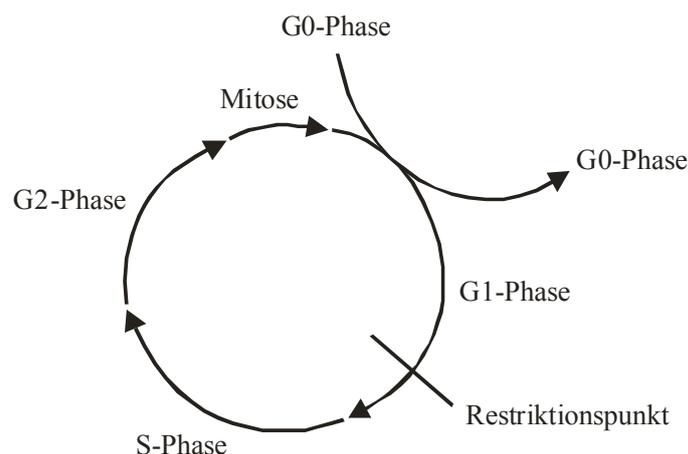


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Zellzyklus

I.3.2 Zellzyklusregulierende Proteine

Der Zellzyklus wird letztlich von bestimmten Zellzyklusproteinen kontrolliert. Diese finden sich vorwiegend im Nukleus. Der Übergang von einer Phase des Zellzyklus in die Nächste wird von Enzymen reguliert, die sich aus zwei Untereinheiten zusammensetzen: den Zyklinen und den Zyklin-abhängigen Kinasen (CDK) (Morgan 1995). Zyklone haben eine sehr kurze Halbwertszeit von 30-60 Minuten. Ihre Expression variiert mit dem Ablauf des Zellzyklus (Pardee 1989). Im Gegensatz dazu werden Zyklin-abhängige Kinasen konstitutiv exprimiert, so dass ihre Konzentrationen während des gesamten Zellzyklus typischerweise konstant sind (Lees 1995). CDKs werden allerdings erst nach Bindung eines Zyklins enzymatisch aktiv. Es sind derzeit sieben verschiedene CDKs beschrieben, von denen jede mit einem bestimmten Zyklin-Molekül assoziiert. Die resultierenden Komplexe besitzen eine Substratspezifität.

Die Aktivität von CDKs wird zusätzlich von CDK-Inhibitoren (CKI) reguliert (Peter et al. 1994). Eine Inhibition der Aktivität von Zyklin-CDK-Komplexen durch spezifische Bindung einer CKI führt zu einem Zellzyklusarrest (Shankland et al. 1999). CKIs sind relativ kleine Proteine, die jeweils nach ihrem Molekulargewicht benannt wurden. Aufgrund von strukturellen (Shankland 1997) und funktionellen Homologien können zwei Familien von CKIs unterschieden werden: $p21^{Cip1/Waf1}$, $p27^{Kip1}$ und $p57^{kip2}$ inhibieren ganz allgemein die CDK-Aktivität. $p16^{INK4a}$, $p15^{INK4b}$, $p18$ und andere hemmen hingegen selektiv Zyklin D/CDK-4 oder -6 Komplexe.

CKIs können durch Wachstumsinhibitoren, wie beispielsweise Transforming Growth Factor Beta (TGF- β), induziert werden. Sie können jedoch auch selbst durch Wachstumsstimulatoren, wie Interleukin 2, inhibiert werden.

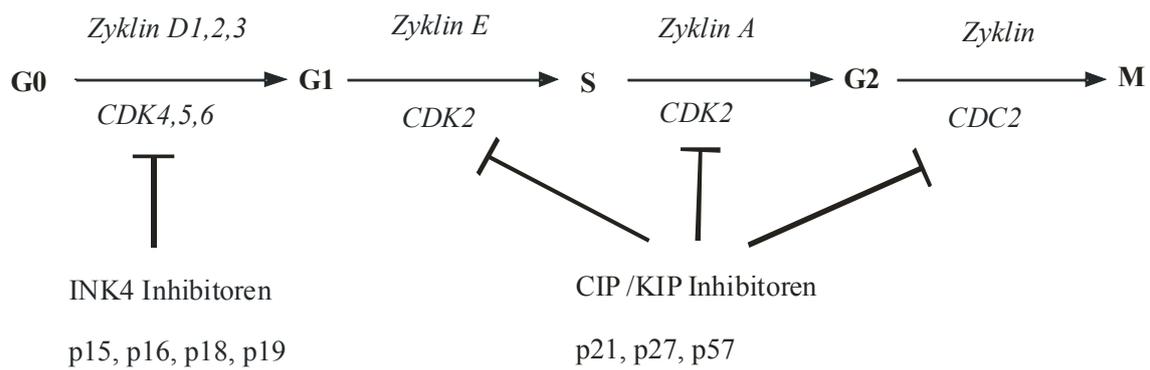


Abbildung 2: Schematische Darstellung wichtiger zellzyklusregulierender Proteine

I.3.3 Die Rolle von p27^{Kip1} im Zellzyklus

P27^{Kip1} ist ein 27kDa Protein und wird vermehrt in nicht-proliferierenden, also ruhenden Zellen exprimiert (Sherr CJ 2000). P27^{Kip1} wird nach Transkription durch Modulation der Translation und Degradation mittels der Ubiquitin-Proteolyse reguliert (Toyoshima et al. 1994). Zusätzlich kann p27^{Kip1} nach Translation durch eine Phosphorylierung modifiziert werden (Sheaff et al. 1997). P27^{Kip1} spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Übergangs von der G1-Phase in die S-Phase des Zellzyklus, indem es CDK4/6-Zyclin D1 und CDK2-Zyclin E inhibiert (Sherr et al. 1995). Damit eine Zelle den Zellzyklus durchläuft, ist es erforderlich, dass die p27^{Kip1}-Konzentration vor Erreichen des Restriktionspunktes erniedrigt ist (Coats et al. 1996). In diesem Fall kann die Zelle entweder in die Mitose eintreten oder bei Mangel von Wachstumsfaktoren apoptisch werden. Andernfalls kommt es zu einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase.

Die Interaktion von p27^{Kip1} mit Zyclin-CDK-Komplexen ist jedoch noch weitaus komplizierter als ursprünglich angenommen. Denn p27^{Kip1} kann für E-CDK2 sowohl ein Inhibitor als auch ein Substrat sein. In der G0-Phase kann p27^{Kip1} Zyclin E-CDK2 inhibieren. Nach Wachstumsfaktor-vermittelter Aktivierung von Zyclin D-CDK4, bindet p27^{Kip1} jedoch bevorzugt an diesen Komplex. Daraus resultiert eine Aktivierung von Zyclin E-CDK2 mit nachfolgender Phosphorylierung von p27^{Kip1}. Dies verstärkt die Degradation von p27^{Kip1} (Sheaff et al. 1997) und führt schließlich zu einer

Aktivierung von weiterem Zyklin E-CDK2 und dadurch zu einer Förderung der G1-Progression.

I.4 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, ob OxLDL die Proliferation von Endothelzellen induziert. In einem zweiten Schritt sollte die Hypothese überprüft werden, dass OxLDL die Proliferation von Endothelzellen durch Modulation des Zellzyklusinhibitors p27^{Kip1} vermittelt.

An einem HUVEC-Zellkulturmodell sollte ein möglicher proliferationsstimulierender Effekt von OxLDL-Molekülen untersucht werden. Die Proliferationskinetik wurde hierfür in einem 3H-Thymidin-Assay, einer Zellzählung und in einem MTT-Assay evaluiert. Die Modulation der p27^{Kip1}-Expression durch OxLDL wurde in einer Western Blot-Analyse dargestellt. HUVEC wurden liposomenvermittelt mit Antisense-Oligonukleotiden transfiziert. Die Transfektionseffizienz wurde in einer FACS-Analyse gemessen. Die zelluläre Aufnahme der Oligonukleotide zusätzlich mikroskopisch beurteilt. Die Inhibition der p27^{Kip1}-Proteinexpression mittels Antisense-Oligonukleotiden sollte zunächst in einer Western Blot-Analyse überprüft werden. Schließlich wurde an transfizierten Zellen die Proliferation nach OxLDL-Stimulation mit dem 3H-Thymidin-Assay und dem MTT-Assay gemessen.

Die Ergebnisse sollten dazu führen, den Mechanismus der Atherogenese weiter aufzuklären.

II Material und Methoden

II.1 Material

II.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Acrylamid	Sigma, Taufkirchen
APS	Sigma, Taufkirchen
Aqueous Counting Scintillant ACSII	Amersham, Braunschweig
Auftragspuffer Roti®-Load1	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Chloroform	Fluka, Buchs SG, Schweiz
DMSO	Sigma, Taufkirchen
ECL™ Anti-mouse IgG, peroxidase-linked species-specific whole antibody NA 931	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg
EDTA	Sigma, Taufkirchen
Ethanol	Baker JT, Griesheim
Glycin	Sigma, Taufkirchen
HCL	Merck, Darmstadt
3H-Thymidin Code-Nr. TRK 758	Amersham, Braunschweig
Isoton® II Diluent	Coulter Electronics GmbH, Krefeld
Isopropanol	Sigma, Taufkirchen
Methanol	JT Baker, Griesheim
Novex™	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
PBS	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Phenol-TE-gesättigt	Sigma, Taufkirchen
Ponceau S Solution 0,1%	Sigma, Taufkirchen
Propidium-Jodid	Sigma, Taufkirchen
Proteinase K	Sigma, Taufkirchen
Rainbow Proteinmarker	Amersham Pharmacia Biotech
Seebblue® Pre-Stained Standard	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
SDS	Sigma, Taufkirchen
Serum Albumin bovine purified	Dade Behring Marburg GmbH, Marburg
TEMED	Sigma, Taufkirchen
Tris	Merck, Darmstadt

Triton x-100
Trypsin

Sigma, Taufkirchen
PAA Laboratories GmbH, Cölbe

II.1.2 Zellkultur

Brutschrank
FCS
HUVEC

Heraeus instruments GmbH, Hanau
Biochrom AG seromed®, Berlin
Clonetics, jetzt Cambrex, Verviers,
Belgien

Lipofectin®

Life Technologies GmbH,
Eggenstein-Leopoldshafen

OptiMEM®

Life Technologies GmbH,
Eggenstein-Leopoldshafen

Six-wells, 96er-wells, Kryotubes

NUNC GmbH & Co. KG,
Wiesbaden

Zeiss Axiovert 25 Mikroskop

Carl Zeiss Jena GmbH, Jena

Zellkulturgefäß 75cm²

Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Zellkulturmedium

PromoCell, Heidelberg

Zellkulturzusätze

PromoCell, Heidelberg

II.1.3 Antikörper und Oligonukleotide

Anti-Mouse IgG, horseradish peroxidase
linked whole antibody from sheep
CD31 Fluorescein Isothiocyanate-Conjugated
Mouse Anti-Human Monoclonal Antibody
Monoclonal Anti-β-Actin Clone
AC-15 Mouse IgG1 isotype
Oligonukleotide FITC-markiert
Purified Mouse Anti-p27^{kip1} IgG1

Amersham Life Science,
Braunschweig
BD Pharmingen, Heidelberg
Sigma, Taufkirchen
Interactiva Ulm
BD Pharmingen, Heidelberg

II.1.4 Geräte und Verbrauchsmaterialien

β-Counter
Coulter® Particle count and size analyser

Canberra Packard GmbH, Dreieich
Coulter Electronics GmbH, Krefeld

Densitometer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Quantity One	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Elisa-Reader TECAN Spectran	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim
Eppendorf-Tubes	Eppendorf AG, Hamburg
FACS-Gerät	Beckton-Dickinson, Heidelberg
Filme	Fuji Film (Europe) GmbH, Düsseldorf
Laser-Konfokalmikroskop	Leica, Solms
Mikroskopische Deckgläschen rund 24mm	Assistent Deutschland
Nitrocellulose-Membran Filter Paper Sandwich	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Objektträger	Menzel-Glaser
Photometer UV/ VIS Spectrometer Lambda 12	Perkin Elmer GmbH, Rodgau- Jügesheim
„Roth-Messflaschen“ für Photometer	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Sonopuls Homogenisator HD	Bandelin elektronik GmbH & Co KG, Glattbach
Zentrifuge Megafuge 10R	Heraeus Instruments GmbH, Hanau

II.1.5 Lösungen und Kits

Lipidophor electrophoresis kits	Immuno, Heidelberg
MTT Cell Proliferation Kit I	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Protein Assay Kit	Sigma Diagnostics Firmengruppe, Taufkirchen

II.2 Methoden

II.2.1 Die Zellkultur

Humane Nabelschnurendothelzellen aus der Vene (HUVEC) wurden in der 1. Passage von der Firma Clonetics bezogen. Die Zellen wurden in einem Brutschrank bei 37°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 100% und einem CO₂-Gehalt von 5% kultiviert. Die Kulturgefäße waren nicht beschichtet. Als Zellkulturmedium wurde Endothelial Basal Medium von PromoCell verwendet. Dieses wurde mit 10% FCS versetzt und mit folgenden als 'supplement pack' käuflichen Zusätzen (PromoCell) versehen: Hydrocortison (1µg/ml), bovine brain extract (12µg/ml), Gentamicin (50µg/ml), Amphotericin B (50ng/ml) und EGF (10ng/ml). Das Medium wurde alle 2 bis 3 Tage gewechselt. Zur Passagierung konfluenten Kulturen wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin enzymatisch von dem Kulturgefäß abgelöst. Um das Trypsin zu inaktivieren, wurden die gelösten Zellen in Wachstumsmedium resuspendiert und in neue Kulturgefäße überführt. Alle Versuche wurden mit Zellen der 5. Passage durchgeführt.

Ein mit HUVEC dicht bewachsenes Kulturgefäß enthält ungefähr $5-6 \times 10^4$ Zellen /cm². Die Zellzahl wurde in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Es besteht die Möglichkeit, Zellen einzufrieren. Dazu wurden Zellen mit PBS gewaschen, trypsiniert, abzentrifugiert und in 5 ml eines eiskalten Einfriermediums (Medium mit 10% DMSO und 20% FCS) aufgenommen. Die Zellen wurden in Kryotubes aliquotiert (1ml/ Aliquot). Die Aliquots wurden stufenweise eingefroren, d.h. von -20°C nach 24h auf -80°C für 2-3 Tage und schließlich in flüssigem Stickstoff gelagert. Dadurch können Zellen über Jahre konserviert werden.

II.2.2 Die Isolation und Oxidation von LDL

Lipoproteine wurden aus gepooltem Frischplasma gesunder Blutspender gewonnen und durch sequentielle Ultrazentrifugation isoliert. Das LDL wurde mittels CuSO₄ in PBS über 30 Stunden bei 23° oxidiert. Der Proteingehalt des oxidierten LDL wurde mit einem Protein Kit gemessen. Der Oxidationsgrad wurde durch die relative Mobilität in einem Agarosegel quantifiziert. Durch die Behandlung war der Oxidationsgrad in der

Regel 2,5-3fach höher als bei nativem LDL. Oxidiertes LDL wurde im Dunkeln bei 4°C aufbewahrt und alle zwei Wochen neu hergestellt.

II.2.3 Die Bestimmung der Proliferation von HUVEC

Zur Bestimmung der Proliferation von HUVEC wurden drei verschiedene Methoden angewandt: Zum einen eine DNA-Quantifizierung nach Inkubation mit radioaktivem ³H-Thymidin, zum anderen ein nicht-radioaktiver Proliferationsassay unter Verwendung von 3-(4,5-Dimethyl-2Thiazyl)-2,5-Diphenyl-2H-Tetrazolium Bromid (MTT) und eine Zellzählung.

II.2.3.1 Der ³H-Thymidin-Assay

Für den radioaktiven ³H-Thymidin-Assay wurden 75 000 Zellen der 5. Passage in six-wells eingesät und für 24h mit 10% FCS inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 24h auf ein Verarmungsmedium ohne FCS umgesetzt. Dieses enthielt zur Abpufferung toxischer Stoffwechselprodukte 0,5% BSA. Anschließend erfolgte eine Inkubation mit einem Medium von 1% FCS und ansteigenden Konzentrationen OxLDL über 24h. Während der letzten 7h wurde ³H-Thymidin (0,37 MBq) zugefügt. Nach dieser Inkubation wurden die Zellen mit Trypsin geerntet. Durch eine 15minütige Zentrifugation mit 15000 rpm bei RT wurde ein Zellpellet gewonnen. Dieses Zellpellet wurde mittels 200µl Tailbuffer (50mM Tris/HCl pH 8,0, 1mM EDTA, 20mM NaCl, 1% SDS) und 100µg Proteinase K über 12h bei 56°C unter Schütteln lysiert. Dem Lysat wurden 100µl Phenol TE-gesättigt und 100µl Chloroform hinzugefügt und für 5min bei 15rpm und RT zentrifugiert. Die so gebildete wässrige Phase wurde abgenommen und wiederum mit 400µl Chloroform gemischt und erneut zentrifugiert. Nun wurde die wässrige Phase in 400µl Isopropanol resuspendiert und durch 40minütige Zentrifugation von 15000rpm bei 4°C ein DNA-Pellet präzipitiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und das DNA-Pellet mit kaltem 70%igem Ethanol gewaschen. Die Pellets wurden nach Trocknung in 50µl TE-Puffer aufgenommen und für 1h bei 40°C unter Schütteln gelöst. Der DNA-Gehalt wurde in einem Photometer bei 260nm und 280nm gemessen. Der Gehalt an ³H-Thymidin als Indikator für die Proliferation wurde in einem β-Counter ermittelt.

II.2.3.2 Der MTT-Assay

Für den kolorimetrischen MTT-Assay wurden je 10 000 Zellen der 5. Passage in ein 96er well überführt und für 24h mit 10% FCS bebrütet. Nach Waschen der Zellen mit PBS folgte wie bei dem 3H-Thymidin-Assay eine Inkubation mit Basismedium und 0,5% BSA über 24h. Es schloss sich eine 24stündige Inkubation mit 1% FCS und ansteigenden Konzentration OxLDL an. Nach dieser Inkubation wurde eine gelbe MTT-Markierungslösung in einer Endkonzentration von 0,5mg/ml hinzugefügt. Während einer 4stündigen Inkubationsphase im Brutschrank bildeten metabolisch aktive Zellen violette Salzkristalle. Diese Salzkristalle sind in Wasser nicht löslich. Durch Zugabe von 100µl/well Lösungsreagenz und Inkubation über Nacht gehen die Kristalle in Lösung. Nun wurden Proliferation respektive die Zahl lebender Zellen als relative Absorption in einem Spektrometer gemessen. Die Wellenlänge betrug 570nm, als Referenz diente eine Wellenlänge von 700nm.

II.2.3.3 Die Zellzählung

Als weitere Methode zur Bestimmung der Proliferation diente die Zellzählung. Hierzu wurden je 75 000 Zellen in six-well-Platten eingesät und wie oben beschrieben nach einer 24stündigen Hungerphase mit OxLDL inkubiert. Nach dieser Inkubationsphase wurden die Zellen zunächst mit PBS gewaschen, anschließend durch 0,5ml Trypsin von der Zellkulturplatte abgelöst. Die Zellen wurden in einen Messbecher, der isotonische Messlösung enthielt, überführt. An einem Coulter Counter wurde die Zellzahl/well gemessen.

II.2.4 Bestimmung der LDH-Freisetzung

HUVEC wurden, wie oben beschrieben, in six-well-Platten kultiviert. Zur Bestimmung der LDH-Freisetzung wurde der Überstand jeweils in ein Tube überführt. Die Messung der LDH-Konzentration in U/l erfolgte freundlicherweise im Zentrallabor der Universitätsklinik Würzburg.

II.2.5 Detektion der p27^{Kip1}-Expression durch eine Western Blot Analyse

HUVEC der 5. Passage wurden in Zellkulturflaschen mit 10%FCS-haltigem Wachstumsmedium für 24h inkubiert, mit PBS gewaschen und für 24h mit

Basismedium und 0,5% BSA inkubiert. Es folgte die Inkubation mit OxLDL in ansteigenden Konzentrationen und 1%FCS-haltigem Medium über 4h, 9h, 16h und 24h. Die Zellen wurden zur Ernte zunächst mit PBS gewaschen und mit Trypsin gelöst, welches wiederum mit einem FCS-haltigen Medium neutralisiert wurde. Die Zellen zweier Kulturflaschen mit der gleichen OxLDL-Konzentration wurden in einem Tube gepoolt. Von diesem Arbeitsschritt an wurden die Proben ohne Unterbrechung auf Eis gekühlt. Durch Zentrifugation über 5 min bei 1000 rpm und 4°C wurde ein Zellpellet gewonnen. Dieses wurde nochmals mit PBS gewaschen, um FCS möglichst vollständig zu entfernen. Das Zellpellet wurde mit Lysispuffer (50mM Tris, 5mM EDTA, 150mM NaCl, 0,5% Triton x-100, pH von 8,0) versetzt und in einem Sonopuls Homogenisator verarbeitet. Direkt im Anschluss wurden durch 10minütige Zentrifugation bei 10 000 rpm Pellet und Überstand separiert. Der Überstand wurde in neue Eppendorf-Hütchen überführt, das Pellet verworfen. Die Proteinbestimmung erfolgte mit einem Protein Assay Kit. Dazu wurde eine Verdünnungsreihe der Proben angelegt. Als Kontrollen dienten eine Standardprobe mit definierter Proteinmenge und eine Leerprobe. Den Proben wurde nacheinander das Lowry Reagent Modified und das Folin und Ciocalteus Reagent zugefügt. Es folgte eine Messung der Proben mit einem Photometer. Anhand der Messwerte der Kontrollen konnte die Proteinkonzentration der Proben errechnet werden.

Für einen Western Blot wurde ein 12,5%iges Trenngel hergestellt aus 40% Acrylamid, 4x Lower Tris pH 8,8, 10% SDS, H₂O, 10% APS und TEMED. Als Sammelgel wurde eine 5%ige Polyacrylamidzusammensetzung gewählt mit 40% Acrylamid, 4x Upper Tris pH 6,8, 10% SDS, H₂O, 10% APS und TEMED. Der Laufpuffer bestand aus Tris/Base, Glycin und SDS. Es wurden Proben mit einer Proteinmenge von 30µg eingesetzt. Diese wurden vor dem Auftragen auf das Gel noch mit einem Auftragspuffer versetzt, um gleiche Volumina zu erreichen und für 5min bei 95°C gekocht. Als Proteinstandard für den Blot wurden Rainbow und SeaBlue gewählt. Die Auftrennung der Proteine mittels Gelelektrophorese erfolgte mit 20mA über einen Zeitraum von 1,5h. Die Proteinbanden wurden daraufhin auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Als Blottingpuffer diente eine Zusammensetzung von Novex (TrisGly Transfer Buffer), Methanol und destilliertem Wasser. Die Blotkammer wurde auf Eis gestellt und es wurde eine Spannung von 15 Volt angelegt. Der Erfolg des Blottings wurde mit

einer Ponceau-Rot-Färbung kontrolliert. Der Farbstoff wurde mit TBS-Waschpuffer, bestehend aus Tris, NaCl, TBS und Tween 20, pH 7,2 wieder entfernt. Die Membran wurde über Nacht bei 4°C unter Schütteln in Blotto (5% fettfreie Trockenmilch in Waschpuffer) geblockt.

Zur Markierung der gesuchten Proteinbande wurde die Membran zuerst mit einem Antikörper gegen p27^{Kip1} und anschließend mit einem Antikörper gegen β -Aktin für jeweils 2h bei RT inkubiert. Nach einem Waschschrift folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper, welcher mit Peroxidase markiert war. Nach gründlicher Behandlung mit dem Waschpuffer wurde das Western Blot Detektionsreagenz Enhanced ChemiLuminescence-Plus (ECL-Plus) für 1 Minute auf die Membran gegeben. Auf die so behandelten Membranen wurden Filme aufgelegt, die in einem Fotolabor entwickelt wurden.

Die Intensität der Western Blot-Banden wurde in einem Densitometer mit der Software Quantity One gemessen. Ein gleich großes Feld ohne Bande wurde auf dem Film zusätzlich markiert und als Background von allen Werten subtrahiert. Die Intensität der p27^{Kip1}-Bande wurde in Relation zu der Intensität der entsprechenden Bande des Housekeeping Gens β -Aktin gesetzt. Housekeeping Gene sind konstitutiv exprimierte Gene und werden als interner Standard verwendet. Housekeeping Gene dienen hauptsächlich der Aufrechterhaltung von Grundfunktion einer Zelle. So ist β -Aktin beispielsweise Hauptbestandteil des Zytoskeletts einer Zelle.

II.2.6 Die Antisense-Oligonukleotid-Technik

Oligonukleotide sind eine Produkt aus wenigen Nukleotiden, die in variabler Abfolge synthetisiert werden können. So genannte Antisense-Oligonukleotide sind komplementär zu einem Abschnitt mRNA und können nach der Watson-Crick-Basenpaarung spezifisch an diese mRNA binden. Es resultiert ein stabiles mRNA/Oligonukleotid-Hybrid. Solche Hybride sind Angriffspunkte der RNase H, die mRNA rasch abbaut. Außerdem kann es aufgrund sterischer Veränderungen der mRNA durch ODN-Bindung zu einem sterischen Block an den Ribosomen-Komplexen kommen. Die Folge beider Mechanismen ist eine verminderte Proteinexpression (Helene et al. 1990). In den letzten Jahren wurde die Oligonukleotid-Technik vielfach erfolgreich eingesetzt, um die Funktion eines Proteins durch spezifische Inhibition

desselben zu erforschen. Von diesem rein diagnostischen Ansatz unterscheidet sich der Oligonukleotid-Gebrauch zu therapeutischen Zwecken. Trotz intensiver Bemühungen gerade in der onkologischen Forschung gelang bislang kein Durchbruch. Bei beiden Zielsetzungen besteht die Schwierigkeit darin, Oligonukleotide in ausreichender Menge in die Zelle einzubringen, ohne die Zelle zu schädigen oder unspezifische Effekte auszulösen. Polyanionische Makromoleküle wie unmodifizierte ODN können die Zellmembran nicht durch passive Diffusion passieren (Weyermann et al. 2004). Daher wurden verschiedene Techniken entwickelt, Oligonukleotide in die Zellen einzuschleusen.

Am weitesten verbreitet ist die liposomenvermittelte Transfektion, wie sie in der vorliegenden Arbeit angewandt wurde. Liposomen sind nicht toxische Lipidvesikel, die ein wässriges Kompartiment enthalten, das durch eine Lipiddoppelschicht getrennt ist (Tari et al. 1994). Durch Markierung der Oligonukleotide mit Fluorescein Isozyanat (FITC) kann der Prozentsatz erfolgreich transfizierter Zellen mittels einer FACS-Analyse ermittelt werden. Mikroskopisch kann beurteilt werden, in welchem Kompartiment der Zellen sich die Oligonukleotide befinden. Eine Western Blot Analyse dient dem Nachweis der Inhibition der Proteinexpression. Um unspezifische Effekte detektieren zu können, werden so genannte Missense-Oligonukleotide als Kontrolle eingesetzt. Dies sind in gleicher Weise synthetisierte Oligonukleotide, die sich nur in der Basenabfolge unterscheiden. Missense-Oligonukleotide sind zu keinerlei mRNA komplementär.

Da es sich bei den Oligonukleotiden um eine Sequenz von Nukleotiden handelt, werden sie durch enzymatisch wirkende Nukleasen (Endonukleasen und Exonukleasen) der Zelle rasch eliminiert. Eine adäquate Stabilität der Oligonukleotide konnte erreicht werden, indem ein an Phosphat gebundenes Sauerstoffmolekül der Nukleotide durch ein Schwefelmolekül ersetzt wurde. Das entstandene Konstrukt ist ein Phosphothioat-Analogon der DNA / RNA.

II.2.6.1 Das Oligonukleotid-Design

P27^{Kip1}-Antisense und -Missense-Oligonukleotide wurden freundlicherweise von Prof. Wolf, Eppendorf Universitätsklinik Hamburg zur Verfügung gestellt. Die Phosphothioat-Oligonukleotide wurden an einem Oligo 1000 DNA Synthesizer

(Beckmann Instruments, Fullerton, CA, USA) hergestellt. Folgende Sequenzen wurden verwendet:

Antisense p27^{Kip1}: 5'-UGG-CUC-UCC-UGC-GCC-3' (Zielbasenpaare 306 bis 320)

Missense p27^{Kip1}: 5'-UCC-CUU-UGG-CGC-GCC-3'

Diese Oligonukleotidsequenzen waren bereits erfolgreich angewendet worden, um die p27^{Kip1}-Expression in Mäusefibroblasten zu inhibieren (Coats et al. 1996).

FITC-markierte Oligonukleotide wurden von der Firma Interactiva (Ulm, Deutschland) entsprechend hergestellt. Die Fluorescein-Markierung erfolgte am 5'-Ende. Jede Base wurde mit Phosphothioat verknüpft.

II.2.7 Regulation der p27^{Kip1}-Expression durch transiente Transfektion von HUVEC mit Antisense Oligonukleotiden

Für eine Transfektion wurden HUVEC in 6-well-Platten eingesät. Die Zellen wuchsen über 24h in einem Medium mit 10% FCS an. Sie wurden anschließend mit PBS gewaschen und auf das für die Proliferationsversuche notwendige Verarmungsmedium umgesetzt. Nach 12h – 20h und damit 12h - 4h vor Inkubation mit OxLDL wurden die Zellen transfiziert. Dazu wurden sie zuerst mit OptiMEM gewaschen. Anschließend wurden sie mit einer Lösung aus OptiMEM, 0,1µM Oligonukleotiden und Lipofectin (20µl/ml Medium) als Transfektionsreagenz inkubiert. Nach einer Zeit von 12-4h Stunden wurde das Transfektionsmedium mit PBS ausgewaschen. Die Zellen wurden mit normalem 2%FCS-haltigem Kulturmedium und ansteigenden Konzentrationen OxLDL inkubiert. Als Kontrolle der Antisense-Effekte dienten Missense-Oligonukleotide. Um unspezifische toxische Effekte der Transfektion zu detektieren, wurde eine Kontrolle mitgeführt, die nur Lipofectin ohne Oligonukleotide enthielt.

II.2.8 Bestimmung der Transfektionseffizienz in der Durchflusszytometrie

HUVEC wurden wie oben beschrieben transfiziert. Dabei wurden Fluorescein-markierte Oligonukleotide verwendet. Nach der Transfektionsphase wurden die Zellen mit PBS gewaschen, um freie Oligonukleotide zu entfernen. Die Zellen wurden dann mit Trypsin geerntet und in ein Röhrchen für die FACS-Messung überführt. Durch Zentrifugation wurde ein Zellpellet gewonnen. Der Überstand wurde verworfen. Die Zellen wurden in 250µl 4°C-kaltes PBS aufgenommen und auf Eis gestellt. Es folgte die Messung an

einem FACS-Gerät. Als Positiv-Kontrolle dienten untransfizierte Zellen, die mit einem FITC-gekoppeltem Antikörper markiert wurden gegen das konstitutiv exprimierte Oberflächenprotein von HUVEC CD31, auch platelet endothelial cell adhesion molecule-1 genannt. Negativkontrolle waren unbehandelte Zellen. Abgestorbene Zellen wurden mit Propidium-Jodid angefärbt. Da bei Lichtexposition die Fluoreszenz der Antikörper nachlässt, müssen die Proben im Dunkeln aufbewahrt werden.

In der Durchflusszytometrie wurden für jede Probe 10 000 Zellen bestimmt. In einer FACS-Analyse werden Zellen automatisch durch eine Kapillare gedrückt, die einen Strahl feiner Tropfen erzeugt, wobei jeder Tropfen nur eine Zelle enthält. Die Tropfen passieren einen Laser-Strahl. Photodetektoren messen sowohl die dadurch entstandene Lichtstreuung als auch das emittierte Licht. Das von den FITC-markierten Antikörpern ausgehende grüne Licht wird von einem FL1-H-Detektor erfasst, während das rote Propidium-Jodid-Signal durch einen FLH-3-Detektor registriert wird. In den hier beschriebenen Messungen wurde FL1 gegen FL3 aufgetragen. Dadurch entstand ein Diagramm aus vier Quadranten:

- im Quadranten unten links sind die vitalen, FITC-negativen, d.h. nicht transfizierten Zellen
- im Quadranten unten rechts sind die vitalen, FITC-positiven, d.h. transfizierten Zellen und auch die CD31-markierte Positiv-Kontrolle
- im Quadranten oben links sind die nekrotischen Propidium-Jodid-positiven, jedoch FITC-negativen Zellen
- im Quadranten oben rechts die nekrotischen Propidium-Jodid und FITC-positiven Zellen

II.2.9 Beurteilung der Transfektion mit Oligonukleotiden an einem Konfokal-Laser-Mikroskop

Hierzu wurden sterile runde Deckgläschen in six-wells gelegt und darauf HUVEC wie gewohnt kultiviert. Die Transfektion erfolgte mit FITC-markierten Oligonukleotiden wie oben beschrieben. Im Anschluss wurden die mit HUVEC bewachsenen Deckgläschen auf einen Objektträger aufgelegt und an einem Laser-Konfokalmikroskop beobachtet.

II.2.10 Statistik

Die statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe der Software Programme Statistica und Prism durchgeführt. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Bei den Proliferationsassays handelt es sich um nicht normalverteilte Werte und unabhängige Stichproben, so dass ein Mann-Whitney-U-Test für die statistische Analyse verwendet wurde. Da jeweils sieben verschiedene Gruppen mit der Kontrolle verglichen wurden, erfolgte für den P-Wert eine Korrektur nach Bonferroni. Somit wurde ein P-Wert $< 0,007$ als statistisch signifikant (*) und ein P-Wert $< 0,0001$ als statistisch hochsignifikant (**) angesehen. Die Daten der Proteinexpression in der Western Blot-Analyse wurden mit einem ANOVA-Test analysiert.

III Ergebnisse

III.1 Zellkultur HUVEC

HUVEC-Kulturen zeigten nach wenigen Tagen Wachstum in den Zellkulturgefäßen das typische Bild eines regelmäßigen Monolayers. Da Endothelzellen kontaktinhibiert sind, werden bei Konfluenz der Zellen die Replikationsmechanismen eingestellt. Daher wurden für die Proliferationsversuche Kulturen verwendet, die noch keine Konfluenz erreicht hatten, jedoch die für ein optimales Wachstum von Endothelzellen wichtigen Zell-Zell-Kontakte schon ausgebildet hatten (Abbildung 3 und 4).

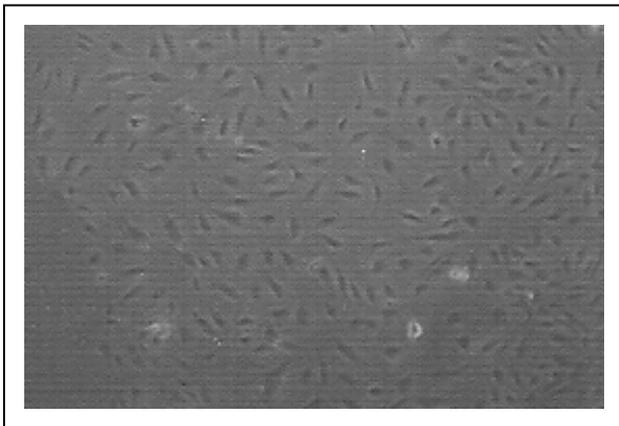


Abbildung 3:

Lichtmikroskopische Aufnahme von HUVEC in der Übersicht (50fache Vergrößerung)

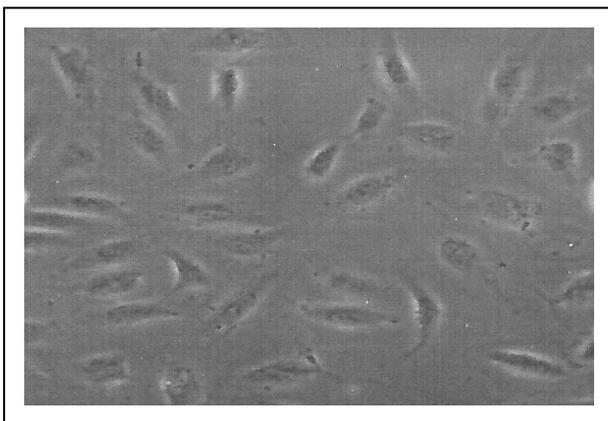


Abbildung 4:

Lichtmikroskopische Aufnahme von HUVEC in 200facher Vergrößerung.

III.2 Proliferation humaner Endothelzellen nach Inkubation mit OxLDL

III.2.1 Messung der Proliferation von HUVEC mittels 3H-Thymidin-Assay

Die Messung der Proliferation mittels 3H-Thymidin-Assay erfolgte nach 24stündiger Inkubation von HUVEC mit ansteigenden Konzentrationen von OxLDL. Vorversuche ergaben, dass HUVEC vor Inkubation mit OxLDL eine Zeit gehungert werden müssen, um auf einen Proliferationsstimulus zu reagieren. Als Verarmungsmedium erwies sich Basismedium ohne FCS als geeignet. Zur Abpufferung toxischer Stoffwechselprodukte wurde BSA in 0,5%iger Konzentration eingesetzt. Es wurden sieben verschiedene Konzentrationen OxLDL von 1µg/ml bis 200µg/ml untersucht. Als Kontrolle dienten Zellen, die nicht mit OxLDL inkubiert wurden. Die Inkorporation von 3H-Thymidin, gemessen als Counts per Minute (cpm), wurde auf die entsprechende Menge DNA bezogen und so als Maß für die Proliferation kalkuliert. Es zeigte sich im Vergleich zu den Kontrollzellen ein Anstieg der Proliferation von HUVEC nach Inkubation mit niedrigen Konzentrationen OxLDL (1 bis 20µg/ml). Höhere Konzentrationen OxLDL (50 - 200µg/ml) führten zu einer signifikanten Abnahme der Proliferation im Vergleich zu den Kontrollzellen (50µg/ml OxLDL $p = 0,0016$; 100µg/ml und 200µg/ml OxLDL $p < 0,0001$) (Abbildung 5).

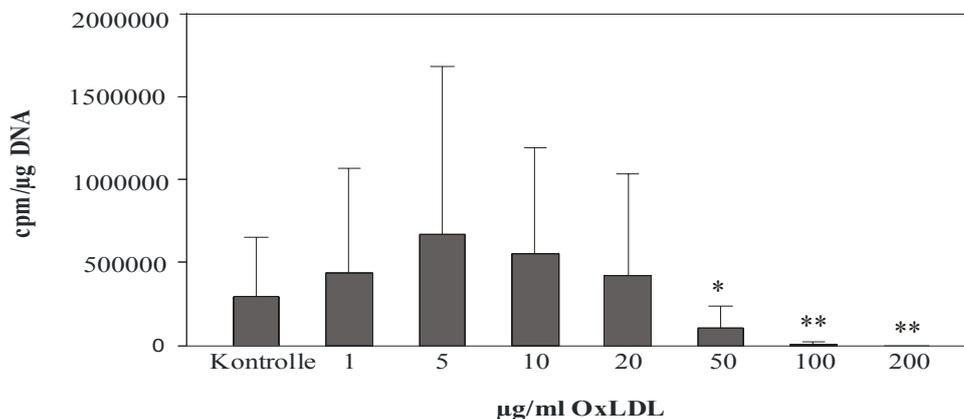


Abbildung 5: 3H-Thymidin-Assay: Darstellung der Proliferation von HUVEC nach Inkubation mit OxLDL über 24h in ansteigenden Konzentrationen ($n = 24$ für die Konzentrationen 0-100µg/ml OxLDL und $n=21$ für die Konzentration 200µg/ml OxLDL). Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt. * $p < 0,007$, ** $p < 0,0001$.

Für die Versuche wurde alle zwei Wochen eine frisch synthetisierte OxLDL - Charge verwendet. Bei ansonsten konstanten Versuchsbedingungen variierte das Maximum der Proliferation in Abhängigkeit von der verwendeten OxLDL-Charge zwischen den Konzentrationsbereichen 5-20µg/ml OxLDL. Ein 3H-Thymidin-Assay mit verschiedenen OxLDL-Chargen und Oxidationsstärken ergab bei einer Konzentration von jeweils 5µg/ml OxLDL Unterschiede in der proliferativen Reaktion. Ebenso hatte der Oxidationsgrad einen Einfluss auf das Ausmaß der Proliferation (s. Abbildung 6).

Um den 3-Thymidin-Assay zu evaluieren, war ein Vorversuch mit verschiedenen definierten Zellzahlen durchgeführt worden. Der Test spiegelt die bekannte ansteigende Zellzahl wider. Siehe Abbildung 7.

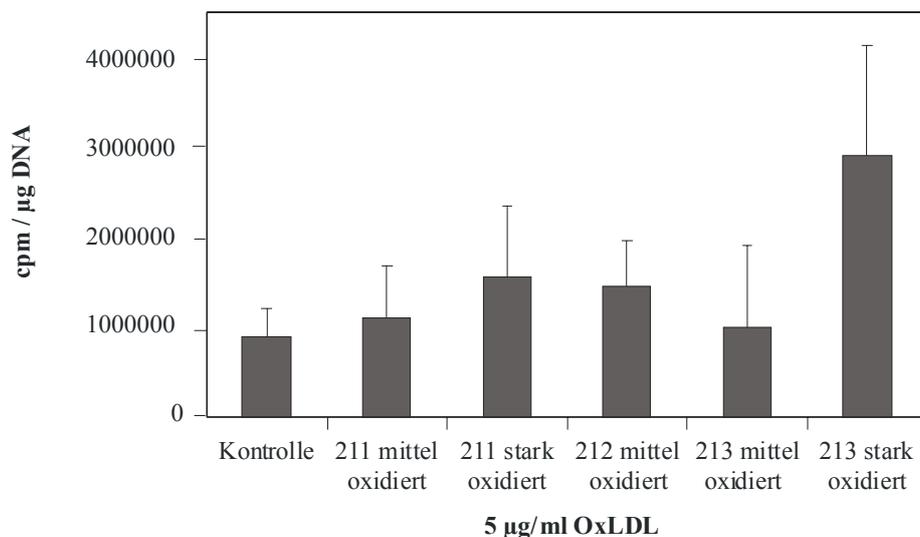


Abbildung 6: 3H-Thymidin-Assay: Wirkung unterschiedlicher Chargen OxLDL und verschiedener Oxidationsgrade auf die Proliferation von Endothelzellen. OxLDL wurde in einer Konzentration von 5µg/ml eingesetzt. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt (n=3).

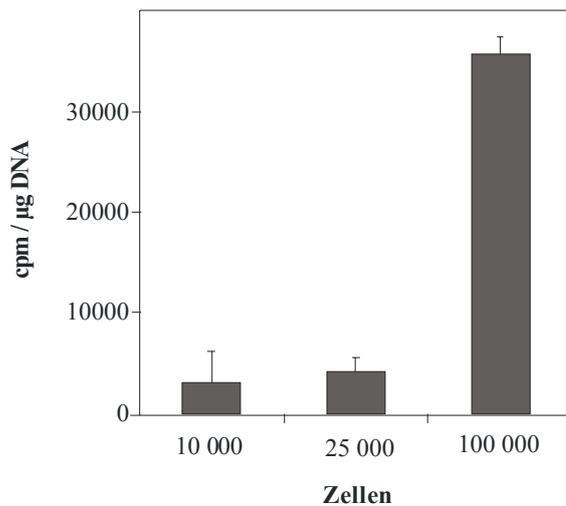


Abbildung 7: 3H-Thymidin-Assay:
Es wurden 3 verschiedene Proben mit bekannter Zellzahl gemessen. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt (n=3).

III.2.2 Messung der Proliferation von HUVEC mittels Zellzählung

Um die Wirkung von OxLDL auf HUVEC zu untersuchen, diente als zweite Methode die Zellzählung. Wie in Abbildung 8 dargestellt, liegt das Maximum der Proliferation bei einer Konzentration von 50µg/ml OxLDL und beträgt 40% im Vergleich zu der Kontrolle. Mit einem P-Wert von 0,0004 nach Bonferroni-Korrektur ist dieses Ergebnis als statistisch signifikant zu werten. Bei der Zellzählung findet sich bei 100µg/ml OxLDL noch eine höhere Zellzahl als bei der Kontrolle und erst bei 200µg/ml OxLDL ist eine signifikante Abnahme der Zellzahl unter die der Kontrolle zu verzeichnen ($p < 0,0001$). Die Zellzählung wurde zu einem späteren Zeitpunkt durchgeführt als die 3H-Thymidin-Assays, so dass eine andere OxLDL-Charge verwendet wurde.

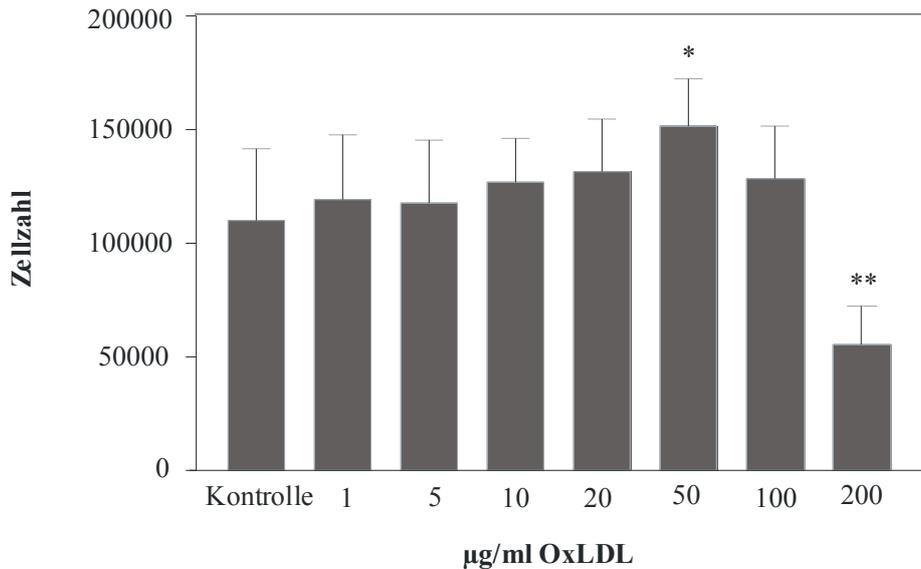


Abbildung 8: Zellzählung: Darstellung der Proliferation von HUVEC nach Inkubation mit OxLDL über 24h in ansteigenden Konzentrationen. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt (n=18). *p< 0,007, **p< 0,0001.

III.2.3 Messung der Proliferation von HUVEC mittels MTT-Assay

Eine Messung der Proliferation von HUVEC nach Inkubation mit ansteigenden Konzentrationen OxLDL mittels kolorimetrischen MTT-Assay bestätigte eine dosisabhängige proliferationsstimulierende Wirkung von OxLDL auf Endothelzellen. In Abbildung 9 ist die Absorbance als Parameter für die Anzahl vitaler Zellen in Abhängigkeit von ansteigenden Konzentrationen OxLDL dargestellt. OxLDL-Konzentrationen zwischen 1µg/ml und 100µg/ml führten zu einem signifikanten Anstieg der Proliferation im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle (1µg/ml OxLDL p= 0,0024; 5-100µg/ml OxLDL p< 0,0001). Das Maximum der Proliferation lag wie bei der Zellzählung bei einer Konzentration von 50µg/ml OxLDL und betrug bezogen auf die unstimulierte Kontrolle 78%. Eine Konzentration von 200µg/ml OxLDL bewirkte eine signifikante Abnahme der Proliferation (p< 0,0001).

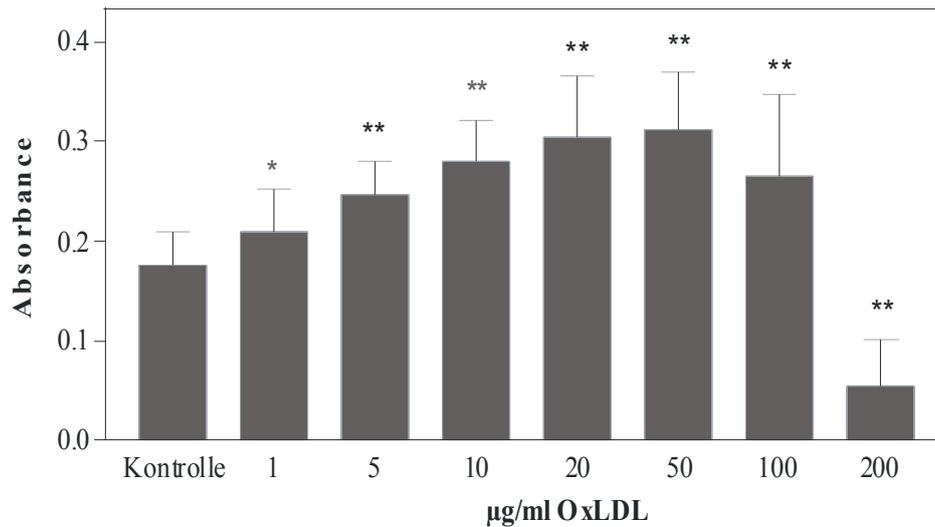


Abbildung 9: MTT-Proliferationsassay: Darstellung der Proliferation von HUVEC nach Inkubation mit OxLDL über 24h in ansteigenden Konzentrationen (n=60 für 0µg/ml OxLDL, n=59 für 5µg/ml OxLDL, n=30 für 10µg/ml OxLDL und n=18 für die übrigen Konzentrationen). Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt. *p< 0,007, **p< 0,0001.

III.3 Bestimmung der Transfektionseffizienz von Oligonukleotiden in der FACS-Analyse

HUVEC, die einer Transfektionsbehandlung mit FITC-markierten Antisense-Oligonukleotiden unterzogen worden waren, wurden durch die FACS-Analyse in drei Gruppen separiert. Die erste Gruppe stellte FITC-negative Zellen dar, die mit nicht transfizierten Zellen gleichgesetzt wurden. Eine zweite Gruppe waren FITC-positive Zellen, die als erfolgreich transfiziert bewertet wurden. Eine dritte Gruppe waren Propidium-Jodid-positive Zellen, die zusätzlich FITC-positiv oder -negativ waren und als nekrotische Zellen interpretiert wurden. Als Negativ-Kontrolle dienten HUVEC, die unter Standardbedingungen kultiviert worden waren. Diese waren in allen Versuchen zu mindestens 99% FITC-negativ. Als Positiv-Kontrolle wurden HUVEC mit einem FITC-markierten CD31-Antikörper, einem Antikörper gegen ein Endotheloberflächenprotein, inkubiert. Die so behandelten Zellen wurden in allen Versuchen zu mindestens 99% als FITC-positiv detektiert.

Zunächst wurde die Transfektionseffizienz von FITC-markierten Non-Phosphothioat-Oligonukleotiden untersucht. Bei konstanter Menge an Oligonukleotiden von 0,4µM

wurde die Konzentration des Transfektionsagens Lipofectin zwischen 5µl/ml und 40µl/ml variiert. Hiermit konnte eine maximale Transfektionsrate von 60% erzielt werden. Um die Transfektionseffizienz zu verbessern, wurde die Oligonukleotidmenge erhöht. Lipofectin wurde in bekannten Konzentrationen eingesetzt, um die Toxizität gering zu halten. Dies ergab unmittelbar nach Transfektionsinkubation eine Transfektionsrate von 83 bis 90%, bei nahezu unverändertem Anteil nekrotischer Zellen (vgl. Abbildung 10).

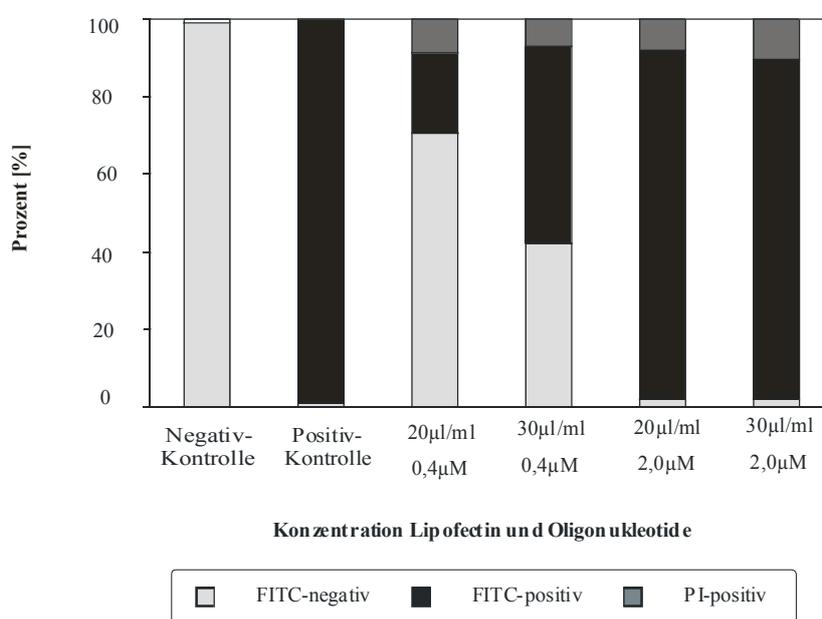


Abbildung 10: Transfektionseffizienz von Non-Phosphothioat-Oligonukleotiden in der FACS-Analyse. Negativ-Kontrolle: untransfizierte Zellen. Positiv-Kontrolle: Markierung mit CD31-FITC. Bei einer Oligonukleotid-Konzentration von 0,4µM steigt die Zahl transfizierter Zellen mit der Lipofectin-Konzentration. Durch Erhöhung der Oligonukleotid-Menge von 0,4µM auf 2,0µM nimmt die Transfektionsrate nochmals von 60% auf 90% zu.

Wurden so behandelte Zellen jedoch über 24h in normalem Wachstumsmedium kultiviert, wie es für Proliferationsstudien nötig ist, sank die Transfektionsrate auf 20% (Abbildung 11). Aus technischen Gründen war bei diesem Versuchsansatz die Propidium-Jodid-Färbung nicht möglich gewesen und wurde aufgrund der nach diesem Versuch bekannten instabilen Transfektion nicht wiederholt.

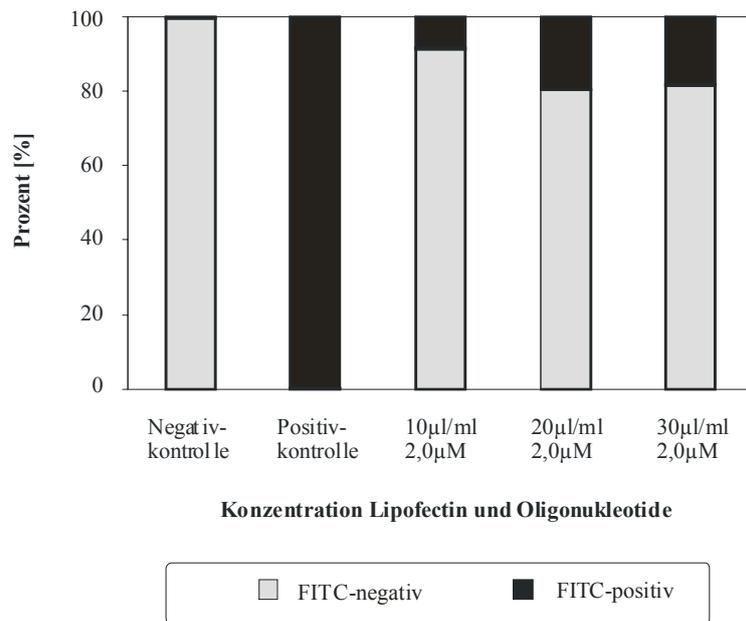


Abbildung 11: Transfektionseffizienz von Non-Phosphothioat-Oligonucleotiden in der FACS-Analyse nach 24h Inkubation in Wachstumsmedium. Negativ-Kontrolle: untransfizierte Zellen. Positiv-Kontrolle: Markierung mit CD31-FITC. Der Anteil FITC-positiver Zellen beträgt nach 24h noch maximal 20%.

Aufgrund der deutlichen Reduktion von FITC-positiven Zellen im Verlauf von 24h wurden als Nächstes Phosphothioat-Oligonucleotide untersucht. Es zeigte sich, dass bei Phosphothioat-Oligonucleotiden weitaus geringere Oligonucleotidmengen für eine effektive Transfektion benötigt wurden. Bereits bei einer Konzentration von $0,1\mu\text{M}$ ODN konnte eine Transfektionsrate von bis zu 98% erreicht werden. Im Gegensatz zu Non-Phosphothioat-Oligonucleotiden führten Konzentrationen von $0,5\mu\text{M}$ und $1,0\mu\text{M}$ zu einem Anstieg der Nekroserate auf 25% bzw. 60% der Zellen (Abbildung12). Eine Reduktion der Oligonucleotidkonzentration unter $0,1\mu\text{M}$ und /oder der Lipofectinkonzentration unter $20\mu\text{l/ml}$ führte zu einer progredienten Abnahme transfizierter Zellen.

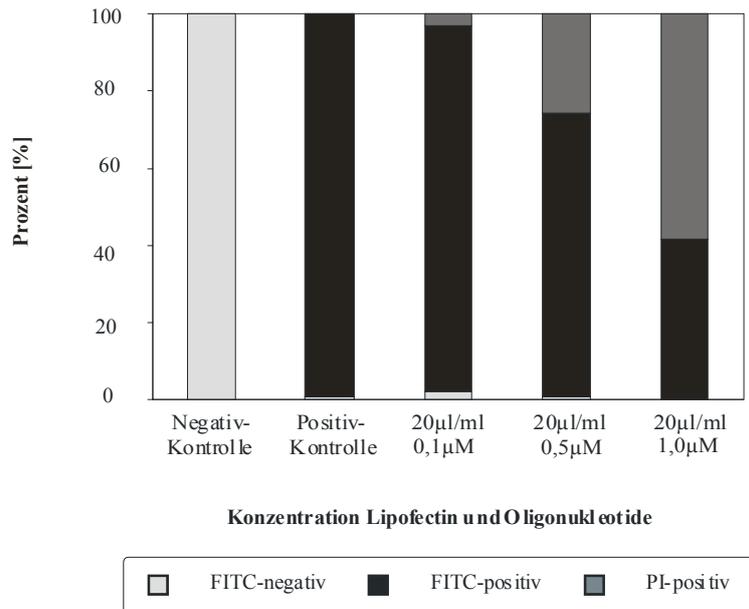


Abbildung 12: FACS-Analyse der Transfektionseffizienz von Phosphothioat-Oligonukleotiden unmittelbar nach Transfektion. Die ODN-Konzentration wurde zwischen 0,1µM und 1,0µM bei konstanter Konzentration von Lipofectin variiert. Der Anteil Propidium-Jodid-positiver Zellen steigt mit der ODN-Konzentration. Negativ-Kontrolle: untransfizierte Zellen. Positiv-Kontrolle: Markierung mit CD31-FITC.

Abschließend sollte die Frage der Stabilität einer Transfektion mit Phosphothioat-Oligonukleotiden geklärt werden. Hierzu wurden Zellen mit Phosphothioat-Oligonukleotiden transfiziert und anschließend für 24h in normalem Wachstumsmedium kultiviert. Nach dieser Zeit ergab eine FACS-Analyse eine deutlich höher Rate an transfizierten Zellen im Vergleich zu einer Transfektion mit Non-Phosphothioat-Oligonukleotiden. Bei einer Konzentration von 0,1µM Oligonukleotiden und 20µl/ml Lipofectin betrug die Abnahme FITC-positiver Zellen im Verlauf von 24h durchschnittlich 15%. Damit lag die Rate FITC-positiver Zellen bei durchschnittlich 70%. 13% der Zellen wurden als FITC-negativ identifiziert. PI-positiv waren 17% der Zellen.

III.4 Einfluss einer Inkubation mit OxLDL und einer Transfektion mit Antisense-Oligonukleotiden auf die LDH-Freisetzung von Endothelzellen

Im Rahmen der Proliferationsassays mit OxLDL war zum einen in der Zellkultur eine Veränderung der Morphologie im Sinne einer Zellschädigung, zum anderen auch bei den Testergebnissen ein möglicher toxischer Effekt hoher OxLDL-Konzentrationen auf Endothelzellen aufgefallen. Um diese Beobachtung näher zu beleuchten, wurde eine Bestimmung der Lactatdehydrogenase in den Zellkulturmedien durchgeführt. Abbildung 13 zeigt eine Zunahme der LDH-Freisetzung ab einer Konzentration von 100 µg/ml OxLDL nach 24stündiger Inkubation.

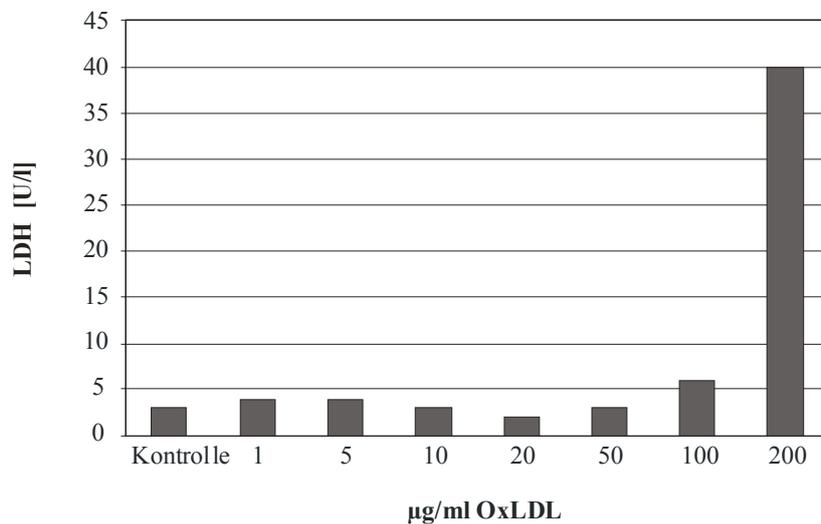


Abbildung 13: LDH-Freisetzung durch HUVEC nach 24stündiger Inkubation mit OxLDL in ansteigenden Konzentrationen. Die Kontrolle erhielt kein OxLDL. (n=1).

Nach Transfektion von HUVEC mit ODN in einer Konzentration von 0,1 µM und 20 µl/ml Lipofectin und anschließender Inkubation mit OxLDL in ansteigenden Konzentrationen lag die LDH-Freisetzung in allen untersuchten OxLDL-Konzentrationen inklusive den Kontrollzellen tendenziell höher (s. Abbildung 14). Dies mag an der toxischen Wirkung einer Transfektion liegen. Ein zusätzlicher Anstieg der LDH nach Inkubation mit hohen OxLDL-Konzentrationen über 24h war auch hier zu verzeichnen.

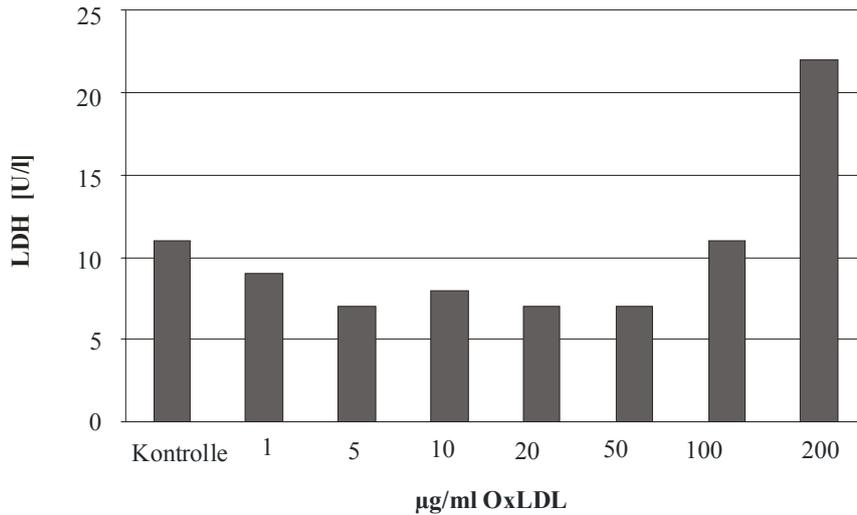


Abbildung 14: LDH-Freisetzung durch HUVEC nach Transfektion mit Antisense-Oligonukleotiden [0,1µM] und Lipofectin [20µl/ml], sowie 24stündiger Inkubation mit OxLDL in ansteigenden Konzentrationen. Die Kontrolle erhielt kein OxLDL. (n=1).

III.5 Darstellung der Transfektion von Oligonukleotiden an einem Laser-Konfokalmikroskop

Zur weiteren Beurteilung der Transfektionseffizienz wurden HUVEC mit FITC-markierten Oligonukleotiden sowie Lipofectin transfiziert und in einem Konfokalmikroskop dargestellt. Wie in Abbildung 15 und 16 zu erkennen ist, sind transfizierte HUVEC im Nukleus und, allerdings in geringerem Ausmaß, im Zytoplasma Fluorescein-positiv. Da die RNase-H-Aktivität im Nukleus lokalisiert ist, stellt dies den eigentlichen Wirkungsort und damit die beabsichtigte Lokalisierung der ODN dar (Achenbach et al. 2003).

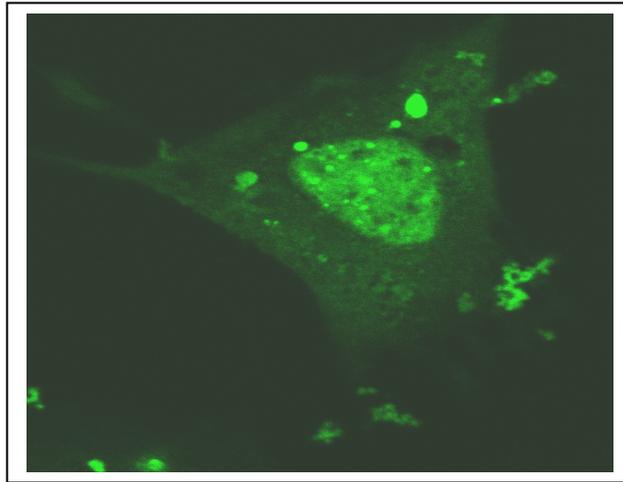


Abbildung15

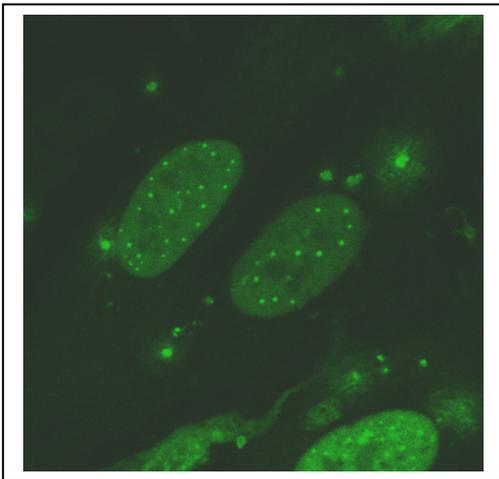


Abbildung 16A

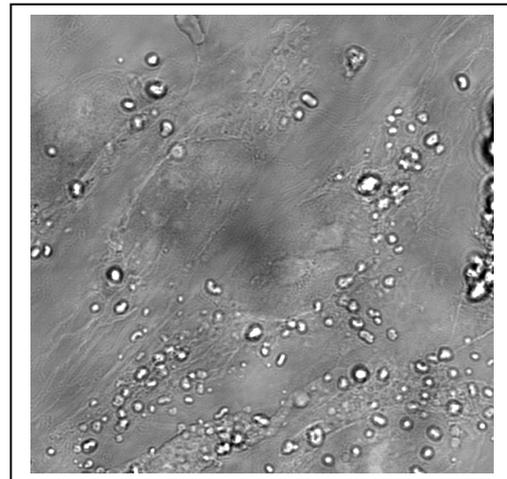


Abbildung 16B

Abbildung 15, 16A und 16B: Konfokalmikroskopische Aufnahme von HUVEC nach Transfektion mit Fluoreszenz-markierten Oligonukleotiden: Die Zellen zeigen in erster Linie eine Anfärbung des Nukleus und weniger des Zytoplasmas. Einzelne sehr stark angefärbte Bezirke entsprechen wahrscheinlich Oligonukleotiden in Granula.

III.6 Einfluss von oxidiertem LDL auf die Proteinexpression von p27^{Kip1}

Die Expression des CDK-Inhibitors p27^{Kip1} als Reaktion auf eine Inkubation von Endothelzellen mit OxLDL ist abhängig von der Konzentration und Inkubationsdauer mit OxLDL. Als ein früher Effekt war 4h nach Inkubation durch die Konzentrationen 1 bis 50µg/ml eine signifikante Reduktion der p27^{Kip1}-Expression von ~50% zu beobachten (Abbildung 17A). Nach einer Inkubationsdauer von 12h verminderte OxLDL die Expression von p27^{Kip1} in HUVEC signifikant bei einer Konzentration von 5µg/ml (69 ± 7%), wohingegen alle anderen getesteten OxLDL-Konzentrationen zu keiner signifikanten Änderung der p27^{Kip1}-Expression führten (Abbildung 17B). Nach einer Inkubationszeit von 24h mit 5µg/ml OxLDL blieb die p27^{Kip1}-Expression in HUVEC auf 69 ± 13% des Ausgangswertes reduziert. Im Gegensatz zu den früheren Zeitpunkten ergab jedoch die Stimulation von HUVEC mit 50µg/ml OxLDL im Vergleich zu 5µg/ml OxLDL eine signifikant höhere Expression von p27^{Kip1} (Abbildung 17C). Somit zeigten niedrige Konzentrationen OxLDL (5µg/ml), die eine maximale Proliferation von HUVEC induzierten, eine anhaltende Verminderung der p27^{Kip1}-Expression.

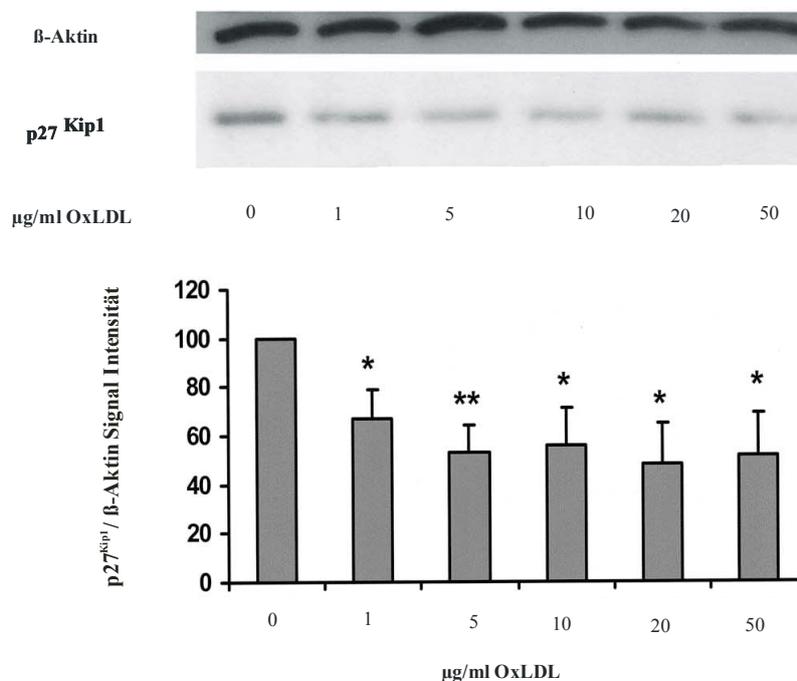


Abbildung 17A

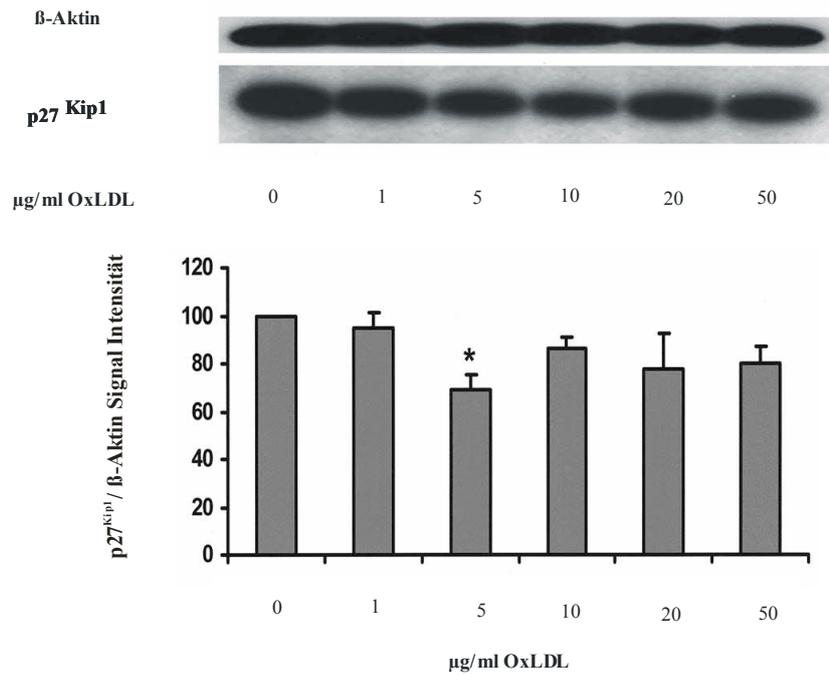


Abbildung 17B

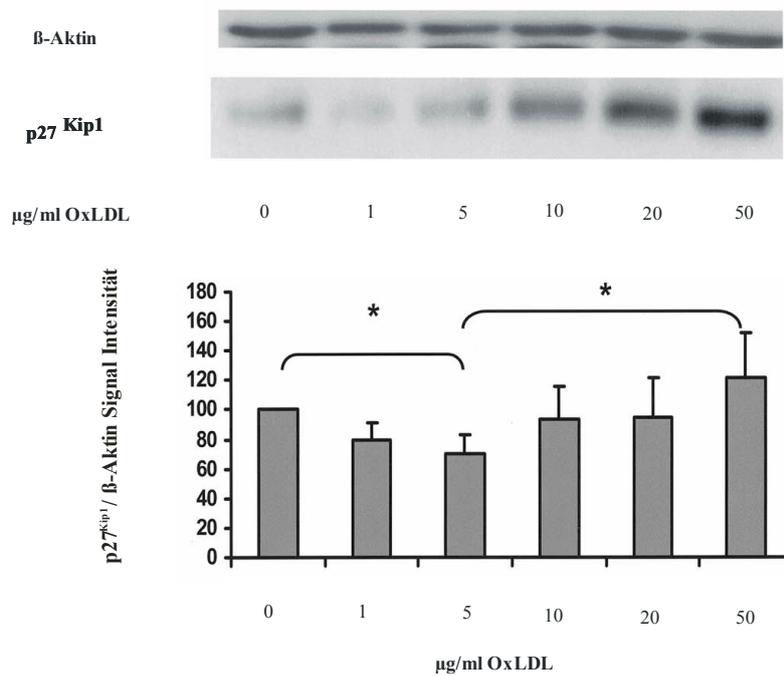


Abbildung 17C

Abbildung 17A-C: Western Blot-Analyse der p27^{Kip1}-Expression in HUVEC nach Inkubation mit OxLDL in ansteigender Konzentration (1 bis 50 μ g/ml). A: Inkubation mit OxLDL über 4h. B: Inkubation mit OxLDL über 12h. C: Inkubation mit OxLDL über 24h. Eine β -Aktin-Färbung wurde als Kontrolle verwendet, um gleichen Proteinauftrag sicherzustellen. Als Kontrolle dienten Zellen ohne OxLDL-Stimulation, die in normalem Wachstumsmedium kultiviert worden waren. Die Kontrolle wurde als 100% definiert. Die Daten sind Mittelwerte \pm SEM. *P < 0.05; **P < 0.01.

III.7 Western Blot-Analyse der Proteinexpression von p27^{Kip1} nach Transfektion mit Oligonukleotiden und Inkubation mit OxLDL

Nachdem sichergestellt war, dass eine ausreichende Transfektionseffizienz bei vertretbarer Toxizität erreicht war, wurde der Effekt der Transfektion auf Proteinebene in der Western Blot-Analyse untersucht. Als Kontrolle dienten sowohl Zellen, die nicht transfiziert worden waren als auch Missense-transfizierte Zellen. Wie in Abbildung 18A dargestellt, kam es nach Transfektion mit Antisense-Oligonukleotiden zu einer vollständigen Suppression der p27^{Kip1}-Expression bei normaler Expression in der Kontrollgruppe. Hingegen blieb die Expression von p27^{Kip1} nach Transfektion mit Missense-Oligonukleotiden im Vergleich zu der Kontrolle unverändert (Abbildung 18B). Somit handelt es bei der Protein-Suppression durch Antisense-Oligonukleotide um einen spezifischen Effekt.

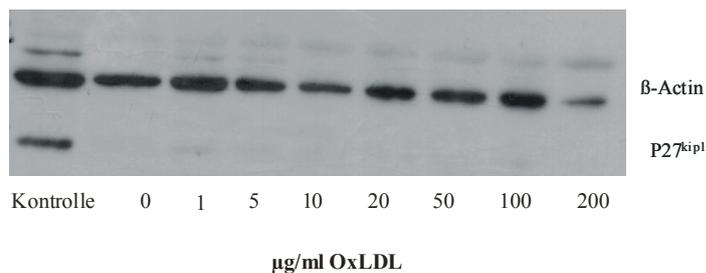


Abbildung 18A

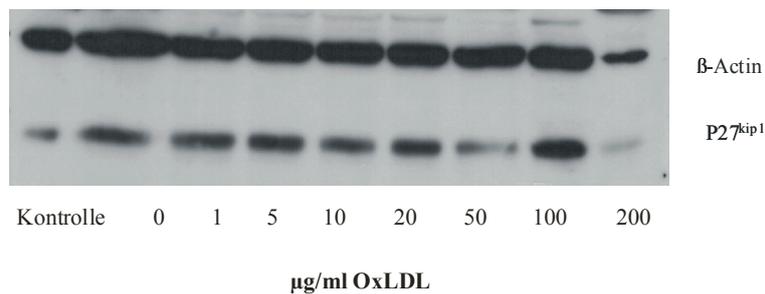


Abbildung 18B

Abbildung 18A und B: Western Blot-Analyse von p27^{Kip1} und β -Aktin als Housekeeping Gen. Transfektion von HUVEC mit p27^{Kip1}-Antisense-Oligonukleotiden (Abbildung A) bzw. p27^{Kip1}-Missense-Oligonukleotiden (Abbildung B) und anschließender Inkubation mit OxLDL in ansteigender Konzentration. Die Kontrolle wurde nicht transfiziert und nicht mit OxLDL behandelt.

III.8 3H-Thymidin-Inkorporation nach Transfektion mit Oligonukleotiden und Stimulation mit OxLDL

Nach Durchführung einer Transfektion und anschließenden Exposition der Zellen mit oxidiertem LDL schien sich der toxische Effekt zu potenzieren. Bei ausgeprägter Schwankungsbreite der Messwerte wurde ein proliferativer Effekt mit einer Konzentration von 1µg/ml OxLDL beobachtet. Konzentrationen von 10µg/ml OxLDL und mehr führten zu einer Reduktion der Proliferation im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abbildung 19). Dieses Ergebnis der verstärkten Toxizität wurde durch die Beobachtung gestützt, dass die Zellen in Kultur eine veränderte Morphologie im Sinne einer Zellschädigung aufwiesen.

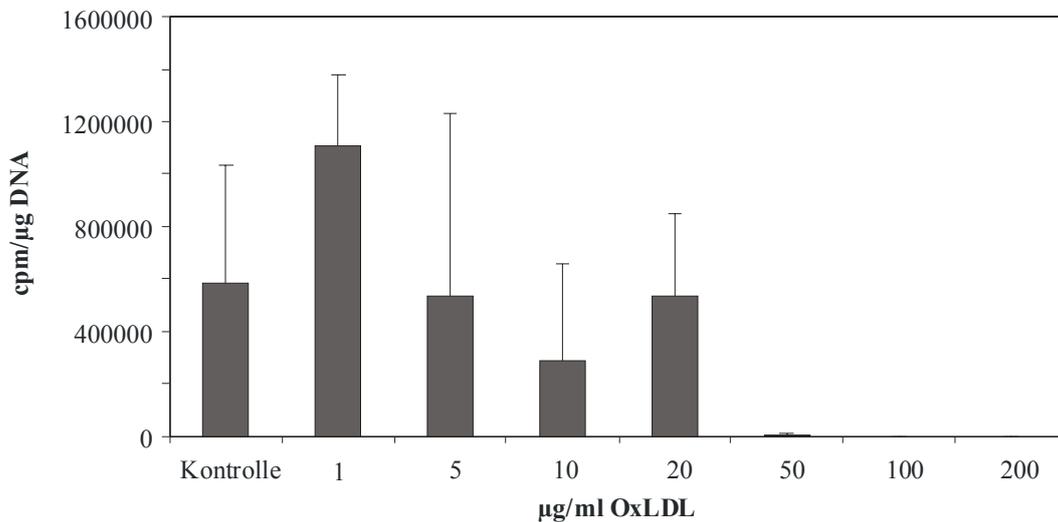


Abbildung 19: 3H-Thymidin-Assay: Proliferation von HUVEC nach Transfektion mit Antisense-Oligonukleotiden (0,1µM) und Stimulation mit OxLDL in ansteigender Konzentration. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt (n=3).

III.9 MTT-Assay nach Transfektion mit Oligonukleotiden und Stimulation mit OxLDL

Der toxische Effekt wurde in dem anschließend durchgeführten MTT-Assay noch deutlicher. Bereits ohne Zugabe von OxLDL war die Absorbance, d.h. die Anzahl vitaler Zellen in der Transfektionsgruppe im Vergleich zu der Kontrollgruppe um bis zu

70% geringer ausgeprägt. Obwohl in der FACS-Analyse die Nekroserate sehr gering war, deuten diese Daten darauf hin, dass die Zellen durch die Transfektion so stark beeinträchtigt wurden, dass sie weniger Wachstum als untransfizierte Zellen zeigten. Dieser Effekt scheint für Missense- und Antisense-transfizierte Zellen in gleichem Maß zu gelten.

Bei den sich anschließenden Versuchen wurde daher eine weitere Kontrolle eingeführt. Neben gänzlich untransfizierten Zellen, die lediglich das Transfektionsmedium OptiMEM® erhalten hatten, wurden nun zusätzlich Zellen untersucht, die mit Lipofectin, jedoch ohne Oligonukleotide inkubiert worden waren. Die Reduktion der Absorbance als Maß für die Zellzahl war in der Lipofectin-Gruppe ebenso stark ausgeprägt wie bei den transfizierten Zellen, so dass anzunehmen ist, dass dieser Effekt auf der Toxizität von Lipofectin beruht (s. Abbildung 20). In allen vier untersuchten Gruppen kam es zu einem signifikanten Anstieg der Proliferation im Vergleich zu der jeweiligen Kontrolle ohne OxLDL. Das Proliferationsmaximum lag jeweils bei 20µg/ml OxLDL. Ein signifikanter Unterschied der Proliferation zwischen den einzelnen Gruppen fand sich jedoch nicht. Wenn man die Proliferation auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle bezieht, sozusagen eine relative Proliferation berechnet (nicht dargestellt), fällt auf, dass die Proliferation in der Antisense-transfizierten Gruppe für die niedrigen OxLDL-Konzentrationen konstant höher ist als in allen Kontrollgruppen. Allerdings nimmt auch die Proliferation der Missense-transfizierten Zellen nach OxLDL-Inkubation im Vergleich zu den Kontrollgruppen zu und übertrifft bei 20µg/ml die der Antisense-transfizierten Zellen. In allen Gruppen ist bei einer Konzentration von 200µg/ml OxLDL eine Reduktion der Proliferation auf etwa 30% des Ausgangswertes zu festzustellen.

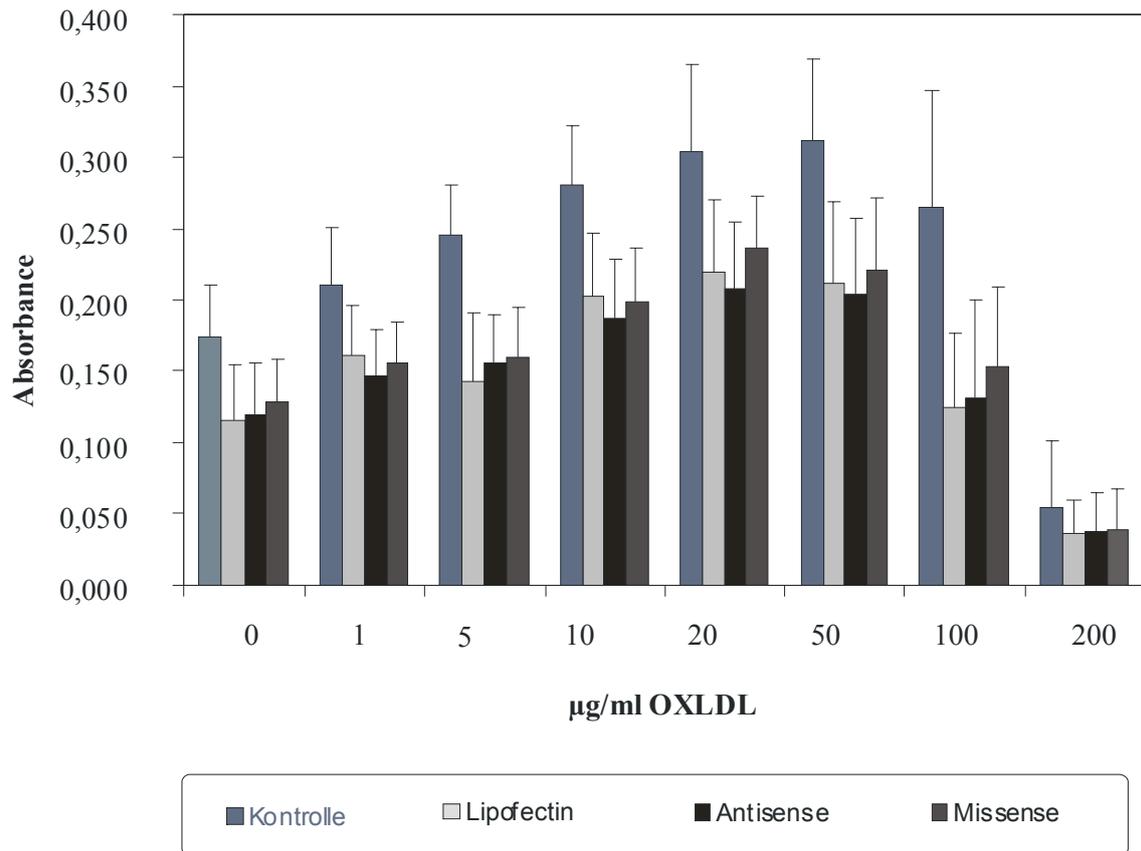


Abbildung 20: MTT-Assay: Darstellung der Proliferation von HUVEC nach Transfektion mit Antisense- und Missense-Oligonukleotiden, Lipofectin alleine, sowie einer unbehandelten Kontrolle und zusätzlicher Stimulation aller vier Gruppen mit OxLDL in ansteigender Konzentrationen. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt (n=11).

IV Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von OxLDL auf die Zellzyklusregulation von Endothelzellen untersucht. Wohingegen früher eine Atherosklerose als unvermeidlicher Alterungsprozess angesehen wurde, wird sie nach aktueller Lehrmeinung als chronischer inflammatorischer und proliferativer Prozess verstanden. Die Daten dieser Arbeit sollen zum Verständnis der Pathogenese beitragen, um so zukünftig mit neuen Therapieansätzen auf die Atherogenese Einfluss nehmen zu können. Im Rahmen des inflammatorischen und proliferativen Prozesses kommt es zu einem erhöhten Zellumsatz. Die Proliferation von glatten Muskelzellen der Gefäßwand im Rahmen der Atherogenese ist seit einigen Jahren bekannt und vielfach experimentell nachgewiesen. Dahingegen wurde die proliferative Aktivität des Endothels bislang wenig berücksichtigt.

Auf diese Kenntnisse aufbauend, wurde untersucht, ob OxLDL das Wachstum von Endothelzellen beeinflusst und wenn ja, welche Regulationsmechanismen des Zellzyklus daran beteiligt sind. Der CDK2-Inhibitor $p27^{Kip1}$ stellt einen wichtigen Regulator für zelluläre Signale dar, die Zellwachstum, Zellproliferation und Zelltod induzieren. Ob $p27^{Kip1}$ auch bei der OxLDL-vermittelten Proliferation von Endothelzellen beteiligt ist, sollte in einem zweiten Schritt beantwortet werden.

IV.1 OxLDL stimuliert die Proliferation humaner Endothelzellen

Als Testzellen dienten humane Nabelschnurendothelzellen (HUVEC). Nach Inkubation dieser Zellen mit OxLDL in ansteigenden Konzentrationen konnte im Vergleich zu einer Kontrollgruppe ohne OxLDL-Exposition eine Zunahme der Proliferation festgestellt werden. Dies wurde in drei verschiedenen Proliferationsassays nachgewiesen: einem ³H-Thymidin-Proliferationsassay, einem MTT-Assay und einer Zellzählung. Je nach verwendetem OxLDL fand sich das Proliferationsmaximum bei Konzentrationsbereichen zwischen 5 µg/ml und 50 µg/ml OxLDL. Dieses Ergebnis entspricht den Beobachtungen von Maier et al. 1996, die durch 1 µg/ml mild oxidiertes LDL eine signifikante Induktion des Zellwachstums von humanen Endothelzellen beschrieben hatten. Einen proliferationsstimulierenden Effekt von OxLDL auf andere Zelltypen wird in zahlreichen Veröffentlichungen postuliert, z.B. glatte Muskelzellen (Augé et al. 1995, Chatterjee et al. 1996, Koba et al. 1999), Makrophagen (Zettler et al.

2003, Hamilton et al. 1999) und Fibroblasten (Zettler et al. 2003, Björkerud et al. 1996).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Konzentrationen über 100µg/ml OxLDL regelmäßig zu einer Abnahme der Proliferation führten. Die zelltoxische Wirkung hoher OxLDL-Konzentrationen wurde durch die Beobachtung einer vermehrten LDH-Freisetzung gestützt. Aus der Literatur ist bekannt, dass oxidiertes LDL gerade für Endothelzellen im Gegensatz zum Beispiel zu glatten Muskelzellen sehr zytotoxisch sein kann. Diese zytotoxische Wirkung werde durch eine Erhöhung des Oxidationsgrades oder durch eine Erhöhung der OxLDL-Konzentration verstärkt (Augé et al. 1995). Letztere Beschreibung entspricht unseren eigenen Beobachtungen. Da es im Rahmen der Atherogenese zu einem Nebeneinander von Proliferation, Apoptose und Nekrose kommt, wurde die Hypothese erstellt, dass OxLDL zur Atherogenese beiträgt, indem es je nach Konzentration Proliferation bzw. Apoptose oder Nekrose induziert.

Die genauen Mechanismen der Induktion sowohl von Proliferation als auch Apoptose und Nekrose sind derzeit noch nicht geklärt. Zwei sich nicht ausschließende Wirkungsweisen werden diskutiert. Zum einen die Hypothese der Induktion von autokrinen Wachstumsfaktoren, zum anderen die direkte Aktivierung des Zellzyklus. Letztere Hypothese wird durch die Beobachtung gestützt, dass sich durch OxLDL-Exposition die zytoplasmatische Kalziumionen-Konzentration erhöht (Augé et al. 1995). Bei beiden Mechanismen ist zu erwarten, dass es nach OxLDL-Exposition letztlich zu einer Änderung der Zellzyklusproteinexpression kommt. Dieser Fragestellung wurde im Folgenden nachgegangen.

IV.2 P27^{Kip1} als Vermittler mitogener Signale des Zellzyklus

In der Onkologie gilt p27^{Kip1} seit einigen Jahren als entscheidender Regulator von Proliferation und wird mittlerweile sogar zu den Tumorsuppressorgenen gezählt (Hommura et al. 2000). Bei verschiedenen malignen Tumoren wurden veränderte p27^{Kip1}-Proteinspiegel beobachtet: Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (Espesito et al. 1997), Prostatakarzinom (Guo et al. 1997), Mammakarzinom (Porter et al. 1997, Jang et al. 2000), Larynxkarzinom (Pruneri et al. 1999), MALT-Lymphom (Shirin et al. 2005). P27^{Kip1}-knock-out-Mäuse zeigen ein vermehrtes Körperwachstum und eine Multiorganhyperplasie (Nakayama et al. 1996).

Auf dem Gebiet der Atherogenese-Forschung gilt p27^{Kip1} als Kandidatengen der Risikomodifikation einer Atherogenese. Die Arbeitsgruppe Gonzalez et al. 2004 untersuchte Polymorphismen des humanen p27^{Kip1}-Gens und konnte zeigen, dass Patienten mit Myokardinfarkt signifikant häufiger einen Polymorphismus aufweisen, der zu einer reduzierten basalen p27^{Kip1}-Gen Promotor-Aktivität führt. Von den Autoren wird spekuliert, dass dieser Polymorphismus die Proliferation im Rahmen der Atherosklerose fördert und so das Risiko erhöht, einen Myokardinfarkt zu erleiden. Die gleiche Arbeitsgruppe (Díez-Juan et al. 2001) zeigte, dass eine schwere Hypercholesterinämie durch atherogene Diät bei Apolipoprotein E-Defizienz in p27^{Kip1}-knock-out-Mäusen die arterielle Zellproliferation (Vascular smooth muscle cells und Makrophagen) um ein Vierfaches steigert und die Atherogenese sogar um ein Sechsfaches beschleunigt verglichen mit p27^{Kip1}-Wildtyp-Mäusen. Daher wurde von unserer Arbeitsgruppe p27^{Kip1} als zellzyklusregulierendes Protein herangezogen, um die Wirkung von OxLDL auf den Zellzyklus zu studieren.

IV.3 Einfluss von OxLDL auf die Proteinexpression von p27^{Kip1}

In der vorliegenden Arbeit wurde nachgewiesen, dass die Expression des CDK-Inhibitors p27^{Kip1} als Reaktion auf eine Inkubation von Endothelzellen mit OxLDL von der Konzentration und Inkubationsdauer mit OxLDL abhängig ist. Als ein früher Effekt wurde durch niedrige OxLDL-Konzentrationen eine signifikante Reduktion der p27^{Kip1}-Expression beobachtet. Nach einer Inkubationsdauer von 12h fand sich eine signifikant verminderte Expression von p27^{Kip1} in HUVEC bei einer Konzentration von 5µg/ml, wohingegen alle anderen getesteten OxLDL-Konzentrationen zu keiner signifikanten Änderung der p27^{Kip1}-Expression führten. Nach einer Inkubationszeit von 24h mit 5µg/ml OxLDL blieb die p27^{Kip1}-Expression in HUVEC reduziert. Im Gegensatz zu den früheren Zeitpunkten ergab jedoch die Stimulation von HUVEC mit 50µg/ml OxLDL im Vergleich zu 5µg/ml OxLDL eine signifikant höhere Expression von p27^{Kip1}. Somit zeigten niedrige Konzentrationen OxLDL, die ja eine maximale Proliferation von HUVEC induzieren, eine persistente Verminderung der p27^{Kip1}-Expression. Die konzentrations- und zeitabhängige Modulation der p27^{Kip1}-Expression in HUVEC durch OxLDL wurde als Beweis interpretiert, dass OxLDL eine direkte Wirkung auf die Zellzyklusregulation über p27^{Kip1} hat.

Eine auf diesem Forschungsgebiet entscheidende Arbeit stammt von Zettler et al.. Diese konnten an Fibroblasten und glatten Muskelzellen zeigen, dass eine OxLDL-induzierte Proliferation mit einer Änderung der Expression von Zellzyklusproteinen einhergeht. Bei dieser Arbeit überraschte, dass OxLDL sowohl Zellzyklusaktivatoren wie Zellzyklusinhibitoren stimulierte. Wobei allerdings letztere in geringerem Ausmaß induziert wurden, so dass die Aktivierung des Zellzyklus überwog. Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass eine Translokation aller untersuchten Zellzyklusproteine in den Nukleus erfolgte als indirektes Zeichen der Zellzyklusaktivierung. Zur Erklärung, dass im Rahmen der Atherogenese auch Zellzyklusinhibitoren hochreguliert und aktiviert werden, formulierten Zettler et al. folgende Hypothese: Durch die gleichzeitige Hochregulation aller Zellzyklusproteine könne die Zelle ihr Wachstum besser steuern und hohe Inhibitor-Spiegel würden es ermöglichen, dass die Zelle auf Änderungen des umgebenden Milieus rascher reagiere. Diese Form des eher kontrollierten Wachstums unterscheidet die Proliferation im Rahmen der Atherogenese von malignem Zellwachstum. In dieser Arbeit wurde entsprechend auch eine Hochregulation von p27^{Kip1} statiiert. Da die OxLDL-Exposition allerdings 24 und 48 Stunden betrug, steht die Arbeit keineswegs im Widerspruch zu unseren eigenen Ergebnissen, die ja zunächst eine Herunterregulation von p27^{Kip1} nachweist und nach 24h bis auf die Konzentration von 5µg/ml OxLDL eine Hochregulation von p27^{Kip1}.

Passend zu der Hypothese der kontrollierten Proliferation sind die Ergebnisse der Arbeitsgruppe um Ophascharoensuk et al.. Diese wiesen nach, dass ein hoher p27^{Kip1}-Spiegel einen protektiven Effekt auf eine übermäßige Proliferation und Apoptose nach einer immunvermittelten und nicht-immunvermittelten Entzündung besitzt.

Dabei ist zu beachten, dass eine alleinige Änderung des p27^{Kip1}-Spiegels jedoch nicht genügt, eine Änderung der proliferativen Aktivität zu bewirken. Entscheidend ist das gleichzeitige Einwirken eines mitogenen Signals, wie Shankland et al. bei der Proliferation von Mesangialzellen zeigten (Shankland et al. 1997). In dieser Arbeit waren der Beginn und das Ausmaß der mitogeninduzierten mesangialen Zellproliferation in vitro noch mehr verstärkt, wenn die p27^{Kip1}-Spiegel mittels Antisense erniedrigt wurden. Diese Methodik erschien daher geeignet, die Rolle von p27^{Kip1} in der OxLDL-vermittelten Proliferation von Endothelzellen weiter darzustellen.

IV.4 Inhibition der p27^{Kip1}-Expression durch Antisense-Oligonukleotid-Transfektion in HUVEC

Um die Bedeutung des Zellzyklusinhibitors p27^{Kip1} im Rahmen der OxLDL-induzierten Proliferation weiter zu untersuchen, wurde die p27^{Kip1}-Expression durch transiente Transfektion mit Antisense-Oligonukleotiden reduziert. Da aus der Literatur bekannt war, dass eine effiziente Transfektion und dabei geringe Toxizität schwierig zu erreichen sind, wurden diese Parameter zunächst in einer FACS-Analyse bestimmt. Dabei fiel auf, dass mit den primär verwendeten Non-Phosphothioat-Oligonukleotide zwar zunächst eine gute Transfektionseffizienz erreicht werden konnte, diese aber sehr instabil war. Daraufhin wurden Phosphothioat-Oligonukleotide eingesetzt, für die eine längere Stabilität beschrieben war (Stein CA 2001). Bei der Verwendung von Phosphothioat-Oligonukleotiden zeigte sich, dass ein Zwanzigstel der Dosis von Non-Phosphothioat-Oligonukleotiden ausreichte, um eine vergleichbare, ja sogar verbesserte Transfektionseffizienz zu erreichen. Auch die Stabilität der Transfektion erschien mittels Phosphothioat-Oligonukleotide zufriedenstellend gelöst. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit anderen wissenschaftlichen Untersuchungen (Wagner 1994). Im Gegensatz zu Non-Phosphothioat-Oligonukleotiden trat jedoch nach Transfektion mit Phosphothioat-Oligonukleotiden eine weitaus höhere Nekroserate auf. Die Toxizität von Phosphothioat-Oligonukleotiden und auch der Transfektionsreagenzien wird in der Literatur ebenfalls beschrieben (Achenbach et al. 2003). Durch die gute Transfektionseffizienz war es jedoch möglich, eine solch geringe Menge an Oligonukleotiden und Lipofectin einzusetzen, dass die Nekroserate auch 24h nach Transfektion unter 20% lag und LDH-Freisetzung nur wenig gesteigert war. Die biologische Wirkung der Antisense-Oligonukleotide resultierte in der gewünschten Reduktion der p27^{Kip1}-Expression in HUVEC. Eine Transfektion von Missense-Oligonukleotiden führte zu keiner messbaren Verminderung der p27^{Kip1}-Expression.

IV.5 Untersuchung der Proliferationsinduktion durch OxLDL nach Reduktion der p27^{Kip1}-Expression mittels Antisense-Oligonukleotid-Transfektion

Bei der Untersuchung der Proliferationsinduktion durch OxLDL nach Reduktion der p27^{Kip1}-Expression mittels Antisense-Oligonukleotid-Transfektion kam es primär zu einem toxischen Effekt durch das Transfektionsagens Lipofectin. Im Vergleich zu Kontrollzellen wurde die Proliferation bereits durch eine Exposition mit Lipofectin deutlich reduziert. In Vorversuchen waren die Nekroserate und LDH-Freisetzung ausführlich untersucht worden und bei eingesetzter Konzentration nur gering gesteigert. Möglicherweise führt Lipofectin in einer Konzentration von 20µl/ml zwar nicht zu Zellschädigung im Sinne eines Membranschadens oder Apoptoseinduktion, sondern übt einen so großen Stress auf die Zellen aus, dass sie in eine Art Ruhezustand übertreten und damit insgesamt weniger proliferieren. Innerhalb der einzelnen Transfektionsgruppen (Lipofectin, Antisense und Missense) ist dennoch nach Exposition mit OxLDL jeweils eine statistisch signifikante Proliferation zu erzielen. Wenn man die Proliferation auf die jeweilige unbehandelte Kontrolle bezieht, fällt auf, dass die Proliferation in der Antisense-transfizierten Gruppe für die niedrigen OxLDL-Konzentrationen konstant höher ist als in allen Kontrollgruppen. Dies mag die These unterstützen, dass die bereits in den nativen Western Blots beobachtete Reduktion der p27^{Kip1}-Expression eine vermehrte proliferative Aktivität nach OxLDL Stimulation ermöglicht.

Allerdings nimmt auch die Proliferation der Missense-transfizierten Zellen nach OxLDL-Inkubation im Vergleich zu den Kontrollgruppen zu und übertrifft bei 20µg/ml die der Antisense-transfizierten Zellen, so dass ein spezifischer Effekt der Antisense-Oligonukleotide in Frage gestellt werden muß.

In allen Gruppen ist bei einer Konzentration von 200µg/ml OxLDL eine Reduktion der Proliferation auf ein gleich niedriges Niveau von etwa 30% zu sehen.

Letztlich war jedoch die Methodik der Antisense-Transfektion im Gegensatz zu der Arbeit von Shankland aufgrund technischer Limitationen nicht geeignet, an unserem Modell eine Endothezellproliferation zu studieren. Zwischenzeitlich wurde in einer Arbeit über verschiedene Oligonukleotid-Techniken bestätigt, dass Lipofectin zwar das effektivste Transfektionsagens darstellt, jedoch der Einsatz aufgrund eines ausgeprägten zytotoxischen Effektes limitiert ist (Weyermann et al 2004). Anhand anderer

Transfektionsverfahren müsste die These weiter geprüft werden. Alternativ könnte eine Zellart herangezogen werden, die weniger empfindlich auf toxische Einflüsse reagiert und dennoch eine proliferative Aktivität auf OxLDL zeigt. Eine weitere Möglichkeit bestünde in einer Überexpression von p27^{Kip1}. Sollte die hier dargelegte Hypothese korrekt sein, müsste dies eine proliferative Antwort auf OxLDL verhindern.

Prinzipiell kann allerdings die Hypothese aufrechterhalten werden, dass eine Reduktion der p27^{Kip1}-Expression zu einer Zunahme der Proliferation führt. Dies wird von den Ergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen gestützt:

In erster Linie ist hier die Arbeit von Kikuchi et al. 2004 zu erwähnen. Diese erzielten durch p27^{Kip1}-Antisense-Oligonukleotid-Transfektion eine Reduktion der p27^{Kip1}-Protein-Expression in Endothelzellen der Kornea von Ratten. In der Folge kam es nach Inkubation mit 10% FCS als Proliferationsstimulus zu einer Zunahme der proliferativen Aktivität der kornealen Endothelzellen im Vergleich zu den Missense-transfizierten Zellen. Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit ist die Bestätigung oben erwähnten Phänomens, dass eine alleinige Reduktion der p27^{Kip1}-Proteinexpression nicht ausreichte, eine vermehrte Proliferation zu induzieren. Erst durch Zugabe des Proliferationsstimulus 10% FCS kam es zu einem Anstieg der Proliferation.

IV.6 Die Zytotoxizität von OxLDL

In den zu dieser Arbeit durchgeführten Studien der OxLDL-induzierten Proliferation von Endothelzellen kam es regelmäßig bei Konzentrationen über 50µg/ml OxLDL zu einem Absterben der Zellen. Es wurde nicht untersucht, ob es sich dabei um die Induktion einer Apoptose oder Nekrose handelt. Damit konnte jedoch der zytotoxische Effekt von OxLDL bestätigt werden, wie er erstmals von Morel und Mitarbeitern beschrieben wurde (Morel et al. 1984, Cathcart et al. 1985). Bei Wolfowitz et al. 1995 wird ein vergleichbarer dosisabhängiger Effekt von OxLDL wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben: Auch hier kam es bei niedrigen OxLDL-Konzentrationen von 25-50µg/ml zu einem protektiven Effekt und bei einer OxLDL-Konzentration von 100µg/ml zu einer ausgeprägten Zytotoxizität sowie nahezu vollständigen Ablösung der sonst adhären Endothelzellen. Dieser Aspekt mag von besonderer Bedeutung sein für die Entwicklung einer fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaqueläsion, indem er zum

Verlust einer intakten Endothelzellauskleidung von Gefäßen beiträgt (Steinberg et al 1989). Im Weiteren mögen die in der Einleitung ausgeführten Mechanismen der Response-to-injury-Hypothese ihre Wirkung entfalten.

IV.7 Klinische Aspekte

Bei immerhin 25-55% der Patienten ist nach klinisch erfolgreicher Revaskularisation eine Restenose zu verzeichnen. Gerade unmittelbar nach Angioplastie kommt es zu einer raschen Proliferation der Media und im Verlauf zu einer gesteigerten Proliferation der Neointima, bevor nach 2-4 Wochen eine normale Proliferationsrate erreicht wird. Es wurde nachgewiesen, dass zu diesem Zeitpunkt die Konzentration von CDK2 sinkt, da es zu einer Komplexbildung mit dem in hohen Konzentrationen vorliegendem p27^{Kip1} kommt. An einem Tiermodell konnte weiters gezeigt werden, dass eine Überexpression von p27^{Kip1} durch eine Adenovirus-Infektion die Intimahyperplasie nach Angioplastie signifikant vermindert (Chen et al. 1997).

Einen anderen Ansatzpunkt bietet die Therapie mit Statinen. Neben der bekannten Reduktion der Lipoproteinkonzentration im Blut werden immer wieder neue Wirkungen propagiert. Terada et al. konnten beispielsweise mit Lovastatin dosisabhängig die mesangiale Zellproliferation in vitro inhibieren (Terada et al 1998). Der Effekt wurde von einer ansteigenden Konzentration des p27^{Kip1}-Proteins begleitet. Durch Antisense-Oligonukleotide gegen p27^{Kip1} konnte der Statin-induzierte Zellzyklusarrest aufgehoben werden. Die Arbeitsgruppe von Schaefer et al. wies zum einen ebenfalls einen proliferativen Effekt von OxLDL auf Endothelzellen (HUVEC) nach. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass durch Statine die OxLDL-induzierte Endothelzellproliferation zumindest in der Zellkultur verhindert werden kann. Dies mag einen ergänzenden antiatherogenen Effekt einer Statintherapie darstellen.

Neue Therapien zielen darauf ab, die Oxidation von LDL zu verhindern, um so die Atherosklerose-Entstehung zu vermindern. Hier sind in erster Linie die natürlichen Antioxidantien wie Vitamin E, Vitamin C, Carotinoide und Flavonoide zu nennen (Cherubini et al 2005).

V Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von oxidiertem LDL auf die Zellzyklusregulation von Endothelzellen untersucht. OxLDL gilt als ein ausgeprägt atherogen wirkendes Lipoprotein, so dass dem Molekül bezüglich Krankheitsinitiation und -progression einer Atherosklerose wesentliche Bedeutung zukommt. Aus der Literatur war bekannt, dass OxLDL einen proliferativen Effekt auf glatte Muskelzellen hat. In einem ersten Schritt wurde untersucht, inwieweit OxLDL auch eine Proliferation von Endothelzellen *in vitro* induziert. Mit drei verschiedenen Methoden, einem ³H-Thymidin-Assay, einem MTT-Assay und einer Zellzählung wurde in der Zellkultur eine Proliferationskinetik von HUVEC, die mit OxLDL inkubiert worden waren, erstellt. Dabei zeigte sich ein dualer Effekt von OxLDL: Niedrige Konzentrationen (1-50µg/ml) OxLDL führten zu einem Anstieg der Proliferation im Vergleich zu Kontrollzellen, wohingegen es bei höheren Konzentrationen OxLDL (100 und 200µg/ml) zu einem Absterben der Zellen kam. Passend dazu fand sich bei hohen OxLDL-Konzentrationen eine vermehrte LDH-Freisetzung. Im Weiteren sollte überprüft werden, durch welche Mechanismen OxLDL die nachgewiesene proliferative Wirkung entfaltet. Hierzu wurde der Einfluss auf den Zellzyklusinhibitor p27^{Kip1} in einer Western Blot-Analyse bestimmt. Es zeigte sich eine dosis- und zeitabhängige Regulation von p27^{Kip1}. Niedrige Konzentrationen OxLDL, die eine maximale Proliferation induziert hatten, führten zu einer anhaltenden Reduktion von p27^{Kip1}. Dahingegen führten höhere Konzentrationen lediglich zu einer passageren Suppression von p27^{Kip1}. Um diese Beobachtung noch weiter zu untermauern, wurden HUVEC mit Antisense-Oligonukleotiden transient liposomenvermittelt transfiziert und im Anschluss der proliferative Effekt erneut getestet. Dafür war in Vorversuchen mittels FACS-Analyse, Mikroskopie und Bestimmung der LDH-Freisetzung die Transfektionseffizienz von Non-Phosphothioat-Oligonukleotiden und Phosphothioat-Oligonukleotiden optimiert und deren Toxizität evaluiert worden. Eine Suppression der Proteinexpression von p27^{Kip1} durch Antisense-Oligonukleotide konnte im Gegensatz zu der Missense-Kontrolle in einer Western Blot-Analyse gesichert werden. Die Überprüfung der Hypothese, dass Antisense-transfizierte HUVEC nach Exposition mit OxLDL noch stärker proliferieren als die der Missense-transfizierten Kontrolle, wurde jedoch durch einen additiven toxischen Effekt von OxLDL und Transfektion limitiert.

VI Literaturverzeichnis

Achenbach TV, Brunner B, Heermeier K: Oligonucleotide-based knockdown technologies: antisense versus RNA interference. *Chem Bio Chem* 2003, 4: 928-935

Assmann G, Schulte H, von Eckardstein A: Hypertriglyceridemia and elevated lipoprotein(a) are risk factors for major coronary events in middle-aged men. *Am J Cardiol* 1996, 77: 1179-1184

Augé N, Pieraggi MT, Thiers JC, Nègre-Salvayre A, Salvayre R: Proliferative and cytotoxic effects of mildly oxidized low-density lipoproteins on vascular smooth-muscle cells. *Biochem J* 1995, 309: 1015-1020

Björkerud B, Björkerud S: Contrary effects of lightly and strongly oxidized LDL with potent promotion of growth versus apoptosis on arterial smooth muscle cells, macrophages, and fibroblasts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996, 16: 416-424

Brand K, Banka CL, Mackman N, Terkeltaub RA, Fan ST, Curtiss LK: Oxidized LDL enhances lipopolysaccharide-induced tissue factor expression in human adherent monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1994, 14: 790-797

Cathcart MK, Morel DW, Chisolm GM 3rd: Monocytes and neutrophils oxidize low density lipoprotein making it cytotoxic. *J Leukoc Biol* 1985, 38(2): 341-350

Chatterjee S, Ghosh N: Oxidized low density lipoprotein stimulates aortic smooth muscle cell proliferation. *Glycobiology* 1996, 6: 303-311

Chen D, Krasinski K, Chen D, Sylvester A, Chen J, Nisen PD, Andres V: Downregulation of cyclin-dependent kinase 2 activity and cyclin A promoter activity in vascular smooth muscle cells by p27^{kip1}, an inhibitor of neointima formation in the rat carotid artery. *J Clin Invest* 1997, 99: 2334-2341

Cherubini A, Vigna GB, Zuliani G, Ruggiero C, Senin U, Fellin R: Role of antioxidants in atherosclerosis: epidemiological and clinical update. *Curr Pharm Des* 2005, 11(16): 2017-2032

Coats S, Flanagan WM, Nourse J, Roberts JM: Requirement of p27^{kip1} for restriction point control of the fibroblast cell cycle. *Science* 1996, 272: 877-880

Creutzig A: Krankheiten der Gefäße. *Innere Medizin*, Hrsg, Classen, Diehl, Kochsiek, Urban & Fischer Verlag, 5.Auflage, 2004: S. 387

Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F, Gerrity R, Schwartz CJ, Fogelman AM: Minimally modified LDL induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87: 5134-5138

Díez-Juan A, Andrés V: The growth supressor p27^{kip1} protects against diet-induced atherosclerosis. *FASEB J* 2001, 15: 1989-1995

Drake TA, Hannani K, Fei HH, Lavi S, Berliner JA: Minimally oxidized low-density lipoprotein induces tissue factor expression in cultured human endothelial cells. *Am J Pathol* 1991, 138: 601-607

Ehara S, Ueda M, Naruko T, Haze K, Itoh A, Otsuka M, Komatsu R, Matsuo T, Itabe H, Takano T, Tsukamoto Y, Yoshiyama M, Takeuchi K, Yoshikawa J, Becker AE: Elevated levels of oxidized low density lipoprotein show a positive relationship with the severity of acute coronary syndromes. *Circulation* 2001, 103: 1955-1960

Endemann G, Stanton LW, Madden KS, Bryant CM, White RT, Protter AA: CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem* 1993, 268: 11811-118165

Espesito V, Baldi A, De Luca A, Groger AM, Loda M, Giordano GG, Caputi M, Baldi F, Pagano M, Giordano A: Prognostic role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 1997, 57: 3381-3385

Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL: CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest* 2001, 108: 785-791

Fei H, Berliner JA, Parhami F, Drake TA: Regulation of endothelial cell tissue factor expression by minimally oxidized LDL and lipopolysaccharide. *Arterioscler Thromb* 1993, 13: 1711-1717

Frohlich J, Lear SA: Old and new risk factors for atherosclerosis and development of treatment recommendations. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 2002, 29: 838-842

Fruchart JC, Nierman MC, Stroes ESG, Kastelein JJP, Duriez P: New risk factors for atherosclerosis and patient risk assessment. *Circulation* 2004, 109: suppl III-15 – III-19

Galle J, Lehmann-Bodem C, Hübner U, Heinloth A, Wanner C: CyA and OxLDL cause endothelial dysfunction in isolated arteries through endothelin-mediated stimulation of O_2^- formation. *Nephrol Dial Transplant* 2000, 15: 339-346

Gonzalez P, Díez-Juan A, Coto E, Alvarez V, Reguero JR, Batalla A, Andrés V: A single-nucleotide polymorphism in the human p27^{kip1} gene (-838C>A) affects basal promoter activity and the risk of myocardial infarction. *BMC Biology* 2004, 2: 1-6

Guo Y, Sklar GN, Borkowski A, Kyprianou N: Loss of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{kip1} protein in human prostate cancer correlates with tumor grade. *Clin Cancer Res* 1997, 3: 2269-2274

Hach-Wunderle V: Gefäße. Basislehrbuch Innere Medizin, Herausgeber Renz-Polster H, Braun J, Urban und Fischer Verlag, 2001, 2. Auflage: 191-193

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

Harrison's Principles of Internal Medicine, Mc Graw-Hill, New York, London, Tokyo, Volume 1, 14th Edition, 1998: 505-507

Helene C, Toulme JJ: Specific regulation of gene expression by antisense, sense and antigene nucleic acids. *Biochim Biophys Acta* 1990, 1049: 99-125

Jang TJ, Kang MS, Kim H, Kim DH, Lee JI, Kim JR: Increased expression of cyclin D1, cyclin E and p21(Cip1) associated with decreased expression of p27(Kip1) in chemically induced rat mammary carcinogenesis. *Jpn J Cancer Res* 2000, 91: 1222-1232

Kikuchi M, Harris DL, Obara Y, Senoo T, Joyce NC: p27^{kip1} Antisense-induced proliferative activity of rat corneal endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004, 45 (6): 1763-1770

Klouche M, Rose-John S, Schmiedt W, Bhakdi S: Enzymatically degraded, nonoxidized LDL induces human vascular smooth muscle cell activation, foam cell transformation, and proliferation. *Circulation* 2000, 101: 1799-1805

Koba S, Pakala R, Watanabe T, Katagiri T, Benedict CR: Vascular smooth muscle proliferation: synergistic interaction between serotonin and low density lipoproteins. *J Am Coll Cardiol* 1999, 34: 1644-1651

Kockx MM, De Meyer GRY, Muhring J, Jacob W, Bult H, Herman A: Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques. *Circulation* 1998, 97: 2307-2315

Latron Y, Chautan M, Anfosso F, Alessi MC, Nalbone G, Lafont H, Juhan-Vague I: Stimulating effect of oxidized low density lipoproteins on plasminogen activator inhibitor-1 synthesis by endothelial cells. *Arterioscler Thromb* 1991, 11: 1821-1829

Lees E: Cyclin dependent kinase regulation. *Curr Opin Cell Biol* 1995, 7: 773-780

Libby P, Ridker M, Maseri A: Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 2002, 105: 1135-1143

Maier JA, Barenghi L, Bradamante S, Pagani F: Induction of human endothelial cell growth by mildly oxidized low density lipoprotein. *Atherosclerosis* 1996, 123: 115-121

Mangin EL, Kugiyama K, Nguy JH, Kerns SA, Henry PD: Effects of lysolipids and oxidatively modified low density lipoprotein on endothelium-dependent relaxation of rabbit aorta. *Circ Res* 1993, 72: 161-166

McGill HC, McMahan CA, Zieske AW, Tracy RE, Malcom GT, Herderick EE, Strong JP: Association of coronary heart disease risk factors with microscopic qualities of atherosclerosis in youth. *Circulation* 2000, 102: 374-379

Morel DW, DiCorleto PE, Chisolm GM: Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. *Arteriosclerosis* 1984, 4(4):357-364

Morgan DO: Principles of CDK regulation. *Nature* 1995, 374: 131-134

Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ: A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in humans by a non-

cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. Proc Natl Acad Sci. 1990, 87: 9383-9387

Murugesan G, Chisolm GM, Fox PL: Oxidized low density lipoprotein inhibits the migration of aortic endothelial cells in vitro. J Cell Biol 1993, 120: 1011-1019

Nakayama K, Ishida N, Shirane M, Inomata A, Inoue T, Shishido N, Horii I, Loh DY, Nakayama K: Mice lacking p27(kip1) display increased body size, multiple organ hyperplasia, retinal dysplasia, and pituitary tumors. Cell 1996, 85: 707-720

Nickening G, Böhm M: Atherosklerose. Innere Medizin, Hrsg. Classen, Diehl, Kochsiek, Urban & Fischer Verlag, 5.Auflage, 2004: 221

Ophascharoensuk V, Fero ML, Hughes J, Roberts JM, Shankland SJ: The cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{kip1} safeguards against inflammatory injury. Nature Medicine 1998, 4 (5) :575- 580

Pardee AB: G1 events and regulation of cell proliferation. Science 1989, 246: 603-608

Peter M, Herskowitz I: Joining the complex: cyclin-dependent kinase inhibitory proteins and the cell cycle. Cell 1994, 79:181-184

Porter PL, Malone KE, Heagerty PJ, Alexander GM, Gatti LA, Firpo EJ, Daling JR, Roberts JM: Expression of cell-cycle regulators p27kip1 and cyclin E, alone and in combination, correlate with survival in young breast cancer patients. Nat. Med 1997, 3 (2): 222-225

Pruneri G, Pignataro L, Carboni N, Buffa R, Di Finizio D, Cesana BM, Neri A: Clinical relevance of expression of the CIP/KIP cell-cycle inhibitors p21 and p27 in laryngeal cancer. J Clin Oncol 1999, 17 (10): 3150-3159

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

Riede UN, Müntefering H, Drexler H, Ihling C, Schäfer H-E: *Kardiovaskuläres System. Allgemeine und spezielle Pathologie*, Hrsg. Riede UN, Schäfer HE, 4. Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, 1995: 435-524

Ross R: Atherosclerosis – an inflammatory disease: *NEJM* 1999, 340 (2): 115-126

Schaefer CA, Kuhlmann CR, Gast C, Weiterer S, Li F, Most AK, Neumann T, Backenkohler U, Tillmanns H, Waldecker B, Wiecha J, Erdogan A: Statins prevent oxidized low-density lipoprotein- and lysophosphatidylcholine-induced proliferation of human endothelial cells. *Vascul Pharmacol* 2004, Mar 41 (2): 67-73

Shankland SJ, Pippin J, Flanagan M, Coats SR, Nangaku M, Gordon KL, Roberts JM, Couser WG, Johnson RJ: Mesangial cell proliferation mediated by PDGF and bFGF is determined by levels of the cyclin kinase inhibitor p27kip1. *Kidney Int* 1997, 51: 1088-1099

Shankland SJ: Cell-cycle control and renal disease. *Kidney International* 1997, 52(2): 294-308

Shankland SJ: Cell cycle regulatory proteins in glomerular disease. *Kidney International* 1999, 56: 1208-1215

Shankland SJ, Wolf, G: Cell cycle regulatory proteins in renal disease: role in hypertrophy, proliferation, and apoptosis. *AJP-Renal Physiology* 2000, 278(4): 515-529

Sheaff RJ, Groudine M, Gordon M, Roberts JM, Clurman BE: Cyclin E-CDK2 is a regulator of p27Kip1. *Genes Dev* 1997, 11: 1464-1478

Sherr CJ: The Pezcoller Lecture: Cancer cell cycles revisited. *Cancer Research* 2000, 60: 3689-3695

Sherr CJ, Roberts JM: Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 1995, 9: 1149-1163

Shirin H, Kravtsov V, Shahmurov M, Petchenko P, Boaz M, Moss SF, Avni Y, Avinoach I: p27kip1 expression is inversely related to the grade of gastric MALT lymphoma. *Int J Gastrintest Cancer* 2005, 35(1): 25-32

Statistisches Bundesamt Deutschland, Sterbefälle nach den 10 häufigsten Todesursachen insgesamt und nach Geschlecht 2004, aktualisiert am 17. November 2005

Stein CA: The experimental use of antisense oligonucleotides: a guide for the perplexed. *J Clin Invest* 2001, 108: 641-644

Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL: Beyond cholesterol: modifications of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989, 320: 915-924

Strong JP, Malcom GT, McMahan CA, Tracy RE, Newman WP 3rd, Herderick EE, Cornhill JF: Prevalence and extent of atherosclerosis in adolescents and young adults: implications for prevention from pathobiological determinants of atherosclerosis in youth study. *JAMA* 1999, 281 (8): 727-735

Tari AM, Tucker SD, Deisseroth A, Lopez-Berestein G: Liposomal delivery of methylphosphonate antisense oligodeoxynucleotides in chronic myelogenous leukemia. *Blood* 1994, 84(2): 601-607

Terada Y, Inoshita S, Nakashima O, Yamada T, Kuwahara M, Sasaki S, Marumo F: Lovastatin inhibits mesangial cell proliferation via p27Kip1. *J Am Soc Nephrol* 1998, 9(12): 2235-2243

Toyoshima H, Hunter T: P27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 1994, 78(1): 67-74

Wagner RW: Gene inhibition using antisense oligodeoxynucleotides. *Nature* 1994, 372: 333-335

Weyermann J, Lochmann D, Zimmer A: Comparison of antisense oligonucleotide drug delivery systems. *J Controlled Release* 2004, 100: 411-423

Witztum JL: The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *The Lancet* 1994, 344: 793-795

Wolfowitz E, Aviram M, Broock JG, Tatarsky I, Lanir N: Protective effect of low concentrations of oxidized low-density lipoprotein on endothelial cell integrity. *J Cardiovasc Risk* 1995, 2(1): 57-62

Yang X, Cai B, Sciacca RR, Cannon PJ: Inhibition of inducible nitric oxide synthase in macrophages by oxidized low-density lipoproteins. *Circ Res* 1994, 74(2): 318-328

Young SG, Parthasarathy S: Why are low-density lipoproteins atherogenic? *West J Med* 1994, 160(2): 153-164

Zettler ME, Prociuk MA, Austria JA, Massaeli H, Zhong G, Pierce GN: OxLDL stimulates cell proliferation through a general induction of cell cycle proteins. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003, 284: 644-653

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen herzlich bedanken, die mich bei meiner Promotion begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Jan Galle

für das spannende Promotionsthema, die Möglichkeit, selbständig experimentell zu arbeiten und die hilfsbereite, zuverlässige und freundliche Betreuung während der Promotion.

Allen Mitarbeitern des Nephrologischen Labors für die gute und hilfsbereite Zusammenarbeit sowie die fachliche Kompetenz beim Erlernen der molekularbiologischen Methoden. Namentlich erwähnen möchte ich Frau Marita Bartrow, Frau Elke Baumeister, Frau Margarete Röder und Frau Traudel Baier.

Frau Dr. Alexandra Heinloth

für die exzellente fachliche Beratung aus den USA.

Herrn Dr. Stefan Seibold

für seine freundliche und konstruktive Hilfe bei der Versuchsplanung und systematischen Problemanalyse.

Herrn Dr. Alois Palmeshofer

für die fachliche und kollegiale Unterstützung bei der Durchführung der FACS-Analysen.

Herrn Dr. Cornelius Krasel

für die Möglichkeit, an einem Konfokal-Laser Mikroskop arbeiten zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. Gunter Wolf

für die Bereitstellung der Oligonukleotide.

Herrn Dr. Gerhard Glatting

für die Mithilfe bei der Statistik.

Ich danke meinem Ehemann PD Dr. Andreas Buck, meinen Eltern Dr. Wolfgang und Monika Schürle, sowie meinen Geschwistern Dr. Charlotte Hackenberg und Stefan Schürle für ihre unermüdliche und liebevolle Unterstützung während der gesamten Promotion.

07/ 2002	Neurologie	University Hospital of Kyoto
08/ 2002	Gynäkologie u. Geburtshilfe	University Hospital of Kyoto
09/ 2002	Allgemeinmedizin	Praxis Ulm-Westerstetten

Praktisches Jahr

04-08/ 2003	Innere Medizin	Universitätsspital Zürich
08-10/ 2003	Chirurgie (Notfallstation)	New-York-University Downtown Hospital
10-12/ 2003	Chirurgie (Herzchirurgie und Chirurgische Intensivstation)	Harvard Medical School, Boston, Brigham and Women's Hospital
12/03-04/2004	Neurologie	Universitätsklinik Würzburg

Berufliche Tätigkeit

10/2004	Approbation als Ärztin
9/2004	Ärztin im Praktikum, Neurologische Klinik der Universität Würzburg
seit 10/04	Assistenzärztin, Neurologische Klinik der Universität Würzburg

Promotion

Thema	„Wirkung atherogener Lipoproteine auf den Zellzyklus von Endothelzellen“
Leitung	Prof. Dr. Jan Galle, Universitätsklinik für Innere Medizin Würzburg, Abteilung Nephrologie

Stipendien

1999-2004	Stipendiatin des Cusanuswerkes
2001-2003	Stipendiatin e-fellows

Sprachen

Englisch	Fließend in Schrift und Sprache
Französisch	Grundkenntnisse
Latein	Grosses Latinum

Klinische Studien

Remain	Phase IV, Subinvestigator
FTY	Phase III, Subinvestigator
Laquinimod	Phase II, Subinvestigator
ECASS III	Phase III, Subinvestigator
Dias2	Phase II, Subinvestigator

Zertifizierungen

EDSS-Zertifikat
NIH Stroke Scale Zertifikat

Unterricht

Unterricht an der Berufsschule für Krankenpflege der Missionsärztlichen Klinik
Würzburg im Fach Neurologie

Würzburg, im Mai 2006

