

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl

**Untersuchung der Entstehung von intrazellulärem oxidativem Stress
unter dem Einfluss von oxidiertem low density lipoprotein**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Tanja Bauer

aus Schweinfurt

Würzburg, März 2010

Referent: Professor Dr. med. J. Galle

Korreferent: Professor Dr. med. C. Wanner

Dekan: Professor Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung:

05.10.2010

Die Promovendin ist Ärztin

In Liebe und Dankbarkeit meiner Familie und ganz besonders Lisa gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Atherosklerose.....	1
1.1.1	Allgemeines	1
1.1.2	Risikofaktoren	1
1.1.3	Pathophysiologie	2
1.2	Lipoproteine	6
1.2.1	Lipoproteinfraktionen und deren Funktionen.....	6
1.2.2	LDL-Formen und Rezeptoren	7
1.2.2.1	natives LDL	7
1.2.2.2	modifiziertes LDL	8
1.2.3	HDL	11
1.3	Reaktive Sauerstoffspezies	11
1.3.1	wichtige Vertreter	11
1.3.2	Quellen und Stimuli.....	12
1.3.3	Antioxidative Strategien.....	16
1.3.4	Effekte der ROS auf die Gefäßwand	18
1.4	Spektroskopische Nachweismöglichkeiten für ROS.....	20
1.4.1	Electron Spin Resonance	20
1.4.2	Spektrophotometrie des sichtbaren Lichts (Vis-Spektroskopie)	20
1.4.3	Fluoreszenzspektroskopie.....	20
1.4.3.1	Proben.....	21
1.4.3.2	Messverfahren	23
1.4.4	Lumineszenzproben und ihre Messung	24
1.4.4.1	Proben.....	24
1.4.4.2	Messverfahren	26
1.5	Zielsetzung.....	26
2	MATERIALIEN	28
2.1	Zellkultur.....	28
2.2	Chemikalien.....	29
2.3	Ge- und Verbrauchsmaterialien.....	30
2.4	Geräte und Zubehör	32
3	METHODEN.....	33
3.1	Zellkultur.....	33
3.1.1	Herstellung der verwendeten Wachstumsmedien.....	33

3.1.2	Kultivierung humaner Endothelzellen aus der Nabelschnurvene.....	33
3.1.3	Kultivierung glatter Muskelzellen aus Koronararterien	34
3.1.4	Einsatz im Versuch	35
3.1.5	Transfektion von HUVEC mit siRNA.....	35
3.2	Herstellung und Modifikation der Lipoproteine	36
3.2.1	Herstellung von nativem low density lipoprotein (nLDL)	36
3.2.2	Herstellung von oxidiertem low density lipoprotein (oxLDL).....	37
3.2.3	Herstellung von DiI-markiertem oxidiertem low density lipoprotein (DiI-oxLDL).....	37
3.3	Lösungen der verwendeten Antioxidantien.....	38
3.4	Messung von ROS am Luminometer	39
3.4.1	Herstellung des verwendeten Puffers und Lösung des Farbstoffes L-012	39
3.4.2	Versuch zum Nachweis der Freisetzung von $O_2^{\cdot -}$ durch oxLDL	40
3.5	Messung von ROS am FACS und Multilabel Counter	41
3.5.1	Lösung der Fluoreszenzproben.....	41
3.5.2	Messung der DiI-oxLDL-Aufnahme und ROS-Bildung in HUVEC nach Transfektion mit siRNA im FACS.....	41
3.5.3	Messung oxLDL-induzierter ROS und deren Hemmung in zellfreier Lösung im Multilabel Counter	42
3.5.4	Messung oxLDL-induzierter ROS auf Lumox-Schalen im FACS.....	42
3.5.5	Messung der oxLDL-Aufnahme in HUVEC und der induzierten ROS-Entstehung bei 37°C und 4°C im FACS	43
3.5.6	Messung der oxLDL-Aufnahme und induzierten ROS-Bildung in CASMC im FACS.....	44
3.5.7	Messung der oxLDL-induzierten ROS und deren Hemmung in HUVEC und CASMC im FACS	45
3.5.8	Durchführung der Messung am FACS	45
3.6	Auswertung und Statistik.....	46
4	ERGEBNISSE	48
4.1	Nachweis der Beteiligung des LOX-1-Rezeptors an der oxLDL-Aufnahme in HUVEC	48
4.2	Nachweis der Freisetzung von $O_2^{\cdot -}$ durch oxLDL.....	50
4.3	Nachweis der anhaltenden extrazellulären Freisetzung von $O_2^{\cdot -}$ durch oxLDL	52
4.4	Nachweis der oxLDL-induzierten Entstehung weiterer ROS-Untergruppen in zellfreier Lösung	55
4.5	Nachweis der Entstehung von oxidativem Stress in HUVEC durch extrazelluläre Stimulation mit $O_2^{\cdot -}$	56
4.6	Nachweis der reduzierten Aufnahme von oxLDL in HUVEC bei 4°C.....	58

4.7	Nachweis der oxLDL-induzierten Bildung von oxidativem Stress in HUVEC bei 4°C	59
4.8	Nachweis der reduzierten Aufnahmefähigkeit für oxLDL in CASMC	63
4.9	Nachweis der oxLDL-induzierten Bildung von ROS in CASMC	66
4.10	Nachweis der oxLDL-induzierten Bildung verschiedener ROS-Untergruppen und deren Hemmung in CASMC	70
5	DISKUSSION	73
5.1	Die Bedeutung der NAD(P)H-Oxidase für die oxLDL-induzierte Entstehung von oxidativem Stress.....	73
5.2	Die extrazelluläre Generierung von O₂⁻ durch oxLDL	77
5.3	Verlässlichkeit der verwendeten Farbstoffe.....	79
5.3.1	Chemilumineszenz-Farbstoff L-012.....	80
5.3.2	Fluoreszenz-Farbstoffe c-H ₂ DCF-DA und DHE.....	80
5.4	Ausblicke	81
6	ZUSAMMENFASSUNG	82
7	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	84
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	88
9	LITERATURVERZEICHNIS.....	91

DANKSAGUNG

LEBENS LAUF

1 Einleitung

1.1 Atherosklerose

1.1.1 Allgemeines

Der Begriff der Atherosklerose stand lange Zeit synonym für eine Akkumulation von Lipoproteinen in der Gefäßwand großer und mittelgroßer elastischer und muskulärer arterieller Gefäße. Inzwischen konnte jedoch gezeigt werden, dass nicht nur die Ablagerung von Lipiden eine Rolle spielt, sondern vielmehr die Entstehung endothelialer Dysfunktion, die auf ein verstärktes Vorkommen modifizierter Lipoproteine, reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und weiterer Risikofaktoren kompensatorisch mit einer Entzündungsreaktion reagiert. [Ross, R. - 1999] Die darin begründete Atherosklerose bildet nun die Grundlage für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen (CVD = cardiovascular disease), wie z.B. Erkrankungen der Koronarien, Hypertension, Herzinsuffizienz und Schlaganfall, welche die führenden Todesursachen in den Industrieländern darstellen. [Madamanchi, N. R. - 2005]

1.1.2 Risikofaktoren

Mittlerweile ist eine große Anzahl an Prädiktoren für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen bekannt, wobei noch Unklarheit über die Gewichtung der einzelnen Faktoren besteht. Dazu werden ein hohes Alter, männliches Geschlecht, Adipositas, Nikotinabusus, Hypertension, Diabetes mellitus, hohe Konzentration an LDL (low density lipoprotein), geringe Konzentration an HDL (high density lipoprotein), positive Familienanamnese, Infektionen (Herpesviren, Chlamydia pneumoniae) und Hyperhomocysteinämie gezählt. [Ceperkovic, Z. - 2006 // Hozawa, A. - 2006 // Kim, S. W. - 2006 // Ross, R. - 1999 // Stocker, R. - 2004 // Takeuchi, M. - 2006] Zur Abschätzung des individuellen Risikos stehen verschiedene Scores wie z.B. der Framingham risk score [NCEP - 2001], PROCAM score [Assmann, G. - 2002 //

Cooper, J. A. - 2005] und SCORE risk score [**Conroy, R. M.** - 2003] zur Verfügung, in deren Auswertung unterschiedliche Risikofaktoren einbezogen werden. Der Framingham risk score beispielsweise berücksichtigt folgende Faktoren: Geschlecht, Alter, Gesamtcholesterin, Blutdruck (systolisch), Nikotinabusus und die Konzentration an HDL. [**Kim, S. W.** - 2006]

1.1.3 Pathophysiologie

Da die Pathophysiologie der Atherosklerose bis heute nur unzureichend geklärt ist, existieren verschiedene Hypothesen. [**Stocker, R.** - 2004] In dieser Arbeit soll nun auf die Hypothese der oxidativen Modifikation näher eingegangen werden. Diese wurde erstmals von Steinberg 1989 beschrieben, der von einer kausalen Verbindung zwischen oxidativem Stress und der Entstehung von Atherosklerose ausging. [**Steinberg, D.** - 1989] Gelangt natives LDL (nLDL) aus dem Lumen eines Blutgefäßes in den subendothelialen Raum (siehe **Abb. 1**), wird dieses durch oxidativen Stress (vgl. 1.3), welcher durch entsprechende Aktivitäten in Makrophagen, glatten Muskelzellen und Endothelzellen verstärkt wird, oxidativ modifiziert. [**Madamanchi, N. R.** - 2005] Das hierbei entstandene oxidierte LDL (oxLDL) trägt nun aktiv zur Entstehung atherosklerotischer Läsionen (Plaques) bei, indem es zirkulierende Monozyten in die Intima rekrutiert, die dort bereits vorhandenen Makrophagen am Verlassen derselben hindert und die Aufnahmerate von Lipoproteinen in den subendothelialen Raum steigert. Dadurch verstärkt oxLDL die Schaumzellbildung und trägt durch seine zytotoxische Wirkung zur Entstehung endothelialer Dysfunktion und Beschädigung des Endothels bei. [**Stocker, R.** - 2005]

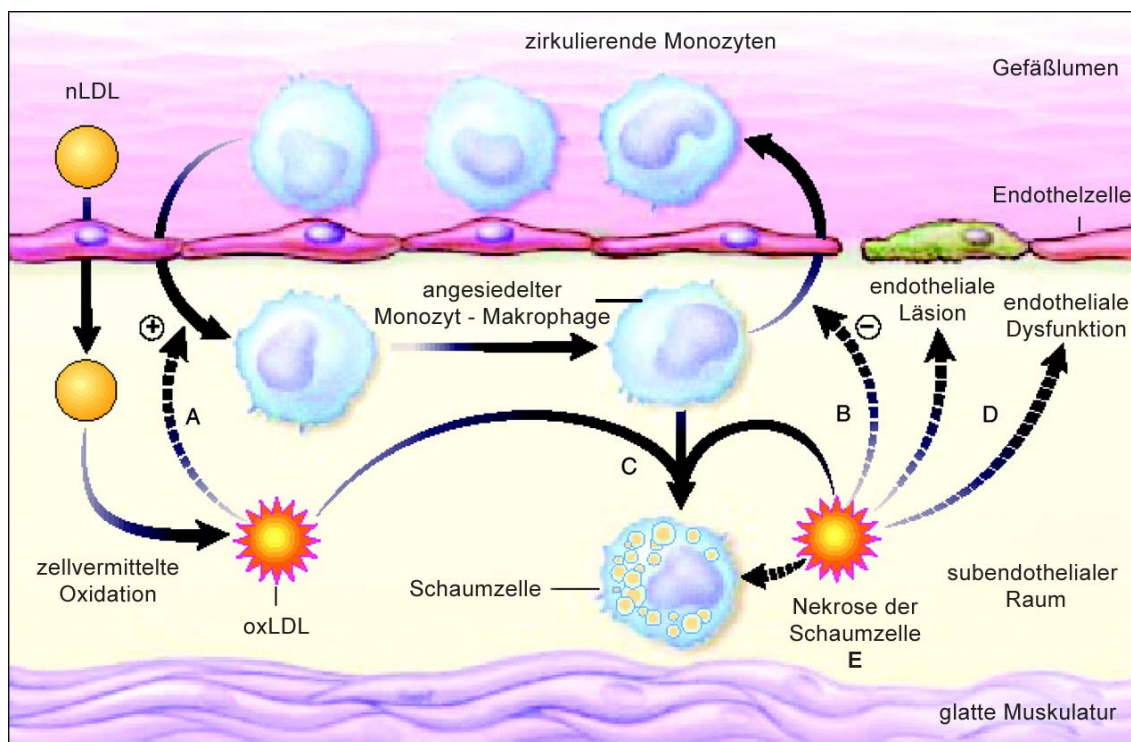


Abb. 1 Hypothese der oxidativen Modifikation: nLDL-Aufnahme in den subendothelialen Raum und oxidative Modifikation durch angesiedelte Gefäßzellen wie z.B. glatte Muskelzellen, Endothelzellen und Makrophagen. Stimulation der monozytären Chemotaxis durch oxLDL (A), Hemmung der Monozyten am Verlassen des subendothelialen Raumes (B) und Förderung der Schaumzellbildung (C). Entstehung endothelialer Dysfunktion und Plaquebildung durch oxLDL (D). Nekrose der Schaumzellen durch Akkumulation von oxLDL (E). [Stocker, R. - 2005]

Unter physiologischen Bedingungen wirkt das Gefäßendothel neben der Produktion von Vasokonstriktoren wie Angiotensin II (Ang II) hauptsächlich durch den Vasodilatator NO vasoprotektiv und antiatherogen. Es hält über die Bildung des second messenger cGMP (cyclic guanosine monophosphate) die Balance zwischen Vasodilatation und Vasokonstriktion, Thrombogenese und Fibrinolyse, Hemmung und Stimulation der Proliferation und Migration glatter Muskelzellen. [Charakida, M. - 2006 // Corti, R. - 2002 // Tziros, C. - 2006] Ebenso reduziert NO den Einstrom von Lipoproteinen in die Gefäßwand und inhibiert deren Oxidation. [Davignon, J. - 2004 // Li, H. - 2000] Eine Störung dieses Gleichgewichtes durch einen Mangel an NO führt zu endothelialer Dysfunktion, die ein frühes Zeichen der Atherosklerose darstellt. [Davignon, J. - 2004 // Stone, P. H. - 2005] Sie geht einher mit erhöhter endothelialer Permeabilität, Leukozytenmigration, Hochregulation leukozytärer und endothelialer Adhäsions-

moleküle und lokaler Oxidation und Aufnahme modifizierter Lipoproteine in das Endothel. [Ross, R. - 1999 // Stoll, G. - 2006] Die Gefäßwand reagiert darauf mit einer chronischen Entzündungsreaktion, die sich bis zur Plaqueruptur fortsetzen kann. [Lafont, A. - 2003 // Paoletti, R. - 2004] Monozyten und T-Lymphozyten ist es durch diese endothelialen Veränderungen möglich, an das geschädigte Endothel zu binden und in die Intima einzuwandern. Dort differenzieren sich erstere zu Makrophagen und im Rahmen der Entzündung kommt es zu einer verstärkten Bildung von Zytokinen wie z.B. Il-1 und TNF- α . Darauf aufbauend entstehen vornehmlich an Gefäßverzweigungen atherosklerotische Läsionen, deren Verlauf histologisch in 6 Stadien (Typ I – VI) eingeteilt wird. (siehe **Abb. 2**). Typ I ist infolge der Einwanderung von Zellen durch eine adaptive Verdickung der Intima gekennzeichnet. Im weiteren Verlauf kommt es in Typ II (fatty streak) zu einer zusätzlichen Akkumulation von Lipiden im Zytoplasma von Makrophagen (vgl. 1.2.3.2) und somit zur Bildung von Schaumzellen (foam cells), die eine Schlüsselrolle in der Atherogenese einnehmen. Bei Typ III sind vereinzelt extrazelluläre Lipidablagerungen zu finden, die bereits bei Kindern im Alter von 10 Jahren nachzuweisen sind. Sterben die aus Makrophagen gebildeten Schaumzellen ab, geben sie die internalisierten Lipide frei, aus denen sich ein nekrotisches Kernstück (core) bildet (Typ IV). In diesem Stadium besteht nur eine schmale Abgrenzung zum Lumen, die bei Typ V durch eine fibröse Verdickung ersetzt ist. Erst in diesem Stadium beginnt die Läsion lumenwärts zu wachsen, die sich vorher in Richtung der Adventitia ausbreitete. Diese Verdickung ist begründet in der Einwanderung glatter Muskelzellen aus der Media, die durch die von Makrophagen und aktivierten T-Lymphozyten freigesetzten proinflammatorischen Zytokine und Chemokine ausgelöst wird. Dadurch kommt es zu einer weiteren Verstärkung der entzündlichen Antwort in der Läsion. Bei Typ VI handelt es sich letztendlich um eine komplizierte Läsion, die einen oberflächlichen Defekt, Hämorrhagien und/oder einen Thrombus aufweist. Prädilektionsstelle für eine Ruptur stellt die Schulter der Läsion dar. Kommt es zur Formation eines Thrombus, entsteht das klinische Bild einer instabilen Angina pectoris oder eines akuten Myokardinfarktes. [Burke, A. P. - 2002 // Libby, P. - 2002 // Lusis, A. J. - 2000 // Stary, H. C. - 1995 // Tousoulis, D. - 2006] Ein klinisches Korrelat zu diesen Veränderungen bildet der Begriff der „vascular failure“, der die Dysfunktion des Endothels, der glatten Muskelzellen und des Metabolismus umfasst. [Inoue, T. - 2006]

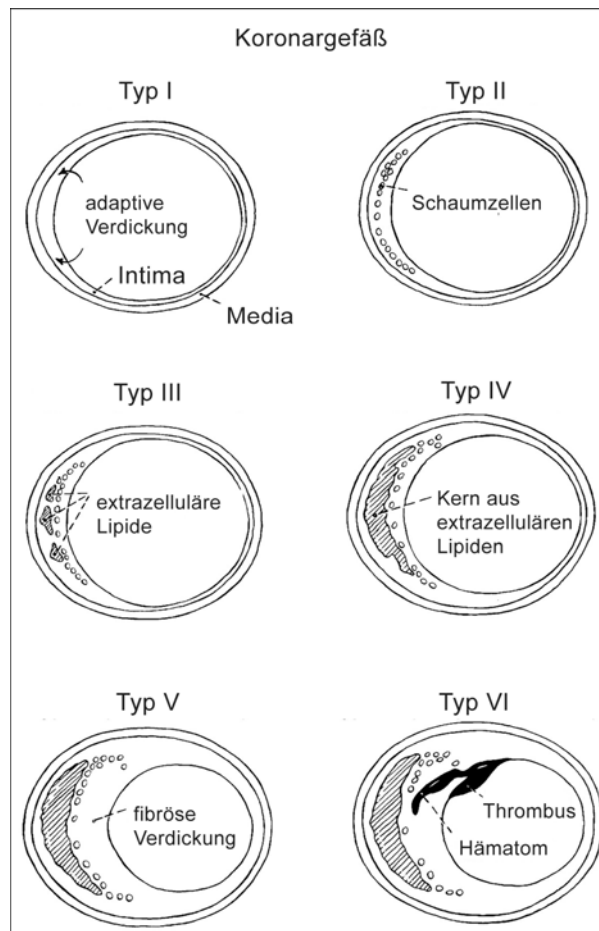


Abb. 2 Entstehung atherosklerotischer Läsionen in Stadien (Typ I – VI): Darstellung am Beispiel prädisponierter Koronargefäßabschnitte. Adaptive Verdickung der Intima (Typ I), Bildung von Schaumzellen (Typ II), extrazelluläre Lipidablagerungen (Typ III; Präatherom) und anschließende Bildung eines nekrotischen Kernstückes (Typ IV; Atherom). Fibröse Verdickung der Intima (Typ V; Fibroatherom) und letztendlich Entstehung einer komplizierten Läsion mit oberflächlichem Defekt, Hämorrhagien und Thrombenbildung (Typ VI). [Stary, H. C. - 1995]

1.2 Lipoproteine

1.2.1 Lipoproteinfraktionen und deren Funktionen

Die Lipoproteine dienen dem Transport von Triglyceriden und Cholesterin im Blut. Sie enthalten einen kugelförmigen lipophilen Kern, der sich aus Triglyceriden und Cholesterinestern zusammensetzt. Umgeben wird dieser Kern von einer amphiphilen Hülle aus Phospholipiden, unverestertem Cholesterin und Apolipoproteinen, die neben stabilisierenden Aufgaben auch regulierend auf den Abbau und die Synthese der Lipoproteine wirken. In Abhängigkeit von ihrer Dichte werden die Lipoproteine in vier große Fraktionen eingeteilt: [**Herbert Renz-Polster** - 2006]

Chylomikron

Die im Darm synthetisierten Chylomikrone weisen die geringste Dichte auf. Sie transportieren die aus der Nahrung aufgenommenen Lipide vom Darm in extrahepatisches Gewebe. Dort werden die Triglyceride frei und die cholesterinreichen Reste (Remnants) in der Leber abgebaut.

VLDL

VLDL (very low density lipoprotein) transportiert endogen von der Leber gebildete Lipide in die Peripherie. Nach Abgabe der Triglyceride werden 40% der VLDL in LDL umgewandelt.

LDL

LDL (low density lipoprotein) zeigt bei einer Dichte von 1,019-1,063 g/ml einen Cholesterinanteil von 45% und einen Triglyceridanteil von 10% (siehe **Abb. 3**). Im Gegensatz zu den restlichen Lipoproteinen besitzt LDL nur ein Apolipoprotein (ApoB-100) pro Lipoproteinpartikel. Es entsteht aus VLDL und übernimmt den Transport für 70% des Plasmacholesterins von der Leber in extrahepatisches Gewebe. Nahezu jedes Gewebe weist Rezeptoren für LDL auf, um seinen Cholesterinbedarf zu decken.

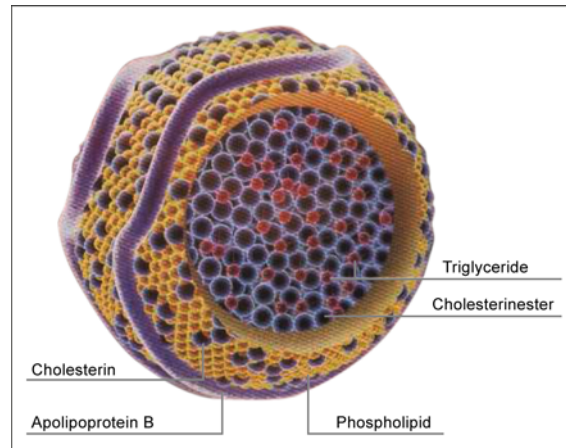


Abb. 3 Darstellung eines low density lipoprotein (LDL-) Partikels [Spektrum der Wissenschaft - 2002]

HDL

HDL (high density lipoprotein) ist für den Cholesterintransport von der Peripherie zur Leber zuständig, wodurch das aufgenommene Cholesterin über die Galle ausgeschieden werden kann. Dadurch wirkt es vasoprotektiv und stellt einen entscheidenden Faktor in der Pathogenese der Atherosklerose dar.

1.2.2 LDL-Formen und Rezeptoren

1.2.2.1 natives LDL

Das native LDL bildet die Grundlage für die Bildung modifizierter LDL. Über den „low density lipoprotein“ - Rezeptor (LDL-Rezeptor) kann LDL, ebenso wie VLDL, als cholesterinreiches Lipoprotein gebunden und durch Endozytose bei neutralem pH internalisiert werden. [Jeon, H. - 2000 // Rudenko, G. - 2003] nLDL ist allerdings auch selbst in der Lage, über eine Entkoppelung der endothelialen Nitric-Oxide Synthase (eNOS) in geringem Ausmaß $O_2^{\cdot-}$ zu generieren und LPS-induziert die Zytokinproduktion (Il-8, TNF- α) zu steigern, indem es Ca^{2+} intrazellulär mobilisiert. [Netea, M. G. - 2002 // Stepp, D. W. - 2002] Jedoch galt es lange nicht als atherogen, da Makrophagen durch die Herunterregulation des LDL-Rezeptors weniger aufnehmen und somit die Bildung von Schaumzellen verhindert wird. [Nakajima, K. - 2006 //

Stocker, R. - 2005] Neuere Untersuchungen zeigen allerdings, dass nLDL unter bestimmten Bedingungen atherogen wirkt, indem es über den LDL-Rezeptor von glatten Muskelzellen internalisiert wird und sich diese zu Schaumzellen transformieren. [**Ruan, X. Z.** - 2006] Durch den Schritt der Oxidation kommt es zu einer Modifikation, durch die je nach Ausmaß mmLDL und oxLDL (vgl. 1.2.2.2) entsteht.

1.2.2.2 modifiziertes LDL

Minimal modifiziertes LDL

Minimal modifiziertes LDL (mmLDL, minimally modified low density lipoprotein) entsteht durch leichte Oxidation von nLDL und wird von dessen Rezeptoren erkannt. Keine Aufnahme konnte über die sogenannten Scavenger-Rezeptoren auf Makrophagen nachgewiesen werden, über die oxLDL gebunden und aufgenommen wird. [**Berliner, J. A.** - 1990] Ein Grund hierfür könnte die Tatsache sein, dass das in oxLDL vorherrschende und für die Rezeptorbindung verantwortliche modifizierte Apolipoprotein B-100 bei der Oxidation zu mmLDL nicht modifiziert wird und mmLDL somit nicht von den Rezeptoren für oxLDL erkannt werden kann. [**Chen, M.** - 2002 // **Stocker, R.** - 2004] Trotzdem zeigt mmLDL ebenso wie oxLDL proinflammatorische und proatherogene Eigenschaften. Es induziert die Aktin-Polymerisation und Ausbreitung von Makrophagen, was zu einer Hemmung der Phagozytose apoptotischer Zellen und einer gesteigerten Aufnahme von oxLDL in Makrophagen führt. Des Weiteren fördert es die Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen und die Produktion des Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1; monocyte chemotactic protein-1), das chemotaktisch auf Monozyten wirkt. [**Cushing, S. D.** - 1990 // **Stocker, R.** - 2005] Eine weitere Eigenschaft stellt die Generierung von $O_2^{\cdot-}$ dar, die über die Xanthinoxidase, die NADPH-Oxidoreductase und eine Entkoppelung von eNOS möglich ist. [**Stepp, D. W.** - 2002] Vermittelt werden diese Signalwege über die Bindung an den Lipopolysaccharidrezeptor CD 14, der mit dem Toll-like-Rezeptor TLR4/MD-2 assoziiert ist. [**Miller, Y. I.** - 2003]

Oxidativ modifiziertes LDL

Oxidiertes LDL entsteht im Gegensatz zu mmLDL durch eine stärkere Lipidperoxidation, die durch Risikofaktoren wie Hypercholesterinämie [Gutierrez, J. - 2006 // Ohara, Y. - 1993 // Stepp, D. W. - 2002] (vgl. 1.1.2) bzw. oxidativen Stress [Cai, H. - 2000 // Madamanchi, N. R. - 2005] ausgelöst wird. Hierbei werden u.a. die Lysingruppen des Proteinanteils modifiziert, wodurch die negative Ladung des Lipoproteinpartikels zunimmt und oxLDL von den im übernächsten Absatz genannten Rezeptoren erkannt werden kann. [Spiteller, G. - 2005 // Spiteller, G. - 2005 // Stocker, R. - 2004 // Valko, M. - 2006] Das auf diese Weise entstandene oxLDL bildet durch seine proinflammatorischen und proatherogenen Eigenschaften (siehe **Tab.1**) die Grundlage der in 1.1.3 beschriebenen Hypothese der oxidativen Modifikation.

oxLDL ...
... unterstützt die Schaumzellbildung
... ist mitogen für glatte Muskelzellen und Makrophagen
... steigert die Expression von Scavenger-Rezeptoren auf Makrophagen
... aggregiert, was zu einer erhöhten Aufnahme führt
Produkte von oxLDL ...
... wirken chemotaktisch auf Monozyten, T-Lymphozyten und Makrophagen
... sind zytotoxisch und induzieren Apoptose
... reduzieren die Bioverfügbarkeit von •NO

Tab. 1 Proatherogene Aktivitäten von oxLDL und seiner Produkte [Stocker, R. - 2004]

Zu den proinflammatorischen und proatherogenen Eigenschaften zählt beispielsweise die Reifung von Makrophagen zu Schaumzellen, die durch die Aufnahme von oxLDL ausgelöst wird und die die dominante Zellpopulation in atherosklerotischen Läsionen darstellt. [Hansson, G. K. - 2005] Die beteiligten Rezeptoren lassen sich in zwei Gruppen einteilen: Scavenger-Rezeptoren und Toll-like-Rezeptoren. Beide gehören zu der Gruppe der „pattern recognition receptors“, die im Auftrag des Immunsystems Pathogene erkennen und beseitigen. [Rader, D. J. - 2005] Zu den Scavenger-Rezeptoren werden u.a. die Unterklassen SR-A (SR-AI, SR-AII, MARCO, SRLC),

SR-B (SR-BI [**Gillotte-Taylor, K.** - 2001], CD 36 [**Febbraio, M.** - 2001]), SR-E (LOX-1) und SR-F (SREC-1, -2) gezählt. [**Moore, K. J.** - 2006] Einem Großteil dieser Klassen ist es möglich, modifizierte Lipoproteine zu erkennen, und zumindest für die Rezeptoren SR-A und CD 36 ist gesichert, dass diese oxLDL auch internalisieren. [**Rader, D. J.** - 2005] Die zweite wichtige Gruppe bilden die Toll-like-Rezeptoren (TLR-1, -2, -4), die auf Makrophagen in atherosklerotischen Läsionen exprimiert sind. [**Rader, D. J.** - 2005] Für TLR-4 konnten proatherogene Eigenschaften nachgewiesen werden, jedoch ist die Rolle der einzelnen Untergruppen in der Atherogenese noch unzureichend erforscht. [**Michelsen, K. S.** - 2006]

Für die Wirkung von oxLDL auf das Endothel wird u. a. der in atherosklerotischen Plaques überexprimierte LOX-1-Rezeptor verantwortlich gemacht, der in der Lage ist, oxLDL zu binden, zu internalisieren und proteolytisch zu degradieren. Dadurch kommt es zur verstärkten Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies und folglich zur Entstehung von oxidativem Stress. [**Galle, J.** - 2006 // **Zhang, T.** - 2006 // **Zmijewski, J. W.** - 2005] Die ROS können einerseits durch eNOS (vgl. 1.3.2) gebildet werden, indem oxLDL die Phosphorylierung von Thr 495 reduziert [**Fleming, I.** - 2005]. Andererseits ist eine Bildung über die NAD(P)H-Oxidase (vgl. 1.3.2) möglich, indem durch einen Bestandteil des oxLDLs, das Lysophosphatidylcholin (LPC), die Untereinheiten p22phox und gp91phox stimuliert werden. [**Kugiyama, K.** - 1999 // **Ohara, Y.** - 1994 // **Rueckschloss, U.** - 2001] Im Rahmen der auf diese Weise induzierten endothelialen Dysfunktion (vgl. 1.1.3) kommt es durch oxLDL zu einer gesteigerten Oxidationsrate des nLDLs, zu einer Reduktion von •NO durch ROS (vgl. 1.3.1) und die aktive Hemmung der eNOS. [**Cai, H.** - 2000 // **Chen, M.** - 2002 // **Cominacini, L.** - 2001 // **Ji, Y.** - 2004 // **Yung, L. M.** - 2006] Das hat zur Folge, dass die Expression des LOX-1-Rezeptors hoch reguliert wird und dadurch verstärkt ROS gebildet werden können. [**Smirnova, I. V.** - 2004] Diese Effekte lassen einen circulus vitiosus entstehen, der zu einer Progression der Atherogenese führt. [**Cai, H.** - 2000 // **Chen, M.** - 2002 // **Yung, L. M.** - 2006]

1.2.3 HDL

Das high density lipoproteins (HDL) wirkt einerseits durch sein Apolipoprotein A-I (Apo A-I) antiatherogen bzw. antiinflammatorisch, indem es die Oxidation des nativen LDL hemmt, die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen reduziert und die Freisetzung von Cholesterin aus Zellen fördert. [Barter, P. J. - 2004 // Navab, M. - 2006 // Shah, P. K. - 2001] Andererseits wird in der Literatur beschrieben, dass das vorherrschende Apo A-I durch eine oxidative Schädigung seine protektiven Funktionen verliert und proinflammatorisch wirkt. [Navab, M. - 2006]

1.3 **Reaktive Sauerstoffspezies**

1.3.1 wichtige Vertreter

Reaktive Sauerstoffspezies spielen als Signalmoleküle in der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen eine entscheidende Rolle. [Cai, H. - 2000] In dieser Arbeit soll nun auf die wichtigsten Vertreter der ROS eingegangen werden.

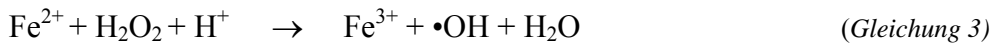
Superoxidradikalanion

Als primäres Radikal zeigt sich das Superoxidradikalanion ($O_2^{\cdot-}$) mit einer Halbwertszeit von nur 1×10^{-6} sec in wässriger Lösung instabil. Gebildet wird es durch die endotherme Übertragung eines Elektrons auf molekularen Sauerstoff (siehe *Gleichung 1*). Aufgrund der Tatsache, dass es kaum membranpermeabel ist, verbleibt es zu einem Großteil am Ort seiner Entstehung und zerfällt (siehe *Gleichung 4*) oder reagiert dort mit anderen Molekülen aus der Umgebung. [Li, J. M. - 2004] Zur letzteren Möglichkeit wird beispielsweise die Reaktion mit Stickoxid ($\cdot NO$) zu Peroxynitrit ($ONOO^-$) (siehe *Gleichung 2*) gezählt, die im Vergleich zu der SOD-katalysierten Reaktion von $O_2^{\cdot-}$ zu H_2O_2 mit einer 3fach höheren Geschwindigkeit abläuft und somit favorisiert auftritt. [Halliwell, B. - 2006 // Lassegue, B. - 2004 // Li, J. M. - 2004]



Hydroxylradikal

Dieses hochreaktive freie Radikal wird durch das Abspalten eines •H aus Lipiden als bedeutender Initiator der Lipidperoxidation beschrieben. Es weist eine Halbwertszeit von nur 1×10^{-9} sec auf, wodurch nur geringe Diffusionswege möglich sind. Die Bildung erfolgt beispielsweise über die Fenton-Reaktion aus H_2O_2 und Fe^{2+} (siehe *Gleichung 3*). [Halliwell, B. - 2006] Das dabei entstehende Fe^{3+} wird durch Superoxidanionen zu Fe^{2+} reduziert, das wiederum erneut zu einem Hydroxylradikal (•OH) reagiert. [Schimmel, M. - 2001] Fenton-ähnliche Reaktionen können auch mit niedervalenten Metallkomplexen (z.B. Cu^+ zu Cu^{2+}) ablaufen.



Wasserstoffperoxid

Wasserstoffperoxid (H_2O_2) ist ein nichtradikalischer, im Verhältnis zu den anderen ROS ein stabiler Vertreter dieser Klasse und kann aufgrund seiner Membranpermeabilität zwischen verschiedenen Zellkompartimenten wechseln. Es kann u.a. enzymatisch durch eine SOD-katalysierte Reaktion (siehe *Gleichung 4*) entstehen. [Madamanchi, N. R. - 2005]



1.3.2 Quellen und Stimuli

Als Quellen für die Bildung von ROS kommen neben der NAD(P)H-Oxidase, XO (Xanthinoxidase), NOS, Myeloperoxidase, Lipoxygenase, Cyclooxygenase,

Nebenreaktionen bei Elektronen-Transportvorgängen der mitochondrialen Atmungskette, Lipidperoxidation, Elektronen-Transport durch Übergangsmetalle (vgl. oben), Hämproteine und viele mehr in Frage. [Ballinger, S. W. - 2005] Die Bildung einzelner ROS führt zur Aktivierung weiterer Quellen. Im Folgenden wird nun näher auf die wichtigsten Quellen und deren Stimulation eingegangen (siehe *Abb. 4*). [Li, J. M. - 2004]

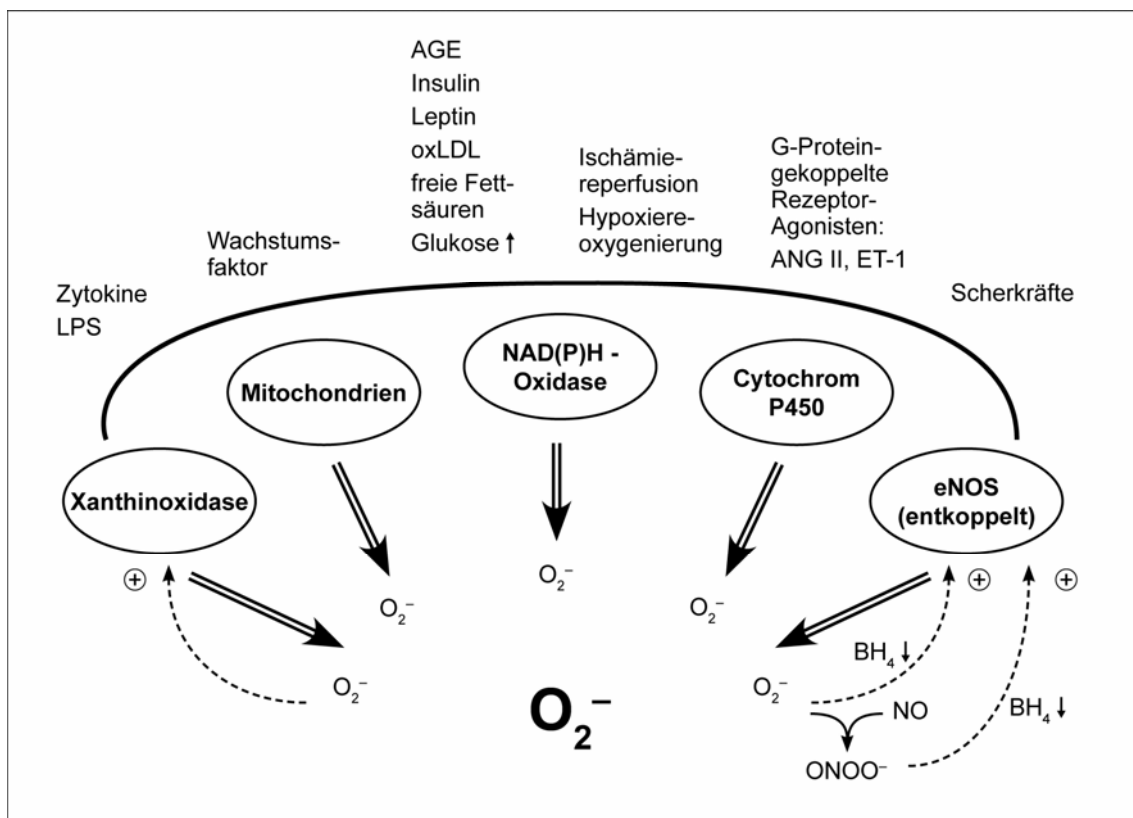


Abb. 4 Quellen für die Bildung von $O_2^{\cdot -}$ in Endothelzellen: Potenzielle Stimuli sind am oberen Bildrand dargestellt. Rückkopplungsmechanismen durch $O_2^{\cdot -}$ bestehen für die Xanthinoxidase und eNOS. [Li, J. M. - 2004]

NAD(P)H-Oxidase

Die membranassoziierte NAD(P)H – Oxidase stellt eine der wichtigsten Quellen für die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in kardiovaskulären Zellen dar (siehe *Gleichung 5*).



Bislang besteht noch Unklarheit über die Dominanz eines der beiden Substrate – NADH und NAD(P)H. In Bezug auf die zellulären Freisetzungsorte der Radikale wurden starke Unterschiede zwischen einzelnen Zelltypen nachgewiesen. Für glatte Muskelzellen zeigte sich eine Freisetzung von $O_2^{\cdot-}$ nach intrazellulär, wohingegen die Endothelzellen zu einer extrazellulären Abgabe tendieren. [**Griendling, K. K.** - 2000 // **Stocker, R.** - 2005] Bezüglich des Aufbaus wurden je nach Zelltyp ebenfalls deutliche Unterschiede festgestellt. Die wichtigste Komponente bildet gp91phox, das zusammen mit p22phox eine zellmembran-ständige, katalytische Einheit (Flavocytochrom b_{558}) bildet. [**Griendling, K. K.** - 2000 // **Matute, J. D.** - 2005] gp91phox (Nox 2) zählt zur Familie der Nox-Proteine (nonphagocytic NAD(P)H oxidase proteins), die für die Bildung der $O_2^{\cdot-}$ verantwortlich sind. Sie bestehen insgesamt aus sieben Proteinen, unter denen zwischen Nox 1 bis 5 und den beiden dualen Oxidasen Duox 1 und 2 unterschieden wird, wobei letztere Übereinstimmungen mit Regionen aufweisen, die für Nox-Proteine und Peroxidasen codieren. [**Sumimoto, H.** - 2005 // **Ushio-Fukai, M.** - 2004] In Endothelzellen sind Nox 2, Nox 4 und als weitere Untereinheiten p40phox, p47phox, p67phox und die kleine GTPase Rac zu finden. Hierbei ist p47phox für die Bindung der Untereinheit p67phox an das Nox-Protein verantwortlich, woraufhin p67phox als Aktivator die Bildung von $O_2^{\cdot-}$ veranlasst.

Die Untereinheit, über die bislang am wenigsten bekannt ist, ist p40phox. Sie ist mit p47phox und p67phox assoziiert, spielt jedoch für die Aktivität der NAD(P)H-Oxidase vermutlich keine Rolle. [**Ellson, C. D.** - 2006] Im Gegensatz zu den Endothelzellen weisen glatte Muskelzellen einen Mangel an gp91phox und p67phox auf. Stattdessen konnten die Proteine Nox 1 und 4 identifiziert werden. Für die fehlende Komponente p67phox wurde das Homologon Noxa 1 nachgewiesen, das die aktivierende Aufgabe des p67phox übernimmt. [**Ambasta, R. K.** - 2006 // **Takeya, R.** - 2003]

Xanthinoxidase

Die Xanthinoxidase ist neben der Xanthindehydrogenase eine von zwei Formen der Xanthinoxidoreduktase. Durch irreversible Proteolyse oder reversible Oxidation von Thiol-Gruppen ist die Umwandlung der Xanthindehydrogenase in die Xanthinoxidase möglich, die ausschließlich im Plasma und in Endothelzellen zu finden ist. [**Madamanchi, N. R.** - 2005 // **Stocker, R.** - 2005] Dieses Metalloflavoprotein wandelt

Hypoxanthin und Xanthin zu Harnsäure um und kann unter bestimmten pathophysiologischen Bedingungen, wie z.B. Ischämie und Hypercholesterinämie, $O_2^{\cdot-}$ und H_2O_2 bilden. [Taniyama, Y. - 2003] Da ein Vorkommen in den Zellen der Gefäßwand nicht nachgewiesen werden konnte, wird von einem Ursprung in anderen Organen und der Aufnahme über Heparin-Bindungsstellen ausgegangen. [Rojas, A. - 2006] Mittlerweile konnte auch eine Molybdän-freie Form nachgewiesen werden, die zwar Xanthin als Substrat ausschließt, jedoch $O_2^{\cdot-}$ bildet, was durch den Flavoproteininhibitor DPI gehemmt werden kann. [Li, J. M. - 2004]

NOS

Das aus Hämproteinen bestehende Enzym NOS ist in der Lage, $\bullet NO$ – und unter bestimmten Bedingungen auch $O_2^{\cdot-}$ – zu produzieren. Insgesamt sind drei Isoformen bekannt, wobei für die hier behandelte Thematik nur eNOS (constitutive endothelial NOS) und iNOS (endotoxin- and cytokine-inducible NOS) relevant erscheinen. [Stocker, R. - 2005] Als Substrat dient L-Arginin, durch das mit Hilfe des Cofaktors Tetrahydrobiopterin (H_4B) die Synthese von L-Citrullin und $\bullet NO$ möglich ist. Kommt es nun unter Mangel an Substrat oder Cofaktor zu einer Aktivierung, koppelt sich die Synthese von der Oxidation des L-Arginin ab und generiert in Anwesenheit von NAD(P)H $O_2^{\cdot-}$ und H_2O_2 . [Mayer, B. - 2000] Gestoppt werden kann dieser Vorgang durch Zugabe des fehlenden Substrates oder des Cofaktors. Sobald große Mengen an $O_2^{\cdot-}$ gebildet wurden, kann dies mit noch vorhandenen $\bullet NO$ zu $ONOO^-$ reagieren. Das wiederum führt zur Oxidation von H_4B , wodurch aus Mangel an Cofaktor die Bildung von $O_2^{\cdot-}$ begünstigt wird. [Lassegue, B. - 2004 // Stuehr, D. - 2001 // Taniyama, Y. - 2003]

Mitochondrium als $O_2^{\cdot-}$ -Quelle

Die innere Membran des Mitochondrium ermöglicht über die Atmungskette die Synthese von Energie in Form von ATP (Adenosintriphosphat), wobei O_2 als Redox-Partner dient und durch die Übertragung von vier e^- zu H_2O umgewandelt wird. [Ballinger, S. W. - 2005] Aus 1-2 % des molekularen O_2 bilden sich dabei per Nebenreaktion $O_2^{\cdot-}$, deren Hauptquelle der Komplex I (NADH-Dehydrogenase) darstellt. [Grivennikova, V. G. - 2006] Die Bildung erfolgt durch eine Umkehrung des

Elektronentransfers von Succinat zu NAD^+ , was wiederum durch die hohe protonenbewegende Kraft ermöglicht wird. Als maßgebliche Komponente des Komplexes I wird das FeS-Zentrum N2 und die assoziierte Ubiquinon-Bindungsstelle vermutet. Zu einem geringen Anteil wird auch eine Beteiligung des Komplexes III in Anwesenheit von Antimycin diskutiert. In Abhängigkeit der Konzentrationsverhältnisse der gebildeten $\text{O}_2^{\cdot-}$ und der Aktivität der Mangan-gekoppelten Superoxiddismutase (Mn-SOD) und weiterer Enzyme kommt es zur Umwandlung in H_2O_2 . [Brand, M. D. - 2004 // Stocker, R. - 2004] Neben $\text{O}_2^{\cdot-}$ ist die Organelle nach derzeitigen Erkenntnissen auch in der Lage über eine mitochondriale Form der NOS $\cdot\text{NO}$ zu produzieren, das wiederum schnell mit $\text{O}_2^{\cdot-}$ zu ONOO^- reagiert. [Cadenas, E. - 2004]

Stimuli

Für die ROS-Produktion sind bereits eine Vielzahl von Stimuli identifiziert worden. Einige davon umfassen (siehe **Abb. 4**): G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Agonisten [Angiotensin II (Ang II), ET-1 (Endothelin-1)], Wachstumsfaktoren [vascular endothelial growth factor (VEGF), Thrombin, platelet-derived growth factor (PDGF)], Phorbol-Ester, Zytokine [tumor necrosis factor- α (TNF- α), Interleukin 1 Il-1], metabolische Faktoren [modifizierte LDL, Glucose, Insulin, non-esterified fatty acids (NEFA), advanced glycation end products (AGEs)] und mechanische Faktoren (Scherkräfte, Stillstand des Blutflusses). [Li, J. M. - 2004 // Ray, R. - 2005]

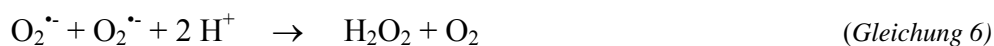
1.3.3 Antioxidative Strategien

Unter einem Antioxidans versteht man eine Substanz, die effektiv vor oxidativem Schaden schützt, solange sie in größerer Menge vorliegt als der Schaden selbst. [Stocker, R. - 2004] Die antioxidativen Strategien der Gefäßwand untergliedern sich in ein enzymatisches und ein nicht-enzymatisches System. [Choi, S. W. - 2004 // Inal, M. E. - 2001] Als Vertreter des enzymatischen Systems sind SOD, Katalase und die Glutathionperoxidase zu nennen und für das nicht-enzymatische System (Scavenger) Substanzen wie Glutathion, Harnsäure oder Vitamin C (Ascorbinsäure) und E

(α -Tocopherol). [Valko, M. - 2006] Im Folgenden soll nun auf die bedeutendsten Enzyme eingegangen werden.

Superoxiddismutase

Die Superoxiddismutase (SOD) ist eines der wichtigsten antioxidativen Enzyme. Sie katalysiert die Reduktion und Oxidation von $O_2^{\cdot-}$ zu H_2O_2 und molekularem Sauerstoff (siehe *Gleichung 6*).



Bislang sind drei Formen beschrieben: Kupfer-, Zink-gekoppelt (Cu,Zn-SOD), Mangan-gekoppelt (Mn-SOD) und extrazellulär (Ec-SOD). Als vorherrschende Isoform ist die Cu,Zn-SOD im Zytosol, Lysosomen und Nucleus lokalisiert, wohingegen die Mn-SOD in Mitochondrien zu finden ist. Die extrazelluläre Form ist an der Zelloberfläche vorzugsweise an Heparinsulfat gebunden und übt möglicherweise eine regulierende Wirkung auf die Bioverfügbarkeit von $\bullet NO$ aus. [Li, J. M. - 2004 // Stocker, R. - 2004]

Katalase

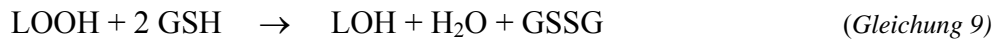
Eine weitere wichtige Komponente des antioxidativen Systems stellt die Katalase dar, die in Peroxisomen zu finden ist. Sie formt die relativ stabile Verbindung H_2O_2 in Wasser und Sauerstoff um (siehe *Gleichung 7*). [Stocker, R. - 2004]



Glutathion-Peroxidase

Die Glutathion-Peroxidase dient ebenfalls der Reduktion von H_2O_2 zu H_2O (siehe *Gleichung 8*) oder auch LOOH (Lipidhydroperoxid) zu LOH (korrespondierender Alkohol) (siehe *Gleichung 9*), wobei dieser Schritt mit der Oxidation von GSH (Glutathion) zu GSSG (Glutathiondisulfid) gekoppelt ist. [Halliwell, B. - 2006] Das Verhältnis GSH zu GSSG ist ein gutes Maß für das Vorhandensein von oxidativem Stress, wobei erhöhte GSSG-Konzentrationen zu enzymatischen Schäden führen. Das

im Zytosol produzierte GSH gelangt über spezielle Trägermoleküle in das Mitochondrium und ist somit in den Mitochondrien reichlich zu finden. [Valko, M. - 2006]



Derzeit sind vier Formen dieses Enzyms bekannt, dessen Aktivität von der Anwesenheit von Selen als Cofaktor abhängt. Die beiden Wichtigsten sind die „klassische“ Form (GPx1) und PHGPx (phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase; GPx4). Im Unterschied zu GPx1 ist PHGPx in der Lage, Lipidhydroperoxide, die bereits verestert in Lipidproteinen und Lipidmembranen vorliegen, zu Alkohol zu reduzieren. Die Generierung von GSH erfolgt durch die Glutathionreduktase.

Weiterhin dient GSH der Regeneration von Vitamin C und E in ihren aktiven Formen. [Stocker, R. - 2004 // Valko, M. - 2006]

1.3.4 Effekte der ROS auf die Gefäßwand

In Abhängigkeit von den ROS-Konzentrationen, dem ROS-Typ und der Expositionsdauer kommt es unter physiologischen, aber auch pathophysiologischen Bedingungen zu unterschiedlichen Effekten auf die einzelnen Zelltypen, die über verschiedene Signalwege vermittelt werden. [Galle, J. - 2001 // Griendling, K. K. - 2003 // Irani, K. - 2000 // Yung, L. M. - 2006] An zellulären Mechanismen sind Ionentransportsysteme, Phosphorylierung von Proteinen und Genexpression zu nennen. [Rojas, A. - 2006]

Effekte unter physiologischen Bedingungen

Bestimmt durch das Gleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien konnte selbst unter physiologischen Bedingungen die Bildung von ROS nachgewiesen werden, die als Signalmoleküle wichtige Aufgaben bezüglich verschiedener Zellfunktionen

übernehmen. Aufgrund der Eigenschaften zeigte sich für H_2O_2 im Gegensatz zu $O_2^{\cdot-}$ (vgl. 1.3.1) eine größere Relevanz für die Modulation von Signalwegen. [Li, J. M. - 2004i] Dazu zählt endothel-abhängig, $\bullet NO$ -abhängig oder -unabhängig die Regulation des Gefäßtonus, die von der Größe des Gefäßes und der Aktivität der eNOS abhängt. Auch das Zellwachstum steht unter dem Einfluss von H_2O_2 , wobei es gleichzeitig zu einer erhöhten Expression von VEGF und infolgedessen zu einer Aktivierung weiterer Wachstumsfaktoren kommt, die die weitere Bildung von ROS begünstigen. [Cai, H. - 2005 // Faraci, F. M. - 2006]

Effekte unter pathophysiologischen Bedingungen

Entwickelt sich ein Ungleichgewicht zwischen Oxidantien und Antioxidantien zugunsten der ersteren, kommt es zu einer verstärkten Bildung von $O_2^{\cdot-}$, welches bevorzugt mit $\bullet NO$ zu $ONOO^-$ reagiert. [Cominacini, L. - 2001] In der Literatur wird in diesem Zusammenhang der Begriff der endothelialen Dysfunktion verwendet, die sich aus einer Inaktivierung des $\bullet NO$ beispielsweise durch oxLDL oder $O_2^{\cdot-}$ ergibt, wodurch es zu einer Beeinträchtigung der Endothel-abhängigen Vasorelaxation kommt (vgl. Einleitung). [Cai, H. - 2000 // Touyz, R. M. - 2004] Somit ist die Grundlage für die Entwicklung kardiovaskulärer Erkrankungen geschaffen. Da es neben der Inaktivierung von $\bullet NO$ zu einer erhöhten Konzentration an ROS, v. a. H_2O_2 , kommt, reagieren die Zellen über verschiedene Signalwege z.B. mit Apoptose, Migration, Hypertrophie, Oxidation von nativem LDL zu oxidativ modifiziertem LDL und vaskulärem Remodelling. Des Weiteren entstehen Entzündungsreaktionen, da es durch die Aktivierung der Proteine ICAM (intercellular adhesion molecule), VCAM (vascular cell adhesion molecule), MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1), PAF (platelet-activating factor) und P-Selectin zur Adhäsion neutrophiler Granulozyten an das Endothel und zu einer Aktivierung von Thrombozyten kommt, die die Entstehung atherosklerotischer Plaques nach sich ziehen. [Cai, H. - 2005 // Galle, J. - 2001 // Li, J. M. - 2004 // Taniyama, Y. - 2003]

1.4 Spektroskopische Nachweismöglichkeiten für ROS

1.4.1 Electron Spin Resonance

Durch Electron Spin Resonance (ESR) ist es möglich, die resonante Mikrowellenabsorption einer Probe mit einem permanenten magnetischen Moment in einem äußeren Magnetfeld zu messen. Somit ist der direkte Nachweis von Radikalen möglich. Allerdings ist die Sensitivität so gering, dass der Einsatz von stabilen spin traps, wie z.B. Nitrosoverbindungen, nötig ist. Diese ermöglichen die Bildung paramagnetischer Verbindungen, die durch Akkumulation messbare Konzentrationen erreichen. Der Nachteil hierbei ist, dass diese Verbindungen zum Teil eine sehr geringe Stabilität aufweisen und somit die Messung erschweren. [Bartosz, G. - 2006]

1.4.2 Spektrophotometrie des sichtbaren Lichts (Vis-Spektroskopie)

Unter Spektrophotometrie versteht man die Konzentrationsbestimmung einer lichtabsorbierenden Substanz. Cytochrom C und Nitro Blue Tetrazolium (NBT) stellen die beiden wichtigsten Vertreter dieser Nachweismethode dar. In beiden Fällen kommt es zu einer Reduktion durch $O_2^{\cdot-}$ und somit Veränderung der Lichtabsorption. Problematisch ist jedoch, dass der „Cytochrom C“ - Assay nicht spezifisch für $O_2^{\cdot-}$ ist und NBT unter aeroben Bedingungen selbst in der Lage ist, $O_2^{\cdot-}$ zu generieren. [Brandes, R. P. - 2005]

1.4.3 Fluoreszenzspektroskopie

Die Fluoreszenzspektroskopie ermöglicht die Untersuchung und Differenzierung verschiedener Proben anhand ihrer Fluoreszenzeigenschaften.

1.4.3.1 Proben

Im Gegensatz zu allen anderen spektroskopischen Verfahren weisen die Fluoreszenzproben die größte Sensitivität für ROS auf und ermöglichen eine topographische Lokalisation. Prinzipiell unterscheidet man zwischen positiven und negativen Fluoreszenzproben. Für die positiven Proben gilt, dass es erst durch eine Reaktion mit ROS zur Entstehung von Fluoreszenz kommt. Entgegengesetzt nimmt bei den negativen Proben die Fluoreszenz bei einer Reaktion mit ROS ab. [Bartosz, G. - 2006]

Dihydrorhodamin 123

Eine häufig eingesetzte Substanz ist das lipophile und somit membrandurchgängige Dihydrorhodamin 123, das durch Oxidation in Rhodamin 123 überführt werden kann. Hervorgerufen wird dieser Schritt durch sehr geringe Konzentrationen von ONOO⁻. Außerdem besteht eine Sensitivität für HOCl und H₂O₂ in Kombination mit Eisen oder Peroxidasen. Im Anschluss an die intrazelluläre Oxidation kommt es zur Akkumulation des Rhodamin 123 in den Mitochondrien und zu einem geringeren Anteil im Extrazellularraum. [Crow, J. P. - 1997 // Royall, J. A. - 1993]

Dihydroethidium

Dihydroethidium (DHE) ist ebenso wie Dihydrorhodamin 123 eine positive Fluoreszenzprobe und ist spezifisch für O₂^{-•}. Oxyethidium entsteht in Abhängigkeit von O₂^{-•} aus DHE. Es unterscheidet sich durch seine Spektraleigenschaften von Ethidium, das durch unspezifische Oxidation aus DHE entsteht. Problematisch ist, dass es sich in die DNA einfügt und bei Unterschieden in der Chromatindichte heterozellulärer Organe die Messung verfälscht, da es Licht einer anderen Wellenlänge emittiert. [Brandes, R. P. - 2005]

[5-(and-6)-carboxy-] 2',7'-Dichlorofluoresceindiacetat

Die Messung des fluoreszierenden Farbstoffes 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF) ist eine der am häufigsten genutzten Methode zur Detektion von intrazellulärem oxidativem Stress. Die verwendete reduzierte Form des DCF, das 2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat (H₂DCF-DA), fluoresziert selbst nicht, kann jedoch die Zellmembran passieren und durch intrazelluläre Esterasen deacetyliert werden.

Dadurch entsteht das nicht-fluoreszierende 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein (H₂DCF), das die Fähigkeit der Penetration verloren hat und somit relativ gefangen in der Zelle und ihrer Membran ist. Erst durch einen weiteren Oxidationsschritt kann die Umwandlung in das grün-fluoreszierende Produkt 2',7'-Dichlorofluorescein (DCF) eingeleitet werden, das ebenfalls zu einem Großteil in der Zelle verbleibt. [**Hansen-Hagge, T. E.** - 2008 // **Royall, J. A.** - 1993] Um diese Anreicherung zu verstärken, wurde die carboxylierte Form 5-(and-6)-carboxy-2',7'-Dichlorodihydrofluoresceindiacetat (carboxy-H₂DCF-DA) verwendet, deren Produkt das fluoreszierende carboxy-DCF ist. Die genauen Schritte, die zur Oxidation dieses Farbstoffes führen, sind im Einzelnen noch nicht geklärt. Als Auslöser werden in der Literatur nicht nur ROS, sondern auch Pyocyanin [**O'Malley, Y. Q.** - 2004], Metallionen, Peroxidasen, Häm, Hämoglobin, Myoglobin und Cytochrom C [**Ohashi, T.** - 2002] beschrieben. In der Gruppe der ROS weist ONOO⁻ das größte Potential für eine schnelle und direkte Oxidation auf. [**Possel, H.** - 1997] Im Gegensatz dazu benötigt H₂O₂ die Anwesenheit von Peroxidasen, wie sie z.B. im Meerrettich vorkommen, oder die Eisenaufnahme über den Transferrin-Rezeptor, um eine Oxidation auslösen zu können. Vor allem die Aktivität der Peroxidasen ist ein wichtiger limitierender Faktor. [**Myhre, O.** - 2003 // **Tampo, Y.** - 2003] In diesem Zusammenhang spielt auch das reduzierte Glutathion (GSH) eine entscheidende Rolle, denn je geringer die Konzentration an GSH ist, desto höher ist die Oxidationsrate. [**Jakubowski, W.** - 2000 // **Tampo, Y.** - 2003] Außerdem liegen Nachweise dafür vor, dass •OH als Zwischenstufe für die durch Peroxidasen, Eisen oder H₂O₂ hervorgerufene Bildung von DCF dient. Eine eher untergeordnete Rolle scheinen allerdings NO, O₂^{-•} und HOCl zu spielen. NO und O₂^{-•} können nur in ihrer kombinierten Form als ONOO⁻ H₂DCF-DA oxidieren. [**Myhre, O.** - 2003] Als Inhibitoren der Oxidation werden z.B. GSH, Superoxiddismutase und Katalase diskutiert.

1.4.3.2 Messverfahren

Multilabel Counter

Der Multilabel Counter ist in der Lage, licht-emittierende und licht-absorbierende Marker zu detektieren. In dieser Arbeit soll es jedoch ausschließlich um die Messung von Fluoreszenzen gehen. Als Lichtquelle dient eine Wolfram-Halogen CW-Lampe (continuous wave lamp; 75 W) mit einem spektralen Bereich von 320-800 nm. Zur Erzeugung bestimmter Wellenlängen sind insgesamt 12 Filter vorhanden, wobei für die Anregung von Fluoreszenzen zwei spezielle Filter mit den Wellenlängen 355 und 485 nm zur Verfügung stehen. Hierbei ist es möglich, über eine Photodiode die Intensität des Anregungslichtes der Lampe zu messen und diese gegebenenfalls zu korrigieren, um eine konstante Bestrahlung der Probe zu gewährleisten. Kommt es nun zur Emission von Fluoreszenz, wird diese über einen Spiegel anfangs zu einem Linsensystem und dann über einen Emissionsfilter (515-550 nm) zu einem Photomultiplier weitergeleitet, der einen spektralen Empfindlichkeitsbereich von 400-700 nm aufweist. Die entstandenen Photoelektronen werden anschließend gemessen und mit Hilfe der Wallac 1420 Software 3.0 am Computer in relativen Emissions-Ereignissen (Counts) ausgewertet.

Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FACS: Fluorescence Activated Cell Sorter) ermöglicht die gleichzeitige Messung verschiedener optischer Eigenschaften einer Zelle, wie z.B. deren Zellgröße, Zellgranularität und Fluoreszenz. Durch Erzeugung eines Überdruckes wird die zu untersuchende Probenflüssigkeit in die Messkuvette des FACS Calibur bei Überdruck gepumpt und von einem Hüllstrom aus Trägerflüssigkeit mit laminärer Strömung umgeben. Eine Verjüngung der Messkuvette bedingt die Beschleunigung beider Flüssigkeiten und somit die Entstehung der hydrodynamischen Fokussierung. Auf diese Weise ist es möglich, dass jede Zelle der Einzelzellsuspension den Laserstrahl einer Lichtquelle separat passiert. Die eingesetzten Lichtquellen können zum einen ein luftgekühlter Argon-Laser (488 nm, blau) und - je nach Bedarf - ein Dioden-Laser (635 nm, rot) sein. Durch den Laserstrahl angeregt, erzeugt jede einzelne Zelle zwei Arten von Streulicht: zum einen das Vorwärtsstreulicht (FSC: forward scatter), das als

gebeugtes Licht entlang der Achse des einfallenden Lichtes gemessen die relative Größe der Zelle widerspiegelt; zum anderen das Seitwärtsstreulicht (SSC: side scatter), das als gestreutes Licht in einem 90° Winkel zum einfallenden Licht gemessen die relative Granularität der Zelle darstellt. Neben der Erzeugung von Streulicht wird die Zelle außerdem dazu angeregt, Fluoreszenzlicht zu emittieren. Dies geschieht, indem das Fluorochrom der markierten Zelle die Energie des einfallenden Lichtes absorbiert und ein Photon mit einer größeren Wellenlänge wieder emittiert. Mittels unterschiedlicher Filter (Filter (FL) 1: 530 nm, 2: 585 nm, 3: 670 nm, 4: 661 nm) können diese Fluorochrome entsprechend ihrer emittierten Wellenlängen getrennt voneinander erfasst und gemessen werden. Dadurch lässt sich die relative mittlere Fluoreszenzintensität (Mean) einer markierten Zelle berechnen. Dies ist ein Maß für die Menge gebundenen Fluoreszenzfarbstoffes pro Partikel. Die an den Detektoren empfangenen Signale werden durch einen Analog-Digital-Wandler digitalisiert und die daraus resultierenden Daten an einem Computer weiter verarbeitet. Durch eine Auswertung mit Dot Plot entsteht eine Punktwolkendarstellung der Messwerte, die die Korrelation zweier Parameter erkennen lässt. Im Histogramm können dann Aussagen hinsichtlich der Häufigkeitsverteilung getroffen werden.

1.4.4 Messung der Chemilumineszenz

Chemilumineszenz entsteht durch die Emission von Licht bei einer chemischen Reaktion. Hierbei geht ein Elektron aus einem angeregten Zustand in einen energetisch tiefer liegenden Zustand über.

1.4.4.1 Proben

Lucigenin

Der Farbstoff Lucigenin zeigt im Gegensatz zu den folgenden Lumineszenzproben bei geringer Sensitivität eine hohe Spezifität für $O_2^{\cdot-}$. Im Rahmen der Detektion von $O_2^{\cdot-}$ erfolgt die Reduktion zum Lucigenin-Kationradikal. Allerdings wird in der Literatur

beschrieben, dass es bei Konzentrationen über 5 $\mu\text{mol/l}$ oder in Anwesenheit von NADH zu einer Autooxidation des Kationradikals kommt, wodurch Lucigenin selbst zur $\text{O}_2^{\cdot-}$ -Quelle wird. [Brandes, R. P. - 2005 // Royall, J. A. - 1993]

Luminol

Wie auch für Lucigenin beschrieben, schränkt die geringe Sensitivität den Einsatz im Versuch ein. Gesichert ist die Abhängigkeit der Entstehung von Luminol-induzierter Chemilumineszenz vom Myeloperoxidase- $\text{H}_2\text{O}_2\text{-Cl}^-$ - System in Zellen. Sensitivität wird am ehesten für HOCl beschrieben. Für den Nachweis von NO, $\cdot\text{OH}$, ONOO^- und H_2O_2 scheint es jedoch nicht ausreichend. [Myhre, O. - 2003]

8-amino-5-chloro-7-phenylpyridol(3,4-d) pyridazine-1,4-(2H,3H)dion

Der Chemilumineszenz-Farbstoff 8-amino-5-chloro-7-phenylpyridol(3,4-d) pyridazine-1,4-(2H,3H)dion, L-012, ist ein Luminol-Analogen, das eine höhere Sensitivität für geringe ROS-Konzentrationen aufweist als Luminol und auch in komplexen biologischen Systemen wirksam ist. Die höchste Sensitivität besteht gegenüber extrazellulären $\text{O}_2^{\cdot-}$, deren Hauptquelle die NAD(P)H-Oxidase und in zellfreien Systemen beispielsweise die Xanthinoxidase darstellt. [Daiber, A. - 2004] Eine Verstärkung des Signals kann durch die Zugabe von Vanadat erreicht werden, indem Vanadat mit $\text{O}_2^{\cdot-}$ einen Peroxovanadyl-Komplex bildet. [Sohn, H. Y. - 1999] Auch für $\cdot\text{OH}$, H_2O_2 in Kombination mit Fe^{2+} oder Peroxidasen, HOCl und ONOO^- ist ein Anstieg der Chemilumineszenz beschrieben. Als Inhibitoren sind SOD, Harnsäure, Deferoxamine und Azide zu nennen. [Daiber, A. - 2004 // Imada, I. - 1999] Ein bedeutender Vorteil besteht darin, dass für L-012 die Gefahr der Autooxidation nicht besteht, die für Lucigenin beschrieben wird.

1.4.4.2 Messverfahren

Luminometer

Das Luminometer bietet die Möglichkeit, Chemo- und Biolumineszenz in einem spektralen Empfindlichkeitsbereich von 390-620 nm zu messen. Die im Probenröhrchen durch Farbstoffe, wie z.B. L-012, entstandenen Photonen treffen auf die Kathode eines Photomultipliers und werden als Einzelsignale registriert. Dadurch entstehen Photoelektronen, die über eine Dynodenkette Einzelimpulse an der Anode auslösen. Diese verhalten sich direkt proportional zur entstandenen Lichtmenge. Mit Hilfe eines Schwellendiskriminators ist es möglich, ein Rauschen, das durch den Photomultiplier hervorgerufen wird, zu unterdrücken. Gemessen werden die eingehenden Impulse als relative Lichteinheiten (RLU: Relative Light Units), indem die Rohdaten durch zehn dividiert und mit dem RLU-Faktor 1,0 multipliziert werden. Dies stellt ein Maß für die Lichtintensität dar. Der RLU-Faktor gleicht unerwünschte Schwankungen des Photomultipliers aus.

1.5 Zielsetzung

Oxidativ modifiziertes low density lipoprotein (oxLDL) führt über verschiedene, immer noch nicht ganz geklärte Mechanismen zu einer Erhöhung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) innerhalb von Endothelzellen und im Weiteren zu endothelialer Dysfunktion, die letztendlich die Basis der Atherogenese darstellt.

Ausgehend von dem Modell, dass die durch oxidiertes LDL hervorgerufenen reaktiven Sauerstoffspezies zu einem Großteil über die Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase generiert werden, war ursprünglich geplant, diese Abhängigkeit mittels Fluoreszenz- und Chemilumineszenz-Messung sowie anderer geeigneter Verfahren detaillierter zu untersuchen. Im Rahmen von Vorarbeiten anderer wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Komplex aus LOX-1-Rezeptor und oxLDL-Ligand an der Weiterleitung des vom oxidierten LDL ausgehenden Signals an die NAD(P)H-Oxidase beteiligt ist. Unsere Ergebnisse zeigten jedoch, dass dieses Ausgangsmodell nicht verifiziert werden konnte.

Daher wurde es Ziel dieser Arbeit, die NAD(P)H-Oxidase als Hauptquelle der oxLDL-induzierten Radikalbildung zu verifizieren bzw. auszuschließen und bei Ausschluss der Verantwortlichkeit der NAD(P)H-Oxidase den / die tatsächlichen Hauptproduzent(en) des oxidativen Stresses zu eruieren.

2 Materialien

2.1 Zellkultur

Zelllinien

CASMC

HUVEC

Firmen

Cambrex, Walkersville, USA

Cambrex, Walkersville, USA

Zellkulturmedien und Medienzusätze

CASMC - Basalmedium (SmBM®)

CASMC - Single Quots® (SmGM™-2)
(Insulin, hFGF-B, GA, hEGF)

Fötales Rinderserum (FCS)

HUVEC - Basalmedium (EBM®)

HUVEC - Single Quots® (EGM™)
(Hydrocortison, BBE, GA, hEGF)

Cambrex, Walkersville, USA

Cambrex, Walkersville, USA

Biochrom, Berlin, Deutschland

Cambrex, Walkersville, USA

Cambrex, Walkersville, USA

Lösungen

Dimethylsulfoxid (DMSO)

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
(D-PBS)

10xTrypsin/EDTA-Lösung

Sigma-Aldrich, München, Deutschland

PAA, Linz, Österreich

PAA, Linz, Österreich

Reaktionskits und RNA

„Gene Porter™ 2 Transfection Reagent“

Biocarta, San Diego, USA

„Gene Porter™ Booster 3“	Biocarta, San Diego, USA
Lox-1 siRNA (ohne Fluoreszenz)	MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland
Luziferase GL2 siRNA (ohne Fluoreszenz)	MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland

Lox-1 siRNA	5' – CUG CAU UUU AGC UGC CUU C – 3'
Luziferase GL2 siRNA	5' – GUA CGC GGA AUA CUU CGA TT – 3'

2.2 Chemikalien

Folgende Chemikalien wurden im höchsten Reinheitsgrad (p. A.) von den aufgeführten Firmen käuflich erworben:

<u>Chemikalien</u>	<u>Firmen</u>
AEBSF-Hydrochlorid	Baack, Schwerin, Deutschland
Ampuwa®	Fresenius, Bad Homburg, Deutschland
Aqua ad iniectabilia (deionisiertes Wasser)	Delta Select, Pfullingen, Deutschland
Calciumdichlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt, Deutschland
5-(and-6)-carboxy-2',7'-Dichloro-fluoresceindiacetat (c-H ₂ DCF-DA)	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
2',7'-Dichlorofluoresceindiacetat (H ₂ DCF-DA)	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Dihydroethidium (DHE)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
4,5-Dihydroxy-1,3-benzoldisulfonsäure (Tiron)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
3,3'-Diocetylindocarbocyanin (DiI)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Diphenyliodoniumchlorid (DPI)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
EDTA	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Frischplasma	Transfusionsmedizin, Würzburg, Deutschland

Glucose	Merck, Darmstadt, Deutschland
HEPES [N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'- (2-ethanesulfonic acid)]	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Kaliumbromid (KBr)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Katalase	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Katalase polyethylenglykol-gekoppelt (peg. Katalase)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Kohlendioxid 4,5 (CO ₂)	Riessner, Lichtenfels, Deutschland
L-012	Wako Chemicals, Neuss, Deutschland
Lipidophor All in 12	Technoclone, Wien, Deutschland
Lowry-Kit	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Magnesiumdichlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumazid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Superoxiddismutase (SOD)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Superoxiddismutase polyethylenglykol-gekoppelt (peg. SOD)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Trasylol® (Aprotinin)	Bayer, Leverkusen, Deutschland
Trypan-Blau (0,4%)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Xanthin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Xanthinoxidase	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

2.3 Ge- und Verbrauchsmaterialien

Ge- und Verbrauchsmaterialien

Bechergläser versch. Größen
 Combipips versch. Größen
 Reaktionsgefäße versch. Größen
 Dialyseschläuche Spectra/Por 6

Firmen

Schott, Zwiesel, Deutschland
 Eppendorf, Hamburg, Deutschland
 Eppendorf, Hamburg, Deutschland
 Spectrum, Rancho Domingues, USA

Filtereinheiten versch. Größen	Schleicher&Schuell, Dassel, Deutschland
Handschuhe Safe Skin PFE	Kimberly-Clark, Zaventem, Belgien
HandyStep®	Brand, Wertheim, Deutschland
Kanülen Sterican versch. Größen	Braun, Melsungen, Deutschland
Kryoröhrchen	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Lumox Dish™ 50	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Mikrozentrifugenröhrchen	Biocert, Wertheim, Deutschland
MultiLoch™ 6-Loch-Platte	Becton, Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Pasteur Pipetten	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
PetriSchalenn versch. Größen	Falcon, Le Pont de Claix, Frankreich
Pipettierhilfen	IBS, Woburn, USA
Pipetten versch. Größen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen Biosphere-Filter-Tips	Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen Gel-Loader	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Pipettenspitzen gestopft versch. Größen	Starlab, Ahrensburg, Deutschland
Polypropylen Röhrchen versch. Größen	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Polystyrol Rundbodenröhrchen 5 ml (FACS)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Polystyrol Rundbodenröhrchen 5 ml (Lumat)	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Magnetrührstäbchen	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Serologische Pipetten (2 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Spritzen Omnican versch. Größen	Braun, Melsungen, Deutschland
Stripetten versch. Größen	Costar, New York, USA
WägeSchalen versch. Größen	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Zellkulturflaschen (12 ml)	Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland
Zellkulturplatten versch. Größen	Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland
ZellkulturSchalenn versch. Größen	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Zentrifugenfiltereinheiten	Amicon, Beverly, USA
Zentrifugenröhrchen Quick Seal®	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland

2.4 Geräte und Zubehör

<u>Geräte und Zubehör</u>	<u>Firmen</u>
Absaugsystem Vacu Safe	IBS, Woburn, USA
Aräometer	Assistent, Sondheim, Deutschland
Eismaschine	Genheimer, Hettstadt, Deutschland
FACS Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FACS Computer (PowerMac G5)	Apple, Palo Alto, USA
FACS Software (Cell Quest™ Pro 5.2)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Gefrierschrank -20°C Liebherr Comfort	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Gefrierschrank -80°C	Genheimer, Hettstadt, Deutschland
Hybridiser HB-1D	Techne, Jahnsdorf, Deutschland
Inkubator B6220	Heraeus, Hanau, Deutschland
Kühlschrank Liebherr Profi Line	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Laminar Flow LaminAir HB2472	Heraeus, Hanau, Deutschland
Lumat LB 9501	Berthold, Bad Wildbad, Deutschland
Magnetrührer Combimag REO	IKA, Staufen, Deutschland
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Vortexer VF 2	Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland
pH-Meter inoLab® pH 720	WTW, Weilheim, Deutschland
Waage Mettler AE 240	Mettler Toledo, Giessen, Deutschland
Wallac 1420 Victor 3 Multilabel Counter	Perkin Elmer, Turku, Finnland
Wallac 1420 Software 3.00	Perkin Elmer, Turku, Finnland
Wasserbad A 100	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
WinMDI 2.8	Joseph Trotter, Scripps, San Diego, USA
Zentrifuge Rotina 46R	Hettich, Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Rotor VTI 50	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Herstellung der verwendeten Wachstumsmedien

Herstellung des Wachstumsmediums für Endothelzellen (HUVEC)

EBM	450,0 ml
FCS	50,0 ml
Hydrocortison 1 mg/ml	0,5 ml
Gentamicinsulfat/Amphotericin B	0,5 ml
Bovine Brain Extract (BBE) 3 mg/ml	2,0 ml
human Epidermal Growth Factor (hEGF)	0,5 ml

Herstellung des Wachstumsmediums für glatte Muskelzellen (CASMC)

SmBM	450,0 ml
FCS	10,0 ml
Insulin	0,5 ml
human Fibroblast Growth Factor-basic (hFGF-b)	1,0 ml
Gentamicinsulfat/Amphotericin B	0,5 ml
human Epidermal Growth Factor (hEGF)	0,5 ml

3.1.2 Kultivierung humaner Endothelzellen aus der Nabelschnurvene

HUVEC (human vein endothelial cells) wurden in der 2. Passage geliefert und in Kultur genommen, in der 3. Passage in 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für den Versuchseinsatz wurden die Zellen im Wasserbad aufgetaut und auf unbeschichteten Flaschenböden von Zellkulturflaschen in 12 ml Wachstumsmedium, deren jeweilige Zusammensetzung unter 3.1.1 beschrieben

wird, angezchtet. Dies erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Im Abstand von zwei Tagen wurde der Überstand aus den Zellkulturflaschen abgenommen und 12 ml Wachstumsmedium, das auf 37°C angewärmt wurde, zugegeben. Sobald der Boden konfluent bewachsen war, wurden die Endothelzellen im Verhältnis 1:3 bis 1:6 aufgeteilt. Hierzu musste der Überstand abgenommen, die Zellen einmalig mit sterilem angewärmtem D-PBS (8 ml) gewaschen und mit 2 ml 1xTrypsin/EDTA für 40 sec im Brutschrank bei 37°C vom Boden abgelöst werden. Die daraufhin in 8 ml einer Lösung, bestehend aus EBM und 2% FCS (v/v), aufgenommenen Zellen wurden in Falcon-Röhrchen bei 1200 g/min und 4°C für 10 min zentrifugiert. Das Präzipitat wurde in Wachstumsmedium resuspendiert und die Zellen auf neue Zellkulturflaschen verteilt. Die Anzahl jeder dieser Passagen wurde dokumentiert. Für die Versuche wurden nur Zellen der Passage 5 bis 8 eingesetzt, da es sich um Primärzellen handelte, die aufgrund ihrer kürzeren Lebensdauer in höheren Passagen zu Chromosomeninstabilität neigen.

3.1.3 Kultivierung glatter Muskelzellen aus Koronararterien

Neben den Endothelzellen wurden auch CASMC (coronary artery smooth muscle cells) verwendet, die in der 3. Passage geliefert und aliquotiert wurden. Im Gegensatz zu HUVEC wurde für die Kultivierung bei CASMC SmBM mit entsprechenden Zusätzen (vgl. 3.1.1) als Wachstumsmedium verwendet. Die Anzucht der Zellen im Brutschrank und die Zugabe des Medium wurde wie für die Endothelzellen gehandhabt (vgl. 3.1.2). Die CASMC wurden im Verhältnis 1:2 bis 1:4 geteilt. Wie unter 3.1.2 beschrieben, wurde der Überstand abgenommen und die Zellen einmalig mit D-PBS gewaschen. Für die Abspaltung der Zellen vom Untergrund durch Trypsin war eine 2-minütige Inkubation bei 37°C erforderlich. Da es sich bei CASMC ebenfalls um Primärzellen handelt, wurden in den nachfolgenden Experimenten nur Passagen von 5 bis 8 eingesetzt.

3.1.4 Einsatz im Versuch

Für die Versuche wurden die Zellen in 6-Loch-Platten, 96-Loch-Platten und Lumox-Schalen ausgesät. Die abgelösten Zellen (vgl. 3.1.2 und 3.1.3) wurden in 5 ml des jeweiligen Wachstumsmediums resuspendiert. 10 µl dieser Suspension wurden mit 40 µl Trypan-Blau vermischt und die lebenden Zellen mittels Neubauerzählkammer im Mikroskop ausgezählt. Nach Berechnung der Zelldichte wurden die resuspendierten Zellen entsprechend der Anzahl der benötigten Zellen in die Löcher der Platten oder Schalen pipettiert. Endvolumina: für 6-Loch-Platten = 2 ml, für 96-Loch-Platten = 150 µl und für Lumox-Schalen = 6 ml.

3.1.5 Transfektion von HUVEC mit siRNA

Für die Transfektion mit Lox-1 siRNA und Luziferase siRNA wurden die einzelnen Reagenzien eines Ansatzes auf eine Nukleinsäure-Konzentration von 0,5 µg/Loch für 6-Loch-Platten eingestellt. Für ein Transfektionsvolumen von 1 ml/Loch ergab sich bei einem Transfektionsansatz von 150 nM/Loch eine Menge von 1,5 µl siRNA, 12,5 µl DNA diluent, 2,5 µl GenePORTER2 und 10 µl GenePORTER2 diluent (serumfreies Medium). Voraussetzung war die 80%-ige Konfluenz der ausgesäten Zellen.

Nachdem die berechneten Mengen an GenePORTER2 mit Basismedium und siRNA mit DNA diluent jeweils für 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert wurden, konnten beide Lösungen miteinander nochmals für 10-30 min bei RT inkubiert werden. Anschließend wurden die Proben zusammen mit 1 ml EBM/Loch zu den zuvor gewaschenen Zellen pipettiert und für 4 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Zuletzt folgte die Zugabe des Booster Nr. 3 im Verhältnis 1:50, durch dessen Einsatz die Transfektionseffizienz enorm gesteigert werden konnte. Daraufhin mussten die Zellen nochmals für 20 h inkubiert werden, bevor die Zusätze zugegeben werden konnten.

3.2 Herstellung und Modifikation der Lipoproteine

3.2.1 Herstellung von nativem low density lipoprotein (nLDL)

Für die Herstellung von nativem LDL [Galle, J. - 1998] wurden 600 ml Frischplasma verwendet, das von unterschiedlichen gesunden Spendern gewonnen wurde. Um eine Proteolyse und Autooxidation zu verhindern, wurde bei Raumtemperatur folgender Antioxidationscocktail hinzugegeben:

- 16,8 ml NaCl (0,3 M)
- 9,6 ml EDTA (0,2 M pH 7,4)
- 0,3 ml Trasylol Bayer 0,5 (Aprotinin)
- 0,6 ml Natriumazid (2%)
- 6,0 ml AEBSF-Hydrochlorid (100 mM)

Durch Zugabe von Kaliumbromid (KBr) wurde eine gewünschte Dichte von 1,063 g/ml eingestellt, die mittels Aräometer überprüft wurde. Das in Zentrifugenröhrchen eingeschweißte Plasma wurde anschließend für 8 h bei 4°C und 50.000 g/min in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Durch die Zentrifugation entstanden abgrenzbare Schichten, von denen sich die oberste aus LDL, VLDL, Chylomikronen und Triglyceriden zusammensetzte, während die unterste aus HDL bestand (vgl. 1.2.1). Die Schicht aus LDL, VLDL, Chylomikronen und Triglyceriden wurde mittels einer Spritze aus dem Zentrifugenröhrchen abgesogen. Nach erneuter Einstellung der Dichte auf 1,063 g/ml wurden die Zentrifugenröhrchen zur Hälfte mit PBS befüllt und mit der LDL-Lösung unterschichtet. Die erneute Zentrifugation für 3 h bei 4°C mit 50.000 g/min trennte LDL, das als gelb-orange Bande in der Mitte des Röhrchens zu erkennen war, von VLDL, Chylomikronen und Triglyceriden. Mittels einer Kanüle wurde die LDL-Schicht abgezogen. Das Isolat wurde gegen PBS bei 4°C für 24 h dialysiert. Als Oxidationsschutz wurde 200 µM EDTA zugefügt. Im Anschluss erfolgte eine Proteinbestimmung nach Lowry et al. [LOWRY, O. H. - 1951] und eine Lipidelektrophorese mit Lipidophor All in 12.

3.2.2 Herstellung von oxidiertem low density lipoprotein (oxLDL)

Für die Oxidation des nativen LDLs wurde Carbogengas (95 % Sauerstoff, 5 % Kohlendioxid) verwendet. Dazu wurde nLDL gegen PBS mit 1 μ M EDTA bei 4°C mit zweimaligem Pufferwechsel nach jeweils 24 h dialysiert, um die Konzentration des als Oxidationsschutz zugesetzten EDTAs herabzusetzen. Nach Sterilfiltration wurde die Proteinkonzentration nach Lowry et al. [LOWRY, O. H. - 1951] ermittelt und das Dialysat mittels PBS auf einen Proteingehalt von 1 mg/ml eingestellt. Das zu oxidierende LDL wurde in einen Dialyseschlauch überführt und für einen Zeitraum von 16-28 h in PBS bei 37°C inkubiert. Das LDL im Dialyseschlauch wurde durch Einleiten von Carbogen über eine Glasfritte oxidiert. Zur Kontrolle der erreichten Oxidationsstufe wurde während der Inkubationsperiode in regelmäßigen Abständen eine Lipidelektrophorese durchgeführt. Durch den Zuwachs an negativen Ladungen wandert das oxidierte LDL im elektrischen Feld schneller zur Anode als die native Form. Die Oxidation wurde durch Zugabe von EDTA mit einer Endkonzentration von 100 μ M beendet, sobald eine 2,5- bis 3-fache Zunahme der Beweglichkeit gegenüber dem nativem LDL nachweisbar war. Abschließend wurde steril filtriert und eine endgültige Proteinbestimmung nach Lowry et al. durchgeführt. Das so entstandene oxidierte LDL konnte nun bei 4°C für maximal 3 Wochen aufbewahrt und verwendet werden.

3.2.3 Herstellung von DiI-markiertem oxidiertem low density lipoprotein (DiI-oxLDL)

Das Labeling des oxidierten LDLs erfolgte mit dem fluoreszierenden Farbstoff 3,3'-Dioctadecylindocarbocyanin (DiI) nach der Methode von Stephan und Yurachek. [Stephan, Z. F. - 1993] Durch Zugabe einer DiI-Lösung (30 mg/ml DMSO) unter sterilen Bedingungen zu sterilfiltriertem oxLDL wurde eine DiI-Endkonzentration von 300 μ g pro 1 mg LDL-Protein erreicht. Das mit dem Farbstoff versetzte oxLDL wurde bei 37°C für 18 h inkubiert und die Dichte der Lösung durch Zugabe von KBr auf 1,3 mg/ml eingestellt. In Quick-Seal-Röhrchen wurde 0,9% NaCl vorgelegt, mit DiI-markiertem oxLDL der Dichte 1,3 unterschichtet und für 3 h bei 12°C mit 50.000 g/min

in der Ultrazentrifuge zentrifugiert. Das als orange-roter Ring sichtbare DiI-markierte oxLDL konnte mittels einer Kanüle abgezogen werden und wurde gegen 5 Liter PBS mit 100 μ M EDTA bei 4°C für 24 h dialysiert. Nach einem Pufferwechsel und erneuter Dialyse gegen 5 Liter PBS mit 100 μ M EDTA wurde das Dialysat geerntet, steril filtriert und die Proteinkonzentration nach Lowry et al. bestimmt. Das auf diese Weise gewonnene DiI-oxLDL wurde bei 4°C unter Lichtausschluss für ca. 3 bis 4 Wochen gelagert und verwendet.

3.3 Lösungen der verwendeten Antioxidantien

Diphenyliodoniumchlorid

Eine Stammlösung von Diphenyliodoniumchlorid (DPI) in DMSO (10.000 μ M; w/v) wurde bei -20°C gelagert und in einer Konzentration von 1 μ M eingesetzt.

Katalase und peg. Katalase

Das Enzym Katalase wurde in D-PBS gelöst und auf eine Konzentration von 10.000 U/ml (v/v) eingestellt. Die Lösung wurde bei 4.000 g/min und RT für 5 min abzentrifugiert, steril filtriert und bei -20°C gelagert. Eingesetzt wurden Konzentrationen von 100 und 400 U/ml. Die polyethylenglykol-gekoppelte Form der Katalase (peg.) soll den Transfer des aktivierten Enzyms in den Intrazellularraum unterstützen. [Muzykantov, V. R. - 2001]

Superoxiddismutase und peg. Superoxiddismutase

Entsprechend der Proteinkonzentration wurde das Enzym Superoxiddismutase (SOD) in sterilem Aqua ad iniectabilia gelöst, in einer Stammkonzentration von 10.000 U/ml (v/v) aliquotiert und in Portionen von 20 μ l bei -20°C gelagert. Im Versuch wurden 10 und 100 U/ml eingesetzt. Die polyethylenglykol-gekoppelte Form der SOD (peg.) soll ebenso wie im Fall der Katalase den Transfer des aktivierten Enzyms in den Intrazellularraum unterstützen.

Tiron

Die Substanz Tiron wurde bei Raumtemperatur (RT) gelagert. Zur Herstellung der Stammlösung von 1.000 mM (w/v) musste Tiron in sterilem D-PBS immer frisch angesetzt und mit 5 N NaOH auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt werden. Anschließend konnte es steril filtriert und im Versuch (10 mM) eingesetzt werden.

Xanthin

Die Substanz Xanthin wurde bei RT gelagert, wobei die Stammlösung von 1.000 μ M (w/v) immer frisch angesetzt werden musste. Dazu wurden 3,1 mg Xanthin in 50 μ l 5 N NaOH und 10 ml Basismedium (EBM) gelöst. Nach der Einstellung eines pH-Wertes von 7,4 mit 1 N HCl wurde ad 18 ml die entsprechende Menge an Basismedium hinzugefügt. Die Lösung konnte nun steril filtriert und im Versuch in einer Konzentration von 100 μ M eingesetzt werden.

Xanthinoxidase

Die in D-PBS gelöste Xanthinoxidase wurde bei 4°C im Kühlschrank gelagert und für den Einsatz im Versuch musste frisch eine Stammlösung (0,02 U/ml; v/v) mit D-PBS hergestellt werden. In den Versuchen wurden 0,0001 U/ml eingesetzt.

3.4 Messung von ROS am Luminometer**3.4.1 Herstellung des verwendeten Puffers und Lösung des Farbstoffes L-012*****Herstellung des 10-fach-konzentrierten Puffers für die Versuche mit L-012***

Der 10-fach-konzentrierte L012-Puffer war wie folgt zusammengesetzt: 1,35 M NaCl, 27 mM KCl, 18 mM CaCl₂, 4,9 mM MgCl₂, 2,8 mM Na₂HPO₄, 55 mM Glucose, 200 mM HEPES. Er wurde vor Gebrauch durch 5 N NaOH auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

Lösung von L-012

Der Farbstoff L-012 wurde in einer Konzentration von 25 mM (w/v) in deionisiertem Wasser hergestellt, die dann bei -20°C gelagert werden konnte. Im Versuch wurde eine Konzentration von 100 µM eingesetzt.

3.4.2 Versuch zum Nachweis der Freisetzung von O₂^{•-} durch oxLDL

Als Vorbereitung zum Nachweis von oxLDL-emittiertem O₂^{•-} wurde in deionisiertem Wasser eine 100 µM L-012-Lösung in NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂, Na₂HPO₄, Glucose und HEPES (vgl. 3.3) mit einem pH von 7,4 hergestellt.

Für den Versuchsteil, bei dem die O₂^{•-}-Produktion in Anwesenheit von HUVEC gemessen werden sollte, wurden 4x10⁵ Zellen in 2 ml Wachstumsmedium resuspendiert, in 6-Loch-Platten ausgesät und über Nacht im Brutschrank angezchtet. Daraufhin wurden die Platten abgesaugt und pro Loch 1 ml EBM+0,1% FCS sowie die folgenden Zusätze zugegeben: oxLDL (15,3 µg/ml), nLDL (12,6 µg/ml), Katalase (100 U/ml), SOD (10 U/ml) und Tiron (10 mM). Nach Ablauf der Inkubationszeit von 3 h wurden die Überstände abgenommen und die Zellen einmalig mit jeweils 2 ml D-PBS gewaschen. Zum Ablösen mussten die Zellen mit 200 µl 1xTrypsin/EDTA pro Loch für 40 sec im Brutschrank inkubiert werden. Um den Trypsin-Verdau zu beenden, wurden jeweils 2 ml D-PBS und 2% FCS (v/v) zugegeben und die Zellen bei 4°C und 1200 g/min für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und 1 ml L-012-Puffer mit den jeweiligen Zusätzen zugegeben. Die Chemilumineszenz der Lösung wurde nun in 5 ml Rundbodenröhrchen (75 x 12 mm) aus Polystyrol im Luminometer bei einer Messzeit von 100 sec gemessen. Die Proben wurden während und zwischen den einzelnen Messungen dunkel aufbewahrt.

Dieser Versuch wurde nun auch in zellfreier Lösung durchgeführt, wobei die Zusätze zu jeweils 1 ml des L-012-Puffers pipettiert und im Luminometer gemessen wurden. Bei dem eingesetzten oxidierten LDL handelte es sich aufgrund verschiedener Chargen allerdings um zwei unterschiedlich stark oxidierte oxLDL-Formen: oxLDL der Charge 301 (Proteinkonzentration: 1,8 mg/ml und Laufweite in der Lipidelektrophorese: 32 mm) und 302 (Proteinkonzentration: 3,06 mg/ml und Laufweite in der

Lipidelektrophorese: 28 mm). Die Laufweite ist hierbei ein Maß für die Oxidationsstufe, da stärker oxidierte Formen negativer geladen sind und somit in der Lipidelektrophorese eine längere Laufweite aufweisen.

3.5 Messung von ROS am FACS und Multilabel Counter

3.5.1 Lösung der Fluoreszenzproben

H₂DCF-DA (2',7'-Dichlorofluoresceindiacetat) und c-H₂DCF-DA [5-(and-6)-carboxy-2',7'-Dichlorofluoresceindiacetat]

Beide Farbstoffe, H₂DCF-DA und c-H₂DCF-DA, wurden als 20 mM Lösung in DMSO bei -20°C unter Ausschluss von Licht gelagert und in den Versuchen in einer Konzentration von 5 und 20 µM eingesetzt.

DHE (Dihydroethidium)

Der Farbstoff DHE wurde als 50.000 µM Lösung in DMSO gelöst und Aliquots dieser Lösung unter Ausschluss von Licht bei -20°C gelagert. Für den Einsatz im Versuch war eine Vorverdünnung von 1:100 mit Basismedium nötig. Die im Versuch eingesetzte Konzentration betrug 5 µM.

3.5.2 Messung der DiI-oxLDL-Aufnahme und ROS-Bildung in HUVEC nach Transfektion mit siRNA im FACS

Für Transfektionsversuche von HUVEC mit LOX-1 siRNA und Luziferase GL2 siRNA wurden 1×10^5 Zellen in je 2 ml Wachstumsmedium pro Loch einer 6-Loch-Platte ausgesät, die über Nacht im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert wurden. Nach Erreichen einer Konfluenz von 80% konnte die Transfektion mit Luziferase GL2 siRNA und LOX-1 siRNA, wie unter 3.1.5 beschrieben, durchgeführt werden.

24 h nach Transfektion wurde das Medium durch 2 ml EBM und 0,1% FCS (v/v) ersetzt und die Zellen für 3 h mit DiI-oxLDL (20 µg/ml Endkonzentration) und c-H₂DCF-DA (20 µM Endkonzentration) inkubiert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellen mit 2 ml angewärmtem D-PBS gewaschen und der Trypsin-Verdau mit je 500 µl 1xTrypsin/EDTA für 40 sec im Brutschrank durchgeführt. Sobald sich die Zellen abgelöst hatten, wurden jeweils 2 ml angewärmtes D-PBS und 2% FCS (v/v) zugegeben und die Zellen bei 1200 g/min und 4°C für 5 min zentrifugiert. Es folgten zwei Waschschriffe mit 2 ml vorgekühltem D-PBS und 2% FCS (v/v) (4°C). Das Präzipitat wurde in 400 µl D-PBS und 2% FCS (v/v) aufgenommen und mittels FACS (FL 1 und 2) analysiert. Die Kompensation betrug FL 1: 3,5 % FL 2 und FL 2: 20,0 % FL 1.

3.5.3 Messung oxLDL-induzierter ROS und deren Hemmung in zellfreier Lösung im Multilabel Counter

Mit Hilfe dieser Versuchsreihe sollte untersucht werden, welche Auswirkungen die unten aufgeführten Substanzen bzw. Kombinationen dieser Substanzen auf die Bildung von DCF haben.

Dazu wurden in 96-Loch-Platten mit 150 µl EBM, das zuvor mit H₂DCF-DA (5 µM Endkonzentration) versetzt worden war, die folgenden Zusätze zugegeben: oxLDL (20 µg/ml), nLDL (20 µg/ml), Katalase (100 U/ml), SOD (100 U/ml), Tiron (10 mM) und DPI (1 µM). Anschließend erfolgte sofort die Messung mittels Multilabel Counter unter folgenden Einstellungen:

Label: Fluorescein (0,1 sec), Technik: prompt fluorometry, CW- Lampe Filter: F485, CW-Lampe Filter Slot: A5, Emissions-Filter: F535, Emissions-Filter Slot: A5, Dauer der Messung: 0,1 sec, Emissionsöffnung: small, CW-Lampe Energie: 14024

3.5.4 Messung oxLDL-induzierter ROS auf Lumox-Schalen im FACS

Durch diesen Versuchsaufbau sollte die Aufnahme von oxLDL durch HUVEC verhindert werden, ohne die Aufnahme von ROS zu blockieren.

Auf Lumox-Schalen wurden die 5×10^5 HUVEC in 6 ml Wachstumsmedium ausgesät und in verschlossenen Petri-Schalen für 24 h im Brutschrank inkubiert. Das Medium wurde entfernt und die entsprechenden Zusätze in 6 ml Wachstumsmedium, das zuvor mit c-H₂DCF-DA (5 μ M Endkonzentration) versetzt worden war, zugegeben. An Zusätzen wurden oxLDL (50 μ g/ml), nLDL (50 μ g/ml), DiI-oxLDL (20 μ g/ml), Xanthinoxidase (0,0001 U/ml) und Xanthin (100 μ M) zur direkten (auf dem Filter) und indirekten (unter dem Filter) Stimulation eingesetzt (siehe **Abb. 5**). Der Filter wurde nun in die mit 15 ml vorbereitetem Wachstumsmedium gefüllte Petri-Schalen gestellt und durch Abstandhalter in der Schalen luftblasenfrei aufgebockt gelagert. Dieser Aufbau wurde bei 37°C im Brutschrank für 48 h inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen, wie unter 3.5.2 beschrieben, gewaschen, abgelöst und zentrifugiert. Im FACS konnte dann mit den Filterkanälen 1 und 2 die Messung durchgeführt werden, wobei eine Kompensation von FL 1: 3,5 % FL 2 und FL 2: 20,0 % FL 1 vorgenommen wurde.

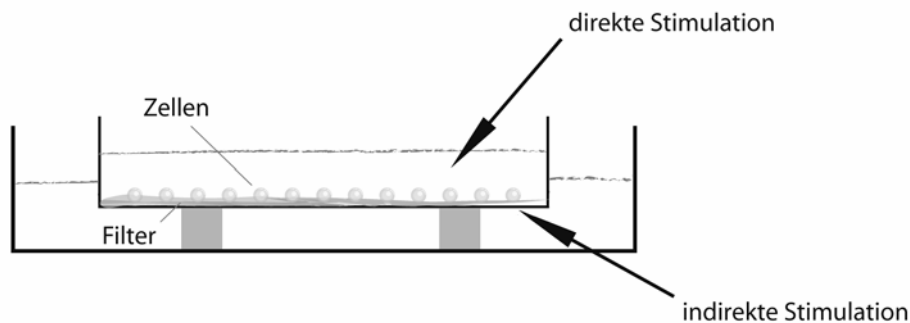


Abb. 5 Versuchsaufbau mit zellundurchlässigen und gleichzeitig gasdurchlässigen Lumox-Schalen

3.5.5 Messung der oxLDL-Aufnahme in HUVEC und der induzierten ROS-Entstehung bei 37°C und 4°C im FACS

HUVEC wurden bei 4°C mit oxLDL inkubiert, da die Zellen in diesem Temperaturbereich kein oxLDL aufnehmen – bei gleichzeitiger Exposition durch ROS, welche vom oxLDL abgegeben wurden. Dazu wurden konfluent gewachsene Zellen in

einem verschließbaren, mit CO₂ und O₂ befüllten Behältnis bei 4°C gelagert. Um im weiteren Verlauf eine Internalisierung der Lipoproteine von der Zelloberfläche zu verhindern, mussten die Zellen während der Versuchsdurchführung auf Eis gehalten und alle verwendeten Medien und Zusätze im Kühlschrank bei 4°C vorgekühlt werden. Nach 24 h bei 4°C wurden folgende Zusätze ohne vorherigen Medienwechsel zugegeben: oxLDL in unterschiedlichen Konzentrationen (Bereich: 10 – 200 µg/ml), nLDL (20 µg/ml) und DiI-oxLDL (Bereich: 10 – 200 µg/ml). Anschließend wurden die fluoreszenzmarkierten Farbstoffe DHE (5 µM Endkonzentration) und H₂DCF-DA (20 µM Endkonzentration) hinzugefügt. Die Zellen wurden für 4 h bzw. 24 h bei 4°C in einem mit CO₂ und O₂ angereicherten Behältnis inkubiert. Nach dieser Zeit wurden die Platten auf Eis abgesaugt und mit jeweils 2 ml gekühltem D-PBS gespült. Die Zellen konnten durch die 10minütige Inkubation mit 6xTrypsin/EDTA bei RT abgelöst werden. Die in jeweils 2 ml D-PBS und 2% FCS (v/v) aufgenommenen Zellen wurden bei 1200 g/min und 4°C für 10 min zentrifugiert. Anschließend in 400 µl vorgekühltem D-PBS und 2% FCS (v/v) resuspendiert, wurden die Messungen in FACS-Röhrchen im FACS (FL 1 und 2) durchgeführt.

Bei der Durchführung der Versuche bei 37°C wurde bei Konfluenz der Zellen in der 6-Loch-Platte sofort mit der Zugabe der Zusätze und Farbstoffe, wie oben aufgeführt, begonnen. Nach Inkubationszeiten von 4 h bzw. 24 h wurden die Zellen gewaschen und für die FACS-Messung vorbereitet. Es wurden folgende Kompensations-einstellungen gewählt: 37°C für 4 h (FL 1: 3,0 % FL 2, FL 2: 22,5 % FL 1), 37°C für 24 h (FL 1: 4,0 % FL 2, FL 2: 20,0 % FL 1), 4°C für 4 h (FL 1: 3,0 % FL 2, FL 2: 22,5 % FL 1) und 4°C für 24 h (FL 1: 4,0 % FL 2, FL 2: 25,0 % FL 1).

3.5.6 Messung der oxLDL-Aufnahme und induzierten ROS-Bildung in CASMC im FACS

Um die Aufnahmefähigkeit von CASMC für oxidiertes LDL zu untersuchen, wurden 2×10^5 Zellen in 2 ml Wachstumsmedium pro Loch einer 6-Loch-Platte ausgesät und diese über Nacht im Brutschrank kultiviert. Am Versuchstag wurde das Wachstumsmedium durch 2 ml frisches Medium ersetzt und die Zusätze zusammen mit

den fluoreszenzmarkierten Farbstoffen DHE (5 μM Endkonzentration) und $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ (20 μM Endkonzentration) zugegeben. Die Versuchsansätze bestanden aus nLDL (20 $\mu\text{g/ml}$) und unterschiedlichen Konzentrationen von oxLDL (Bereich: 10 – 200 $\mu\text{g/ml}$) und DiI-oxLDL (Bereich: 10-200 $\mu\text{g/ml}$). Für einen Zeitraum von 4 h wurden die Ansätze bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach musste der Überstand abgesaugt und die Zellen mit gewärmtem D-PBS (2 ml) gewaschen werden. Durch Zugabe von 500 μl 1xTrypsin/EDTA wurden die CASMC nach 120 sec im Brutschrank abgelöst. Abgestoppt wurde dieser Vorgang durch Zugabe von 2 ml gewärmtem D-PBS und 2%FCS (v/v). Die somit in Lösung gehaltenen Zellen wurden anschließend in 15 ml Röhren für 10 min bei 1200 g/min und 20°C zentrifugiert. Schließlich wurde das Pellet in 400 μl gewärmtem D-PBS und 2%FCS (v/v) resuspendiert und für die Messung (FL 1 und 2) in FACS-Röhren pipettiert. Die Kompensation betrug für die Proben mit $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ und DiI (FL 1: 3,5 % FL 2, FL 2: 25,0 % FL 1) und für die Proben mit $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ und DHE (FL 1: 2,5 % FL 2, FL 2: 22,0 % FL 1).

3.5.7 Messung der oxLDL-induzierten ROS und deren Hemmung in HUVEC und CASMC im FACS

Dieser Versuch vergleicht die Wirkung verschiedener Antioxidantien auf die Entstehung oxLDL-induzierter ROS in HUVEC und CASMC. Zur Durchführung vgl. 3.5.5 (37°C). Als Zusätze wurden oxLDL (20 $\mu\text{g/ml}$), peg. (polyethylenglykolgekoppelte) Katalase (400 U/ml) und peg. SOD (100 U/ml) verwendet. Die Markierung der Zellen erfolgte mit den Fluoreszenzfarbstoffen DHE (5 μM) und $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ (20 μM), woraufhin die beiden Zelllinien für 1 h bei 37°C und 5% CO_2 im Brutschrank inkubiert wurden.

3.5.8 Durchführung der Messung am FACS

Für die Messung wurden einige Voreinstellungen am Computer vorgenommen und die Filter 1 und 2 (vgl. 1.4.3.2) verwendet. Zur Bearbeitung und Registrierung der Daten

wurde mit der Software CellQuest™ Pro 5.2 der Firma BD gearbeitet. Die eingestellte Kompensation ist abhängig von den PMT-Spannungen (funktionelle Abhängigkeit) und dem verwendeten Messgerät. Dadurch war es möglich, die spektralen Überlappungen eines Fluorochroms (siehe **Tab. 2**) auszugleichen. Der Schwellenwert wurde für alle Messungen über den Messparameter des Vorwärtsstreulichtes (FSC) auf einen Wert von 52 festgelegt. Dies diente dem Ausschluss von Autofluoreszenz, die durch die Zellorganellen erzeugt wird. Pro Messung wurden 10.000 Zellen registriert, die mit hoher Durchflussrate (high) gemessen und im logarithmischen Modus dargestellt wurden. Für die Messung wurden die Proben in 5 ml Rundbodenröhrchen (75 x 12 mm) aus Polystyrol pipettiert. Die Ausschalt- und Reinigungsroutine wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Eine abschließende Auswertung der Daten wurde mit WinMDI vorgenommen. Hiermit wurden für die glatten Muskelzellen definierte Gates verwendet, wodurch die toten Zellen von der Messung subtrahiert und somit eine Verfälschung der Daten verhindert werden konnte. Bei Endothelzellen war dies aufgrund der geringeren Rate an toten Zellen nicht nötig.

Fluorochrome	Exzitationsspektren bzw. - maxima	Emissionsspektren bzw. - maxima
c-H ₂ DCF-DA	492-495 nm, 494 nm	517-527 nm
DHE	392 nm	404-600 nm, 410 nm
Dil	549 nm	563-607 nm, 565 nm

Tab. 2 Fluoreszenzspektren der eingesetzten Fluorochrome

3.6 Auswertung und Statistik

Die gemessenen Daten wurden durch das Ergebnis, das sich bei der Messung ohne Zusätze ergab, dividiert und deren arithmetische Mittelwerte \pm SEM (Standardfehler) in Form von Säulen- und Liniendiagrammen dargestellt. Für einen direkten Vergleich zeigen die jeweiligen Tabellen die einzelnen Mittelwerte mit und ohne den Einsatz eines

Gates. Aufgrund der hohen Rate an toten CASMC wurden für die Diagramme in diesem Fall die Messwerte mit Gate verwendet, wohingegen in den Diagrammen zur Darstellung der HUVEC die Werte ohne Gate herangezogen wurden.

Der vertikale Balken auf den jeweiligen Säulen visualisiert den Standardfehler. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Student's T-Test zweiseitig für gepaarte Stichproben und erscheint als Stern (*) über den Säulen, wobei $p < 0,01$ als statistisch signifikant definiert wurde. Die Anzahl der durchgeführten Versuche ist in der Legende der Diagramme mit ,n' angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Nachweis der Beteiligung des LOX-1-Rezeptors an der oxLDL-Aufnahme in HUVEC

Im Rahmen von Vorversuchen sollte das Modell der oxLDL-Aufnahme über den LOX-1-Rezeptor und die dadurch bedingte Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase untersucht werden. In der Vergangenheit wurde bereits durch Versuche mit Western Blots eine Reduktion der Expression des LOX-1-Rezeptors durch die Transfektion mit LOX-1 siRNA vermutet. Um dies zu reproduzieren, wurden die Zellen mit LOX-1 siRNA und Luziferase siRNA transfiziert, 24 h später für 3 h mit 20 µg/ml DiI-oxLDL (FL 2) und 20 µM c-H₂DCF-DA (FL 1) inkubiert und anschließend durchflusszytometrisch gemessen.

Abb. 6 verdeutlicht, dass die alleinige Zugabe von DiI-markiertem oxLDL zu einer Verstärkung des intrazellulären Signals für DiI führte. Durch eine Kombination aus Transfektion mit Luziferase siRNA (Kontrolltransfektion) und Zugabe von DiI-oxLDL wurde nochmals eine Zunahme des Signals erreicht, die sich jedoch durch die Transfektion mit LOX-1 siRNA nur geringfügig reduzieren ließ (ca. 20 %).

In **Abb. 7** zeigte sich durch die Zugabe von DiI-oxLDL zu transfizierten Zellen (Luziferase siRNA) eine Signalverstärkung für c-DCF, die durch die Transfektion mit LOX-1 siRNA nur geringfügig gemindert werden konnte (ca. 7 %).

Aus den gezeigten Daten ging somit kein eindeutiger Hinweis dafür hervor, dass der LOX-1-Rezeptor als wichtige Komponente für die Aufnahme von oxLDL in Endothelzellen eine Rolle spielt. Zudem zeigte sich trotz Hemmung des LOX-1-Rezeptors kein deutlicher Abfall des ROS-spezifischen Signals für c-DCF.

Das Ausgangsmodell musste neu überdacht werden. Da in der Literatur Hinweise über die Freisetzung von O₂⁻ durch oxLDL selbst bestehen, sollte dies durch die Methode der Chemilumineszenz-Messung näher untersucht werden.

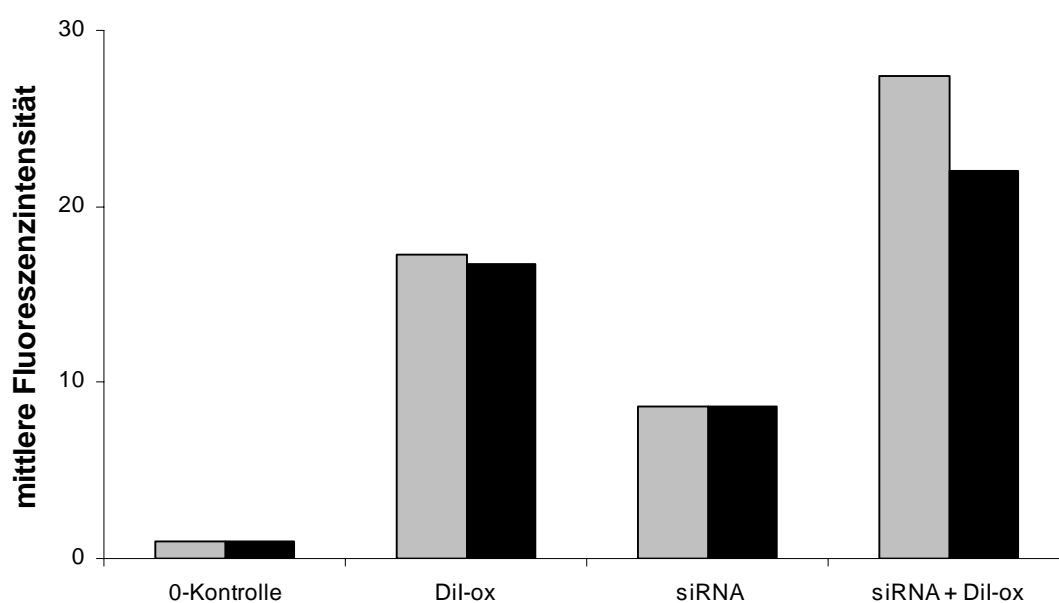


Abb. 6 Analyse der Aufnahmefähigkeit von HUVEC für DiI-oxLDL nach Transfektion mit LOX-1 siRNA und Luziferase siRNA im FACS. Versuchsreihe mit Luziferase siRNA (grau) und LOX-1 siRNA (schwarz). Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (Mean) in Filter 2 in Abhängigkeit von den verwendeten Zusätzen, wobei Zellen, die weder transfiziert (siRNA) noch mit DiI-markiertem oxLDL (DiI-ox) inkubiert wurden, als 0-Kontrolle (= 1) definiert sind. (n = 1)

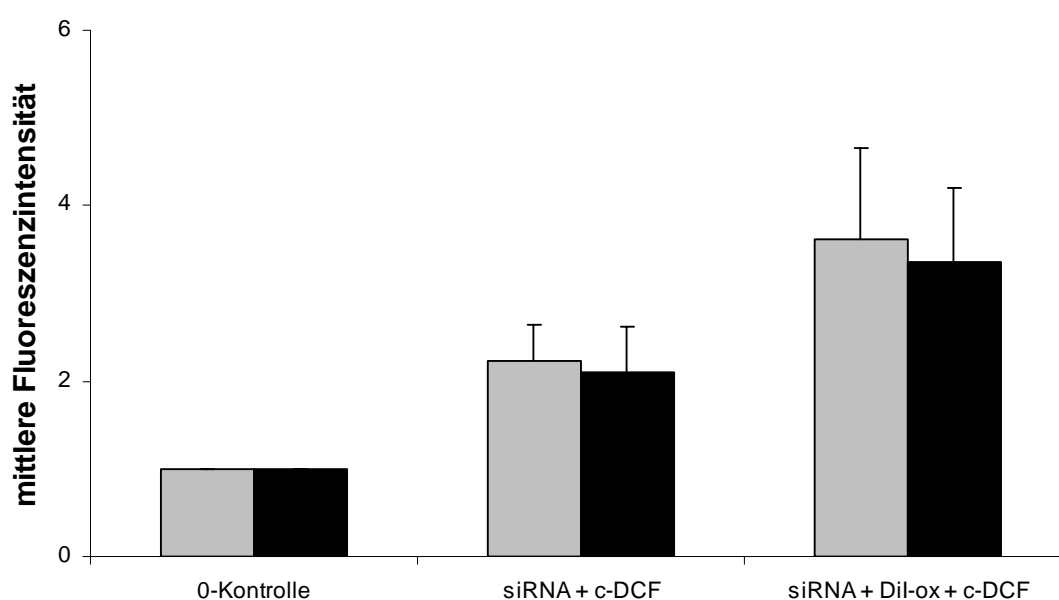


Abb. 7 Analyse der oxLDL-induzierten Bildung von ROS in HUVEC nach Transfektion mit LOX-1 siRNA und Luziferase siRNA mittels c-H₂DCF-DA im FACS. Versuchsreihe mit Luziferase siRNA

(grau) und LOX-1 siRNA (schwarz). Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (Mean) in Filter 1 in Abhängigkeit von den verwendeten Zusätzen, wobei Zellen, die ausschließlich mit siRNA transfiziert wurden, als 0-Kontrolle (= 1) definiert sind. Die Ergebnisse setzen sich aus Mittelwert \pm SEM zusammen (n = 4).

4.2 Nachweis der extrazellulären Freisetzung von $O_2^{\cdot-}$ durch oxLDL

Für den Nachweis der durch oxLDL extrazellulär induzierten Bildung von $O_2^{\cdot-}$ wurde die Chemilumineszenz-Messung mit dem Luminol-Analagon L-012 gewählt. Dieser Versuch wurde in An- und Abwesenheit von Endothelzellen durchgeführt. Die verwendeten Endothelzellen wurden mit nLDL (12,6 $\mu\text{g/ml}$), oxLDL (15,3 $\mu\text{g/ml}$; ox) und den antioxidativen Substanzen Katalase (100 U/ml; Kat.), Superoxiddismutase (10 U/ml; SOD) und Tiron (10 mM) für 3 h inkubiert. Für die Versuche in zellfreier Lösung entfiel die Inkubationszeit von 3 h. Die Messung erfolgte in beiden Versuchen 20 min nach Zugabe des Farbstoffes L-012 (100 μM) mittels Luminometer.

Hierbei zeigte sich (siehe **Abb. 8**), dass der durch oxLDL ausgelöste Anstieg des L-012-Signals gegenüber nLDL in Anwesenheit von HUVEC durch die Zugabe von SOD, SOD in Kombination mit Katalase und durch Tiron gesenkt werden konnte, wobei die alleinige Zugabe von Katalase zu einer Verstärkung des Signals mit großer Streuung führte.

Für die Versuchsreihe in zellfreier Umgebung (siehe **Abb. 9**) konnten identische Ergebnisse gezeigt werden, wobei das Signal auf einem deutlich höheren Niveau als das für HUVEC angesiedelt war.

Um diese Ergebnisse zu untermauern, sollte die direkte Freisetzung von $O_2^{\cdot-}$ durch oxLDL über einen Zeitraum von 4 Monaten untersucht werden.

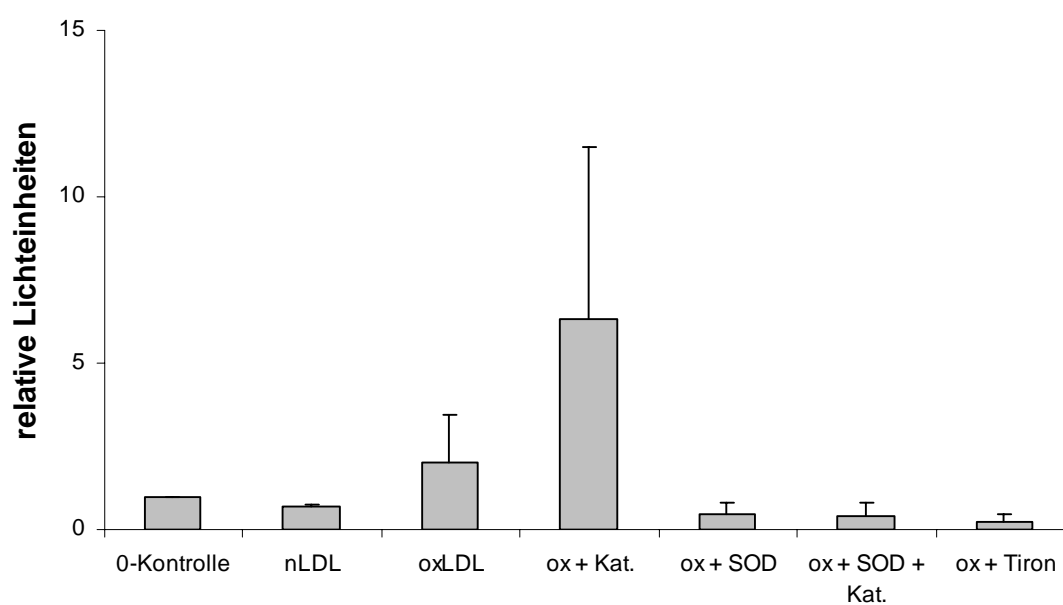


Abb. 8 Analyse des Einflusses verschiedener Antioxidantien auf die oxLDL-induzierte Freisetzung von $O_2^{\cdot -}$ in Anwesenheit von HUVEC mit Hilfe des Chemilumineszenz-Farbstoffes L-012. Dargestellt sind relative Lichteinheiten (RLU = Relative Light Units) in Abhängigkeit von den verwendeten Zusätzen, wobei Zellen, die ausschließlich mit L-012 inkubiert wurden, als 0-Kontrolle (= 1) definiert sind. Die Ergebnisse setzen sich aus Mittelwert \pm SEM zusammen (n = 4).

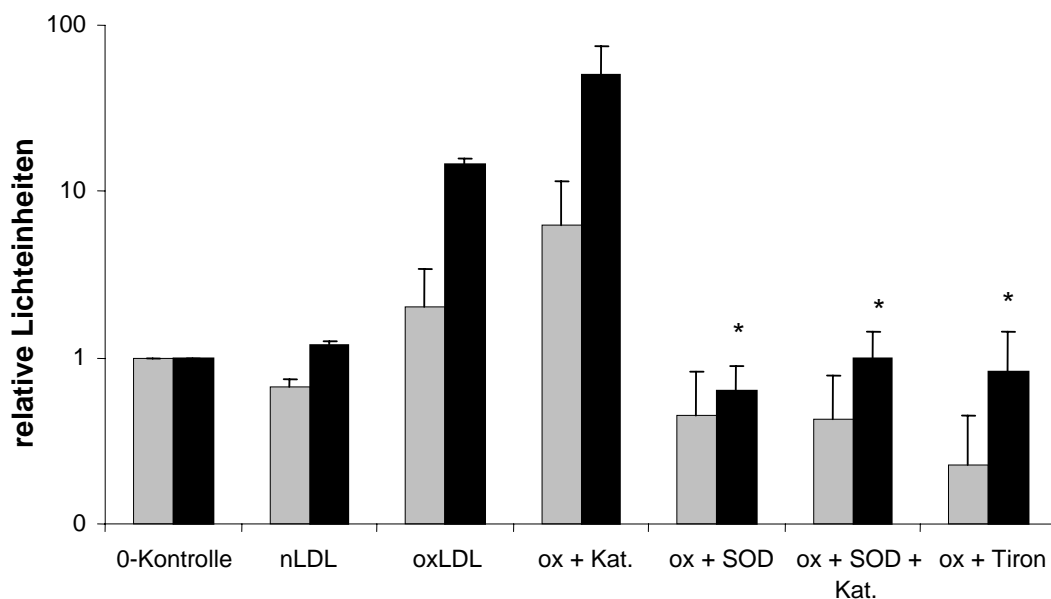


Abb. 9 Analyse des Einflusses verschiedener Antioxidantien auf die oxLDL-induzierte Freisetzung von $O_2^{\cdot-}$ in zellfreier Lösung und in Anwesenheit von HUVEC mit Hilfe des Chemilumineszenz-Farbstoffes L-012. Versuchsreihe in Anwesenheit von HUVEC (grau) und in zellfreier Lösung ohne HUVEC (schwarz). Dargestellt sind relative Lichteinheiten (RLU = Relative Light Units) in Abhängigkeit von den verwendeten Zusätzen, wobei Zellen, die ausschließlich mit L-012 inkubiert wurden, als 0-Kontrolle (= 1) definiert sind. Die Ergebnisse setzen sich aus Mittelwert \pm SEM bei logarithmischer Skalierung zusammen. (n = 4)

4.3 Nachweis der anhaltenden extrazellulären Freisetzung von $O_2^{\cdot-}$ durch oxLDL

Mit Hilfe dieses Versuches sollte die Potenz des oxidierten LDL bezüglich der Generierung von $O_2^{\cdot-}$ untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde in zellfreier Lösung eine Messung am Luminometer über einen Zeitraum von 4 Monaten durchgeführt (vgl. 4.2), wobei zwei unterschiedlich stark oxidierte oxLDL-Formen eingesetzt wurden: oxLDL der Charge 301 mit einer Proteinkonzentration von 1,8 mg/ml und einer Laufweite in der Lipidelektrophorese (LE) von 32 mm und oxLDL der Charge 302 mit einer Proteinkonzentration von 3,06 mg/ml und einer LE von 28 mm. Die Laufweite ist ein Maß für den Grad der Oxidation, da sie bei einem Anstieg der negativen Ladung des oxidierten LDL zunimmt.

Hierbei konnte gezeigt werden (siehe **Abb. 10**), dass über einen Zeitraum von 4 Monaten eine konstante Signalverstärkung unter der Zugabe von oxLDL im Vergleich zur 0-Kontrolle vorliegt, wobei das stärker oxidierte LDL (Charge 301) im Verlauf eine stärkere Potenz aufwies und gegen Ende im Vergleich weniger stark abfiel. Auch eine Inhibition durch Tiron und SOD war durchgehend möglich. Um den Oxidationsgrad bei Verminderung der Potenz von oxLDL nachzuweisen, wurde nach dem 1. Abfall von Charge 301 (73. Tag) und zum Ende des Versuches (115. Tag) eine Lipidelektrophorese durchgeführt, die folgende LE erbrachte: 73. Tag (301: 42 mm und 302: 35 mm) und 115. Tag (301: 42 mm und 302: 38 mm).

Da sich in dieser Versuchsreihe die Ergebnisse von 4.2 bestätigten, ist von einer anhaltenden extrazellulären Freisetzung von $O_2^{\cdot -}$ auszugehen. Im Folgenden sollte nun die Bildung weiterer ROS-Untergruppen durch oxLDL untersucht werden.

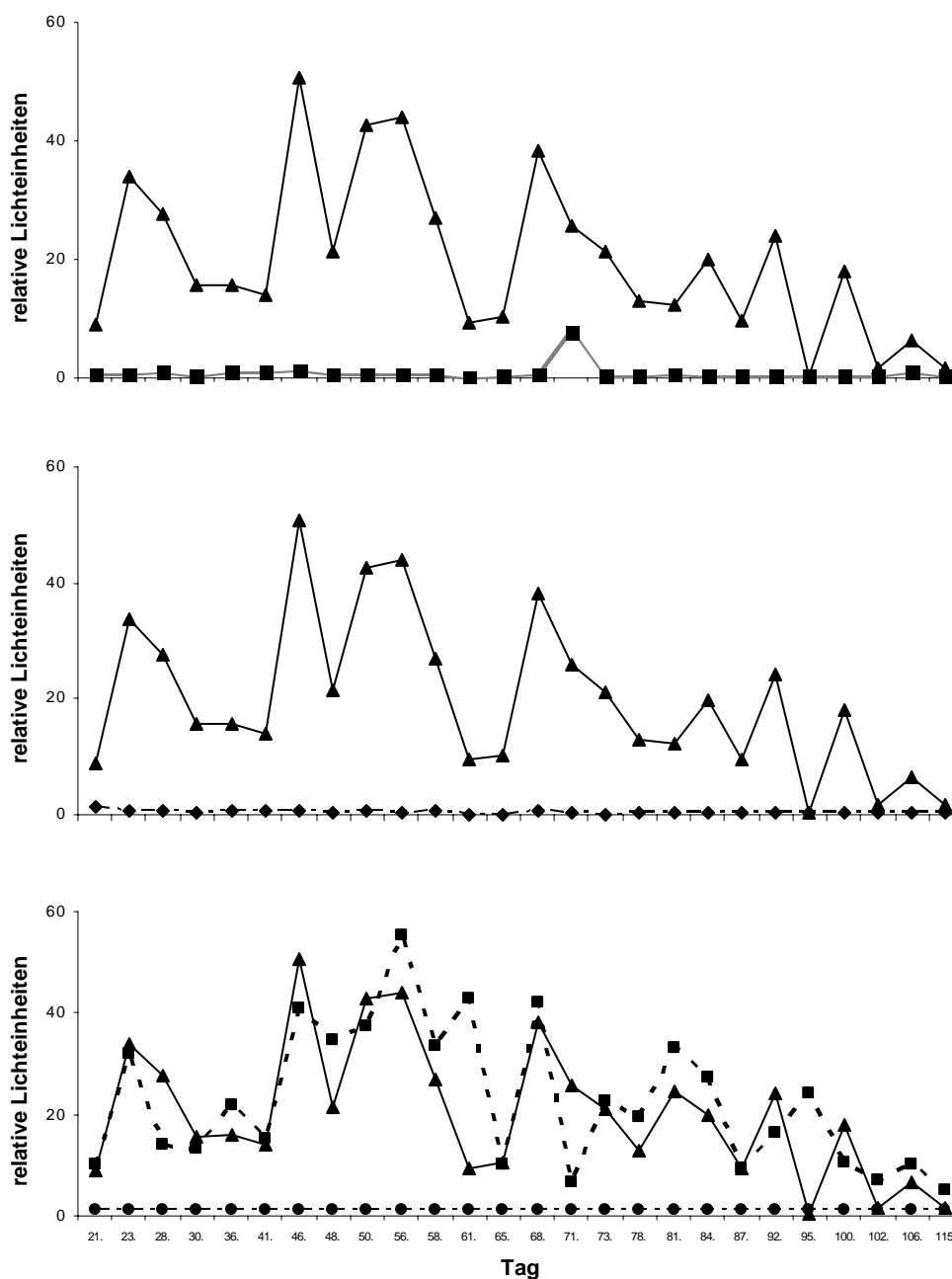


Abb. 10 Analyse der direkten Freisetzung von $O_2^{\cdot -}$ durch oxLDL in zellfreier Lösung und deren Hemmung über einen Zeitraum von 4 Monaten mit Hilfe des Chemilumineszenz-Farbstoffes L-012. Versuchsreihe *oben* (SOD+oxLDL302: —■—, oxLDL302: —▲—), *Mitte* (Tiron+oxLDL 302: - -◆- - , oxLDL302: —▲—) und *unten* (0-Kontrolle: - -●- - , oxLDL301: - -■- - , oxLDL302: —▲—). Dargestellt sind relative Lichteinheiten (RLU = Relative Light Units) in Abhängigkeit von den verwendeten Zusätzen, wobei Zellen, die ausschließlich mit L-012 inkubiert wurden, als 0-Kontrolle (= 1) definiert sind. Die x-Achse zeigt den Tag der Messung bezogen auf die Herstellung des oxidativ modifizierten LDL der Charge 301 (die Herstellung des oxLDL der Charge 302 erfolgte 3 Tage später).

4.4 Nachweis der oxLDL-induzierten Entstehung weiterer ROS-Untergruppen in zellfreier Lösung

In Anlehnung an 4.2 sollte mit diesem Versuch gezeigt werden, inwieweit es in zellfreier Lösung unter Zugabe von oxidiertem LDL zur Bildung weiterer ROS-Untergruppen kommt. Hierfür wurde der $O_2^{\cdot-}$ -unspezifische Fluoreszenz-Farbstoff $H_2DCF\text{-}DA$ ($5\ \mu\text{M}$) mit den Zusätzen versetzt und sofort mittels Multilabel Counter gemessen. Als Zusätze wurden oxLDL ($20\ \mu\text{g}/\text{ml}$; ox), nLDL ($20\ \mu\text{g}/\text{ml}$), Superoxiddismutase ($100\ \text{U}/\text{ml}$; SOD), Katalase ($100\ \text{U}/\text{ml}$; Kat.), Tiron ($10\ \text{mM}$) und DPI ($1\ \mu\text{M}$) eingesetzt.

Wie in *Abb. 11* zu sehen ist, kam es durch die Zugabe von nLDL zu keiner Veränderung gegenüber der 0-Kontrolle. Unter oxLDL entwickelte sich allerdings eine geringfügige Verstärkung des Signals für DCF, das unter dem Einfluss von Katalase und Katalase in Kombination mit SOD zusätzlich verstärkt wurde. Der Einsatz der Antioxidantien SOD, DPI und Tiron führte nur eingeschränkt zu einer Inhibition des Signals.

Somit ergaben sich keine neuen Aspekte für die extrazelluläre Bildung weiterer ROS-Untergruppen durch oxLDL.

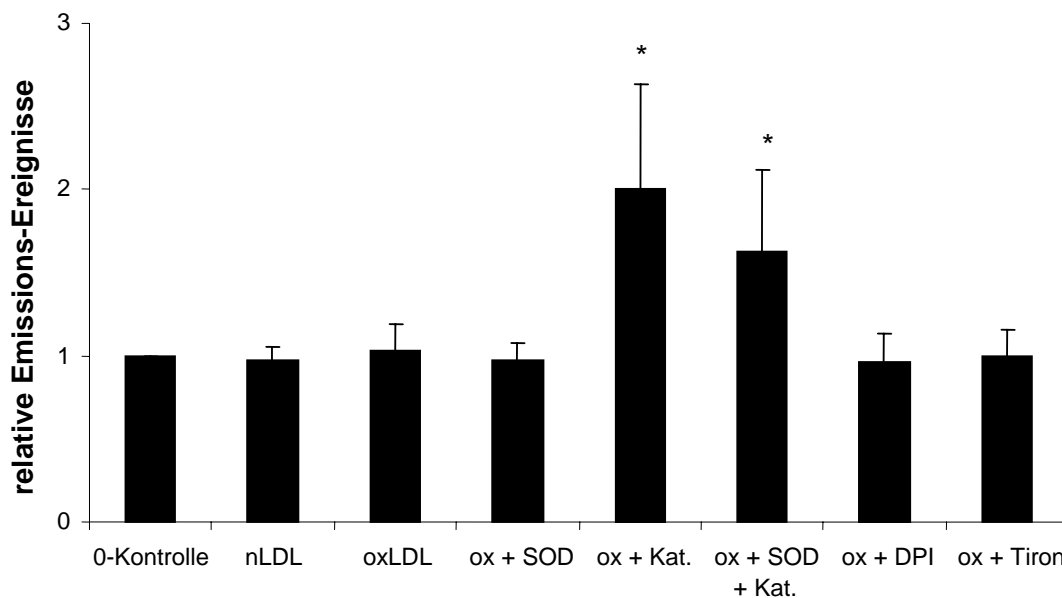


Abb. 11 Analyse des Einflusses verschiedener Antioxidantien auf die oxLDL-induzierte Bildung von ROS und deren Hemmung in zellfreier Lösung mit Hilfe des Fluoreszenz-Farbstoffes H₂DCF-DA im Multilabel Counter. Dargestellt sind relative Emissions-Ereignisse (Counts) in Abhängigkeit von den verwendeten Zusätzen, wobei Zellen, die ausschließlich mit H₂DCF-DA inkubiert wurden, als 0-Kontrolle (= 1) definiert sind. Die Ergebnisse setzen sich aus Mittelwert ± SEM zusammen. (n = 12)

4.5 Nachweis der Entstehung von oxidativem Stress in HUVEC durch extrazelluläre Stimulation mit O₂^{•-}

Mit Hilfe von gasdurchlässigen Filtern (Lumox-Schalen) sollte die Wirkung von extrazellulär freigesetzten O₂^{•-} auf die Entstehung von oxidativem Stress in der Zelle untersucht werden. Als Quelle diente zum einen oxLDL und zum anderen die extrazelluläre Oxidation von Xanthin durch die Xanthinoxidase. Der Versuchsaufbau bestand einerseits aus einer direkten Stimulation der Endothelzellen durch die O₂^{•-}-Produzenten und andererseits aus einer indirekten Stimulation über die Barriere des Filters für 48 Stunden. Die Stimulation erfolgte mit nLDL (50 µg/ml), oxLDL (50 µg/ml; ox) und Xanthin (100 µM; X) in Kombination mit Xanthinoxidase (0,0001 U/ml; XO).

Abb. 12 zeigt, dass die direkte Stimulation mit den Oxidantien X/XO und oxLDL zu einer verstärkten Oxidation von c-H₂DCF-DA (5 µM; FL 1) zu c-DCF führte. Mit der

indirekten Stimulation konnten diese Veränderungen nicht bestätigt werden, da die Fluoreszenzentwicklung durch X/XO und oxLDL nicht gesteigert, sondern reduziert wurde.

Da dieser Versuch keine neuen Erkenntnisse in Bezug auf die Entstehung und den Ursprung von oxidativem Stress in Abhängigkeit von oxLDL brachte, sollte dies im Folgenden durch eine weitere Methode näher untersucht werden.

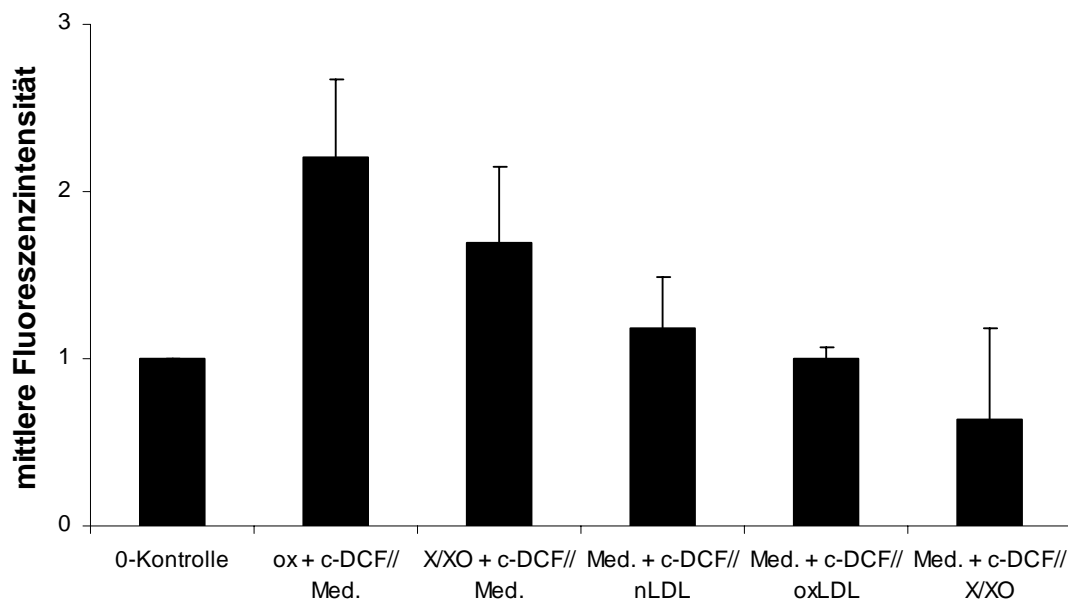


Abb. 12 Analyse der Freisetzung von ROS durch oxLDL und X/XO gemessen an der intrazellulären Fluoreszenzentwicklung des oxidierten Farbstoffes c-DCF im FACS. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (Mean) in Filter 1 in Abhängigkeit von den verwendeten Zusätzen, wobei Zellen, die ausschließlich mit c-H₂DCF-DA (= c-DCF) direkt und mit Medium (Med.) indirekt stimuliert wurden, als 0-Kontrolle (= 1) definiert sind. Die Beschriftung der x-Achse versteht sich wie folgt: direkte Stimulation (über dem Filter) // indirekte Stimulation (unter dem Filter). Die Ergebnisse setzen sich aus Mittelwert ± SEM zusammen (n = 3).

4.6 Nachweis der reduzierten Aufnahme von oxLDL in HUVEC bei 4°C

Mit der Durchführung dieser Versuchsreihe wurde eine Methode angewandt, die das Prinzip der Lumox-Schalen (vgl. 4.5) aufgreift und umsetzt. Dadurch, dass die Proben bei 4°C inkubiert und behandelt wurden, sollte die Aufnahme von oxLDL weitestgehend verhindert werden. Somit war eine direkte Internalisierung des oxidierten LDL ausgeschlossen, wodurch die Beziehung zwischen der extrazellulären $O_2^{\bullet-}$ -Freisetzung durch oxLDL und der dadurch bedingten Bildung von oxidativem Stress in HUVEC näher untersucht werden konnte. Als Grundlage wurden Versuche bei 37°C und 4°C durchgeführt, für die HUVEC mit 20 µg/ml DiI-oxLDL (FL 2) für 24 h inkubiert wurden.

Abb. 13 zeigt, dass es im Gegensatz zu 37°C bei 4°C zu einem starken Abfall des Signals kam (99 %), was die fehlende Aufnahmebereitschaft der Endothelzellen für DiI-oxLDL zeigte.

Darauf aufbauend sollte im Weiteren die intrazelluläre Entstehung von oxidativem Stress bei blockierter Aufnahme des $O_2^{\bullet-}$ -freisetzenden oxLDL untersucht werden.

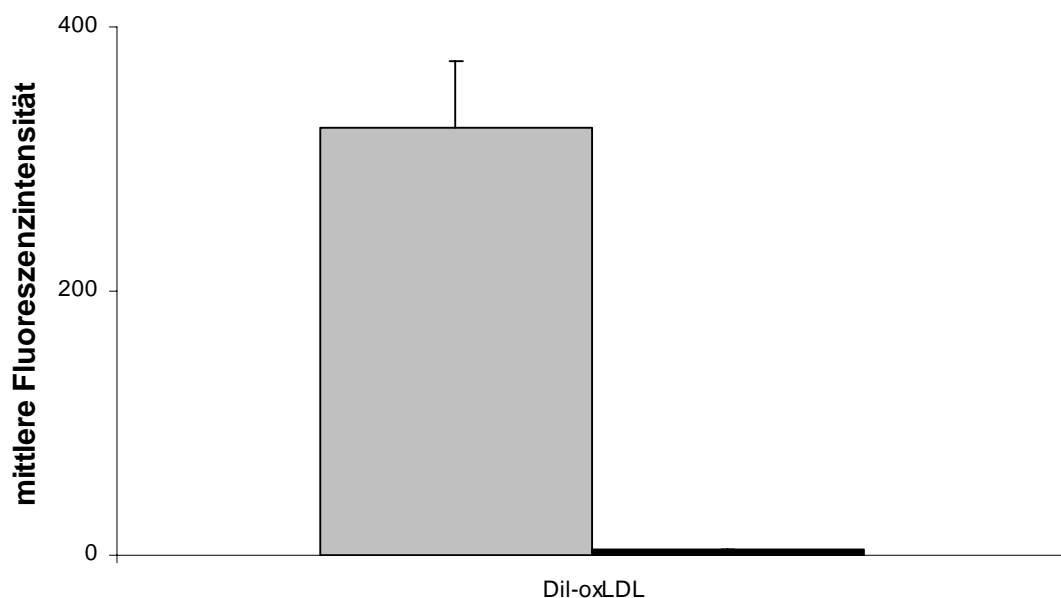


Abb. 13 Analyse der Aufnahmefähigkeit von HUVEC für DiI-oxLDL im Vergleich bei 37°C und 4°C mittels FACS. Versuchsreihe bei 37°C (grau) und 4°C (schwarz). Dargestellt ist die mittlere

Fluoreszenzintensität (Mean) in Filter 2 in Abhängigkeit von den verwendeten Zusätzen. Die Ergebnisse setzen sich aus Mittelwert \pm SEM zusammen (n = 4).

4.7 Nachweis der oxLDL-induzierten Bildung von oxidativem Stress in HUVEC bei 4°C

Nachdem ein Versuchsaufbau gefunden worden war, durch den die Aufnahme von oxLDL in Endothelzellen bei 4°C nahezu aufgehoben werden konnte, sollte die Verbindung der durch oxLDL extrazellulär freigesetzten $O_2^{\cdot-}$ und des intrazellulär entstandenen oxidativen Stress untersucht werden. Dazu wurden HUVEC mit nLDL (20 $\mu\text{g/ml}$) und oxLDL (20 $\mu\text{g/ml}$) für 24 h inkubiert und mit den Farbstoffen DHE (5 μM ; FL 2) und c-H₂DCF-DA (20 μM ; FL 1) für die durchflusszytometrische Messung markiert.

Zur Veranschaulichung der Daten sind in den **Abb. 14** und **15** Histogramme der FACS-Messungen von oxLDL 20 $\mu\text{g/ml}$ mit c-H₂DCF-DA (20 μM) bei 37°C und 4°C abgebildet. In beiden Darstellungen war eine Verteilung mit zwei Maxima zu beobachten. Die Ergebnisse der Fluoreszenzentwicklung für c-H₂DCF-DA zeigen (siehe **Abb. 16**), dass sich bei 4°C bereits ohne Zugabe von oxLDL zu den Proben ein deutlich höheres Signal entwickelte als bei 37°C. Durch die Zugabe von oxLDL konnte eine weitere Verstärkung der Signale beider Versuchsproben ausgelöst werden.

In weiteren Versuchen wurden ansteigende Konzentrationen von oxLDL eingesetzt, um die dadurch induzierte Bildung von oxidativem Stress zu untersuchen. Die Zellen wurden hierfür mit oxLDL-Konzentrationen von 10 bis 200 $\mu\text{g/ml}$ (ox 10 – 200) inkubiert. Für die Messungen im FACS wurden die fluoreszenzmarkierten Farbstoffe c-H₂DCF-DA (20 μM ; FL 1) und DHE (5 μM ; FL 2) eingesetzt. Die **Abb. 17** und **18** verdeutlichen, dass es bei 37°C mit zunehmenden Konzentrationen zu einem deutlichen Anstieg der Signale für c-DCF und einem tendenziellen Abfall für Oxyethidin gegenüber nLDL und der 0-Kontrolle kam. Für die Messungen bei 4°C zeigten sich ähnliche Tendenzen mit einem deutlichen Abfall des Signals für Oxyethidin.

Aufgrund der Tatsache, dass allein die Durchführung der Versuche bei 4°C eine deutliche Verstärkung des ROS-spezifischen Signals bedeutete, sollten die weiteren Untersuchungen unter Einsatz eines neuen Zelltyps fortgeführt werden.

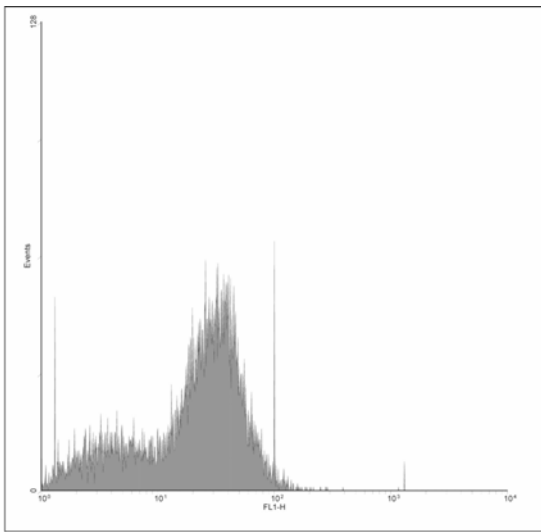


Abb. 14 Histogramm der Verteilung von HUVEC bei 37°C mit oxLDL 20 µg/ml und c-H₂DCF-DA (20 µM) für 24 h. Dargestellt sind Events ohne Gate in Filter 1 mit einer mittleren Fluoreszenzintensität (Mean) von 29,10. Ordinate: 0 – 128, Abszisse: 10⁰ - 10⁴.

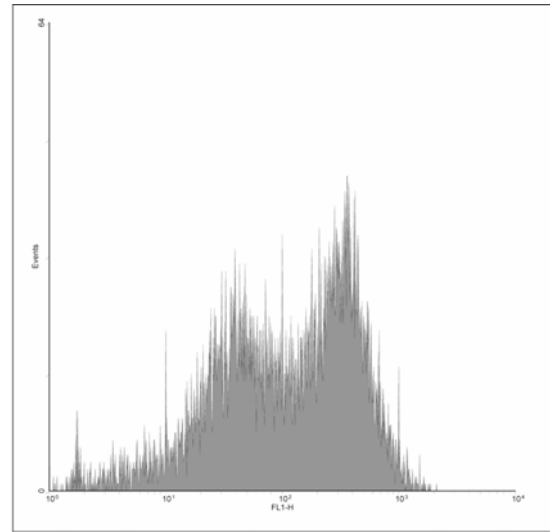


Abb. 15 Histogramm der Verteilung von HUVEC bei 4°C mit oxLDL 20 µg/ml und c-H₂DCF-DA (20 µM) für 24 h. Dargestellt sind Events ohne Gate in Filter 1 mit einer mittleren Fluoreszenzintensität (Mean) von 207,78. Ordinate: 0 – 64, Abszisse: 10⁰ - 10⁴.

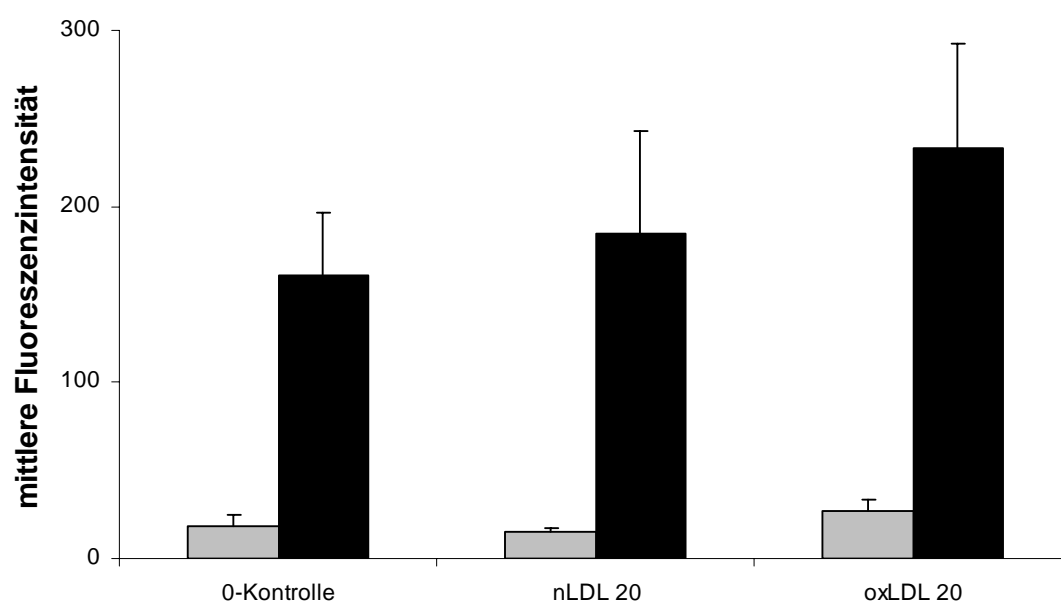


Abb. 16 Analyse der Bildung von ROS in HUVEC unter Zugabe von oxLDL bei 37°C und 4°C mittels Oxidation von c-H₂DCF-DA im FACS. Versuchsreihe bei 37°C (grau) und 4°C (schwarz). Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (Mean) in Filter 1 in Abhängigkeit von den verwendeten Zusätzen, wobei Zellen, die ausschließlich mit c-H₂DCF-DA inkubiert wurden, als 0-Kontrolle definiert sind. In diesem Fall wurde auf die Bereinigung der Daten durch die 0-Kontrolle verzichtet, um die Unterschiede der Messwerte zwischen 37°C und 4°C besser zu veranschaulichen. Die Ergebnisse setzen sich aus Mittelwert ± SEM zusammen (n = 4).

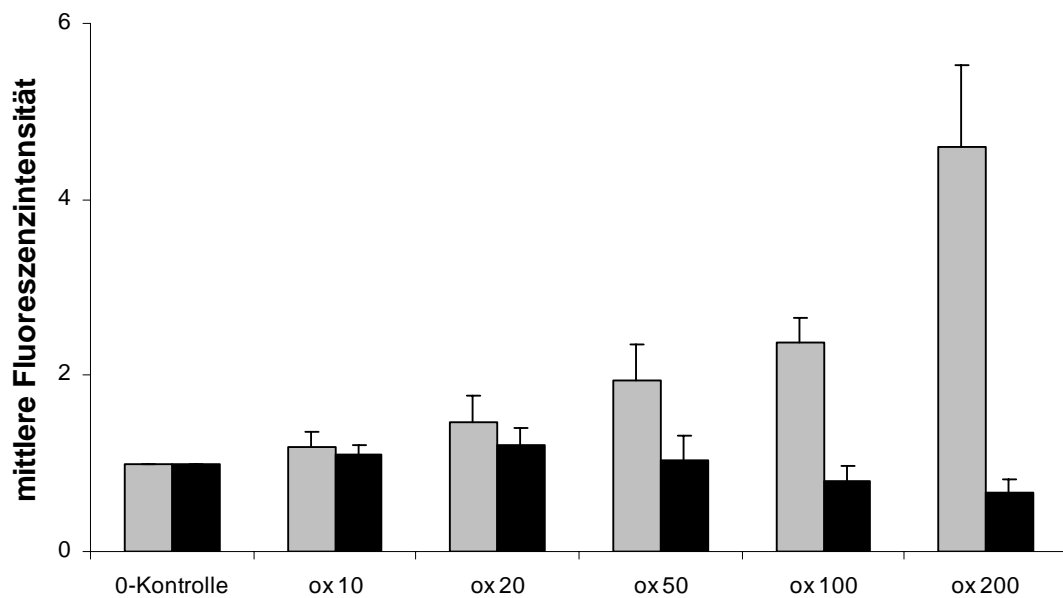


Abb. 17 Analyse der Bildung von ROS in HUVEC durch Stimulation mit steigenden Konzentrationen von oxLDL bei 37°C und 4°C mittels Oxidation von c-H₂DCF-DA im FACS. Versuchsreihe bei 37°C (grau) und 4°C (schwarz). Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (Mean) in Filter 1 in Abhängigkeit von den verwendeten Zusätzen, wobei Zellen, die ausschließlich mit c-H₂DCF-DA inkubiert wurden, als 0-Kontrolle (= 1) definiert sind. Die Ergebnisse setzen sich aus Mittelwert ± SEM zusammen (n = 4).

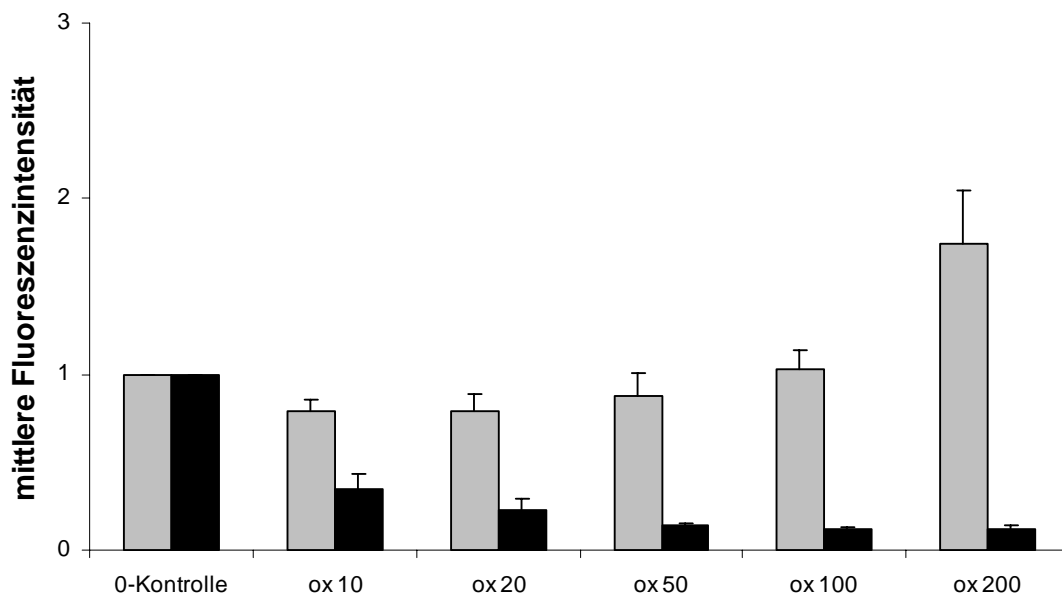


Abb. 18 Analyse der Bildung von ROS in HUVEC durch Stimulation mit steigenden Konzentrationen von oxLDL bei 37°C und 4°C mittels Oxidation von DHE im FACS. Versuchsreihe bei 37°C (grau) und 4°C (schwarz). Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (Mean) in Filter 2 in Abhängigkeit von den verwendeten Zusätzen, wobei Zellen, die ausschließlich mit DHE inkubiert wurden, als 0-Kontrolle (= 1) definiert sind. Die Ergebnisse setzen sich aus Mittelwert \pm SEM zusammen (n = 4).

4.8 Nachweis der reduzierten Aufnahmefähigkeit für oxLDL in CASMC

Aufgrund eines Mangels an neuen Erkenntnissen durch die Versuche mit Endothelzellen wurde mit dem Einsatz von glatten Muskelzellen (CASMC) ein Zelltyp herangezogen, der einen weiteren wichtigen Bestandteil der humanen Gefäßwand darstellt und für den ebenfalls die Aufnahmefähigkeit für oxLDL in der Literatur beschrieben ist. [Yla-Herttuala, S. - 1996]

Als Grundlage sollte der Nachweis der oxLDL-Aufnahme in CASMC im vgl. zu HUVEC erbracht werden, um in weiteren Versuchen oxLDL-induzierte Bildung intrazellulärer ROS zu untersuchen. Hierzu wurden die Zellen für 4 h mit DiI-oxLDL (10-200 $\mu\text{g/ml}$; FL 2; DiI-ox 10 – 200) markiert und im Durchflusszytometer gemessen.

Speziell die Messung von DiI-oxLDL 100 µg/ml ist in den **Abb. 19, 20** und **21** für HUVEC und CASMC mit und ohne Gate gezeigt, um die Auswirkung des Gates auf die Ergebnisse zu veranschaulichen. Hierbei zeigte sich, dass der Anteil der toten Zellen bei HUVEC vernachlässigbar gering und somit der Einsatz eines Gates nicht von Nöten war. Für die CASMC ergab sich jedoch eine große Population an toten Zellen, die durch das Anlegen eines Gates entfernt werden konnte.

Ursprünglich war geplant, die Versuche bei 37°C und 4°C durchzuführen (vgl. 4.7), jedoch zeichnete sich bereits bei der Durchführung bei 37°C (siehe **Tab. 3** und **Abb. 22**) ab, dass es in den glatten Muskelzellen trotz ansteigender Konzentration von DiI-oxLDL zu einem Abfall des Signals um durchschnittlich 92 % kam, wohingegen die Fluoreszenzentwicklung in den Endothelzellen im Verlauf stetig zunahm.

Aufgrund des fehlenden Signals für oxLDL in CASMC sollte nun nachgewiesen werden, inwieweit es durch Stimulation mit oxidativ modifiziertem LDL zur intrazellulären Bildung von ROS in CASMC kommt.

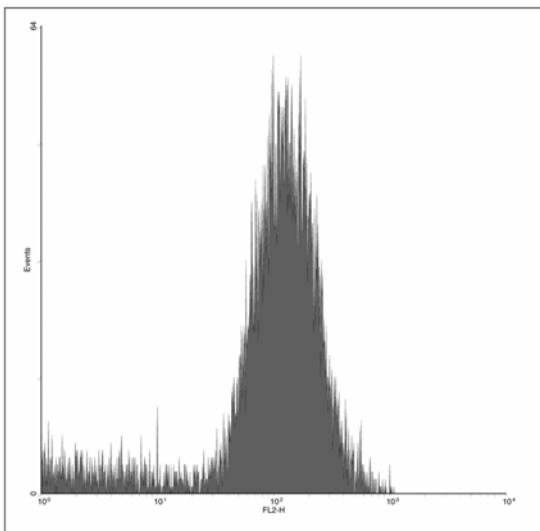


Abb. 19 Histogramm der Verteilung von HUVEC mit DiI-oxLDL 100 µg/ml für 4 h. Dargestellt sind Events **ohne Gate** in Filter 2 mit einer mittleren Fluoreszenzintensität (Mean) von 128,25. Ordinate: 0 – 64, Abszisse: 10^0 - 10^4 .

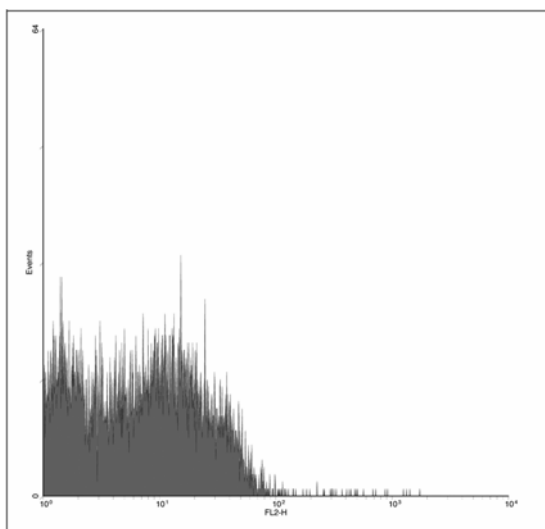


Abb. 20 Histogramm der Verteilung von CASMC mit DiI-oxLDL 100 µg/ml für 4 h. Dargestellt sind Events **ohne Gate** in Filter 2 mit einer mittleren Fluoreszenzintensität (Mean) von 10,40. Ordinate: 0 – 64, Abszisse: $10^0 - 10^4$.

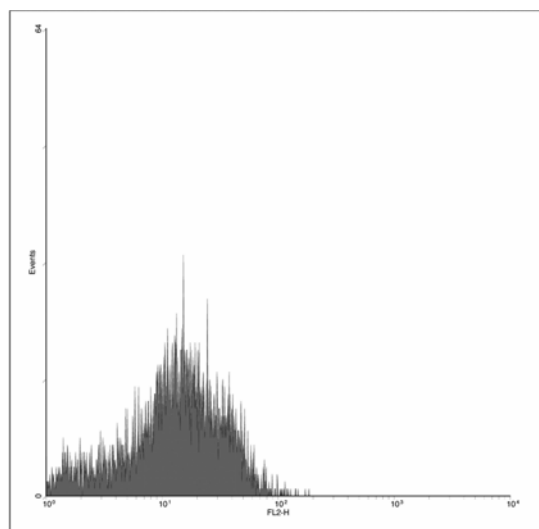


Abb. 21 Histogramm der Verteilung von CASMC mit DiI-oxLDL 100 µg/ml für 4 h. Dargestellt sind Events **mit Gate** in Filter 2 mit einer mittleren Fluoreszenzintensität (Mean) von 16,88. Ordinate: 0 – 64, Abszisse: $10^0 - 10^4$.

FL 2	CASMC		HUVEC
	mit Gate	ohne Gate	ohne Gate
0 - Kontrolle	1,00	1,00	1,00
« + DiI-oxLDL 10 µg/ml	1,40	1,28	12,25
« + DiI-oxLDL 20 µg/ml	1,30	1,22	15,24
« + DiI-oxLDL 50 µg/ml	1,65	1,62	18,90
« + DiI-oxLDL 100 µg/ml	1,49	1,46	24,24
« + DiI-oxLDL 200 µg/ml	2,05	2,36	29,86

Tab. 3 Vergleich der arithmetischen Mittelwerte für CASMC und HUVEC in Filter 2 (FL 2)

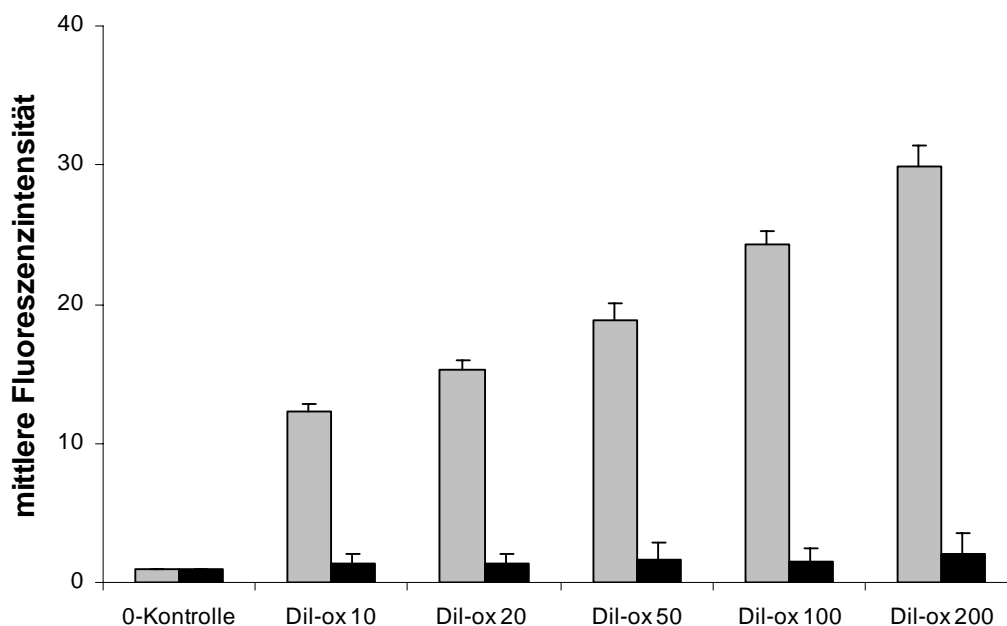


Abb. 22 Analyse der Aufnahmefähigkeit von HUVEC und CASMC für DiI-oxLDL mittels FACS. Versuchsreihe mit HUVEC (grau) und CASMC (schwarz). Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (Mean) in Filter 2 in Abhängigkeit von den verwendeten Zusätzen, wobei Zellen, die nicht mit DiI-markiertem oxLDL inkubiert wurden, als 0-Kontrolle (= 1) definiert sind. Die Ergebnisse setzen sich aus Mittelwert \pm SEM zusammen ($n_{\text{HUVEC}} = 3$, $n_{\text{CASMC}} = 4$).

4.9 Nachweis der oxLDL-induzierten Bildung von ROS in CASMC

Somit war ein ideales Werkzeug gefunden, um bei eingeschränkter Aufnahmebereitschaft für oxLDL die Bildung von ROS in glatten Muskelzellen zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden die Zellen für 4 h mit ansteigenden Konzentrationen von oxLDL (10-200 $\mu\text{g/ml}$; ox 10 – 200) stimuliert und die Fluoreszenzentwicklung von c-H₂DCF-DA (20 μM ; FL 1) und DHE (5 μM ; FL 2) im FACS gemessen.

Zur Veranschaulichung der Ergebnisse zeigen die **Abb. 23** und **24** Histogramme der Messungen von oxLDL 20 $\mu\text{g/ml}$ mit c-H₂DCF-DA (20 μM) in Filter 1 und die **Abb. 26** und **27** oxLDL 20 $\mu\text{g/ml}$ mit DHE (5 μM) in Filter 2 für HUVEC und CASMC. Für HUVEC zeigte sich in beiden Fällen ein Maximum des Fluoreszenzsignals, wohingegen für CASMC sowohl in Filter 1 als auch in Filter 2 zwei Maxima unterschiedlicher Fluoreszenzintensität erkennbar waren.

Im direkten Vergleich beider Zelltypen (siehe **Abb. 25 / 26** und **Tab. 4 / 5**) ergab sich für HUVEC ein stetiger Anstieg des c-DCF-Signals und eine tendenzielle muldenförmige Abnahme der Oxidation von DHE unterhalb des Niveaus der 0-Kontrolle. Die Versuche mit CASMC erbrachten identische Ergebnisse, wobei deren Signalniveau stets das der HUVEC überstieg.

Um die für den c-DCF-Anstieg verantwortlichen intrazellulären ROS-Untergruppen näher zu identifizieren, wurde ein Versuch mit dem Einsatz verschiedener Antioxidantien angeschlossen.

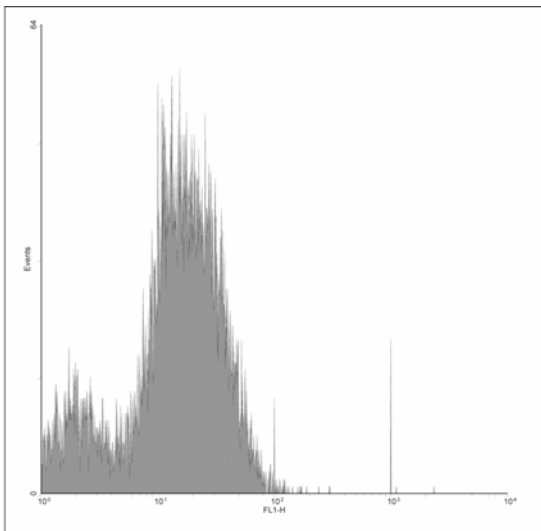


Abb. 23 Histogramm der Verteilung von HUVEC mit oxLDL 20 µg/ml und c-H₂DCF-DA (20 µM) für 4 h. Dargestellt sind Events **ohne Gate** in Filter 1 mit einer mittleren Fluoreszenzintensität (Mean) von 21,09. Ordinate: 0 – 64, Abszisse: 10⁰ - 10⁴.

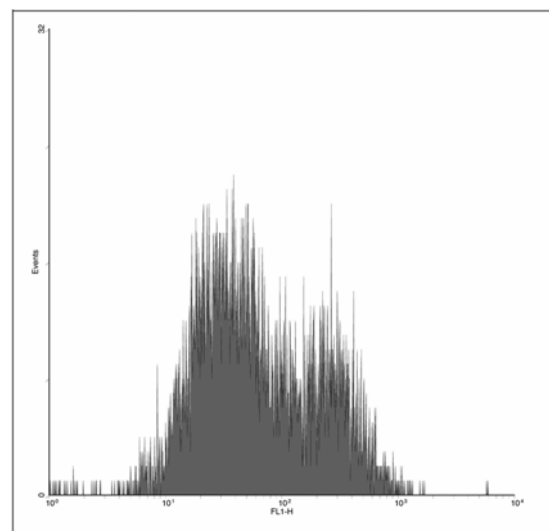


Abb. 24 Histogramm der Verteilung von CASMC mit oxLDL 20 µg/ml und c-H₂DCF-DA (20 µM) für 4 h. Dargestellt sind Events **mit Gate** in Filter 1 mit einer mittleren Fluoreszenzintensität (Mean) von 125,51. Ordinate: 0 – 64, Abszisse: 10⁰ - 10⁴.

FL 1	CASMC		HUVEC
	mit Gate	ohne Gate	ohne Gate
c-H ₂ DCF-DA 20µM	1,00	1,00	1,00
« + oxLDL 10 µg/ml	1,77	1,67	1,43
« + oxLDL 20 µg/ml	2,46	2,26	1,58
« + oxLDL 50 µg/ml	4,66	4,11	3,16
« + oxLDL 100 µg/ml	8,01	6,96	4,41
« + oxLDL 200 µg/ml	11,36	8,91	10,59

Tab. 4 Vergleich der arithmetischen Mittelwerte für CASMC und HUVEC in Filter 1 (FL 1)

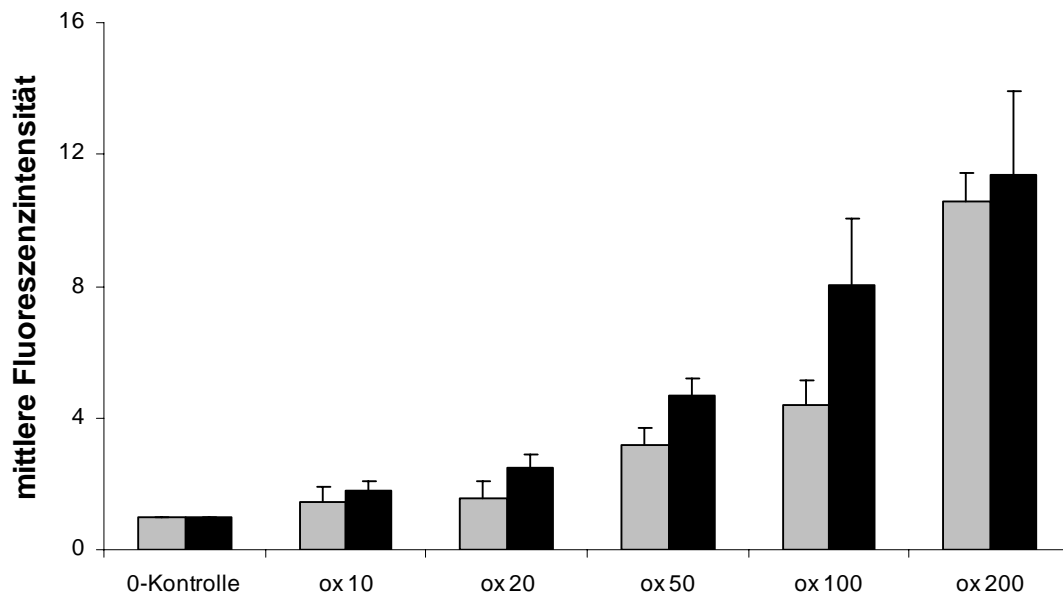


Abb. 25 Analyse der Bildung von ROS in HUVEC und CASMC durch Stimulation mit steigenden Konzentrationen von oxLDL mittels Oxidation von c-H₂DCF-DA im FACS. Versuchsreihe mit HUVEC (grau) und CASMC (schwarz). Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (Mean) in FL 1 in Abhängigkeit von den verwendeten Zusätzen, wobei Zellen, die ausschließlich mit c-H₂DCF-DA inkubiert wurden, als 0-Kontrolle (= 1) definiert sind. Die Ergebnisse setzen sich aus Mittelwert ± SEM zusammen ($n_{\text{HUVEC}} = 3$, $n_{\text{CASMC}} = 4$).

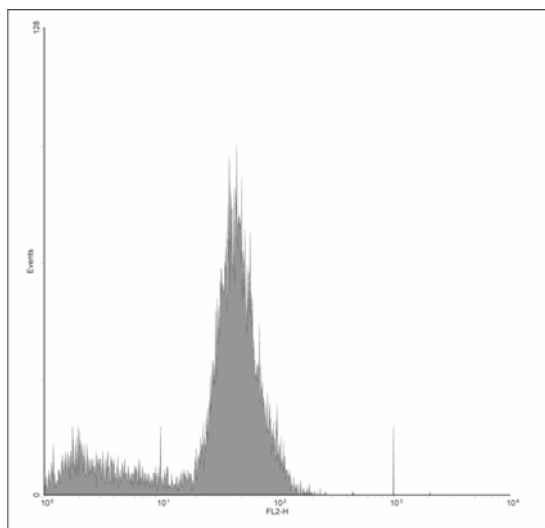


Abb. 26 Histogramm der Verteilung von HUVEC mit oxLDL 20 µg/ml und DHE (5 µM) für 4 h. Dargestellt sind Events ohne Gate in Filter 2 mit einer mittleren Fluoreszenzintensität (Mean) von 42,64. Ordinate: 0 – 128, Abszisse: $10^0 - 10^4$.

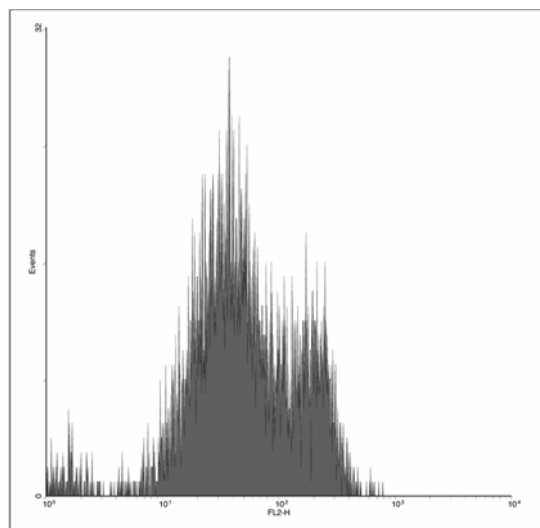


Abb. 27 Histogramm der Verteilung von CASMC mit oxLDL 20 µg/ml und DHE (5 µM) für 4 h. Dargestellt sind Events mit Gate in Filter 2 mit einer mittleren Fluoreszenzintensität (Mean) von 81,48. Ordinate: 0 – 32, Abszisse: $10^0 - 10^4$.

FL 2	CASMC		HUVEC
	mit Gate	ohne Gate	ohne Gate
DHE 5µM	1,00	1,00	1,00
« + oxLDL 10 µg/ml	0,81	0,79	0,53
« + oxLDL 20 µg/ml	0,83	0,81	0,47
« + oxLDL 50 µg/ml	0,84	0,80	0,44
« + oxLDL 100 µg/ml	0,90	0,85	0,46
« + oxLDL 200 µg/ml	0,95	0,83	0,55

Tab. 5 Vergleich der arithmetischen Mittelwerte für CASMC und HUVEC in Filter 2 (FL 2)

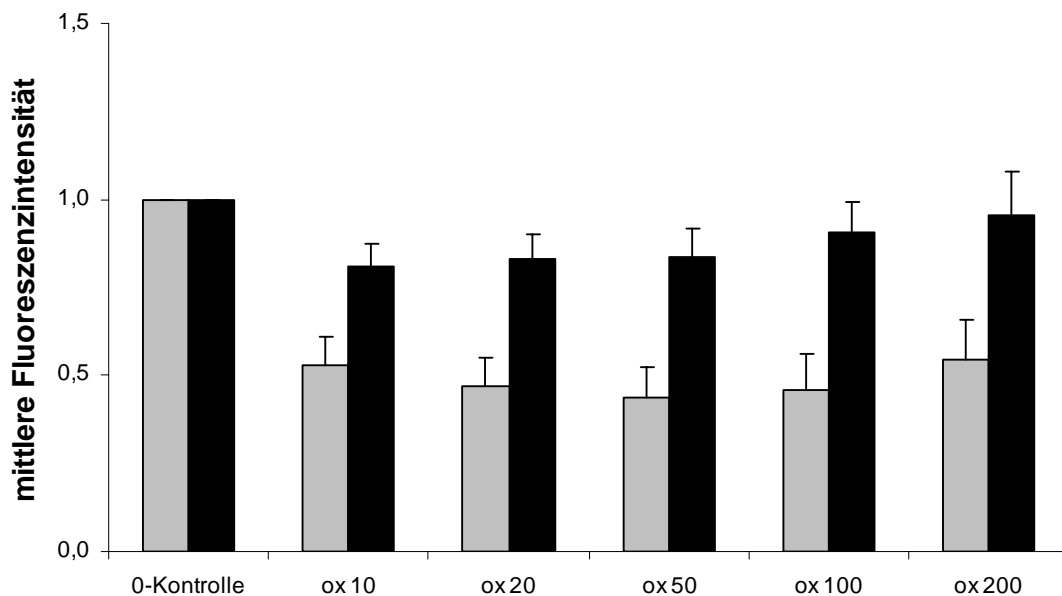


Abb. 28 Analyse der Bildung von ROS in HUVEC und CASMC durch Stimulation mit steigenden Konzentrationen von oxLDL mittels Oxidation von DHE im FACS. Versuchsreihe mit HUVEC (grau) und CASMC (schwarz). Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (Mean) in Filter 2 in Abhängigkeit von den verwendeten Zusätzen, wobei Zellen, die ausschließlich mit DHE inkubiert wurden, als 0-Kontrolle (= 1,0) definiert sind. Die Ergebnisse setzen sich aus Mittelwert \pm SEM zusammen ($n_{\text{HUVEC}} = 3$, $n_{\text{CASMC}} = 4$).

4.10 Nachweis der oxLDL-induzierten Bildung verschiedener ROS-Untergruppen und deren Hemmung in CASMC

Nachdem in **Abb. 25** gezeigt werden konnte, dass es zur Bildung von ROS durch oxLDL kommt, sollten durch die Inhibition mit verschiedenen Antioxidantien die Untergruppen identifiziert werden. Für diesen Nachweis wurden die Zellen mit oxLDL (20 $\mu\text{g/ml}$), c-H₂DCF-DA (20 μM ; FL 1), DHE (5 μM ; FL 2) und folgenden antioxidativen Substanzen für 1 h inkubiert: Katalase (400 U/ml; Kat.) und Superoxiddismutase (100 U/ml; SOD).

Wie in den **Abb. 29** (siehe **Tab. 6**) und **30** (siehe **Tab. 7**) zu sehen ist, kam es unter oxLDL zu einem Anstieg des Signals für c-DCF und zu einem Abfall für Oxyethidin.

Eine Inhibition dieser beiden Signale durch die Zugabe der polyethylenglykolgekoppelten Enzyme SOD und Katalase konnte nicht nachgewiesen werden.

Somit konnten die durch die Stimulation mit extrazellulärem oxLDL entstandenen ROS nicht näher identifiziert werden.

FL 1	CASMC		HUVEC
	mit Gate	ohne Gate	ohne Gate
c-H ₂ DCF-DA 20µM	1,00	1,00	1,00
« + oxLDL	2,37	2,28	1,67
« + oxLDL + Kat.	2,43	2,34	1,64
« + oxLDL + SOD	2,25	2,17	1,68
« + oxLDL + SOD + Kat.	2,33	2,23	1,65

Tab. 6 Vergleich der arithmetischen Mittelwerte für CASMC und HUVEC in Filter 1 (FL 1)

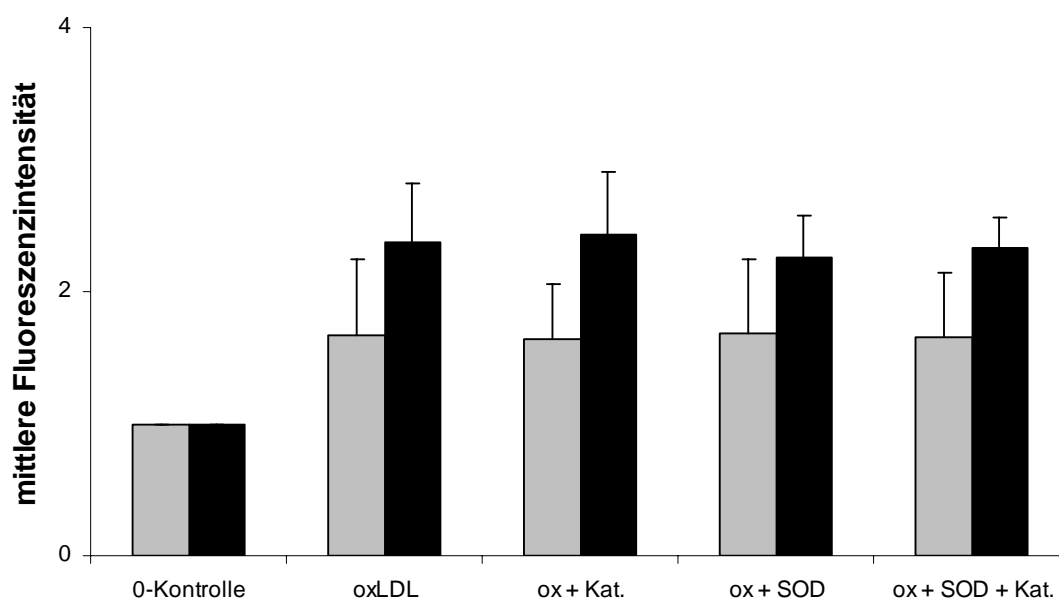


Abb. 29 Analyse der Hemmung von ROS in HUVEC und CASMC durch Antioxidantien mittels Oxidation von c-H₂DCF-DA im FACS. Versuchsreihe mit HUVEC (grau) und CASMC (schwarz). Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (Mean) in Filter 1 in Abhängigkeit von den verwendeten Zusätzen, wobei Zellen, die ausschließlich mit c-H₂DCF-DA inkubiert wurden, als 0-Kontrolle (= 1) definiert sind. Die Ergebnisse setzen sich aus Mittelwert ± SEM zusammen ($n_{HUVEC} = 6$, $n_{CASMC} = 6$).

FL 2	CASMC		HUVEC
	mit Gate	ohne Gate	ohne Gate
DHE 5 μ M	1,00	1,00	1,00
« + oxLDL	0,77	0,76	0,65
« + oxLDL + Kat.	0,78	0,76	0,64
« + oxLDL + SOD	0,74	0,73	0,63
« + oxLDL + SOD + Kat.	0,74	0,72	0,62

Tab. 7 Vergleich der arithmetischen Mittelwerte für CASMC und HUVEC in Filter 2 (FL 2)

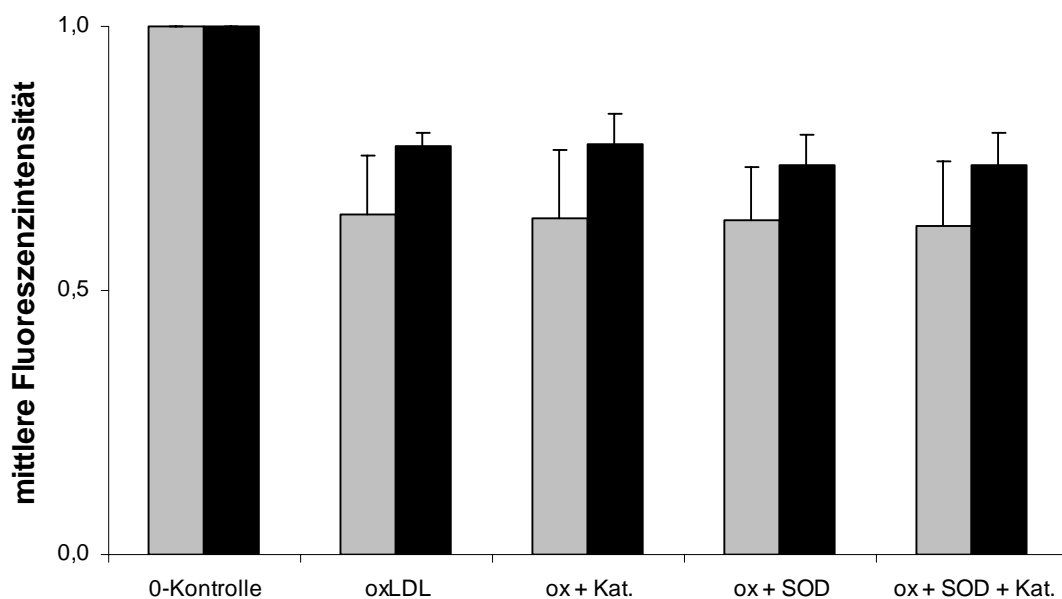


Abb. 30 Analyse der Hemmung von ROS in HUVEC und CASMC durch Antioxidantien mittels Oxidation von DHE im FACS. Versuchsreihe mit HUVEC (grau) und CASMC (schwarz). Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (Mean) in Filter 2 in Abhängigkeit von den verwendeten Zusätzen, wobei Zellen, die ausschließlich mit DHE inkubiert wurden, als 0-Kontrolle (= 1,0) definiert sind. Die Ergebnisse setzen sich aus Mittelwert \pm SEM zusammen ($n_{\text{HUVEC}} = 6$, $n_{\text{CASMC}} = 6$).

5 Diskussion

Die Entstehung von oxidativem Stress ist ein wichtiger Bestandteil des menschlichen Immunsystems. Kommt es jedoch zu einem Ungleichgewicht zugunsten der Bildung von ROS, wird die Entstehung von Atherosklerose unterstützt. Hierbei ist oxLDL als einer der wichtigsten Bestandteile der Induktion von intrazellulärem oxidativen Stress zu nennen.

Ein Mechanismus, über den oxLDL die Entstehung von intrazellulärem oxidativem Stress induziert, wird in der Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase gesehen. Bisher ist es jedoch unklar, inwieweit diese vermutete Aktivierung einen relevanten Stellenwert in der Entstehung von ROS hat. Zusätzlich wird jedoch auch eine direkte extrazelluläre Freisetzung von $O_2^{\cdot -}$ durch oxLDL vermutet, die dann letztendlich die Entstehung von oxidativem Stress mit sich bringt.

5.1 Die Bedeutung der NAD(P)H-Oxidase für die oxLDL-induzierte Entstehung von oxidativem Stress

Zur Untersuchung des Zusammenhanges zwischen der Aufnahme von oxLDL und der Entstehung von intrazellulärem oxidativem Stress durch die Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase erfolgte die Überprüfung des folgenden Modells: Das oxidativ modifizierte low density lipoprotein (oxLDL) induziert über den LOX-1-Rezeptor vermittelt die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies durch die Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase in Endothelzellen. [Rueckschloss, U. - 2001 // Zhang, T. - 2006]

Um diese Verbindung nachzuweisen, wurde zu Beginn der Arbeit die Beteiligung des LOX-1-Rezeptors an der Aufnahme von oxLDL in die Zelle näher untersucht, indem durch den Einsatz von LOX-1 siRNA die Expression des Rezeptors auf Endothelzellen reduziert wurde. Die Messung war durch die Markierung von oxLDL mit dem Farbstoff DiI möglich, der nachweislich an oxLDL gebunden in die Zelle aufgenommen wird. [Smirnova, I. V. - 2004] Anhand der intrazellulären Fluoreszenzentwicklung konnte das Ausmaß der Aufnahme von oxLDL durch FACS-Messungen bestimmt werden. Dabei zeigte sich, dass durch die Transfektion mit LOX-1 siRNA die Aufnahme

lediglich um 20 % reduziert werden konnte (siehe **Abb. 6**). Eine ausschlaggebende Beteiligung des LOX-1-Rezeptors an der Aufnahme von oxLDL in die Endothelzelle konnte aufgrund des geringen Signalabfalles somit nicht bestätigt werden. Ebenso konnte, unter Verwendung des Fluoreszenzfarbstoffes c-H₂DCF-DA, bei verminderter Expression des LOX-1-Rezeptors nur eine geringe Reduktion des ROS-spezifischen Signals (siehe **Abb. 7**) erreicht werden, das den oxidativen Status der Zelle repräsentiert. Diese Ergebnisse könnten einerseits ein Hinweis dafür sein, dass der LOX-1-Rezeptor hingegen der bisherigen Annahme nur geringfügig an der Aufnahme von oxLDL in die Zelle beteiligt ist. Zudem scheint die oxLDL-induzierte intrazelluläre Bildung von ROS unabhängig von der Aufnahme über diesen Rezeptor stattzufinden, da durch die verminderte Rezeptorexpression kaum eine Veränderung des intrazellulären oxidativen Stresses nachzuweisen war. Somit konnte keine eindeutige Beziehung zwischen der Aufnahme von oxLDL über den LOX-1-Rezeptor und der anschließenden Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase nachgewiesen werden, wodurch das Ausgangsmodell in Frage zu stellen ist.

Da nun gezeigt wurde, dass der LOX-1-Rezeptor vermutlich nur eine untergeordnete Rolle für die oxLDL-Aufnahme spielt, wurden Versuchsreihen durchgeführt, die die Aufnahmefähigkeit von Endothelzellen im Vergleich zu CASMC für oxLDL näher untersuchten. Wie bereits unter 1.1.3 beschrieben, spielen die Schaumzellen eine Schlüsselrolle in der Entwicklung der Atherosklerose. Aus der Literatur geht hervor, dass diese zu 30 % aus Makrophagen und zu 45 % aus glatten Muskelzellen gebildet werden, wobei letztere die Lipoproteine über vier Rezeptoren aufnehmen und akkumulieren können: LDL-, VLDL-, LPR- (LDL-related protein) und Scavenger-Rezeptoren. [**Ruan, X. Z.** - 2006 // **Yla-Herttuala, S.** - 1996] Einerseits konnte gezeigt werden, dass eine Durchführung der Versuche bei 4°C zu einer reduzierten Aufnahme von oxLDL in HUVEC führt. Andererseits war allein durch die Versuchsbedingungen ein großes Maß an oxidativem Stress in der Zelle nachweisbar, so dass eine Interpretation der Versuchsergebnisse nicht möglich war.

In den Versuchsreihen mit CASMC konnte hingegen aller Erwartungen keine bedeutende Aufnahme von oxLDL nachgewiesen werden (siehe **Abb. 22**). Dies deckt sich mit anderen Untersuchungen, die eine geringe Expression der Rezeptoren für

oxLDL auf glatten Muskelzellen beschrieben haben und zeigten, dass es sich bei den akkumulierten Lipoproteinen um nicht modifizierte Lipoproteine handelt, die über eine Dysregulation des LDL-Rezeptors durch $\text{Il-1 } \beta$ internalisiert werden können. [Argmann, C. A. - 2004 // Ruan, X. Z. - 2006]

Um nun das Ausmaß der oxLDL-induzierten Entstehung von oxidativem Stress über eine Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase in beiden Zellreihen zu untersuchen, erfolgte die Fluoreszenzbestimmung unter Verwendung der Farbstoffe c-H₂DCF-DA und DHE im FACS. Durch c-H₂DCF-DA ist ein Nachweis intrazellulärer ROS möglich, wohingegen DHE spezifisch $\text{O}_2^{\cdot -}$ nachweist.

In den Versuchen mit c-H₂DCF-DA zeigte sich, dass es in beiden Zellreihen zur Entstehung von ROS kommt, die durch steigende Konzentrationen von oxLDL vermehrt nachgewiesen werden konnten (siehe *Abb. 25* und *28*). Durch diesen konzentrationsabhängigen Anstieg der Oxidationsrate von c-H₂DCF-DA zu c-DCF konnte gezeigt werden, dass die Entstehung der ROS in keinerlei Abhängigkeit zur Internalisierung von oxLDL in die Zelle steht.

Sollte nun die Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase zu der Entstehung von oxLDL-induziertem oxidativem Stress beitragen, so sollte unter dem extrazellulären Einfluss von oxLDL eine Zunahme der intrazellulären $\text{O}_2^{\cdot -}$ nachweisbar sein. Unter Einsatz von DHE hingegen zeigte sich eine konzentrationsabhängige Abnahme des $\text{O}_2^{\cdot -}$ -spezifischen Signals. Folglich ist bei einem nachgewiesenen Abfall von $\text{O}_2^{\cdot -}$ unter Zugabe von oxLDL davon auszugehen, dass weder in Endothelzellen noch in glatten Muskelzellen eine Beteiligung der NAD(P)H-Oxidase an der Entstehung intrazellulärer $\text{O}_2^{\cdot -}$ vorliegt, zumal der verwendete Fluoreszenz-Farbstoff DHE, anders als c-H₂DCF-DA, eine Spezifität für $\text{O}_2^{\cdot -}$ aufweist.

Folglich ist zu vermuten, dass es in CASMC bei reduzierter Aufnahmefähigkeit von oxLDL zwar zur Entstehung intrazellulärer ROS kommt, die allerdings nicht aus einer Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase durch oxLDL hervorgehen, da keine $\text{O}_2^{\cdot -}$ nachweisbar sind. Vielmehr ist eine Blockierung der NAD(P)H-Oxidase unter oxLDL zu vermuten. Es wird beschrieben, dass es unter oxLDL zu einem Abfall des zellulären ATP-Vorrates kommt. [Sukhanov, S. - 2006]

Um die durch oxLDL induzierten und für die Entstehung von oxidativem Stress verantwortlichen ROS-Untergruppen näher zu identifizieren, erfolgte die Verwendung verschiedener Antioxidantien (siehe **Abb. 29** und **30**). Die Detektion mit c-H₂DCF-DA zeigte keine Inhibition durch Katalase, weshalb auf ein Fehlen von H₂O₂ geschlossen werden kann, da diese von c-H₂DCF-DA erkannt und durch Katalase gehemmt werden können. Eine Hemmung des DHE-Signals durch SOD blieb ebenfalls aus, was als ein weiteres Indiz für das Fehlen von O₂^{•-} gedeutet werden kann. In diesem Zusammenhang ist darauf hinzuweisen, dass es hingegen den Beobachtungen in 4.2 zu keiner Signalverstärkung von Oxyethidin und c-DCF durch die Zugabe von Katalase kam, obwohl dies bereits in der Literatur beschrieben ist. [Daiber, A. - 2004] Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die unter 4.2 beschriebenen Versuche mit der reinen Form der Katalase durchgeführt wurden und für die hier beschriebene Versuchsdurchführung ein polyethylenglykol-gekoppeltes Enzym verwendet wurde. Dieses zeichnet sich im Gegensatz zu der reinen Form dadurch aus, dass es eine längere Halbwertszeit aufweist. [Muzykantov, V. R. - 2001] Dadurch kommt es zu einem verzögerten Abbau und die dabei entstandenen Produkte können erst mit einer gewissen Latenz mit dem Farbstoff interagieren und diesen somit weniger stark beeinflussen, was ein Grund für den fehlenden Anstieg sein könnte. Andererseits ist es möglich, dass es anfangs zu einer Hemmung der vorhandenen H₂O₂ durch das Enzym kam und diese durch die folgende Interaktion mit dem Farbstoff maskiert wurden. Somit kann keine eindeutige Aussage über das Vorhandensein von H₂O₂ getroffen werden.

Daraus ergibt sich, dass es trotz der fehlenden Aufnahme von oxLDL in CASMC zur Entwicklung von oxidativem Stress kommt, der jedoch nicht in Form von O₂^{•-} vorliegt. Die hierfür verantwortlichen ROS-Untergruppen konnten allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht identifiziert werden. Durch das Fehlen von O₂^{•-} konnte allerdings das Modell der NAD(P)H-Oxidase als Hauptproduzent der entstandenen ROS endgültig ausgeschlossen werden.

5.2 Die extrazelluläre Generierung von $O_2^{\cdot-}$ durch oxLDL

In der Literatur bestehen Hinweise dafür, dass oxLDL selbst in der Lage ist, $O_2^{\cdot-}$ zu generieren.[Galle, J. - 2006] Dies sollte mit Hilfe des $O_2^{\cdot-}$ -spezifischen Farbstoffes L-012 in An- und Abwesenheit von Endothelzellen untersucht werden (siehe *Abb. 8* und *9*). Unter oxLDL konnte das Signal für L-012 in Anwesenheit von HUVEC deutlich verstärkt und durch die Zugabe der Superoxiddismutase (SOD) vollständig inhibiert werden. Für den Versuchsaufbau in zellfreier Lösung zeigten sich identische Tendenzen.

Aus diesen Versuchsergebnissen kann geschlossen werden, dass es sich bei den Signal-induzierenden ROS um direkt durch oxLDL freigesetzte extrazelluläre $O_2^{\cdot-}$ handelt, die durch L-012 detektiert und durch SOD zu H_2O_2 abgebaut wurden. Bestätigt wird dies durch die Signalzunahme sowohl in zellreicher als auch in zellfreier Lösung. Die Zugabe des antioxidativen Enzyms Katalase führte allerdings zu einer weiteren Verstärkung des Signals, was artifiziell zu interpretieren ist, da reaktive Zwischenprodukte der Katalase, die über Compound I und II gebildet werden, mit L-012 interagieren und dadurch dessen Signal verstärken. [Daiber, A. - 2004] Dadurch erklärt sich auch die große Streuung der Werte für Katalase.

Die Messungen wurden über insgesamt vier Monate nach Herstellung des modifizierten LDL durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass oxLDL selbst in der Lage ist, relativ konstant über diesen Zeitraum hinweg $O_2^{\cdot-}$ extrazellulär zu generieren, welche durch Tiron und SOD gehemmt werden konnten (siehe *Abb. 10*). Die ermittelten Laufweiten in der Lipidelektrophorese machen deutlich, dass der Oxidationsgrad des Lipoproteins im Laufe der Zeit zunimmt, was ein Zeichen für den Verfall des oxidierten Lipoproteins sein kann.

Da nun gezeigt werden konnte, dass oxLDL über einen längeren Zeitraum in der Lage ist, extrazellulär $O_2^{\cdot-}$ freizusetzen, sollte nun untersucht werden, ob es zudem zur Bildung weiterer ROS neben $O_2^{\cdot-}$ kommt. Zum Nachweis wurde der Farbstoff c-H₂DCF-DA eingesetzt, durch den vornehmlich ein Nachweis von ONOO⁻ und H_2O_2 möglich ist, jedoch keine Aussage über $O_2^{\cdot-}$ getroffen werden kann (vgl. 1.4.3.1). Durch die Zugabe von oxLDL zeigte sich in zellfreier Lösung weder eine Verstärkung des Signals noch eine Inhibition durch Antioxidantien wie SOD, Tiron und DPI (siehe *Abb. 11*). Vielmehr kam es bei Zugabe von Katalase zu einer deutlichen Signal-

verstärkung, die darauf zurückzuführen ist, dass Katalase aufgrund seiner geringen Halbwertszeit schnell zu Eisen abgebaut wird, das dann ohne die Beteiligung von ROS mit c-H₂DCF-DA zu c-DCF reagiert.

Aus den Versuchsergebnissen können somit keine weiteren Schlüsse bezüglich der Bildung weiterer ROS-Untergruppen gezogen werden.

Da nun gezeigt werden konnte, dass oxLDL selbst in der Lage ist, extrazellulär O₂^{•-} freizusetzen, sollte untersucht werden, inwieweit es durch eine indirekte Stimulation mit extrazellulären O₂^{•-} zu einer Entwicklung von oxidativem Stress in der Zelle kommt. Es wurde vermutet, dass die durch oxLDL direkt generierten O₂^{•-} (vgl. 5.2) in der Lage sind, die Zellmembran zu passieren, intrazellulär zu zerfallen und die dabei entstandenen Produkte zur Bildung von oxidativem Stress führen. Diese Vermutung basierte auf Hinweisen in der Literatur, die pro-oxidative und pro-inflammatorische Effekte wie die Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase durch extrazelluläre Stimulation mit oxLDL zeigten. [Jacobi, J. - 2005] Um dies nun näher zu untersuchen, sollte ein Modell verwendet werden, das die direkte Aufnahme von oxLDL in die Zelle verhindert und somit nur die Wirkung der extrazellulären O₂^{•-} auf die Entwicklung von oxidativem Stress wiedergibt. Als Quellen für O₂^{•-} wurde einerseits oxLDL und andererseits das Enzym Xanthinoxidase eingesetzt, das durch die Oxidation von Xanthin ebenfalls in der Lage ist, O₂^{•-} extrazellulär zu bilden. Dazu wurden gasdurchlässige Filter (Lumox-Schalen) verwendet, die die Aufnahme von oxLDL in die Endothelzellen verhindern sollten (siehe **Abb. 12**). Unter der direkten Stimulation durch Zugabe von oxLDL bzw. X/XO zu den Zellen kam es zu einer Verstärkung des Signals für c-DCF. Im nächsten Schritt fand eine indirekte Stimulation über den Filter hinweg statt, durch den oxLDL bzw. X/XO von den Zellen getrennt wurde. Durch diese Art der Stimulation zeigte sich eine Reduktion der Fluoreszenzentwicklung, die in verschiedene Richtungen gedeutet werden kann. Eine Möglichkeit könnte sein, dass die von oxLDL freigesetzten O₂^{•-} nicht, wie vermutet, in die Zelle aufgenommen werden und dort zu oxidativem Stress führen, sondern über einen anderen Weg Stress induzieren, wodurch die anfangs aufgestellte Vermutung widerlegt werden würde. Demgegenüber steht jedoch folgender Sachverhalt: Die Poren des verwendeten Filters sind O₂^{•-}-durchgängig, wohingegen O₂^{•-} aufgrund seiner negativen Ladung nicht in der

Lage ist, die Zellmembran zu passieren. Daher reagiert ein kleiner Teil (0,3 %) mit H^+ zu ungeladenem HO_2^* , welches nun die Zellmembran passieren kann. Daraus ergibt sich die Problematik, dass zu geringe Mengen an ROS nicht in der Lage sind, deutliche Signale auszulösen. Dies könnte im Versuchsaufbau begründet sein, der sich sehr schwierig gestaltete und somit nicht immer identische und optimale Bedingungen geschaffen werden konnten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass oxLDL in der Lage ist, extrazellulär $O_2^{\bullet-}$ zu bilden. Da nun nachgewiesen werden konnte, dass es durch extrazelluläres oxLDL zu einer Entstehung von intrazellulärem oxidativem Stress kommt, dieser jedoch unabhängig von der Internalisierung von oxLDL in die Zelle ist, könnte eine direkte Interaktion der entstandenen $O_2^{\bullet-}$ mit der Zellmembran eine mögliche Erklärung sein.

5.3 Verlässlichkeit der verwendeten Farbstoffe

Grundsätzlich ist bei der Messung reaktiver Sauerstoffspezies ihre kurze Halbwertszeit und die Tatsache, dass sie sehr schnell ineinander übergehen und somit ihr Nachweis erschwert wird, zu beachten. Des Weiteren ist auf die Rahmenbedingungen zu achten. Sobald die Zellen großem Stress ausgesetzt sind, wie es beispielsweise bei der Versuchsdurchführung bei $4^\circ C$ der Fall war, kommt es bereits ohne die Stimulation mit Oxidantien zu einer verstärkten Bildung von ROS und somit zu einer deutlichen Abweichung der Ergebnisse.

Durch die Versuche mit Antioxidantien wie Tiron und SOD (vgl. 4.2 und 4.3) konnte gezeigt werden, dass die verwendeten Farbstoffe tatsächlich der Detektion von ROS dienen, da ansonsten die Hemmung dieser zu keiner Reduktion des Fluoreszenzsignals geführt hätte.

5.3.1 Chemilumineszenz-Farbstoff L-012

Mit Hilfe des $O_2^{\cdot-}$ -spezifischen Farbstoffes L-012 ist es im Gegensatz zu den Fluoreszenz-Farbstoffen nur möglich, extrazelluläre $O_2^{\cdot-}$ zu detektieren. Dadurch können keine Aussagen über den intrazellulären Status der Zelle gemacht werden. Im Fall der Katalase zeigen sich durch entstandene Abbauprodukte Interaktionen mit L-012, die zu einer artifiziellen Verstärkung der gemessenen Chemilumineszenz führen. [Daiber, A. - 2004]

5.3.2 Fluoreszenz-Farbstoffe c-H₂DCF-DA und DHE

[5-(and-6)-carboxy-] 2',7'-Dichlorofluorescindiacetat (c-H₂DCF-DA)

Wie bereits unter 1.4.3.1 beschrieben, ist die Detektion des Oxidationsproduktes von H₂DCF-DA von verschiedenen Faktoren abhängig, die bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden sollten. Grundsätzlich ist zu sagen, dass durch die Messung von DCF nur eine Aussage über den oxidativen Status der Zelle getroffen werden kann und nicht direkt über die Bildung einzelner ROS-Untergruppen. Aufgrund der Tatsache, dass es durch intrazelluläre Esterasen zu einer Deacetylierung des Farbstoffes kommt, besteht unter gewissen Bedingungen, wie z.B. bei Inkubationszeiten über mehrere Stunden, die Gefahr der extrazellulären Akkumulation. Aus diesem Grund wurde die carboxylierte Form (c-H₂DCF-DA) eingesetzt, bei der diese extrazelluläre Anreicherung nahezu gegen Null geht. Des Weiteren ist H₂DCF-DA bereits extrazellulär der Gefahr der Hydrolyse durch Esterasen des Mediums ausgesetzt, weshalb die Verwendung von serumfreiem Medium sinnvoll wäre, das allerdings selbst oxidativen Stress in der Zelle erzeugt. [Bartosz, G. - 2006] Es sollte auch berücksichtigt werden, dass zu einem gewissen Anteil eine Autooxidation stattfindet und durch eine Oxidation wiederum neue ROS gebildet werden können, die möglicherweise zu einer Fehlinterpretation der Ergebnisse führen. [Bonini, M. G. - 2006 // Myhre, O. - 2003 // Royall, J. A. - 1993] Die für L-012 beschriebene

Interaktion mit dem Enzym Katalase wurde auch für H₂DCF-DA beschrieben, indem der Farbstoff irreversibel zu Eisen abgebaut wird, welches dann die Oxidation induziert.

Dihydroethidium (DHE)

Sozusagen als Pendant zu H₂DCF-DA ist DHE spezifisch für O₂^{•-}. Wie bereits für die anderen Farbstoffe beschrieben, kommt es auch hier zu Reaktionen mit dem Enzym Katalase, die eine Signalverstärkung nach sich ziehen. [Daiber, A. - 2004]

5.4 Ausblicke

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass weder die oxLDL-induzierte Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase noch die Freisetzung von O₂^{•-} durch oxLDL selbst die Entstehung von intrazellulärem Stress ausreichend erklärt. Durch weitere Versuchsreihen konnte ein drittes Modell aufgestellt werden. Hierbei wird davon ausgegangen, dass Lipidperoxide zwischen der Zellmembran und oxLDL ausgetauscht werden können und als ideale Startermoleküle für oxidative Kettenreaktionen dienen. Dadurch kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen dem oxidativen und antioxidativen System und somit zur Entstehung von oxidativem Stress. [Hansen-Hagge, T. E. – 2008]

6 Zusammenfassung

Atherosklerose stellt mit ihren Komplikationen die führende Todesursache in den Industrieländern dar. Einen der wichtigsten Risikofaktoren bildet hierbei die erhöhte Konzentration an low density lipoprotein (LDL), die zur Bildung von oxidativ modifiziertem LDL (oxLDL) führt. Ausgehend von der Hypothese der oxidativen Modifikation kommt es durch eine verstärkte Bildung von ROS zur Entstehung endothelialer Dysfunktion, die letztendlich die Grundlage der Atherosklerose darstellt. Aus diesem Grund sollte in dieser Arbeit versucht werden, den Mechanismus der ROS-Bildung unter dem Einfluss von oxLDL zu klären, um darauf aufbauend eine effektivere Therapie der Atherosklerose betreiben zu können. Als Ausgangsmodell sollte ursprünglich der vermutete Zusammenhang zwischen der Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase durch oxLDL und der daraus resultierenden Entstehung von intrazellulärem oxidativem Stress näher untersucht werden.

In ersten Versuchen zeigte sich durch den Einsatz von LOX-1 siRNA und DiI-markiertem oxLDL, dass der LOX-1-Rezeptors weder maßgeblich an der Aufnahme von oxLDL in die Endothelzelle beteiligt ist noch eine anschließende Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase stattfindet. Somit musste nach neuen Mechanismen gesucht werden.

In weiteren Versuchsreihen mit Endothelzellen und glatten Muskelzellen zeigte sich, dass hingegen etlicher Beschreibungen in der Literatur Letztere nur in geringem Maße in der Lage sind, oxLDL zu internalisieren. Dennoch konnte eine konzentrationsabhängige Zunahme von intrazellulärem oxidativem Stress unter dem Einfluss von oxLDL in beiden Zellreihen nachgewiesen werden. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass die Entstehung von oxidativem Stress in keinerlei Beziehung zur Aufnahmefähigkeit für oxLDL steht. Die einzelnen ROS-Untergruppen konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht eruiert werden.

Im Folgenden wurde das Augenmerk auf eine in der Literatur beschriebene extrazelluläre Bildung von $O_2^{\cdot-}$ durch oxLDL selbst gerichtet. Mittels Luminometer

konnte nachgewiesen werden, dass oxLDL über einen Zeitraum von ca. vier Monaten in der Lage ist, relativ konstant $O_2^{\cdot-}$ zu generieren. Darauf aufbauend sollte die Beziehung zwischen den auf diese Weise gebildeten $O_2^{\cdot-}$ und der Entstehung von oxidativem Stress geklärt werden. Es wurde vermutet, dass oxLDL extrazellulär $O_2^{\cdot-}$ freisetzt und diese nach erfolgter Aufnahme in die Zelle zerfallen. Die entstandenen Abbauprodukte lösen dann die Oxidation der verwendeten Fluoreszenz-Farbstoffe aus, die durch eine Verstärkung des Signals im FACS als oxidativer Stress gemessen werden kann. Der dazu entwickelte Versuchsaufbau unter Verwendung gasdurchlässiger Filter (Lumox-Schalen) gestaltete sich sehr schwierig und ließ letztendlich nur Vermutungen dahingehend zu, dass die von oxLDL extrazellulär gebildeten $O_2^{\cdot-}$ ohne direkte Aufnahme zur Bildung von intrazellulärem Stress führen.

Zusammenfassend konnte durch diese Arbeit gezeigt werden, dass es unter dem Einfluss von oxLDL unabhängig von der intrazellulären Aufnahme und der Aktivierung der NAD(P)H-Oxidase sowohl in glatten Muskelzellen als auch in Endothelzellen zur Bildung von oxidativem Stress kommt. Einzelne Untergruppen der dabei generierten ROS konnten nicht nachgewiesen werden. Zudem konnte die extrazelluläre Bildung von $O_2^{\cdot-}$ durch oxLDL gezeigt werden.

In auf dieser Arbeit basierenden nachfolgenden Arbeiten konnte nachgewiesen werden, dass die oxLDL-immanenten oxidativen Reaktionsketten bzw. Emissionsketten von reaktiven Radikalen nicht alleinig über die Aufnahme des Partikels an die Zellen weitergegeben werden müssen, sondern dass der physische Kontakt von zellulären Lipidmembranen mit den oxLDL-Lipiden ausreicht. Somit können die in dieser Arbeit gezeigten Phänomene hinreichend erklärt werden.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AGEs	advanced glycation end products
Apo A-I	Apolipoprotein A-I
BBE	Bovine Brain Extract
°C	Grad Celsius
CaCl ₂	Calciumdichlorid
c-DCF	5-(and-6)-carboxy-2',7'-Dichlorofluorescein
c-H ₂ DCF	5-(and-6)-carboxy-2',7'-Dichlorofluorescein
c-H ₂ DCF-DA	5-(and-6)-carboxy-2',7'-Dichlorofluorescein diacetat
CASMC	coronary artery smooth muscle cells
cGMP	cyclic guanosine monophosphate
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cu,Zn-SOD	Kupfer-, Zink- gekoppelte Superoxiddismutase
CVD	cardiovascular disease
D-PBS	Phosphate Buffered Saline
DCF	2',7'-Dichlorofluorescein
DHE	Dihydroethidium
DiI	3,3'-Diiodododecylindocarbocyanin
DiI-oxLDL	DiI-markiertes oxidativ modifiziertes low density lipoprotein
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid
DPI	Diphenyliodonium
e ⁻	Elektron
EBM	endothelial cell basal medium
ec-SOD	extrazelluläre Superoxiddismutase
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eNOS	constitutive endotheliale Nitric-Oxide Synthase

ESR	Electron Spin Resonance
ET-1	Endothelin-1
FACS	fluorescens activated cell sorter
Fe ²⁺	zweiwertiges Eisen
Fe ³⁺	dreiwertiges Eisen
FL	Filter
FCS	fötales Kälberserum
FSC	Vorwärtsstreulicht
g	Gramm
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
h	Stunde
H ₄ B	Tetrahydrobiopterin
HCl	Salzsäure
H ₂ DCF	2',7'-Dichlorofluorescein
H ₂ DCF-DA	2',7'-Dichlorofluorescein-Diacetat
HDL	high density lipoprotein
hEGF	human Epidermal Growth Factor
hFGF-b	human Fibroblast Growth Factor-basic
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HOCl	hypochlorige Säure
HUVEC	human vein endothelial cells
ICAM	intercellular adhesion molecule
Il-1	Interleukin 1
Il-8	Interleukin 8
iNOS	endotoxin- and cytokine-inducible NOS
KBr	Kaliumbromid
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
L-012	8-amino-5-chloro-7-phenylpyridol(3,4- <i>d</i>)pyridazine-1,4-(2H,3H)dione

LDL	low density lipoprotein
LOOH	Lipidhydroperoxid
LOX-1-Rezeptor	lectin-like oxLDL Rezeptor - 1
LPC	Lysophosphatidylcholin
M	Molar
MCP-1	monocyte chemotactic protein-1
Mean	mittlere Fluoreszenzintensität
MgCl ₂	Magnesiumdichlorid
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
mmLDL	minimally modified low density lipoprotein
min	Minute
Mn-SOD	Mangan-gekoppelte Superoxiddismutase
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
n	Anzahl
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
nLDL	natives low density lipoprotein
NaCl	Natriumchlorid
NAD ⁺	Nicotinamide adenine dinucleotide
NAD(P)H-Oxidase	Nicotinamide Adenine Dinucleotide (Phosphate) Oxidase
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
nM	Nanomolar
NaOH	Natronlauge
NEFA	non-esterified fatty acids
NO	Stickoxid
NOS	Nitric-Oxide Synthase
NOX-Proteine	nonphagocytic NAD(P)H oxidase proteins
O ₂ ^{•-}	Superoxidradikalanion
•OH	Hydroxylradikal

ONOO ⁻	Peroxynitrit
oxLDL	oxidiertes low density lipoprotein
PAF	platelet-activating factor
PDGF	platelet-derived growth factor
peg.	polyethylenglykol-gekoppelt
PHGPx	phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase
phox	phagocyte oxidase
PKC	Proteinkinase C
RLU	Relative Light Units
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
sec	Sekunde
SEM	Standardfehler
siRNA	small interfering ribonucleic acid
SmBM	smooth muscle cell basal medium
SOD	Superoxiddismutase
SSC	Seitwärtsstreulicht
Tab.	Tabelle
TNF- α	tumor necrosis factor- α
G/min	Umdrehungen pro Minute
U/ml	Units pro Milliliter
VCAM	vascular cell adhesion molecule
VEGF	vascular endothelial growth factor
VLDL	very low density lipoprotein
W	Watt
X	Xanthin
XO	Xanthinoxidase

8 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1 Hypothese der oxidativen Modifikation
- Abb. 2 Entstehung atherosklerotischer Läsionen in Stadien (Typ I – VI)
- Abb. 3 Darstellung eines low density lipoprotein (LDL-) Partikels
- Abb. 4 Quellen für die Bildung von $O_2^{\bullet-}$ in Endothelzellen
- Abb. 5 Versuchsaufbau mit zellundurchlässigen und gleichzeitig gasdurchlässigen Lumox-Schalen
- Abb. 6 Analyse der Aufnahmefähigkeit von HUVEC für DiI-oxLDL nach Transfektion mit LOX-1 siRNA und Luziferase siRNA im FACS
- Abb. 7 Analyse der oxLDL-induzierten Bildung von ROS in HUVEC nach Transfektion mit LOX-1 siRNA und Luziferase siRNA mittels c-H2DCF-DA im FACS
- Abb. 8 Analyse des Einflusses verschiedener Antioxidantien auf die oxLDL-induzierte Freisetzung von $O_2^{\bullet-}$ in Anwesenheit von HUVEC mit Hilfe des Chemilumineszenz-Farbstoffes L-012
- Abb. 9 Analyse des Einflusses verschiedener Antioxidantien auf die oxLDL-induzierte Freisetzung von $O_2^{\bullet-}$ in zellfreier Lösung und in Anwesenheit von HUVEC mit Hilfe des Chemilumineszenz-Farbstoffes L-012
- Abb. 10 Analyse der direkten Freisetzung von $O_2^{\bullet-}$ durch oxLDL in zellfreier Lösung und deren Hemmung über einen Zeitraum von 4 Monaten mit Hilfe des Chemilumineszenz-Farbstoffes L-012
- Abb. 11 Analyse des Einflusses verschiedener Antioxidantien auf die oxLDL-induzierte Bildung von ROS und deren Hemmung in zellfreier Lösung mit Hilfe des Fluoreszenz-Farbstoffes H2DCF-DA im Multilabel Counter
- Abb. 12 Analyse der Freisetzung von ROS durch oxLDL und X/XO gemessen an der intrazellulären Fluoreszenzentwicklung des oxidierten Farbstoffes c-DCF im FACS
- Abb. 13 Analyse der Aufnahmefähigkeit von HUVEC für DiI-oxLDL im Vergleich bei 37°C und 4°C mittels FACS
- Abb. 14 Histogramm der Verteilung von HUVEC bei 37°C mit oxLDL 20 µg/ml und c-H2DCF-DA (20 µM) für 24 h

-
- Abb. 15 Histogramm der Verteilung von HUVEC bei 4°C mit oxLDL 20 µg/ml und c-H2DCF-DA (20 µM) für 24 h
- Abb. 16 Analyse der Bildung von ROS in HUVEC unter Zugabe von oxLDL bei 37°C und 4°C mittels Oxidation von c-H2DCF-DA im FACS
- Abb. 17 Analyse der Bildung von ROS in HUVEC durch Stimulation mit steigenden Konzentrationen von oxLDL bei 37°C und 4°C mittels Oxidation von c-H2DCF-DA im FACS
- Abb. 18 Analyse der Bildung von ROS in HUVEC durch Stimulation mit steigenden Konzentrationen von oxLDL bei 37°C und 4°C mittels Oxidation von DHE im FACS
- Abb. 19 Histogramm der Verteilung von HUVEC mit DiI-oxLDL 100 µg/ml für 4 h
- Abb. 20 Histogramm der Verteilung von CASMC mit DiI-oxLDL 100 µg/ml für 4 h
- Abb. 21 Histogramm der Verteilung von CASMC mit DiI-oxLDL 100 µg/ml für 4 h
- Abb. 22 Analyse der Aufnahmefähigkeit von HUVEC und CASMC für DiI-oxLDL mittels FACS
- Abb. 23 Histogramm der Verteilung von HUVEC mit oxLDL 20 µg/ml und c-H2DCF-DA (20 µM) für 4 h
- Abb. 24 Histogramm der Verteilung von CASMC mit oxLDL 20 µg/ml und c-H2DCF-DA (20 µM) für 4 h
- Abb. 25 Analyse der Bildung von ROS in HUVEC und CASMC durch Stimulation mit steigenden Konzentrationen von oxLDL mittels Oxidation von c-H2DCF-DA im FACS
- Abb. 26 Histogramm der Verteilung von HUVEC mit oxLDL 20 µg/ml und DHE (5 µM) für 4 h
- Abb. 27 Histogramm der Verteilung von CASMC mit oxLDL 20 µg/ml und DHE (5 µM) für 4 h
- Abb. 28 Analyse der Bildung von ROS in HUVEC und CASMC durch Stimulation mit steigenden Konzentrationen von oxLDL mittels Oxidation von DHE im FACS
- Abb. 29 Analyse der Hemmung von ROS in HUVEC und CASMC durch Antioxidantien mittels Oxidation von c-H2DCF-DA im FACS

Abb. 30 Analyse der Hemmung von ROS in HUVEC und CASMC durch Antioxidantien mittels Oxidation von DHE im FACS

Tab. 1 Proatherogene Aktivitäten von oxLDL und seiner Produkte

Tab. 2 Fluoreszenzspektren der eingesetzten Fluorochrome

Tab. 3 Vergleich der arithmetischen Mittelwerte für CASMC und HUVEC in Filter 2 (FL 2)

Tab. 4 Vergleich der arithmetischen Mittelwerte für CASMC und HUVEC in Filter 1 (FL 1)

Tab. 5 Vergleich der arithmetischen Mittelwerte für CASMC und HUVEC in Filter 2 (FL 2)

Tab. 6 Vergleich der arithmetischen Mittelwerte für CASMC und HUVEC in Filter 1 (FL 1)

Tab. 7 Vergleich der arithmetischen Mittelwerte für CASMC und HUVEC in Filter 2 (FL 2)

9 Literaturverzeichnis

- Ambasta RK, Schreiber JG, Janiszewski M, Busse R, Brandes RP.** Nox1 is a central component of the smooth muscle NADPH oxidase in mice. *Free Radic Biol Med* 41: S. 193-201, 2006
- Argmann CA, Sawyez CG, Li S, Nong Z, Hegele RA, Pickering JG, Huff MW.** Human smooth muscle cell subpopulations differentially accumulate cholesteryl ester when exposed to native and oxidized lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: S. 1290-6, 2004
- Assmann G, Cullen P, Schulte H.** Simple scoring scheme for calculating the risk of acute coronary events based on the 10-year follow-up of the prospective cardiovascular Munster (PROCAM) study. *Circulation* 105: S. 310-5, 2002
- Ballinger SW.** Mitochondrial dysfunction in cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med* 38: S. 1278-95, 2005
- Barter PJ, Nicholls S, Rye KA, Anantharamaiah GM, Navab M, Fogelman AM.** Antiinflammatory properties of HDL. *Circ Res* 95: S. 764-72, 2004
- Bartosz G.** Use of spectroscopic probes for detection of reactive oxygen species. *Clin Chim Acta* 368: S. 53-76, 2006
- Berliner JA, Territo MC, Sevanian A, Ramin S, Kim JA, Bamshad B, Esterson M, Fogelman AM.** Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. *J Clin Invest* 85: S. 1260-6, 1990
- Bonini MG, Rota C, Tomasi A, Mason RP.** The oxidation of 2',7'-dichlorofluorescein to reactive oxygen species: a self-fulfilling prophesy? *Free Radic Biol Med* 40: S. 968-75, 2006
- Brand MD, Affourtit C, Esteves TC, Green K, Lambert AJ, Miwa S, Pakay JL, Parker N.** Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic Biol Med* 37: S. 755-67, 2004
- Brandes RP, Janiszewski M.** Direct detection of reactive oxygen species ex vivo. *Kidney Int* 67: S. 1662-4, 2005
- Burke AP, Farb A, Kolodgie FD, Narula J, Virmani R.** Atherosclerotic plaque morphology and coronary thrombi. *J Nucl Cardiol* 9: S. 95-103, 2002
- Cadenas E.** Mitochondrial free radical production and cell signaling. *Mol Aspects Med* 25: S. 17-26, 2004
- Cai H.** Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences. *Cardiovasc Res* 68: S. 26-36, 2005

- Cai H, Harrison DG.** Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res* 87: S. 840-4, 2000
- Ceperkovic Z.** [The role of increased levels of homocysteine in the development of cardiovascular diseases]. *Med Pregl* 59: S. 143-7, 2006
- Charakida M, Deanfield JE, Halcox JP.** The role of nitric oxide in early atherosclerosis. *Eur J Clin Pharmacol* 62 Suppl 13: S. 69-78, 2006
- Chen M, Masaki T, Sawamura T.** LOX-1, the receptor for oxidized low-density lipoprotein identified from endothelial cells: implications in endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Pharmacol Ther* 95: S. 89-100, 2002
- Choi SW, Benzie IF, Collins AR, Hannigan BM, Strain JJ.** Vitamins C and E: acute interactive effects on biomarkers of antioxidant defence and oxidative stress. *Mutat Res* 551: S. 109-17, 2004
- Cominacini L, Rigoni A, Pasini AF, Garbin U, Davoli A, Campagnola M, Pastorino AM, Lo C, V, Sawamura T.** The binding of oxidized low density lipoprotein (ox-LDL) to ox-LDL receptor-1 reduces the intracellular concentration of nitric oxide in endothelial cells through an increased production of superoxide. *J Biol Chem* 276: S. 13750-5, 2001
- Conroy RM, Pyorala K, Fitzgerald AP, Sans S, Menotti A, De Backer G, De Bacquer D, Ducimetiere P, Jousilahti P, Keil U, Njolstad I, Oganov RG, Thomsen T, Tunstall-Pedoe H, Tverdal A, Wedel H, Whincup P, Wilhelmsen L, Graham IM.** Estimation of ten-year risk of fatal cardiovascular disease in Europe: the SCORE project. *Eur Heart J* 24: S. 987-1003, 2003
- Cooper JA, Miller GJ, Humphries SE.** A comparison of the PROCAM and Framingham point-scoring systems for estimation of individual risk of coronary heart disease in the Second Northwick Park Heart Study. *Atherosclerosis* 181: S. 93-100, 2005
- Corti R, Farkouh ME, Badimon JJ.** The vulnerable plaque and acute coronary syndromes. *Am J Med* 113: S. 668-80, 2002
- Crow JP.** Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide* 1: S. 145-57, 1997
- Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F, Gerrity R, Schwartz CJ, Fogelman AM.** Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: S. 5134-8, 1990
- Daiber A, August M, Baldus S, Wendt M, Oelze M, Sydow K, Kleschyov AL, Munzel T.** Measurement of NAD(P)H oxidase-derived superoxide with the luminol analogue L-012. *Free Radic Biol Med* 36: S. 101-11, 2004

- Daiber A, Oelze M, August M, Wendt M, Sydow K, Wieboldt H, Kleschyov AL, Munzel T.** Detection of superoxide and peroxynitrite in model systems and mitochondria by the luminol analogue L-012. *Free Radic Res* 38: S. 259-69, 2004
- Davignon J, Ganz P.** Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* 109: S. III27-III32, 2004
- Ellson CD, Davidson K, Ferguson GJ, O'Connor R, Stephens LR, Hawkins PT.** Neutrophils from p40phox^{-/-} mice exhibit severe defects in NADPH oxidase regulation and oxidant-dependent bacterial killing. *J Exp Med* 203: S. 1927-37, 2006
- Faraci FM.** Hydrogen peroxide: watery fuel for change in vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: S. 1931-3, 2006
- Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL.** CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest* 108: S. 785-91, 2001
- Fleming I, Mohamed A, Galle J, Turchanowa L, Brandes RP, Fisslthaler B, Busse R.** Oxidized low-density lipoprotein increases superoxide production by endothelial nitric oxide synthase by inhibiting PKC α . *Cardiovasc Res* 65: S. 897-906, 2005
- Galle J, Hansen-Hagge T, Wanner C, Seibold S.** Impact of oxidized low density lipoprotein on vascular cells. *Atherosclerosis* 185: S. 219-26, 2006
- Galle J, Heinloth A, Wanner C, Heermeier K.** Dual effect of oxidized LDL on cell cycle in human endothelial cells through oxidative stress. *Kidney Int Suppl* 78: S. S120-S123, 2001
- Galle J, Wanner C.** Oxidized LDL and Lp(a). Preparation, modification, and analysis. *Methods Mol Biol* 108: S. 119-30, 1998
- Gillotte-Taylor K, Boullier A, Witztum JL, Steinberg D, Quehenberger O.** Scavenger receptor class B type I as a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Lipid Res* 42: S. 1474-82, 2001
- Griendling KK, FitzGerald GA.** Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* 108: S. 1912-6, 2003
- Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M.** NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res* 86: S. 494-501, 2000
- Grivennikova VG, Vinogradov AD.** Generation of superoxide by the mitochondrial Complex I. *Biochim Biophys Acta* 1757: S. 553-61, 2006
- Gutierrez J, Ballinger SW, Darley-Usmar VM, Landar A.** Free radicals, mitochondria, and oxidized lipids: the emerging role in signal transduction in vascular cells. *Circ Res* 99: S. 924-32, 2006

- Halliwell B.** Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol* 141: S. 312-22, 2006
- Hansen-Hagge TE, Baumeister E, Bauer T, Schmiedeke D, Renne T, Wanner C, Galle J.** Transmission of oxLDL-derived lipid peroxide radicals into membranes of vascular cells is the main inducer of oxLDL-mediated oxidative stress. *Atherosclerosis* 197: S. 602-11, 2008
- Hansson GK.** Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 352: S. 1685-95, 2005
- Herbert Renz-Polster, Steffen Krautzig, Jörg Braun.** Basislehrbuch Innere Medizin. Urban & Fischer Verlag München, 2006
- Hozawa A, Folsom AR, Sharrett AR, Payne TJ, Chambless LE.** Does the impact of smoking on coronary heart disease differ by low-density lipoprotein cholesterol level?: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Circ J* 70: S. 1105-10, 2006
- Imada I, Sato EF, Miyamoto M, Ichimori Y, Minamiyama Y, Konaka R, Inoue M.** Analysis of reactive oxygen species generated by neutrophils using a chemiluminescence probe L-012. *Anal Biochem* 271: S. 53-8, 1999
- Inal ME, Kanbak G, Sunal E.** Antioxidant enzyme activities and malondialdehyde levels related to aging. *Clin Chim Acta* 305: S. 75-80, 2001
- Inoue T, Node K.** Vascular failure: A new clinical entity for vascular disease. *J Hypertens* 24: S. 2121-30, 2006
- Irani K.** Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival : a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. *Circ Res* 87: S. 179-83, 2000
- Jacobi J, Kristal B, Chezar J, Shaul SM, Sela S.** Exogenous superoxide mediates prooxidative, proinflammatory, and procoagulatory changes in primary endothelial cell cultures. *Free Radic Biol Med* 39: S. 1238-48, 2005
- Jakubowski W, Bartosz G.** 2,7-dichlorofluorescein oxidation and reactive oxygen species: what does it measure? *Cell Biol Int* 24: S. 757-60, 2000
- Jeon H, Shipley GG.** Localization of the N-terminal domain of the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem* 275: S. 30465-70, 2000
- Ji Y, Han Y, Diao J, Huang Y, Chen Q, Ferro A.** Inhibition of endothelial nitric oxide generation by low-density lipoprotein is partially prevented by L-arginine and L-ascorbate. *Atherosclerosis* 176: S. 345-53, 2004

- Kim SW, Mintz GS, Escolar E, Ohlmann P, Pregowski J, Tyczynski P, Pichard AD, Satler LF, Kent KM, Suddath WO, Waksman R, Weissman NJ.** The impact of cardiovascular risk factors on subclinical left main coronary artery disease: an intravascular ultrasound study. *Am Heart J* 152: S. 693-12, 2006
- Kugiyama K, Sugiyama S, Ogata N, Oka H, Doi H, Ota Y, Yasue H.** Burst production of superoxide anion in human endothelial cells by lysophosphatidylcholine. *Atherosclerosis* 143: S. 201-4, 1999
- Lafont A.** Basic aspects of plaque vulnerability. *Heart* 89: S. 1262-7, 2003
- Lassegue B, Griendling KK.** Reactive oxygen species in hypertension; An update. *Am J Hypertens* 17: S. 852-60, 2004
- Li H, Forstermann U.** Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol* 190: S. 244-54, 2000
- Li JM, Shah AM.** Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287: S. R1014-R1030, 2004
- Libby P, Ridker PM, Maseri A.** Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 105: S. 1135-43, 2002
- LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: S. 265-75, 1951
- Lusis AJ.** Atherosclerosis. *Nature* 407: S. 233-41, 2000
- Madamanchi NR, Hakim ZS, Runge MS.** Oxidative stress in atherogenesis and arterial thrombosis: the disconnect between cellular studies and clinical outcomes. *J Thromb Haemost* 3: S. 254-67, 2005
- Matute JD, Arias AA, Dinauer MC, Patino PJ.** p40phox: the last NADPH oxidase subunit. *Blood Cells Mol Dis* 35: S. 291-302, 2005
- Mayer B.** Nitric oxide synthases catalyze superoxide formation. *FEBS Lett* 481: S. 304, 2000
- Michelsen KS, Arditi M.** Toll-like receptor signaling and atherosclerosis. *Curr Opin Hematol* 13: S. 163-8, 2006
- Miller YI, Viriyakosol S, Binder CJ, Feramisco JR, Kirkland TN, Witztum JL.** Minimally modified LDL binds to CD14, induces macrophage spreading via TLR4/MD-2, and inhibits phagocytosis of apoptotic cells. *J Biol Chem* 278: S. 1561-8, 2003

- Moore KJ, Freeman MW.** Scavenger receptors in atherosclerosis: beyond lipid uptake. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: S. 1702-11, 2006
- Muzykantov VR.** Targeting of superoxide dismutase and catalase to vascular endothelium. *J Control Release* 71: S. 1-21, 2001
- Myhre O, Andersen JM, Aarnes H, Fonnum F.** Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochem Pharmacol* 65: S. 1575-82, 2003
- Nakajima K, Nakano T, Tanaka A.** The oxidative modification hypothesis of atherosclerosis: the comparison of atherogenic effects on oxidized LDL and remnant lipoproteins in plasma. *Clin Chim Acta* 367: S. 36-47, 2006
- Navab M, Anantharamaiah GM, Reddy ST, Van Lenten BJ, Ansell BJ, Fogelman AM.** Mechanisms of disease: proatherogenic HDL--an evolving field. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2: S. 504-11, 2006
- NCEP.** Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA* 285: S. 2486-97, 2001
- Netea MG, Kullberg BJ, Demacker PN, Jacobs LE, Verver-Jansen TJ, Hijmans A, van Tits LH, Hoenderop JG, Willems PH, Van der Meer JW, Stalenhoef AF.** Native LDL potentiate TNF alpha and IL-8 production by human mononuclear cells. *J Lipid Res* 43: S. 1065-71, 2002
- O'Malley YQ, Reszka KJ, Britigan BE.** Direct oxidation of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein by pyocyanin and other redox-active compounds independent of reactive oxygen species production. *Free Radic Biol Med* 36: S. 90-100, 2004
- Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG.** Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest* 91: S. 2546-51, 1993
- Ohara Y, Peterson TE, Zheng B, Kuo JF, Harrison DG.** Lysophosphatidylcholine increases vascular superoxide anion production via protein kinase C activation. *Arterioscler Thromb* 14: S. 1007-13, 1994
- Ohashi T, Mizutani A, Murakami A, Kojo S, Ishii T, Taketani S.** Rapid oxidation of dichlorodihydrofluorescein with heme and hemoproteins: formation of the fluorescein is independent of the generation of reactive oxygen species. *FEBS Lett* 511: S. 21-7, 2002
- Paoletti R, Gotto AM, Jr., Hajjar DP.** Inflammation in atherosclerosis and implications for therapy. *Circulation* 109: S. III20-III26, 2004

- Possel H, Noack H, Augustin W, Keilhoff G, Wolf G.** 2,7-Dihydrodichlorofluorescein diacetate as a fluorescent marker for peroxynitrite formation. *FEBS Lett* 416: S. 175-8, 1997
- Rader DJ, Pure E.** Lipoproteins, macrophage function, and atherosclerosis: beyond the foam cell? *Cell Metab* 1: S. 223-30, 2005
- Ray R, Shah AM.** NADPH oxidase and endothelial cell function. *Clin Sci (Lond)* 109: S. 217-26, 2005
- Rojas A, Figueroa H, Re L, Morales MA.** Oxidative stress at the vascular wall. Mechanistic and pharmacological aspects. *Arch Med Res* 37: S. 436-48, 2006
- Ross R.** Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340: S. 115-26, 1999
- Royall JA, Ischiropoulos H.** Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells. *Arch Biochem Biophys* 302: S. 348-55, 1993
- Ruan XZ, Moorhead JF, Tao JL, Ma KL, Wheeler DC, Powis SH, Varghese Z.** Mechanisms of dysregulation of low-density lipoprotein receptor expression in vascular smooth muscle cells by inflammatory cytokines. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: S. 1150-5, 2006
- Rudenko G, Deisenhofer J.** The low-density lipoprotein receptor: ligands, debates and lore. *Curr Opin Struct Biol* 13: S. 683-9, 2003
- Rueckschloss U, Galle J, Holtz J, Zerkowski HR, Morawietz H.** Induction of NAD(P)H oxidase by oxidized low-density lipoprotein in human endothelial cells: antioxidative potential of hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor therapy. *Circulation* 104: S. 1767-72, 2001
- Schimmel M, Bauer G.** Selective apoptosis induction in transformed fibroblasts by B cell lines: involvement of reactive oxygen and nitrogen species. *Int J Oncol* 19: S. 299-304, 2001
- Shah PK, Kaul S, Nilsson J, Cercek B.** Exploiting the vascular protective effects of high-density lipoprotein and its apolipoproteins: an idea whose time for testing is coming, part II. *Circulation* 104: S. 2498-502, 2001
- Smirnova IV, Sawamura T, Goligorsky MS.** Upregulation of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) in endothelial cells by nitric oxide deficiency. *Am J Physiol Renal Physiol* 287: S. F25-F32, 2004
- Sohn HY, Gloe T, Keller M, Schoenafinger K, Pohl U.** Sensitive superoxide detection in vascular cells by the new chemiluminescence dye L-012. *J Vasc Res* 36: S. 456-64, 1999
- Spektrum der Wissenschaft.** *Spektrum der Wissenschaft* 7-2002, S. 48-57. Verlagsgesellschaft mbH Heidelberg

- Spiteller G.** Is atherosclerosis a multifactorial disease or is it induced by a sequence of lipid peroxidation reactions? *Ann N Y Acad Sci* 1043: S. 355-66, 2005
- Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW.** A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15: S. 1512-31, 1995
- 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* 320: S. 915-24, 1989
- Stephan ZF, Yurachek EC.** Rapid fluorometric assay of LDL receptor activity by DiI-labeled LDL. *J Lipid Res* 34: S. 325-30, 1993
- Stepp DW, Ou J, Ackerman AW, Welak S, Klick D, Pritchard KA, Jr.** Native LDL and minimally oxidized LDL differentially regulate superoxide anion in vascular endothelium in situ. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: S. H750-H759, 2002
- Stocker R, Keaney JF, Jr.** Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 84: S. 1381-478, 2004
- Stocker R, Keaney JF, Jr.** New insights on oxidative stress in the artery wall. *J Thromb Haemost* 3: S. 1825-34, 2005
- Stoll G, Bendszus M.** Inflammation and atherosclerosis: novel insights into plaque formation and destabilization. *Stroke* 37: S. 1923-32, 2006
- Stone PH.** Evaluating cardiovascular pathophysiology and anatomy in atherosclerosis. *Am Heart Hosp J* 3: S. 187-92, 2005
- Stuehr D, Pou S, Rosen GM.** Oxygen reduction by nitric-oxide synthases. *J Biol Chem* 276: S. 14533-6, 2001
- Sukhanov S, Higashi Y, Shai SY, Itabe H, Ono K, Parthasarathy S, Delafontaine P.** Novel effect of oxidized low-density lipoprotein: cellular ATP depletion via downregulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Circ Res* 99: S. 191-200, 2006
- Sumimoto H, Miyano K, Takeya R.** Molecular composition and regulation of the Nox family NAD(P)H oxidases. *Biochem Biophys Res Commun* 338: S. 677-86, 2005
- Takeuchi M, Yoshitani H, Miyazaki C, Yoshikawa J.** Relationship between the number of coronary risk factors and coronary atherosclerosis assessed by high-frequency transthoracic echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr* 19: S. 1056-62, 2006

- Takeya R, Ueno N, Kami K, Taura M, Kohjima M, Izaki T, Nunoi H, Sumimoto H.** Novel human homologues of p47phox and p67phox participate in activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *J Biol Chem* 278: S. 25234-46, 2003
- Tampo Y, Kotamraju S, Chitambar CR, Kalivendi SV, Keszler A, Joseph J, Kalyanaraman B.** Oxidative stress-induced iron signaling is responsible for peroxide-dependent oxidation of dichlorodihydrofluorescein in endothelial cells: role of transferrin receptor-dependent iron uptake in apoptosis. *Circ Res* 92: S. 56-63, 2003
- Taniyama Y, Griendling KK.** Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension* 42: S. 1075-81, 2003
- Tousoulis D, Charakida M, Stefanadis C.** Endothelial function and inflammation in coronary artery disease. *Heart* 92: S. 441-4, 2006
- Touyz RM.** Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension: what is the clinical significance? *Hypertension* 44: S. 248-52, 2004
- Tziros C, Freedman JE.** The many antithrombotic actions of nitric oxide. *Curr Drug Targets* 7: S. 1243-51, 2006
- Ushio-Fukai M, Alexander RW.** Reactive oxygen species as mediators of angiogenesis signaling: role of NAD(P)H oxidase. *Mol Cell Biochem* 264: S. 85-97, 2004
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J.** Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2006
- Yla-Herttuala S.** Expression of lipoprotein receptors and related molecules in atherosclerotic lesions. *Curr Opin Lipidol* 7: S. 292-7, 1996
- Yung LM, Leung FP, Yao X, Chen ZY, Huang Y.** Reactive oxygen species in vascular wall. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 6: S. 1-19, 2006
- Zhang T, Huang Z, Dai Y, Chen X, Zhu P, Du G.** The expression of recombinant human LOX-1 and identifying its mimic ligands by fluorescence polarization-based high throughput screening. *J Biotechnol* 125: S. 492-502, 2006
- Zmijewski JW, Landar A, Watanabe N, Dickinson DA, Noguchi N, Darley-USmar VM.** Cell signalling by oxidized lipids and the role of reactive oxygen species in the endothelium. *Biochem Soc Trans* 33: S. 1385-9, 2005

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. G. Ertl, Direktor der Medizinischen Klinik und Poliklinik der Universität Würzburg, für die Möglichkeit der wissenschaftlichen Arbeit an seiner Klinik.

Weiterhin möchte ich mich ganz besonders bei meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. J. Galle für das Thema meiner Doktorarbeit und das Ermöglichen dieser wissenschaftlichen Arbeit bedanken.

Ebenfalls großer Dank gebührt Herrn Dr. T. Hansen-Hagge, der mir als Betreuer dieser Arbeit stets hilfreich zur Seite stand und immer ein offenes Ohr für anfallende Probleme hatte. Durch sein hohes Engagement hat er diese Arbeit mit Ideen, Geduld und Erfahrung vorangetrieben und mir das wissenschaftliche Arbeiten näher gebracht.

Zudem möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Nephrologischen Labors (Elke Baumeister, Margarethe Röder, Sylvia Renker und Carmen Bauer) für die gute Zusammenarbeit, die vielen Diskussionen und die freundschaftliche Atmosphäre bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern Renate und Wilfried und meinem Bruder Michael für ihre Geduld und stete Unterstützung auf meinem gesamten Lebensweg.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinem Freund René für die ständige Hilfsbereitschaft und unermüdete Motivation, welche mich nicht nur bei meiner Doktorarbeit ermutigte, bedanken.

Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name	Bauer
Vorname	Tanja
Anschrift	

Geburtsdatum	12.10.1981
Geburtsort	Schweinfurt
Familienstand	ledig
Konfession	evangelisch
Staatsangehörigkeit	deutsch

PRAKTA UND BERUFLICHE ERFAHRUNG

seit 09/2008	Leopoldina Krankenhaus Schweinfurt Neurologische Klinik (Assistenzarztstelle in der Weiterbildung)
08/2007 – 12/2007	Missionsärztliche Klinik Würzburg 3. Tertial (PJ) – Internistische Abteilung
07/2007 – 08/2007	Leopoldina Krankenhaus Schweinfurt Neurologische Abteilung (Praktikum)
04/2007 – 07/2007	Missionsärztliche Klinik Würzburg 2. Tertial (PJ) – Chirurgische Abteilung
11/2006 – 03/2007	Klinikum Aschaffenburg 1. Tertial (PJ) – Neurologische Abteilung
04/2006 – 04/2006	Klinikum Coburg Anästhesiologische Abteilung (Famulatur)
03/2006 – 03/2006	Dermatologische Praxis Dr. Razinkas, Schweinfurt (Famulatur)
09/2005 – 09/2005	AKH Wien Dermatologische Abteilung (Famulatur)

Lebenslauf

- 08/2005 – 09/2005 AKH Wien
Abteilung für Innere Medizin III
(Nephrologie; Famulatur)
- 03/2005 – 04/2005 Universitätsklinik Würzburg
Med. Poliklinik (Hämatologie; Famulatur)
- 03/2004 – 03/2004 Leopoldina Krankenhaus Schweinfurt
Chirurgische Klinik II (Unfallchirurgie; Famulatur)

STUDIUM

- 09/2001 – 06/2008 Studium der Humanmedizin an der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- Ärztliche Prüfung (1,5)

SCHULAUSBILDUNG

- 09/1992 – 07/2001 Walther-Rathenau-Gymnasium, Schweinfurt
Allgemeine Hochschulreife (1,5)
- 09/1988 – 08/1992 Kerschensteiner Grundschule, Schweinfurt

SONSTIGE KENNTNISSE

- 10/2003 – 12/2003 Sanitätshelferausbildung
Johanniter Schweinfurt

Schweinfurt, den 22.03.2010

Tanja Bauer

