

Gabriel Pürstinger Bsc.

Toxizität oxidierter Alkylacyl- und Diacylglycerophosphocholine in kultivierten RAW Makrophagen

Masterarbeit

zur Erlangung des akademischen Grades

Master of Science, MSc

Studienrichtung: Biochemie und Molekulare Biomedizin

Technische Universität Graz

Institut für Biochemie

Betreuer: Ao.Univ.-Prof Dr.phil. Albin Hermetter – Institut für Biochemie

Graz, 2012

Danksagung:

Ich möchte mich zu allererst bei Professor Albin Hermetter für seine sehr gute Betreuung zuerst während meiner Bachelorarbeit und jetzt bei meiner Masterarbeit bedanken.

Weiters danke ich Heidemarie Kayer und Ute Stemmer herzlich für die gute Zusammenarbeit und Betreuung im Labor!

Mein Dank gilt auch allen meinen Freunden und Kollegen in unserer Arbeitsgruppe und am Institut.

Abschließend möchte ich auch noch meinen Eltern für ihre Unterstützung danken.

Deutsche Fassung:

Beschluss der Curricula-Kommission für Bachelor-, Master- und Diplomstudien vom
10.11.2008

Genehmigung des Senates am 1.12.2008

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, andere als die angegebenen Quellen/Hilfsmittel nicht benutzt, und die den benutzten Quellen wörtlich und inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am

(Unterschrift)

Englische Fassung:

STATUTORY DECLARATION

I declare that I have authored this thesis independently, that I have not used other than the declared sources / resources, and that I have explicitly marked all material which has been quoted either literally or by content from the used sources.

.....

date

.....

(signature)

Kurzfassung

Die Aufnahme von oxidiertem LDL (oxLDL) und dessen (Phospho)lipid- Bestandteilen, durch Makrophagen, die Ausbildung von Schaumzellen sowie apoptotischer Zelltod sind Schlüsselereignisse der Arteriosklerose. Für glatte vaskuläre Muskelzellen (VSMC) konnte bereits nachgewiesen werden, dass oxPL toxisch wirken [1].

Es war das Ziel dieser Arbeit, die Auswirkungen von oxidierten Phospholipiden (oxPL) auf Zell-Viabilität und Apoptose von kultivierten Makrophagen zu bestimmen. Untersucht wurden die kurzkettigen Diacyl-oxPL 1-palmitoyl-2-glutaroyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (PGPC) und 1-palmitoyl-2-(5-oxovaleroyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine (POVPC) sowie deren Alkylacyl-Analoga, 1-O-hexadecyl-2-glutaroyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine (E-PGPC) und 1-O-hexadecyl-2-(5-oxovaleroyl)-*sn*-glycero-3-phosphocholine (E-POVPC). Alle untersuchten oxPL induzieren Apoptose in RAW 264.7 Makrophagen. PGPC und E-PGPC, die eine Carboxylgruppe in der *sn*-2 Position tragen, zeigen ähnliche Toxizität. Beide Lipide sind jedoch toxischer als ihre „Gegenstücke“ POVPC und E-POVPC, die eine reaktive Aldehydgruppe in der *sn*-2 Position aufweisen. Zwischen den Diacyl-oxPL und deren Alkylacyl-Analoga gab es keine Unterschiede hinsichtlich der Toxizität. Über welche Mechanismen die oxPL die Apoptose von Makrophagen auslösen ist noch weitgehend unklar. Wir fanden, dass die saure Sphingomyelinase (aSMase) bei diesem Prozess ein Schlüsselenzym darstellt [1]. Die aSMase Aktivität wurde nach Inkubation mit POVPC oder E-POVPC schnell aktiviert. PGPC und E-PGPC zeigten keinen derartigen Effekt. Somit muss ein anderer Mechanismus der toxischen Wirkung dieser Lipide zugrunde liegen. Es gibt Hinweise, dass PGPC und E-PGPC über CD36 und TLR2/6 ROS Produktion in anderen Zellen induzieren [2] [3].

Zusammenfassend bestätigt diese Studie, dass oxPL toxisch auf kultivierte Makrophagen wirken. Das Ausmaß der Apoptose und die Wirkmechanismen hängen von der Struktur der individuellen oxPL ab.

Abstract

The uptake of oxidized LDL (oxLDL) and its (phospho) lipid components by macrophages, the formation of foam cells and apoptotic cell death are hallmarks of atherosclerosis. In vascular smooth muscle cells (VSMC), oxPL have already been shown to be toxic [1].

It was the aim of this study to determine effects of oxidized phospholipids (oxPL) on cell viability and apoptosis in cultured macrophages. Specifically, the short-chain diacyl-oxPL 1-palmitoyl-2-glutaroyl-sn-glycero-3-phosphocholine (PGPC) and 1-palmitoyl-2-(5-oxovaleroyl)-sn-glycero-3-phosphocholine (POVPC) as well as their alkyl-acyl analogs 1-O-hexadecyl-2-glutaroyl-sn-glycero-3-phosphocholine (E-PGPC) and 1-O-hexadecyl-2-(5-oxovaleroyl)-sn-glycero-3-phosphocholine (E-POVPC) were studied. All analyzed oxPL induced apoptosis in RAW 264.7 macrophages. PGPC and E-PGPC, featuring a carboxylic group, showed similar toxicities. However, both compounds were more toxic than their counterparts POVPC and E-POVPC possessing a reactive aldehyde function at the sn-2 position. The detailed mechanism by which oxPL trigger apoptosis in macrophages is not fully understood. We found that acid sphingomyelinase (aSMase) is a key signaling enzyme in this process [1]. aSMase activity was rapidly stimulated after incubation with POVPC or E-POVPC found in this study. PGPC and E-PGPC did not exhibit such an effect. Their toxicity must be due to a completely different mechanism. There is evidence that PGPC and E-PGPC induce ROS production by a CD36 and TLR2/6 dependent pathway in other cells [2] [3].

In summary, this study showed that oxPL are toxic to cultured macrophages. The extent of apoptosis and the pathways by which it is induced, depend on the structure of the individual oxPL.

Inhaltsverzeichnis:

1.	Allgemeiner Teil	1
1.1.	Arteriosklerose:.....	1
1.2.	Oxidierete Phospholipide:	4
1.3.	Scavenger-Rezeptor Klasse B, Cluster of Differentiation 36 (CD36):.....	6
1.4.	Die saure Sphingomyelinase (aSMase):.....	8
2.	Zielsetzung	11
3.	Material und Methoden	12
3.1.	Material:.....	12
3.2.	Zellkultur:	12
3.2.1.	Splitten:.....	13
3.2.2.	Inkubation mit oxidierten Phospholipiden:.....	13
3.3.	Bestimmung der Apoptose durch Fluorescence-activated cell sorting:.....	18
3.3.1.	Planung und Vorbereitung der Zellen:	18
3.3.2.	Fluoreszenzsonden:	20
3.3.3.	Fluorescence-activated cell sorting (FACS):.....	23
3.3.4.	Mögliche Fehlerquellen:	27
3.4.	Bestimmung der Aktivität der sauren Sphingomyelinase:	29
3.4.1.	Funktionsweise des Assays zu Bestimmung der aSMase-Aktivität in RAW 264.7 Makrophagen:.....	29
3.4.2.	Planung und Vorbereitung der Zellen:	30
3.4.3.	Proteinbestimmung nach Bradford:	32
3.4.4.	Sphingomyelinase Assay:.....	33
4.	Ergebnisse	35
4.1.	Toxizität von oxidierten Phospholipiden und Apoptose:	35
4.1.1.	Aussehen der Zellen:.....	35

4.1.2. Bestimmung des Zelltods mittels FACS:	37
4.1.3. Auswirkungen von oxidierten Phospholipiden auf die Apoptose von RAW 264.7 Makrophagen:.....	45
4.2. Bestimmung der Aktivität von sauren Sphingomyelinase:.....	48
5. Diskussion	53
6. Literaturverzeichnis	62
7. Abbildungsverzeichnis	69

1. Allgemeiner Teil

1.1. Arteriosklerose:

Durch Arteriosklerose hervorgerufene Komplikationen gehören in der westlichen Welt zu den häufigsten Todesursachen. Bei dieser Krankheit handelt es sich um eine chronische Entzündung. Hervorgerufen wird diese durch die Interaktion von modifizierten Lipoproteinen mit Makrophagen, glatten Muskelzellen und anderen Zellen der Arterienwand [4]. Die chronische Entzündung führt in ihrem Verlauf zur Ausbildung komplexer Läsionen, Plaques genannt, welche in das vaskuläre Lumen hervorstehen. Im späteren Stadium der Arteriosklerose kann es zum Einreißen des Plaques kommen, was zur Bildung eines Thrombus führt. Die Thrombose kann einen Herzinfarkt oder Schlaganfall auslösen [5] [6].

Bevor es im Verlauf der Arteriosklerose zur Plaque-Bildung kommt, bilden sich Fettstreifen (fatty streaks) in der Intima von Arterien aus. Eine steigende Anzahl an Makrophagen und die Akkumulation von oxidierten "low-density lipoprotein" (LDL) in diesen Zellen sind die Hauptauslöser der „fatty streak“ Entstehung. Eine oxidative Modifikation der Lipidkomponenten sowie des Apolipoprotein B von LDL spielen eine wesentliche Rolle bei der Aufnahme von LDL durch Makrophagen im Rahmen der „fatty streak“ Bildung [7]. Die oxidative Modifikation von LDL unterliegt einer gewissen Schwankungsbreite. Sind nur die Lipoproteine oxidiert, kann das LDL-Partikel noch vom LDL-Rezeptor erkannt werden. In diesem Fall spricht man von minimal modifiziertem LDL (mmLDL) [5]. Sind die Proteinkomponenten des LDL oxidativ fragmentiert und die Lysingruppen kovalent an Bruchstücke von oxidierten Phospholipiden gebunden, spricht man von extensiv modifiziertem LDL [7]. Dieses wird nicht mehr vom LDL-Rezeptor erkannt, dafür aber von Scavenger-Rezeptoren von Makrophagen und glatten Muskelzellen aufgenommen. Zur enzymatischen und nicht-enzymatischen LDL-Oxidation kommt es erst, nachdem dieses vom vaskulären Volumen in die Arterienwand eingedrungen ist [8] [9]. Verschiedene oxidative Systeme spielen eine Rolle bei der

LDL-Oxidation. Für die 15-Lipoxygenase (15-LO) [10] und die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) [11] [12] konnte bereits gezeigt werden, dass sie am Verlauf der Arteriosklerose beteiligt sind.

Die Anwesenheit von proinflammatorischem oxLDL in der Intima führt zur verstärkten Einwanderung von Monozyten und deren Differentierung zu Makrophagen. Diese Entzündungsreaktion dient eigentlich dem Abbau des oxLDL und apoptotischer Zellen. Die Anreicherung von Makrophagen und deren Aufnahme von oxLDL führt allerdings langfristig zur Entwicklung atherosklerotischer Läsionen [4]. Dass Makrophagen eine essenzielle Rolle bei der Entwicklung der Arteriosklerose spielen, kann man z.B. an der osteopetrotischen Maus (op Maus) sehen. Dieses Tier weist eine natürliche Mutation im Gen des macrophage colony stimulating factor (M-CSF) auf und besitzt kaum Makrophagen. Es ist extrem resistent gegen die Entwicklung von Arteriosklerose [13] [14].

Die normale Aufnahme von LDL über den LDL-Rezeptor unterliegt einer Feedback-Regulierung [15]. oxLDL wird allerdings über Scavenger-Rezeptoren bzw. Phagozytose aufgenommen [16]. Für diesen Aufnahmemechanismus existiert keine von LDL bzw. Cholesterin abhängige Regulation. Es kommt zu einer ungehemmten Aufnahme von oxLDL und einer Anreicherung von Lipiden und Cholesterinestern in den Makrophagen. Die so entstehenden Makrophagen-Schaumzellen tragen maßgeblich zur Entstehung von „fatty streaks“ bei und bilden einen wichtigen Bestandteil sowohl von frühen als auch von späten arteriosklerotischen Läsionen.

Der Übergang zwischen „fatty streaks“ und komplexeren, arteriosklerotischen Läsionen wird markiert durch die Migration von glatten Muskelzellen (SMC) aus der arteriellen Media in die Intima. Die SMCs in der Intima proliferieren und können ebenfalls oxLDL aufnehmen und zu Schaumzellen werden. Die von den SMCs produzierten extrazellulären Matrixproteine führen zur Ausbildung einer fibrösen Abkappung [6] [7] [17]. In dieser Phase entwickelt die Arteriosklerose die Merkmale einer chronischen Entzündung. Die zytokinhaltige Läsionsmatrix und Bestandteile des oxLDL erhöhen die Zahl apoptotischer und nekrotischer Makrophagen und SMCs und führen zur Bildung eines nekrotischen Kerns [18] [4] [19] [20]. Bei einer arteriosklerotischen Läsion in

diesem Stadium spricht man von einem Plaque. Ist die fibröse Abkappung nur sehr dünn, bzw. wird sie durch Absterben der Zellen dünner, kann der Plaque aufreißen. Dies setzt den Inhalt des nekrotischen Kerns wie Lipide und Thromboplastin, ins Blut frei und initiiert die Blutgerinnung und Bildung eines Thrombus [4]. Löst sich dieser Thrombus, kann dies zu einem Herzinfarkt oder einem Schlaganfall führen.

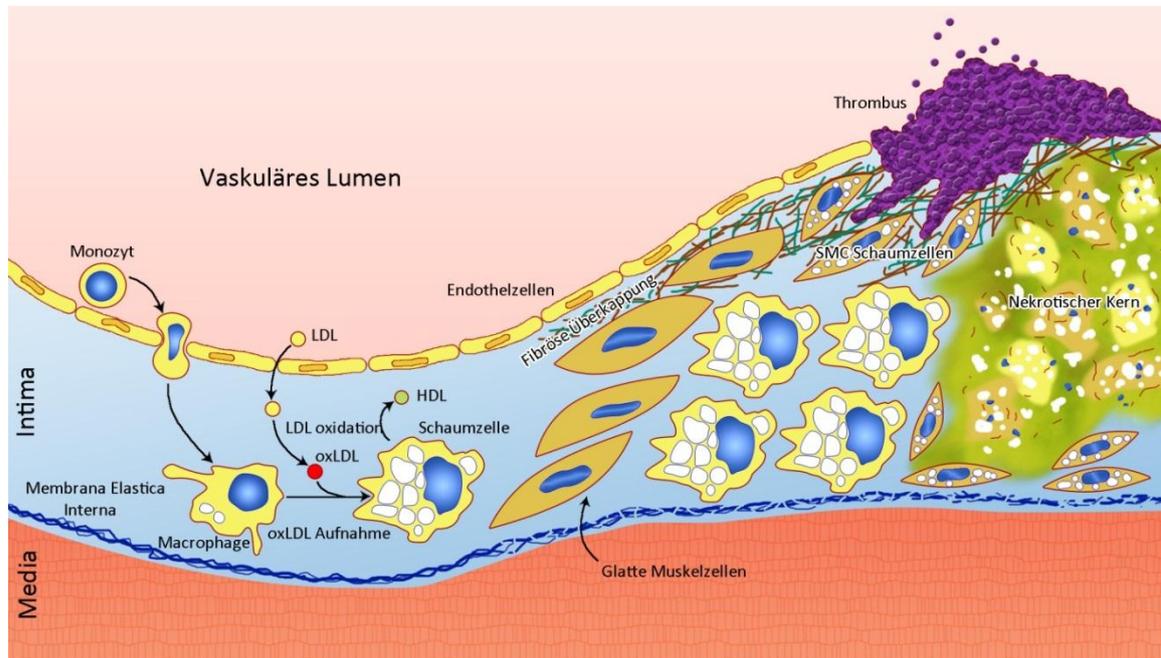


Abbildung 1: Atherosklerose, Überblick. Ein initiierender Schritt ist die Oxidation von LDL im subendothelialen Bereich. Monozyten migrieren in die Intima und differenzieren zu Makrophagen. Aus diesen bilden sich, durch die Aufnahme von oxLDL über Scavenger-Rezeptoren, Schaumzellen. Es kommt zu einer chronischen Entzündung. Aus der Media migrieren glatte Muskelzellen. Sie sekretieren extrazelluläre Matrixproteine und formen eine fibröse Überkappung. Nekrose und Apoptose der Schaumzellen führen zur Ausbildung eines nekrotischen Kerns. Reißt der Plaque, führt dies zur Koagulation des Blutes und Ausbildung eines Thrombus. Modifiziert nach [4]

1.2. Oxidierte Phospholipide:

Bei der oxidativen Modifikation von LDL zu oxLDL kommt es unter anderem zu der Oxidation der im LDL-Partikel enthaltenen Phospholipide. Die dabei entstehenden oxidierten Phospholipide (oxPL) spielen eine wichtige Rolle bei der biochemischen Wirkung von oxLDL und dessen Auswirkung auf den Verlauf der Arteriosklerose [21] (Abbildung 2).

Bei der Oxidation von LDL-Partikeln kommt es auch zur Oxidation der darin enthaltenen Phospholipide. Das häufigste natürlich vorkommende Phospholipid ist Phosphatidylcholin (PC). Die meisten oxPL haben somit auch eine PC-Kopfgruppe, obwohl auch Phosphatidylethanolamin (PE) vorkommen kann [22]. Tierische und menschliche Phospholipide sind meistens so aufgebaut, dass die Fettsäure der Sn-1 Position gesättigt ist, die Sn-2 Fettsäure jedoch ein- oder mehrfach ungesättigte (PUFA) ist. PUFAs lassen sich sehr leicht oxidieren, weshalb die meisten oxPL Modifikationen der Sn-2 Position zeigen [21]. Eine häufig vorkommende PUFA ist Arachidonsäure, wie zum Beispiel in dem Phospholipid PAPC (Abbildung 3 A). Unterschiedliche oxidative Modifikationen und Folgereaktionen führen zu einer Vielzahl an möglichen oxPL. Im Folgenden wird nur auf die für diese Arbeit relevanten oxPL PGPC, E-PGPC, POVPC und E-POVPC eingegangen. Einen sehr guten Überblick über die möglichen oxPL verschafft das Review von Fruhwirth und Loidl 2007 [21].

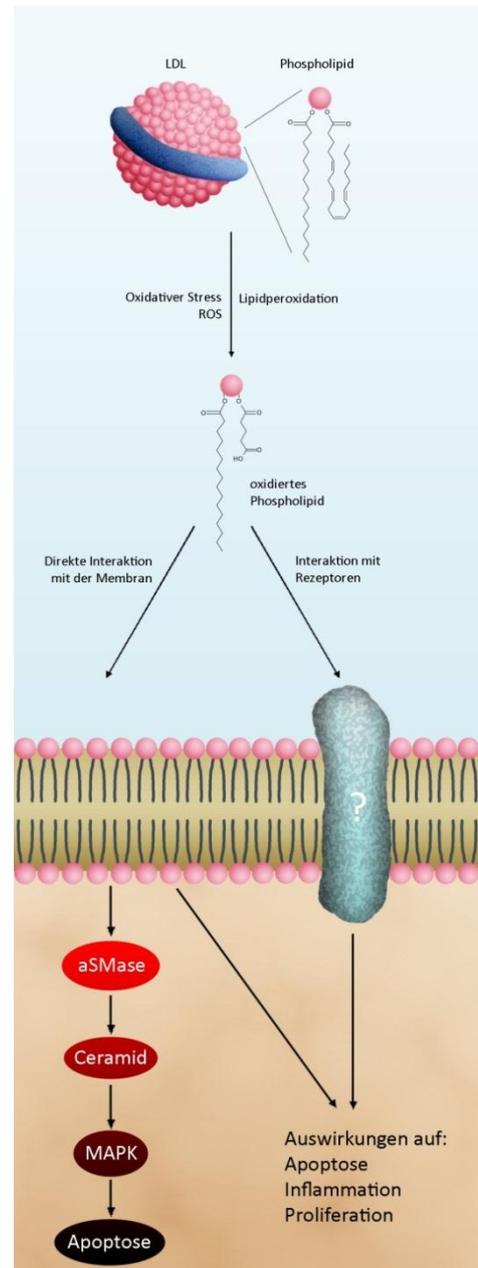


Abbildung 2: Oxidierte Phospholipide (oxPL) gehören zu den biochemisch aktiven Bestandteilen von oxLDL.

Die ungesättigten Kohlenwasserstoffe der Arachidonsäure bilden unter oxidativen Bedingungen sehr leicht Hydroperoxide. Die Reduktion und der Abbau dieser führt zu oxPL mit stark verkürzten (5-7 Kohlenstoffe) Fettsäuregruppen in der Sn-2 Position, sogenannten „truncated oxPLs“ [21]. Zwei mögliche Produkte dieser Oxidationsreaktion mit PAPC als Ausgangslipid sind 1-palmitoyl-2-(5'-oxo-valeroyl)-Sn-glycero-3-phosphocholine (POVPC) und 1-palmitoyl-2-glutaryl-Sn-glycero-3-phosphocholine (PGPC) (Abbildung 3A). Bei beiden ist die Sn-2 Fettsäurekette stark verkürzt und enthält nur mehr 5 Kohlenstoffatome. Der Unterschied zwischen POVPC und PGPC besteht in der ω -Gruppe. POVPC besitzt eine Aldehyd-, PGPC eine Carboxyl-Gruppe. Die Carboxylgruppe ist chemisch nicht reaktiv. Die Aldehydgruppe ermöglicht es dem POVPC Schiff Basen-Bindungen mit Proteinen und Aminophospholipiden zu bilden [23].

Beide oxPL werden mit Atherosklerose in Verbindung gebracht und gehören zu den biologisch und chemisch wirksamen Bestandteilen von oxLDL [21] [1] [24].

Etherlipide sind natürlich vorkommende Phospholipide, welche sich von normalen Phospholipiden in der Sn-1 Position unterscheiden. Die Sn-1 Kohlenwasserstoffkette ist nicht über eine Acyl- sondern durch eine Ether-Gruppe gebunden. Man spricht auch von Alkylacyl-Phospholipiden im Gegensatz zu Diacyl-Phospholipiden. Auf die Oxidationsreaktion der ungesättigten Sn-2 Gruppe wirkt sich dies grundsätzlich nicht aus [25]. Etherlipide können die „gleichen“ Oxidationsprodukte wie normale Phospholipide bilden. Es gibt somit natürlich vorkommende Analoga von POVPC und PGPC, welche in der Sn-1 Position eine Alkylgruppe aufweisen. Man spricht dann von Ether-POVPC (E-POVPC) und Ether-PGPC (E-PGPC) (Abbildung 3B).

In LDL weisen nur 0,25-0,5% der Phosphatidylcholine eine Alkylbindung in der Sn-1 Position auf [26]. Warum oxidierte Etherlipide (oxE-PL) doch eine Rolle in der Toxikologie von oxLDL spielen können, sieht man, wenn man sie mit dem plättchenaktivierenden Faktor (PAF) vergleicht (Abbildung 3B). Die PC-Kopfgruppe und die kurze Sn-2 Acylgruppe, welche oxPL und oxE-PL gemeinsam haben, sind essentiell für eine Bindung an den PAF-Rezeptor (PAFR). Die Sn-1 Ethergruppe führt bis zu einer 800fach stärkeren Interaktion mit dem PAFR [27], wodurch auch die sehr geringen

Mengen an oxE-PL merkbare Auswirkungen über die PAFR Signalkaskaden haben könnten.

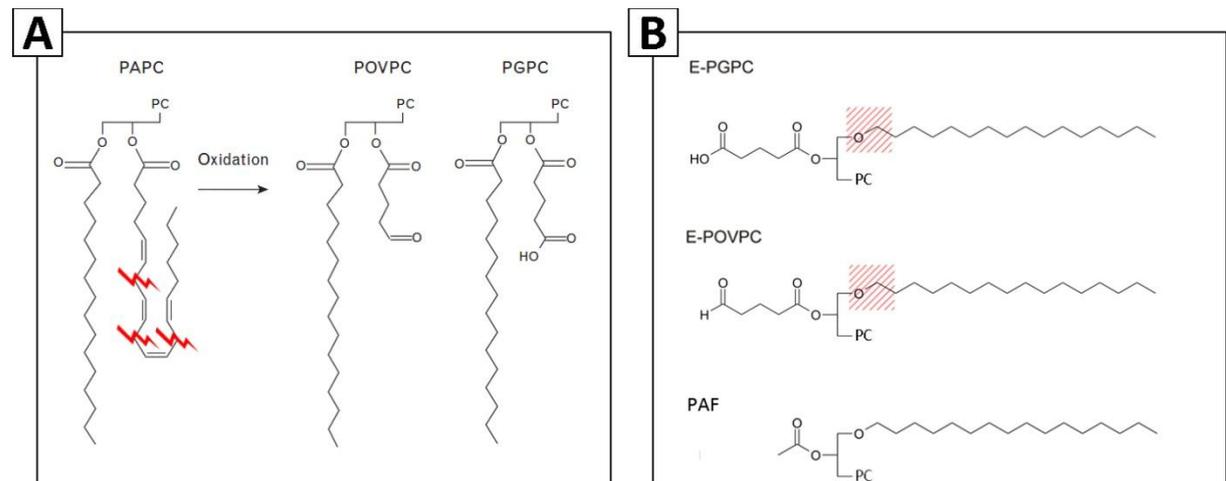


Abbildung 3: Strukturen von oxidierten Phospholipiden.

PC = Phosphocholin

A: Peroxidation und Abbau der ungesättigten Kohlenwasserstoffe in PAPC während der Oxidation von LDL führen zu „truncated PCs“, oxPLs mit sehr kurzen Sn-2 Fettsäureresten. Zwei Produkte dieser Reaktion sind die oxPL 1-palmitoyl-2-(5'-oxo-valeroyl)-Sn-glycero-3-phosphocholine (POVPC) und 1-palmitoyl-2-glutaryl-Sn-glycero-3-phosphocholine (PGPC). Die oxPL unterscheiden sich in ihrer Sn-2 ω -Gruppe. Bei PGPC ist dies eine Carboxylgruppe. POVPC besitzt eine Aldehydgruppe, welche dieses oxPL chemisch reaktiv macht.

B: Natürlich vorkommende Ether-Lipide, welche in der Sn-1 Position eine Alkyl- statt einer Acyl-Gruppe haben, können unter oxidativen Bedingungen dem PAF ähnliche Phospholipide bilden.

1.3. Scavenger-Rezeptor Klasse B, Cluster of Differentiation 36 (CD36):

Ein wichtiger Schritt in der Bildung atherosklerotischer Läsionen ist die Entwicklung von Makrophagen zu Schaumzellen durch die ungehemmte Aufnahme von oxLDL. Nicht modifiziertes LDL wird über den LDL-Rezeptor aufgenommen und unterliegt einer Feedback-Regulierung [15]. Oxidativ modifiziertes LDL wird auch von Scavenger-Rezeptoren erkannt [16]. Die oxLDL Aufnahme über Scavenger-Rezeptoren unterliegt keiner Regulierung, wodurch es zu vermehrter Einlagerung von Cholesterin in den Makrophagen und somit zur Bildung von Schaumzellen kommt [4].

Scavenger-Rezeptor Klasse B Cluster of Differentiation 36 (CD36) ist ein wichtiger Rezeptor für die Interaktion von oxLDL mit Makrophagen im Verlauf der Arteriosklerose.

CD36 besteht aus 471 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 53 kDa [28]. Der Rezeptor liegt stark glykosyliert vor, was möglicherweise als Schutz vor Proteinasen dient, die in Lysosomen und entzündetem Gewebe vermehrt vorkommen [29]. C-terminal befindet sich eine Region aus 27 hydrophoben Aminosäuren, welche eine Transmembrandomäne bilden. Eine zweite Transmembrandomäne befindet sich in einem N-terminalen, nicht abgetrennten Signalpeptid. Der Großteil des Proteins ist, bis auf zwei kurze (9-13 Aminosäuren lang) zytoplasmische Tails, extrazellulär [30].

CD36 kolokalisiert an der Zelloberfläche mit Caveolen genannten Mikrodomänen [31]. Caveolen sind an der Clathrin-unabhängigen Endozytose und an der Signalübertragung beteiligt [32].

oxLDL kann von CD36 anhand von oxidierten Phospholipiden erkannt werden. Oxidative Modifizierung kann bei den in LDL vorhandenen Phospholipiden zu einer Unzahl an oxidierten Produkten führen. Welche Veränderungen welcher Phospholipide von CD36 erkannt werden, wurde von Gao et al. 2010 gezeigt. So muss die Sn-1 Kette intakt und hydrophob sein. Die Kopfgruppe muss eine hydrophile Phosphocholin- oder Phosphatidylsäuregruppe sein. In der Sn-2 Position ist es notwendig, dass die Kette verkürzt und polar ist. Enthält die Sn-2 Kette eine negativ geladene Carboxylgruppe, erhöht dies die Bindungsaffinität.

Neben der ungehemmten Aufnahme von oxLDL und den daraus folgenden Implikationen in der Schaumzellenbildung besteht außerdem die Möglichkeit, dass CD36 durch oxPL aktivierte Signalkaskaden auslöst [33]. CD36 fehlen die klassischen Signaldomänen (Kinase, Phosphatase, G-Proteine Bindestelle, Scaffolding Domänen). Die C-terminale zytoplasmische Kette (13 Aminosäuren groß) enthält allerdings ein CXCX5K Motiv, welches Homologe in CD4 und CD8 hat und mit Signalmolekülen interagieren kann. Silverstein et al. konnten zeigen, dass diese Sequenz mit der MAP-Kinase-Kinase, MEKK2, interagiert und dies möglicherweise ein Grund für die Aktivierung der MAP-Kinasen JNK1 und JNK2 durch oxLDL in Makrophagen ist [33]. CD36 muss auch nicht zwingend alleine für die Signalübertragung verantwortlich sein. CD36 kann Komplexe mit anderen Rezeptoren, zum Beispiel aus der Familie der Toll-like Rezeptoren bilden [2]. Es lässt sich somit nicht

ausschließen, dass CD36 auch über die Aufnahme von oxLDL hinaus eine Rolle in der Entwicklung von Makrophagen während der Atherosklerose spielt.

1.4. Die saure Sphingomyelinase (aSMase):

Im späteren Verlauf der Atherosklerose, wenn sich aus den „fatty streaks“ atherosklerotische Läsionen bilden, beginnt die Apoptose von Makrophagen-Schaumzellen eine immer wichtigere Rolle zu spielen. Das Sterben von Schaumzellen (Makrophagen und VSMCs) führt zur Bildung des nekrotischen Kerns und kann die fibröse Überkappung schwächen, was die Thrombusentstehung begünstigt.

Ein Enzym, welches im Zusammenhang mit oxidierten Phospholipiden und Atherosklerose immer wieder genannt wird, ist die saure Sphingomyelinase (aSMase) [24] [1].

aSMasen sind Enzyme, welche den Abbau von Sphingomyelin zu Ceramid katalysieren. Ceramid ist ein wichtiger Lipid-Botenstoff und hat Auswirkungen auf die Apoptose, Differenzierung und Proliferation [34] [35] [36]. Es gibt drei Hauptgruppen von Sphingomyelinasen: Die saure Sphingomyelinase (aSMase), die neutrale Sphingomyelinase (nSMase) und die basische Sphingomyelinase (bSMase). Das pH-Optimum der sauren Sphingomyelinase liegt bei etwa pH 5. Rekombinante aSMase Proteine sind 72 kDa groß. Reinigt man die aSMase hingegen aus humanem Gewebe auf, findet man 75 kDa Proteine, welche sich hinsichtlich ihrer Aktivität allerdings nicht unterscheiden [37].

In der Zellmembran zeigt die aSMase eine hohe Affinität zu Cholesterin-Raft-Mikrodomänen, welche reich an Sphingomyelin sind [38]. Dort katalysiert es die Bildung von Ceramid, welches, verglichen mit Sphingomyelin, eine geringere Affinität zum Cholesterin aufweist [39] und deswegen eigene Rafts bildet [40] (Abbildung 4).

Welcher Mechanismus zur Aktivierung der aSMase führt, ist noch nicht hinreichend genau bekannt und Gegenstand der Forschung [41]. Jedoch konnte bereits gezeigt werden, dass die Stimulation des Oberflächenrezeptors CD95 zu einem raschen Anstieg von durch aSMase produziertem Ceramid führt [42]. Die Rezeptor-vermittelte Aktivierung führt zur Translokation der aSMase in den äußeren Layer der Plasmamembran [43]. Die Herkunft der aSMase ist nicht genau gesichert. Es wird vermutet, dass intrazelluläre Vesikel mit der Plasmamembran verschmelzen, was innerhalb weniger Sekunden geschehen kann [44]. Ebenfalls wird derzeit die Protein Kinase C- δ (PKC δ) untersucht, welche auch, durch Phosphorylierung an S508, die Aktivierung und Translokation der aSMase bewirken könnte [45]. Möglich ist auch eine Aktivierung der aSMase durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS) [46]. Der Mechanismus, welcher diese Aktivierung verursacht, ist noch unklar. Ein Modell schlägt eine Oxidation des C-terminalen Endes der aSMase als Ursache vor [47].

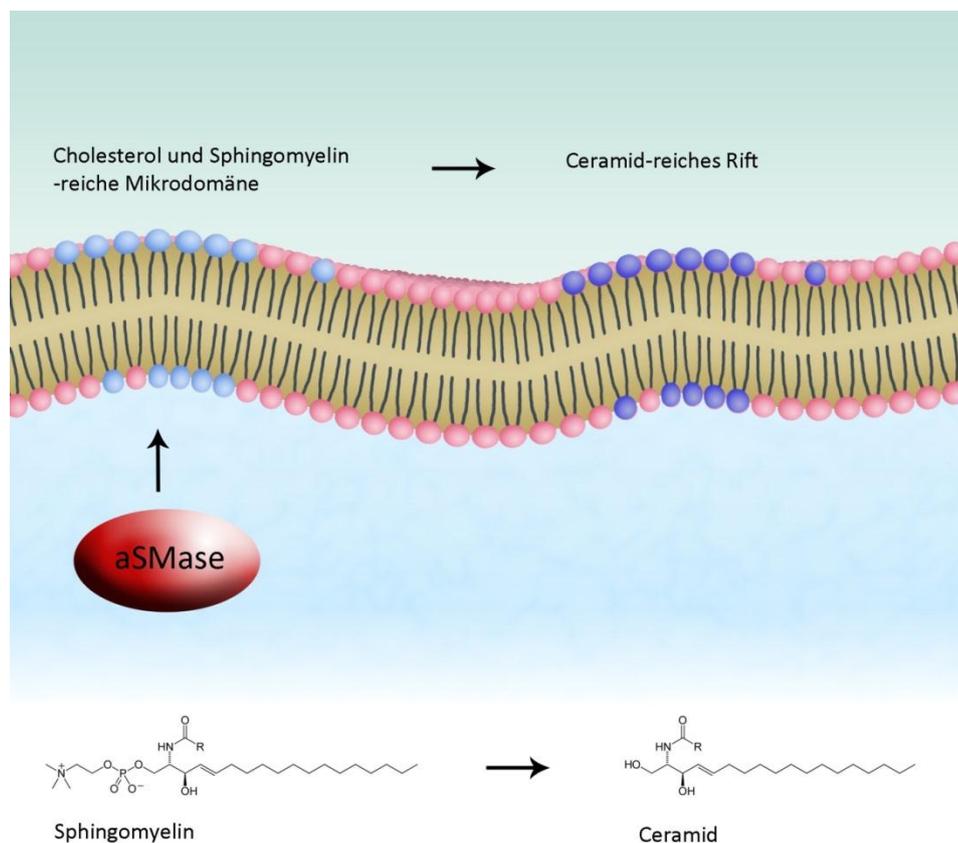


Abbildung 4: aSMase wird von oxPL aktiviert. Der genaue Mechanismus ist noch unbekannt. Die aSMase hydrolysiert Sphingomyelin zu Ceramid. In den Membranen bilden sich Ceramid-reiche Domänen.

Das von der sSMase gebildete Ceramid ist ein wichtiger sekundärer Botenstoff in der Apoptose [48]. Eine Reihe von an der Apoptose beteiligten Proteinen konnte bisher identifiziert werden, welche direkt oder indirekt von Ceramid beeinflusst werden (Abbildung 5).

Dazu gehört der Kinase-Suppressor von RAS (KSR), eine Ceramid-aktivierte Proteinkinase, welche Raf mittels Phosphorylierung des Threonins 269 auf Raf-1 aktiviert [49]. Anschließend führt dies zur Apoptose über die Aktivierung der MAP-Kinasen [50].

Ceramid steigert direkt die Aktivität von PKC ζ gegenüber hnRNPA1, welcher alternatives Splicing reguliert [51].

Die Aktivität der Serin/Threonin Protein Phosphatase PP2A wird durch Ceramid ebenfalls gesteigert [52]. PP2A dephosphoryliert Akt/PKB, welches dadurch inaktiviert wird und nicht mehr anti-apoptotisch wirkt [53]. Dies ist zur Aktivierung der apoptotischen Proteine BAD und Caspase 9 notwendig [54] [55]. Bcl-2, ein ebenfalls anti-apoptotisches Protein, wird von PP2A auch durch Dephosphorylierung inaktiviert [56]. Zusätzlich senkt PP2A die Aktivität von PKC α , welches Bcl-2 phosphoryliert [48].

Ceramid interagiert direkt mit Cathepsin D und induziert dessen autokatalytische Proteolyse in die aktive 48/32-kDa Form [57].

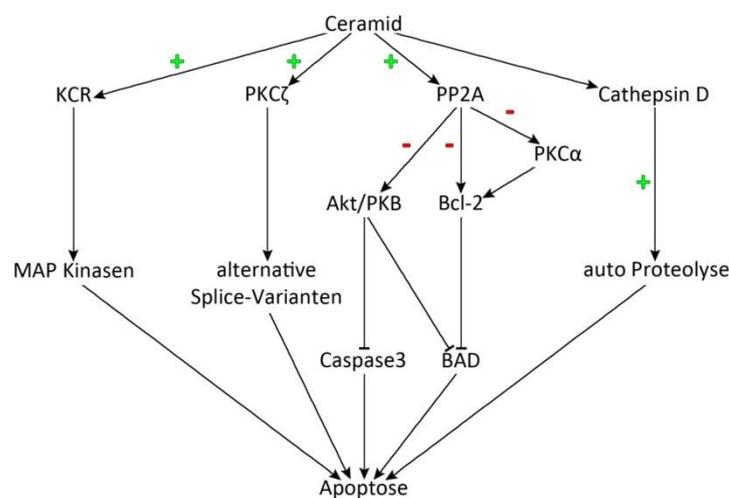


Abbildung 5: Ceramid ist ein wichtiger sekundärer Botenstoff und kann Apoptose induzieren. Ceramid aktiviert verschiedene Proteine, welche entweder direkt oder indirekt die Apoptose steigern.

2. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Bestimmung der Toxizität von oxidierten Phospholipiden in kultivierten RAW Makrophagen. Oxidierte Phospholipide (oxPL) sind Bestandteile von oxidiertem LDL (oxLDL). oxLDL gilt als initiiender Faktor bei der Ausbildung von Fettstreifen und wird wie oxPC in arteriosklerotischen Läsionen gefunden [4]. In vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC) konnte bereits nachgewiesen werden, dass oxPL apoptotische Signalkaskaden initiieren [1]. Es lag somit Nahe, mögliche Auswirkungen von oxPL auf die Viabilität und den möglichen Zelltod von Makrophagen zu untersuchen.

Bei der Oxidation von LDL kommt es zur Bildung einer Vielzahl an möglichen oxPL [21]. Aufgrund der chemischen Unterschiede der einzelnen oxPL ist anzunehmen, dass die Wirkung von oxLDL auf Makrophagen nicht nur auf einem speziellen Mechanismus basiert, sondern von mehreren Signalen abhängt. Um definierte Informationen auf molekularer Basis zu erhalten, wurde in dieser Arbeit nicht mit oxLDL oxPL Gemischen gearbeitet, sondern mit chemisch definierten oxPL. Im Zentrum des Interesses standen sogenannte „truncated phospholipids“. Diese Verbindungen enthalten eine oxidativ verkürzte sn-2 Acylkette mit funktionellen Gruppen am ω -Ende. Je nach Art dieser Gruppe können oxPL chemische und/oder physikalische Wechselwirkungen mit anderen Biomolekülen eingehen.

Wir fanden, dass die chemische Struktur der oxPL für die toxische Wirkung auf Makrophagen entscheidend war. aSMase konnte als Schlüsselenzym identifiziert werden. Es ist an der Apoptose durch sn-2-Aldehydo-oxPL beteiligt. Eine Rolle in der Toxizität von sn-2-Carboxyl-oxPL ist hingegen unwahrscheinlich.

3. Material und Methoden

3.1. Material:

Die oxidierten Phospholipide PGPC und POVPC, sowie ihre Alkylacylderivate, wurden in unserem Labor synthetisiert, wie in (Moumtzi, et al. 2007) beschrieben. Organische Lösungsmittel und alle anderen Chemikalien wurden von Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland), Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) oder Merck (Darmstadt, Deutschland) gekauft. Materialien für die Zellkultur wurden entweder von Sarstedt (Nürnbrecht, Deutschland) oder Greiner (Kremsmünster, Österreich) gekauft. Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, 4,5 g/L Glucose) mit bzw. ohne Phenolrot, hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum, Vybrant® apoptosis assay kit#2 (V-13241), und Staurosporin wurden von Invitrogen (Leek, Niederlande) gekauft. PBS und Medien Zusätze wurden von PAA (Linz, Österreich) gekauft. Puffer und Waschflüssigkeiten für die Durchflusszytometrie und FACS-Röhrchen wurden bei BD bioscience (Heidelberg, Deutschland) gekauft.

3.2. Zellkultur:

Verwendet wurde die Makrophagen-ähnliche Zelllinie RAW 264.7 (ATCC No. TIB-71, American Type Culture collection, Rockville, MD, USA). Als Wachstumsmedium diente Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (4,5 g/L Glucose, 25 mM HEPES, 4 mM L-Glutamin, ohne Natriumpyruvat) versetzt mit 10% hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (10% FCS) und 100 U/ml Penicillin/Streptomycin (1% SP) (Sofern nicht explizit anders erwähnt, bezieht sich der Ausdruck "Medium" auf diese Mischung). Die Zellen wurden bei 37°C in feuchter CO₂ (5%)-Atmosphäre in 75 cm²-Flaschen mit 20 ml Medium kultiviert.

3.2.1. Splitten:

Um eine gesunde Zellpopulation beizubehalten, wurden die Makrophagen im Abstand von 3 bis 4 Tagen (montags und freitags) im Verhältnis 1:6 gesplittet. Bei 4 Tagen Wachstumszeit wurde nach 2 Tagen das Medium gewechselt. Splitten im Verhältnis 1:3 führte zu einer konfluenten Zellpopulation nach 2 Tagen, ohne Medium zu wechseln. Wurde die Population 1:2 gesplittet, erhält man nach 2 Tagen einen sehr konfluenten Zellrasen, geeignet für Experimente, bei denen mehr Makrophagen benötigt werden. Zuerst wurde in neue 75 cm²-Flaschen 14 ml (1:2 Splitten), 16 ml (1:3 Splitten), bzw. 18 ml (1:6 Splitten) Medium vorgelegt. Von den konfluent gewachsenen Zellen wurde das alte Medium vorsichtig abgesaugt und 12 ml frisches Medium zugegeben. Darin wurden die Makrophagen vorsichtig von der Flasche gescraped und leicht resuspendiert. 6 ml (1:2 splitten), 4 ml (1:3 splitten), bzw. 2 ml (1:6 splitten) der Zellsuspension wurden langsam direkt in das vorgelegte Medium der vorbereiteten Flaschen gegeben. Hierbei musste besonders darauf geachtet werden, dass die Zellsuspension in das Medium getropft wird und nicht auf die Flasche, um eine gleichmäßige Verteilung der Makrophagen auf der Oberfläche zu gewährleisten. Die Flaschen wurden verschlossen, leicht geschwenkt und anschließend in den Brutschrank gestellt.

3.2.2. Inkubation mit oxidierten Phospholipiden:

3.2.2.1. Bestimmung der Zellzahl:

oxLDL, mmLDL und oxidierte Phospholipide zeigen unterschiedliche, konzentrationsabhängige Effekte auf Makrophagen. Um die Konzentration der oxidierten Phospholipide pro Zelle gleich zu halten und reproduzierbare Ergebnisse zu bekommen, wurden bei den Experimenten nicht nur die Lipidkonzentration, sondern auch die Zellzahl konstant gehalten. Hierfür wurde immer die gleiche Menge an Zellen ausgesät: $1,3 \cdot 10^6$ Zellen/ml. Um diese Konzentration einstellen zu können, wurde zuerst die Zellzahl der Ausgangskultur mithilfe des Invitrogen Countess[®] Automated Cell Counter bestimmt. In einem Zentrifugenröhrchen wurden 12 ml Medium ohne

Phenolrot vorgelegt. Das alte Medium der konfluenten Ausgangskultur wurde abgesaugt, 12 ml frischem Medium ohne Phenolrot zugegeben und die Zellen darin gescraped. Die Zellsuspension wurde in das Zentrifugenröhrchen überführt und vorsichtig durchmischt. Die daraus resultierende Verdünnung erwies sich als optimal für den Messbereich des Invitrogen Countess® Automated Cell Counter (1×10^4 Zellen/ml – 1×10^7 Zellen/ml). 15 μ l der Zellsuspension wurden in einem Eppendorf Röhrchen mit 15 μ l Trypanblau 0,4% von Invitrogen vermischt. Die daraus resultierende 0,2%-Trypanblaulösung kann die Zellmembran lebender Zellen nicht durchdringen und färbt nur die toten Zellen, womit die Viabilität der Zellen bestimmt wurde. Jeweils 10 μ l dieser Mischung wurden in die beiden Messkammern einer Invitrogen Countess® Cell Counting Chamber Slide gegeben und beide Kammern mit dem Invitrogen Countess® Automated Cell Counter gemessen. Das Ergebnis liegt als „lebende Zellen/ml“ und „% Viabilität“ (sollte um 95% liegen) vor und berücksichtigt bereits die 1:1-Verdünnung mit Trypanblau. Es gibt somit direkt die Konzentration im Zentrifugenröhrchen an. Aus den beiden Messungen wurde der Mittelwert gebildet. Dieser wurde verwendet, um den Verdünnungsfaktor für $1,3 \times 10^6$ lebende Zellen/ml zu bilden. Verdünnt wurde in einem zweiten Zentrifugenröhrchen. Die Menge, welche hergestellt wurde, ergab sich aus den geplanten Experimenten.

3.2.2.2. Aussäen in 24 Well Plates:

Verwendet wurden 24 Well Plates mit einer Fläche von $1,88 \text{ cm}^2$ pro Well. Um diese Fläche zu bedecken, wurden 500 μ l Medium benötigt. Durch die bei der Zellmessung hergestellte Verdünnung von $1,3 \times 10^6$ Zellen/ml ergaben sich 650000 Zellen pro Well. Nach 19h-20h im Brutschrank waren die Zellen bereit zur Inkubation mit Lipiden.

3.2.2.3. Aussäen in 6 Well Plates:

Verwendet wurden 6 Well Plates mit einer Fläche von $9,6 \text{ cm}^2$ pro Well. Um diese Fläche zu bedecken, wurden 2 ml Medium benötigt. Daraus ergeben sich, bei einer Konzentration von $1,3 \times 10^6$ Zellen/ml, $2,6 \times 10^6$ Zellen pro Well. Nach 19h-20h im Brutschrank waren die Zellen bereit zur Inkubation mit Lipiden.

3.2.2.4. Vorbereiten der oxidierten Phospholipide:

Die benötigte Menge an oxidierten Phospholipiden war abhängig von der Art des Experimentes und der Anzahl an Proben.

FACS-Experimente in 24 Well Plates benötigten eine Konzentration von 50 μM in 400 μl pro Well, was einer Absolutmenge an Lipid von 20 nmol entspricht. Normalerweise wurde von jedem oxidierten Phospholipid mehr als ein Well inkubiert. Die vorzubereitende Menge eines Lipids für ein FACS-Experiment ergab sich also aus (Anzahl der mit diesem Lipid inkubierten Wells + 1) * 20 nmol. Es wurde oxPL für ein zusätzliches Well vorbereitet, um Fehler bei der Inkubation des letzten Wells zu minimieren.

Experimente zur Bestimmung der aSMase-Aktivität in 6 Well Plates benötigten eine Konzentration von 25 μM in 2 ml pro Well. Dies entspricht einer Absolutmenge von 50 nmol. Wie bei den FACS-Experimenten wurde auch hier etwas mehr oxPL als benötigt vorbereitet. Wegen der größeren Lipidmenge pro Well war es allerdings nicht nötig ein zusätzliches Extra-Well vorzubereiten.

Die oxidierten Phospholipide wurden vom Lösungsmittel im N_2 -Strom befreit und unter N_2 Atmosphäre bei -20°C in 1,5 ml Gewindefläschchen-braun gelagert. Um eine bestimmte Menge an oxPL zu entnehmen, wurde dieses in einem geeigneten Volumen und zusätzlichen 5 Vol%, $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (2:1, v/v) gelöst und der gewünschte Teil der Lösung mittels Direktverdränger-Pipette in ein Glasröhrchen überführt. Danach wurde das Lösungsmittel im N_2 -Strom entfernt. Die zusätzlichen 5% Lösungsmittel dienen dazu, die Verdampfung auszugleichen. Wurden z.B. 40 nmol PGPC benötigt und es waren noch 100 nmol im Stock vorhanden, wurden diese in 525 μl (500 + 5 Vol%) $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (2:1, v/v) in Glasgefäßen gelöst und 200 μl davon in ein Glasröhrchen überführt. Die so portionierten oxPL Lösungen wurden vom Lösungsmittel befreit, mit Parafilm verschlossen und entweder sofort weiterverwendet oder über Nacht bei -20°C gelagert.

3.2.2.5. Inkubieren der ausgesäten Zellen mit den vorbereiteten oxPL für

FACS Experimente:

Nachdem die ausgesäten Zellen ungefähr 20h im Brutschrank anwachsen konnten, konnten mit den oxidierten Phospholipiden inkubiert zu werden. Zuerst wurden die Zellen gewaschen und das Medium gewechselt. Dies war besonders wichtig, da sich die Makrophagen noch in Medium mit 10% FCS befanden. Wie unter anderem von Fruhwirth und Moutzi gezeigt (Fruhwirth, et al. 2006), führt ein zu hoher FCS-Anteil zum Abbau von oxidierten Phospholipiden. Die tatsächliche Konzentration der oxPL zum Zeitpunkt der Messung wäre somit nicht bekannt und die Aussagekraft der Ergebnisse nicht mehr gegeben. Das alte Medium wurde abgesaugt und pro Well 500 µl DMEM (4,5 g/L Glucose) ohne Phenolrot, 0,1% FCS, 1% SP zugegeben. Anschließend wurden die oxidierten Phospholipide suspendiert. In 15 ml Sarstedt Röhrchen wurde für jedes oxPL 400 µl * (Wells + 1) 0,1% FCS Medium vorgelegt. Die vorbereiteten Lipide wurden in EtOH gelöst. Das verwendete EtOH Volumen war von der vorgelegten Phospholipidmenge abhängig: 4 µl EtOH pro 20 nmol Lipid. Waren in dem vorbereiteten Glasröhrchen z.B. 60 nmol PGPC wurden diese in 12 µl EtOH gelöst. Die Lipidlösung wurde dann mittels Kolbenhubpipette in die FACS-Röhrchen überführt. Durch mehrmaliges Auf- und Ab- Pipettieren wurden die Lösungen durchmischt. Um eventuell im Glasröhrchen zurückgebliebene Phospholipide nicht zu verlieren wurden 100 µl der Medium, oxPL Mischung aus den Sarstedt-Röhrchen wieder zurück in das Glasröhrchen pipettiert, die Wände mehrmals gespült und dann wieder in das Sarstedt-Röhrchen zurück überführt. Zusätzlich zu den gelösten oxPL wurde noch ein Sarstedt-Röhrchen mit Medium + 1% EtOH als Kontrolle hergestellt. Nachdem alle Mischungen vorbereitet waren, wurde das Medium im 24 Well Plate abgesaugt und pro Well 400 µl der entsprechenden (oxPL + Medium)-Mischung zugeben. Das 24 Well Plate wurde zur Inkubation in den Brutschrank gestellt.

Bsp.: Für ein FACS-Experiment wurden 2 Proben PGPC und 2 Proben POVPC vorbereitet. Zuerst wurden jeweils 60 nmol PGPC und 60 nmol POVPC in Glasröhrchen überführt und vom Lösungsmittel befreit. Am Tag davor wurden bereits in 5 Wells für 4 oxPL + Kontrolle Makrophagen ausgesät. Diese wurden mit 0,1% FCS Medium gewaschen. In Sarstedt-Röhrchen wurden 1,2 ml PGPC Suspension, 1,2 ml POVPC Suspension und

400 µl 0,1% FCS Medium vorgelegt. Die oxPL wurden in jeweils 12 µl EtOH gelöst, in die Röhrchen mit 1,2 ml Medium überführt und durchmischt. Jeweils 100 µl dieser Mischungen wurden zurück in die entsprechenden Glasröhrchen pipettiert, diese damit gewaschen und wieder zurück überführt. In den 5 Wells wurde das Medium abgesaugt. In das erste Well wurden 400 µl der Kontrollmischung pipettiert, in Well 2 und 3 400 µl der PGPC-Mischung und in Well 4 und 5 400 µl der POVPC-Mischung. Das 24 Well Plate wurde zur Inkubation in den Brutschrank gestellt.

3.2.2.6. Inkubieren der ausgesäten Zellen mit den vorbereiteten oxPL für aSMase Assay Experimente:

Der Ablauf war gleich wie bei FACS-Experimenten, Unterschiede gab es lediglich in den verwendeten Mengen und Volumina. Die Makrophagen in den 6 Well Plates wurden mit 2 ml 0,1% FCS Medium gewaschen. Die vorgelegten Lipide wurden in EtOH in 0,1% FCS Medium eingetragen. Die Volumina von Medium und EtOH hingen von der vorgelegten menge an oxPL ab. Für 50 nmol oxPL wurden 2 ml Medium und 20 µl EtOH verwendet. Zu beachten war, dass aus Gründen der Lipidersparnis nicht ein ganzes Well zuviel vorbereitet wurde, sondern nur ein Bruchteil.

Bsp.: Mit E-PGPC wurde in 2 Wells inkubiert. 110 nmol E-PGPC (2 * 50 nmol + 10 nmol Überschuss) wurden Lösungsmittel-frei eingetrocknet, in 44 µl EtOH gelöst und in 4,4 ml 0,1% FCS Medium eingetragen. 2 ml dieser Lösung wurden jeweils in die Wells gegeben.

3.3. Bestimmung der Apoptose durch Fluorescence-activated cell sorting:

3.3.1. Planung und Vorbereitung der Zellen:

Zuerst wurde festgelegt, wie viele Proben von welchem oxPL gemessen werden sollten. Hierbei war darauf zu achten, dass pro Experiment nicht zu viele Proben vorbereitet und gemessen wurden. Die Aussagekraft der Ergebnisse nahm mit zunehmender Vorbereitungs- und Messdauer ab. Ein Ansatz von 12 Proben erwies sich als Optimum aus hinreichend kurzem Zeitaufwand und ausreichender Probenanzahl. 4 Proben waren für jedes Experiment vorgegeben: eine Autofluoreszenzprobe und 3 Referenzproben. Eine typische Aufteilung für die verbleibenden 8 Proben war z.B.: 3 x E-PGPC, 1 x PGPC, 1 x POVPC und 3 x E-POVPC. Die Zellen in den 24 Well Plates und die Lipide wurden wie oben beschrieben vorbereitet und dann 4 h im Brutschrank bei 37°C und 15% CO₂ inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Wells sofort im Mikroskop betrachtet und ihre grobe Beschaffenheit und Morphologie notiert.

Die Makrophagen wurden direkt im Medium in den Wells gescraped. Hierfür wurde ein modifizierter Scraper verwendet, dessen Länge auf den Durchmesser der Wells gekürzt wurde (Abbildung 6A). Besonders wichtig war kurzes und sanftes Scrapen. Wurde zu fest oder zu lange gescraped, manifestierte sich dies in einer abnormal hohen Anzahl an nekrotischen und spätapoptotischen Zellen bei den mit oxPL behandelten Zellen. Diese Messergebnisse waren nicht repräsentativ. Der Scraper wurde ohne merklichen Druck nach unten aufgesetzt und um 360° in die eine und 180° in die andere Richtung gedreht, um die Makrophagen möglichst zu schonen (Abbildung 6B). Jedes Well wurde in ein eigenes FACS-Röhrchen überführt (Abbildung 6C). Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis. Die Zellsuspension wurde für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert, das Medium vorsichtig (das Zellpellet ist nicht sehr stabil) abgesaugt. Die Zellen wurden in 1 ml gekühltem PBS-Puffer + 2% Glucose resuspendiert und wieder für 5 min bei 1000 rpm zentrifugiert. Der PBS-Puffer wurde vorsichtig abgesaugt und die Makrophagen in 100 µl

gekühltem Annexin Binding Buffer (5x) resuspendiert (Abbildung 6E). Die folgenden Schritte wurden im abgedunkelten Labor durchgeführt. Die Fluoreszenzfarbstoffe, vor allem Alexa Fluor 488 Annexin V, sind stark lichtempfindlich. Zu jeder Probe, von der Autofluoreszenzkontrolle abgesehen, wurden 5 µl Lösungen von Alexa Fluor 488 Annexin V und 5,5 µl Lösungen von Propidiumiodid (1,5 mM) zugegeben (Abbildung 6F). Die Proben wurden 15 min in einer Styroporbox mit Deckel auf Eis im Dunkeln inkubiert. Die Box ermöglichte den lichtfreien und gekühlten Transport der Proben zum BD-FACSCalibur. Nach der Inkubationszeit wurden die Proben mit jeweils 400 µl gekühltem PBS-Puffer + 2% Glucose verdünnt und konnten mittels FACS vermessen werden.

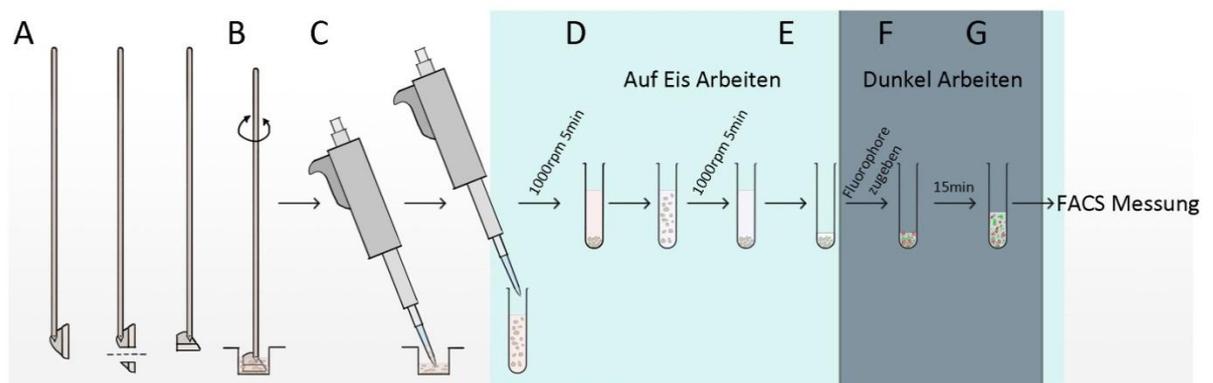


Abbildung 6: Vorbereitung der Proben zur Bestimmung der Apoptose mittels FACS:

A: Ein Scraper wurde durch Kürzen des Blättchens zum Gebrauch mit 24 Well Plates vorbereitet und normal zum Stiel gestellt.

B: Makrophagen wurden vorsichtig mit so wenig Druck wie möglich gescraped, um die durch die oxPL bereits belasteten Zellmembranen zu schonen. Zu festes oder zu langes Scrapen resultierte in stark erhöhter Nekrose und später Apoptose.

C: Der Inhalt jedes Wells wurde in ein eigenes FACS-Röhrchen überführt. Fortan wurde auf Eis gearbeitet.

D: Die Makrophagen wurden abzentrifugiert und mit 1ml gekühltem PBS Puffer + 2% Glucose gewaschen.

E: Nach dem Waschen wurden die Zellen in 100 µl gekühltem Annexin Binding Buffer (5x) resuspendiert. Die folgenden Schritte erfolgten in möglichst dunkler Umgebung.

F: Zu jeder Probe wurden 5 µl Alexa Fluor 488 Annexin V und 5,5 µl Propidiumiodid (1,5 mM) Lösung zugegeben und für 15 min inkubiert.

G: Vor der FACS-Messung wurden die Proben mit 500 µl gekühltem PBS Puffer + 2% Glucose verdünnt.

3.3.2. Fluoreszenzsonden:

Den Grundbaustein zur Bestimmung der Apoptose und Nekrose in RAW 264.7 Makrophagen durch FACS-Messung bilden die verwendeten Fluoreszenzsonden. Es werden zwei verschiedene Fluorophore verwendet. Diese müssen verschiedene Motive der Zelle oder Zellstrukturen erkennen und binden (Abbildung 7). Die, anhand der Markierung zu bestimmenden Abläufe in den Zellen, dürfen durch die Fluorophore nicht verfälscht werden. Dies erlaubt eine Unterscheidung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen aufgrund der Fluoreszenz. In dieser Arbeit wurden zur Bestimmung der Apoptose Alexa Fluor 488 Annexin V und zur Messung der Nekrose Propidiumiodid verwendet.

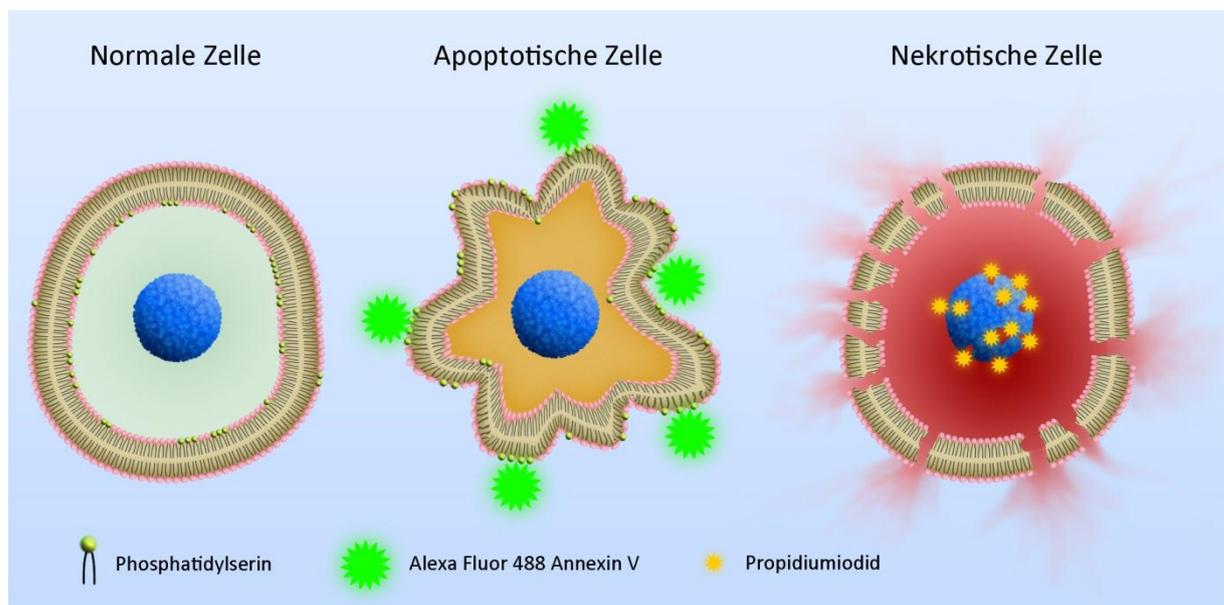


Abbildung 7: Markieren von apoptotischen und nekrotischen Zellen durch Fluoreszenzsonden.

Links: Gesunde Zellen sollen von keiner der beiden Fluoreszenzsonden gefärbt werden.

Mitte: Zellen, welche Apoptose zeigen, exponieren Phosphatidylserin (PS) an der Zelloberfläche. PS wird von Alexa Fluor 488 Annexin V erkannt und gebunden.

Rechts: Propidiumiodid bindet an DNA, kann eine gesunde Zellmembran allerdings nicht durchdringen. Wird diese durch Nekrose allerdings durchlässig, werden diese Zellen mit PI gefärbt.

3.3.2.1. Alexa Fluor 488 Annexin V:

Alexa Fluor 488 Annexin V ist die Fluoreszenzsonde, welche zur Bestimmung der apoptotischen Makrophagen verwendet wurde. Sie besteht aus zwei Teilen: Alexa Fluor 488, dem Fluoreszenzfarbstoff, und Annexin V, einem Protein, mit dessen Hilfe apoptotische Zellen markiert werden. Alexa Fluor 488 ist ein grüner Fluoreszenzfarbstoff mit Absorptionsmaximum bei 495 nm und Emmisionsmaximum bei 519 nm (Invitrogen, kein Datum). Annexin V (auch Annexin A5) ist ein Protein der Annexin-Familie. Es zeigt *in vitro* Anti-Phospholaseaktivität, Anti-Koagulantaktivität, Anti-Kinaseaktivität, und es bindet das negativ geladene Phospholipid Phosphatidylserin (PS) bei Vorhandensein von geringen Ca^{2+} Konzentrationen (van Engeland, et al. 1998). Für die Bestimmung der Apoptose interessant ist die PS-bindende Aktivität. In gesunden Zellen herrscht zwischen den beiden Hälften des Bilayers eine Asymmetrie in der Verteilung der verschiedenen Phospholipide (Bretscher 1972). Während Phosphatidylcholin (PC) und Sphingomyelin (SM) hauptsächlich in der äußeren Hälfte vorkommen, findet man Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylserin (PS) fast nur in der cytosolischen Seite der Plasmamembran. Diese Lipidasymmetrie wird in lebenden Zellen von sogenannten „Flippasen“ (Aminophospholipid-Translokasen) aufrecht erhalten, welche die Translokation von Lipiden zwischen den beiden Hälften der Plasmamembran ermöglichen (Higgins 1994). Zellen ist es jedoch auch möglich, gezielt die PS-Asymmetrie aufzuheben und schnell PS in die äußere Membranhälfte zu transportieren. Dies geschieht, wenn eine Zelle dem programmierten Zelltod untergeht. Die „Flippasen“ werden inaktiviert, während eine „Scramblase“ aktiviert wird. Diese transferiert unspezifisch Phospholipide zwischen den beiden Monolayers. Das somit auf der Zelloberfläche exponierte PS dient für andere Zellen als Signal, die tote Zelle zu verdauen (Alberts, et al. 2002). Während des Verlaufs der Apoptose, von der frühen Ausführungsphase bis hin zu den abgeschnürten apoptotischen Vesikeln, findet sich PS als Signal an der Zelloberfläche. Es bildet somit ein hervorragendes Ziel zur Messung des kontrollierten Zelltodes (Abbildung 8). Gemeinsam mit der Fähigkeit von Annexin V PS zu binden ergibt sich eine Methode zur Bestimmung der Apoptose, welche zuerst von Koopman et al. beschrieben wurde (Koopmann, et al. 1994). Ein Fluoreszenzfarbstoff wird an Annexin V gebunden, welches in der Gegenwart von millimolarem Ca^{2+} das exponierte PS der äußeren Zellmembranhälfte von apoptotischen Zellen bindet.

Gesunde Zellen können auf diese Art nicht gefärbt werden, da die Mengen an PS im äußeren Monolayer zu gering sind und Annexin V die Zellmembran nicht durchdringen kann. Sind die Zellen allerdings dermaßen stark beschädigt, dass die Integrität der Zellmembran nicht mehr gegeben ist (dies gilt für nekrotische und spätapoptotische Zellen) kann Annexin V auch das PS des cytosolischen Monolayers binden. Um zwischen lebenden, nekrotischen, apoptotischen und spätapoptotischen Zellen unterscheiden zu können, wird noch eine zweite Fluoreszenzsonde benötigt.

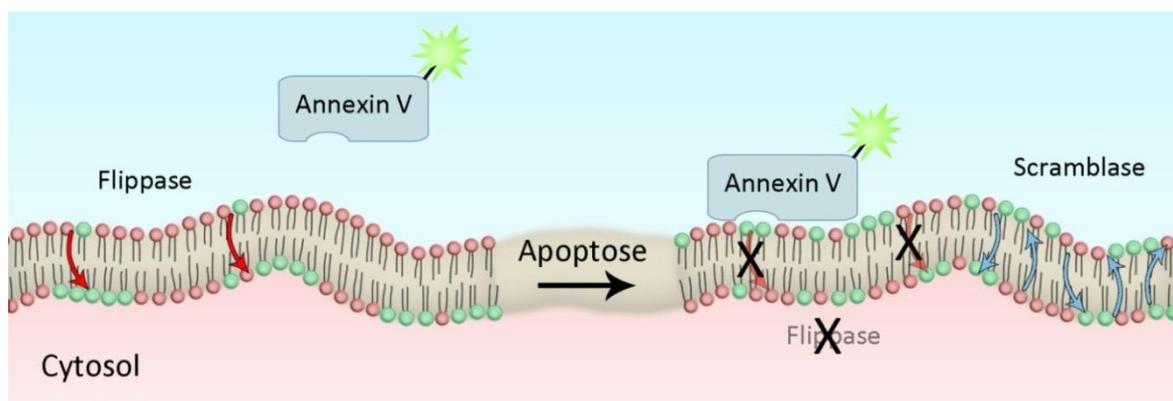


Abbildung 8: Apoptose verändert die Lipidasymmetrie in der Zellmembran und erlaubt das Binden von Annexin V.

In gesunden Zellen herrscht zwischen den beiden Monolayern der Zellmembran eine Asymmetrie in der Lipidzusammensetzung. Phosphatidylserin (PS), hier grün dargestellt, befindet sich hauptsächlich in der cytosolischen Membranhälfte. Die Asymmetrie wird durch Flippasen aufrecht erhalten, welche die Translokation von PS von der äußeren in die innere Membranhälfte ermöglichen. Zeigt die Zelle Apoptose, wird die PS-Asymmetrie aufgehoben. Die Flippase-Aktivität wird unterdrückt und Scramblasen werden aktiviert. Scramblasen transferieren unspezifisch Lipide zwischen den beiden Monolayern. Annexin V kann an das PS an der Zelloberfläche binden und somit apoptotische Zellen markieren.

3.3.2.2. Propidiumiodid:

Propidiumiodid (PI) ist ein fluoreszierender Nukleinsäureinterkalator. Im freien Zustand zeigt es ein Absorptionsmaximum bei 493 nm und ein Extinktionsmaximum bei 630 nm. PI kann eine gesunde Zellmembran nicht durchdringen. Es kommt somit nur zu Interaktionen mit Zellen mit beschädigter Plasmamembran. Es sind die nekrotische und spätapoptotische Zellen. Kombiniert man PI mit Annexin V, erlaubt dies eine Aussage darüber, ob die Annexin-Fluoreszenz nur vom PS an der Zelloberfläche stammt (Apoptose) oder die Zelle bereits derart stark beschädigt ist, dass ihre Membran nicht

mehr intakt ist und Annexin V das PS an der cytosolischen Membranseite daher binden kann (Nekrose, späte Apoptose).

3.3.3. Fluorescence-activated cell sorting (FACS):

3.3.3.1. Aufbau und Funktion:

Verwendet wurde ein BD-FACSCalibur Flow Cytometry SystemTM von BD Bioscience. Es handelt sich dabei um ein Durchflusszytometer mit einem 488 nm Laser und 3-Farben-Kapazität. Im FACS-Röhrchen, das auf den Probenhalter gesteckt wird, wird ein Überdruck erzeugt. Die Probe wird in die Injektionsnadel gedrückt. Mögliche Flussgeschwindigkeiten: LOW: $12 \mu\text{l} \pm 3 \mu\text{l}/\text{min}$, MEDIUM: $35 \mu\text{l} \pm 5 \mu\text{l}/\text{min}$ und HIGH: $60 \mu\text{l} \pm 7 \mu\text{l}/\text{min}$. Die Injektionsnadel und die Messzelle sind vom Durchmesser her so ausgelegt, dass immer nur eine Zelle auf einmal den Laserstrahl passiert. Im Durchlicht wird der „Forward Scatter“ (FSC) gemessen. Das Streulicht wird normal zum Laserstrahl von einer Fluoreszenz-Sammellinse gebündelt und durch verschiedene halbdurchlässige Spiegel und Filter in maximal 3 Fluoreszenzsignale (FL1-3) und den „Side Scatter“ (SSC) aufgeteilt und gemessen. (Abbildung 9)

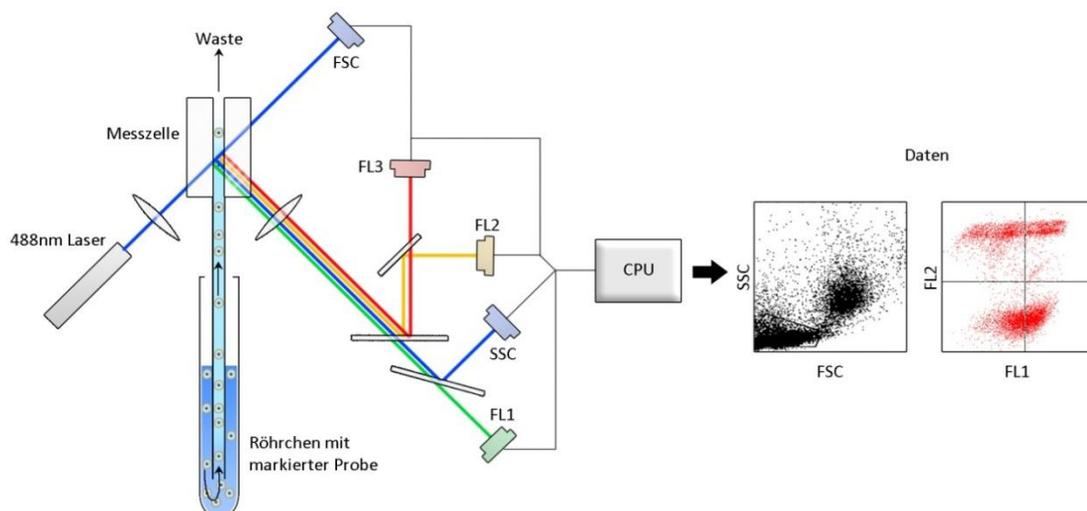


Abbildung 9: Aufbau eines Durchflusszytometers mit Fluoreszenzmessung.

3.3.3.2. Messung:

Während die Proben mit den Fluoreszenzsonden inkubiert wurden, wurde das FACS-Gerät für die Messung vorbereitet. Zuerst wurden die Injektionsnadel und die Messzelle gereinigt. Dafür wurde aus einem FACS-Röhrchen BD-FACS-Clean bei offenem Probenarm und Geschwindigkeitseinstellung HIGH eingesaugt bis der Flüssigkeitsspiegel um ca. 1 cm gefallen ist. Der Probenarm wurde geschlossen und die Messzelle ein paar Minuten mit HIGH gespült. Diese Prozedur wurde mit BD-FACS-Rinse und destilliertem Wasser wiederholt. Abschließend wurde noch zweimal die „Prime“ Prozedur des BD FACS Calibur verwendet, um etwaige Luftbläschen zu entfernen. Nach dem Verdünnen der Proben mit gekühltem PBS Puffer + 2% Glucose, wurde sofort die erste Probe vermessen. Vor dem Anstecken eines Probenröhrchens an die Probenaufnahme wurde die Probe gut durchmischt. Die Messung erfolgte bei der Geschwindigkeitseinstellung „MED“ und wurde entweder nach dem Erfassen von 10000 Zellen oder nach 2 min. beendet.

3.3.3.3. Messdaten und Auswertung:

Von jeder einzelnen gemessenen Zelle wurden vier Parameter aufgenommen: Forward Scatter (FSC), Sidescatter (SSC), die Alexa Fluor 488 Annexin V-Fluoreszenz (FL1) und die Propidiumiodid-Fluoreszenz. Daraus erhält man zwei Plots, anhand derer man Aussagen über den Zustand der gemessenen Zellpopulation treffen kann. Jede gemessene Zelle stellt einen Punkt in beiden Plots dar.

Der Scatter-Plot gibt Aufschluss über Form und Größe der Zellen. Der FSC misst die Beugung des Laserlichts an den Zellen und korreliert mit dem Volumen. Für den SSC ist die Streuung des Lichts an der Zelle verantwortlich. Diese hängt von der Größe der Zelle und der Rauigkeit der Zelloberfläche ab. Der Scatter-Plot erlaubt die Unterscheidung zwischen ganzen Zellen (vital, apoptotisch, nekrotisch) und Zellbruchstücken. Diese entstehen hauptsächlich durch zu hohe mechanische Belastung. Sie stehen somit in keiner Relation zu den Auswirkungen der oxidierten Phospholipide auf die Vitalität der Makrophagen. Betrachtet man nur den Fluoreszenz-Plot, ist eine Unterscheidung zwischen Signalen von Zellbruchstücken und von oxPL geschädigten Zellen nicht möglich. Die Zelltrümmer verfälschen das Ergebnis. Im Scatter-Plot können diese allerdings erkannt werden und in weiterer Folge aus dem Fluoreszenz-Plot gelöscht

werden. Bruchstücke sind deutlich kleiner als intakte Zellen und beugen und brechen das Laserlicht weniger. Im Scatter-Plot sind sie unten links zu finden (Abbildung 10 links). Oft ist eine deutliche Abgrenzung zwischen der Fragmentpopulation und den ganzen Zellen zu erkennen. Die lebenden, apoptotischen und nekrotischen Zellen überlagern sich im Scatter-Plot teilweise sehr stark.

Die Unterscheidung und Bestimmung dieser Populationen erfolgt im Fluoreszenz-Plot. Auf der Abszisse wird die Alexa Fluor 488 Annexin V Fluoreszenz aufgetragen und auf der Ordinate die Propidiumiodid-Fluoreszenz. Es lässt sich sofort der Unterschied zwischen der apoptotischen Population (unten) und der nekrotischen (oben) feststellen (Abbildung 10 rechts). Betrachtet man den Fluoreszenz-Plot, wird auch ersichtlich, dass die Verwendung einer zweiten, nekrosespezifischen Fluoreszenzsonde unabdingbar ist. Für die Messungen in dieser Studie ist vor allem der Anteil an rein apoptotischen Zellen einer Population ausschlaggebend (Abbildung 10: Bereich R4, violett). Bei einer Messung nur mit Annexin, würden auch die spätapoptotischen und zum Teil auch die nekrotischen Zellen (Abbildung 10: beides grün), fälschlicherweise als apoptotische interpretiert werden.

Der Fluoreszenz Plot dient zur Bestimmung wie eine Zellpopulation in vitale, apoptotische, nekrotische und spätapoptotische Zellen aufteilt ist. Zwischen den vitalen bzw. apoptotischen (unten) und den nekrotischen bzw. spätapoptotischen (oben) Zellpopulationen ist ein deutlicher Unterschied festzustellen und die Populationen können eindeutig bestimmt werden. Der Übergang zwischen den nekrotischen und den spätapoptotischen Zellen und, für diese Studie von besonderer Bedeutung, zwischen den gesunden und den apoptotischen Zellen ist weit weniger distinkt, sondern eher fließend.

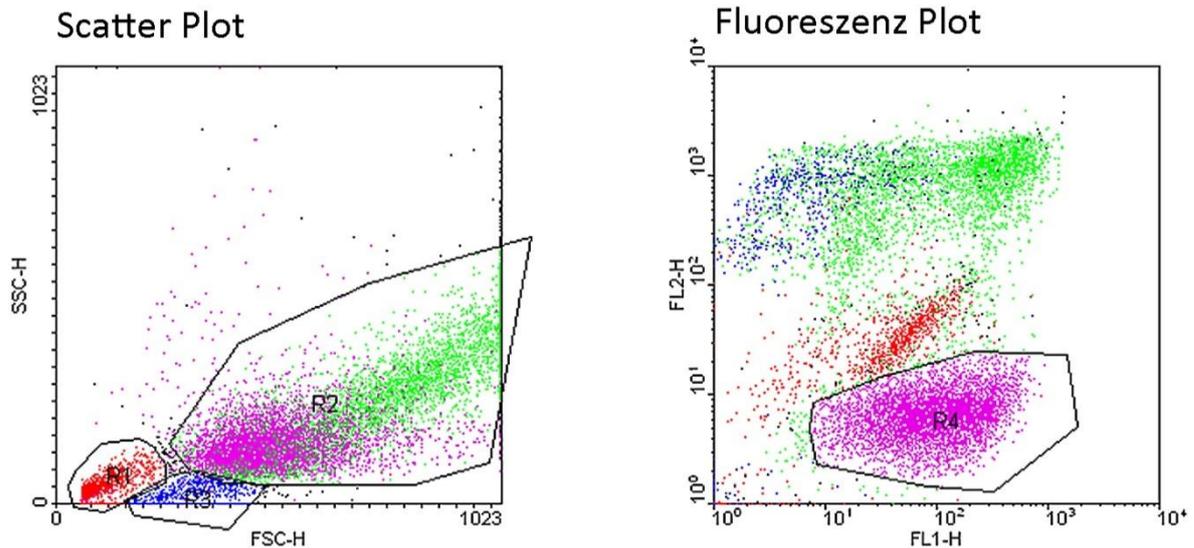


Abbildung 10: Die FACS-Messung liefert als Ergebnis für jede Messung einen Scatter und einen Fluoreszenz Plot.

Links: Im Scatter Plot wird für jede gemessene Zelle der FSC und der SSC aufgetragen. Dies erlaubt Rückschlüsse auf Form und Größe der Zellen und ermöglicht die Identifizierung von Zelltrümmern (hier rot und blau dargestellt) und intakten Zellen (in der Fläche R2). Die Zellbruchstücke entstehen hauptsächlich durch mechanische Einwirkung und stehen in keiner Relation zu den Auswirkungen der oxPL. Im Fluoreszenz Plot führen sie zu einer Verfälschung der Ergebnisse und müssen somit im Scatter Plot identifiziert und von der Auswertung im Fluoreszenzplot ausgeschlossen werden.

Rechts: Im Fluoreszenz Plot sind die Alexa Fluor 488 Annexin V-Fluoreszenz und die PI-Fluoreszenz aufgetragen. Dieser Plot ermöglicht die Unterscheidung zwischen vitalen, apoptotischen, nekrotischen und spätapoptotischen Zellen und dient in weiterer Folge zur Bestimmung der Apoptose.

Um dennoch eine klare und reproduzierbare Aussage über die Aufteilung der Zellpopulation treffen zu können, wird der Fluoreszenz-Plot in vier Bereiche unterteilt (Abbildung 11 B): Unten links befinden sich gesunde Zellen, welche weder mit Annexin V noch mit PI gefärbt sind. Unten rechts die apoptotischen Zellen und oben links die nekrotischen. Oben rechts befinden sich spätapoptotische Zellen, die bereits so zerstört sind, dass Annexin V und PI binden. Für die Reproduzierbarkeit ist wichtig, dass der Mittelpunkt des Quadranten sich an der vitalen Zellpopulation orientiert. Zu diesem Zweck wurden bei jeder FACS-Messung zuerst drei Referenzproben vermessen, welche nicht mit oxPL, sondern nur mit 1% EtOH inkubiert wurden. Diese Proben enthalten keine apoptotischen Zellen. Bei der Auswertung einer Messreihe wurde der Quadrant zuerst so festgelegt, dass er, bei allen drei Referenzproben, die vitale Population gut einschließt, ohne mehr als ~2% apoptotische Zellen zu umfassen (Abbildung 11 A).

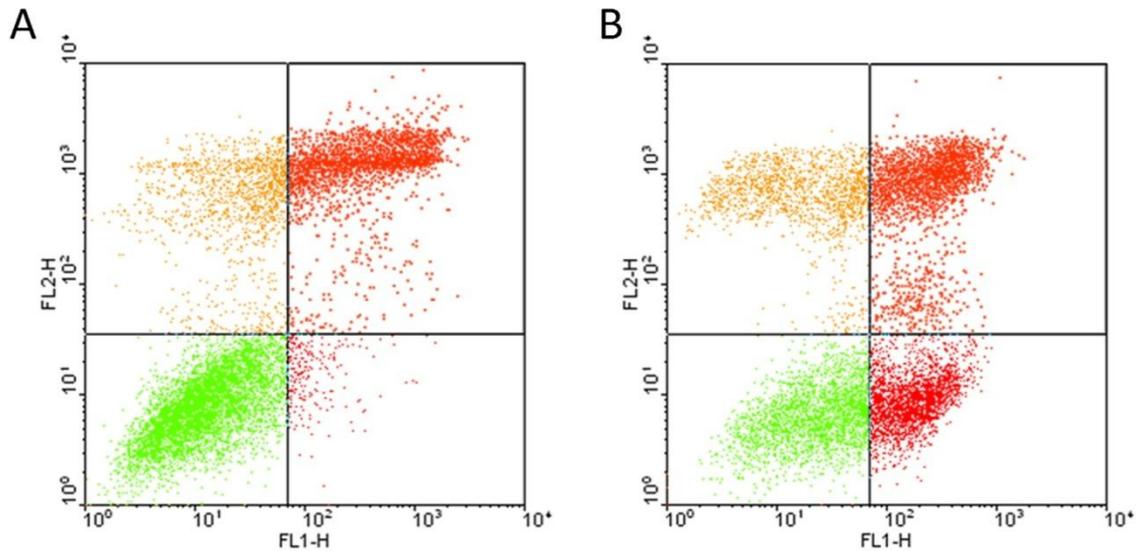


Abbildung 11: Unterteilung des Fluoreszenz-Plots mittels Quadrant. Vitale Zellen sind grün eingezeichnet, apoptotische rot, nekrotische gelb und spätapoptotische orange.

A: Anhand von Referenzproben, welche nicht mit oxPL sondern nur mit 1% EtOH inkubiert wurden, wird der Quadrant festgelegt. Diese Proben enthalten keine apoptotischen Zellen, und die vitale Population ist eindeutig zu erkennen (links unten). Der Quadrant wird bei der Auswertung so gesetzt, dass die gesunden Zellen eng eingeschlossen werden, ohne dass sich daraus ein Apoptosewert $> \sim 2\%$ ergibt. Die Population an nekrotischen/spätapoptotischen Zellen (rechts oben) ergibt sich aus dem mechanischen Stress, dem die Makrophagen bei der Vorbereitung zur FACS-Messung ausgesetzt sind (Scrapen, Zentrifugieren, Pipettieren).

B: Der Fluoreszenz-Plot einer mit $50 \mu\text{M}$ E-PGPC inkubierten Zell Probe. Obwohl der Übergang zwischen vitalen und apoptotischen Zellen sehr fließend ist, erlaubt der anhand der Referenz gesetzte Quadrant, die Bestimmung der apoptotischen Population.

3.3.4. Mögliche Fehlerquellen:

Einen sehr großen Einfluss auf die Aussagekraft und Reproduzierbarkeit der Messungen hatte, wie bereits oben erwähnt, das Scrapen der Zellen nach der Inkubation mit den oxidierten Phospholipiden. Der Zeitraum zwischen dem Ende der Inkubation und dem Ende der Messung spielte ebenfalls eine Rolle. Die Makrophagen sind während des gesamten Vorgangs der Inkubation und der Probenvorbereitung bereits erheblichem Stress und mechanischer Belastung ausgesetzt. Dies manifestiert sich, auch bei den oxPL-freien Referenzproben, die 20% oder mehr nekrotische und spätapoptotische Zellen enthielten. Dieser Wert stellt kein Problem bei der Auswertung dar und kann für die Belastung der Zellen bei der Vorbereitung als normal angesehen werden. Trotzdem gilt es, den nicht durch oxPL verursachten Zelltod möglichst gering zu halten. Es ist nicht

gewährleistet, dass die Belastung durch die Probenvorbereitung sich bei den mit unterschiedlichen oxPL und den unbehandelten Makrophagen gleich auswirkt. Dies würde Vergleiche der Auswirkungen zwischen den verschiedenen oxPL verfälschen. Auch ist nicht gegeben, dass die vitalen und die apoptotischen Zellen einer Probe gleich stark zur Nekrose durch mechanischen Stress neigen. Das würde die Ergebnisse einzelner Messungen ebenfalls verfälschen.

Der Hauptteil der mechanischen Belastung entsteht durch das Scrapen der Zellen. Dies ist zwar ein notwendiger Vorgang, sollte aber so schonend wie möglich vorgenommen werden. Bei vorsichtigerem Scrapen konnte eine deutliche Abnahme der Nekrose bzw. späten Apoptose festgestellt werden, und die Ergebnisse einzelner Proben eines Experimentes und auch verschiedener Experimente zeigten eine viel höhere Konsistenz. Es erwies sich als das Beste, beim Scrapen das Schonen der Zellen vor die Quantität des Erntens zu stellen. Für eine aussagekräftige FACS-Messung wird eine Mindestanzahl an vermessenen Zellen benötigt. Mit den gewählten Zellmengen beim Aussäen ließ sich diese leicht erreichen, weswegen die Makrophagen nicht zu quantitativ geerntet werden mussten.

Um die Dauer zwischen Ernten und Messung gering zu halten, wurde vor allem die Probenanzahl pro Experiment beschränkt. Dies ermöglicht nicht nur eine schnellere Vorbereitung der Zellen zur Messung, sondern verkürzte auch die Messung selbst. Wurden wesentlich mehr als 12 Proben gemessen, konnte bei den späteren Messungen ein probenunabhängiger Anstieg der Nekrose/späten Apoptose und eine Abnahme der Aussagekraft festgestellt werden.

Eine weitere wichtige, wenn auch weniger offensichtliche, Fehlerquelle stellte die Messgeschwindigkeit bei der FACS-Messung dar. Diese wirkte sich direkt und ausschließlich auf den Anteil an apoptotischen Zellen einer Messung aus. Der Unterschied bestand zwischen den Geschwindigkeiten „LO“ und „MED“. Messungen auf „LO“ ergaben weniger Apoptose als Messungen auf MED. Während einer Messung konnte man mitverfolgen, wie sich im Fluoreszenz-Plot zuerst die vitale und die nekrotische bzw. spätapoptotische Population aufbauten und kaum apoptotische Signale vorhanden waren. Änderte man während dieser Messung die Geschwindigkeit

von „LO“ auf „MED“, resultierte dies in einem plötzlichen Anstieg der apoptotischen Population. Zwischen den Geschwindigkeiten „MED“ und „HI“ konnte kein Unterschied bezüglich der Apoptose festgestellt werden. Warum die apoptotischen Zellen bei der niedrigeren Messgeschwindigkeit nicht ordentlich erfasst wurden, ist nicht vollständig klar. Eine Möglichkeit wäre, dass die durch die Apoptose an der Zelloberfläche klebrigen Makrophagen an den Innenwänden der Injektionsnadel anhaften und bei niedrigerem Durchfluss die wirkenden Kräfte nicht groß genug sind, um sie mitzureißen. Um dies vorzubeugen, wurden sämtliche Proben mit der „MED“ Geschwindigkeit gemessen. Eine Messung mit „HI“ ist nicht ratsam, da bereits mit „MED“ sämtliche apoptotischen Makrophagen erfasst werden. Eine weitere Geschwindigkeitserhöhung birgt zusätzliche Fehlerquellen, da zu viele Zellen pro Sekunde gemessen werden und möglicherweise nicht mehr nur einzelne Zellen hintereinander den Laserstrahl passieren.

3.4. Bestimmung der Aktivität der sauren Sphingomyelinase:

3.4.1. Funktionsweise des Assays zu Bestimmung der aSMase-Aktivität in RAW 264.7 Makrophagen:

Der Assay zur Bestimmung der aSMase Aktivität basiert auf der Spaltung einer Phosphodiesterbindung von Sphingomyelin (SM), welches zu Ceramid umgewandelt wird. Ceramid ist aufgrund der fehlenden Phosphorylcholin-Gruppe deutlich unpolarer und kann mittels TLC von SM getrennt werden.

Die aSMase kommt im Zellinneren und an der Membranoberfläche vor. Um die gesamte aSMase-Aktivität zu erfassen wurden die Makrophagen zuerst lysiert, bevor sie mit SM inkubiert wurden. Als Substrat diente in diesem Fall fluoreszierendes SM (NBD-Markierung in der N-Acylkette). Die Lipidmenge in den fluoreszierenden SM und Ceramid Spots wurde mit einer CCD-Kamera nach Kalibrierung bestimmt. Der

Polaritätsunterschied zwischen beiden Lipiden erlaubte eine leichte Trennung des Reaktionsgemisches mittels Dünnschichtchromatografie (Abbildung 12).

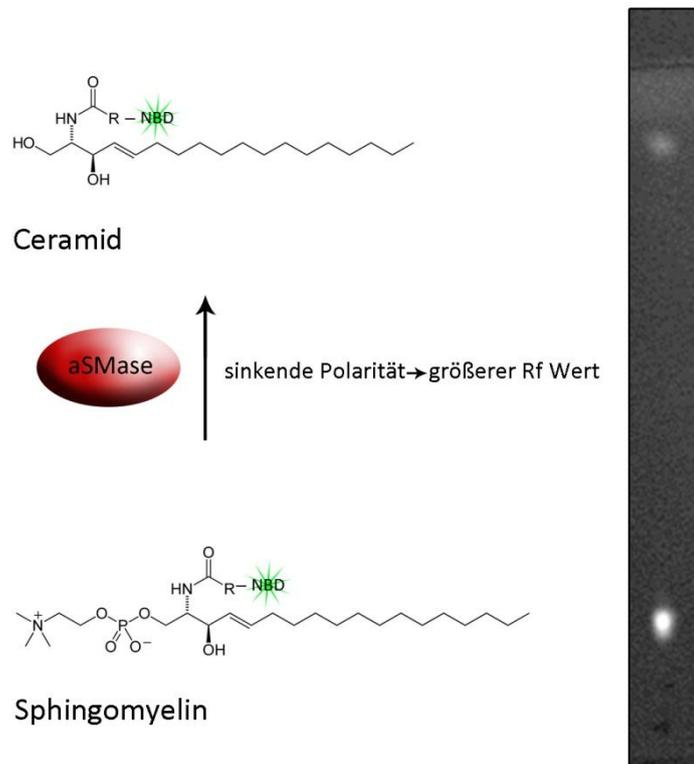


Abbildung 12: Prinzip des aSMase-Assays.

aSMase katalysiert die Umwandlung von Sphingomyelin (SM) zu Ceramid durch Spaltung einer Phosphodiesterbindung. Der Verlust der Phosphorylcholingruppe lässt die Polarität des Produkts (Ceramid) deutlich sinken. Der Polaritätsunterschied erlaubt eine einfache Trennung mittels Dünnschichtchromatografie. Die fluoreszierenden Lipidspots wurden mit einer CCD-Kamera detektiert.

3.4.2. Planung und Vorbereitung der Zellen:

Zuerst wurde festgelegt welche bzw. wie viele Proben gemessen werden sollten. Dabei war zu bedenken, dass bei jedem Experiment die Zellen nach zwei verschiedene Inkubationszeiten (5 und 15 min) geerntet und gemessen wurden. Die Anzahl der Proben pro Experiment wurde durch zwei Faktoren begrenzt: Die Verzögerung beim Ernten zwischen erster und letzter Probe steigt mit größerer Probenanzahl an. In Relation zu den sehr kurzen Inkubationszeiten könnte sich dieser Unterschied in der Inkubationsdauer bereits auf die Messergebnisse auswirken. Auch wurde die Probenanzahl so gewählt, dass in den 10 min zwischen den Erntevorgängen die 5-min inkubierten Proben weit genug verarbeitet werden konnten um sie auf Eis zu lagern. 7

Proben erwiesen sich als optimal. Für Referenzproben wurden Medium mit und ohne 1% EtOH bei beiden Inkubationszeiten eingesetzt. Eine typische Aufteilung für ein Experiment war z.B.: Reines Medium, Medium mit 1% EtOH (5 min), POVPC (5 min), E-POVPC (5 min), Medium mit 1% EtOH (15 min), POVPC (15 min), E-POVPC (15min). Die Proben wurden jeweils in einem 6 Well Plate inkubiert. Die Aufteilung erfolgte so, dass alle Proben, welche nach der selben Inkubationszeit geerntet wurden auf dem selben 6 Well Plate waren. Dies erlaubte auch das getrennte Ernten nach unterschiedlichen Inkubationszeiten. Die 6 Well Plates und die Lipide wurden wie oben beschrieben vorbereitet. Die Proben wurden im Brutschrank bei 37°C und 15% CO₂ inkubiert (Abbildung 13A). Die Nullprobe (nur Medium) wurde, während die Proben in den anderen Wells gewaschen und mit Lipiden oder Ethanol versetzt wurden, überhaupt nicht behandelt. Nach 5 min Inkubationszeit wurde das erste 6 Well Plate aus dem Brutschrank genommen. Das Medium der 5 min-Proben und der Nullprobe wurde sofort abgesaugt und die Wells mit 1ml eisgekühltem PBS Puffer gewaschen (Abbildung 13B). Nach Absaugen des Waschpuffers wurden die Zellen vorsichtig in 1 ml eisgekühltem PBS Puffer gescraped (Abbildung 13C). Die gescrapten Zellen wurden in ein 15 ml Falcon Tube pro Well überführt und sofort auf Eis gestellt (Abbildung 13E). In die leeren Wells wurde noch einmal 1ml eisgekühlter PBS Puffer gegeben und ein weiteres Mal gescraped (Abbildung 13D). Die beiden Fraktionen wurden in einem Falcon Tube vereint und 10 min bei 1500 rpm und 4°C mitzentrifugiert (Abbildung 13F). Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in 50 µl Acid Lysis Buffer (ALB) (250 mM NaAc, 0.2% Triton X- 100, pH 5.0) resuspendiert in Eppendorf Röhrchen überführt (Abbildung 13G). Die Proben in den Eppendorf Röhrchen wurden kurz gevortext und dann auf Eis gestellt. Die Proben wurden alle 15 min gevortext und mindestens eine Stunde im ALB lysiert. Während die 5 min-Proben abzentrifugiert wurden, wurde mit Waschen und Scrapen der 15 min-Proben begonnen. Die 60 min Lysezeit wurde so angepasst, dass die folgenden Schritte für beide Inkubationsreihen gleichzeitig durchgeführt werden konnten. Nach ungefähr einer Stunde auf Eis wurden die Proben wieder 10 min bei 1500 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf Röhrchen überführt (Abbildung 13H). Vom Überstand wurde der Proteingehalt bestimmt.

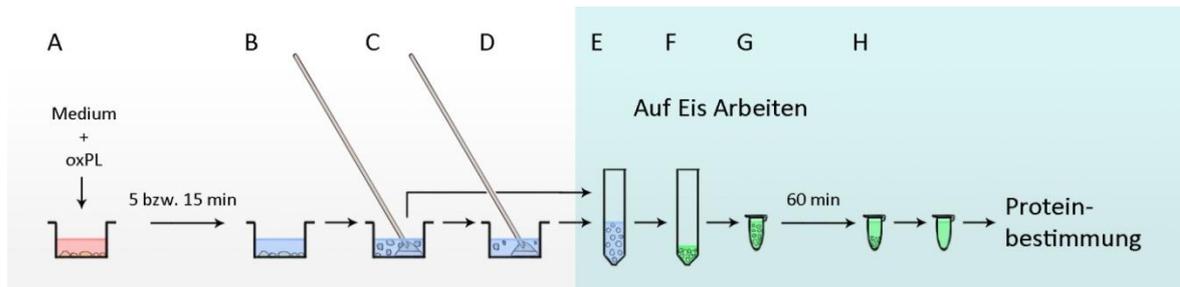


Abbildung 13: Ernten und Vorbereiten der Proben zur aSMase-Aktivitätsbestimmung:

A: Inkubieren der Zellen mit 25 μ M oxPL oder 1% EtOH (Kontrollproben) für 5min bzw. 15min.

B: Waschen der Zellen mit 1ml eisgekühltem PBS Puffer.

C: Scrapen der Zellen in 1ml eisgekühltem PBS Puffer und in ein 15ml Falcon Tube überführen.

D: Die Wells ein zweites Mal mit 1ml eisgekühltem PBS Puffer scrapen und die Fraktionen vereinen.

E: Die gescrapeten Zellen in den Falcons sofort auf Eis stellen und für 10 min bei 1500 rpm und 4°C abzentrifugieren.

F: Den Überstand absaugen, die Zellen in 50 μ l Acid Lysis Buffer (ALB) resuspendieren und in Eppendorf Röhren überführen.

G: Die Proben eine Stunde auf Eis lysieren lassen und alle 15 min leicht vortexen.

H: Die lysierten Zellen für 10 min bei 1500 rpm und 4°C abzentrifugieren und den Überstand in neue Eppendorf Röhren überführen.

3.4.3. Proteinbestimmung nach Bradford:

Um einen aussagekräftigen Vergleich zwischen den unterschiedlichen Proben im Fluoreszenz Aktivitäts Assay zu bekommen, war es notwendig, von jeder Probe dieselbe Proteinmenge aufzutragen. Die Proteinkonzentration in den Proben wurde mit der Methode nach Bradford bestimmt. Der Bradford Test ist ein colorimetrischer Proteinassay und basiert auf einer Farbänderung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue bei der Bindung an Proteine. Unter sauren Bedingungen zeigt dieser eine rote Färbung. Im Komplex mit einem Protein verschiebt sich die Absorbtion ins Blaue. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt dann durch Absorbtionsmessung bei 595nm und Vergleich mit einer Konzentrationskurve.

3.4.4. Sphingomyelinase Assay:

NBD-Sphingomyelin (NBD-SM) wurde als Enzymsubstrat eingesetzt. Es ist sehr lichtempfindlich. Sämtliche Arbeiten wurden deshalb im Dunkeln durchgeführt. Pro Probe wurden 2 nmol NBD-SM benötigt. Bei jedem Experiment wurden 2 nmol NBD-SM zuviel vorbereitet, um Pipettierfehler zu minimieren. Das NBD-SM wurde in CHCl_3 gelöst und ein definiertes Aliquot davon in ein Glasröhrchen überführt (Abbildung 14A/B). Das CHCl_3 -Volumen wurde dabei so gewählt, dass sich die benötigte Menge an NBD-SM leicht pipettieren ließ, z.B.: In der Vorratslösung befanden sich 100 nmol NBD-SM und für 9 Proben wurden 20 nmol benötigt. Das NBD-SM wurde in 100 μl CHCl_3 gelöst und davon jeweils 20 μl in ein Glasröhrchen pipettiert. Das CHCl_3 wurde im N_2 -Strom aus dem Glasröhrchen und dem Aliquot entfernt (Abbildung 14C). Die Vorratslösung wurde wieder auf -20°C gelagert. Das NBD-SM im Röhrchen wurde in $(\text{Probenanzahl} + 1)$ μl THF gelöst (Abbildung 14D). In einem 15 ml Falcon wurden $200 \cdot (\text{Probenanzahl} + 1)$ μl Acid Reaction Buffer (ARB) vorgelegt, das in THF gelöste NBD-SM zugegeben und gevortext (Abbildung 14E). Nach der Proteinbestimmung der Zellen wurden von jeder Probe 20 μg Protein separat in ein Eppendorf Röhrchen gegeben und dieses mit 200 μl der NBD-SM/ARB Mischung versetzt (Abbildung 14F). Die Proben wurden für 2,5 h bei 37°C und leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 300 μl $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (2/1, v/v) abgestoppt und gevortext (Abbildung 14G). Die obere wässrige Phase wurde abgezogen und verworfen. Die organische Phase wurde mit CHCl_3 1:10 verdünnt (Abbildung 14H). 20 μl hiervon wurden auf eine DC-Platte aufgetragen und die Proben wurden in $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (65/25/4, v/v/v) entwickelt (Abbildung 14I). Zur Auswertung wurde die Fluoreszenzintensität der NBD-Sphingomyelin- und NBD-Ceramid-Spots gemessen (siehe vorne). In den 2,5 h Inkubationszeit wurde nur ein Teil des eingesetzten Sphingomyelins zu Ceramid umgewandelt. Dies führte zu einem vergleichsweise konzentrierten Sphingomyelin-Spot und einem kleinen Ceramid-Spot.

Die Bestimmung der umgesetzten Mengen an Sphingomyelin und Ceramid erfolgt durch die Messung der Fluoreszenzintensität mittels CCD-Kamera (Herolab Wien, Österreich) bei Anregungswellenlängen von 256 und 365 nm. Die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität der Lipid-Spots erfolgte mithilfe der Software EasyWin.

Die Konzentrationen im Sphingomyelin-Spot können so hoch sein, dass für die Konzentrationsabhängigkeit der Fluoreszenz keine Linearität mehr gegeben ist. NBD neigt bei zu hohen Konzentrationen ebenfalls zur Selbstquenchung. Um aussagekräftige und reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, ist es daher wichtig, die Lipidproben vor dem Auftragen 1:10 zu verdünnen. Zur Kompensierung von Ungenauigkeiten bei der Proteinbestimmung und dem Pipettieren der einzelnen Proben wird mit dem Verhältnis von Ceramid-Spot zu Ceramid- und Sphingomyelin-Spot gerechnet. Die Ergebnisse werden abschließend noch auf Kontrollprobe (1% v/v EtOH) normalisiert, um Schwankungen zwischen verschiedenen Experimenten auszugleichen.

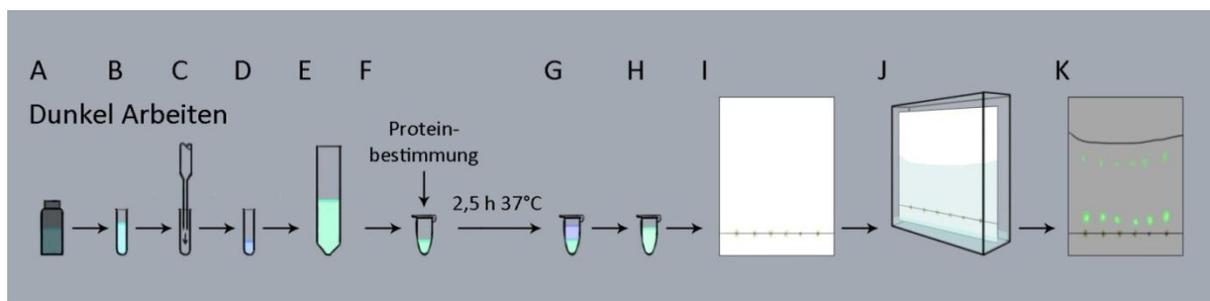


Abbildung 14: Vorbereitung und Durchführung des Sphingomyelinase Assays zur Bestimmung der sMase-Aktivität

A: Das Lösungsmittel-freie NBD-SM wird in CHCl_3 gelöst.

B: $2 \cdot (\text{Probenanzahl} + 1)$ nmol NBD-SM werden in ein Glasröhrchen überführt.

C: Entfernen des CHCl_3 im N_2 -Strom.

D: Lösen des NBD-SM in $(\text{Probenanzahl} + 1)$ μl THF.

E: $200 \cdot (\text{Probenanzahl} + 1)$ μl ARB in einem 15 ml Falcon vorlegen, das in THF gelöste NBD-SM zugeben und vortexen.

F: Pro Probe 20 μg Protein in ein Eppendorf Röhrchen geben, mit 200 μg ARB/NBD-SM Mischung bei 37°C für 2,5 h unter leichtem Schütteln inkubieren.

G: Die Reaktion mit 300 μl $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (2/1) abstoppen und vortexen.

H: Die wässrige Phase abziehen und die organische mit CHCl_3 1:10 verdünnen.

I: Auftragen von je 20 μl auf eine DC-Platte. Laufmittel für die DC: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ (65/25/4, v/v/v)

J: Messung der Fluoreszenzintensität mit CCD-Kamera bei 256 und 365 nm Anregungswellenlänge. Auswertung mit EasyWin.

4. Ergebnisse

4.1. Toxizität von oxidierten Phospholipiden und Apoptose:

Die Bestimmung der Apoptose unter Einfluss der oxidierten Diacyl- und Alkylacyl-Phospholipide, wie im Kapitel material und Methoden besprochen, ist aufschlussreich für eine Aussage über die Toxizität dieser Substanzen. Eine Ursache für die Entstehung und den Verlauf von Arteriosklerose bildet oxidiertes LDL. Es wurde bereits von Hermetter et al. gezeigt, dass oxidiertes LDL den kontrollierten Zelltod in vaskulären glatten Muskelzellen erhöht. Weiter wurde dies für die oxidierten Phospholipide PGPC und POVPC, Bestandteile von oxidiertem LDL, im Einzelnen bestätigt [58]. Neben der Apoptose von Muskelzellen, spielt die Apoptose von Makrophagen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Bildung und Entwicklung von arteriosklerotischen Läsionen. Es liegt somit nahe, die Auswirkungen von oxidierten Phospholipiden auf Makrophagen zu untersuchen. Oxidierte Alkylacylphospholipide sind ebenfalls Bestandteile von oxidiertem LDL. Sie ähneln sowohl ihren Diacylanalogen (sie unterscheiden sich lediglich darin, dass sie in der SN-1 Position eine Alkyl- anstatt einer Acyl-Gruppe haben) sowie als auch dem Plättchenaktivierendem Faktor (PAF) (beide haben eine Alkylgruppe in der SN-1 Position, PAF jedoch nur eine Acetylgruppe in der SN-2 Position). Dies macht sie ebenfalls für eine Untersuchung der Toxizität interessant.

Die FACS-Messung gibt Aufschluss über den Anteil an lebenden, apoptotischen, nekrotischen und spätapoptotischen Zellen einer Population zum Zeitpunkt der Messung. Daraus ergeben sich wichtige Rückschlüsse über die Auswirkungen der oxidierten Phospholipide auf das Überleben der Makrophagen.

4.1.1. Aussehen der Zellen:

Vor dem Ernten der Zellen zur Vorbereitung auf die FACS-Messung zeigen sich bereits deutliche Unterschiede zwischen den mit oxidierten Phospholipiden behandelten und

den unbehandelten Zellen. Als Referenzproben wurden Makrophagen mit 4% EtOH inkubiert. Die oxPL sind ebenfalls in EtOH gelöst wodurch sich die Konzentration für die Referenzproben ergibt. Die Referenzmakrophagen sind nach der 4-stündigen Inkubationszeit morphologisch gleich geblieben. Der Zellrasen ist konfluent angewachsen. Die Makrophagen sind gut differenziert und zeigen deutlich ausgebildete Filopodien. Die mit oxidierten Phospholipiden inkubierten Zellen unterscheiden sich im Aussehen, abhängig vom verwendeten Lipid, verschieden stark vom Normalzustand (Abbildung 15).

Den geringsten Unterschied zeigen die mit POVPC behandelten Zellen. Die Konfluenz verringert sich und die Makrophagen sind weniger eindeutig differenziert. Sie werden rundlicher. Einzelne Zellen sind nicht mehr adhären an der Oberfläche sondern schwimmen im Medium.

Sehr ähnlich verhalten sich die dem E-POVPC ausgesetzten Zellen. Insgesamt weicht die Morphologie der Makrophagen jedoch stärker ab. Im Nährmedium schwimmen vermehrt Zellen. Die Filopodien sind weniger stark ausgeprägt.

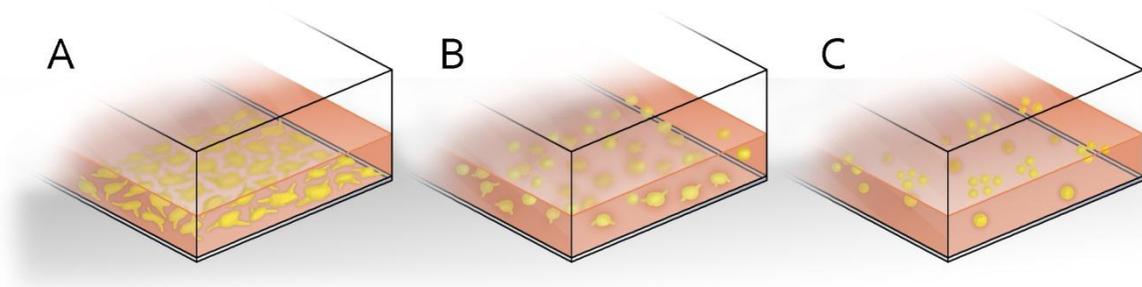


Abbildung 15: Aussehen der Makrophagen nach Inkubation mit verschiedenen oxidierten Phospholipiden.

A: Morphologisch normale Makrophagen. Schön differenzierte Zellen, welche einen konfluenten Zellrasen bilden. Die Filopoden sind deutlich ausgeprägt, und die Zellen sind adhären.

B: Mit POVPC oder E-POVPC inkubierte Makrophagen. Die Zellen sind etwas weniger konfluent gewachsen. Sie sehen deutlich runder aus und die Fortsätze sind weniger deutlich ausgeprägt. Im Medium befinden sich schwimmende Zellen.

C: Makrophagen nach Exposition von PGPC oder E-PGPC. Die Konfluenz ist deutlich verringert. Der Zellrasen zeigt große Lücken und es schwimmen sehr viele Zellen im Medium. Die Makrophagen sind kaum noch differenziert und fast ausschließlich rund.

Die größten Veränderungen zeigen sich nach der Inkubation mit PGPC und E-PGPC. Die Konfluenz ist deutlich verringert, der Zellrasen ist von Löchern durchzogen. Viele Zellen haben sich gelöst und schwimmen. Morphologisch sind die Makrophagen kaum mehr als solche zu erkennen. Sie sind rund und besitzen keine ausgebildeten Filopodien.

Die morphologischen Veränderungen lassen zweifellos einen Trend erkennen, können jedoch teilweise deutlich abweichen ohne ein erkennbare Änderung der FACS-Ergebnisse zu zeigen. Vor allem die bei POVPC und E-POVPC zu beobachtenden Effekte fallen mitunter deutlich stärker aus und gleichen fast den Veränderungen bei PGPC/E-PGPC, ohne jedoch deswegen zu einer weiter erhöhten Apoptoserate zu führen.

Morphologische Veränderungen durch Exposition mit POVPC und PGPC wurden von Fruhwirt und Moutzi [58] bereits für glatte vaskuläre Muskelzellen gezeigt. Diese Veränderungen sind den in dieser Arbeit mit Mikroskopie beobachteten sehr ähnlich. Die Muskelzellen weisen ebenfalls eine weniger differenzierte Morphologie auf und sind weniger konfluent und adhärent. Bei den von Fruhwirt und Moutzi durchgeführten Versuchen wurden die Zellen ebenfalls mit 50µM oxidierten Phospholipiden inkubiert, jedoch für den wesentlich längeren Zeitraum von 40h.

4.1.2. Bestimmung des Zelltods mittels FACS:

Die Apoptose wurde wie in Material und Methoden beschrieben gemessen. Anhand der Dot-Plots der FACS-Messungen wird der Anteil an lebenden, apoptotischen, nekrotischen und spätapoptotischen Makrophagen ermittelt. Hierfür wird der Plot mittels Quadrant geviertelt. Der Quadrant für eine Messreihe wird anhand der mit EtOH inkubierten Makrophagen bestimmt. Er wird so platziert, dass die Population der gesunden Zellen möglichst vollständig im unteren linken Viertel liegt (Abbildung 16). Auf der x-Achse des Dotplots ist die AnnexinV-Fluoreszenz, auf der y-Achse die PI-Fluoreszenz aufgetragen. Im Quadrant rechts unten befinden sich somit apoptotische Makrophagen. Oben links sind die nekrotischen Zellen. Makrophagen im oberen rechten

Quadranten sind bereits so stark beschädigt, dass sowohl AnnexinV als auch PI gut binden. Diese werden als spätapoptotisch bezeichnet.

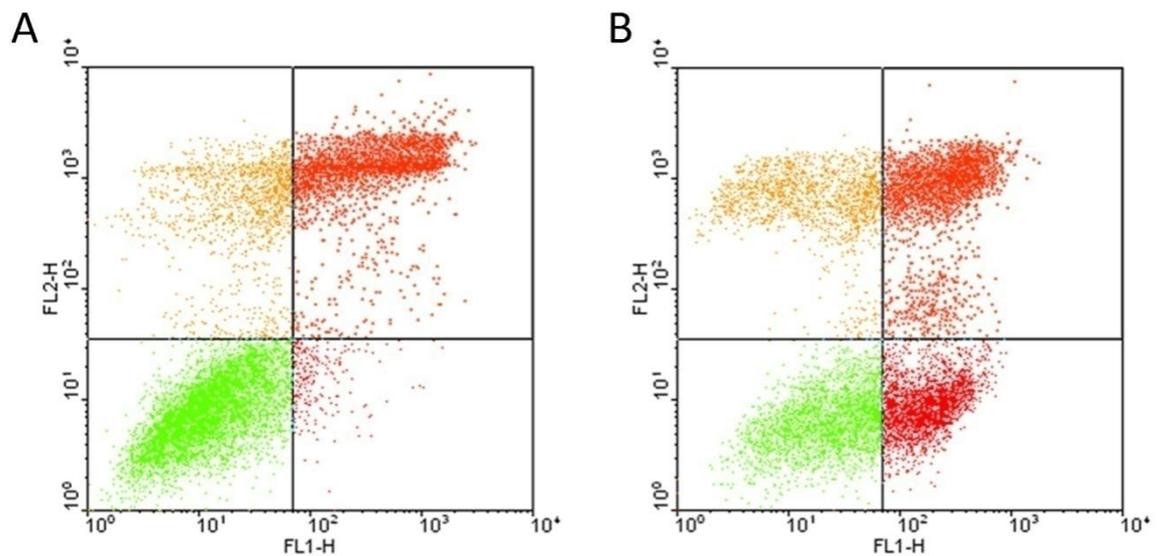


Abbildung 16: Unterteilung des FACS Dotplots in 4 Quadranten zur Auswertung. FL1-H: Annexin V Fluoreszenz, Maß für die Apoptose; FL2-H: Propidiumiodid Fluoreszenz, Maß für die Nekrose

A: Der Quadrant zu Auswertung einer Messreihe wird so festgelegt, dass er bei der Referenzmessung (EtOH) die Population der lebenden Makrophagen möglichst vollständig im unteren linken Viertel einschließt.

B: Der Quadrant unterteilt den Dotplot in: Lebende Zellen (unten links), apoptotische Zellen (unten rechts), nekrotische Zellen (oben links) und spätapoptotische Zellen (oben rechts).

Um zu bestimmen wie sich die verschiedenen oxidierten Phospholipide auf RAW 264.7 Makrophagen auswirken, werden die Ergebnisse mehrerer FACS-Messungen ausgewertet:

Abbildung 17: Effekt von EtOH auf Viabilität und Zelltod von RAW 264.7 Makrophagen.

FACS-Analyse der Zellfärbung mit Propidiumiodid (Nekrose, FL2-H) und Annexin (Apoptose, FL1-H), Dotplots.

A: Probe 1: Nekrotisch: 17,33%; Spätapoptotisch: 18,42%; Lebend: 62,22%; Apoptotisch: 2,03%

B: Probe 2: Nekrotisch: 13,39%; Spätapoptotisch: 26,89%; Lebend: 57,35%; Apoptotisch: 2,37%

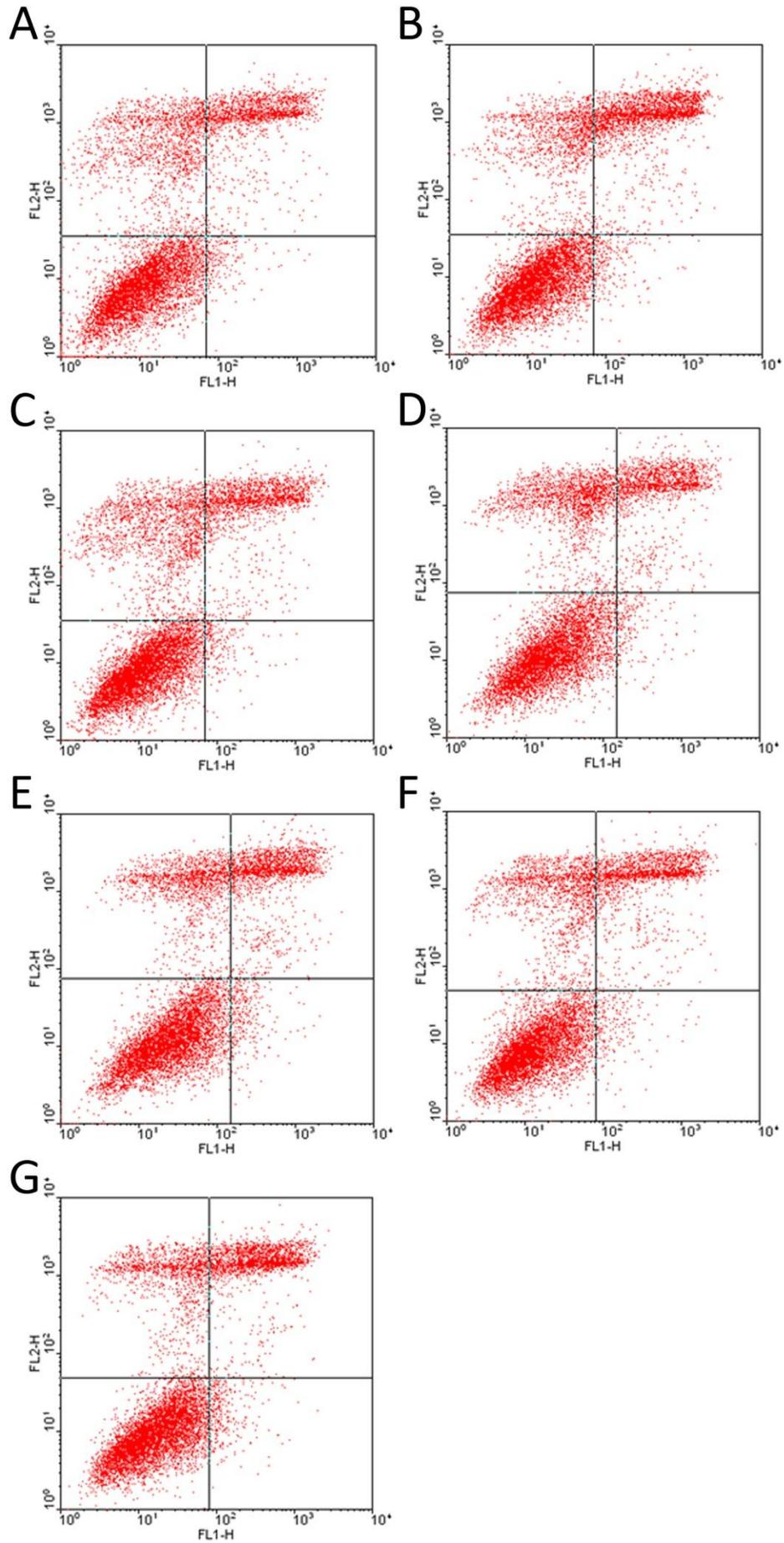
C: Probe 3: Nekrotisch: 17,81%; Spätapoptotisch: 18,52%; Lebend: 61,85%; Apoptotisch: 1,82%

D: Probe 4: Nekrotisch: 19,94%; Spätapoptotisch: 16,21%; Lebend: 61,90%; Apoptotisch: 1,95%

E: Probe 5: Nekrotisch: 15,64%; Spätapoptotisch: 19,41%; Lebend: 61,85%; Apoptotisch: 3,10%

F: Probe 6: Nekrotisch: 16,21%; Spätapoptotisch: 19,39%; Lebend: 62,15%; Apoptotisch: 2,24%

G: Probe 7: Nekrotisch: 12,51%; Spätapoptotisch: 19,70%; Lebend: 64,63%; Apoptotisch: 3,16%



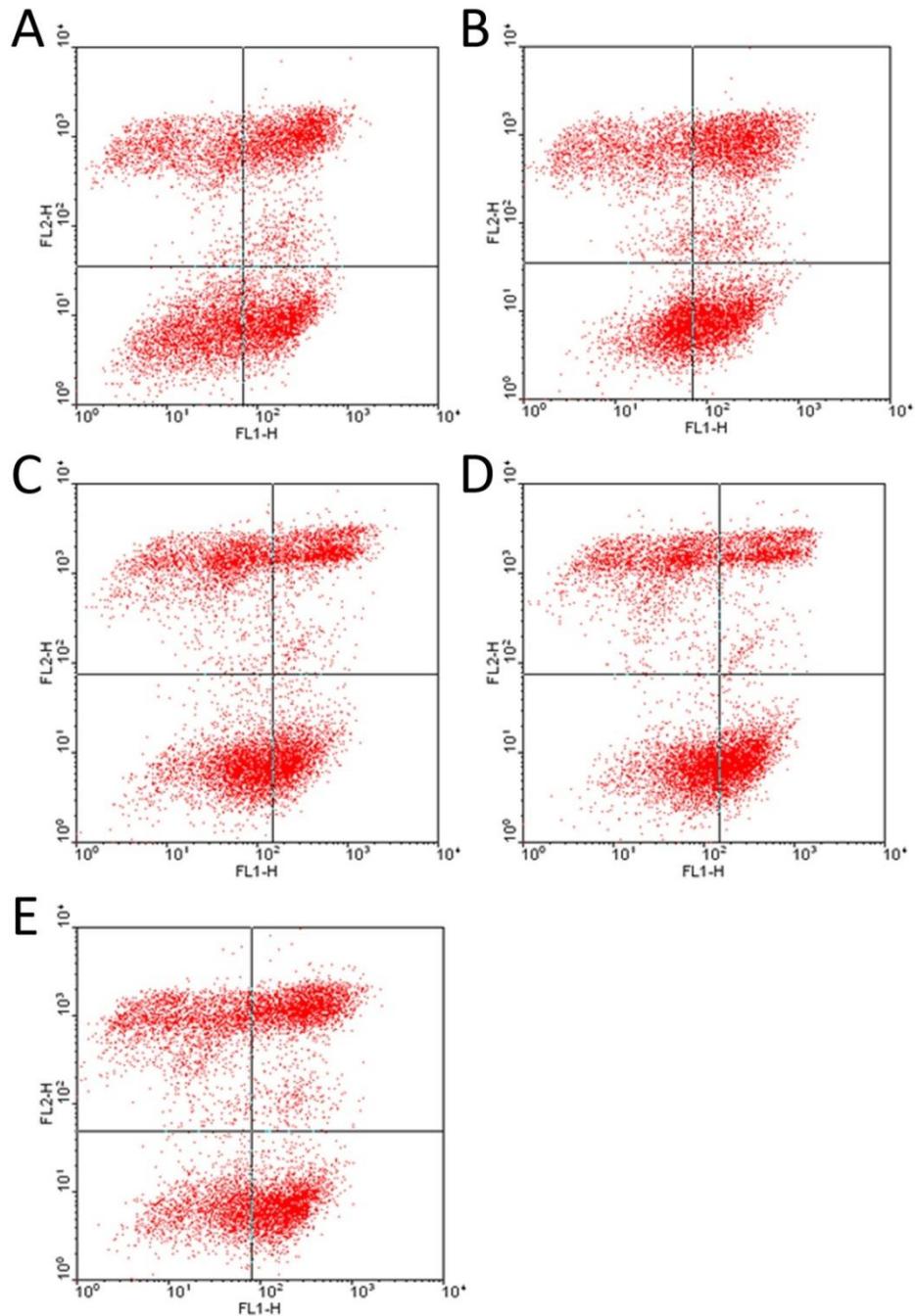


Abbildung 18: Effekt von E-PGPC auf Viabilität und Zelltod von RAW 264.7 Makrophagen.

FACS-Analyse der Zellfärbung mit Propidiumiodid (Nekrose, FL2-H) und Annexin (Apoptose, FL1-H), Dotplots.

A: Probe 1: Nekrotisch: 16,79%; Spätapoptotisch: 28,02%; Lebend: 28,29%; Apoptotisch: 26,90%

B: Probe 2: Nekrotisch: 17,93%; Spätapoptotisch: 30,07%; Lebend: 22,30%; Apoptotisch: 29,07%

C: Probe 3: Nekrotisch: 24,50%; Spätapoptotisch: 19,99%; Lebend: 33,47%; Apoptotisch: 22,03%

D: Probe 4: Nekrotisch: 23,37%; Spätapoptotisch: 15,33%; Lebend: 30,20%; Apoptotisch: 31,10%

E: Probe 5: Nekrotisch: 24,08%; Spätapoptotisch: 29,43%; Lebend: 18,27%; Apoptotisch: 28,21%

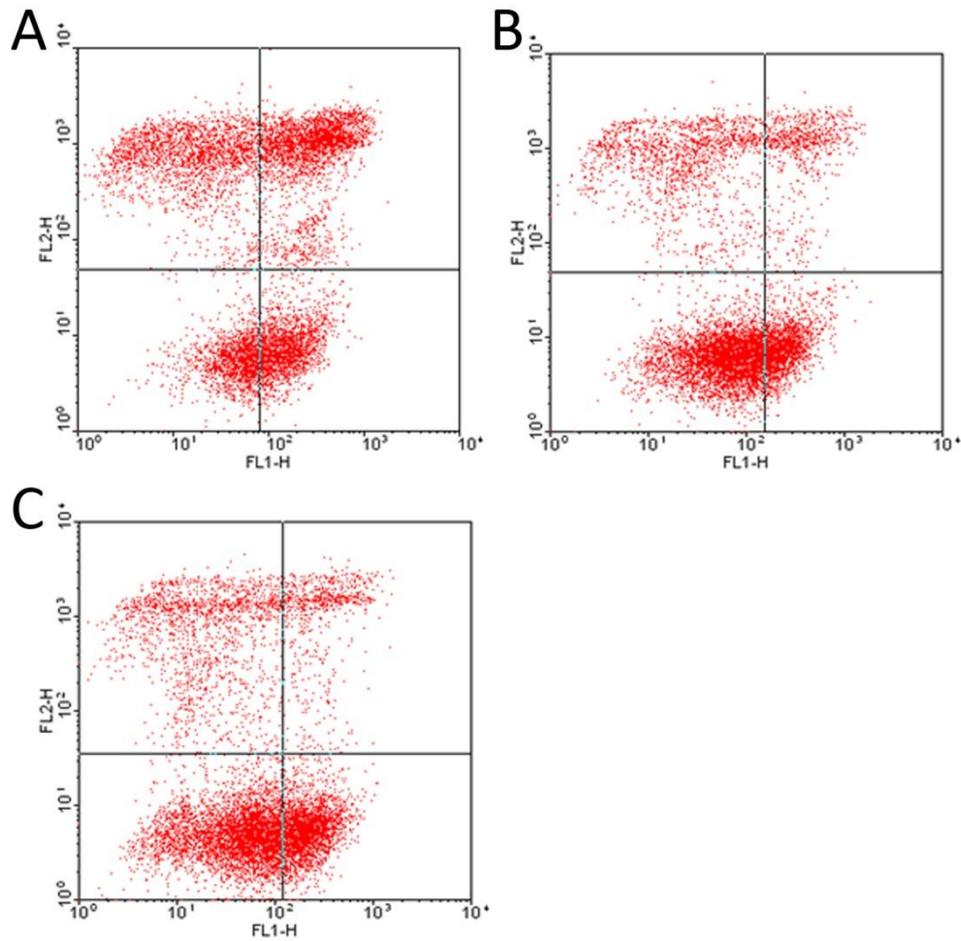


Abbildung 19: Effekt von PGPC auf Viabilität und Zelltod von RAW 264.7 Makrophagen.

FACS-Analyse der Zellfärbung mit Propidiumiodid (Nekrose, FL2-H) und Annexin (Apoptose, FL1-H), Dotplots.

A: Probe 1: Nekrotisch: 25,17%; Spätapoptotisch: 32,80%; Lebend: 18,14%; Apoptotisch: 23,89%

B: Probe 2: Nekrotisch: 17,05%; Spätapoptotisch: 8,24%; Lebend: 53,00%; Apoptotisch: 21,71%

C: Probe 3: Nekrotisch: 16,31%; Spätapoptotisch: 6,73%; Lebend: 48,22%; Apoptotisch: 28,12%

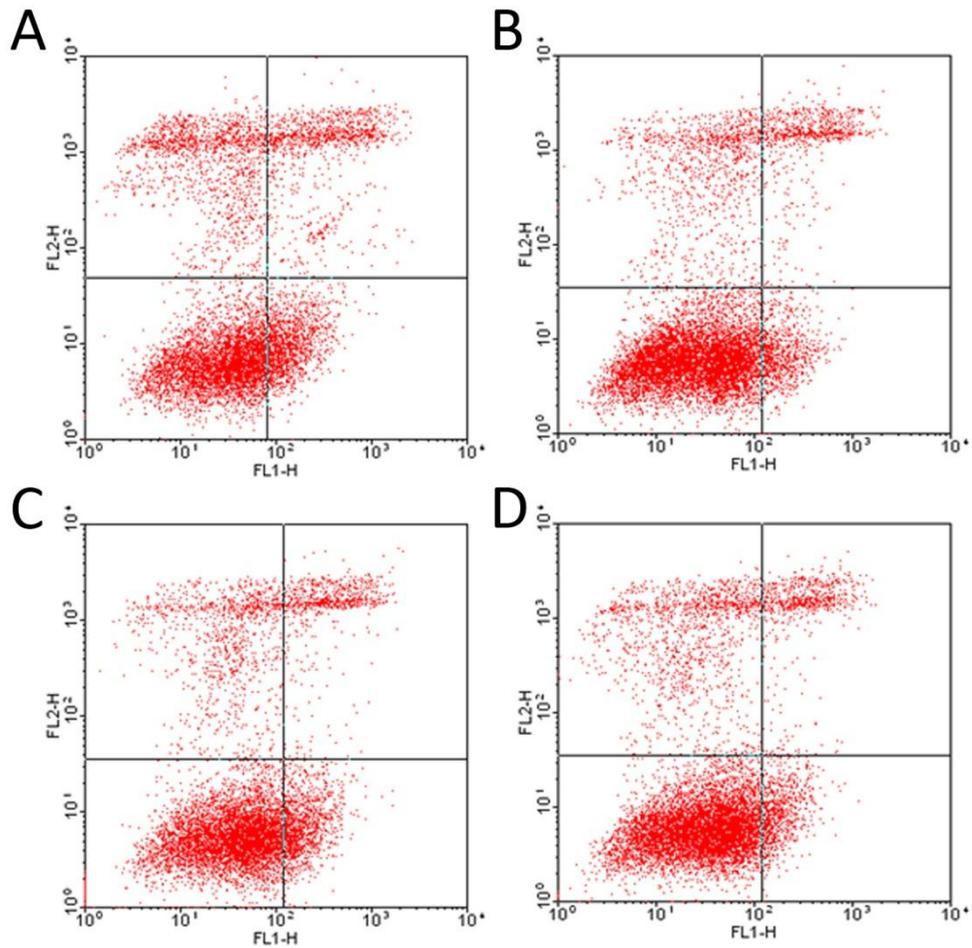


Abbildung 20: Effekt von POVPC auf Viabilität und Zelltod von RAW 264.7 Makrophagen.

FACS-Analyse der Zellfärbung mit Propidiumiodid (Nekrose, FL2-H) und Annexin (Apoptose, FL1-H), Dotplots.

A: Probe 1: Nekrotisch: 16,31%; Spätapoptotisch: 12,46%; Lebend: 54,50%; Apoptotisch: 16,73%

B: Probe 2: Nekrotisch: 10,02%; Spätapoptotisch: 7,23%; Lebend: 74,31%; Apoptotisch: 8,26%

C: Probe 3: Nekrotisch: 11,06%; Spätapoptotisch: 7,54%; Lebend: 66,24%; Apoptotisch: 15,16%

D: Probe 4: Nekrotisch: 12,95%; Spätapoptotisch: 6,73%; Lebend: 72,16%; Apoptotisch: 8,16%

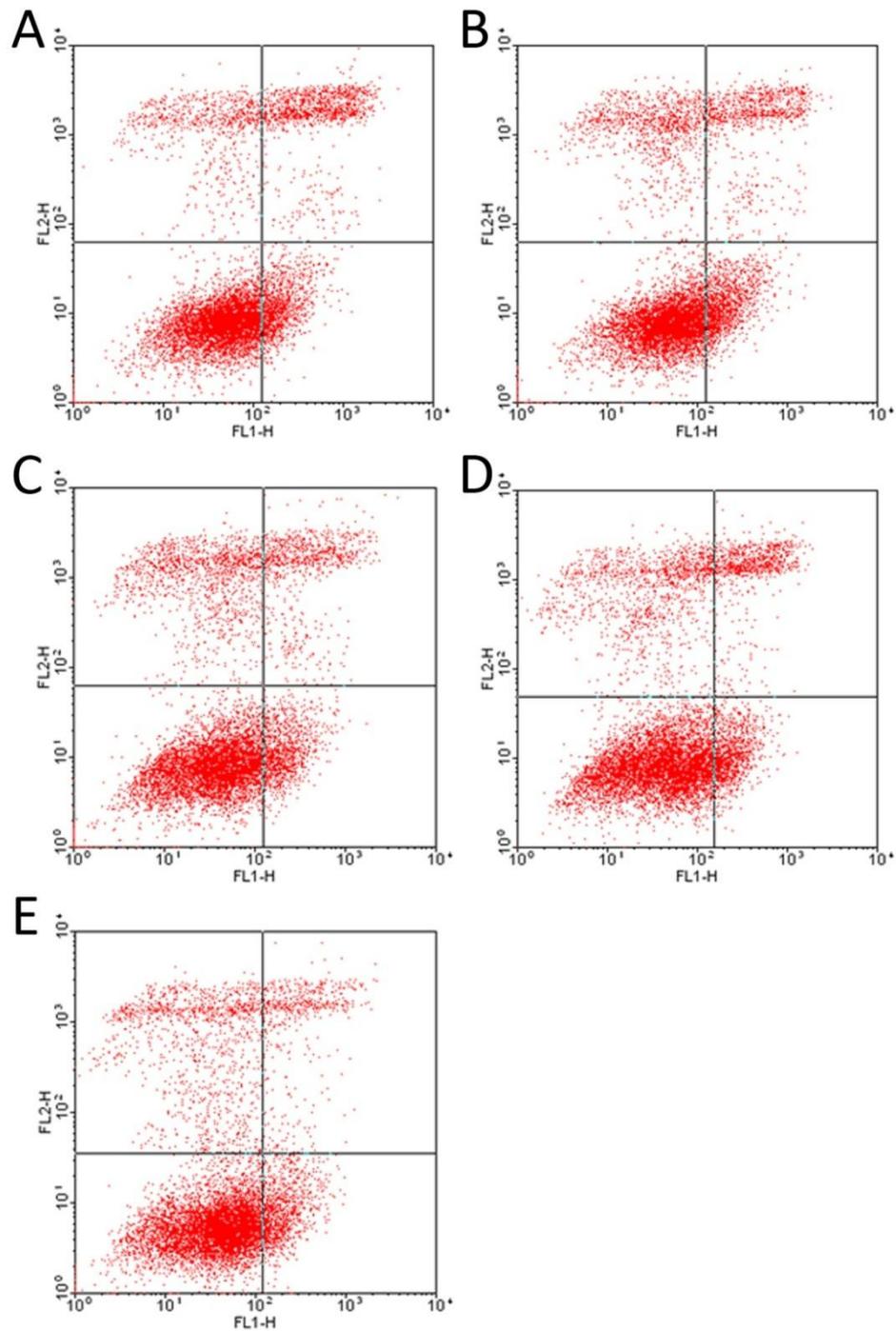


Abbildung 21: Effekt von E-POVPC auf Viabilität und Zelltod von RAW 264.7 Makrophagen.

FACS-Analyse der Zellfärbung mit Propidiumiodid (Nekrose, FL2-H) und Annexin (Apoptose, FL1-H), Dotplots.

A: Probe 1: Nekrotisch: 7,41%; Spätapoptotisch: 12,25%; Lebend: 66,32%; Apoptotisch: 14,02%

B: Probe 2: Nekrotisch: 10,96%; Spätapoptotisch: 9,36%; Lebend: 64,29%; Apoptotisch: 15,39%

C: Probe 3: Nekrotisch: 13,38%; Spätapoptotisch: 8,42%; Lebend: 65,80%; Apoptotisch: 12,40%

D: Probe 4: Nekrotisch: 13,03%; Spätapoptotisch: 8,90%; Lebend: 65,93%; Apoptotisch: 12,14%

E: Probe 5: Nekrotisch: 12,07%; Spätapoptotisch: 5,56%; Lebend: 70,13%; Apoptotisch: 12,24%

Vergleicht man die Aufteilung der verschiedenen Experimente, erkennt man bereits sehr gut die unterschiedlichen Auswirkungen der verschiedenen oxidierten Phospholipide (Abbildung 22).

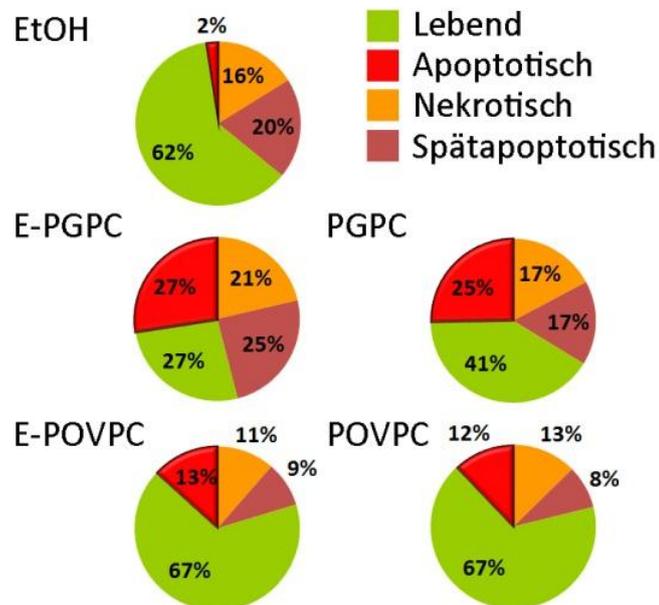


Abbildung 22: Überblick über die Auswirkungen von verschiedenen oxidierten Phospholipiden auf Zelltod und Vitalität von RAW 264.7 Makrophagen. Bezogen auf die EtOH Referenzproben zeigen die mit PGPC und E-PGPC inkubierten Makrophagen stark erhöhte Apoptose und Nekrose. Inkubation mit POVPC und E-POVPC führt hingegen vor allem zu einem Schift von der Nekrose zur Apoptose ohne die totale Zellsterblichkeit stark zu verändern.

Die stärkste Veränderung zeigt sich bei den mit PGPC und E-PGPC inkubierten Makrophagen. Die Apoptose steigt stark an. Nekrotische und spätapoptotische Zellen treten ebenfalls vermehrt auf. Dies ist bei E-PGPC stärker ausgeprägt als bei PGPC. Die gesunde Zellpopulation nimmt deutlich ab. Bei E-PGPC ist sie auf weniger als die Hälfte reduziert.

Exposition der Makrophagen mit E-POVPC oder POVPC induziert ebenfalls Apoptose. Verglichen mit E-PGPC/PGPC ist der Anstieg nur etwa halb so groß. Die Population der gesunden Zellen bleibt im Gegenzug allerdings gleich. Das Ausmaß der Nekrose und der spätapoptotischen Zellen ist somit geringer.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die oxidierten Phospholipide, vor allem E-PGPC und PGPC, signifikante Auswirkungen auf die Zellsterblichkeit der Makrophagen zeigen.

4.1.3. Auswirkungen von oxidierten Phospholipiden auf die Apoptose von RAW 264.7 Makrophagen:

Die Apoptose – die durch die oxidierten Phospholipiden PGPC, E-PGPC, POVPC und E-POVPC induziert wurde - wird durch Färben mit AnnexinV und anschließender FACS Analyse, wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben, gemessen. Die Zellen werden hierfür mit 50µM eines oxidierten Phospholipids für 4 Stunden inkubiert. Die Ergebnisse der Messreihen werden statistisch ausgewertet (Abbildung 23).

Als Referenz für unbehandelte, vitale Zellen werden parallel Makrophagen mit 4% EtOH inkubiert. Dies entspricht der Menge an EtOH in der die 50µM oxPL gelöst wurden. Diese Referenzpopulation zeigt eine Apoptose von $2,38 \pm 0,54\%$.

Die meisten apoptotischen Zellen enthalten die mit E-PGPC inkubierten Zellen mit $27,46 \pm 3,40\%$.

Das Diacylanalog PGPC zeigt einen sehr ähnlichen Wert: $24,92 \pm 4,53\%$.

Die mit POVPC und E-POVPC inkubierten Proben zeigen auch eine verstärkte Apoptose. Die Zunahme ist jedoch weniger drastisch als bei den mit PGPC und E-PGPC versetzten Proben. Wenn Alkylacyl- und Diacyl-Phospholipide verglichen werden, sieht man ebenfalls sehr ähnliche Werte.

Bei den mit E-POVPC inkubierten Makrophagen beträgt der Anteil an apoptotischen Zellen $13,24\% \pm 1,43\%$.

POVPC führt zu einem Anstieg der Apoptose auf $12,08 \pm 4,51\%$.

Die Signifikanz der Unterschiede bei der Apoptose wird mittels Zweistichproben-t-Test unter Annahme gleicher Varianzen bestimmt. Die Zunahme der Apoptose durch

Inkubation mit oxidierten Phospholipiden verglichen mit unbehandelten Makrophagen (1% EtOH) ist für alle Messreihen mit $p < 0,005$ signifikant. Die Signifikanz für den Unterschied zwischen den Lipidpaaren PGPC vs. POVPC und E-PGPC vs. E-POVPC ist mit $p < 0,01$ und $p < 0,005$ ebenfalls gegeben. Andererseits sind die Unterschiede in der Apoptose zwischen den Diacylphospholipiden und deren Alkylacylanalogen (PGPC vs. E-PGPC und POVPC vs. E-POVPC) nicht signifikant.

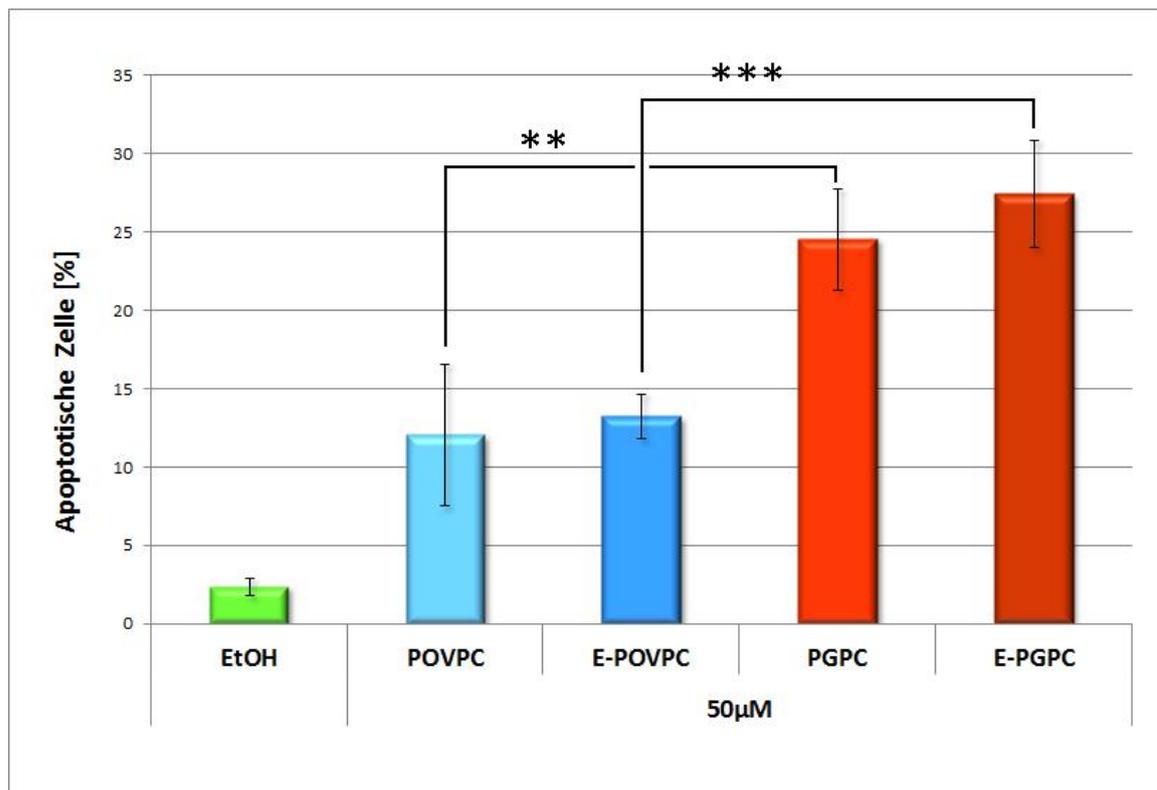


Abbildung 23: Apoptotische Effekte von oxidierten Alkylacyl- und Diacyl-Phospholipiden auf RAW 264.7 Makrophagen.

Die Zellen werden, wie in Material und Methoden beschrieben, mit 50µM oxidierten Phospholipiden (PGPC, E-PGPC, POVPC und E-POVPC) und 0,1% FCS für 4h inkubiert. Nach Färben mit AnnexinV wird die Apoptose mittels FACS bestimmt. Als Kontrolle werden mit 1% EtOH inkubierte Zellen verwendet.

Gezeigt werden Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die Signifikanz der Ergebnisse wird mittels Student's Zweistichproben-t-Test unter Annahme gleicher Varianzen bestimmt. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,005$

Seiman et al. [2] zeigten, dass ein wesentlicher Faktor bei der Induktion von Apoptose in Makrophagen durch oxidierte Phospholipide ER-Stress ist. Inkubation der Zellen für 30 h mit 10 µg POVPC / ml (16,8 µM) erzielt nur minimale Wirkung. Die Apoptose steigt

verglichen mit der Kontrolle nur von 4% auf 6%. Der gleiche Versuch mit zusätzlich 0,25 μM Tapsigargin, welches ER-Stress verursacht, erhöht die Apoptose auf $\sim 30\%$.

Die Gruppe Deigner untersuchte die Auswirkungen von mmLDL auf kultivierte menschliche Makrophagen (M Φ). Sie konnten einen Anstieg der Apoptose von 11% auf 22% nach 2 h und auf 49% nach 4 h bei Inkubation mit 54 $\mu\text{g}/\text{ml}$ oxLDL ($2,2 \pm 0,5$ nmol thiobauric acid reactive substance /mg) messen [59]. Später wurde gezeigt, dass die Wirkung von mmLDL auf M Φ Konzentrationsabhängig ist. Nach 4 h Inkubation ergibt sich für die Apoptose: 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ mmLDL, 7%; 27 $\mu\text{g}/\text{ml}$ mmLDL, 20,7%; 54 $\mu\text{g}/\text{ml}$ mmLDL, 29,3%; 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 37% (Deigner, et al. 2001).

Exposition von Makrophagen gegenüber mmLDL muss nicht zwangsweise zur Apoptose führen. Hundal et al. konnten zeigen, dass geringe mmLDL Mengen das Überleben von „Bone Marrow-Derived Macrophages“ (BMDM) steigern und die Apoptose senken (Hundal, et al. 2001). BMDM, welche in Medien ohne Wachstumsfaktoren kultiviert werden, zeigen nach ungefähr 24 h Stunden erhöhte Apoptose. Die Apoptose wird ebenfalls mittels FACS bestimmt. Anstatt AnnexinV wird Hoechst 33342 verwendet. Nach 24h sind $\sim 20\%$ der Makrophagen apoptotisch und $\sim 50\%$ spätapoptotisch. Werden die Zellen mit 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ mmLDL versetzt, zeigen sich nach 24h keine apoptotischen oder spätapoptotischen Zellen.

Einen ähnlichen Effekt auf das Überleben von Makrophagen in Gegenwart von oxLDL konnten Boullier, et al. zeigen. Sie untersuchten residente peritoneale Makrophagen. Zur Bestimmung der Apoptose wurde in dieser Studie nicht ein auf AnnexinV (oder einem ähnlichen Farbstoff) basierender Assay verwendet, da diese Zellen auch im gesunden Zustand große Mengen an Phosphatidylserin an der Zelloberfläche aufweisen. Die Apoptose wird stattdessen über DNA Fragmentierung und Caspase-3 Aktivität bestimmt. Nach 48h Inkubation mit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ mmLDL zeigen diese Zellen keine verstärkte Fragmentierung der DNA bzw. erhöhte Caspase-3 Aktivität. Mit 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ oxLDL steigen beide Werte auf das ~ 10 - bzw. ~ 5 -fache an. Werden die Makrophagen sowohl mit 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ oxLDL als auch mit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ mmLDL inkubiert ist der Anstieg der DNA Fragmentierung und der Caspase-3 Aktivität nur etwa halb so stark [60].

Die Auswirkung von POVPC und PGPC auf die Apoptose von vaskulären glatten Muskelzellen (VSMC) wurde von Fruhwirt und Moutzi bestimmt [58]. Hierfür wurde ebenfalls mit 50 μ M POVPC bzw. PGPC für 4h inkubiert und die Apoptose mittels FACS gemessen. In VSMC ist unter den gegebenen Bedingungen POVPC toxischer als PGPC. Vergleicht man die Makrophagen mit den VSMC, kommt es nach Inkubation mit POVPC jeweils zu einem Anstieg der Apoptose um das 5-fache in Bezug auf die Kontrollprobe. Während in Makrophagen PGPC noch stärkere Effekte zeigt und zu einem Anstieg um den Faktor 10 führt, ist dessen Wirkung in VSMC weniger drastisch als die des POVPC; die Apoptose verdreifacht sich.

4.2. Bestimmung der Aktivität von sauren Sphingomyelinase:

Die oxidierten Phospholipide PGPC, E-PGPC, POVPC und E-POVPC wirken toxisch auf RAW 264.7 Makrophagen und führen zu einem Anstieg der Apoptose. Über welche Mechanismen die Apoptose ausgelöst wird, ist weitgehend unklar. Die saure Sphingomyelinase (aSMase) wird in der Literatur mehrfach als mögliches Target im Zusammenhang mit von oxidierten Phospholipiden induzierter Apoptose genannt.

In unserer Arbeitsgruppe wurde bereits die Auswirkung von POVPC, PGPC [1] und mmLDL [61] auf die aSMase Aktivität in vaskulären glatten Muskelzellen gemessen. Inkubation mit 10 μ M oxPI für 30min führt zu einem Anstieg der aSMase Aktivität in VSMCs. Bezogen auf eine Kontrollprobe ohne oxPI führt POVPC zu einem Aktivitätsanstieg auf ~180%. Die Auswirkungen von PGPC sind mit ~140% weniger deutlich (Loidl, Sevcsik, et al. 2003). Inkubation mit mmLDL (60 μ g apo B/ml) für 30 min erhöht die aSMase Aktivität auf ungefähr 180% [61].

Einen gegenteiligen Effekt konnten Hundal, et al. in Makrophagen bei geringen LDL Mengen zeigen. Diese verhindern den Anstieg der aSMase Aktivität in BMDM in Medien ohne Wachstumsfaktoren [62]. Nach 30h Wachstum ohne Wachstumsfaktoren steigt die aSMase Aktivität in BMDM auf ~300% an. Werden die Zellen in Medium ohne

Wachstumsfaktoren kultiviert, jedoch mit 25µg/ml mmLDL versetzt, steigt die aSMase Aktivität nach 30h nicht an.

Zur Bestimmung der aSMase Aktivität in RAW 264.7 Makrophagen unter Einfluss von oxPL und oxE-PL werden die Zellen mit 25µM der oxidierten Phospholipide für 5 bzw. 15 Minuten inkubiert. Die Zellen werden wie in Material und Methoden besprochen behandelt und mit NBD-Sphingomyelin als Substrat inkubiert und ausgewertet. Es gibt keine signifikanten Veränderungen der aSMase Aktivität im Zeitraum zwischen 5 und 15 Minuten erkennbar (Abbildung 24).

POVPC und E-POVPC führen zu einer erhöhten Enzymaktivität. POVPC 5 Min: $1,12 \pm 0,09$; E-POVPC 5 Min: $1,34 \pm 0,17$; POVPC 15 Min: $1,24 \pm 0,13$; E-POVPC 15 Min: $1,38 \pm 0,17$.

Die Inkubation mit PGPC und E-PGPC senkt die Aktivität der aSMase. PGPC 5 Min: $0,78 \pm 0,16$; E-PGPC 5 Min: $0,71 \pm 0,18$; PGPC 15 Min: $0,69 \pm 0,15$; E-PGPC 15 Min: $0,73 \pm 0,08$.

Die Aktivitätsänderung der aSMase nach 5 Minuten verglichen mit der Kontrollprobe ist für PGPC und POVPC mit $p < 0,01$ und für E-PGPC und E-POVPC mit $p < 0,005$ signifikant. Nach 15 Minuten Inkubation sind die Unterschiede der aSMase-Aktivität mit allen oxPL mit $p < 0,005$ signifikant.

Es gibt keine signifikanten Änderungen der aSMase-Aktivität zwischen 5 und 15 Minuten.

Die Aktivitätsunterschiede zwischen denen mit POVPC und E-POVPC inkubierten Proben sind ebenfalls nicht signifikant. Dies gilt auch für die mit PGPC bzw. E-PGPC inkubierten Proben.

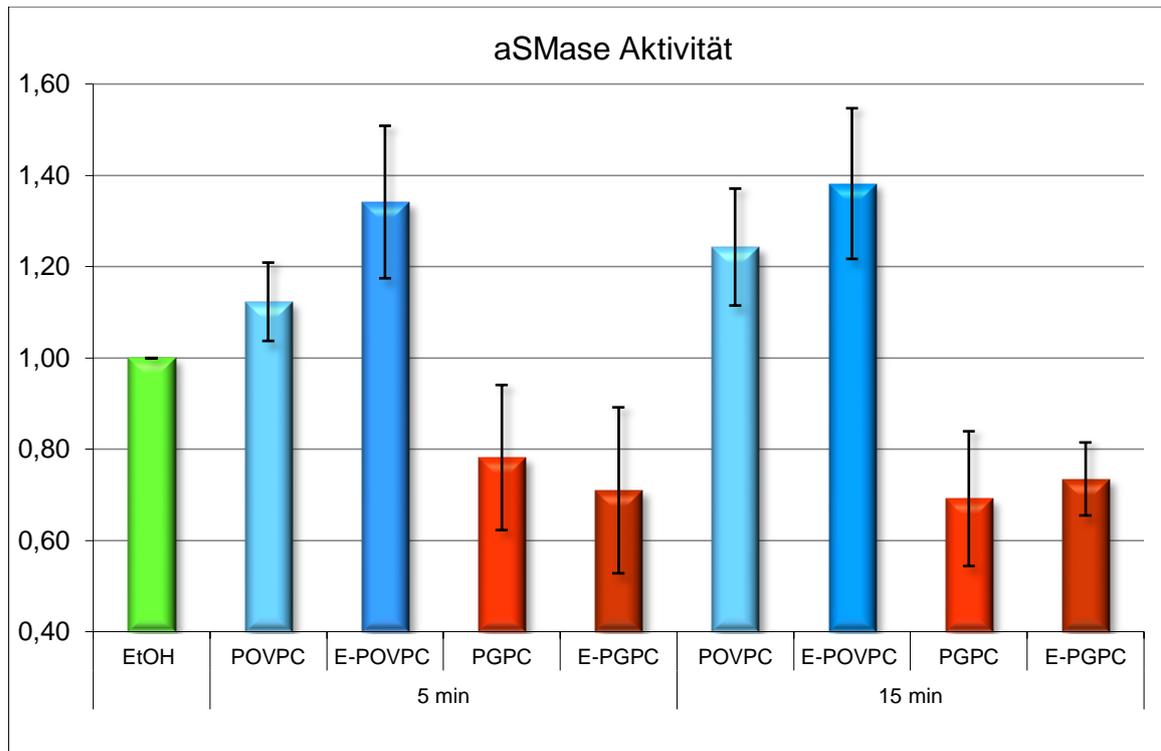


Abbildung 24: Beeinflussung der aSMase Aktivität durch oxidierte Phospholipide in RAW 264.7 Makrophagen.

RAW 264.7 Makrophagen werden mit 25 μ M PGPC, E-PGPC, POVPC und E-POVPC für 5 bzw. 15 Minuten inkubiert. Als Kontrolle dienen mit 1% v/v EtOH inkubierte Zellen. Die Sphingomyelinase Aktivität wird, wie in Material und Methoden beschrieben, bestimmt. POVPC und E-POVPC zeigen bereits nach 5 Minuten eine gesteigerte Enzymaktivität. PGPC und E-PGPC wirken inhibierend auf die aSMase.

Gezeigt werden Mittelwerte \pm Standardabweichung normalisiert auf die Kontrollproben.

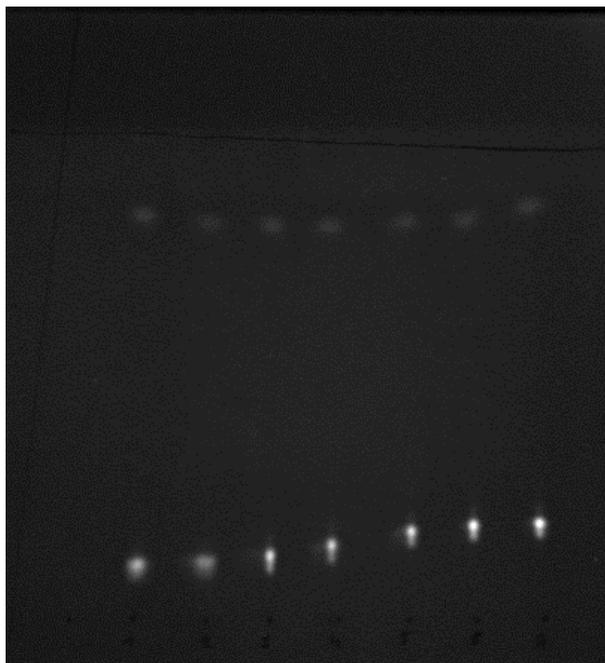


Abbildung 25: Fluoreszenzaufnahme Dünnschichtchromatographie des aSMase Assays vom 2011.02.10

NBD-Sphingomyelin unten, NMD-Ceramid oben.

Spots von Links nach Rechts: Nullprobe; EtOH 5min; POVPC 5min; E-POVPC 5min; EtOH 15min; POVPC 15min; E-POVPC 15min

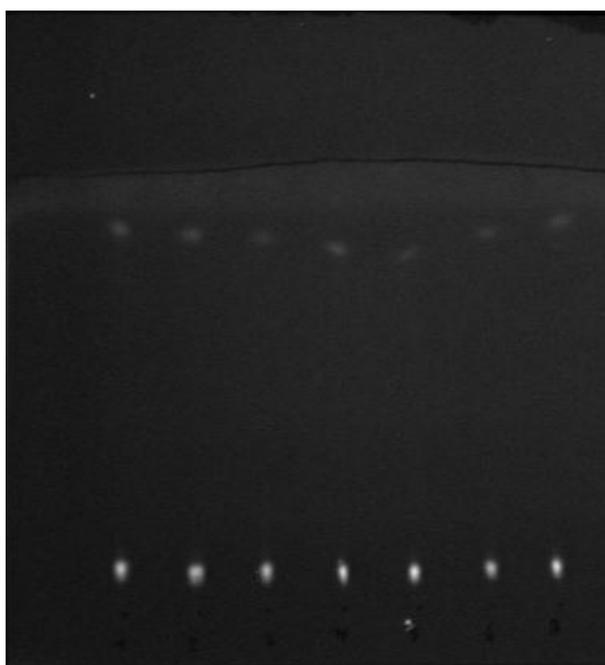


Abbildung 26: Fluoreszenzaufnahme Dünnschichtchromatographie des aSMase Assays vom 2011.03.04

NBD-Sphingomyelin unten, NMD-Ceramid oben.

Spots von Links nach Rechts: Nullprobe; EtOH 5min; POVPC 5min; E-POVPC 5min; EtOH 15min; POVPC 15min; E-POVPC 15min

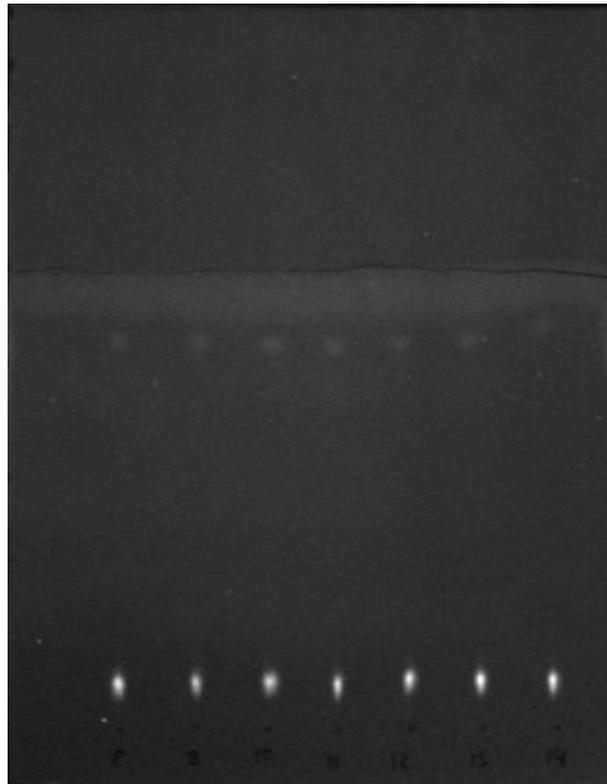


Abbildung 27: Fluoreszenzaufnahme Dünnschichtchromatographie des aSMase Assays vom 2011.03.04

NBD-Sphingomyelin unten, NMD-Ceramid oben.

Spots von Links nach Rechts: Nullprobe; EtOH 5min; PGPC 5min; E-PGPC 5min; EtOH 15min; PGPC 15min; E-PGPC 15min

5. Diskussion

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, induzieren PGPC oder E-PGPC sowie, in einem geringeren Ausmaß, POVPC oder E-POVPC einen signifikanten Anstieg der Apoptose in RAW 264.7 Makrophagen. Die Zunahme der Apoptose nach Behandlung mit PGPC oder E-PGPC ist ungefähr doppelt so groß wie nach Behandlung mit POVPC oder E-POVPC. PGPC und POVPC sowie ihre Alkylacyl-Analoga, unterscheiden sich in der funktionellen Gruppe in der ω -Position der kurzen sn-2 Kette. PGPC besitzt eine negativ geladene, aber chemisch unreaktive Carboxylgruppe. POVPC hingegen weist eine weniger stark geladene Aldehydgruppe auf, welche chemisch reaktiv ist. Die Unterschiede der physikalischen und chemischen Eigenschaften sowie die daraus resultierenden Abweichungen in Wirkort und Wirkmechanismus innerhalb der Zelle bewirken den deutlichen Unterschied im Anstieg der durch PGPC oder POVPC induzierten Apoptose.

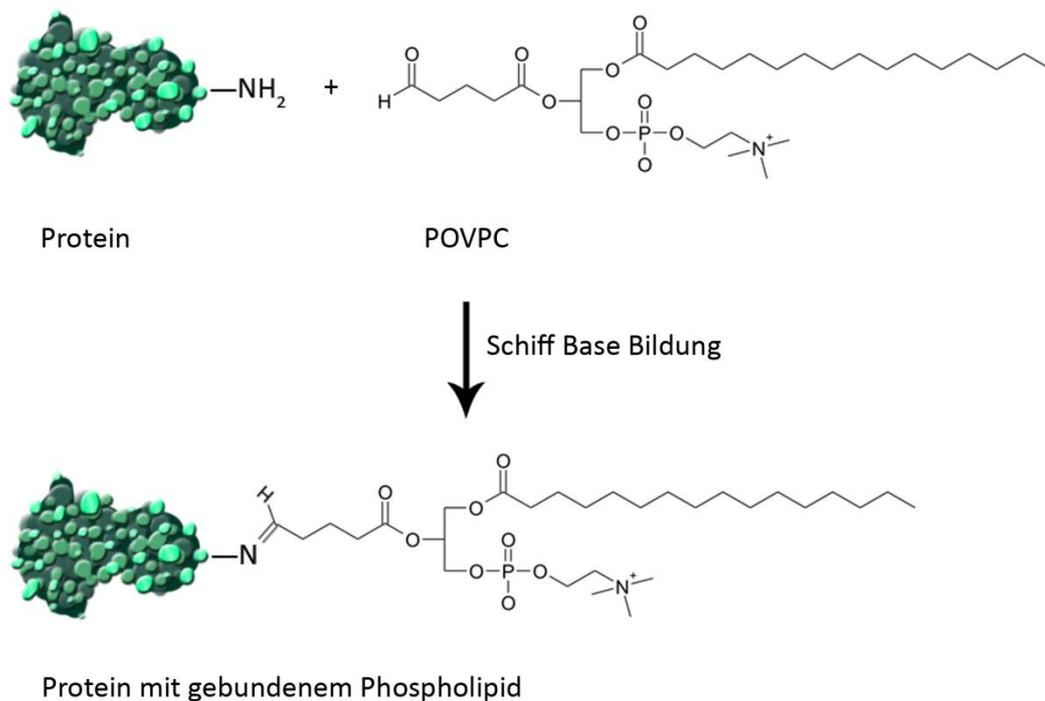


Abbildung 28: Die Aldehydgruppe von POVPC und E-POVPC kann an primäre Amine von Proteinen unter Bildung einer Schiff'schen-Base kovalent binden.

Im Gegensatz zur unreaktiven Carboxylgruppe kann die Aldehydgruppe von POVPC und E-POVPC mit primären Aminen von Aminophospholipiden und Proteinen eine Schiff'sche Base bilden (Abbildung 28).

Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass BY-POVPE, ein fluoreszenzmarkiertes Analogon von POVPC, nach Inkubation mit Makrophagen an der Zelloberfläche lokalisiert ist (Abbildung 29) und mit spezifischen Proteinen Schiff-Basen bildet [63]. Die Selektivität beruht vermutlich nicht auf einer gezielten Erkennung dieser Proteine. Es spielt eher der pK-Wert ihrer freien Aminogruppen eine Rolle, der wahrscheinlich die Bildung der Schiff'schen-Base favorisiert. Die Auswirkungen auf die Aktivität von Membranproteinen durch Binden von Phospholipiden [64] oder anderen Aldehyden [65] [66] konnten bereits gezeigt werden. Ähnliche Wirkungen können auch bei der kovalenten Bindung von POVPC und E-POVPC angenommen werden. Die mit BY-POVPE markierten Proteine sind am Zelltod sowie an Überlebensmechanismen, zellulären Stressreaktionen und dem Transport und Metabolismus von Lipiden beteiligt. Unter anderem sind die Protein-Targets von POVPC Cethepsin D, Caspase 1 und Caspase 3.

POVPC und E-POVPC führen weiters zu einem Anstieg der aSMase-Aktivität und somit zu einer Ceramid-vermittelten Apoptose. Der genaue Mechanismus der Aktivierung ist noch nicht hinreichend belegt. Die aSMase kann sowohl durch physikalischen und chemischen Stress als auch durch verschiedene Rezeptoren wie z.B. CD95 aktiviert werden [67]. POVPC führt in VSMCs ebenfalls zu einem Anstieg der aSMase-Aktivität [1]. Die Aktivierung der aSMase findet bereits innerhalb der ersten 5 Minuten nach der Inkubation mit dem Lipid statt. Es kann somit ausgeschlossen werden, dass eine verstärkte Proteinexpression für die gesteigerte Aktivität verantwortlich ist. Daher erfolgt die Aktivierung auf Proteiebene. Möglich sind eine vermehrte Translokation zur äußeren Phospholipidmembran bzw. eine erhöhte Phosphorylierung. PGPC und E-PGPC induzieren keinen Anstieg der aSMase-Aktivität. Das Enzym scheint im Gegenteil sogar weniger aktiv zu sein. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass sich PGPC und E-PGPC nicht lange genug an der Zelloberfläche befinden (siehe unten), die Carboxylgruppe weniger geeignet ist aSMase zu aktivieren oder sie vielleicht zu großer Unordnung in der Lipidmembran führen. Obwohl PGPC in VSMCs ebenfalls sehr schnell internalisiert wird,

führt es in diesen sehr wohl zu Aktivitätssteigerung der aSMase, die der Aktivierung durch POVPC vergleichbar ist [3].

Die Carboxylgruppe von PGPC und E-PGPC kann nicht kovalent andere Lipide oder Proteine binden, sondern nur physikalisch mit diesen interagieren. Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe mit dem fluoreszenzmarkiertem PGPC-Analoga BY-PGPE zeigten, dass dieses die Zellmembran von Makrophagen schnell durchdringen kann und internalisiert wird [63] (Abbildung 29). Ebenfalls konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass dies für die Aufnahme von BY-PGPE in VSMC's ebenfalls gilt [3].

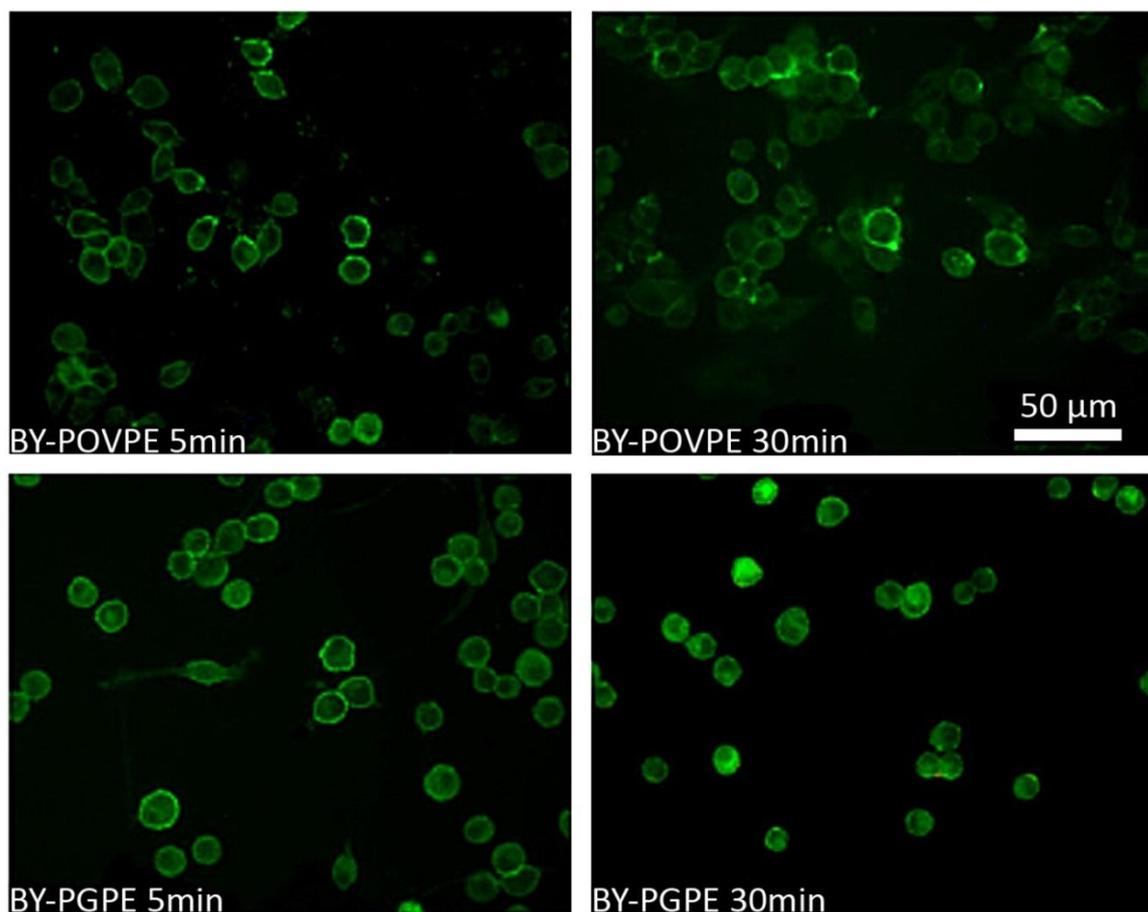


Abbildung 29: Fluoreszenz Aufnahmen der fluoreszenzmarkierten POVPC- und PGPC-Analoga BY-POVPE und BY-PGPE in RAW-Zellen. BY-PGPE wird schnell internalisiert, während BY-POVPE aufgrund kovalenter Bindungen an Membranproteine länger auf der Zelloberfläche bleibt [63].

Rhode et al. untersuchten in VSMC's den Mechanismus der Aufnahme des PGPC-Analoga PGPE-Alexa647 an einzelnen oxPL Molekülen [68]. PGPE-Alexa647 dringt sehr leicht in die Zellmembran ein und bewegt sich dort sehr schnell; die Diffusionskonstante liegt bei $D \sim 1,3 - 1,4 \mu\text{m}^2/\text{s}$. Die Diffusionskonstante für normale

Phospholipide ist mit $D \sim 0,4 - 0,6 \mu\text{m}^2/\text{s}$ wesentlich geringer [69] [70] [71]. Grund dafür ist wahrscheinlich die Kegelform von PGPC und PGPE-Alexa647 mit nur einer langen unpolaren Fettsäure und der großen, stark polaren Kopfgruppe. PGPE-Alexa647 perturbiert aufgrund seiner Form die Organisation der Plasmamembran und führt zu Unordnung in den umliegenden Phospholipiden. Dies kann auch die Fluidität von Gel-Phasen erhöhen, sodass diese lokal nicht mehr von einer flüssigen Phase unterschieden werden kann [72]. Die erhöhte Mobilität lässt sich auch dadurch erklären, dass der Widerstand für laterale Bewegungen – Aufgrund der geringeren Eintauchtiefe in die Membran und nur einer Fettsäurekette - von PGPE-Alexa647 kleiner als der normaler Phospholipide ist (Abbildung 30) [73] [74].

Zusätzlich zur freien Diffusion ist der Aufenthalt von PGPE-Alexa647 in der Zellmembran durch vorübergehende Immobilisation in kleinen Domänen für die Dauer von 0,6 – 0,9 s gekennzeichnet. Diese stationären Phasen kolokalisieren mit Arealen der Zellmembran, an denen Endozytose stattfindet. Es kommt zur Anreicherung vor allem an den Rändern von Caveolae und Vesikeln der Rezeptor vermittelten Endozytose [68]. Die stark positive Krümmung an den Rändern dieser Einwölbungen ist für das konische Phospholipid energetisch günstig (Abbildung 30). Die erhöhte Verweildauer in diesen Bereichen der Plasmamembran ermöglicht die Aufnahme von PGPE-Alexa647 in die Zelle durch Endozytose.

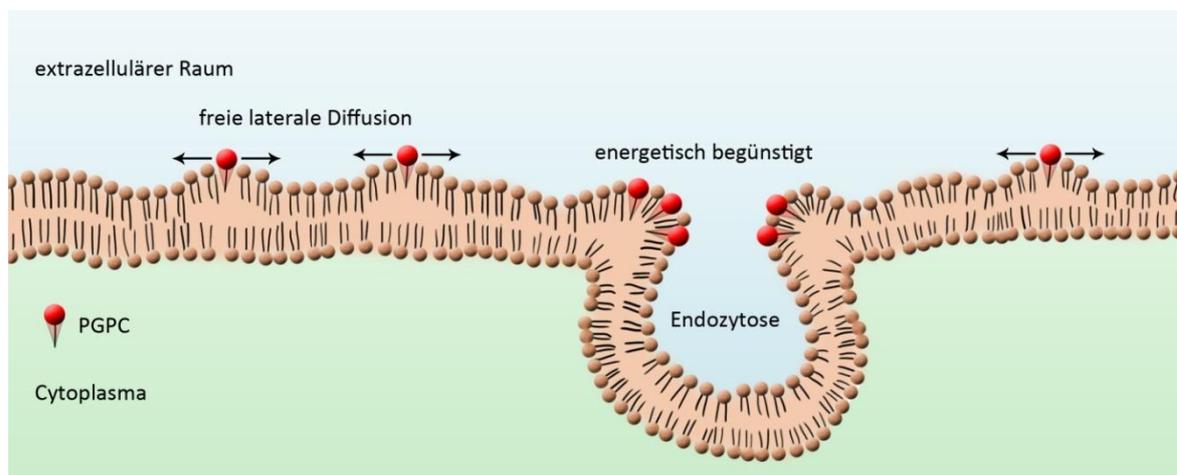


Abbildung 30: Verhalten von PGPC in der Zellmembran: Aufgrund seiner Kegelform taucht PGPC nicht vollständig in die Membran ein. Dies führt zu einer Erhöhung der lokalen Unordnung, und ermöglicht PGPC schnelle laterale Diffusion. An den Rändern von „Clathrin-coated pits“ und Caveolae ist die stark positiv gekrümmte Membran energetisch günstig für die Kegelform. PGPC wird deswegen vorübergehend immer wieder in diesen Randbereichen immobilisiert und über Endozytose in die Zelle aufgenommen.

Dies deckt sich mit Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe, dass BODIPY-PGPE nach der Aufnahme mit den Lysosomen sehr gut kolokalisiert (Abbildung 31:) [3].



Abbildung 31: Kolokalisation von BODIPY-PGPE und Lysosomen in VSMC's [3].

Im Gegensatz zu POVPC kann PGPC keine chemischen Bindungen mit Proteinen ausbilden und somit kovalente Komplexe bilden. PGPC beeinflusst Makrophagen hauptsächlich durch seine physikalischen Auswirkungen auf Plasmamembranen und als Ligand für Rezeptoren. Ein Rezeptor, welcher in der Literatur oft in Zusammenhang mit der von oxPL induzierten Apoptose in Makrophagen genannt wird, ist der „class B scavenger receptor“ „cluster of differentiation 36“ CD36 [75] [76] [77] [33].

Seimon et al. konnten zeigen, dass KDdia-PC und POVPC CD36-medierte Apoptose in primären peritonealen Maus-Makrophagen auslösen [75]. KDdia-PC und PGPC unterscheiden sich zwar in ihrer SN-2 Gruppe, jedoch besitzen beide oxPL's eine chemisch unreaktive Carboxyl-Kopfgruppe an dieser Position (Abbildung 32).

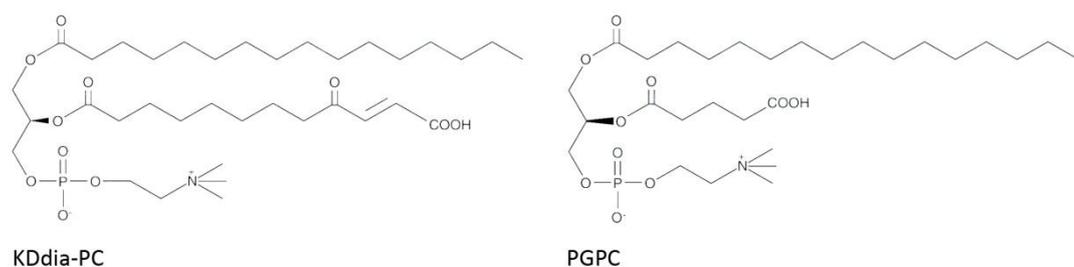


Abbildung 32: Vergleich zwischen KDdia-PC und PGPC. Die SN-2 Gruppe von KDdia-PC ist länger als die von PGPC, hat jedoch auch die chemisch unreaktive Carboxyl-Kopfgruppe.

Die Auswirkungen von KDdia-PC auf Makrophagen lassen somit Rückschlüsse auf den Wirkmechanismus von PGPC zu. KDdia-PC induziert Apoptosen in Makrophagen abhängig von dem Rezeptor CD36 in Kombination mit einem Heterodimer aus den „toll like receptors“ TLR2 und TLR6. Obwohl alle drei Rezeptoren an der Zelloberfläche liegen, ist eine Internalisierung notwendig, um Apoptose auszulösen [75] [78]. In der Zelle führt dies zur Phosphorylierung und Aktivierung der Kinase ERK. Diese bewirkt die Phosphorylierung und Translokation von p47phox und die Anordnung der NADPH Oxidase an den Lysosomen. Die aktivierte NADPH Oxidase produziert ROS, welche ultimativ zur Apoptose führen [75].

Es gibt verschiedene Hinweise darauf, dass dieser Mechanismus für PGPC ebenfalls gilt. CD36 bindet viele verschiedene oxPL [79], und Gao et al. konnte zeigen, dass PGPC ein guter Ligand ist [80]. Die von Seimon et al. gezeigte Aktivität der NADPH Oxidase in den Lysosomen kolokalisiert ebenfalls sehr gut mit der in unserer Arbeitsgruppe gefundenen Lokalisation von PGPC (Abbildung 31).

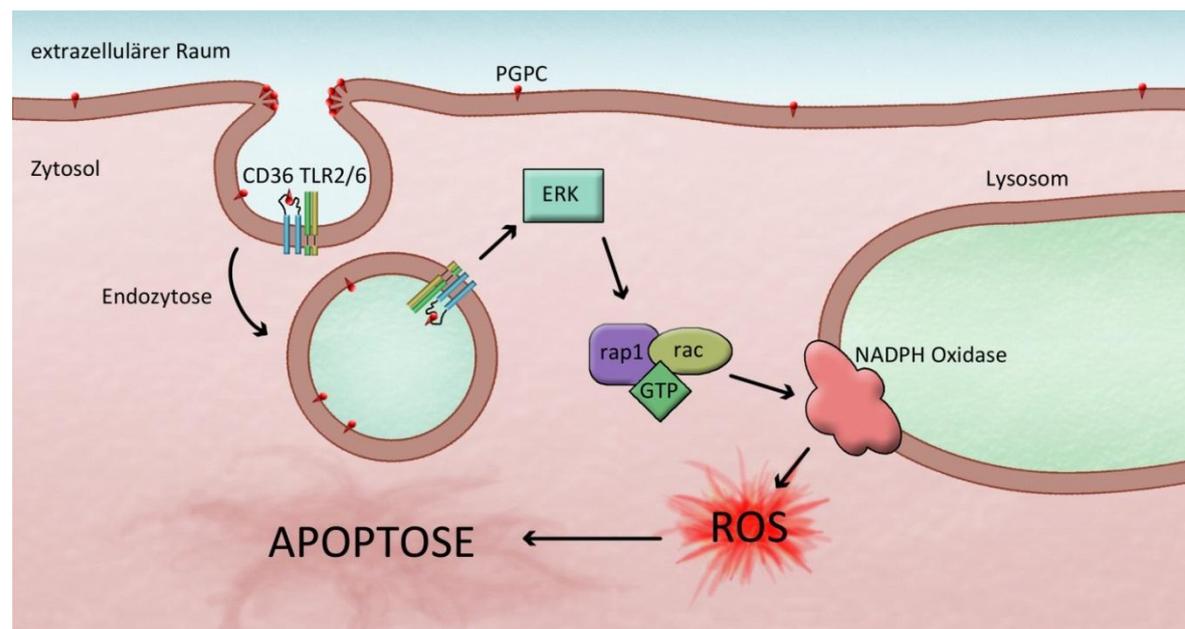


Abbildung 33: CD36, TLR2/6 vermittelte Apoptose in Makrophagen durch PGPC. PGPC ist ein Ligand für den „scavenger receptor“ CD36. Dieser aktiviert, gemeinsam mit einem TLR2/6 Heterodimer, nach der Internalisierung die ERK-Kinase. ERK bewirkt eine Anordnung und Aktivierung der NADP-Oxidase in den Lysosomen. Die daraus resultierende Produktion von ROS führt zur Apoptose.

Es ist somit wahrscheinlich, dass PGPC und E-PGPC in Makrophagen Apoptose über eine CD36, TLR2/6 vermittelte ROS-Produktion auslösen (Abbildung 33).

Unter der Annahme, dass dieser Signalweg einen wichtigen Beitrag zur Toxizität von oxPL in Makrophagen liefert, lässt sich auch der Unterschied in der durch PGPC und E-PGPC bzw. POVPC und E-POVPC induzierten Apoptose erklären. PGPC und E-PGPC sind sehr gute CD36 Liganden und werden, wegen ihrer unreaktiven Carboxyl-Kopfgruppe, schnell internalisiert. Sie können die oben beschriebene Signalkaskade in vollem Maße auslösen. POVPC und E-POVPC sind ebenfalls gute CD36 Liganden [81]. Sie wären somit genauso gut geeignet, auf diesem Weg Apoptose auszulösen. Wie oben beschrieben, liegen POPVC und E-POVPC, aufgrund ihrer reaktiven Aldehyd-Gruppe, vor allem an Proteine und andere Lipide gebunden an der Zelloberfläche vor und werden in viel geringerem Ausmaß als PGPC und E-PGPC internalisiert. Die Bindung von POVPC und E-POVPC an verschiedene Membranproteine hat wahrscheinlich durchaus selbst Auswirkungen auf die Apoptose. Allerdings können diese gebundenen oxPL nicht mehr als Liganden für Rezeptoren wie CD36 oder TLR2 dienen, wodurch die über diese Signalkaskade aktive Konzentration von POVPC und E-POVPC verringert wird. Ein Faktor, welcher die Bedeutung von POVPC und E-POVPC für die CD36/TLR2 Signalkaskade ebenfalls schmälert, ist, wie von Seimon et al. gefunden, dass die Liganden internalisiert werden müssen, und POVPC und E-POVPC aufgrund kovalenter Bindungen hauptsächlich auf der Zelloberfläche bleiben.

POPVC und E-POVPC beeinflussen nicht nur durch Schiff-Base-Bildung die Aktivität von unterschiedlichen Membranproteinen und cytosolischen Proteinen, woraus sich Auswirkungen auf Zelltod und das Überleben der Zellen ergeben. Eine solche Modifikation mit Einfluss auf die Vitalität der Zellen ist die Aktivierung der aSMase, welche eine apoptotische Signalkaskade einleitet. Diese Aktivitäten fehlen PGPC und E-PGPC. Bei der aSMase führen sie sogar zu einer verringerten Enzymaktivität. PGPC und E-PGPC können Apoptose allerdings über einen von CD36 und TLR2/6 abhängigen Signalweg induzieren, an dessen Ende es zur ROS-Produktion durch die NADPH-Oxidase kommt. POVPC und E-POVPC können diese Signalkaskade auch auslösen, jedoch nur in wesentlich geringerem Maße.

Aufgrund der durch diese Arbeit gewonnenen Erkenntnis, dass PGPC und E-PGPC auf Makrophagen toxischer wirken als POVPC und E-POVPC, kann geschlossen werden, dass für die von oxPL induzierte Apoptose in Makrophagen der CD36, TLR2/6 Signalweg eine wesentliche Rolle spielt.

Dass ein signifikanter Teil der zellulären Wirkung von PGPC und E-PGPC durch die von der NADPH Oxidase produzierten ROS verursacht wird, erklärt auch, warum die Apoptose in VSMCs (verglichen mit der in Makrophagen), nach Inkubation mit PGPC oder E-PGPC, geringer ist [58]. In Makrophagen führt ein Anstieg der von der NADPH Oxidase produzierten ROS zur Apoptose [82] [75]. Bei anderen ebenfalls an der Arteriosklerose beteiligten Zellen wie z.B. Endothelzellen haben die ROS eine ähnliche apoptotische Wirkung [83]. In VSMCs hingegen führt ein Anstieg der ROS-Produktion durch die NADPH-Oxidase nicht zum kontrollierten Zelltod. Stattdessen dienen ROS als secondary messenger für proliferatorische Signalwege [83] [84].

Ein weiterer Rezeptor, für welchen oxidierte Phospholipide als Liganden dienen und somit Einfluss auf Überleben und Tod von Makrophagen ausüben können, ist der Rezeptor für den plättchenaktivierenden Faktor (PAF-R) [21].

Dieser Rezeptor ist für die vorliegende Arbeit von Interesse, da die oxidierten Alkylacyllipide E-PGPC und E-POVPC aufgrund der SN-1 Etherbindung dem natürlichen Liganden (PAF) wesentlich ähnlicher sind als die oxidierten Diacyllipide PGPC und POVPC. Damit ein Phospholipid vom PAF-R erkannt wird, sind die Cholin-Kopfgruppe und eine kurze Acetylgruppe an der SN-2 Position essenziell [27]. Oxidierte Phospholipide können diesen somit binden, wenn auch schlechter als PAF. Für POVPC wurde bereits gezeigt, dass es vom PAF-R in Makrophagen erkannt wird und eine mit PAF vergleichbare Genexpression induziert [85]. Die am stärksten von POVPC durch den PAF-R induzierten Gene sind: AT1R, CCR2, IL-1 β , TNF α , TIMP-4 und E-selectin. Die Bindung von POVPC an den PAF-R ist \sim 3,4-fach schwächer als die von PAF, allerdings ist der durch diese Bindung induzierte Effekt (gemessen am Kalziumfluss) um ein Vielfaches schwächer [85]. Der Hauptgrund für die verminderte Wirkung ist die fehlende sn-1 Etherbindung, welche zu einer über 100-fachen Aktivitätssteigerung führt [27]. Man kann somit davon ausgehen, dass die oxidierten Ether-Phospholipide E-POVPC und

E-PGPC die PAF-R-Signalkaskade verglichen mit POVPC und PGPC um ein Vielfaches stärker induzieren.

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, gibt es allerdings keine Unterschiede in der Apoptoserate zwischen den oxidierten Diacyllipiden und ihren Alkylacylanaloga.

Warum sich die unterschiedliche Affinität zum PAF-R nicht auf die Apoptose auswirkt, ist noch nicht näher erforscht worden. Möglich wäre, dass die Auswirkungen der PAF-R Signalkaskade, verglichen mit den anderen durch die oxPL induzierten Signalwegen (aSMase, CD36, ...), nicht gravierend genug sind, um einen statistisch signifikanten Unterschied auf Zelltod und Überleben von Makrophagen zu haben. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass unter den für diese Arbeit gewählten Bedingungen die Konzentrationen der oxPL und der oxE-PL so groß waren, dass dadurch die unterschiedliche Aktivität teilweise kompensiert wurde.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die unterschiedliche Toxizität von PGPC, E-PGPC, POVPC und E-POVPC in Makrophagen sehr stark von den chemischen und physikalischen Eigenschaften der sn-2 Gruppen abhängt. Die daraus resultierenden unterschiedlichen Lokalisierungen der oxPL führen zur Induktion von verschiedenen Signalwegen, welche mehr oder weniger stark Apoptose induzieren. Die Etherbindung in der SN-1 Position von E-PGPC und E-POVPC ermöglicht eine bessere Interaktion mit dem PAF-R. Dies hat jedoch keine signifikanten Auswirkungen auf die Apoptose.

6. Literaturverzeichnis

1. Loidl, A., Sevcsik, E., Riesenhuber, G., Deigner, H.-P. & Hermetter, A., Oxidized Phospholipids in Minimally Modified Low Density Lipoprotein Induce Apoptotic Signaling via Activation of Acid Sphingomyelinase in Arterial Smooth Muscle Cells*. *J Biol Chem.* 278 (35), 32921-32928 (2003).
2. Seiman, T. A. *et al.*, Atherogenic Lipids and Lipoproteins Trigger CD36-TLR2-Dependent Apoptosis in Macrophages Undergoing Endoplasmic Reticulum Stress. *Cell Metab.* 12 (5), 467-482 (2010).
3. Mourtzi, A. *et al.*, Import and fate of fluorescent analogs of oxidized phospholipids in vascular smooth muscle cells. *J Lipid Res.* 48, 565-582 (2007).
4. Glass, C. K. & Witztum, J. L., Atherosclerosis: The Road Ahead. *Cell* 104, 503-516 (2001).
5. Navab, M. *et al.*, The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak. A review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 16 (7), 831-842 (1996).
6. Ross, R., Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 340 (2), 115-126 (1999).
7. Steinberg, D. & Witztum, J. L., in *Molecular Basis of Cardiovascular Disease* (W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1999).
8. Schwenke, D. C. & Carew, T. E., Initiation of atherosclerotic lesions in cholesterol-fed rabbits. I. Focal increases in arterial LDL concentration precede development of fatty streak lesions. *Arteriosclerosis.* 9 (6), 895-907 (1989).
9. Williams, k. J. & Tabas, I., The response-to-retention hypothesis of atherogenesis reinforced. *Curr Opin Lipidol.* 9 (5), 471-474 (1998).
10. Harats, D. *et al.*, Overexpression of 15-lipoxygenase in vascular endothelium accelerates early atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20 (9), 2100-2105 (2000).
11. Behr-Roussel, D. *et al.*, Effect of chronic treatment with the inducible nitric oxide synthase inhibitor N-iminoethyl-L-lysine or with L-arginine on progression of coronary and aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic rabbits. *Circulation.* 102 (9), 1033-1038 (2000).
12. Detmers, P. A. *et al.*, Deficiency in inducible nitric oxide synthase results in reduced atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *J Immunol.* 165 (6), 3430-3435 (2000).
13. Smith, J. D. *et al.*, Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating

- factor (op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92 (18), 8264-8268 (1995).
14. Qiao, J. H. *et al.*, Role of macrophage colony-stimulating factor in atherosclerosis: studies of osteopetrotic mice. *Am J Pathol.* 150 (5), 1687-1699 (1997).
15. Goldstein, J. L. & Brown, M. S., The LDL receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 29 (4), 431-438 (2009).
16. Yamado, Y., Doi, T., Hamakubo, T. & Kodoma, T., Scavenger receptor family proteins: roles for atherosclerosis, host defence and disorders of the central nervous system. *Cell Mol Life Sci.* 54 (7), 628-640 (1998).
17. Paulsson, G., Zhou, X., Törnquist, E. & Hansson, G. K., Oligoclonal T cell expansions in atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20 (1), 10-17 (2000).
18. Salvayre, R., Auge, N., Benoist, H. & Negre-Salvayre, A., Oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 1585 (2-3), 213-221 (2002).
19. Tabas, I., Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis: the importance of lesion stage and phagocytic efficiency. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25 (11), 2255-2264 (2005).
20. Colles, S. M., Irwin, K. C. & Chisolm, G. M., Roles of multiple oxidized LDL lipids in cellular injury: dominance of 7 beta-hydroperoxycholesterol. *J Lipid Res.* 37 (9), 2018-2028 (1996).
21. Fruhwirt, G. O., Loidl, A. & Hermetter, A., Oxidized phospholipids: from molecular properties to disease. *Biochim Biophys Acta.* 1772 (7), 718-736 (2007).
22. Gugio, B. G. *et al.*, Identification of oxidatively truncated ethanolamine phospholipids in retina and their generation from polyunsaturated phosphatidylethanolamines. *Chem Res Toxicol.* 19 (2), 262-271 (2006).
23. Stemmer, U. & Hermetter, A., Protein modification by aldehydophospholipids and its functional consequences. *Biochim Biophys Acta.* 1818 (10), 2436-2445 (2012).
24. Deigner, H.-P. & Hermetter, A., Oxidized phospholipids: emerging lipid mediators in pathophysiology. *Curr Opin Lipidol.* 19 (3), 289-294 (2008).
25. Tokumara, A., Kamiyasu, K., Takauchi, K. & Tsukatani, H., Evidence for existence of various homologues and analogues of platelet activating factor in a lipid extract of bovine brain. *Biochem Biophys Res Commun.* 145 (1), 415-425 (1987).

26. Tsoukatos, D. C. *et al.*, Copper-catalyzed oxidation mediates PAF formation in human LDL subspecies. Protective role of PAF:acetylhydrolase in dense LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17 (12), 3505-3512 (1997).
27. Marathe, G. K. *et al.*, Inflammatory platelet-activating factor-like phospholipids in oxidized low density lipoproteins are fragmented alkyl phosphatidylcholines. *J Biol Chem.* 274 (40), 28395-28404 (1999).
28. Oquendo, P., Hundt, E., Lawler, J. & Seed, B., CD36 directly mediates cytoadherence of *Plasmodium falciparum* parasitized erythrocytes. *Cell* 58 (1), 95-101 (1989).
29. Febbraio, M., Hajjar, D. P. & Silverstein, R. L., CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest.* 108 (6), 785-701 (2001).
30. Gruarin, P. *et al.*, CD36 is a ditopic glycoprotein with the N-terminal domain implicated in intracellular transport. *Biochem Biophys Res Commun.* 275 (2), 446-454 (2000).
31. Lisanti, M. P. *et al.*, Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *J Cell Biol.* 126 (1), 111-126 (1994).
32. Bastiani M, P. R., Caveolae at a glance. *J Cell Sci.* 123 (22), 3831-3836 (2010).
33. Silverstein, R. L., Li, W., Park, Y. M. & Rahaman, S. O., Mechanisms of cell signaling by the scavenger receptor CD36: implications in atherosclerosis and thrombosis. *Trans Am Clin Climatol Assoc.* 121, 206-220 (2010).
34. Hannun YA, L. C. A. K., Hannhn, Y. A., Luberto, C. & Argraves, K. M., Enzymes of sphingolipid metabolism: from modular to integrative signaling. *Biochemistry.* 40 (16), 4893-4903 (2001).
35. Venkataraman, K. & Futerman, A. H., Ceramide as a second messenger: sticky solutions to sticky problems. *Trends Cell Biol.* 10 (10), 408-412 (2000).
36. Kolesnick, R. N., Goñi, F. M. & Alonso, A., Compartmentalization of ceramide signaling: physical foundations and biological effects. *J Cell Physiol.* 184 (3), 285-300 (2000).
37. Goñi, F. M. & Alonso, A., Sphingomyelinases: enzymology and membrane activity. *FEBS Lett.* 531 (1), 38-46 (2002).
38. Brown, D. A. & London, E., Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem.* 275 (23), 17221-17224 (2000).

39. Megha & London, E., Ceramide selectively displaces cholesterol from ordered lipid domains (rafts): implications for lipid raft structure and function. *J Biol Chem.* 279 (11), 9997-10004 (2004).
40. Stancevic, B. & Kolesnick, R., Ceramide-rich platforms in transmembrane signaling. *FEBS Lett.* 584 (9), 1728-1740 (2010).
41. Truman, j. P., Al Gadban, M. M., Smith, K. J. & Hammad, S. M., Acid sphingomyelinase in macrophage biology. *Cell Mol Life Sci.* 68 (20), 3293-3305 (2011).
42. Strasser, A., Jost, P. J. & Nagata, S., The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity.* 30 (2), 180-192 (2009).
43. Grassmé, H., Schwarz, H. & Gulbins, E., Molecular mechanisms of ceramide-mediated CD95 clustering. *Biochem Biophys Res Commun.* 284 (4), 1016-1030 (2001).
44. Jin, S., Yi, F., Zhang, F., Poklis, J. L. & Li, P. L., Lysosomal targeting and trafficking of acid sphingomyelinase to lipid raft platforms in coronary endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 28 (11), 2056-2062 (2008).
45. Zeidan, Y. H. & Hannun, Y. A., Activation of acid sphingomyelinase by protein kinase C δ -mediated phosphorylation. *J Biol Chem.* 282 (5), 11549-11561 (2007).
46. Zhang, Y., Li, X., Carpinteiro, A. & Gulbins, E., Acid sphingomyelinase amplifies redox signaling in *Pseudomonas aeruginosa*-induced macrophage apoptosis. *J Immunol.* (181), 4247-5254 (2008).
47. Qiu, H. *et al.*, Activation of human acid sphingomyelinase through modification or deletion of C-terminal cysteine. *J Biol Chem.* 278 (35), 32744-32752 (2003).
48. Pettus, B. J., Chalfant, C. E. & Hannun, Y. A., Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives. *Biochim Biophys Acta.* 1585 (2-3), 114-125 (2002).
49. Xing, H. R. & Kolesnick, R., Kinase suppressor of Ras signals through Thr269 of c-Raf-1. *J Biol Chem.* 276 (13), 9733-9741 (2001).
50. Basu, S. & Kolesnick, R., Stress signals for apoptosis: ceramide and c-Jun kinase. *Oncogene.* 17 (25), 3277-3285 (1999).
51. Municio, M. M., Lozano, J., Sánchez, P., Moscat, J. & Diaz-Meco, M. T., Identification of heterogeneous ribonucleoprotein A1 as a novel substrate for protein kinase C zeta. *J Biol Chem.* 270 (26), 15884-15891 (1995).

52. Wolff, R. A., Dobrowsky, R. T., Bielawska, A., Obeid, L. M. & Hannun, Y. A., Role of ceramide-activated protein phosphatase in ceramide-mediated signal transduction. *J Biol Chem.* 269 (30), 19605-19609 (1994).
53. Sato, S., Fujita, N. & Tsuruo, T., Modulation of Akt kinase activity by binding to Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97 (20), 10832-10837 (2000).
54. Cardone, M. H. *et al.*, Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* 282 (5392), 1318-1321 (1998).
55. Basu, S., Bayoumy, S., Zhang, Y., Lozano, J. & Kolesnick R, BAD enables ceramide to signal apoptosis via Ras and Raf-1. *J Biol Chem.* 273 (46), 30519-30426 (1998).
56. Ruvolo, P. P., Deng, X., Ito, T., Carr, B. K. & May, W. S., Ceramide induces Bcl2 dephosphorylation via a mechanism involving mitochondrial PP2A. *J Biol Chem.* 274 (29), 20296-20300 (1999).
57. Heinrich, M. *et al.*, Ceramide as an activator lipid of cathepsin D. *Adv Exp Med Biol.* 477, 305-315 (2000).
58. Fruhwirth, G. O., Moutzi, A., Loidl, A., Ingolic, E. & Hermetter, A., The oxidized phospholipids POVPC and PGPC inhibit growth and induce apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta.* (1761), 1060–1069 (2006).
59. Kinscherf, R. *et al.*, Apoptosis caused by oxidized LDL is manganese superoxide dismutase and p53 dependent. *FASEB J.* 12, 461-467 (1998).
60. Boullier, A. *et al.*, Minimally Oxidized LDL Offsets the Apoptotic Effects of Extensively Oxidized LDL and Free Cholesterol in Macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 26, 1169-1176 (2006).
61. Loidl, A., Claus, R., Ingolic, E., Deigner, H.-P. & Hermetter, A., Role of ceramide in activation of stress-associated MAP kinases by minimally modified LDL in vascular smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta.* 1690, 150-158 (2004).
62. Hundal, R. S. *et al.*, Oxidized Low Density Lipoprotein Inhibits Macrophage Apoptosis by Blocking Ceramide Generation, Thereby Maintaining Protein Kinase B Activation and Bcl-XL Levels. *J Biol Chem.* 279, 24399-24408 (2003).
63. Stemmer, U. *et al.*, Uptake and protein targeting of fluorescent oxidized phospholipids in cultured RAW 264.7 macrophages. *Biochim Biophys Acta.* 1821, 706-718 (2012).

64. Code, C., Mahalka, A. K., Bry, K. & Kinnunen, P. K., Activation of phospholipase A2 by 1-palmitoyl-2-(9'-oxo-nonanoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* (1798), 1593–1600 (2010).
65. Esterbauer, H., Schaur, R. J. & Zollner, H., Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic. Biol. Med*, 81–128 (1991).
66. Uchida, K., Szweida, L. I., Chae, H. Z. & Stadtman, E. R., Immunochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in oxidized hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 8742–8746 (1993).
67. Grassmé, H., Riethmüller, J. & Gulbins, E., Biological aspects of ceramide-enriched membrane domains. *Prog Lipid Res.* 46, 161-170 (2007).
68. Rhode, S., Grurl, R., Brameshuber, M., Hermetter, A. & Schütz, G. J., Plasma Membrane Fluidity Affects Transient Immobilization of Oxidized Phospholipids in Endocytotic Sites for Subsequent Uptake. *J. Biol. Chem.* 284, 2258-2265 (2009).
69. Murase, K. *et al.*, Ultrafine membrane compartments for molecular diffusion as revealed by single molecule techniques. *Biophys J.* 86, 4075-4093 (2004).
70. Schütz, G. J., Kada, G., Pastushenko, V. P. & Schindler, H., Properties of lipid microdomains in a muscle cell membrane visualized by single molecule microscopy. *EMBO J.* 19, 892-901 (2000).
71. Kenworthy, A. K. *et al.*, Dynamics of putative raft-associated proteins at the cell surface. *J Cell Biol.* 165, 735-746 (2004).
72. Burns, A. R., Frankel, D. J. & Buranda, T., Local mobility in lipid domains of supported bilayers characterized by atomic force microscopy and fluorescence correlation spectroscopy. *Biophys J.* 89, 1081-1093 (2005).
73. Anderson, R. G., The caveolae membrane system. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 199-225 (1998).
74. Grünfelder, C. G. *et al.*, Endocytosis of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein via clathrin-coated vesicles, sorting by default in endosomes, and exocytosis via RAB11-positive carriers. *Mol. Bio. Cell* 14, 2029-2040 (2003).
75. Seimon, T. A. *et al.*, Atherogenic Lipids and Lipoproteins Trigger CD36-TLR2-Dependent Apoptosis in Macrophages Undergoing Endoplasmic Reticulum Stress. *Cell Metab.* 12 (5), 467-482 (2010).
76. Park, Y. M., Febbraio, . & Silverstein, R. L., CD36 modulates migration of mouse and human macrophages in response to oxidized LDL and may contribute to macrophage trapping in the arterial

- intima. *J Clin Invest.* 119, 136-145 (2009).
77. Mullik, A. E. *et al.*, Increased endothelial expression of Toll-like receptor 2 at sites of disturbed blood flow exacerbates early atherogenic events. *J Exp Med* 205, 373–383 (2008).
78. Nilsen, N. J. *et al.*, Cellular trafficking of lipoteichoic acid and Toll-like receptor 2 in relation to signaling: role of CD14 and CD36. *J Leukoc Biol.* 84, 280-291 (2008).
79. Podrez, E. A. *et al.*, A novel family of atherogenic oxidized phospholipids promotes macrophage foam cell formation via the scavenger receptor CD36 and is enriched in atherosclerotic lesions. *J Biol Chem.* 277 (41), 38517-38523 (2002).
80. Gao, D. *et al.*, Structural basis for the recognition of oxidized phospholipids in oxidized low density lipoproteins by class B scavenger receptors CD36 and SR-BI. *J Biol Chem.* 285 (7), 4447-4454 (2010).
81. Gilotte-Taylor, K., Boullier, A., Witztum, J. L., Steinberg, D. & Quehenberger, O., Scavenger receptor class B type I as a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Lipid Res.* 42 (9), 1474-1482 (2001).
82. Sim, S. *et al.*, NADPH oxidase-derived reactive oxygen species-mediated activation of ERK1/2 is required for apoptosis of human neutrophils induced by *Entamoeba histolytica*. *J. Immunol.* 174 (7), 4279-4288 (2005).
83. Taniyama, Y. & Griendling, K. K., Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension* 42 (6), 1075-1091 (2003).
84. Clempus, R. E. & Griendling, K. K., Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res.* 71 (2), 216-225 (2006).
85. Pégorier, S., Stengel, D., Durand, H., Croset, M. & Ninio, E., Oxidized phospholipid: POVPC binds to platelet-activating-factor receptor on human macrophages. Implications in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 188 (2), 433-443 (2006).

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Überblick Arteriosklerose.....	3
Abbildung 2: Oxidierte Phospholipide, biochemisch aktive Bestandteilen von oxLDL.....	4
Abbildung 3: Strukturen von oxidierten Phospholipiden.	6
Abbildung 4: aSMase Aktivität	9
Abbildung 5: Wirkung von Ceramid	10
Abbildung 6: Probenvorbereitung FACS.....	19
Abbildung 7: Fluoreszenzsonden.	20
Abbildung 8: Annexin V.	22
Abbildung 9: Aufbau eines Durchflusszytometers mit Fluoreszenzmessung.....	23
Abbildung 10: Scatter und einen Fluoreszenz Plot.	26
Abbildung 11: Unterteilung des Fluoreszenz-Plots mittels Quadrant	27
Abbildung 12: Prinzip des aSMase-Assays.....	30
Abbildung 13: Probenvorbereitung aSMase-Aktivitätsbestimmung	32
Abbildung 14: Sphingomyelinase Assays zur Bestimmung der aSMase-Aktivität.....	34
Abbildung 15: Makrophagen Morphologie	36
Abbildung 16: Auswertung FACS Dotplots	38
Abbildung 17: FACS Messungen EtOH.....	38
Abbildung 18: FACS Messungen E-PGPC	40
Abbildung 19: FACS Messungen PGPC	41
Abbildung 20: FACS Messungen POVPC.....	42
Abbildung 21: FACS Messungen E-POVPC.....	43
Abbildung 23: Überblick FACS Messungen.....	44
Abbildung 23: Vergleich von oxidierten Alkylacyl- und Diacyl-Phospholipiden	46
Abbildung 24: Ergebnisse aSMase Aktivität Bestimmung.....	50
Abbildung 25: aSMase Assays vom 2011.02.10.....	51
Abbildung 26: aSMase Assays vom 2011.03.04.....	51
Abbildung 27: aSMase Assays vom 2011.03.04.....	52
Abbildung 28: POVPC und E-POVPC, Schiff'schen-Base bildung	53
Abbildung 29: Aufnahme von POVPC- und PGPC-Analoga in RAW-Zellen	55
Abbildung 30: Verhalten von PGPC in der Zellmembran	56
Abbildung 31: Kolokalisation von BODIPY-PGPE und Lysosomen in VSMC's	57
Abbildung 32: Vergleich zwischen KDdia-PC und PGPC	57
Abbildung 33: CD36, TLR2/6 vermittelte Apoptose in Makrophagen durch PGPC	58