

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen
Abteilung Endokrinologie, Stoffwechsel und Pathobiochemie
Innere Medizin IV, Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H.U. Häring**

**Freie-Fettsäure-induzierte Apoptose und
Proteinkinase C-Expressionsmuster in
Endothel- und glatten Muskelzellen
humaner Koronararterien**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Ulrike Schatz
aus Lahn-Giessen**

2006

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. M. Kellerer

2. Berichterstatter: Professor Dr. M. Gawaz

**Meinen Eltern
und
meinem Bruder Reinhard**

***Unser Verständnis der Welt ist aus unzähligen Schichten errichtet.
Jede Schicht verdient erforscht zu werden,
solange wir nicht vergessen, dass es nur eine von vielen ist.
Wenn wir alles wüssten, was man von einer Schicht wissen kann
- ein höchst unwahrscheinlicher Fall -
so würde uns das nicht viel über den Rest belehren.***

Erwin Chargaff

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Apoptose	7
1.1.1	Allgemeine Grundlagen und Relevanz der Apoptose	7
1.2	Atherosklerose	9
1.2.1	Bedeutung der Atherosklerose	9
1.2.2	Atherogenese	10
1.2.3	Bedeutung der vaskulären Apoptose bei der Atherosklerose	13
1.2.4	Plaquestabilisierung durch Statine	16
1.3	Freie Fettsäuren und Freie-Fettsäure-induzierte Apoptose	17
1.4	Die Proteinkinase C	18
1.4.1	Bedeutung und Einteilung der Proteinkinase C (PKC)	18
1.4.2	Bedeutung der PKC bei der Apoptose generell und bei freier Fettsäure-induzierter Apoptose	20
1.5	Fragestellung	21
2	Material und Methoden	22
2.1	Material	22
2.1.1	Geräte und Hilfsmittel	22
2.1.2	Software (Computerprogramme)	23
2.1.3	Chemikalien/Substanzen:	24
2.2	Methoden	28
2.2.1	Zellkultur:	28
2.2.2	Behandlung der Zellen	29
2.2.3	Durchflusszytometrie (FACS = Fluorescent Activated Cell Sorting)	30
2.2.4	Konfokale Laser-Mikroskopie	33
2.2.5	Immunoblot-Analyse	33
2.2.7	Statistische Auswertung	40

3	Ergebnisse	41
3.1	Effekte freier Fettsäuren auf die Apoptose von Endothelzellen und glatten Muskelzellen humaner Koronararterien	41
3.1.1	Effekte freier Fettsäuren auf die Apoptose von Endothelzellen humaner Koronararterien	41
3.1.2	Effekte freier Fettsäuren auf die Apoptose von glatten Muskelzellen humaner Koronararterien	43
3.1.3	Effekte freier Fettsäuren auf das Zellüberleben von glatten Muskelzellen humaner Koronararterien	45
3.1.4	Effekte der kombinierten Behandlung mit ungesättigten und gesättigten Fettsäuren von Endothelzellen und glatten Muskelzellen humaner Koronararterien	47
3.2	Effekte von Atorvastatin auf die (Lipo-) Apoptose von Endothelzellen und glatten Muskelzellen humaner Koronararterien	51
3.2.1	Effekte von Atorvastatin auf die (Lipo-) Apoptose von Endothelzellen humaner Koronararterien	51
3.2.2	Effekte von Atorvastatin auf die (Lipo-) Apoptose von glatten Muskelzellen humaner Koronararterien	54
3.2.3	Effekte von Atorvastatin auf das Zellüberleben glatter Muskelzellen humaner Koronararterien	55
3.2.4	Ermittlung des PKC-Expressionsmusters mithilfe der Western Blot Analyse	58
3.2.5	Nachweis von PKC-beta-2 in der RT-PCR	60
3.2.6	Darstellung von PKC-Isoformen mittels konfokaler Laser-Mikroskopie	64
3.3	Effekte von verschiedenen Inhibitoren auf die Apoptose von Endothelzellen und glatten Muskelzellen humaner Koronararterien	66
3.3.1	Effekte von Rottlerin auf die Lipo-Apoptose von Endothel- und glatten Muskelzellen humaner Koronararterien	67
3.3.2	Effekte von Bis-Indolyl-Maleimid auf die Lipo-Apoptose von Endothel- und glatten Muskelzellen humaner Koronararterien	70
3.3.3	Effekte einer Langzeitinkubation mit Tetra-Decanoyl-Phorbol-13-Acetat (TPA) auf die Lipo-Apoptose von Endothel- und glatten Muskelzellen humaner Koronararterien	74
3.3.4	Effekte von Proteinkinase C-Zeta-Pseudosubstrat auf die Lipo-Apoptose von Endothelzellen humaner Koronararterien	80

4	Diskussion	82
4.1	Apoptose, Dyslipidämie und Atherosklerose	82
4.2	Freie Fettsäure-induzierte Apoptose an Endothelzellen und glatten Muskelzellen humaner Koronararterien	83
4.3	Effekt von Atorvastatin auf die Apoptose von Endothel- und glatten Muskelzellen humaner Koronararterien	86
4.4	Expressionsmuster der Proteinkinase C in Endothelzellen und glatten Muskelzellen humaner Koronararterien.....	87
4.5	Einfluss verschiedener PKC-Inhibitoren auf die Apoptose-rate von Endothel- und glatten Muskelzellen humaner Koronararterien.....	89
5	Zusammenfassung.....	93
6	Tabellenverzeichnis	95
7	Abbildungsverzeichnis	97
8	Abkürzungs-Verzeichnis.....	99
9	Literatur-Verzeichnis.....	102
10	Danksagung	117
11	Lebenslauf.....	118

1 Einleitung

1.1 Apoptose

1.1.1 Allgemeine Grundlagen und Relevanz der Apoptose

Jede Sekunde sterben mehrere Millionen überzählige, gealterte oder beschädigte Zellen des menschlichen Körpers durch Apoptose (Kroemer et al., 1998). Der Begriff „Apoptose“ stammt aus dem Griechischen und beschreibt das Herabfallen der Blätter von den Bäumen [Kerr et al, 1972]. Im zellbiologischen Sinne bedeutet Apoptose „programmierter Zelltod“, physiologischer Zelltod bzw. „Suizid der Zelle“. Der Begriff „Apoptose“ wurde von Kerr et al (1972) eingeführt, um die morphologischen Abbauvorgänge in der Zelle zu beschreiben. Hierzu gehören blasige Veränderungen der Plasmamembran (membrane blebbing) und eine starke Abnahme des Zellvolumens. Aufgrund dessen verlieren die Zellen den Kontakt zu den Nachbarzellen und treten in die Phase der Zeiose ein, in der die Auflösung der Kernmembran, sowie die Kondensierung und anschließende Fragmentierung des Chromatins stattfindet. Die geschrumpften apoptotischen Zellen werden entweder direkt phagozytiert, oder in kleinere apoptotische Körper aufgebrochen (apoptotic bodies) und von Nachbarzellen absorbiert. Dabei kommt es zu keiner Entzündungsreaktion [Wyllie et al., 1980].

Im Gegensatz dazu steht eine andere Form des Zelltodes, die *Nekrose*, die in Folge einer Zellschädigung auftritt, wie z.B. durch Toxine, Strahlung oder schwere Hypoxie. Die Nekrose ist ein passiver, ATP-unabhängiger, Prozess, bei dem es zu starker Schwellung des Zellkörpers kommt, die Organellen werden geschädigt, das Chromatin verklumpt. Im Gegensatz zur Apoptose, bei der die Integrität der Plasmamembran bis zur Phagozytose gewahrt bleibt, resultiert nekrotischer Zelltod in einem Zerfall der Zelle mit Zerreißen der Plasmamembran und damit einhergehend mit einer Entleerung des Zellinhaltes. Dies führt zu einer begleitenden Entzündungsreaktion [Wyllie, 1997].

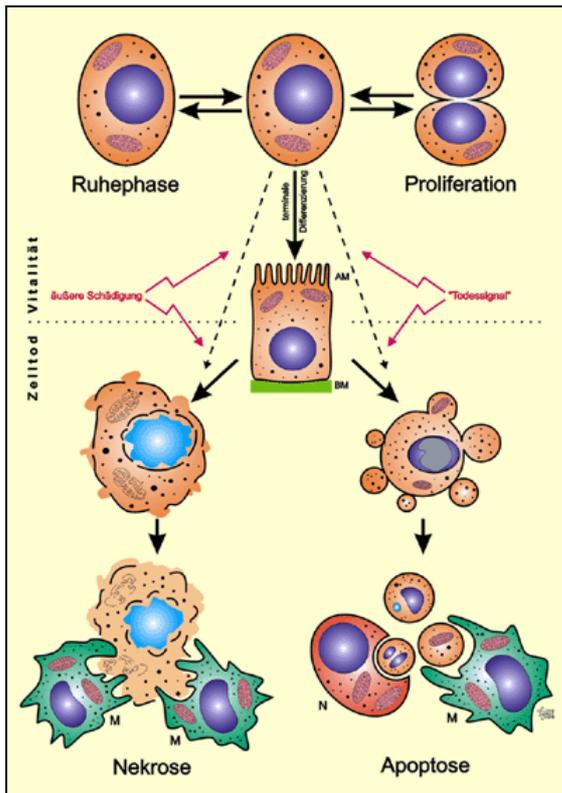


Abb. 1: Apoptose versus Nekrose

Die links dargestellte Nekrose ist charakterisiert durch: zellulären Stoffwechsel-Kollaps, ATP Niveau Erschöpfung, Zellschwellung, Ausdehnung der Organellen, Defekt der Plasmamembran und Freisetzung lysosomaler Enzyme mit anschließender Entzündungsreaktion. Die rechts dargestellte Apoptose ist hingegen ein aktiver (ATP verbrauchender) Prozess, der durch Zellschrumpfung und Chromatinkondensation, Karyohexis, das Abschnüren apoptotischer Körperchen (apoptotic bodies) bei andauernder Membranintegrität und die Phagozytose durch benachbarte Zellen oder Makrophagen und somit ein Ausbleiben einer Entzündungsreaktion gekennzeichnet ist.

Die Apoptose als physiologischer, einem strengen Regulationssystem unterliegender, Zelltod, spielt eine wesentliche Rolle in der Embryogenese (beispielsweise bei der Eliminierung interdigitalen Gewebes des menschlichen Feten), bei der Entwicklung des Gehirns sowie beim Altern. Apoptose ist essentiell für die Entwicklung und Regulation des Immun- und Nervensystems. Ferner ist der programmierte Zelltod am Zellumsatz in der Haut, dem Darmepithel und dem Endometrium beteiligt und hat damit wesentlichen Einfluss auf die Aufrechterhaltung der Gewebhomeostase [Borgerson et al., 1999].

Dysregulation der Apoptose kann zu Erkrankungen führen. Vermehrte Apoptose bedingt das Auftreten neurodegenerativer Erkrankungen wie z.B. Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson und der Zerstörung von T-Lymphozyten bei AIDS. Dagegen kann verminderte Apoptose-Aktivität zu unkontrollierter Zellproliferation in malignen Erkrankungen und zu Autoimmun-Erkrankungen führen [Borgerson et al., 1999].

Demzufolge sind bereits zahlreiche Medikamente entwickelt worden, welche über eine Beeinflussung der Apoptose wirken. Zytostatika und Radiotherapie z.B. induzieren Apoptose in Tumorzellen. Die Grundlagenforschung auf dem Gebiet der Apoptose ist also von großer Bedeutung für das Verständnis der Pathogenese und möglicher Therapieansätze zahlreicher Erkrankungen.

1.2 Atherosklerose

1.2.1 Bedeutung der Atherosklerose

Die Atherosklerose ist die häufigste Systemerkrankung der Arterien und die Haupttodesursache in den westlichen Industrieländern. Weltweit sind rund 33%, in Deutschland 48%, der Todesfälle durch Atherosklerose und ihre Folgeerkrankungen bedingt [Statistisches Bundesamt, 2002, s. Abb. 2].

Die WHO definiert Atherosklerose als eine „komplexe Veränderung der auskleidenden inneren Zellschicht (Intima) von Arterien, die mit einer lokalen Anhäufung von Lipiden, Blut und Blutbestandteilen, schließlich mit der Bildung eines fibrösen Gewebes mit Kalkablagerungen einhergeht“. Zu den wichtigsten Risikofaktoren zählen genetische Disposition, Alter, männliches Geschlecht, Hypertonie, Diabetes mellitus, Fettstoffwechsel-Störungen, Rauchen und Adipositas [Ross, 1995]. Die Atherosklerose (griech.: athära = Grütze, skleros = hart) stellt eine chronisch progrediente Veränderung der Gefäßwand dar, welche von der Intima ausgeht. Sie wird als eine Systemerkrankung bezeichnet, die den gesamten Körper befällt [Meyer R, 1999]. Die Pathogenese der Atherosklerose gilt als multifaktoriell und ist bis dato nicht eindeutig geklärt. Von zentraler Bedeutung sind unter anderem reaktive Sauerstoffspezies (ROS), welche vermehrt gebildet werden bei Patienten mit Risikofaktoren und klinisch manifester Atherosklerose [Reilly et al. 1998, Kiowski 1999; Jones 2000; McNamara und Fitzgerald 2001]. Initial werden Endothelzellen, welche die Gefäßwand auskleiden und eine dynamische Grenzschicht zwischen Blutstrom und Gefäßwand bilden,

wiederholten bzw. kontinuierlichen Schädigungen ausgesetzt. Dies führt zur Beeinträchtigung ihrer Homöostase- und Schutzfunktion.

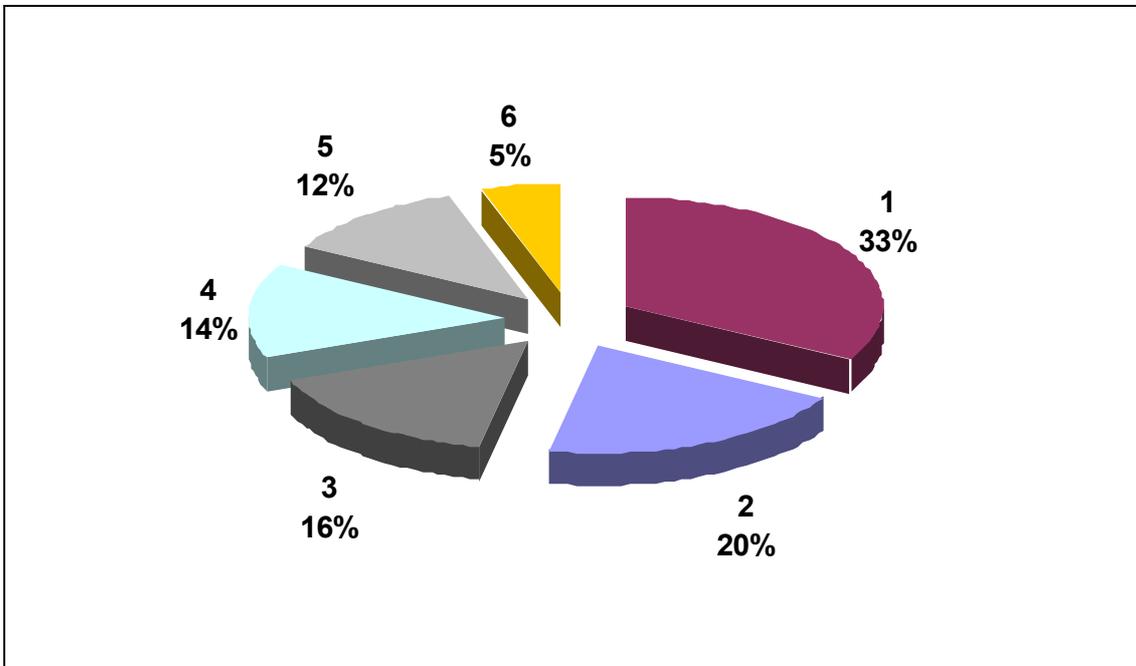


Abb.: 2 Todesursachen in der Welt (Statistisches Bundesamt 2002)

(1) Atherosklerose (14,5 Mio.), (2) Infektionen (8,9 Mio.), (3) Lungen-Erkrankungen (7 Mio.), (4) Malignome (6 Mio.), (5) Tod durch Gewalt (5,2 Mio.), (6) AIDS (2,4 Mio.).

1.2.2 Atherogenese

Die Atherogenese verläuft als ein Prozess der Interaktion zwischen Blut und Gefäßwand. Am Anfang der Atherogenese steht wahrscheinlich die endotheliale Dysfunktion, welche begünstigt wird durch Lipid- und Glukose-Stoffwechselstörungen, Hypertonie und Nikotinabusus. Sie bedingt eine erhöhte Permeabilität für Plasmabestandteile, besonders Lipoproteine. In einer frühen Phase werden Lipoproteinpartikel, insbesondere das LDL-Cholesterin, in den subintimalen Raum aufgenommen. Dort sind sie anfällig für chemische Modifikationen wie die Oxidation. Oxidierte LDL-Partikel werden von eingewanderten Makrophagen und Monozyten in erster Linie über Scavenger-Rezeptoren phagozytiert. Diese

fettbeladenen Makrophagen werden dann als „Schaumzellen“ bezeichnet und sezernieren eine Vielzahl chemotaktischer Substanzen. Diese führen zu einer Beschleunigung der Einwanderung von Leukozyten, Monozyten und inflammatorischer Lymphozyten in die Gefäßwand. Auf dem luminalen Deckendothel werden Adhäsionsmoleküle exprimiert, die wiederum Leukozyten aus dem Blut anlocken. Die Anhäufung der Schaumzellen führt zu einer frühen morphologischen Veränderung der Gefäßwand, dem sogenannten „fatty streak“ (s. Abb. 3). Schließlich bedingt der Untergang der Schaumzellen extrazelluläre Ablagerungen von Lipiden (s. Abb. 3). Diese fließen zusammen und bilden den Lipidkern der atherosklerotischen Plaque. Im weiteren Verlauf der Atherogenese kommt es zur Einwanderung von glatten Muskelzellen aus der Media in die Intima des Gefäßes, wo sie proliferieren. Die in die Intima eingewanderten Gefäßmuskelzellen bilden eine kollagenreiche Bindegewebsmatrix und sezernieren Zytokine und Chemokine. Auch aktivierte Fibroblasten proliferieren und deponieren Kollagen in der Gefäßwand. Die Vasodilatoren NO und Prostazyklin (PGI₂) sind die wesentlichen Antagonisten. Bei endothelialer Dysfunktion ist ihre Sekretion vermindert, ein Remodeling (strukturelle Veränderungen der Gefäßwand durch Stimulation von glatten Muskelzellen und Fibroblasten) der Gefäßwand wird somit begünstigt. Bei endothelialer Dysfunktion werden weiterhin Thrombozyten angelockt und aktiviert, welche Wachstumsfaktoren (platelet derived growth factor, PDGF) freisetzen und somit den Prozess des Remodeling verstärken.

Die Atherosklerose kann sich als stabile oder instabile Plaque manifestieren. Zellbiologisch handelt es sich bei der instabilen Plaque um eine zelluläre Infiltration, welche proteolytische Aktivität begründet. Dadurch kommt es zu einer nur dünnen bindegewebigen Grenzlamelle zum fließenden Blut. Es existiert ein besonders großer Pool chemisch modifizierter Lipide, bezogen auf die Plaque-Größe. Bei der stabilen Plaque hingegen herrscht ein relativ kleiner Lipidsee vor. Es besteht eine relativ dicke bindegewebige Grenzlamelle zum fließenden Blut. Häufig herrschen Kalzifikationen vor.

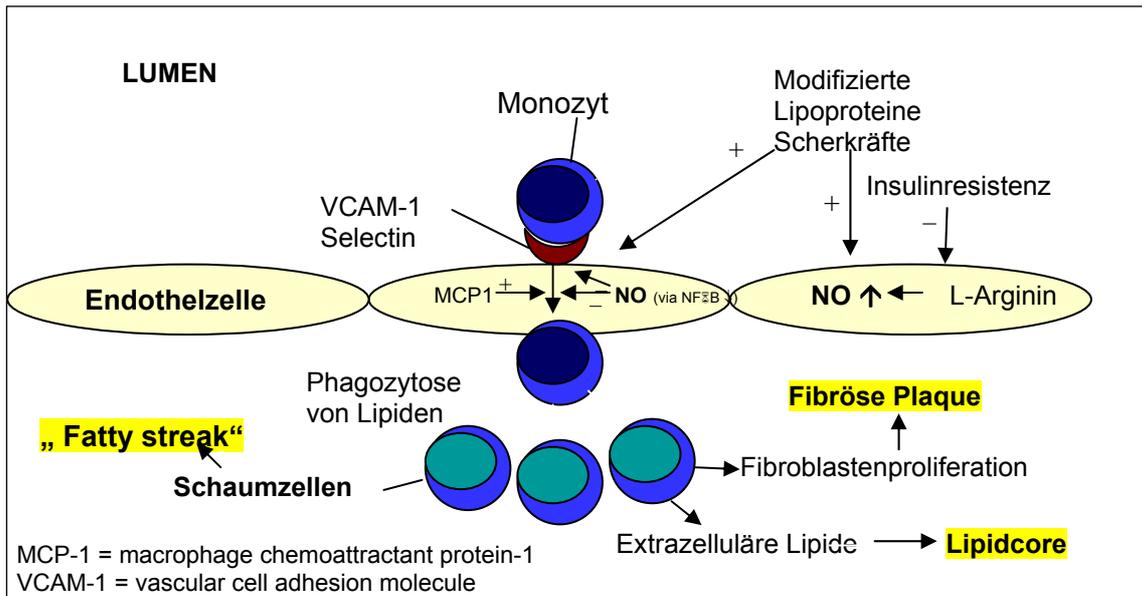


Abb. 3: Pathogenese der Atherosklerose.

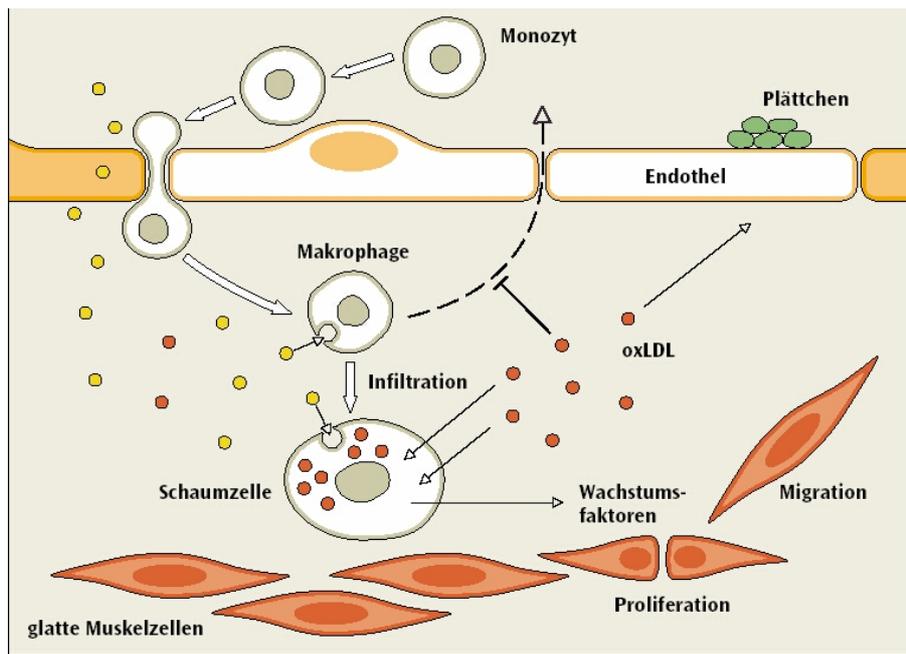


Abb. 4: Mechanismen der Einwanderung von Cholesterin und Monozyten in die Gefäßwand und strukturelle Umbauprozesse.

Aufgrund endothelialer Dysfunktion (deformierte Endothelzelle) wandern Cholesterin (gelbe Kugeln) und Monozyten aus dem Blut in die Gefäßwand ein, werden zu Makrophagen und phagozytieren eingewandertes, oxidiertes LDL (rote Kugeln). Glatte Muskelzellen wandern aus der Media in die Intima ein und proliferieren. Thrombozyten werden angelockt und adhären am Endothel (grüne Kugeln).

1.2.3 Bedeutung der vaskulären Apoptose bei der Atherosklerose

Die Apoptose von Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Makrophagen spielt bei der Pathogenese und Progression der Atherosklerose eine wesentliche Rolle. Viele exogene und endogene Faktoren können die Apoptose über verschiedene Signaltransduktionswege oder Enzymsysteme beeinflussen. Zu den die Gefäßzell-Apoptose triggernden Faktoren während der Entwicklung der Atherosklerose zählen modifizierte Lipide, proinflammatorische Zytokine, von aktivierten Immunzellen produzierte Fas-Liganden, Zytokin-induzierte NO-Synthese, Fas-vermittelte Caspase Aktivierung, Bcl 2/mitochondriale Dysfunktion und p53 Antionkogen-Expression [Geng, 2001].

Abnormale Expression und Dysfunktion dieser Apoptose regulierenden Gene könnte die Gefäßzell-Apoptose sowohl abschwächen als auch beschleunigen und damit die Integrität und Stabilität atherosklerotischer Plaques beeinflussen.

Apoptose von Gefäßzellen ist die Basis für das Entstehen von Mikropartikeln in der Zirkulation, welche als potente prokoagulatorische Substrate agieren, sowohl lokal als auch systemisch [Mallat et al., 1999; Mallat et al., 2000]. Diese Partikel sind bei Patienten mit instabiler KHK erhöht und sind mitverantwortlich für den großen Anteil prokoagulatorischer Aktivität in der Plaque [Trevor et al., 2003]. Die Apoptose sowohl von Makrophagen, als auch von glatten Muskelzellen an der Schulterregion der Plaque soll mit verantwortlich sein für eine Ruptur. Es wird derzeit diskutiert, ob für eine Plaque-Ruptur primär die Apoptose von Makrophagen [Trevor et al., 2003; Kolodgie et al, 2000] oder die glatter Muskelzellen verantwortlich ist, oder aber ob die Apoptose beider Zelltypen gemeinsam die Ursache darstellt [Trevor et al., 2003].

Auch Endothelzell-Apoptose wird in atherosklerotischen Läsionen beobachtet und soll sowohl an der Atherogenese als auch an der Progression der Läsion beteiligt sein. [Tricot et al, 2000]. Apoptose ist also sowohl bei der Atherogenese als auch bei der Progression atherosklerotischer Plaques und deren Ruptur involviert. Ein verbessertes Wissen über die Regulation der Apoptose in den Gefäßen könnte also u. a. zu neuen Therapieansätzen für eine Plaque-Stabilisierung beitragen [Libby, Aikawa, 2002].

1.2.3.1 Endothelzell-Apoptose

Endothelzell-Läsionen gelten als ein Schlüsselereignis in der Pathogenese der Atherosklerose [Dimmeler et al., 1998; Choy 2001]. Endothelzell-Apoptose wird als initialer Schritt bei der Entwicklung atherosklerotischer Plaques diskutiert [Dimmeler et al. 1998, Haunstetter et al., 1998]. Den ersten Hinweis, dass Endothelzellen dem programmierten Zelltod unterliegen können, erbrachten Robaye et al. (1991). Apoptotische Endothelzellen sind sowohl in experimenteller, als auch in humaner Atherosklerose nachgewiesen worden [Hasdai et al., 1999; Alvarez et al., 1997]. Praktisch alle Risikofaktoren an Atherosklerose zu erkranken, können Endothelzell-Apoptose in vitro vermehren oder die Anzahl zirkulierender Endothelzellen in vivo. Zu den Faktoren, welche zu Endothelzell-Apoptose und damit zur Initiierung atherosklerotischer Läsionen führen, zählen Hyperglykämie [Baumgartner-Parzer, 1995], TNF α , oxidierte LDL-Partikel und Angiotensin II über die Aktivierung von Caspasen [Dimmeler et al, 1997] und vermehrter oxidativer Stress [Hermann et al., 1997]. Atheroprotektive Faktoren wie z.B. Oestrogen, NO, Antioxidantien und laminarer Blutfluß hingegen verhindern Endothelzell-Apoptose [Dimmeler et al., 1998]. Viele Interventionen, die für die Prävention und die Therapie der Atherosklerose und ihrer Komplikationen herangezogen werden, können die Apoptoserate des Endothels reduzieren: Cholesterinsenkung reduziert das Substrat für die Produktion von proapoptotischem oxidiertem LDL von Endothelzellen [Mabile et al, 1997]; Statine können die cNOS-Aktivität vermindern [Laufs et al., 1998] was antiapoptotische Effekte hat [Dimmeler et al., 1997]; Glukosekontrolle bei Diabetes mellitus verhindert die proapoptotischen Effekte der Hyperglykämie [Stefanec et al, 2000]; Diuretika reduzieren den proapoptotisch wirkenden natriuretischen Faktor [Anderson et al., 1988]; ACE Inhibitoren reduzieren das proapoptotische Angiotensin II [Stefanec, 2000]; Calciumkanal-Blocker, Estradiol und die Antioxidantien Vitamin C und E besitzen ebenfalls antiapoptotische Effekte [Stefanec, 2000]. Weiterhin konnten Dimmeler und Zeiher zeigen, dass physiologische Schubspannungen (shear stress) über das dadurch freigesetzte NO, welches die Caspasen inaktiviert, die Apoptoseinduktion komplett inhibieren können (1996).

1.2.3.2 Apoptose glatter Gefäß-Muskelzellen

Apoptose glatter Muskelzellen von Gefäßen ist in Atheroskleroseprozessen nachgewiesen worden. Die Rolle der Apoptose glatter Gefäßmuskelzellen wird gegenwärtig kontrovers diskutiert. Zu Beginn atherosklerotischer Läsionen scheint die Apoptose glatter Muskelzellen protektiv zu sein, da sie der Proliferation entgegenwirkt [Bennett, 2000]. In fortgeschrittenen Stadien wird die Apoptose glatter Gefäßmuskelzellen an der fibrösen Kappe atherosklerotischer Plaques beobachtet [Han et al., 1995; Geng & Libby, 1995; Isner et al., 1995; Bennett et al., 1998; Geng, 2001; Trevor et al., 2003]. Die glatten Gefäßmuskelzellen „vergreisen“ und sind unfähig zur effektiven Reparatur [Bennett 2000]. Gefäßmuskelzellen aus fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaques weisen intrinsische Defekte in Proliferation und Überlebenssignalen auf; Aktivierung der Zellzyklus-Maschinerie zur Zellteilung induziert bei ihnen Apoptose, nicht eine Zell-Proliferation [Bennett 1998]. Dies führt zur Verdünnung der an glatten Gefäßmuskelzellen reichen fibrösen Kappe und damit zur Gefahr einer Plaque-Ruptur. Aus einer stabilen Plaque kann sich somit eine instabile Plaque entwickeln. Es ist nachgewiesen worden, dass in Läsionen, welche mit instabiler Angina assoziiert sind, mehr Apoptose glatter Gefäßmuskelzellen vorkommt als in stabilen Läsionen [Bauriedel et al., 1998; Bauriedel et al., 1999]. Von den die Gefäßwand auskleidenden Endothelzellen sezerniertes NO und oxidierte Lipide rufen Apoptose glatter Gefäßmuskelzellen in der Plaque-Region hervor, nicht jedoch der übrigen glatten Muskelzellen der Gefäßwand. Dies führt zur weiteren Schwächung der Plaque und prädisponiert zu einer Plaque-Ruptur [Bennett et al. 1997]. Auch benachbarte Entzündungs-Zellen führen zum Zelltod der glatten Muskelzellen [Boyle, 1997].

Cholesterinsenkende Medikamente sollen die Entzündungszellen in der Plaque reduzieren und somit den Zelltod der glatten Muskelzellen und damit Plaque-Rupturen vermindern können [Bennett, 2000] (s. Abb. 5).

1.2.4 Plaquestabilisierung durch Statine

HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren, Statine, stellen zur Zeit die effektivste Methode zur pharmakologischen Senkung des Plasmacholesterins dar. Große multizentrische Studien haben gezeigt, dass durch die Gabe von Statinen über mehrere Jahre die kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität signifikant gegenüber Placebos gesenkt werden.

Neben der bekannten LDL- und Gesamtcholesterin-senkenden Wirkung wurden auch sogenannte pleiotrope, „non-lipid“ bzw. gefäßwandgerichtete Effekte postuliert, welche zu einer Plaque-Stabilisierung führen (vgl. Abb. 5) und einen günstigen Einfluss auf die Gesamtmortalität ausüben [Libby, 2003]. Experimentelle Untersuchungen gaben deutliche Hinweise, dass Statine antientzündlich [Crisby et al., 2001; Ortego et al., 1999; Strandberg et al., 1999], antiproliferativ [Fukumoto et al., 2001; Laufs et al., 1999; Sindermann et al., 2000; Yasunari et al., 2001] und antithrombotisch [Eto et al., 2002; Libby, 2003; Seljeflot et al., 2002; Wiesbauer et al., 2002] wirken, die Endothelfunktion verbessern [Laufs et al., 1998; Mueck et al., 2001] und die fibröse Deckplatte atherosklerotischer Plaques stabilisieren [Bellosta et al., 1998; Crisby et al., 2001; Fukumoto et al., 2001].

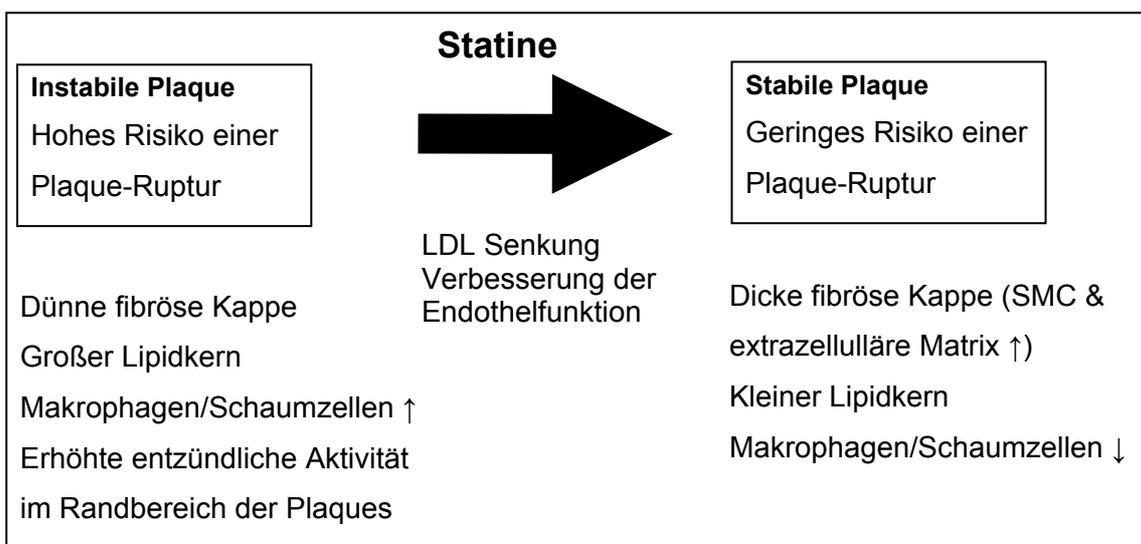


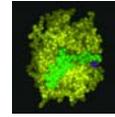
Abb. 5: Plaquestabilisierung durch Statine.

1.3 Freie Fettsäuren und Freie-Fettsäure-induzierte Apoptose

Freie Fettsäuren sind unveresterte Carbonsäuren mit langer Kohlenwasserstoffkette und dienen im Organismus als Quelle für Stoffwechselenergie, als Substrate für den Zellmembran-Aufbau (Glyko- und Phospholipide) und als Vorläufer für viele intrazelluläre Signalmoleküle wie z.B. Prostaglandine, Leukotriene, Thromboxane und „Platelet-activating factor“ [Bergstrom, 1967; Grimminger, 1997; McArthur, 1999]. Im Normalzustand reichen die Konzentrationen der freien Fettsäuren von 200 bis 600 $\mu\text{mol/l}$ [Mu et al, 2001]. Diese große Variationsbreite kommt durch individuelle Ernährungsgewohnheiten und Schwankungen im Serum-Insulin-Spiegel zustande [Wolever et al., 1995; Singer et al, 1985; Murphy et al. 1995]. In pathologischen Zuständen wie Insulinresistenz/Diabetes [Artwohl, Roden 2003], Adipositas und malignen Erkrankungen sind die Gesamt-Freie-Fettsäure-Konzentrationen auf 400-2000 $\mu\text{mol/l}$ erhöht [Hall, 1979; Reaven, 1988; Stolba 1993]. Die Erhöhung freier Fettsäuren im Plasma ist ein wichtiger Faktor, der Adipositas, Insulinresistenz und Typ 2 Diabetes mellitus verbindet und auch das Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen erhöht [Smith, 1999; Belfiore, 1998; Lewis, 1996]. Das Freie-Fettsäure-Muster unterscheidet sich in schlanken und adipösen Menschen: adipöse haben einen niedrigen ungesättigten-zu-gesättigten Fettsäure Quotienten [Mitropoulos et al., 1997]. Neuere Studien zeigen, dass erhöhte Spiegel freier Fettsäuren die T- Lymphozyten-Funktion stören [Stulnig, Waldhausl et al., 2000] und pankreatische β -Zellapoptose induzieren [Eitel et al., 2003; Shimabukuro et al., 1998; Maedler K, 2001; Lupi et al., 2002]. Die bei Insulinresistenz und Adipositas erhöhten freien Fettsäuren beeinträchtigen die Endothelfunktion, wobei die zugrunde liegenden Mechanismen noch größtenteils unbekannt sind [Artwohl, Roden et al., 2003].

1.4 Die Proteinkinase C

1.4.1 Bedeutung und Einteilung der Proteinkinase C (PKC)



Die Proteinkinase C ist kein einzelnes Enzym, sondern eine Familie von mindestens 11 verschiedenen Isoenzymen, welche andere Proteine an Serin- und Threoninresten phosphorylieren und deshalb auch als Serin/Threonin-Kinasen bezeichnet werden. [Berry N (1990); Dekker LV (1994); Nishizuka Y (1988)]. Wie die meisten der Serin/Threonin-spezifischen Proteinkinasen weist auch die Proteinkinase C eine außerordentliche Heterogenität auf. Bisher ist die Proteinkinase C in Säugetieren anhand verschiedener Kriterien wie Sequenz, Stimulierbarkeit und Regulation in die Isoenzyme alpha, beta-1, beta-2, gamma, delta, epsilon, zeta, eta, theta und iota/lambda eingeteilt worden, wobei PKC-lambda das Maus-Homolog von PKC-iota ist. [Krauss, 1997; α , β , γ Parker et al., 1986; Coussens et al. 1986; δ , ϵ , ζ : Ono et al., 1987; η : Osada et al., 1990; θ : Osada et al., 1992; ι/λ : Selbie et al., 1993]. Die unterschiedlichen Isoformen unterscheiden sich in ihrer zellulären Lokalisation, in ihrer Aktivierbarkeit durch Cofaktoren und durch ihre Substratproteine. PKC-alpha, -delta, und -zeta sind beispielsweise in nahezu allen Geweben weit verbreitet, während die anderen Subtypen nur in spezifischen Geweben vorkommen [Krauss, 1997]. Anhand ihres Aktivierungsmodus wird die Proteinkinase C in 3 Untergruppen eingeteilt:

1. Zu den klassischen oder konventionellen PKCs (cPKC) zählen PKC-alpha, -beta-1, -beta-2 und -gamma. Sie benötigen Phosphatidylserin, Diacylglycerin und Calcium zu ihrer Aktivierung [Takai et al., 1979].
Der Tumorpromotor PMA (bzw. TPA) ist dem natürlichen Aktivator Diacylglycerin strukturverwandt und aktiviert die klassischen PKCs, indem er sie bindet.

Isoform	Vorkommen
Alpha (α)	Ubiquitär
Beta I (β I)	Besonders in mesenchymalen Geweben
Beta II (β II)	Besonders in mesenchymalen Geweben
Gamma (γ)	Ausschließlich im Gehirn

2. Die neuen oder „novel“ PKCs (nPKC) bestehen aus den Isoenzymen PKC-delta, -epsilon, -eta und -theta. Sie sind Ca^{2+} -unabhängig, werden jedoch ebenfalls durch Diacylglycerin oder Phorbolster in Gegenwart von Phosphatidylserin aktiviert [Ono et al., 1988].

Isoform	Vorkommen
Delta (δ)	Ubiquitär, größte Expression im Pankreas
Epsilon (ϵ)	Besonders im Gehirn
Eta (η)	Besonders in Haut, Herz und Lunge
Theta (θ)	Besonders im mesenchymalen Gewebe

3. die **atypischen** PKCs (aPKC) iota (bzw. lambda bei der Maus) und zeta sind wie die nPKCs Ca^{2+} -unabhängig. Sie benötigen nur Phosphatidylserin zu ihrer Aktivierung und reagieren im Gegensatz zu den klassischen und neuen Isoformen nicht auf Diacylglycerin oder Phorbolster [Ono et al., 1989].

Isoform	Vorkommen
Zeta (ζ)	Ubiquitär
Lambda/ iota (λ, ι)	Besonders in Keimdrüsen

Die PKC-Isoenzyme sind zentrale Signalproteine. Den einzelnen Subtypen der Proteinkinase C kommen unterschiedliche, spezifische Funktionen im Organismus zu [Dekker und Parker 1994]. Sie spielen beispielsweise eine zentrale Rolle bei der hormonellen Signaltransduktion, sowie bei der Regulation von Zellwachstum, Zelldifferenzierung und bei der Apoptose [Clemens et al., 1992; Nishizuka, 1992; Livneh und Fishman, 1997; Musashi et al., 2000, Eitel et al. 2003]. Auch im Glucosestoffwechsel ist die Proteinkinase C von zentraler Bedeutung. Die Aktivierung der PKC durch Phorbolster führt zu einer Serin-Phosphorylierung am Insulinrezeptor und zur Hemmung der Tyrosinkinase [Obermaier, Häring, 1987; Takayama S., 1988]. Durch Aktivierung der PKC konnte weiterhin der Glukosetransport stimuliert werden [Mühlbacher, Häring 1988]. Bei der Entwicklung diabetischer Komplikationen an Retina, Aorta, Niere und Herz kommt der PKC ebenfalls Bedeutung zu [Forst, 1998; Inoguchi 1992; Ishii 1996; Shiba T 1993].

1.4.2 Bedeutung der PKC bei der Apoptose generell und bei freier Fettsäure-induzierter Apoptose

Der Prozess der Apoptose ist auf verschiedenen Ebenen durch Phosphorylierung vieler verschiedener Proteinkinasen reguliert [Gutcher et al., 2003]. Die Familie der Proteinkinase C (PKC) zeigt sowohl inhibitorische, als auch stimulierende Effekte auf die Apoptose. Bis auf einige Ausnahmen sollen PKC-alpha, -beta, -epsilon und die atypischen Isoformen PKC-iota und -zeta anti-apoptotisch wirken und PKC-delta und -theta pro-apoptotisch [Gutcher et al., 2003]. Eitel et al. fand, dass die freie Fettsäure induzierte Apoptose an Ratteninsulinomazellen und an humanen β -Zellen des Pancreas über die Proteinkinase C-delta vermittelt wird [Eitel et al., 2003]. Auch bei der Apoptose an Gefäßmuskelzellen ist die Proteinkinase C beteiligt. Hyperglykämie, beispielsweise, inhibiert die Apoptose glatter Gefäßmuskelzellen über Proteinkinase C-alpha und -beta-2 [Hall et al., 2000].

1.5 Fragestellung

Aufgrund der oben geschilderten Zusammenhänge zwischen erhöhten Fettsäure-Spiegeln und Insulinresistenz/Adipositas einerseits und der Apoptose-induktion und Atherosklerose andererseits stellten sich folgende Fragen:

1. Induzieren Fettsäuren an Endothel- und glatten Muskelzellen humaner Koronararterien Apoptose? Gibt es Unterschiede in der Wirkung einzelner Fettsäuren?
2. Beeinflussen die gefäßprotektiven Statine die Lipo-Apoptose von Endothel- und glatten Muskelzellen humaner Koronararterien?
3. Vermittelt die Proteinkinase C die Lipo-Apoptose an Endothel- und glatten Muskelzellen humaner Koronararterien?
 - 3.1 Was ist das Expressionsmuster der Proteinkinase C in Endothelzellen und glatten Muskelzellen humaner Koronararterien?
 - 3.2 Beeinflussen verschiedene PKC-Inhibitoren die Lipo-Apoptose von Endothel- und glatten Muskelzellen humaner Koronararterien?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Hilfsmittel

ABI PRISM 310	Applied Biosystems
Agarosegel 2 %	Invitrogen Agarose Elektrophoresis Grade
Brutschrank	Heraeus Instruments, Hanau
Blockthermostat BT 200	Kleinfeld Labortechnik GmbH&Co, Gehrden
Centri Sep Columns (Sephadex)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Drehzahl Elektronic	Ikamag Reo, IKA Labortechnik, Jahnke&Kunkel, Staufen
FACS Calibur Zytometer	Becton Dickinson, Erembodegem-Aalst, Belgien
Falcon Culture Slides	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA
Falcon Plastikröhrchen	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA
Inkubationsschüttler	Infors, Boltwingen, Schweiz
Konfokal Mikroskop	Leica, Bensheim
Light Cycler	Roche, Mannheim, Deutschland
Mikroskop	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Mikrowellengerät	Bauknecht
Nitrozellulose	Schleicher und Schuell, Kassel, Deutschland
PCR plates (96er)	Macherey Nagel GmbH, Düren, Deutschland
Photometer	Spectronic Instruments, Milton Roy, USA
pH-Meter	Beckman, München, Deutschland

Pipetboy	Integra Biosciences GmbH, Fernwald, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Petrischalen	Peske Laborbedarf, Aindling, Deutschland
Stabiles Netzgerät	Fisher, Canada
Sterilbank	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Sterilfilter	Sartorius AG, Goettingen, Deutschland
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Wasserbad GFL 1083	Bachofer, Reutlingen, Deutschland
Whatman 3MM Papier	Whatman International Ltd., Maidstone, England
Zellkulturplatte	TPP, Europe/Switzerland
Zentrifugen	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland

2.1.2 Software (Computerprogramme)

CELLQuest Programm	Becton Dickinson, Erembodegem-Aalst, Belgien
Sigma Stat	Jandel Scientific Software, San Rafael, Ca, USA
Sigma Plot	Jandel Scientific Software, San Rafael, Ca, USA

2.1.3 Chemikalien/Substanzen:

Acrylamid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
AMV Reverse Transkriptase	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Annexin-V-Fluos	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland
Aprotonin (Trasylol)	Bayer, Leverkusen, Deutschland
APS (Ammonium-Poly-Sulfat)	Sigma, München, Deutschland
Atorvastatin (20 mM in DMSO)	Merck, Darmstadt (Calbiochem), Deutschland
Bis Indolyl Maleimid, 0,5 mM in H ₂ O	Sigma, München, Deutschland
Bradford-Reagenz	BioRad, München, Deutschland
BSA (Bovines Serum Albumin), fettsäurefrei	Sigma, München, Deutschland
DMSO	Merck, Darmstadt, Deutschland
ECL Kit (Western blotting Reagenz)	Amersham Buchler, Braunschweig, Deutschland
Entwickler G 150	AGFA-GEVAERT, Belgien
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fettsäuren, 200 mM in Ethanol	Sigma, München, Deutschland
First strand cDNA kit	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Fixierer Superfix	Tetenal, Norderstedt, Deutschland
Gelatine	Sigma, München, Deutschland
HEPES	Boehringer Mannheim, Deutschland

Isopropanol	Sigma, München, Deutschland
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Molekulargewichtsstandard für SDS-PAGE	BioRad, München, Deutschland
PermaFluor	Immunotech, Marseille, Frankreich
Ponceau S (0,2 % in 3 % TCA)	Sigma, München, Deutschland
Propidiumiodid (Stocklösung 5 mg/ml in PBS)	Sigma, München, Deutschland
Proteinkinase C-Zeta Pseudosubstrat	Biosource, Camarillo, CA, USA
RNAse A (Stocklösung 10 mg/ml in PBS)	CarlRoth GmbH&Co, Karlsruhe
Rottlerin, 20 mM in DMSO	Merck, Darmstadt (Calbiochem)
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Sphingosin, 5mM in Ethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
TEMED	CarlRoth GmbH&Co, Karlsruhe Deutschland
12-O-Tetradecanoylphorbol 13-Acetat (TPA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan	Serva, Heidelberg, Deutschland
Triton X-100	Sigma, München, Deutschland
Trypsin/EDTA Lösung 1:250	BioWhittaker, Walkersville, USA
Zellkultur-Medien:	Clonetics/ BioWhittaker,
Endothelzellen: EGM-2 M	Walkersville, USA
Glatte Muskelzellen: SmGm2	
Zellkulturmedien Zusätze "Singlequots"	Clonetics/ BioWhittaker, USA

Primer

5'-GTCTATGTCCAAGGAAGCTG-3'
5'-AGGTGTTAGGACTGGTGGAT-3'

Invitrogen, Karlsruhe,
Deutschland

Primär-Antikörper

α -PKC-alpha:	Kaninchen, polyklonal	Santacruz (Santa Cruz, CA, USA)
α -PKC-beta 1:	Kaninchen, polyklonal	Santacruz (Santa Cruz, CA, USA)
α -PKC-beta 2:	Kaninchen, polyklonal	Santacruz (Santa Cruz, CA, USA)
α -PKC-gamma:	Kaninchen, polyklonal	Santacruz (Santa Cruz, CA, USA)
	Maus, monoklonal	Transduction Laboratories, Lexington, USA
α -PKC-delta:	Kaninchen, polyklonal	Santacruz (Santa Cruz, CA, USA)
α -PKC-epsilon:	Kaninchen, polyklonal	Santacruz (Santa Cruz, CA, USA)
α -PKC-zeta:	Ziege, polyklonal	Santacruz (Santa Cruz, CA, USA)
	Kaninchen, polyklonal	Sigma (München, Deutschland)
	Kaninchen, polyklonal	Biomol (Hamburg; Deutschland)
α -PKC-eta:	Kaninchen, polyklonal	Santacruz (Santa Cruz, CA, USA)
	Maus, monoklonal	Transduction Laboratories, Lexington, USA
α PKC-theta:	Kaninchen, polyklonal	Santacruz (Santa Cruz, CA, USA)
	Maus, monoklonal	Santacruz (Santa Cruz, CA, USA)
	Maus, monoklonal	Transduction Laboratories, Lexington, USA
α -PKC-iota:	Maus, monoklonal	Transduction Laboratories, Lexington, USA

Sekundär-Antikörper

α -Kaninchen, α -Maus, α -Ziege

Sigma (München, Deutschland)

α -Kaninchen, α -Maus, α -Ziege,
fluoreszenzmarkiert

Molecular Probes Inc.(Eugene, USA)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur:

Endothelzellen CC-2585 und glatte Muskelzellen CS-2583 humaner Koronararterien wurden von Clonetics/BioWhittaker bezogen. Die Zellen wurden durch enzymatische Verdauung von Transplantaten gesunder Organspender gewonnen. Die Endothelzellen stammen von einem 21-jährigen Mann, die glatten Muskelzellen von einem 58-jährigen Mann. Die Endothelzellen wurden auf von Willebrand Faktor VIII und acetyliertes LDL positiv und auf glatte Muskelzellen alpha-Aktin negativ getestet. Sie wurden nach der ersten Passage mit >500 000 Zellen pro Cup gefroren geliefert. Die glatten Muskelzellen wiesen positives glatte Muskelzellen alpha-Aktin, glatte Muskelzellen Myosin, Calponin und Caldesmin und einen negativen von Willebrand Faktor VIII auf. Sie wurden nach der dritten Passage mit einer Zellzahl von $6,8 \times 10^8$ pro Cup gefroren geliefert. Sowohl die Endothel- als auch die glatten Muskelzellen zeigten negative Tests für HIV-1, HBV, HCV, Mykoplasmen, Bakterien und Pilze. Dem basalen Endothelzellmedium CC-3121 EBM von Clonetics/BioWhittaker (500 ml) wurden 35 ml FBS, 0,2 ml Hydrocortison, 2 ml hFGF, 0,5 ml VEGF, 0,5 ml R³-IGF, 0,5 ml ASS, 0,5 ml hEGF und 0,5 ml GA-1000 hinzugefügt. Dem basalen glatten Muskelzell-Medium CC-4149 SmBM von Clonetics/BioWhittaker (500ml) wurden 25 ml FBS, 0,5 ml Insulin, 1,0 ml hFGF-B, 0,5 ml GA-1000 und 0,5 ml hEGF hinzugefügt. Bei den basalen Medien handelt es sich jeweils um modifizierte MCDB 131 Medien (Dr. Ham, University of Colorado) mit einer Konzentration von FCS von 10% und 5 mM Glucose. Die Endothel- und glatten Muskelzellen wurden in 15 cm Gewebekulturschalen bis zu 80 % Konfluenz in wasserdampfgesättigter Atmosphäre (37°C, 7% CO₂) kultiviert. Zur Passagierung wurden die adhärenenten Zellen nach einigen Tagen mit 1-2 facher Trypsin/ EDTA Lösung von dem Zellkulturschalenboden gelöst. Anschließend wurden 10 ml Zellkulturmedium zugefügt, um die Trypsinaktivität zu stoppen und die Zellen sodann zu resuspendieren. Die Zellsuspension wurde mit Medium je nach Bedarf verdünnt und auf neue Zellkulturschalen verteilt. Nach einer Woche waren

die Zellen zu ca. 80% konfluent und konnten so für die Versuche eingesetzt werden.

2.2.2 Behandlung der Zellen

2.2.2.1 Herstellung von Fettsäure-Lösungen

Die Fettsäure Stammlösungen (200 mM in Ethanol) wurden an fettsäurefreies BSA gekoppelt, indem sie 1:25 mit Krebs-Ringer-HEPES-Puffer (BSA Gehalt 20%) verdünnt wurden (Krebs-Ringer-HEPES-Puffer: 7,674 g/l NaCl, 0,351 g/l KCl, 0,363 g/l CaCl₂, 0,363 g/l MgSO₄, 0,342 g/l NaH₂PO₄, 2,38 g/l HEPES, ad 250 ml Millipore Wasser, auf pH 7,4 einstellen und auf 1000 ml mit destillierten Wasser auffüllen). Nach Überleitung von Stickstoff wurden die Lösungen über Nacht bei 37°C im Inkubationsschüttler belassen. Die Fettsäuren wurden in Eppendorf Cups aliquotiert, welche nach erneuter Stickstoff Überleitung bei -20°C verwahrt wurden.

2.2.2.2 Behandlung der Zellen mit Fettsäuren und PKC-Inhibitoren

Nachdem die Zellen ca. 80% Konfluenz in den 15 cm Kulturschalen erreicht hatten (s.2.2.1), wurden sie abtrypsinisiert und auf 6-Loch-Zellkultur-Platten („6 wells“) verteilt, in denen sie über Nacht bei 37°C inkubierten. Am nächsten Tag wurde dann das Medium durch fettsäurehaltiges Medium ersetzt. Bei Einsatz von Inhibitoren, inkubierten die Zellen 30 Minuten mit diesen bei 37°C, bevor die Zugabe der Fettsäuren erfolgte. Die Zellen inkubierten weitere 24 Stunden im Brutschrank, um dann für die Durchflusszytometrie (s. Kap. 2.2.3.) vorbereitet zu werden.

2.2.3 Durchflusszytometrie (FACS = Fluorescent Activated Cell Sorting)

2.2.3.1 Zellzyklusanalyse

Mit der Durchflusszytometrie können die physikalischen Eigenschaften von Zellen gemessen werden. Das Verfahren findet Anwendung in Studien zur Zellproliferation und zum Zelltod. Die Lichtstreuung der Zellen ist abhängig von Größe, Oberflächen- und Zytoplasma-Beschaffenheit. Wir verwendeten die Zellzyklusanalyse zur Messung der apoptotischen Zellen, indem der DNA Gehalt in der Sub-G1-Fraktion gemessen wurde. Verwendet wurde der Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid, welcher tote Zellen anfärbt. Propidiumiodid gelangt durch die Zellmembran und lagert sich dort in die DNA ein. Propidiumiodid bindet an Chromatin und gibt ein dem Chromatingehalt der Zellen proportionales Signal ab. Die Zellen wurden wie oben aufgeführt behandelt, abtrypsiniert, in je ein Röhrchen pipettiert und bei 4°C und 1200 Umdrehungen 7 Minuten abzentrifugiert. Danach wurde einmal mit kaltem PBS (10 x PBS: 100 mM Na₂HPO₄, 50 mM NaH₂PO₄, 54 mM KCl, 137 mM NaCl) gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung mit 1 ml eiskaltem 75-prozentigen Ethanol pro Röhrchen über Nacht oder mehrere Tage lang bei 4°C. Am Tag der Messung wurden die Proben zweimal mit je 2 ml kaltem PBS gewaschen. Es folgte die Färbung der Zellen. Dafür wurde eine Propidiumiodid/RNase Lösung hergestellt: 50 µg/ml Propidiumiodid (Stammlösung 1:1000 verdünnen) und 100 µg/ml RNase (Stammlösung 1:100 verdünnen) wurden in PBS gelöst. Je nach Größe des Zellpellets wurden ca. 200-400 µl Färbelösung in das Probenröhrchen pipettiert, das Pellet aufgenommen und in ein FACS Messröhrchen überführt. Nach 20-minütiger lichtgeschützter Inkubation erfolgte die Messung der apoptotischen Zellen mittels durchflusszytometrischer Zellzyklusanalyse. Mit Histogrammen wurde der prozentuale Anteil von Zellen in der Sub-G1-Zellzyklusphase mit Hilfe des Cell-Quest Programms (Becton Dickinson) quantitativ bestimmt. Auf der x-Achse ist die Intensität der gemessenen Fluoreszenz, auf der y-Achse sind die gezählten Zellen („Count“) aufgetragen.

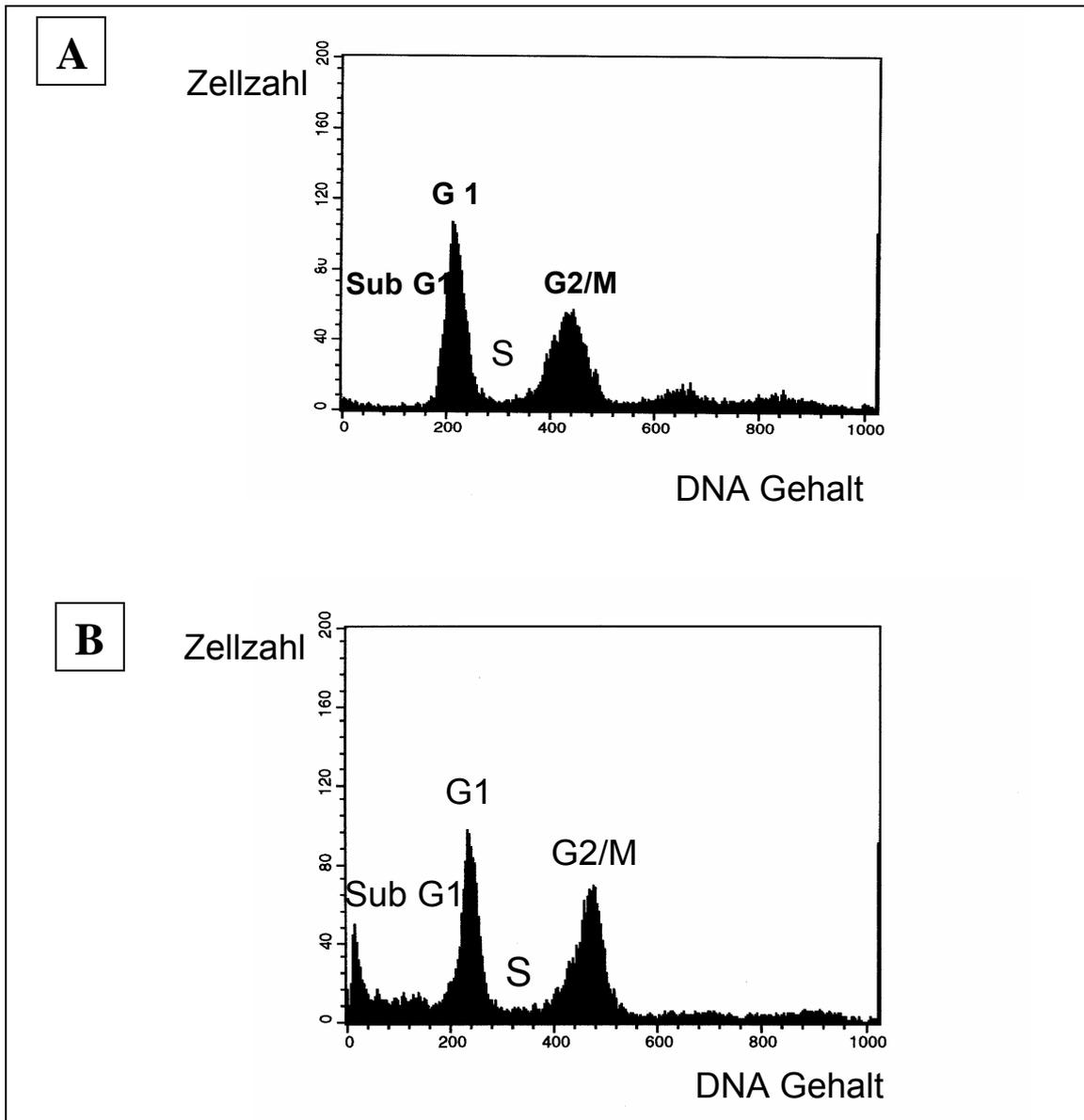


Abb. 6: Zellzyklusanalyse.

Durchflusszytometrische Bestimmung des DNA Gehaltes. Die Größe des DNA-Fluoreszenzsignals (x-Achse) wurde gegen die Anzahl der gemessenen Teilchen pro Intensitätsklasse (Y-Achse) aufgetragen. Hier sichtbar das Verhältnis zwischen Zellzyklus und DNA Gehalt. Der DNA Gehalt verdoppelt sich in der S Phase. Daher haben die Zellen in der G2/M Phase doppelt so viel DNA wie Zellen in der G1 Phase. Die Sub-G1-Phase repräsentiert die apoptotischen Zellen. Während der Apoptose geht eine Fraktion DNA von der Zelle verloren durch DNA Fragmentierung. Die „Sub-G1-Zellen“ sind also apoptotische Zellen mit fragmentierter DNA Gehalt. Mit Hilfe von Computerprogrammen wird der prozentuelle Anteil der apoptotischen Zellen angegeben. (A) Fast keine Apoptose, (B) deutliche Apoptose (Sub G1 Fraktion).

2.2.3.2 Propidiumiodid/ Annexin Doppelfärbung

Die Doppelfärbung mit Propidiumiodid und Annexin ermöglicht die Differenzierung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen. Die Zellen wurden gereinigt und gewaschen (s. Durchflusszytometrie) und mit Propidiumiodid (1µg/ml) und Annexin gefärbt. Dazu wurde zunächst ein Inkubationspuffer angesetzt (10mM HEPES/NaOH, pH 7,4, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl₂). Dem Inkubationspuffer wurde anschließend die Annexin-V-Fluos Markierungslösung zugefügt (Verdünnung von 20 µl Annexin-V-Fluos Stammlösung in 1000 µl Inkubations-Puffer und hinzufügen von 20 µl der 50 µg/ml Propidiumiodid Stammlösung). Von der Annexin/Propidiumiodid Färbelösung wurden 100 µl pro Zellpellet verwendet. Die gefärbten Zellen wurden mittels FACS Calibur Zytometer untersucht: Die Prozentanteile der nekrotischen, apoptotischen und lebenden Zellen wurden mit Hilfe der CellQuest Software (Becton Dickinson) errechnet.

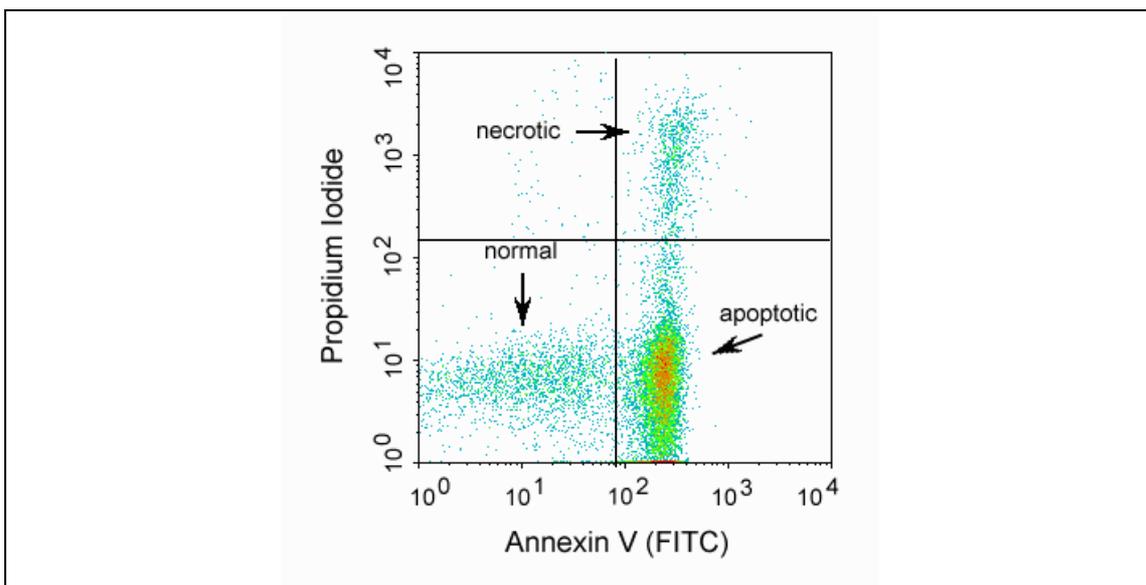


Abb. 7: Propidiumiodid/Annexin Doppelfärbung.

Auf der x-Achse wurde der Logarithmus des Annexin Signals, auf der Y-Achse logarithmisch die PJ-Fluoreszenz dargestellt. Quadranten-Einteilung: linker unterer Q: unmarkierte Zellen = vitale Zellen; rechter unterer Q: Annexin V positive Zellen = apoptotische Zellen; linker und rechter oberer Q: Annexin V und PJ positive Zellen = nekrotische Zellen (PJ durchdringt nur die Zellmembranen nekrotischer Zellen).

2.2.4 Konfokale Laser-Mikroskopie

Die konfokale Laser Mikroskopie hat sich bei der Analyse zellulärer Funktionsmechanismen besonders bewährt. Sie wurde als erstes von Minsky 1957 eingeführt und patentiert.

Zunächst wurden 0,5 ml kultivierter Zellen (s. 2.2.1) in jede der 8 Kammern der Kammerobjekt-Träger („Falcon Culture Slides“) ausgesät. Nach 24-stündiger Inkubation im 37°C Brutschrank erfolgte ein zweimaliger Waschschrift mit PBS, dann die Fixierung mit eisgekühltem Methanol für 20 Minuten bei -20°C und anschließend ein erneuter zweimaliger Waschschrift. Die unspezifische Bindung von Antikörpern wurde mittels Inkubation mit PBG (0,045% Fischgelatine in PBS) mit Zusatz von 5% Ziegen Serum und 1% BSA blockiert. Danach wurden 100 µl des primären Antikörpers - in PBG, 1% BSA und 5% Ziegen Serum verdünnt - pro Kammer sorgsam aufgetragen. Die Culture Slides inkubierten über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurden die Zellen zunächst viermal mit PBG gewaschen. Nach sorgsamer Auftragung von 100 µl des in PBG verdünnten fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpers pro Kammer inkubierten die Slides für 45 Minuten in einem dunklen Raum. Danach erfolgten weitere Waschschriffe mit PGB und PBS. Schließlich wurden die Kammerunterteile sorgfältig abgetrennt und ein Deckglas mit PermaFluor auf den Objektträger geklebt. Mittels konfokaler Lasermikroskopie konnte nun die Lokalisation der verschiedenen Proteinkinase C-Isoformen in den Zellen betrachtet werden.

2.2.5 Immunoblot-Analyse

Die Methode der Immunoblot-Analyse wurde zur Detektion der Proteinkinase C-Isoenzyme in Gesamtzell-Lysaten von Endothel- und glatten Muskelzellen humaner Koronararterien herangezogen.

2.2.5.1 Herstellung von Zell-Lysaten

Die kultivierten Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit Hilfe von Triton-haltigem Lysepuffer mit Phosphatase-Inhibitoren (50 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 10 % (v/v) Glycerin, 1 % (w/v) Triton X-100, 100 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 10 mM Na₄P₂O₇ und frisch dazugegeben 1 mM PMSF, 10 µg/ml Aprotinin) und Zellschaber vom Boden der Petrischalen gelöst, in Eppendorf Cups überführt und nach 5 Minuten Inkubation zur Abtrennung der Kernfraktion bei 1300 upm und 4°C 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf Cup pipettiert und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C verwahrt.

2.2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Proteinkonzentration von Ganz-Zell-Lysaten wurde mit Hilfe des Protein Microassays von BioRad bestimmt (Bradford, 1976), um zu gewährleisten, dass gleiche Proteinmengen in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (s. Kap. 2.2.2.3) eingesetzt wurden.

Zunächst wurde der Triton-haltige Lysepuffer hergestellt und 1:10 verdünnt (I-sopuffer). Dazu wurden 0,1 ml Lysepuffer (50 mM Hepes pH 7,5; 150 mM NaCl; 1,5 mM MgCl₂; 1 mM EGTA; 10 % Glycerin; 1 % Triton; 10 mM NaF; 10 mM Na₄P₂O₇) 1 mM PMSF, 10 µg/ml Aprotinin und 400 µM Na₃VO₄ frisch hinzugefügt. Sodann wurde eine Verdünnungsreihe des Standard Bradford Proteins BSA mit den Konzentrationen 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,75 mg/ml und 1 mg/ml erstellt. Es folgte eine 1:10 Verdünnung der Proben der Lysate. Von der Verdünnungsreihe und den Lysaten wurden je Doppelansätze angefertigt. Das BioRad Reagenz wurde 1:5 verdünnt und den Proben zugefügt. Nach 5 Minuten Farbentwicklung erfolgten die Messung der Proben am Photometer bei 595 nm und die Ermittlung der Mittelwerte der Doppelansätze. Es wurde eine Standardkurve erstellt und die Proteinkonzentration rechnerisch ermittelt. Von dieser ausgehend konnte dann das Volumen der Probe errechnet werden, welches einer Proteinmenge von 40 µg pro Geltasche entsprach.

2.2.5.3 SDS-PAGE

(Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese)

Die Proteinlysate wurden elektrophoretisch unter reduzierenden und denaturierenden Bedingungen durch das SDS-PAGE Verfahren in einem Polyacrylamid-Trenngel („lower gel“) aufgetrennt, welches folgendermaßen hergestellt wurde:

Poly-Acrylamid-Konzentration	10 %
Acrylamid-Stammlösung	13,30 ml
Lower Tris (1,5 M Tris/HCl, pH 8,8, 2 % SDS)	10,00 ml
Aqua dest.	16,70 ml
TEMED	66 µl
10% APS (Ammonium-Peroxid-Sulfat)	0,27 ml

Das Gel wurde unter Vermeidung von Luftblasen gegossen und die Polymerisation abgewartet. Anschließend wurde das obere Sammelgel („upper gel“) hergestellt:

Poly-Acrylamid-Konzentration	4%
Acrylamid-Stammlösung	3,50 ml
Upper Tris (1,5 M Tris/HCl, pH 6,8, 2 % SDS)	9,40 ml
TEMED	15 µl
10 % APS (Ammonium-Peroxid-Sulfat)	0,15 ml

und über das Trenngel gegossen. Sogleich wurde ein Kamm zur Abtrennung der Geltaschen eingeführt und die Polymerisation abgewartet. Anschließend erfolgte die Einspannung der Gelplatten in die Elektrophoresekammer und das Pipettieren von 40 µl Proteinlysate bzw. Molekulargewichtsmarker in die Taschen. Die Proben wurden bei 80 V und 11 mA in einem Elektrophorese Puffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris, 0,1 % SDS) über Nacht elektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.5.4 Transfer von Proteinen auf Membranen (Western Blot)

Die mit dem SDS-PAGE Verfahren aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrozellulose-Membran (Polymerschicht) transferiert, indem das Gel und die Nitrozellulose Membran zwischen mehreren in Transfer Puffer getränkten Whatman Saugpapieren in eine halbtrockene („semidry“) Elektrophorese-Kammer eingebaut wurden (Transfer Puffer: 48 mM Tris/HCl, pH 7,5; 0,0004 % (w/v) SDS; 39 mM Glycin; 20 % (v/v) Methanol) und 3 Stunden bei 4°C ein Strom von 0,13 Ampère angeschlossen wurde. Durch Schwenken der Nitrozellulose in Ponceau Rot konnten die Banden und der Molekulargewichtsmarker sichtbar gemacht und markiert werden. Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen des Antikörpers mit der Nitrozellulose-Membran, wurde diese mit H₂O und anschließend eine Stunde mit NET-G Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 7,4; 150 mM NaCl, 5 mM EDTA; 0,05 % (v/v); Triton X-100 und 0,25 % (w/v) Gelatine) abgesättigt. Die Inkubation mit den entsprechenden Primär-Antikörpern erfolgte über Nacht bei 4°C. Anschließend wurden die Membranen fünf mal mit NET-G-Puffer gewaschen, bevor sie für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur mit den entsprechenden Peroxidase-gekoppelten Sekundär-Antikörpern inkubiert und schließlich erneut fünf mal mit NET-G gewaschen wurden.

2.2.5.5 Nachweis der Proteine mit Chemolumineszenz

Die durch den sekundären Antikörper markierten Proteine wurden durch eine Meerrettichperoxidase-katalysierte Chemolumineszenzreaktion (enhanced chemiluminescence = ECL) nachgewiesen. Dazu wurden die mit Antikörpern behandelten Membranen ca. 3 Minuten in einem Chemolumineszenz-Reagenz (1:1 Mischung einer Luminollösung und einer Wasserstoffperoxidlösung aus dem ECL-Kit von Amersham) geschwenkt. Durch diese Chemolumineszenz-Reaktion entstanden leuchtende Banden, welche durch Auflegen eines Röntgenfilms mit unterschiedlich langen Expositionszeiten (10 sec, 30 sec, 1 min, 2 min, 5 min, 15 min) und sofortige Entwicklung sichtbar gemacht wurden.

2.2.6 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Mit der von MULLIS et al. (1986) entwickelten Methode der Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) werden selektiv bestimmte Abschnitte der DNA exponentiell amplifiziert. In dieser Reaktion dienen Oligonukleotide („Primer“) als Startmoleküle. Der Abschnitt, den die Primer beidseitig flankieren, wird in jedem Zyklus der Reaktion verdoppelt. Der Zyklus besteht aus drei Schritten:

1. Hitzedenaturierung der doppelsträngigen DNA bei 94°C, wobei die DNA in Einzelstränge aufgespalten wird.
2. Anlagerung der Primer („Annealing“) an die DNA-Einzelstränge bei einer primerspezifischen Temperatur.
3. Synthese des komplementären DNA-Doppelstranges (Extension) bei der optimalen Arbeitstemperatur der hitzestabilen DNA-Polymerase (72-75°C).

2.2.6.1 RT-PCR mit dem Reverse Transkription System

Gesamt-RNA wurde aus Endothelzellen und glatten Muskelzellen humaner Koronararterien mit dem RNeasy Mini Kit von Quiagen (Hilden, Deutschland) isoliert. Da hier also RNA als Ausgangsmaterial für die PCR diente, musste zunächst eine Reverse Transkription (RT) durchgeführt werden. Dazu wurde mit der RNA-abhängigen DNA-Polymerase Reverse Transkriptase unter Zusatz von Oligo-dT-Primern, welche sich an die Poly-(A)-Überhänge der RNA anheften, RNA in eine zur eingesetzten RNA-Matrize komplementären Einzelstrang-DNA „cDNA“ (copied DNA bzw. complementary DNA) umgeschrieben. In der anschließenden PCR erfolgte die Anlagerung der für den gesuchten Genabschnitt spezifischen Primer an die einzelsträngige cDNA, die dann zum Doppelstrang ergänzt und nachfolgend amplifiziert wurde. Als Reverse Transkripta-

se wurde AMV Reverse Transkriptase (Avian Myeloblastosis Virus) eingesetzt (Goodman und MacDonald 1979).

Als PCR-Primer dienen 5'-GTCTATGTCCAAGGAAGCTG-3' als „upstream“-Primer und 5'-AGGTGTTAGGACTGGTGGAT-3' als „downstream“-Primer, welche von Invitrogen (Karlsruhe) bezogen wurden. Die quantitative PCR erfolgte mithilfe des Kits „Light Cycler DNA Master SYBR Green I“ und eines „high speed thermal cyclers with integrated microvolume fluorometer“ (Roche Diagnostics, Mannheim).

Die RT-PCR wurde unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

12,6 µl H ₂ O	
2,0 µl MgCl ₂	(4 mM End-Konzentration)
0,5 µl Primer 1, forward	(0,5 µM End-Konzentration)
0,5 µl Primer 2, reverse	(0,5 µM End-Konzentration)
2,0 µl Fast Start DNA Master SYBR Green	(1x End-Konzentration)

PCR:	denaturiert	95°C 10'	
	amplifiziert	95°C 15"	
		66°C 10"	
		72°C 11"	einfache Messung
		ca. 45 Zyklen	
	melt	95°C 5"	
		68°C 10"	
		98°C 0"	Slope 0,1°C/sec mit kontinuierlicher Messung
	cool	40°C 30"	

2.2.6.2 Elektrophoretische Trennung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden elektrophoretisch in einem 2% Agarosegel (Invitrogen Agarose Elektrophoresis Grade) mit Ethidiumbromid aufgetrennt. Dazu wurden 2 g Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer gelöst und 4 µl Ethidiumbromid zugegeben. 15 µl der Proben wurden mit 3 µl Ladepuffer besetzt, aufgetragen und bei 120 V getrennt. Zur Größenbestimmung der Fragmente wurde ein DNA-Größenmarker eingesetzt.

Die gewonnenen PCR-Produkte wurden sequenziert mit dem Applied Biosystems ABI PRISM 310 und dem Sequenzierungskit DNA Sequencing KiT Big Dye Terminatoren ebenfalls von Applied Biosystems.

Bedingungen:	Template (PCR-Produkt)	3-10 ng
	Big Dye Sequenzierungspuffer (5x)	2 µl
	Primer „upstream“	3,2 pmol
	Ready Reaction Premix (2,5 x)	2 µl
	H ₂ O	auf 10 µl

Reaktion:	96°C	1 min
	96°C	10 sec
	50°C	30 sec
	60°C	4 min

Die Aufreinigung erfolgte über Seqhadex mit Centri Sep Spin Columns von Applied Biosystems. Die Sequenzen sind im BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/, Altschul et al., 1990) verglichen worden.

2.2.7 Statistische Auswertung

Alle durchgeführten Versuche wurden mindestens zweimal unabhängig voneinander wiederholt. Die Anzahl der Wiederholungen je Variante (n) wird bei den entsprechenden Ergebnisdarstellungen angegeben. Es wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit 1. Art mit $p < 0,05$ zugelassen. Der paarweise Vergleich der Messergebnisse erfolgte bei Vorliegen einer Normalverteilung mit dem t-Test nach STUDENT, bei keiner Normalverteilung mit dem Rangsummentest nach Whittney und Mann. Aus den umfangreichen Daten sind zur besseren Übersicht Mittelwerte gebildet worden und tabellarisch und graphisch dargestellt worden. Um einen Eindruck von der Reproduzierbarkeit der Daten zu gewinnen, sind die Standardfehler der Mittelwerte (standard error of the mean) berechnet und ebenfalls tabellarisch und graphisch dargestellt worden.

Folgende Computerprogramme wurden zur Auswertung der vorliegenden Arbeit verwendet: Excel 7.0 (Microsoft), CellQuest (Becton Dickinson), Sigma Stat (Jandel) und SigmaPlot (Jandel).

3 Ergebnisse

3.1 Effekte freier Fettsäuren auf die Apoptose von Endothelzellen und glatten Muskelzellen humaner Koronararterien

Endothelzellen und glatte Muskelzellen humaner Koronararterien wurden mit fettsäurehaltigem Medium (1mmol/l) für 24 Stunden bei 37°C inkubiert und der Anteil der apoptotischen Zellen in der untersuchten Zellfraktion mittels Zellzyklus-Analyse ermittelt (s. Kap. 2.2.3). Zunächst wurde der Effekt von den gesättigten Fettsäuren Palmitat (16:0) und Stearat (18:0) und den ungesättigten Fettsäuren Palmitoleat (16:1), Oleat (18:1) und Linoleat (18:2) auf die basale Apoptoserate untersucht.

3.1.1 Effekte freier Fettsäuren auf die Apoptose von Endothelzellen humaner Koronararterien

Wie aus Tabelle 1 und Abbildung 8 a und b ersichtlich, erhöhten die gesättigten Fettsäuren *Palmitat* ($n = 12$, $p = 0,02$ im T-Test für ungepaarte Stichproben) und *Stearat* ($n = 12$, $p < 0,0001$ im T-Test für ungepaarte Stichproben) die basale Apoptoserate von Endothelzellen humaner Koronararterien signifikant.

Die ungesättigten Fettsäuren *Palmitoleat*, *Oleat* und *Linoleat* beeinflussten die basale Apoptoserate hingegen nicht statistisch signifikant.

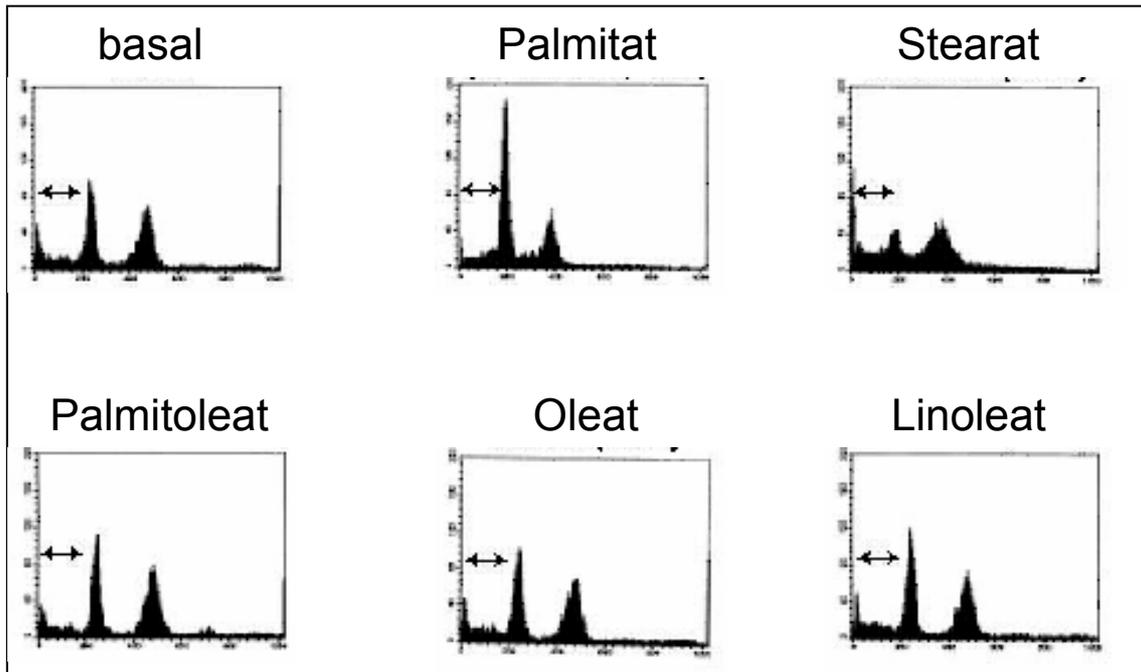


Abb. 8a Effekte gesättigter und ungesättigter Fettsäuren auf die Apoptose von Endothelzellen humaner Koronararterien

Die Zellen wurden 24 Stunden mit den Fettsäuren inkubiert und der Zellzyklusanalyse zugeführt. Mit Pfeilen markiert sind die apoptotischen Zellen in der Sub-G1-Fraktion (s. Material und Methoden). „basal“ = ohne Fettsäure Behandlung.

Tabelle 1: Lipoapoptotische Effekte gesättigter und ungesättigter Fettsäuren auf Endothelzellen humaner Koronararterien.

Die Zellen wurden mit verschiedenen Fettsäuren behandelt (1 mM, 24 Stunden) und mittels Durchflusszytometrie untersucht (s. Kap. 2.2.3). Dargestellt sind die Mittelwerte des gemessenen Prozentanteils apoptotischer Zellen in der analysierten Zellfraktion \pm standard error of the mean. n = 12

Basal	6,70 \pm 1,04
Palmitat	12,46 \pm 0,91
Stearat	21,56 \pm 2,11
Palmitoleat	8,12 \pm 4,21
Oleat	10,33 \pm 5,49
Linoleat	14,07 \pm 6,12

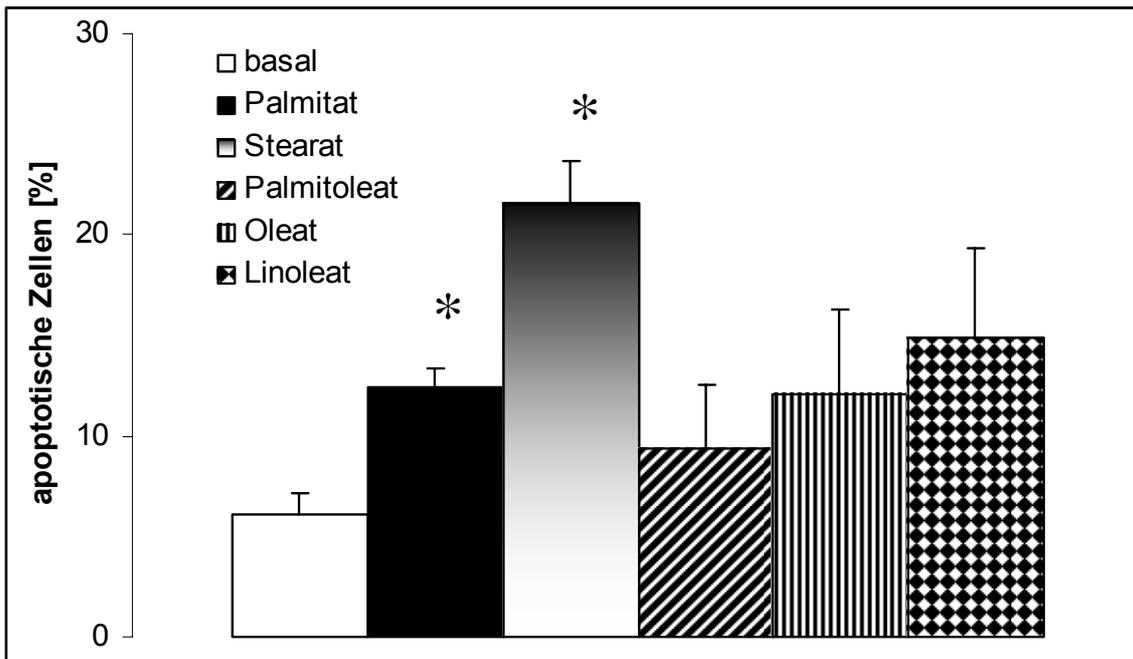


Abb. 8 b: Effekte von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren auf die Apoptose von Endothelzellen humaner Koronararterien

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler der mittels Durchflusszytometrie ermittelten apoptotischen Zellen in Prozent der Gesamtzellzahl. Die Sterne kennzeichnen statistische Signifikanzen ($p < 0,05$). $n = 12$.

3.1.2 Effekte freier Fettsäuren auf die Apoptose von glatten Muskelzellen humaner Koronararterien

Folgende Versuche wurden in Analogie zu den Endothelzellen ebenfalls an glatten Muskelzellen humaner Koronararterien durchgeführt, um Unterschiede und Gemeinsamkeiten dieser anatomisch eng benachbarten Zelltypen aufzuweisen.

Die gesättigten Fettsäuren *Palmitat* (16:0) und *Stearat* (18:0) erhöhten die basale Apoptoserate glatter Muskelzellen humaner Koronararterien signifikant (*Palmitat*: $n = 4$, $p = 0,03$; *Stearat*: $n = 4$, $p = 0,03$ im Rangsummentest). Die einfach ungesättigten Fettsäuren *Palmitoleat* (16:1) und *Oleat* (18:1) zeigten keinen signifikanten Einfluss auf die Apoptose der glatten Muskelzellen, während die mehrfach ungesättigte Fettsäure *Linoleat* (18:2) die Apoptoserate sta-

tistisch signifikant erhöhte (n = 4, p = 0,01 im T-Test für ungepaarte Stichproben; vgl. Tab. 2 und Abb. 9).

Tabelle 2: Effekte freier Fettsäuren auf die Apoptose von glatten Muskelzellen humaner Koronararterien.

Die Zellen wurden mit verschiedenen Fettsäuren behandelt (1 mM, 24 Stunden) und mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dargestellt sind die Mittelwerte des mittels Zellzyklusanalyse ermittelten Prozentanteils apoptotischer Zellen in der analysierten Zellfraktion ± Standard error of the mean. n = 4

Basal	Palmitat	Stearat	Palmitoleat	Oleat	Linoleat
1,63 ± 0,13	4,12 ± 0,57	14,23 ± 2,52	3,66 ± 2,02	3,51 ± 1,19	3,03 ± 0,29

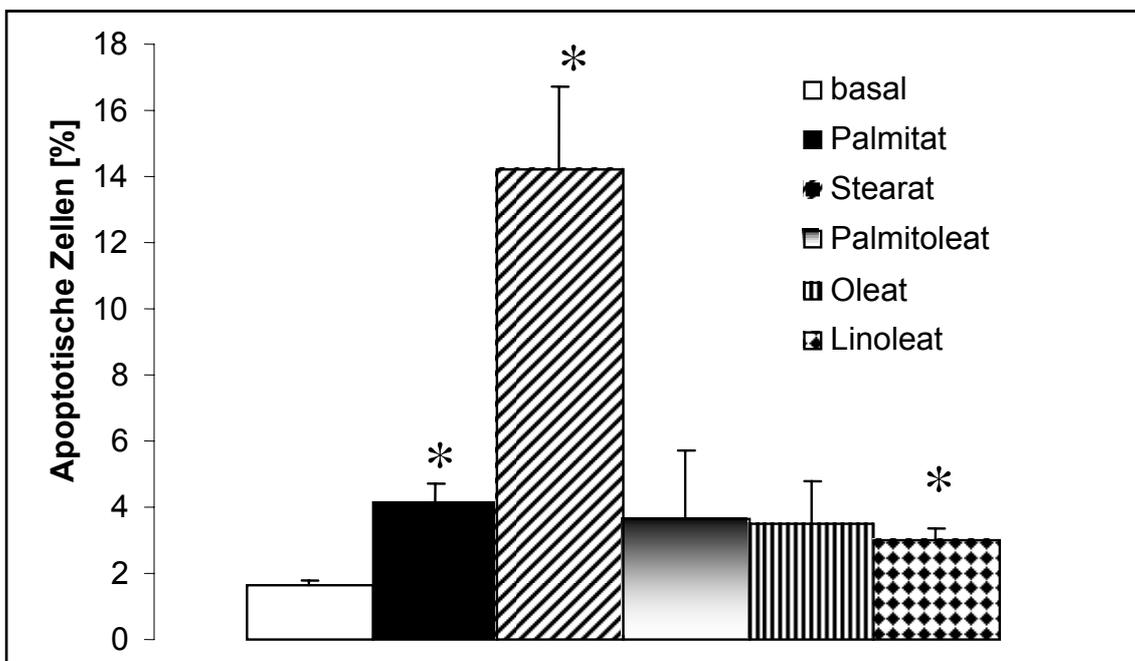


Abb. 9 Effekte von den gesättigten Fettsäuren Palmitat und Stearat und den ungesättigten Fettsäuren Palmitoleat, Oleat und Linoleat auf die Apoptose von glatten Muskelzellen humaner Koronararterien.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standard error of the mean der mittels Zellzyklusanalyse ermittelten apoptotischen Zellen in Prozent der Gesamtzellzahl. n = 4. (* = p < 0,05)

3.1.3 Effekte freier Fettsäuren auf das Zellüberleben von glatten Muskelzellen humaner Koronararterien

Glatte Muskelzellen humaner Koronararterien wurden 24 Stunden mit den gesättigten Fettsäuren Palmitat und Stearat sowie der mehrfach ungesättigten Fettsäure Linoleat (1mM) bei 37°C inkubiert. Mit Hilfe der Propidiumiodid-Annexin-Doppelfärbung-Durchflusszytometrie (s. Kap. 2.2.3.2) wurden die überlebenden Zellen in Prozent ermittelt.

Tabelle 3: Effekte freier Fettsäuren auf die Vitalität von glatten Muskelzellen humaner Koronararterien.

Die Zellen wurden 24 Stunden mit verschiedenen Fettsäuren behandelt und der Prozentanteil überlebender (vitaler) Zellen in der analysierten Zellfraktion mithilfe der Propidiumiodid/Annexin-Durchflusszytometrie ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte vitaler Zellen in Prozent der Gesamtzellzahl \pm Standard error of the mean. n = 5

Basal	Palmitat	Stearat	Linoleat
95,10 \pm 0,80	75,49 \pm 5,78	40,55 \pm 4,14	90,44 \pm 0,41

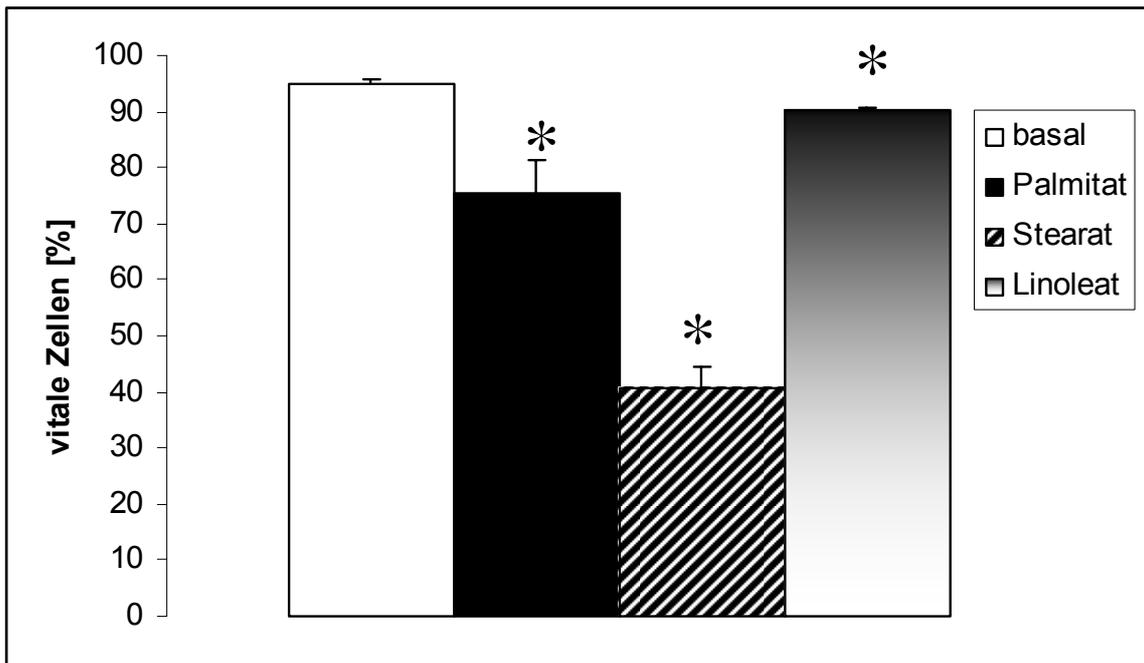


Abb. 10 Effekte von Palmitat, Stearat und Linoleat auf das Zellüberleben von glatten Muskelzellen humaner Koronararterien.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler der mittels Propidiumiodid/Annexin-Doppelfärbung-Durchflusszytometrie ermittelten vitalen Zellen in Prozent. $n = 5$ (* $p < 0,05$)

Wie in Tabelle 3 und Abbildung 10 dargestellt, verringerten sowohl *Palmitat* ($n = 5$, $p = 0,008$ im Rangsummentest), als auch *Stearat* ($n = 5$, $p = 0,008$ im Rangsummentest) und *Linoleat* ($n = 5$, $p = 0,0005$) das Zellüberleben der HCA-SM-Zellen hoch signifikant, wobei Stearat die stärksten Effekte zeigte, gefolgt von Palmitat und Linoleat.

3.1.4 Effekte der kombinierten Behandlung mit ungesättigten und gesättigten Fettsäuren von Endothelzellen und glatten Muskelzellen humaner Koronararterien

Anschließend sollte ermittelt werden, ob die ungesättigten Fettsäuren einen Einfluss auf die durch gesättigte Fettsäuren hervorgerufene Lipoapoptose von Endothel- und glatten Muskelzellen humaner Koronararterien haben. Dazu wurden die Zellen 30 Minuten mit den ungesättigten Fettsäuren Palmitoleat, Oleat und Linoleat (1mM) bzw. nur mit Medium („Kontrolle“) inkubiert vor Zugabe der gesättigten Fettsäuren Palmitat und Stearat (1mM) bzw. von Medium („basal“) für 24 Stunden.

3.1.4.1 Effekte der kombinierten Behandlung mit ungesättigten und gesättigten Fettsäuren auf die Apoptose von Endothelzellen humaner Koronararterien

Wie in Tabelle 4 und Abbildung 11 dargestellt, verringerten alle drei eingesetzten ungesättigten Fettsäuren *Palmitoleat*, *Oleat* und *Linoleat* die durch Stearat induzierte Apoptoserate von Endothelzellen humaner Koronararterien tendenziell ($n = 3$, p (Palmitoleat) = 0,08, p (Oleat) = 0,09, p (Linoleat) = 0,08 im T-Test für ungepaarte Stichproben), nicht jedoch die durch Palmitat hervorgerufene.

Tabelle 4: Effekt von gesättigten, ungesättigten Fettsäuren und deren Kombination auf die Apoptose von Endothelzellen humaner Koronararterien.

Die Zellen wurden 30 min mit den ungesättigten Fettsäuren inkubiert vor Zugabe der gesättigten Fettsäuren für weitere 24 Stunden. Dargestellt sind die Mittelwerte der mittels Durchflusszytometrie ermittelten apoptotischen Zellen [%] in der analysierten Zellfraktion \pm Standard error of the mean. n = 3

	Kontrolle	+ Palmitoleat	+ Oleat	+ Linoleat
Basal	9,88 \pm 4,00	8,12 \pm 4,21	10,33 \pm 5,49	14,07 \pm 6,11
Palmitat	16,95 \pm 6,33	6,98 \pm 4,44	6,85 \pm 3,75	6,40 \pm 2,37
Stearat	40,92 \pm 12,35	9,36 \pm 5,61	9,86 \pm 6,10	9,65 \pm 5,21

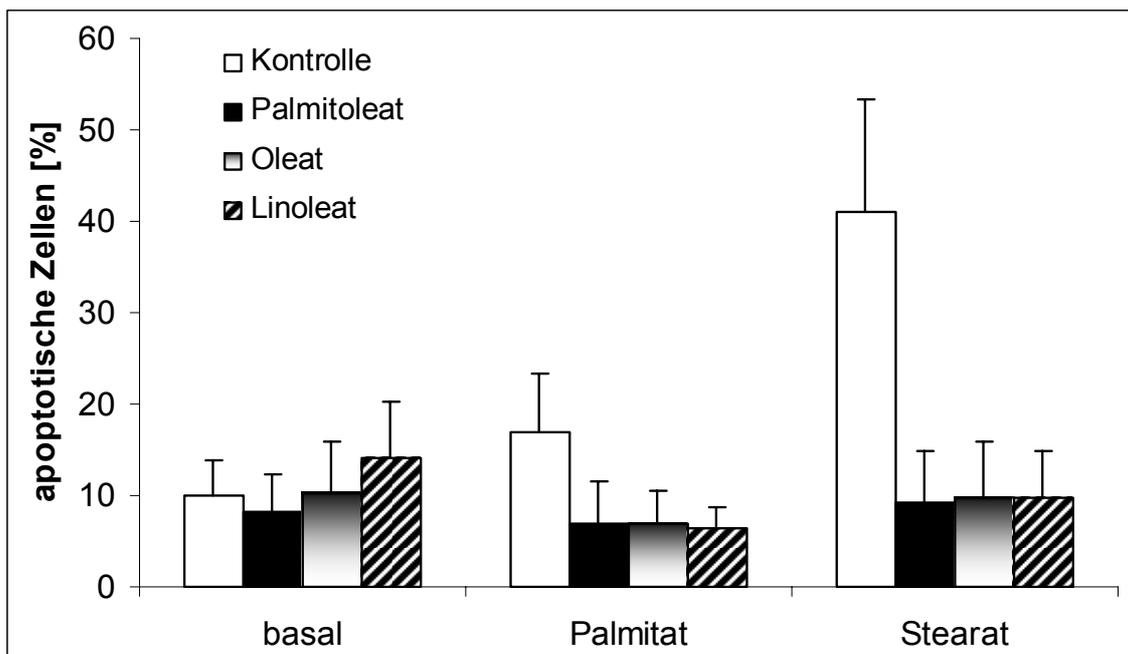


Abb. 11: Effekte freier Fettsäuren auf die Apoptose von Endothelzellen humaner Koronararterien.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler der mittels Zellzyklusanalyse ermittelten apoptotischen Zellen. n = 3

3.1.4.2 Effekte der kombinierten Behandlung mit ungesättigten und gesättigten Fettsäuren auf die Apoptose von glatten Muskelzellen humaner Koronararterien

In Tabelle 5 und Abbildung 12 sind die Ergebnisse der kombinierten Behandlung von glatten Muskelzellen humaner Koronararterien mit gesättigten und ungesättigten Fettsäuren dargestellt.

Die ungesättigten Fettsäuren *Palmitoleat* und *Oleat* beeinflussten die basale Apoptoserate nicht.

Palmitoleat erhöhte die durch Palmitat induzierte Apoptose tendenziell (n = 3, p = 0,08 im T-Test für ungepaarte Stichproben), *Oleat* statistisch signifikant (n = 3, p = 0,03 im T-Test für ungepaarte Stichproben).

Palmitoleat, *Oleat* und *Linoleat* beeinflussten die durch Stearat induzierte Apoptose nicht.

Die mehrfach ungesättigte Fettsäure *Linoleat* erhöhte die basale Apoptoserate (n = 3; p = 0,01 im T-Test für ungepaarte Stichproben) und verstärkte die durch Palmitat induzierte Apoptose (n = 3; p = 0,03 im T-Test für ungepaarte Stichproben). Die durch Stearat induzierte Apoptose wurde hingegen nicht statistisch signifikant beeinflusst (vgl. Tabelle 5 und Abbildung 12).

Tabelle 5: Effekte der kombinierten Behandlung mit gesättigten und ungesättigten Fettsäuren auf die Apoptose von glatten Muskelzellen humaner Koronararterien.

Die Zellen wurden 30 min mit den ungesättigten Fettsäuren inkubiert vor Zugabe der gesättigten Fettsäuren für 24 Stunden. Dargestellt sind die Mittelwerte der mittels Zellzyklusanalyse ermittelten apoptotischen Zellen [%] der Gesamtzellzahl in der analysierten Zellfraktion ± Standard error of the mean. n = 3.

	Kontrolle	+ Palmitoleat	+ Oleat	+ Linoleat
Basal	1,63 ± 0,13	3,66 ± 2,02	3,51 ± 1,19	3,03 ± 0,29
Palmitat	4,12 ± 0,57	10,70 ± 2,87	10,90 ± 2,10	10,18 ± 1,84
Stearat	14,23 ± 2,52	15,15 ± 4,61	14,43 ± 3,68	15,55 ± 3,93

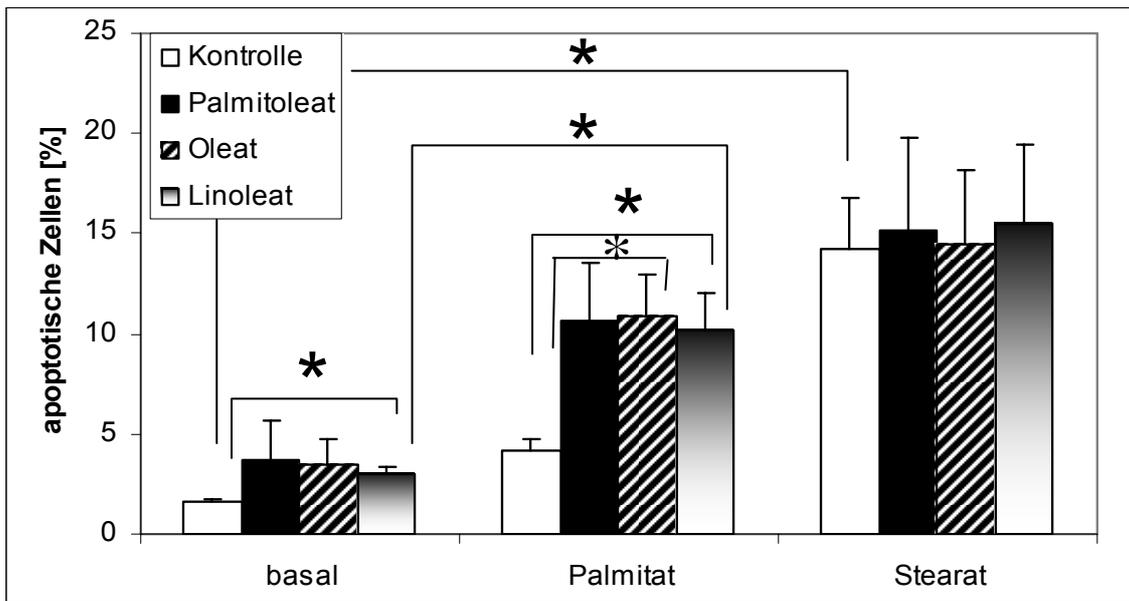


Abb. 12: Effekte von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren und deren Kombination auf die Apoptose von glatten Muskelzellen humaner Koronararterien. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standard error of the mean der mittels Zellzyklus-Analyse ermittelten apoptotischen Zellen in Prozent der Gesamtzellzahl. n = 3. Signifikanzen sind mit Sternen gekennzeichnet (p < 0,05).

3.2 Effekte von Atorvastatin auf die (Lipo-) Apoptose von Endothelzellen und glatten Muskelzellen humaner Koronararterien

Es gibt zahlreiche Hinweise dafür, dass Statine nicht nur über eine Senkung des LDL-Cholesterinspiegels gefäßprotektiv wirken, sondern auch über andere Mechanismen wie ihre pleiotropen Effekte (s. Kap. 1.2.4). Um festzustellen, ob Statine die Apoptose von Endothel- und glatten Muskelzellen humaner Koronararterien beeinflussen, haben wir Atorvastatin in unseren Versuchen eingesetzt.

Die Zellen wurden 30 Minuten mit Atorvastatin in den Konzentrationen 0,1 $\mu\text{mol/l}$, 1 $\mu\text{mol/l}$, 5 $\mu\text{mol/l}$, 10 $\mu\text{mol/l}$ und 50 $\mu\text{mol/l}$ bzw. nur mit Medium als „Kontrolle“ behandelt, bevor sie mit Palmitat, Stearat bzw. mit Medium („basal“) 24 Stunden bei 37 °C inkubierten. Mit Hilfe der Zellzyklus-Analyse wurden im Folgenden die apoptotischen Zellen ermittelt (s. Kap. 2.2.3).

3.2.1 Effekte von Atorvastatin auf die (Lipo-) Apoptose von Endothelzellen humaner Koronararterien

Aus Tabelle 6 und Abbildung 13 ist zunächst erneut zu entnehmen, dass die gesättigten Fettsäuren Palmitat und Stearat Apoptose an Endothelzellen humaner Koronararterien induzieren ($n = 6$; $p = 0,03$ im Rangsummentest für sowohl Palmitat als auch Stearat).

Ein statistisch signifikanter Effekt von Atorvastatin auf die Apoptose von HCA-E-Zellen konnte in den Konzentrationen 0,1 $\mu\text{mol/l}$, 1 $\mu\text{mol/l}$, 5 $\mu\text{mol/l}$ 10 $\mu\text{mol/l}$ und 50 $\mu\text{mol/l}$ jedoch nicht nachgewiesen werden.

Tabelle 6: Effekte von Atorvastatin auf die Lipoapoptose von Endothelzellen humaner Koronararterien.

Die Zellen wurden 30 Minuten mit Atorvastatin in den Konzentrationen 0,1 µmol/l; 1 µmol/l; 5 µmol/l; 10 µmol/l und 50 µmol/l inkubiert vor Zugabe der Fettsäuren für weitere 24 Stunden. Dargestellt sind die gemessenen apoptotischen Zellen in Prozent der Gesamtzellzahl in der analysierten Zellfraktion ± Standard error of the mean. n = 6

	Kontrolle	+ Atorvastatin 0,1 µM	+ Atorvastatin 1 µM
Basal	5,33 ± 1,67	11,46 ± 4,30	5,83 ± 2,24
Palmitat	9,20 ± 1,95	11,20 ± 0,92	8,53 ± 0,96
Stearat	16,93±2,52	15,35 ± 5,34	16,58 ± 1,54

	Kontrolle	+ Atorvastatin 5 μ M	+ Atorvastatin 10 μ M	+ Atorvastatin 50 μ M
Basal	5,33 \pm 1,67	2,59 \pm 0,33	5,83 \pm 2,24	10,44 \pm 1,80
Palmitat	9,20 \pm 1,95	8,08 \pm 0,77	10,44 \pm 1,34	15,69 \pm 1,04
Stearat	16,93 \pm 2,52	15,17 \pm 1,45	18,47 \pm 1,35	20,78 \pm 2,39

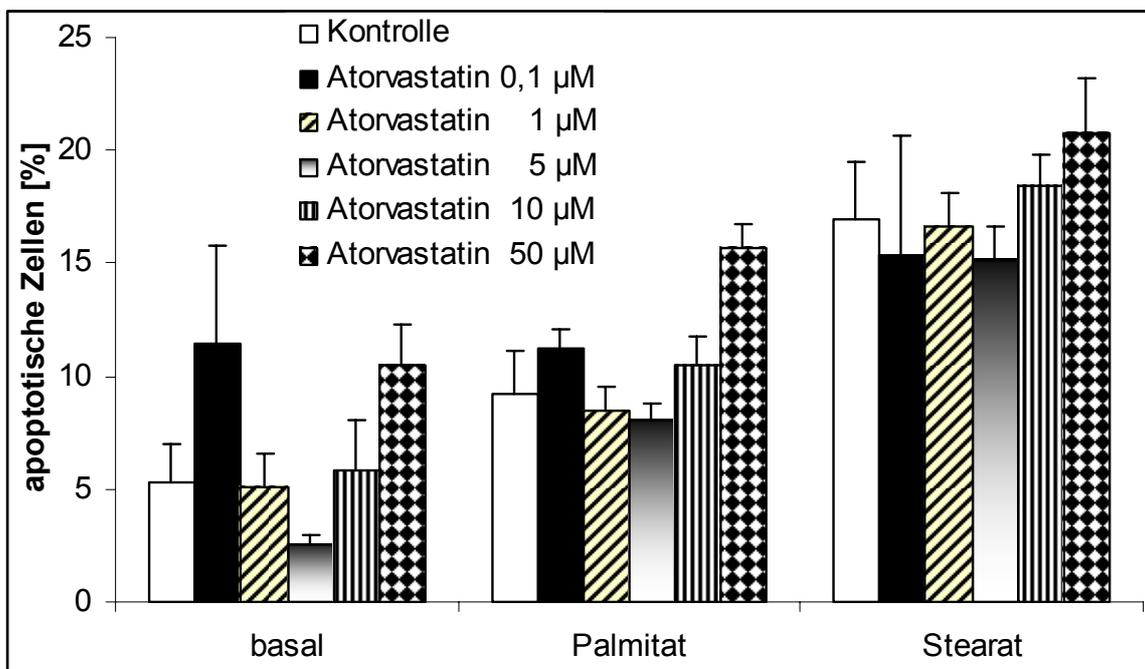


Abb. 13: Effekte von Atorvastatin 0,1 μ mol/l, 1 μ mol/l, 5 μ M, 10 μ mol/l und 50 μ mol/l auf die (Lipo-) Apoptose von Endothelzellen humaner Koronararterien.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler der mittels Zellzyklusanalyse ermittelten apoptotischen Zellen in Prozent der Gesamtzellzahl. n = 6

3.2.2 Effekte von Atorvastatin auf die (Lipo-) Apoptose von glatten Muskelzellen humaner Koronararterien

Aus Abbildung 14 ist erneut ersichtlich, dass Palmitat und Stearat Apoptose an glatten Muskelzellen humaner Koronararterien induzieren.

Die eingesetzten Konzentrationen des Atorvastatin zeigten keinen statistisch signifikanten Effekt auf die (Lipo-) Apoptose von glatten Muskelzellen humaner Koronararterien.

Es bestand ein Trend, dass Atorvastatin in einer Konzentration von 50 $\mu\text{mol/l}$ die Palmitat-induzierte Apoptose erhöhte ($n = 4$, $p = 0,1$ im Rangsummentest).

Tabelle 7: Effekte von Atorvastatin auf die (Lipo-) Apoptose von glatten Muskelzellen humaner Koronararterien.

Die Zellen wurden 30 min mit Atorvastatin in den Konzentrationen 0,1 $\mu\text{mol/l}$, 1 $\mu\text{mol/l}$, 10 $\mu\text{mol/l}$ und 50 $\mu\text{mol/l}$ inkubiert vor Zugabe von Palmitat bzw. Stearat für weitere 24 Stunden. Dargestellt sind die Mittelwerte der mittels Zellzyklusanalyse ermittelten apoptotischen Zellen in Prozent der Gesamtzellzahl in der analysierten Zellfraktion \pm Standard error of the mean. $n = 4$

	Kontrolle	Atorvastatin 0,1 μM	Atorvastatin 1 μM	Atorvastatin 10 μM	Atorvastatin 50 μM
Basal	1,13 \pm 0,26	0,92 \pm 0,25	1,68 \pm 0,58	0,68 \pm 0,06	1,28 \pm 0,36
Palmitat	3,17 \pm 0,60	3,06 \pm 0,52	3,33 \pm 0,40	3,35 \pm 0,80	5,45 \pm 1,62
Stearat	10,47 \pm 2,34	8,02 \pm 2,91	7,77 \pm 3,86	7,89 \pm 3,01	8,88 \pm 2,35

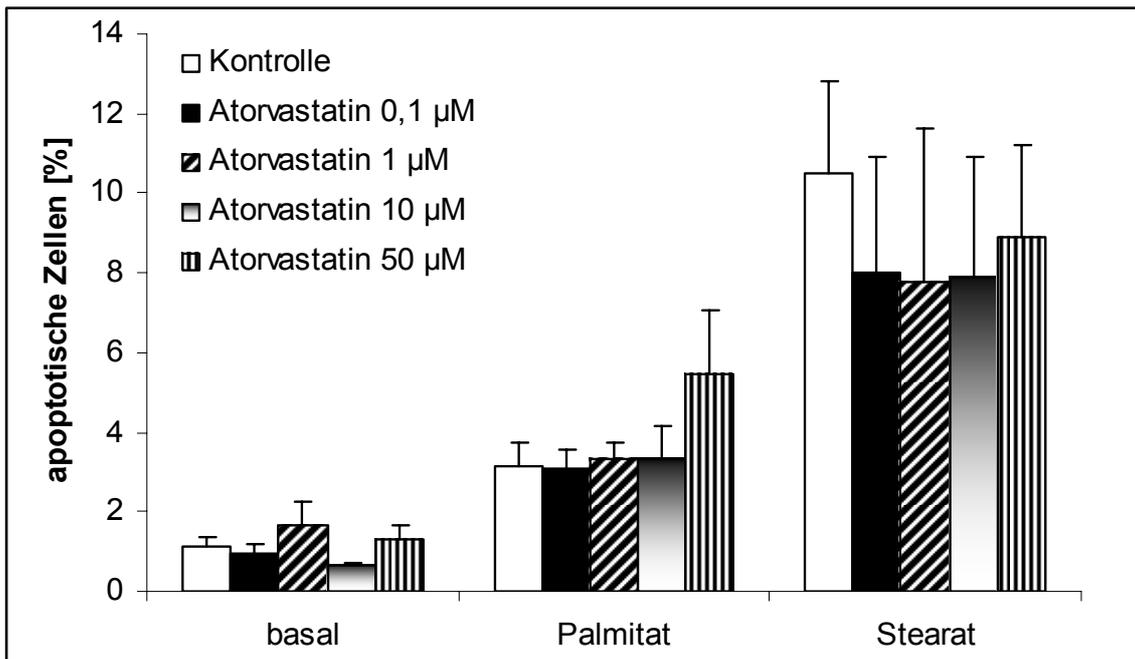


Abb. 14: Effekte von Atorvastatin 0,1 µM, 1 µM und 10 µM und 50 µM auf die (Lipo-) Apoptose von glatten Muskelzellen humaner Koronararterien.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler der mittels Zellzyklusanalyse ermittelten apoptotischen Zellen in Prozent der Gesamtzellzahl. n = 4

3.2.3 Effekte von Atorvastatin auf das Zellüberleben glatter Muskelzellen humaner Koronararterien

Glatte Muskelzellen humaner Koronararterien wurden 30 Minuten mit Atorvastatin in einer Konzentration von 50 µmol/l behandelt, bevor sie weitere 24 Stunden mit Fettsäuren in einer Konzentration von 1 mmol/l bei 37°C inkubierten. Die überlebenden Zellen wurden mit Hilfe von Propidiumiodid/ Annexin-Doppelfärbung-Durchflusszytometrie ermittelt und die Mittelwerte fünf unabhängiger Stichproben in Tabelle 8 und Abbildung 15 dargestellt.

Tabelle 8: Effekt von Atorvastatin 50 µmol/l auf die (Lipo-)Apoptose von glatten Muskelzellen humaner Koronararterien.

Die Zellen wurden 30 min mit Atorvastatin 50 µmol/l inkubiert vor Zugabe von Palmitat, Stearat bzw. Linoleat für weitere 24 Stunden. Dargestellt sind die Mittelwerte der mittels Propidiumiodid/Annexin-Doppelfärbung-Durchflusszytometrie ermittelten vitalen Zellen in Prozent der Gesamtzellzahl in der analysierten Zellfraktion ± Standard error of the mean. n = 5

	Kontrolle	+ Atorvastatin 50 µM
Basal	95,10 ± 0,80	92,30 ± 0,69
Palmitat	75,49 ± 5,78	60,84 ± 4,43
Stearat	40,55 ± 4,14	29,74 ± 5,90
Linoleat	90,44 ± 0,41	79,47 ± 6,39

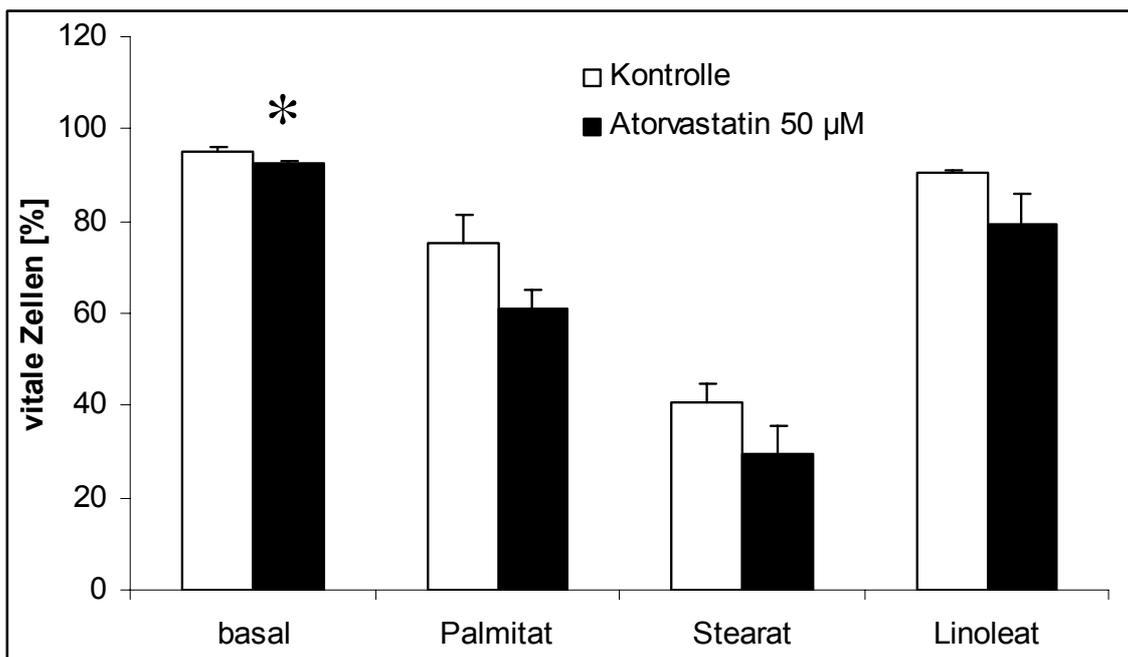


Abb. 15: Effekte von Atorvastatin 50 µmol/l auf die Vitalität von glatten Muskelzellen humaner Koronararterien.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler der mittels Propidiumiodid/Annexin Doppelfärbung-Durchflusszytometrie ermittelten vitalen Zellen in Prozent. (Stern: p < 0,05). n = 5

Wie in Tabelle 8 und Abbildung 15 dargestellt, verringerte Atorvastatin in einer Konzentration von 50 $\mu\text{mol/l}$ das basale Zellüberleben von glatten Muskelzellen humaner Koronararterien signifikant ($n = 5$, $p = 0,03$ im T-Test für unabhängige Stichproben).

Weiterhin bestanden Trends, dass Atorvastatin 50 μM auch das Zellüberleben nach Behandlung mit Palmitat ($n = 5$, $p = 0,08$ im T-Test für ungepaarte Stichproben), mit Stearat ($n = 5$, $p = 0,09$ im T-Test für ungepaarte Stichproben) und Linoleat ($n = 5$, $p = 0,16$ im T-Test für ungepaarte Stichproben) verringerte.

3.3 Expressionsmuster der Proteinkinase C (PKC) in Endothel-(EC) und glatten Muskelzellen (SMC) humaner Koronararterien

Im Folgenden wurde erstmals das Expressionsmuster der Proteinkinase C in Endothelzellen und glatten Muskelzellen humaner Koronararterien ermittelt.

3.2.4 Ermittlung des PKC-Expressionsmusters mithilfe der Western Blot Analyse

Die Proteinkinase C kommt ubiquitär im Körper vor und ist an Apoptoseprozessen beteiligt (s. Kapitel 1). Um zu determinieren, welche PKC-Isoformen an der freien Fettsäure induzierten Apoptose von Endothel- und glatten Muskelzellen humaner Koronararterien eine Rolle spielen könnten, sollte zunächst das Proteinkinase C-Expressionsmuster in beiden Zelltypen mittels Western Blot Analyse untersucht werden. Ein Molekulargewichtsmarker lief mit und wurde markiert (s. Methoden), die Laufstrecken des Molekulargewichtsmarkers wurden ausgemessen und gegen das Molekulargewicht in kDa in einem Koordinatensystem aufgetragen. Anhand dessen wurde die Höhe ermittelt, auf der die jeweilige PKC-Isoform laufen müsste (In den Abbildungen mit Pfeilen markiert).

Von den klassischen PKCs (Einteilung der PKCs siehe Einleitung) konnten *PKC-alpha* und *-beta-1* im Western Blot sowohl in Endothelzellen als auch in glatten Muskelzellen humaner Koronararterien nachgewiesen werden (s. Abb. 16). Von den neuen PKCs wurden *PKC-delta* und *-epsilon* in beiden Zelltypen aufgezeigt (s. Abb. 17). Von den atypischen PKCs konnte *PKC-iota*, nicht jedoch *PKC-zeta* in beiden Zelltypen gefunden werden (s. Abb. 18).

EC = Endothelzellen humaner Koronararterien („Endothelial Cells“)

SMC = glatte Muskelzellen humaner Koronararterien („smooth muscle cells“)

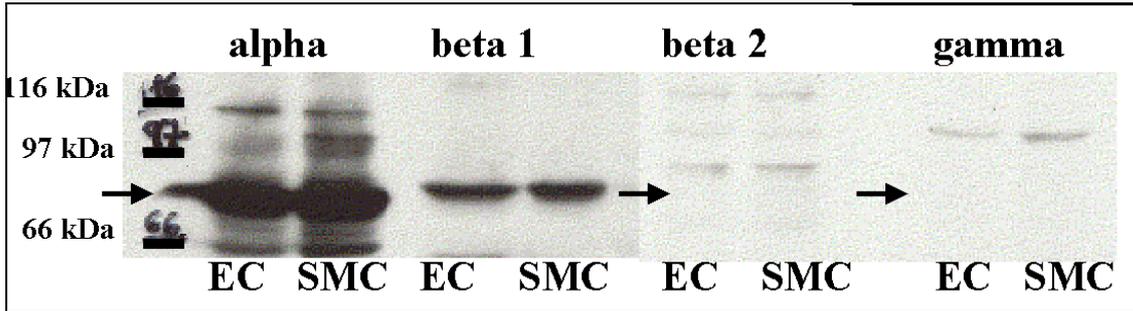


Abb. 16: Klassische PKCs in der Western Blot Analyse.

Nachweis von PKC-alpha (80 kDa) und -beta-1 (80 kDa).

Kein Nachweis von PKC-beta-2 (80 kDa) und -gamma (80 kDa).

Die Pfeile deuten an, auf welcher Höhe das jeweilige Isoenzym laufen sollte.

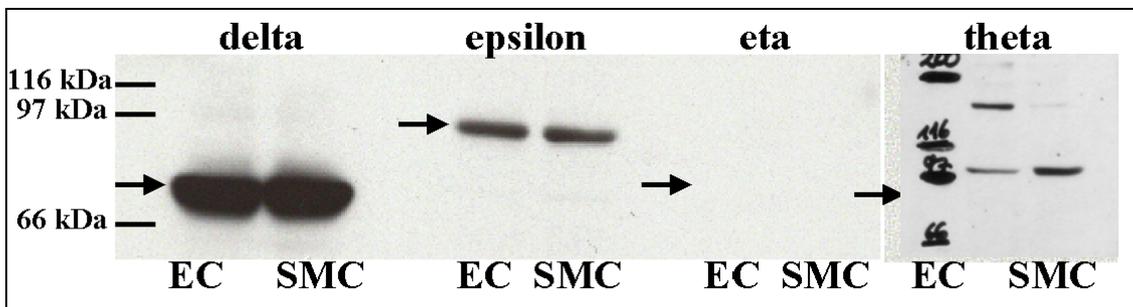


Abb. 17: Novel PKCs in der Western Blot Analyse.

Nachweis von PKC-delta (78 kDa) und PKC- epsilon (90 kDa).

Kein Nachweis von: PKC-eta (82 kDa) und PKC-theta (79 kDa).

Die Pfeile deuten an, auf welcher Höhe die jeweilige Isoform laufen sollte. Bei den bei PKC-theta sichtbaren Banden handelt es sich um unspezifische Signale.

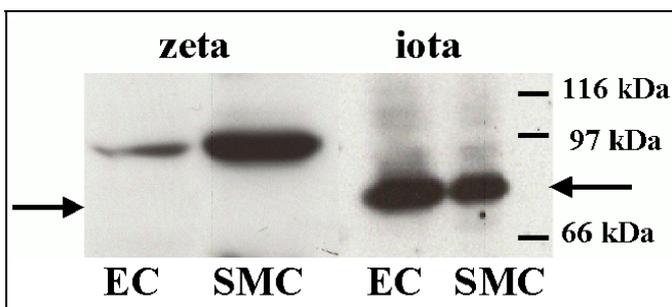


Abb. 18: Atypische PKCs in der Western Blot Analyse.

Nachweis von PKC-iota (74 kDa).

Kein Nachweis von PKC-zeta (72kDa).

Der Pfeil deutet an, auf welcher Höhe die Isoform etwa laufen sollte. Bei der etwa auf der Höhe von 97 kDalton laufenden Bande handelt es sich um ein unspezifisches Signal.

3.2.5 Nachweis von PKC-beta-2 in der RT- PCR

Im Gegensatz zum Western Blot konnte PKC-beta-2 in der PCR-Analyse sowohl in glatten Muskelzellen (Probe A) als auch in Endothelzellen (Probe B) humaner Koronararterien nachgewiesen werden.

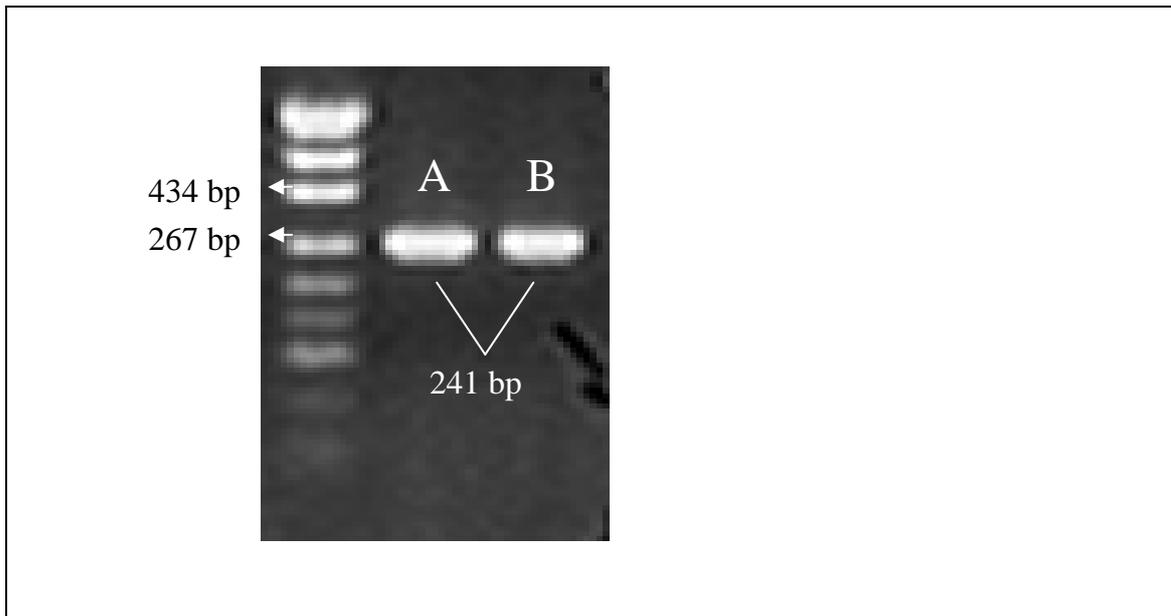


Abb. 19: Darstellung der PKC-beta-2 in Endothel (B) und glatten Muskelzellen (A) humaner Koronararterien im 2% Agarosegel

Sequenzvergleich mittels BLAST (s. Material und Methoden) ergab, dass die Sequenz des erhaltenen PCR Produktes identisch mit der in der Datenbank verzeichneten PKC-beta-2 cDNA Sequenz ist.

Herabregulierung der PKC durch Langzeitinkubation mit TPA

Anschließend wurde eine Langzeitinkubation mit TPA 100 nM und 500 nM (20 Stunden) durchgeführt. TPA ist ein Phorbolster, welcher Diacylglycerol, einem natürlichen Liganden und Aktivator der PKC, strukturverwandt ist. TPA aktiviert zunächst die PKC, Langzeitinkubation (> 12 Stunden) führt hingegen zu einer Herabregulierung der klassischen (PKC-alpha, -beta und -gamma) und neuen PKC-Isoformen (PKC-delta, -epsilon, -eta und -theta), nicht jedoch der atypischen (PKC-zeta und -iota). Die Herabregulierung der jeweiligen PKC-Isoformen diente als Nachweis der Spezifität der Banden.

Wie aus Abbildung 20 und 21 ersichtlich, führte die Inkubation der Endothel- und glatten Muskelzellen humaner Koronararterien für 20 Stunden sowohl in einer Konzentration von 100 nM als auch von 500 nM zu der Herabregulierung der nachgewiesenen klassischen PKC-Isoformen PKC-alpha und -beta-1, als auch der neuen PKC-Isoformen PKC-delta und -epsilon (s. Abb. 22 und 23). Die nachgewiesene atypische PKC-Isoform PKC-iota konnte wie erwartet durch Langzeitbehandlung der Zellen mit TPA nicht herabreguliert werden (vgl. Abb. 24).

EC = „Endothelial Cells“ = Endothelzellen humaner Koronararterien
SMC = „Smooth Muscle Cells“ = glatte Muskelzellen humaner Koronararterien

1 = basal (ohne Behandlung)
2 = TPA 100 nM, 20 Stunden Inkubation
3 = TPA 500 nM, 20 Stunden Inkubation

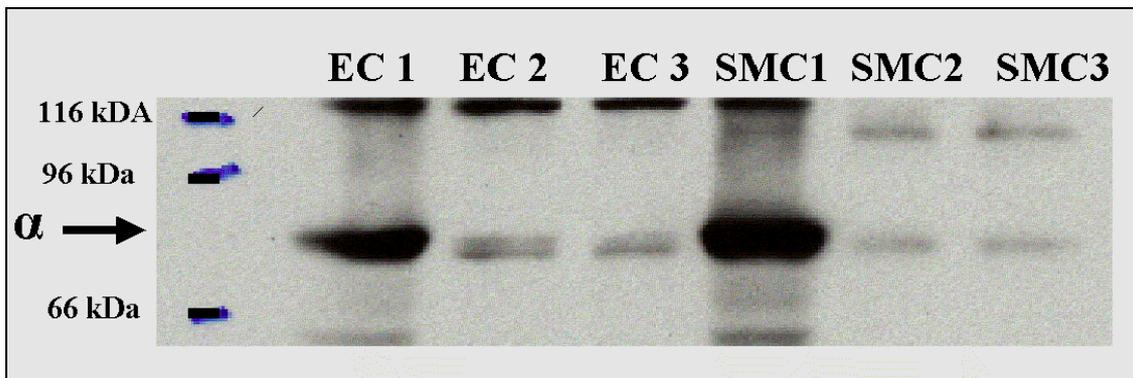


Abb. 20: PKC alpha (80 kDa) Herabregulierung, dargestellt in der Western Blot Analyse. Langzeitbehandlung (20 Stunden) Endothel- (EC) und glatter Muskelzellen (SMC) humaner Koronararterien mit Medium als Kontrolle (1), TPA 100 nM (2) und TPA 500 nM (3).

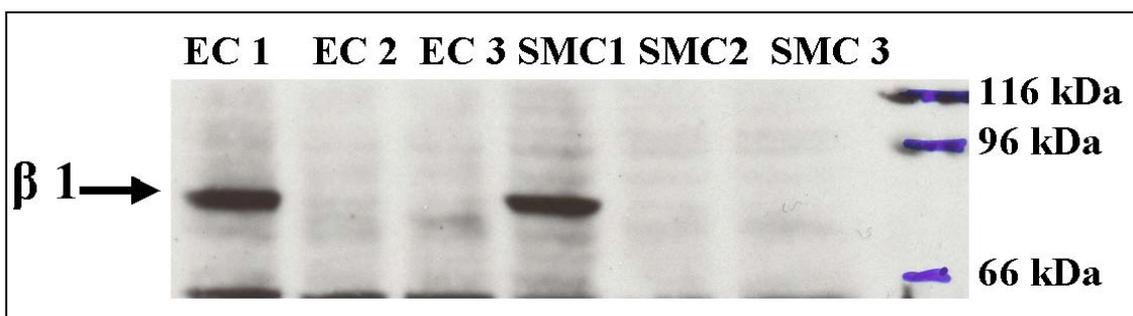


Abb. 21: PKC beta-1 (80 kDa) Herabregulierung, dargestellt in der Western Blot Analyse. Langzeitbehandlung (20 Stunden) der Endothel (EC)- und glatten Muskelzellen (SMC) humaner Koronararterien mit TPA 100 nM (2) und TPA 500 nM (3). Medium (1) als Kontrolle.

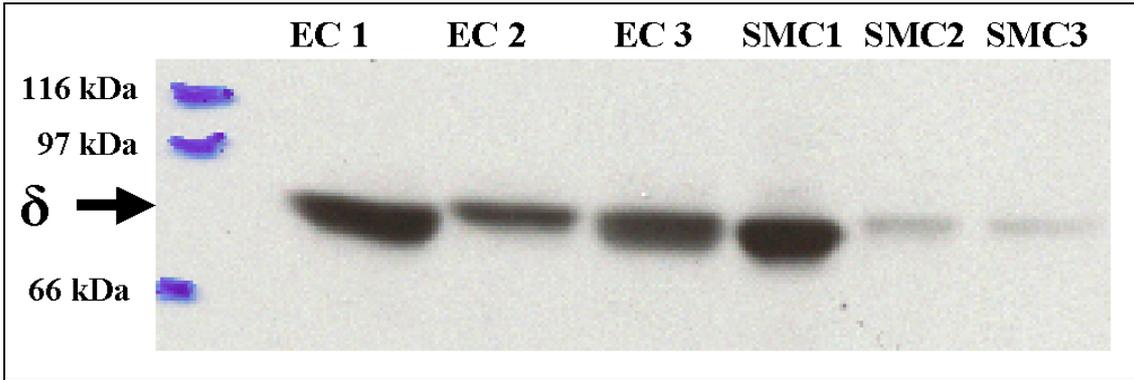


Abb. 22: PKC delta (80 kDa) Herabregulierung.

Dargestellt in der Western Blot Analyse. Langzeitbehandlung (20 Stunden) der Endothel-(EC) und glatten Muskelzellen (SMC) humaner Koronararterien mit Medium (1), TPA 100 nM (2) und TPA 500 nM (3).

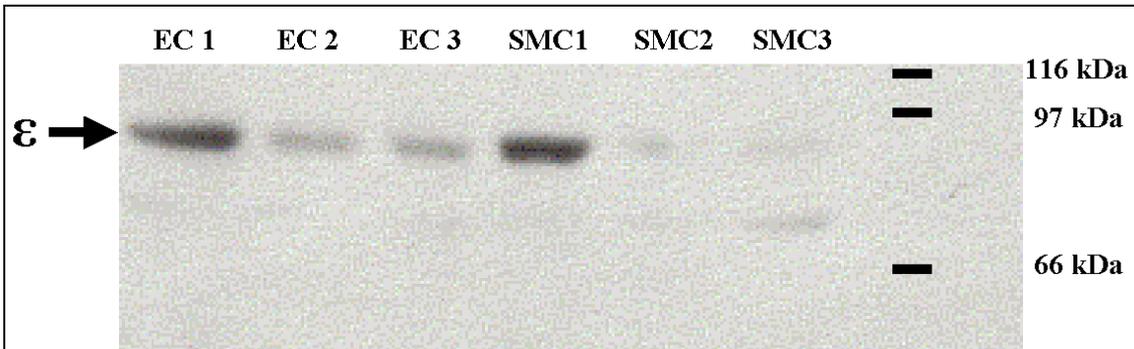


Abb. 23: PKC epsilon (90 kDa) Herabregulierung.

Dargestellt in der Western Blot Analyse. Langzeitbehandlung (20 Stunden) der Endothel (EC) – und glatten Muskelzellen (SMC) humaner Koronararterien mit Medium (1), TPA 100 nM (2) und TPA 500 nM (3).

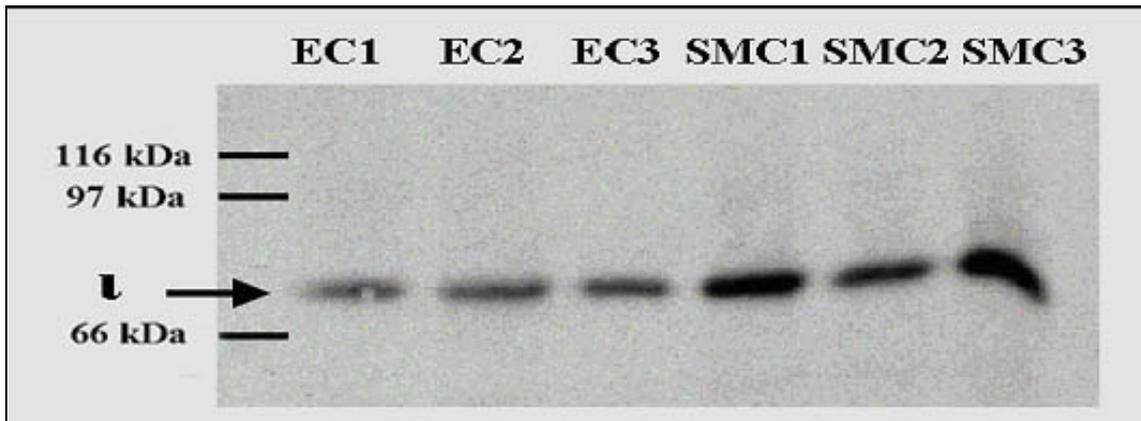


Abb. 24: PKC iota (74 kDa) Herabregulations-Versuch, dargestellt in der Western Blot Analyse.

Langzeitbehandlung (20 Stunden) Endothel- (EC) und glatter Muskelzellen (SMC) humaner Koronararterien mit Medium (1), TPA 100 nM (2) und TPA 500 nM (3).

3.2.6 Darstellung von PKC-Isoformen mittels konfokaler Laser-Mikroskopie

Um die Proteinkinase C-Isoformen in der Zelle zu visualisieren und zu lokalisieren, wurde die konfokale Laser-Mikroskopie angewandt.

Mit Antikörpern gegen Proteinkinase C-Isoformen wurden Immunreaktionen an Endothelzellen humaner Koronararterien durchgeführt. Als Kontrollreaktionen wurden die Zellen in gleicher Weise behandelt, jedoch mit dem Unterschied, dass (1) keine Inkubation mit Primärantikörpern stattfand und (2) eine Inkubation mit TPA in einer Konzentration von 500 nM über 20 Stunden (Herabregulation der PKC) durchgeführt wurde.

Abbildung 25 zeigt die Verteilung der Proteinkinase C-alpha - als Vertreter der klassischen PKCs - im Zytoplasma der HCA-E-Zellen. In der Negativkontrolle blieb eine Immunreaktion aus. Langzeitinkubation (s. Abb. 26) zeigte die Spezifität des Antikörpers, denn durch die Langzeitinkubation der Zellen mit TPA wird die PKC vermindert in der Zelle synthetisiert, so dass sie durch den Antikörper nicht mehr anfärbbar ist.

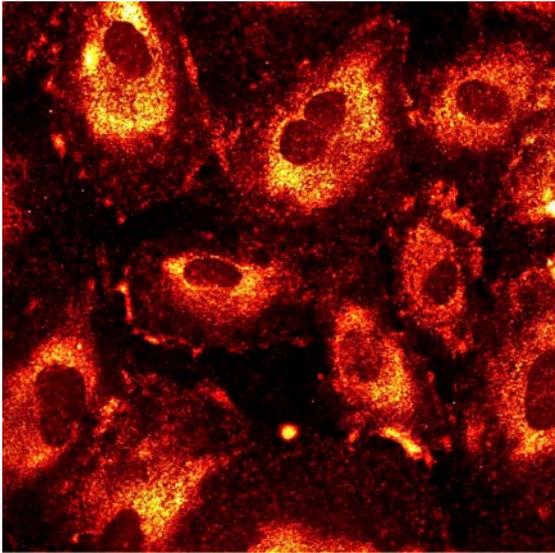


Abb. 25: PKC-alpha in HCA-E-Zellen.
Dargestellt mittels konfokaler Laser-Mikroskopie.

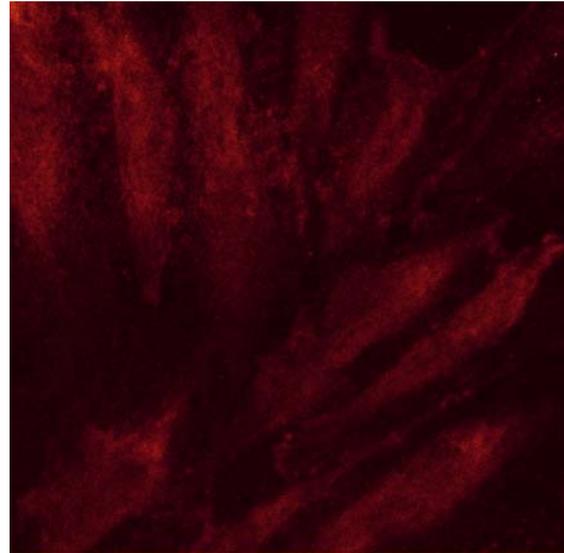


Abb. 26: Langzeitinkubation (20 Std) von HCA-E-Zellen mit TPA 500 nM
Dargestellt mittels konfokaler Laser-Mikroskopie

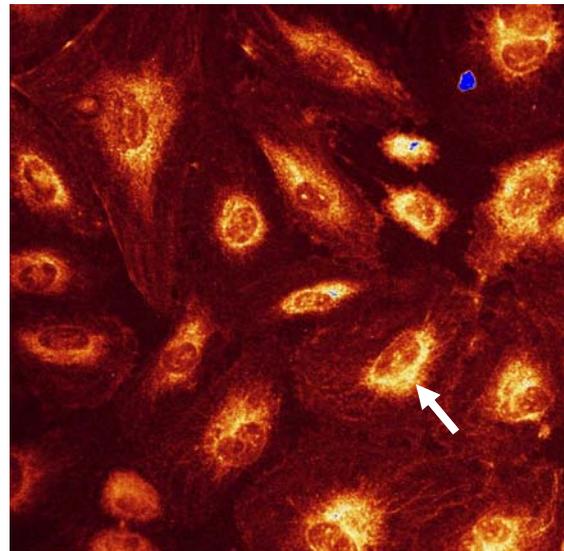
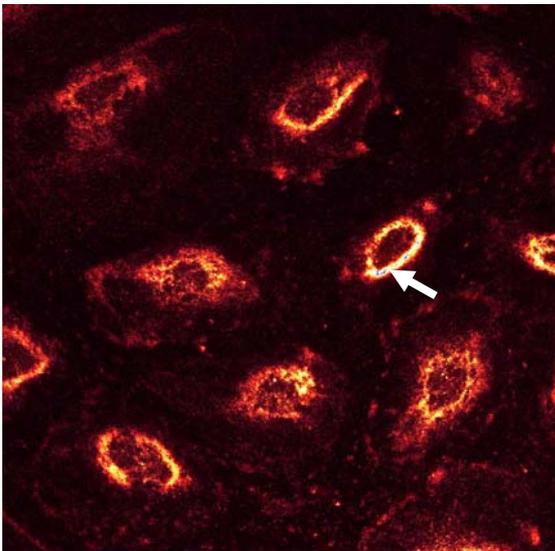


Abb. 27: PKC delta in Endothelzellen humaner Koronararterien, dargestellt mittels konfokaler Laser-Mikroskopie.

Die Immunreaktion befindet sich hauptsächlich perinukleär und im Zytoplasma der HCA-E-Zellen.

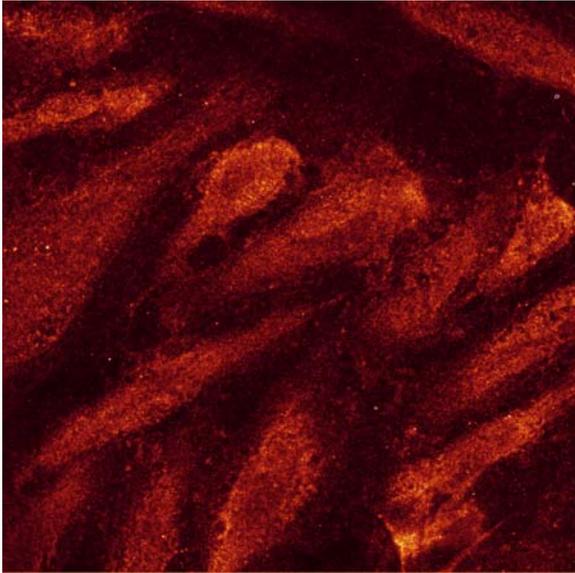
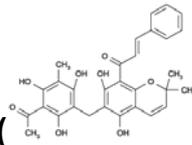


Abb. 28: Langzeitinkubation (20 Std.) von HCA-E-Zellen mit TPA 500nM. Dargestellt mittels konfokaler Laser-Mikroskopie. Keine Immunreaktion von PKC-delta mehr nachweisbar.

PKC-delta – als Vertreter der neuen PKCs - ist wie in Abbildung 27 sichtbar, hauptsächlich perinukleär lokalisiert. Bei der Kontrolle nur mit Sekundärantikörper blieb die Immunreaktion aus. Die fehlende Immunreaktion nach der Herabregulierung der PKC-delta-Synthese durch Langzeitinkubation mit TPA 500 nM sprach für die Spezifität des Antikörpers (s. Abb. 28).

3.3 Effekte von verschiedenen Inhibitoren auf die Apoptose von Endothelzellen und glatten Muskelzellen humaner Koronararterien

Um festzustellen, ob die Proteinkinase C an der (Lipo-) Apoptose von Endothelzellen und glatten Muskelzellen humaner Koronararterien beteiligt sein könnte, wurden verschiedene PKC-Inhibitoren eingesetzt.



3.3.1 Effekte von Rottlerin ($C_{30}H_{28}O_8$) auf die Lipo-Apoptose von Endothel- und glatten Muskelzellen humaner Koronararterien

Zunächst wurde Rottlerin eingesetzt, ein PKC-Inhibitor, welcher die Aktivität von PKC-delta mehr als die von PKC-alpha, -beta, -epsilon, -zeta und -eta blockiert. Die Zellen wurden 30 Minuten mit Rottlerin in den Konzentrationen 1 $\mu\text{mol/l}$, 5 $\mu\text{mol/l}$, 7,5 $\mu\text{mol/l}$ und 15 $\mu\text{mol/l}$ bzw. mit Medium („Kontrolle“) behandelt, bevor sie dann 24 Stunden bei 37°C mit den gesättigten Fettsäuren Palmitat und Stearat bzw. mit Medium als Kontrolle („basal“) inkubierten. Die apoptotischen Zellen wurden nach Behandlung mit Fettsäuren und Rottlerin mithilfe der Zellzyklus-Analyse (s. Kap. 2.2.3) ermittelt.

3.3.1.1 Effekte von Rottlerin auf die Lipo-Apoptose von Endothelzellen humaner Koronararterien

Wie in Tabelle 9 und Abbildung 29 dargestellt, bestand ein Trend, dass Rottlerin in einer Konzentration von 1 $\mu\text{mol/l}$ und in einer Konzentration von 5 $\mu\text{mol/l}$ die basale Apoptoserate der Endothelzellen humaner Koronararterien verringert (Rottlerin 1 $\mu\text{mol/l}$: $n = 4$ und $p = 0,11$ im Rangsummentest; Rottlerin 5 $\mu\text{mol/l}$: $n = 4$, $p = 0,19$ im t-Test für ungepaarte Stichproben). Rottlerin 7,5 $\mu\text{mol/l}$ und 15 $\mu\text{mol/l}$ beeinflussten die basale Apoptoserate der Endothelzellen hingegen nicht signifikant. Rottlerin nahm in keiner der eingesetzten Konzentrationen einen statistisch signifikanten Einfluss auf die Lipo-Apoptose von Endothelzellen humaner Koronararterien.

Tabelle 9: Effekte von Rottlerin auf die Lipoapoptose von Endothelzellen humaner Koronararterien.

Die Zellen wurden 30 min mit Rottlerin 1 µmol/l, 5 µmol/l, 7,5 µmol/l und 15 µmol/l inkubiert vor Zugabe der gesättigten Fettsäuren Palmitat und Stearat für weitere 24 Stunden. Dargestellt sind die Mittelwerte des mittels Durchflusszytometrie ermittelten Prozentanteils apoptotischer Zellen in der analysierten Zellfraktion ± dem Standard error of the mean. n ≥ 3

	Kontrolle	+ Rottlerin 1	+ Rottlerin 5	+ Rottlerin7,5	+Rottlerin 15
Basal	9,88 ± 4,00	4,02 ± 1,19	4,37 ± 0,99	7,61 ± 3,40	13,47 ± 3,76
Palmitat	16,95 ± 6,33	15,73 ± 4,84	14,16 ± 5,12	9,91 ± 2,69	13,43 ± 4,73
Stearat	40,92± 12,35	42,13 ±11,44	36,72 ± 10,06	42,10 ± 10,71	43,39 ±12,75

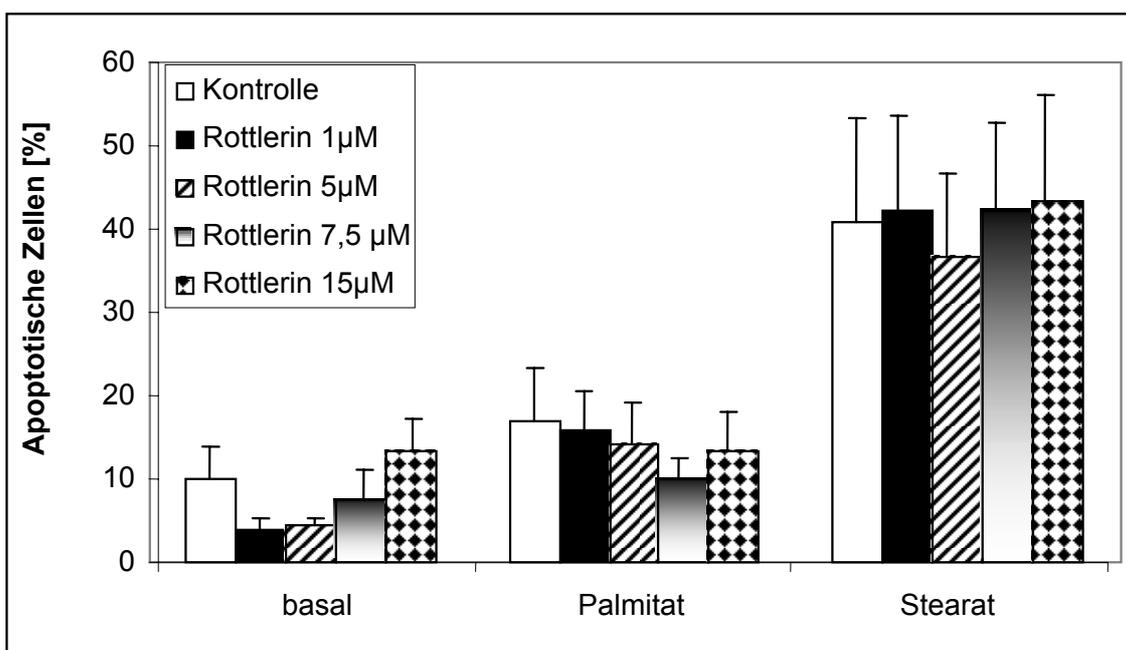


Abb. 29: Effekte von Rottlerin auf die (Lipo-) Apoptose von Endothelzellen humaner Koronararterien.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler der mittels Durchflußzytometrie ermittelten apoptotischen Zellen in Prozent der Gesamtzellzahl. n = 3

3.3.1.2 Effekte von Rottlerin auf die Lipo- Apoptose von glatten Muskelzellen humaner Koronararterien

Die *basale Apoptose* von glatten Muskelzellen humaner Koronararterien wurde durch Rottlerin 1 $\mu\text{mol/l}$ signifikant erniedrigt ($n = 3$, $p = 0,03$ im T-Test für ungepaarte Stichproben). Rottlerin 5 $\mu\text{mol/l}$, 7,5 $\mu\text{mol/l}$ und 15 $\mu\text{mol/l}$ beeinflussten die basale Apoptoserate jedoch nicht statistisch signifikant.

Die *durch Palmitat induzierte Apoptose* wurde von Rottlerin in den Konzentrationen 7,5 $\mu\text{mol/l}$ und 15 $\mu\text{mol/l}$ signifikant erhöht ($n = 3$, $p = 0,03$ und $p = 0,02$ im T-Test für ungepaarte Stichproben), nicht jedoch in den Konzentrationen 1 $\mu\text{mol/l}$ und 5 $\mu\text{mol/l}$.

Die *durch Stearat induzierte Apoptose* wurde durch Rottlerin in keiner der eingesetzten Konzentrationen statistisch signifikant beeinflusst.

Tabelle 10: Effekt von Rottlerin auf die Apoptose von glatten Muskelzellen humaner Koronararterien.

Die Zellen wurden 30 min mit Rottlerin 1 $\mu\text{mol/l}$, 5 $\mu\text{mol/l}$, 7,5 $\mu\text{mol/l}$ und 15 $\mu\text{mol/l}$ inkubiert vor Zugabe von Palmitat bzw. Stearat für weitere 24 Stunden. Dargestellt sind die Mittelwerte der mittels Zellzyklusanalyse ermittelten apoptotischen Zellen in Prozent der Gesamtzellzahl \pm Standard error of the mean. $n = 3$

	Kontrolle	+ Rottlerin 1	+ Rottlerin 5	+Rottlerin 7,5	+Rottlerin 15
Basal	1,63 \pm 0,13	0,88 \pm 0,19	1,53 \pm 0,21	1,61 \pm 0,48	2,65 \pm 0,79
Palmitat	4,12 \pm 0,57	4,67 \pm 0,51	6,31 \pm 0,78	7,92 \pm 0,99	8,98 \pm 1,17
Stearat	14,23 \pm 2,52	13,01 \pm 2,32	14,71 \pm 1,05	15,69 \pm 1,14	20,98 \pm 5,43

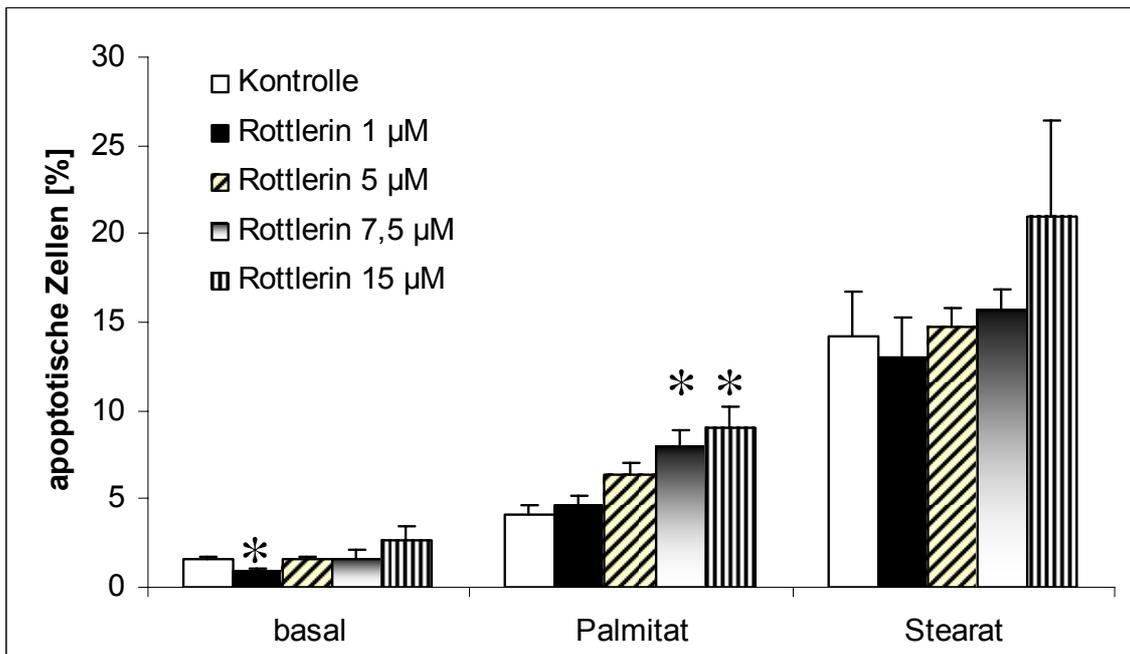


Abb. 30: Effekte von Rottlerin auf die (Lipo-) Apoptose von glatten Muskelzellen humaner Koronararterien.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler der mittels Zellzyklus-Analyse ermittelten apoptotischen Zellen in Prozent der Gesamtzellzahl. n = 3. Signifikanzen sind mit Sternen gekennzeichnet (*p<0,05)

3.3.2 Effekte von Bis-Indolyl-Maleimid auf die Lipo-Apoptose von Endothel- und glatten Muskelzellen humaner Koronararterien

Bis-Indolyl-Maleimid ist ein hochspezifischer, zellpermeabler Proteinkinase C-Inhibitor mit hoher Affinität zu PKC-alpha, -beta, -gamma, -delta, und -epsilon. Die Zellen wurden 30 Minuten mit Bis-Indolyl-Maleimid in den Konzentrationen 100 nmol/l, 500 nmol/l und 1000 nmol/l bzw. mit Medium („Kontrolle“) behandelt, bevor sie 24 Stunden bei 37°C mit den gesättigten Fettsäuren Palmitat und Stearat bzw. nur mit Medium („basal“) inkubierten. Anschließend wurde der Prozentanteil apoptotischer Zellen in der analysierten Zellfraktion mittels Durchflusszytometrie (s. Kap. 2.2.3) ermittelt.

3.3.2.1 Effekte von Bis-Indolyl-Maleimid auf die Lipo-Apoptose von Endothelzellen humaner Koronararterien

Es zeigte sich ein Trend, dass Bis-Indolyl-Maleimid in einer Konzentration von 100 nmol/l vor der basalen Apoptose von Endothelzellen humaner Koronararterien schützt (n = 4, p = 0,08 im T-Test für ungepaarte Stichproben). Es bestanden jedoch keine statistisch signifikanten Effekte von Bis-Indolyl-Maleimid in den eingesetzten Konzentrationen 100 nmol/l, 500 nmol/l und 1000 nmol/l auf die basale Apoptose und die Lipoapoptose von HCA-ECs (vgl. Tabelle 11 und Abb. 31)

Tabelle 11: Effekte von Bis-Indolyl-Maleimid auf die Lipoapoptose von Endothelzellen humaner Koronararterien.

Die Zellen wurden 30 Minuten mit Bis-Indolyl-Maleimid („BIS“) in den Konzentrationen 100 nM, 500 nM und 1000 nM inkubiert vor Zugabe der gesättigten Fettsäuren Palmitat und Stearat für weitere 24 Stunden. Dargestellt sind die Mittelwerte der mittels Durchflusszytometrie ermittelten apoptotischen Zellen in Prozent der Gesamtzellzahl in der analysierten Zellfraktion \pm standard error of the mean. n = 4.

	Kontrolle	+ BIS 100 nM	+ BIS 500 nM	+ BIS 1000 nM
Basal	2,92 \pm 0,20	2,28 \pm 0,22	2,51 \pm 0,55	2,47 \pm 0,34
Palmitat	6,33 \pm 0,50	7,58 \pm 1,65	6,49 \pm 0,48	7,07 \pm 1,01
Stearat	15,41 \pm 1,40	16,18 \pm 1,52	15,76 \pm 1,32	15,71 \pm 1,44

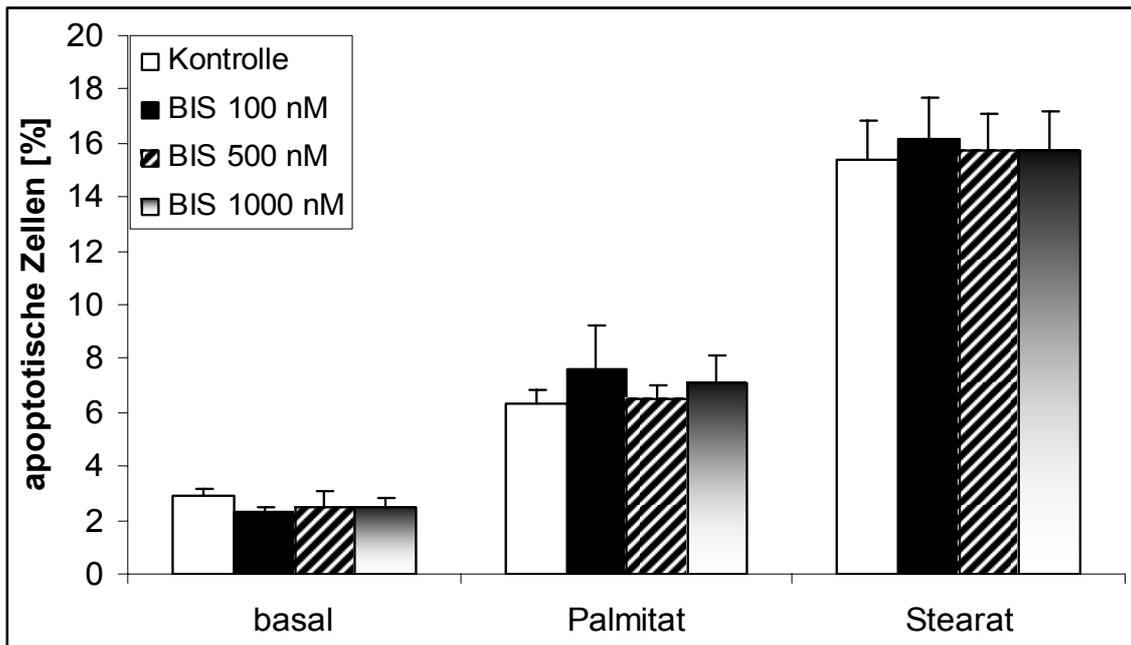


Abb. 31: Effekte von Bis-Indolyl-Maleimid auf die (Lipo-) Apoptose von Endothelzellen humaner Koronararterien.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler der mittels Zellzyklusanalyse ermittelten apoptotischen Zellen in Prozent der Gesamtzellzahl. n = 4

3.3.2.2 Effekte von Bis-Indolyl-Maleimid auf die Lipo-Apoptose von glatten Muskelzellen humaner Koronararterien

Weder die basale, noch die durch Palmitat und Stearat induzierte Apoptose glatter Muskelzellen humaner Koronararterien wurde durch Bis-Indolyl-Maleimid in den Konzentrationen 100 nmol/l und 500 nmol/l statistisch signifikant beeinflusst (vgl. Tabelle 12 und Abb. 32).

Tabelle 12: Effekte von Bis-Indolyl-Maleimid auf die (Lipo-) Apoptose von glatten Muskelzellen humaner Koronararterien.

Die Zellen wurden 30 min mit Bis-Indolyl-Maleimid („BIS“) in den Konzentrationen 100 nM, 500 nM und 1000 nM inkubiert vor Zugabe der Fettsäuren (1mM) für weitere 24 Stunden. Dargestellt sind die mittels Zellzyklusanalyse ermittelten apoptotischen Zellen in Prozent der Gesamtzellzahl in der analysierten Zellfraktion \pm standard error of the mean. n = 4

	Kontrolle	+ BIS 100 nM	+ BIS 500 nM
Basal	1,13 \pm 0,26	0,94 \pm 0,05	0,87 \pm 0,19
Palmitat	3,17 \pm 0,60	2,93 \pm 0,29	4,04 \pm 1,68
Stearat	10,47 \pm 2,34	8,40 \pm 2,11	9,38 \pm 2,05

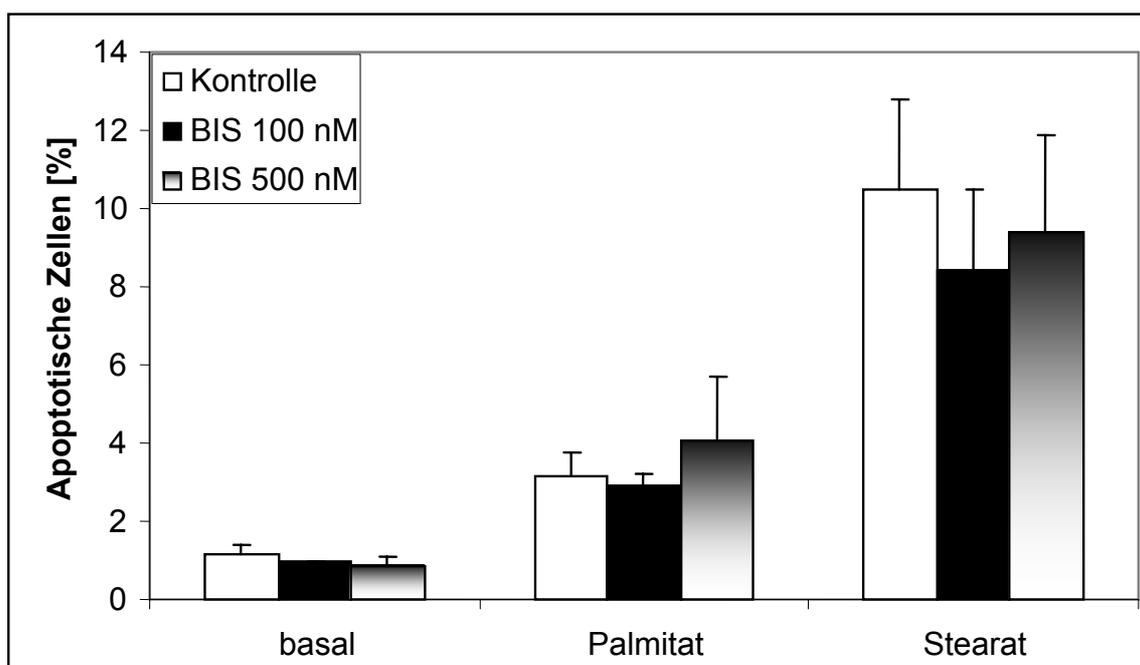


Abb. 32: Effekte von Bis Indolyl Maleimid („BIS“) auf die Lipoapoptose von Muskelzellen humaner Koronararterien.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler der mittels Zellzyklus-Analyse ermittelten apoptotischen Zellen in Prozent der Gesamtzellzahl. n = 4

3.3.3 Effekte einer Langzeitinkubation mit Tetra-Decanoyl-Phorbol-13-Acetat (TPA) auf die Lipo-Apoptose von Endothel- und glatten Muskelzellen humaner Koronararterien

12-o-Tetra-Decanoyl-Phorbol-13-Acetat (TPA) ist ein Phorbol-ester, welcher Diacylglycerol (DAG), einem natürlichen Liganden und Aktivator der PKC, strukturell verwandt ist. TPA aktiviert die klassischen und neuen PKC Isoenzyme. Langzeitinkubation (> 12 Stunden) führt hingegen zur Herabregulierung der klassischen (PKC-alpha, -beta und -gamma) und neuen (PKC-delta, -epsilon, -eta und -theta) PKC-Isoformen.

Die Zellen wurden 20 Stunden mit TPA in einer Konzentration von 500 nmol/l bzw. mit Medium („Kontrolle“) bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die gesättigten Fettsäuren Palmitat und Stearat bzw. als Kontrolle Medium („basal“) hinzugefügt und für weitere 24 Stunden bei 37°C inkubiert.

In Tabelle 13 und Abbildung 33 sind die Mittelwerte der mittels Zellzyklus-Analyse ermittelten apoptotischen Zellen in der analysierten Endothel-Zellfraktion vierer Stichproben dargestellt, in Tabelle 14 und Abbildung 34 in der analysierten glatten Muskel-Zellfraktion.

3.3.3.1 Effekte einer Langzeitinkubation mit Tetra-Decanoyl-Phorbol-Acetat (TPA) auf die Lipo-Apoptose von Endothelzellen humaner Koronararterien

Langzeitbehandlung (20 Stunden) der Endothelzellen mit TPA in einer Konzentration von 500 nmol/l verringerte sowohl die basale (n = 4, p = 0,003 im T-Test für ungepaarte Stichproben) als auch die durch Palmitat induzierte Apoptoserate signifikant (n = 4, p = 0,03 im T-Test für ungepaarte Stichproben). Auf die durch Stearat induzierte Apoptose bestand kein statistisch signifikanter Effekt (vgl. Tabelle 13 und Abbildung 33 und 34).

Tabelle 13: Effekte einer Langzeitinkubation mit Tetra-Decanoyl-Phorbol-Acetat (TPA) auf die Lipoapoptose von Endothelzellen humaner Koronararterien.

Die Zellen wurden 20 Stunden mit TPA 500 nM inkubiert vor Zugabe der Fettsäuren für weitere 24 Stunden. Dargestellt sind die Mittelwerte der mittels Zellzyklusanalyse ermittelten apoptotischen Zellen in Prozent der Gesamtzellzahl in der analysierten Zellfraktion \pm Standard error of the mean. n = 4

	Kontrolle	+ TPA 500 nM
Basal	7,44 \pm 0,71	1,25 \pm 0,35
Palmitat	12,14 \pm 0,33	7,70 \pm 1,42
Stearat	26,65 \pm 0,71	25,26 \pm 3,42

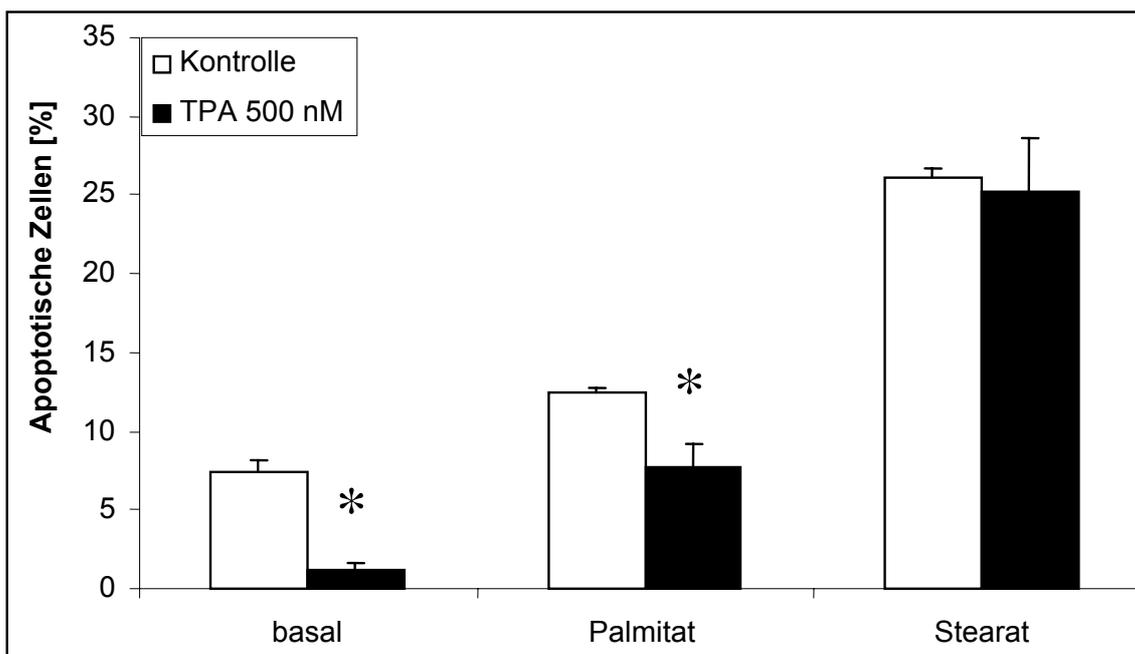


Abb. 33: Effekt einer Langzeitinkubation mit TPA 500 nM auf die Apoptose von Endothelzellen humaner Koronararterien.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler der mittels Durchflusszytometrie ermittelten apoptotischen Zellen in Prozent der Gesamtzellzahl. n = 4 (* p < 0,05)

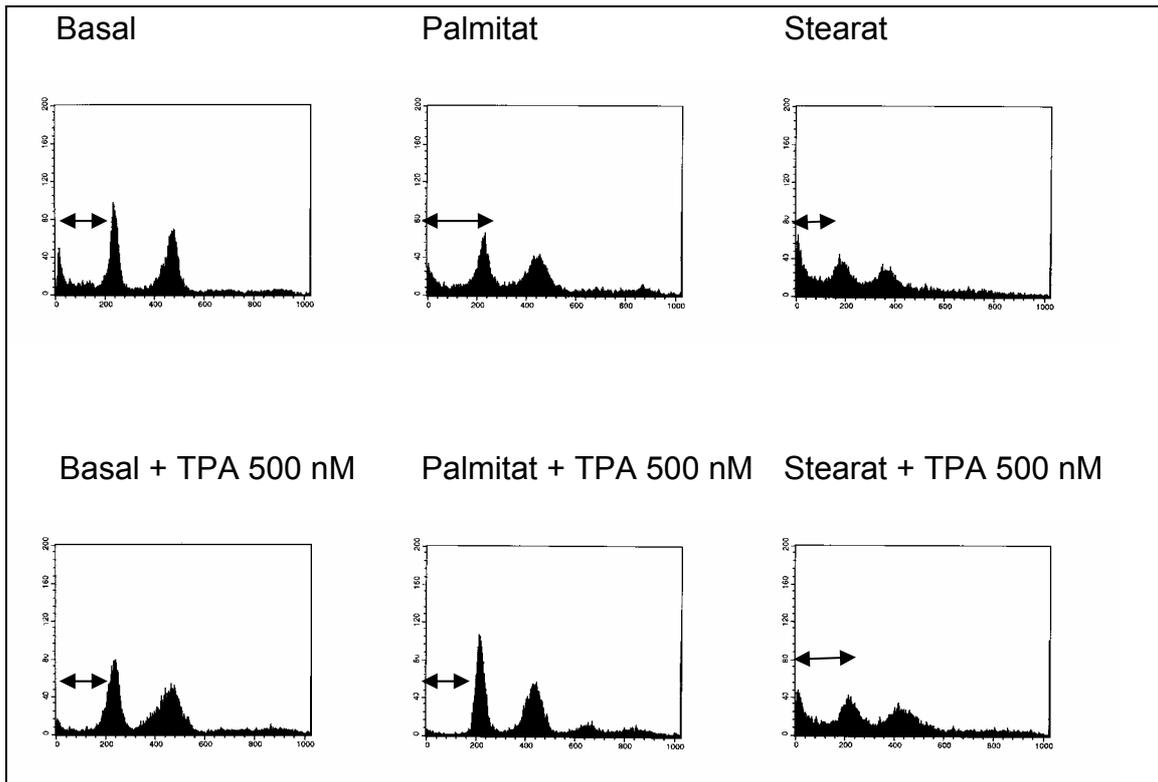


Abb. 34: Analyse des Zellzyklus von Endothelzellen humaner Koronararterien nach Behandlung mit Fettsäuren (1 mM, 24 Stunden) und zusätzlicher Langzeitinkubation mit TPA (500 nM, 20 Stunden).

Die Pfeile markieren die Sub-G1-Fraktion. (s. Kap. 2.2.3)

3.3.3.2 Effekte einer Langzeitinkubation mit Tetra-Decanoyl-Acetat (TPA) auf die Lipo-Apoptose von glatten Muskelzellen humaner Koronararterien

Weder die basale, noch die durch Palmitat und Stearat induzierte Apoptose glatter Muskelzellen humaner Koronararterien wurden durch Langzeit-Behandlung mit TPA 500 nM statistisch signifikant beeinflusst (vgl. Tabelle 14 und Abbildung 35).

Tabelle 14: Effekte einer Langzeitbehandlung mit Tetra-Decanoyl-Phorbol-Acetat (TPA) auf die Lipo-Apoptose von glatten Muskelzellen humaner Koronararterien.

Die Zellen wurden 20 Stunden mit TPA 500 nM inkubiert vor Zugabe der Fettsäuren (1mM) für weitere 24 Stunden. Dargestellt sind die Mittelwerte des mittels Durchflusszytometrie gemessenen Prozentanteiles apoptotischer Zellen in der analysierten Zellfraktion \pm Standard error of the mean. n = 5

	Kontrolle	+ TPA 500 nM
Basal	6,06 \pm 2,42	3,40 \pm 1,63
Palmitat	9,01 \pm 3,66	8,18 \pm 3,96
Stearat	21,09 \pm 3,77	16,90 \pm 4,42

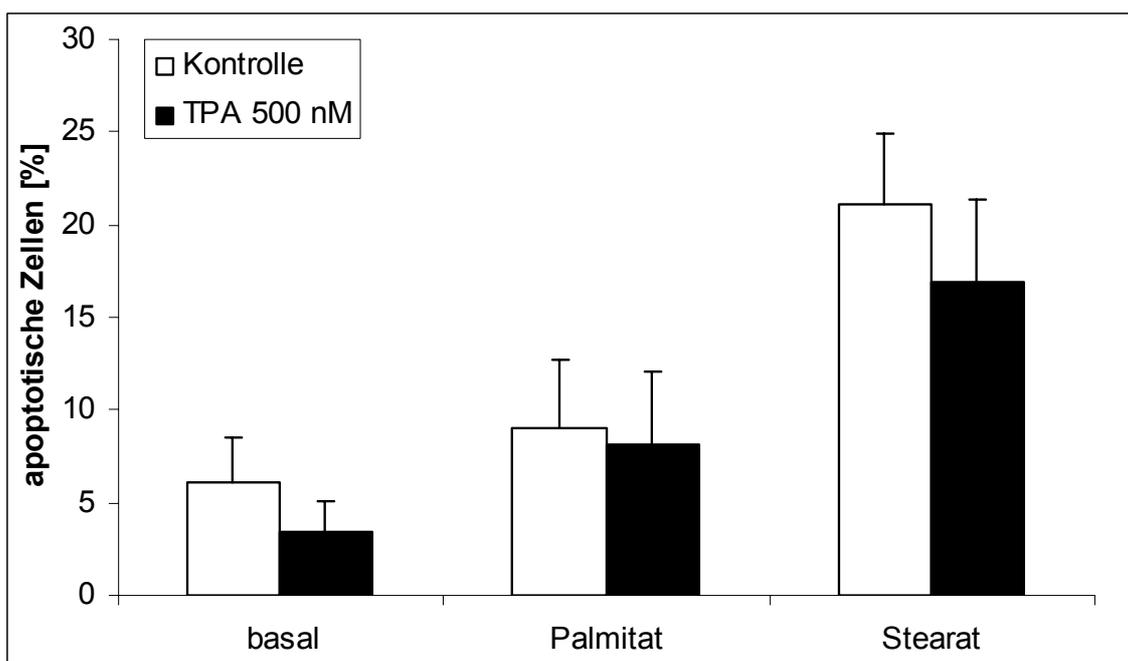


Abb. 35: Effekte einer Langzeitbehandlung (20 Stunden) mit TPA 500 nM auf die Apoptose von glatten Muskelzellen humaner Koronararterien.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler der mittels Zellzyklusanalyse ermittelten apoptotischen Zellen in Prozent der Gesamtzellzahl. n = 5

3.3.3.3 Effekte einer Langzeitinkubation mit Tetra-Decanoyl-Phorbol-Acetat (TPA) auf das Zellüberleben von glatten Muskelzellen humaner Koronararterien

Glatte Muskelzellen humaner Koronararterien wurden 20 Stunden mit TPA 100 nmol/l und TPA 500 nmol/l bzw. nur mit Medium als „Kontrolle“ bei 37°C inkubiert. Anschließend inkubierten die vorbehandelten Zellen weitere 24 Stunden bei 37°C mit den gesättigten Fettsäuren Palmitat und Stearat, der ungesättigten Fettsäure Linoleat bzw. nur mit Medium („basal“). Die vitalen Zellen wurden mittels Propidiumiodid/Annexin-Doppelfärbung-Durchfluss-Zytometrie ermittelt und in Tabelle 15 und Abbildung 36 dargestellt.

Tabelle 15: Effekt einer Langzeitinkubation mit Tetra-Decanoyl-Phorbol-Acetat (TPA) auf die Vitalität von glatten Muskelzellen humaner Koronararterien.

Die Zellen wurden 20 Stunden mit TPA 100 nmol/l bzw. 500 nmol/l inkubiert vor Zugabe von Palmitat, Stearat oder Linoleat für weitere 24 Stunden. Dargestellt sind die Mittelwerte des mittels Propidiumiodid/Annexin-Doppelfärbung-Durchflusszytometrie ermittelten Prozentanteiles vitaler Zellen in der analysierten Zellfraktion ± Standard error of the mean. n = 3

	Kontrolle	TPA 100 nM	TPA 500 nM
Basal	96,51 ± 0,55	96,51 ± 0,75	94,93 ± 0,77
Palmitat	87,12 ± 1,30	81,90 ± 0,73	81,01 ± 2,27
Stearat	47,76 ± 8,06	33,12 ± 0,98	44,75 ± 3,71
Linoleat	90,38 ± 0,71	76,73 ± 3,28	85,87 ± 3,06

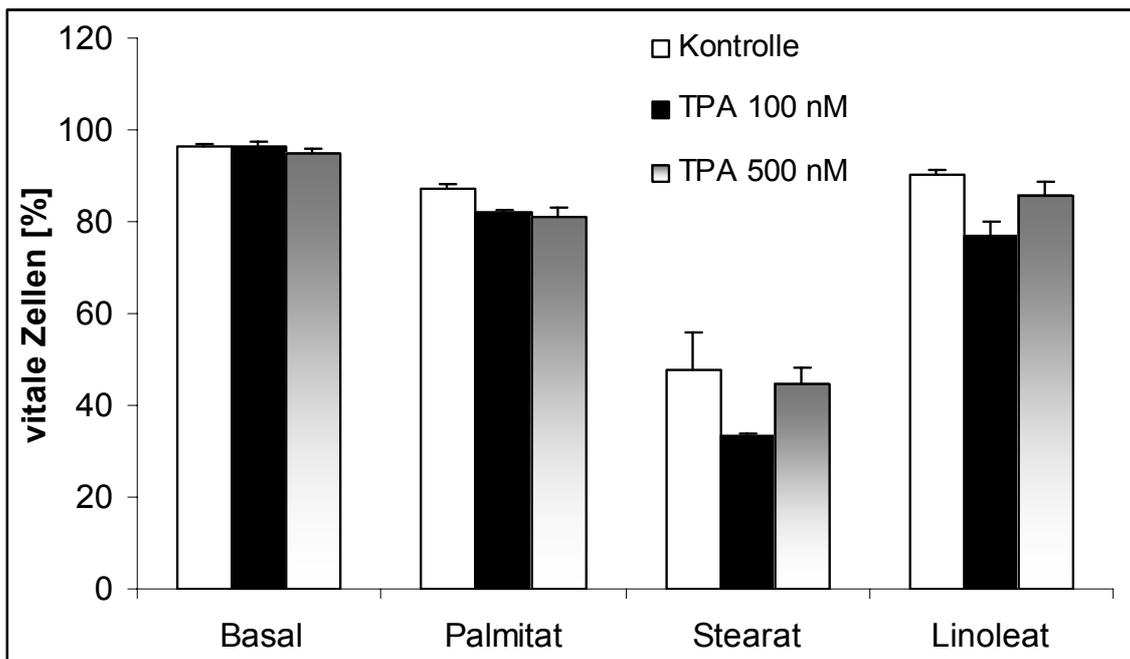


Abb. 36: Effekt einer Langzeitbehandlung glatter Muskelzellen humaner Koronararterien mit Tetra-Decanoyl-Phorbol-Acetat (TPA) 100 nM und 500 nM auf das Zellüberleben ohne („basal“) und mit Fettsäurebehandlung.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler des mittels Propidiumiodid/Annexin-Durchflusszytometrie ermittelten Prozentanteiles vitaler Zellen in der analysierten Zellfraktion. n = 3

Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied im Zellüberleben mit und ohne Vorbehandlung mit TPA 100 nmol/l und TPA 500 nmol/l (vgl. Tabelle 15 und Abbildung 36).

Diese Ergebnisse korrelieren mit der oben dargestellten Analyse der apoptotischen Zellen nach Langzeitinkubation mit TPA (vgl. Kap. 3.3.3.2).

3.3.4 Effekte von Proteinkinase C-Zeta-Pseudosubstrat auf die Lipo-Apoptose von Endothelzellen humaner Koronararterien

Um zu determinieren, ob die Proteinkinase C- ι an der Lipo-Apoptose von Endothelzellen humaner Koronararterien beteiligt sein könnte, wurde ein myristoyliertes Proteinkinase C-Zeta-Pseudosubstrat eingesetzt, dessen Aminosäuresequenz (Myr-Ser-Ile-Tyr-Arb-Arg-Gly-Ala-Arg-Arg-Trp-Arg-Lys-Leu-OH) sowohl in der Proteinkinase C-Zeta als auch - ι vorkommt und also beide Isoformen blockiert.

Die Zellen wurden 45 Minuten mit 1,5 mM Proteinkinase C-Zeta- Pseudosubstrat inkubiert, vor Zugabe der Fettsäuren für weitere 24 Stunden. Anschließend wurden die Zellen der Zellzyklusanalyse zugeführt und der Anteil apoptotischer Zellen [%] der analysierten Zellfraktion ermittelt. Die Mittelwerte mit Standard error of the mean fünfer unabhängiger Versuche wurden in Tabelle 13 und Abbildung 37 dargestellt.

Tabelle 13: Effekte von Proteinkinase C-Zeta-Pseudosubstrat auf die (Lipo-) Apoptose von Endothelzellen humaner Koronararterien.

Die Zellen wurden mit PKC-Zeta-Pseudosubstrat 45 min inkubiert vor Zugabe der Fettsäuren für weitere 24 Stunden. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung der mittels Zellzyklusanalyse ermittelten apoptotischen Zellen in Prozent der Gesamtzellzahl in der analysierten Zellfraktion. n = 5.

	Kontrolle	PKC-Zeta-Pseudosubstrat
Basal	11,46 ± 5,17	9,70 ± 2,86
Palmitat	29,77 ± 8,22	8,86 ± 0,85
Stearat	38,57 ± 4,67	14,14 ± 2,51

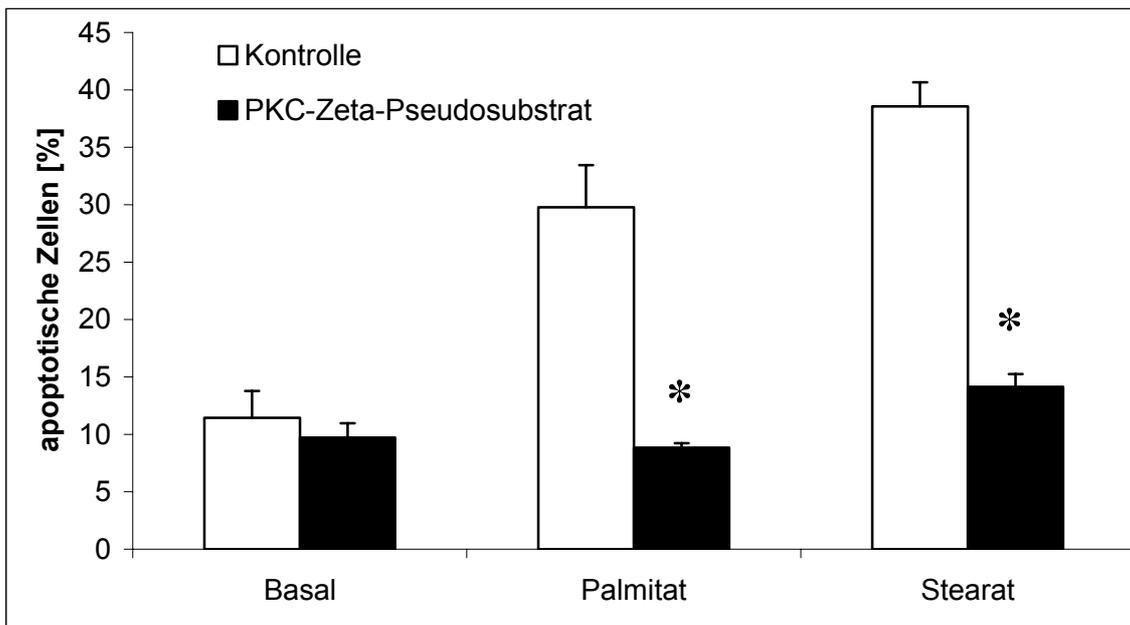


Abb. 37: Effekte von PKC-Zeta-Pseudosubstrat auf die Lipo-Apoptose von Endothelzellen humaner Koronararterien.

Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standard error of the mean der mittels Zellzyklusanalyse ermittelten apoptotischen Zellen in Prozent der Gesamtzellzahl in der analysierten Zellfraktion. (* = $p < 0,05$) $n = 5$.

PKC-Zeta-Pseudosubstrat verringerte sowohl die durch Palmitat als auch die durch Stearat induzierte Apoptoserate signifikant ($n = 5$; p (Palmitat) = 0,0005; p (Stearat) = 0,000007).

4 Diskussion

4.1 Apoptose, Dyslipidämie und Atherosklerose

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss freier Fettsäuren auf die Apoptose von Endothel- und glatten Muskelzellen humaner Koronararterien untersucht, das Expressionsmuster der Proteinkinase C in diesen Zelltypen zum ersten Mal aufgeklärt und die Rolle der PKC bei der Lipoapoptose analysiert. Da Statine pleiotrope, gefäßprotective Wirkungen wie eine Plaque-Stabilisierung zugeschrieben werden, wurde zusätzlich der Effekt eines Statins, Atorvastatin, auf die Lipoapoptose dieser Zellen untersucht.

Der programmierte Zelltod spielt bei der Pathogenese der Atherosklerose eine wichtige Rolle. Apoptose der die Gefäßwand auskleidenden Endothelzellen ist ein wesentlicher Faktor bei der Entstehung atherosklerotischer Läsionen [Dimmeler et al., 1998, Haunstetter et al., 1998]. In fortgeschrittenen Läsionen führt die Apoptose glatter Muskelzellen an der Schulterregion der Plaque zu einer Instabilisierung und begünstigt damit eine mögliche Plaque-Ruptur.

Die freien Fettsäurespiegel sind erhöht bei den Komponenten des metabolischen Syndroms wie der Insulin-Resistenz [Artwohl et al., 2003], der Hypertonie [Fagot-Campagna et al., 1998], der Adipositas [Opie et al., 1963] und dem Diabetes mellitus [Reaven et al., 1988]. Die Insulinresistenz gilt als Bindeglied zwischen den Facetten des metabolischen Syndroms [DeFronzo et al., 1991; Modan et al.]. Erhöhte freie Fettsäuren werden als eine Ursache der Insulinresistenz im peripheren Zielgewebe und der Leber angesehen [Randle et al., 1963; McGarry, 1992; Littman et al., 2000]. Erhöhte freie Fettsäuren und Insulinresistenz wiederum sind mit kardiovaskulären Erkrankungen wie der Atherosklerose assoziiert.

4.2 Freie Fettsäure-induzierte Apoptose an Endothelzellen und glatten Muskelzellen humaner Koronararterien

Freie Fettsäuren sind bekannt für ihre toxische Wirkung auf lebende Zellen. Es wurden unterschiedliche Effekte verschiedener freier, d.h. unveresterter, Fettsäuren auf die Apoptose von Endothelzellen und glatten Muskelzellen humaner Koronararterien festgestellt.

An **Endothelzellen** humaner Koronararterien induzierten die gesättigten Fettsäuren *Palmitat* und *Stearat* die Apoptose. Die ungesättigten Fettsäuren *Palmitoleat*, *Oleat* und *Linoleat* wiesen hingegen keine pro-apoptischen Effekte auf. Die Apoptose wird in diesem Zelltyp also spezifisch durch gesättigte Fettsäuren hervorgerufen, während ungesättigte Fettsäuren keine pro-apoptischen Effekte zeigten.

Auch an **glatten Muskelzellen** induzierten die gesättigten Fettsäuren *Palmitat* und *Stearat* die Apoptose.

Die mehrfach ungesättigte Fettsäure *Linoleat* wirkte jedoch im Gegensatz zu den Resultaten bei Endothelzellen ebenfalls proapoptisch. Dies bestätigte sich durch eine zusätzliche Messung des Prozentanteils überlebender Zellen nach *Linoleat*-Behandlung. Die vitalen Zellen nahmen nach 24-stündiger Inkubation mit *Linoleat* signifikant ab.

Ebenso wie bei den Endothelzellen, stimulierten die einfach ungesättigten Fettsäuren *Palmitoleat* und *Oleat* die basale Apoptoserate glatter Muskelzellen humaner Koronararterien nicht. Die Einflüsse verschiedener gesättigter und ungesättigter Fettsäuren auf die basale Apoptoserate sind mit Ausnahme des *Linoleats* bei Endothel- und glatten Muskelzellen somit deckungsgleich. Die Ursache für den lipoapoptischen Effekt von *Linoleat* an glatten Muskelzellen ist ungeklärt. Es bleibt deshalb spekulativ, ob *Linoleat* bestimmte Signalwege, wie beispielsweise reaktive Sauerstoffspezies (ROS) oder mitochondriale Effekte, spezifisch in diesem Zelltyp auslöst.

In zahlreichen experimentellen Systemen variieren die Effekte verschiedener gesättigter und ungesättigter Fettsäuren auf die Apoptose von verschiedenen Zellsystemen stark. Studien an Ovarialzellen chinesischer Hamster [Listenberger L, 2001], kardialen Myozyten [deVries et al., 1997], pankreatischen β -Zellen [Eitel et al., 2003; Lupi et al., 2002; Maedler et al., 2001; Cnop et al., 2001; Shimabukuro et al., 1998], Brustkrebszellen [Hardy et al., 2000] und hämatopoetischen Vorläuferzellen [Paumen et al., 1997] deuten darauf hin, dass die Lipotoxizität durch Akkumulation von freien Fettsäuren spezifisch für gesättigte Fettsäuren ist. Dies stimmt mit den oben aufgeführten Ergebnissen an menschlichen Endothel- und glatten Muskelzellen weitgehend überein.

Diese Selektivität wird der Bildung spezifischer proapoptotischer Signalmoleküle zugeschrieben, welche als Antwort auf gesättigte, nicht jedoch ungesättigte Fettsäuren, generiert werden. Die Beschaffenheit solcher proapoptotischer Signale variiert von Zellsystem zu Zellsystem und schließt folgende Wege ein: die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) [Listenberger et al., 2001], de novo Synthese von Ceramid [Shimabukuro et al., 1998], Bildung von NO [Shimabukuro et al., 1997] und primäre Effekte auf mitochondriale Struktur und Funktion [Ostrander et al., 2001], sowie die Unterdrückung antiapoptotischer Faktoren wie *BclII* [Shimabukuro et al., 1998].

Bei **kombinierter Behandlung mit gesättigten und ungesättigten Fettsäuren** ist mehrfach gezeigt worden, dass ungesättigte Fettsäuren vor der von gesättigten Fettsäuren hervorgerufenen Lipoapoptose zu schützen vermögen [Welters et al., 2004; Eitel et al., 2003; deVries et al., 2001; Maedler et al., 2001; Hardy et al., 2000]. Der zugrunde liegende Mechanismus ist noch nicht aufgeklärt.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher der Effekt von der kombinierten Behandlung mit gesättigten und ungesättigten Fettsäuren auf *Endothel- und glatte Muskelzellen humaner Koronararterien* studiert.

Die einfach ungesättigten Fettsäuren *Palmitoleat* (C 16:1) und *Oleat* (C 18:1) sowie die mehrfach ungesättigte Fettsäure *Linoleat* (C 18:2) verringerten zwar

die durch *Stearat* induzierte Apoptose der **Endothelzellen**, die durch *Palmitat* induzierte Apoptose wurde jedoch durch keine der eingesetzten ungesättigten Fettsäuren beeinflusst.

Anders als bei den Endothelzellen erhöhte *Palmitoleat* die *Palmitat*-induzierte Apoptose der **glatten Muskelzellen** tendenziell, *Oleat* und *Linoleat* erhöhten sie signifikant. Keine der eingesetzten ungesättigten Fettsäuren beeinflusste die durch *Stearat* induzierte Apoptose.

Auch ungesättigte Fettsäuren scheinen also glatte Muskelzellen humaner Koronararterien zu schädigen, da sie die Apoptoserate weiter erhöhen. Dies steht im Gegensatz zu den oben dargestellten Ergebnissen an Endothelzellen, nach denen ungesättigte Fettsäuren die basale Apoptose nicht beeinflussen und vor der *Stearat*-induzierten Apoptose schützen. In Analogie dazu demonstrierten Eitel et al. anti-apoptotische Eigenschaften der ungesättigten Fettsäuren *Palmitoleat*, *Oleat* und *Linoleat* an Ratteninsulinomazellen und humanen β -Zellen des Pankreas [Eitel et al., 2002]. Eine andere Studie zeigte hingegen, dass auch ungesättigte Fettsäuren Apoptose induzieren können: Artwohl et al. wiesen eine vermehrte Apoptoserate nach bei 24-stündiger Inkubation von Endothelzellen humaner Umbilicalvenen mit den mehrfach ungesättigten Fettsäuren *Linoleat* und *Arachidonsäure* und nach 48-stündiger Inkubation dieser Zellen mit der einfach ungesättigten Fettsäure *Oleat* [Artwohl et al., 2003].

Mehrere Studien in jüngster Zeit haben sich mit dem Zusammenhang zwischen der Fettsäure-Zusammensetzung im Plasma, der Insulin-Sensitivität und anderen Störungen des metabolischen Syndroms befasst. Pelikanova fand eine negative Korrelation zwischen gesättigten Fettsäuren im Plasma und Insulin-Sensitivität und eine positive Assoziation zwischen ungesättigten Fettsäuren und Insulin-Sensitivität [Pelikanova, 2001]. Die endotheliale Dysfunktion als Teil des metabolischen Syndromes soll in einem Zusammenhang mit der Fettsäure-Zusammensetzung des Plasmas stehen und stellt möglicherweise ein Bindeglied zwischen Ernährung, Fettsäure-Profil des Plasmas, Hypertonie und linksventrikulärer Hypertrophie dar [Vessby, 2003]. Ein typisches Fettsäure-Muster von Individuen mit metabolischem Syndrom ist charakterisiert durch erhöhte Proportionen gesättigter Fettsäuren, v.a. von *Palmitat*, und reduzierten Anteilen

von *Linoleat* [Vessby, 2003]. Vor diesem Hintergrund sind die oben dargestellten Effekte der gesättigten Fettsäuren Palmitat und Stearat auf den programmierten Zelltod von Endothel- und glatten Muskelzellen humaner Koronararterien von besonderem Interesse. Vermehrte Zufuhr von gesättigten Fettsäuren mit der Nahrung, aber auch eine erhöhte endogene Produktion bei Insulinresistenz, können also zu Apoptose in Koronarien führen und somit die Entstehung und Progression einer Atherosklerose begünstigen (vgl. auch Kap. 1.2.3 und 1.3).

Die Hemmung der *Stearat*-induzierten Apoptose an Endothelzellen durch die einfach ungesättigten Fettsäuren *Palmitoleat* und *Oleat* könnte zumindest teilweise erklären, weshalb diätäre ungesättigte Fettsäuren eine gefäßprotektive Wirkung zeigen.

4.3 Effekt von Atorvastatin auf die Apoptose von Endothel- und glatten Muskelzellen humaner Koronararterien

Große klinische Interventionsstudien haben gezeigt, dass Cholesterinsynthesehemmer, Statine, kardiovaskuläre Komplikationen/Mortalität und Gesamtsterblichkeit signifikant senken können [MIRACL-Studie, WOSCOPS Studie, AFCAPS/TexCAPS Studie, 4 S-Studie, LIPID Studie, CARE Studie]. Die klinische Prognose wird nicht allein durch den Stenosegrad, sondern auch durch Zahl, Struktur und Vulnerabilität der Plaques bestimmt.

Statine gelten als gefäßprotektiv, nicht nur durch eine LDL-Senkung, sondern auch unabhängig davon durch ihre pleiotropen Effekte [Heart Protection Study 2002; ASCOT Studie 2003; Werner et al. 2002; Laufs 2003; Vaughan 1996; Lefer 2001; Laufs 2000] wie u.a. einer Verbesserung der endothelialen Dysfunktion [Corsini 1996; O'Driscoll 1997; Perticone 2000]. Sie sollen die Entzündungsprozesse in den Atheromen reduzieren, mit einer Plaque-stabilisierung assoziiert sein, die Thromboseneigung deutlich reduzieren [Ballantyne 1999; Müller-Wieland 1997 und 1999; Rosenson 1998; Farema 2000; Laufs 2001;

Sukhova 2002; Libby 2003] und so u.a. das Risiko einer Plaqueruptur vermindern.

Es wird diskutiert, dass Statine Zeit- und Dosis-abhängige biphasische lipid-unabhängige Effekte auf Endothelzellen hervorrufen [Urbich 2002; Weis 2002]; sie können sowohl pro- als auch anti-apoptotisch wirken. Um in diesem Zusammenhang zu klären, ob Statine die Lipoapoptose von Endothel- und glatten Muskelzellen humaner Koronararterien beeinflussen, wurde der HMG-CoA-Reduktase-Hemmer Atorvastatin eingesetzt.

Atorvastatin zeigte in der Konzentrationsreihe 0,1 μM , 1 μM , 5 μM , 10 μM und 50 μM und einer Inkubationszeit von 30 min/24 Stunden jedoch keine statistisch signifikanten Effekte auf die basale Apoptose und die Lipoapoptose von Endothel- und glatten Muskel-Zellen humaner Koronararterien. Damit ist jedoch eine Wirkung von Atorvastatin auf die Apoptoserate der beiden Zelltypen nicht vollkommen ausgeschlossen. In anderen Konzentrationen oder Inkubationszeiten wären Effekte eventuell möglich, denn die Wirkung von Statinen ist Zeit-, Dosis-, und Zelltyp-abhängig [Urbich et al., 2002; Weis et al., 2002].

4.4 Expressionsmuster der Proteinkinase C in Endothelzellen und glatten Muskelzellen humaner Koronararterien

PKC-Signaltransduktionswege spielen bei der Apoptose, der Entwicklung von Atherosklerose und diabetischer vaskulärer Erkrankungen eine entscheidende Rolle [Kawakami et al., 2003; Way et al., 2001; Li et al., 2000; Natarajan et al., 1995].

Um in diesem Zusammenhang zu ermitteln, ob die Proteinkinase C bei der Lipoapoptose von Endothel- und glatten Muskelzellen humaner Koronararterien beteiligt ist, wurde erstmals das PKC-Expressionsmuster in beiden Zelltypen analysiert [Schatz et al., 2003]. Sowohl in Endothel- als auch glatten Muskelzellen humaner Koronararterien konnten die Isoenzyme PKC-alpha, -beta-1 (klassische PKCs, cPKCs), -delta, -epsilon (neue PKCs, nPKCs) und

-iota (atypische PKC, aPKC) detektiert werden. Nicht nachweisen ließen sich hingegen die Isoformen PKC-gamma (klassische PKC), -eta, -theta (neue PKCs) und -zeta (atypische PKC). PKC-beta-2 konnte im Immunoblot nicht nachgewiesen werden, wohl aber in der Light-Cycler-PCR. PKC-beta-2 wurde also nur auf RNA-Ebene, nicht jedoch auf Proteinebene gefunden. Dies ist entweder dadurch zu erklären, dass (1) die Affinität des Antikörpers zu gering war, (2) zu wenig Protein exprimiert wird oder (3) dass PKC-beta-2-mRNA zu schnell abgebaut wird, um zu einer im Immunoblot detektierbaren Proteinmenge zu führen.

Das PKC-Expressionsmuster *humaner* Koronarien unterscheidet sich von dem tierischer. In *bovinen* Koronararterien wurden z.B. PKC-alpha, -epsilon, -iota, -gamma, -lambda, -my und -zeta auf Proteinebene nachgewiesen, nicht jedoch PKC-beta, -delta und -theta [Skaletz-Rorowski et al., 1999]. Weiterhin unterscheidet sich das Expressionsmuster in humanen Koronararterien von dem humaner Venen: In Endothelzellen humaner Umbilicalvenen konnte PKC-alpha, -delta, -epsilon, -theta und -zeta sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden [Haller et al., 1999]. In humanen glatten Muskelzellen der Vena saphena wiesen Itoh et al. sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene PKC-alpha, -beta-1, -beta-2, delta, -epsilon, -my, -iota und -zeta nach [Itoh et al., 2001].

Interessanterweise war in den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen das Expressionsmuster in Endothelzellen und glatten Muskelzellen humaner Koronararterien identisch. Dies könnte auf eine ähnliche Regulation PKC-abhängiger zellulärer Signalwege in diesen anatomisch eng benachbarten Zelltypen hinweisen. PKC-Inhibitoren, wie der in jüngster Zeit entwickelte potentiell gefäßprotektive PKC-beta-Inhibitor, sollten also in beiden Zelltypen gleichermaßen wirken.

Als nächstes wurden die bekanntermaßen proapoptotisch wirkenden PKC-Isoformen alpha und delta in der Zelle visualisiert und die PKC-Aktivität in Form einer Translokation mit Hilfe der **konfokalen Laser-Mikroskopie** untersucht.

PKC-alpha fand sich in den HCA-E-Zellen diffus im Zytoplasma verteilt. PKC-delta war perinukleär lokalisiert.

Eitel et al. zeigten, dass in humanen β -Zellen des Pancreas PKC-delta ebenfalls im Zytoplasma lokalisiert ist. Nach Behandlung mit den gesättigten Fettsäuren Palmitat bzw. Stearat translozierte PKC-delta in diesen Zellen zum Zellkern [Eitel et al., 2003].

Bei Zugabe der gesättigten Fettsäuren Palmitat und Stearat und der kombinierten Behandlung mit gesättigten Fettsäuren und den ungesättigten Fettsäuren Palmitoleat, Linoleat und Oleat fanden sich in den Untersuchungen mit Endothel- und glatten Muskelzellen allerdings keine Hinweise einer PKC-Translokation. Damit ist eine Aktivierung der dargestellten PKC-Isoformen nach Zusatz der Zellen mit Fettsäuren zwar unwahrscheinlich, jedoch nicht sicher auszuschließen, da Aktivierungsprozesse auch ohne messbare Translokation in der konfokalen Laser-Mikroskopie möglich sind.

4.5 Einfluss verschiedener PKC-Inhibitoren auf die Apoptose-rate von Endothel- und glatten Muskelzellen humaner Koronararterien

Verschiedene PKC-Inhibitoren wurden eingesetzt, um weiter zu prüfen, ob die Proteinkinase C an der durch freie Fettsäuren induzierten Apoptose von Endothel- und glatten Muskelzellen humaner Koronararterien beteiligt ist.

Aufgrund des Ergebnisses der Analyse des Expressionsmusters (s.o.) können nur PKC-alpha, -beta, -delta, -epsilon und -iota bei der Apoptose in diesen beiden Zelltypen potentiell eine Rolle spielen.

Heute ist es ein Hauptanliegen der PKC-Forschung die spezifischen zellulären Funktionen der einzelnen Isoenzyme aufzuklären. Die Erforschung individueller PKC-Funktionen, wie hier der (Lipo-) Apoptose, wird dadurch erschwert, dass keine Isoform-spezifischen Inhibitoren erhältlich sind und es weder ein Gewebe noch einen Zelltyp gibt, in dem nur eine PKC-Isoform exprimiert wird.

Der Kinasemodulator *Rottlerin (Mallotoxin)*, ein Extrakt aus der Fruchtschale der *Mallotus philippinensis*, hemmt PKC-delta spezifischer als PKC-alpha, -beta, -epsilon, -eta und -zeta. Teilweise ist Rottlerin in der Literatur sogar als PKC-delta spezifischer Inhibitor beschrieben [Gschwendt et al., 1994].

Bis-Indolyl-Maleimid ist ein hochspezifischer zellpermeabler PKC-Inhibitor mit hoher Affinität zu PKC-alpha, -beta, -delta, -gamma und -epsilon.

Langzeitinkubation (20 Stunden) mit *TPA* bewirkt eine Herabregulierung der klassischen (PKC-alpha, -beta, -gamma) und neuen (PKC-delta, -epsilon, -theta und -eta) Proteinkinase C-Isoformen.

An **glatten Muskelzellen** humaner Koronararterien senkte *Rottlerin* in einer Konzentration von 1 µM die basale und in den Konzentrationen 7,5 µM und 15 µM die durch Palmitat induzierte Apoptoserate signifikant.

Bis-Indolyl-Maleimid und Langzeitinkubation (20 Stunden) mit *TPA* beeinflussten weder die basale noch die durch Fettsäuren induzierte Apoptose.

Die Verminderung der Apoptoserate nach Rottlerin-Behandlung ist demnach höchstwahrscheinlich nicht auf seine PKC-Inhibition, sondern vielmehr auf seine unspezifischen Effekte [Soltoff et al., 2001] zurückzuführen.

An der (Lipo-) Apoptose glatter Muskelzellen humaner Koronararterien ist demzufolge eine Rolle der Proteinkinase C unwahrscheinlich.

An **Endothelzellen** humaner Koronararterien verringerten *Rottlerin* (1µM und 5 µM) und *Bis-Indolyl-Maleimid* (100 nM) die basale Apoptoserate nicht signifikant.

Langzeitinkubation (20 h) der Zellen mit *TPA* (500 nM) senkte die basale Apoptoserate und die durch *Palmitat* induzierte Apoptoserate signifikant, nicht jedoch die durch *Stearat* induzierte Apoptose.

Da die beiden PKC-Inhibitoren Rottlerin und Bis-Indolyl-Maleimid keine signifikante Wirkung zeigten, ist eine Beteiligung der klassischen und neuen Proteinkinase C-Isoformen an der Lipo-Apoptose unwahrscheinlich.

Folglich wurde überprüft, ob die ebenfalls in Endothelzellen nachgewiesene atypische Isoform PKC-iota an der Apoptose beteiligt sein könnte.

PKC-zeta/iota-Pseudosubstrat, dessen Aminosäuresequenz sowohl in PKC-zeta als auch -iota vorkommt und welches folglich beide Isoformen blockiert, verringerte sowohl die durch *Palmitat* als auch durch *Stearat* induzierte Apoptose hoch signifikant. Da PKC-zeta in den Zellen nicht nachgewiesen wurde, spricht dieses Ergebnis dafür, dass in Endothelzellen humaner Koronarien die Fettsäure-induzierte Apoptose über PKC-iota vermittelt wird.

Die meisten Untersuchungen sprechen dafür, dass PKC-iota anti-apoptotisch wirkt [Song et al, 2004; Gutcher et al., 2003]. Xie et al zeigten, dass PKC-iota Neuronen vor der Amyloid beta-Peptid-induzierten Apoptose schützt [Xie et al., 2000]. Weiterhin reduzierte sie die Medikamenten-induzierte Apoptose von humanen Leukämie-Zellen [Murray et al, 1997]. Regala et al. demonstrierten, dass PKC-iota in humanen Bronchialkarzinom-Zellen antiapoptotisch wirkt und daher ein interessantes molekulares Ziel für Mechanismus-basierte Therapie des Lungenkrebses sei [Regala et al., 2005].

Somit scheint die *pro*-apoptotische Funktion der Proteinkinase C-iota spezifisch für Endothelzellen humaner Koronararterien zu sein. Ihre Blockierung durch einen spezifischen Inhibitor könnte demzufolge zu einem neuen Therapieansatz bei Atherosklerose führen.

In den letzten zwei Jahrzehnten haben PKC-Inhibitoren großes Interesse erweckt, da sie neue Therapieoptionen darstellen. In der Diabetologie existiert bereits ein PKC-beta spezifischer Inhibitor (Ruboxistaurin-Mesylat, LY333531), welcher im Tiermodell zu einer reduzierten Entwicklung diabetischer vaskulärer Komplikationen wie diabetischer Retinopathie, Nephropathie und Neuropathie geführt hat [Ishii 1996; Aiello 1997; Danis 1998; Nakamura 1999] und bei gesunden Personen die Hyperglykämie-induzierte Störung der Endothel-abhängigen Vasodilatation verhinderte [Shen, 2003]. Er befindet sich zur Zeit in der Phase III der klinischen Erprobungsphase. In der Onkologie ist ein PKC-alpha-spezifischer Inhibitor (ISIS-3521, Ly 900003) entwickelt worden, welcher das Wachstum und die Metastasierung solider Tumoren reduzieren soll [Hanauske 2004]. Auch dieser befindet sich bereits in der klinischen Erprobungsphase [Shen 2003].

Da die Proteinkinase C ein multifunktionales Enzym ist, welches in fast allen Zellen und Geweben des menschlichen Körpers vorkommt, ist allerdings auch mit verschiedenen Wirkungen zu rechnen, denn die PKC-vermittelten zellulären Prozesse sind Isoform- und Gewebs-spezifisch [Shen, 2003]. Verschiedene PKC-Isoformen wie PKC-beta, -delta und -iota inhibieren in unterschiedlichen Karzinomzellen (z.B. Leukämiezellen, Bronchialkarzinom-zellen) Apoptose [Regala et al, 2005; Alkan et al., 2005; Goekjian et al, 2001], während sie, wie oben dargestellt in vaskulären Zellen unter den hier gewählten experimentellen Bedingungen pro-apoptotische Effekte zeigen.

Diese gegensätzlichen Wirkungen könnten jedoch sogar wünschenswert sein, denn in vaskulären Zellen könnte mit einer antiapoptotischen Wirkung ein vasoprotektives Ergebnis erzielt werden, während in Karzinomzellen die Apoptoseförderung Therapieziel ist.

Hieraus könnten in nächster Zeit interessante neue Therapiemöglichkeiten entstehen.

5 Zusammenfassung

Apoptose von vaskulären Endothel- und glatten Muskelzellen spielt bei der Pathogenese der Atherosklerose eine entscheidende Rolle. Freie Fettsäuren sind in Stadien des metabolischen Syndroms im Plasma erhöht und können Apoptose von verschiedenen Zellen wie z.B. β -Zellen des Pancreas hervorrufen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte verschiedener gesättigter und ungesättigter Fettsäuren auf die Apoptose von Endothel- und glatten Muskelzellen humaner Koronararterien untersucht. In beiden Zelltypen induzierten die gesättigten Fettsäuren Palmitat (16:0) und Stearat (18:0) Apoptose, während die einfach ungesättigten Fettsäuren Palmitoleat (16:1) und Linoleat (18:1) keinen Effekt zeigten. Die mehrfach ungesättigte Fettsäure Linoleat (18:2) stimulierte die Apoptose in glatten Muskelzellen, nicht jedoch in Endothelzellen.

Bei kombinierter Behandlung mit gesättigten und ungesättigten Fettsäuren verringerten Palmitoleat, Oleat und Linoleat in Endothelzellen die Apoptosefördernde Wirkung von Palmitat, erhöhten sie jedoch in glatten Muskelzellen.

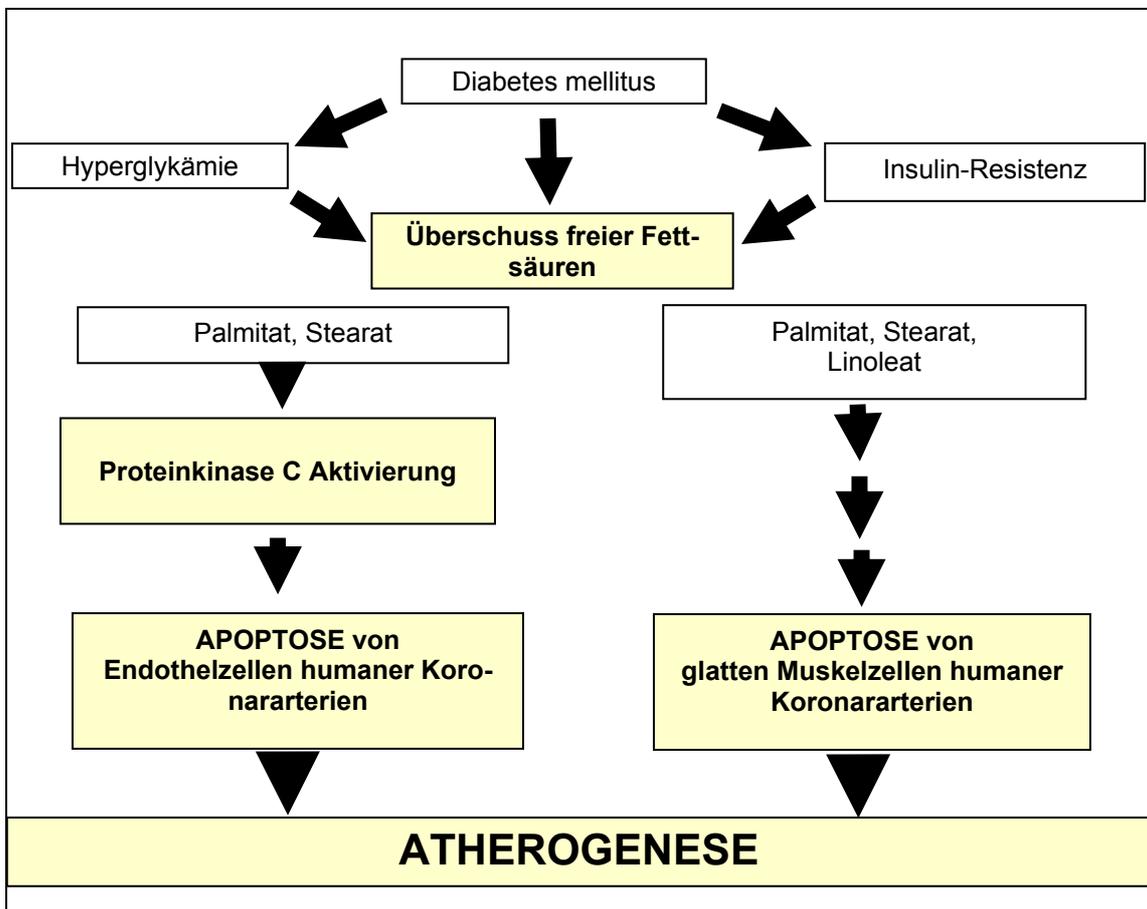
Statine entfalten pleiotrope, cholesterinunabhängige, gefäßprotektive Wirkungen und können die Apoptose von Gefäßzellen sowohl erhöhen als auch erniedrigen. Das lipophile Statin Atorvastatin zeigte jedoch keine Wirkung auf die (Lipo-) Apoptose von Endothel- und glatten Muskelzellen humaner Koronararterien.

Um zu klären, ob die multifunktionale Proteinkinase C (PKC) an der (Lipo-) Apoptose von Endothel- und glatten Muskelzellen humaner Koronararterien beteiligt ist, wurde zunächst das PKC-Expressionsmuster analysiert. Es war für beide Zelltypen identisch: PKC-alpha, -beta, -delta, -epsilon und -iota konnten nachgewiesen werden, nicht zeigen ließen sich hingegen PKC-gamma, -eta, -theta und -zeta.

Experimente mit den PKC-Inhibitoren Rottlerin, Bis-Indolyl-Maleimid, dem Phorbol-ester Tetra-Decanoyl-Phorbol-Acetat und PKC-zeta/iota-Pseudosubstrat deuten daraufhin, dass bei der Lipoapoptose von Endothelzellen PKC-iota eine

Schlüsselrolle spielt, während bei den glatten Muskelzellen humaner Koronararterien die Proteinkinase C an der Apoptose nicht beteiligt zu sein scheint.

PKC-Inhibitoren stellen interessante neue Therapieoptionen dar. In der Onkologie wird ein PKC-alpha-Inhibitor eingesetzt, welcher durch Apoptose-Förderung Wachstum und Metastasierung solider Tumoren reduzieren soll. Ein PKC-beta spezifischer Inhibitor (Ruboxystaurin) hat im Tiermodell zu einer verminderten Entwicklung diabetischer vaskulärer Komplikationen geführt und befindet sich bereits in der klinischen Erprobungsphase. In nächster Zeit ist mit weiteren Ansätzen solcher PKC-Inhibitoren zu rechnen, die viel versprechende neue Therapieoptionen – möglicherweise auch bei der Koronarsklerose – eröffnen.



6 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Lipoapoptotische Effekte gesättigter und ungesättigter Fettsäuren auf Endothelzellen humaner Koronararterien.	42
Tabelle 2: Effekte freier Fettsäuren auf die Apoptose von glatten Muskelzellen humaner Koronararterien.	44
Tabelle 3: Effekte freier Fettsäuren auf die Vitalität von glatten Muskelzellen humaner Koronararterien.	45
Tabelle 4: Effekt von gesättigten, ungesättigten Fettsäuren und deren Kombination auf die Apoptose von Endothelzellen humaner Koronararterien.	48
Tabelle 5: Effekte der kombinierten Behandlung mit gesättigten und ungesättigten Fettsäuren auf die Apoptose von glatten Muskelzellen humaner Koronararterien.	49
Tabelle 6: Effekte von Atorvastatin auf die Lipoapoptose von Endothelzellen humaner Koronararterien.	52
Tabelle 7: Effekte von Atorvastatin auf die (Lipo-) Apoptose von glatten Muskelzellen humaner Koronararterien.	54
Tabelle 8: Effekt von Atorvastatin 50 µmol/l auf die (Lipo-)Apoptose von glatten Muskelzellen humaner Koronararterien.	56
Tabelle 9: Effekte von Rottlerin auf die Lipoapoptose von Endothelzellen humaner Koronararterien (HCA-ECs).	68
Tabelle 10: Effekt von Rottlerin auf die Apoptose von glatten Muskelzellen humaner Koronararterien.	69
Tabelle 11: Effekte von Bis-Indolyl-Maleimid auf die Lipoapoptose von Endothelzellen humaner Koronararterien.	71
Tabelle 12: Effekte von Bis-Indolyl-Maleimid auf die (Lipo-) Apoptose von glatten Muskelzellen humaner Koronararterien.	73
Tabelle 13: Effekte einer Langzeitinkubation mit Tetra-Decanoyl-Phorbol-Acetat (TPA) auf die Lipoapoptose von Endothelzellen humaner Koronararterien.	75
Tabelle 14: Effekte einer Langzeitbehandlung mit Tetra-Decanoyl-Phorbol-Acetat (TPA) auf die Lipo-Apoptose von glatten Muskelzellen humaner Koronararterien.	77

Tabelle 15: Effekt einer Langzeitinkubation mit Tetra-Decanoyl-Phorbol-Acetat (TPA) auf die Vitalität von glatten Muskelzellen humaner Koronararterien.....	78
---	----

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Apoptose versus Nekrose.....	8
Abb.: 2	Todesursachen in der Welt	10
Abb. 3:	Pathogenese der Atherosklerose.	12
Abb. 4:	Mechanismen der Einwanderung von Cholesterin und Monozyten in die Gefäßwand und strukturelle Umbauprozesse.	12
Abb. 5:	Plaquestabilisierung durch Statine.	16
Abb. 6a	Effekte gesättigter und ungesättigter Fettsäuren auf die Apoptose von Endothelzellen humaner Koronararterien	42
Abb. 6 b:	Effekte von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren auf die Apoptose von Endothelzellen humaner Koronararterien	43
Abb. 7	Effekte von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren auf die Apoptose von glatten Muskelzellen humaner Koronararterien.	44
Abb. 8	Effekte von Palmitat, Stearat und Linoleat auf das Zellüberleben von glatten Muskelzellen humaner Koronararterien	46
Abb. 9:	Effekte freier Fettsäuren auf die Apoptose von Endothelzellen humaner Koronararterien.....	48
Abb. 10:	Effekte von gesättigten und ungesättigten Fettsäuren und deren Kombination auf die Apoptose von glatten Muskelzellen humaner Koronararterien.....	50
Abb. 11:	Effekte von Atorvastatin auf die (Lipo-) Apoptose von Endothelzellen humaner Koronararterien.	53
Abb. 12:	Effekte von Atorvastatin auf die (Lipo-) Apoptose von glatten Muskelzellen humaner Koronararterien.	55
Abb. 13:	Effekte von Atorvastatin 50 µmol/l auf die Vitalität von glatten Muskelzellen humaner Koronararterien.	56
Abb. 14:	Klassische PKCs in der Western Blot Analyse.	59
Abb. 15:	Novel PKCs in der Western Blot Analyse.	59
Abb. 16:	Atypische PKCs in der Western Blot Analyse.....	59
Abb. 17:	Darstellung der PKC-beta-2 in Endothel (B) und glatten Muskelzellen humaner Koronararterien im 2% Agarosegel	60

Abb. 18:	PKC alpha (80 kDa) Herabregulierung,	62
Abb. 19:	PKC beta-1 (80 kDa) Herabregulierung,	62
Abb. 20:	PKC delta (80 kDa) Herabregulierung.	63
Abb. 21:	PKC epsilon (90 kDa) Herabregulierung.....	63
Abb. 22:	PKC iota (74 kDa) Herabregulations-Versuch,	64
Abb. 23:	PKC-alpha in HCA-E-Zellen.	65
Abb. 24:	Langzeitinkubation (20 Std) von HCA-E-Zellen mit TPA	65
Abb. 25:	PKC delta in Endothelzellen humaner Koronararterien, dargestellt mittels konfokaler Laser-Mikroskopie.	65
Abb. 26:	Langzeitinkubation (20 Std.) der HCA-E-Zellen mit TPA. Dargestellt mittels konfokaler Laser-Mikroskopie.	66
Abb. 27:	Effekte von Rottlerin auf die (Lipo-) Apoptose von Endothelzellen humaner Koronararterien.	68
Abb. 28:	Effekte von Rottlerin auf die (Lipo-) Apoptose von glatten Muskelzellen humaner Koronararterien.	70
Abb. 29:	Effekte von Bis-Indolyl-Maleimid auf die (Lipo-) Apoptose von Endothelzellen humaner Koronararterien.	72
Abb. 30:	Effekte von Bis Indolyl Maleimid auf die Lipoapoptose von glatten Muskelzellen humaner Koronararterien.	73
Abb. 31:	Effekt einer Langzeitinkubation mit TPA auf die Apoptose von Endothelzellen humaner Koronararterien.	75
Abb. 32:	Analyse des Zellzyklus von Endothelzellen humaner Koronararterien nach Behandlung mit Fettsäuren und zusätzlicher Langzeitinkubation mit TPA	76
Abb. 33:	Effekte einer Langzeitbehandlung (20 Stunden) mit TPA auf die Apoptose von glatten Muskelzellen humaner Koronararterien.	77
Abb. 34:	Effekt einer Langzeitbehandlung glatter Muskelzellen humaner Koronararterien mit Tetra-Decanoyl-Phorbol-Acetat (TPA) auf das Zellüberleben ohne („basal“) und mit Fettsäurebehandlung. ..	79
Abb. 35:	Effekte von PKC-Zeta-Pseudosubstrat auf die Lipo-Apoptose von Endothelzellen humaner Koronararterien.	81

8 Abkürzungs-Verzeichnis

ACE	Angiotensin-converting enzyme
AFCAPS	Air Force Coronary Atherosclerosis Prevention Study
APS	Ammonium Peroxid Sulfat
AMV-RT	Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transkriptase
bes.	besonders
BLAST	Basic local alignment search tool
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
BIS	Bis-Indolyl-Maleimid
CARE	Cholesterol And Recurrent Events Study
cNOS	constitutive nitric oxide synthase (konstitutive NO-Synthase)
DAG	Diacyl-Glycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
dest.	Destilliert
dT	Desoxy-Thymidin
ECL	Enhanced chemi-luminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylendioxy-bis-(ethylenitril-) tetra-Acetat
FACS	Fluorescent Activated Cell Sorting
FBS	fetal bovine serum
FCS	Fetal Calf Serum (Serum von Kälberföten)
FACS	Fluorescent Activated Cell Sorting (Durchflußzytometrie)
FFA	Free Fatty Acids = freie Fettsäuren
FS	Fettsäuren
GA	Gentamycin sulphate Amphotericin B
HCA-ECs	Human coronary artery endothelial cells
HCA-SMCs	Human coronary artery smooth muscle cells
hEGF	Human epidermal growth factor
hFGF	Human fibroblast growth factor

HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HMG-CoA	Hydroxy-Methyl-Glutaryl-Coenzym A
IGF	Insulin like growth factor
Kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KHK	Koronare Herzerkrankung
LDL	Low density lipoprotein
L	Linoleat
LIPID	Long Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease
M	molar, mol/l
MIRACLE	Multicenter insyne Randomized Clinical Evaluation
n	Anzahl der Versuche
NO	Nitrit oxide (Stickstoffmonoxid)
O	Oleat
oxLDL	Oxidiertes LDL
PDGF	Platelet derived growth factor
PGI ₂	Prostaglandin 2
P	Palmitat
PL	Palmitoleat
PAGE	Poly-Acrylamid-Gel-Elektrophorese
PBG	Phosphate Buffered Gelatine
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (Phosphate Buffered Saline)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PI	Propidiumiodid (Fluoreszenzfarbstoff)
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Q	Quadrant
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive Oxygen Species
RT	Reverse Transkriptase

RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion
S	Stearat
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat (Sodium-Dodecyl-Sulfate)
SL	Stammlösung
TAE	Tris/Acetat/EDTA (Puffer)
TCA	Trichloressigsäure (trichlor acetic acid)
TEMED	N, N, N, N', N'-Tetra-methyl-ethylen-diamin
TexCAPS	Texas Coronary Atherosclerosis Prevantion Study
TPA	12-o-Tetra-Decanoyl-Phorbol 13 Acetat
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
upm	Umdrehungen pro Minute
4 S	Scandinavian Simvastatin Survival Study
VEGF	Endothelial growth factor, vascular human recombinant
(v/v)	Volumen/Volumen
(w/v)	Gewicht/Volumen (weight by volume)
WOSCOPS	West of Scotland Coronary Prevention Study Group
16:1	16 C-Atome, eine Doppelbindung (Fettsäure)
18:0	18 C-Atome, keine Doppelbindung (Fettsäure)
18:1	18 C-Atome, eine Doppelbindung (Fettsäure)
18:2	18 C-Atome, zwei Doppelbindungen (Fettsäure)

9 Literatur-Verzeichnis

- [1] Aiello LP, Bursell SE, Clermont A, et al: Vascular endothelial growth factor-induced retinal permeability is mediated by protein kinase C in vivo and suppressed by an orally effective beta-isoform-selective inhibitor. *Diabetes* 46:1473-1480 (1997)
- [2] Alkan S, Huang O, Ergin M, Denning MF, Nand S, Maududi T, Paner GP, Ozpuyan F, Izban KF: Survival role of protein kinase C (PKC) in chronic lymphocytic leukaemia and determination of Isoform expression pattern and genes altered by PKC inhibition. *Am J Hematol.* Jun; 79 (2): 97-106 (2005)
- [3] Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ: Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* Oct 5; 215 (3): 403-10 (1990)
- [4] Alvarez RJ, Gips SJ, Moldovan N et al.: 17 β -estradiol inhibits apoptosis of endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 237, 372-381 (1997)
- [5] Anderson JV, Woodruff PWR, Bloom SR: The effect of treatment of congestive heart failure on plasma atrial natriuretic peptide concentration: a longitudinal study. *Br Heart J* 59, 207-211 (1988)
- [6] Artwohl M, Roden M, Waldhausl W, Freudenthaler A, Baumgartner-Parzer SM: Free fatty acids trigger apoptosis and inhibit cell cycle progression in human vascular endothelial cells. *FASEB J*, Nov 3, 2003 [Epub ahead of print].
- [7] Ballantyne C.M: Reducing atherothrombotic events in high-risk patients: recent data on therapy with statins and fatty acids. *Current Atherosclerosis Reports* 1: 6-8 (1999).
- [8] Baumgartner-Parzer SM, Wagner L, Petterman M, Grillari J, Gessl A, Waldheusel W.: High glucose-triggered apoptosis in cultured endothelial cells. *Diabetes* 44: 1323 (1995)
- [9] Bauriedel G, Schluckebier S, Hutter R, Welsch U, Kandoff R, Lüderitz B, Prescott M: Apoptosis in restenosis versus stable-angina atherosclerosis. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 18: 1132-9 (1998)
- [10] Bauriedel G, Hutter R, Welsch U, et al.: Role of smooth muscle cell death in advanced coronary primary lesions: implications for plaque instability. *Cardiovasc Res* 1999; 41:480-488 (1999)
- [11] Belfiore F, Iannello S: Insulin resistance in obesity: metabolic mechanisms and measurement methods. *Mol Genet Metab* 65:121-128 (1998)

- [12] Bellosta S, Via D, Canavesi M, Pfister P, Fumagalli R, Paoletti R, Bernini F: HMG-CoA reductase inhibitors reduce MMP-9 secretion by macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 18:1671-1678 (1998)
- [13] Bennett M.R.: Vascular Smooth Muscle Cell Apoptosis – a Dangerous Phenomenon in Vascular Disease? *J Clin Basic Cardiol* 2000; 3:63 (2000)
- [14] Bennett MR, Littlewood TD, Schwartz SM, Weissberg PL: Increased sensitivity of human vascular smooth muscle cells from atherosclerotic plaque to p53-mediated apoptosis. *Circ Res* 81: 591-9 (1997).
- [15] Bennett MR, Macdonald K, Chan SW, Boyle JJ, Weissberg PL: Cooperative interactions between RB and p53 regulate cell proliferation, cell senescence and apoptosis in human vascular smooth muscle cells from atherosclerotic plaques. *Circ Res* 82: 704-12 (1998)
- [16] Bergstrom S: Prostaglandins: members of a new hormonal system. These physiologically very potent compounds of ubiquitous occurrence are formed from essential fatty acids. *Science* 157:382-391 (1967)
- [17] Berry N, Nishizuka Y: Protein kinase C and T-cell activation. *Eur J Biochem* 189:205-214 (1990)
- [18] Blanco-Colio L.W., Villa A., Ortego M., Hernández-Presa M.A., Pascual A., Plaza J.J., Egido J: 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, induce apoptosis of vascular smooth muscle cells by downregulation of Bcl-2 expression and Rho A prenylation. *Atherosclerosis* 17-26 (2002)
- [19] Boyle J, Proudfoot D, Bowyer D, Weissberg P, Bennett M: Human monocyte/macrophages induce human vascular smooth muscle cell apoptosis in culture. *Heart* 79: 61 (1998)
- [20] Carpenter L, Cordery D, Biden TJ: Inhibition of protein kinase C delta protects rat INS-1 cells against interleukin-1 beta and streptozotocin-induced apoptosis. *Diabetes* 51:317-34 (2002)
- [21] Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U., Nishizuka, Y.: Direct activation of calcium-activated, phospholipids-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem* 257: 7847-7851 (1982)
- [22] Choy JC; Granville DJ, Hunt DWC, McManus BM: Endothelial cell apoptosis: biochemical characteristics and potential implications for atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol* 33:1673 (2001)
- [23] Clemens, M.J., Trayner, I., Menaya, J.: The role of protein kinase C isoenzymes in the regulation of cell proliferation and differentiation. *J Cell Sci* 103: 881-887 (1992)

- [24] Cnop M., Hannaert J.C., Hoorens A., Eizirik D.L. & Pipeleers D.G. Diabetes 50, 1881-1777 (2001)
- [25] Corsini A, Bernini F, Quarato P, Donetti E, Bellocosta S, Fumagalli R, et al: Non-lipid-related effects of 3-hydroxy-methylglutryl coenzyme A reductase inhibitors. *Cardiology* 87:458 (1996)
- [26] Coussens, L., Parker, P.J., Rhee, L., Yang-Feng, T.L., Chen, E., Waterfield, M.D., Francke, U., Ullrich, A.: Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signalling pathways. *Science* 233: 859-866 (1986)
- [27] Crisby M, Nordin-Fredriksson G, Shah PK; Yano J, Zhu J, Nilsson J.: Pravastatin treatment increases collagen content and decreases lipid content, inflammation, metalloproteinases, and cell death in human carotid plaques: implications for plaque stabilization. *Circulation* 103:926-933 (2001)
- [28] Cross T, Griffiths G, Deacon E, Sallis R, Gough M, Watters D, Lord JM: PKC-delta is an apoptotic lamin kinase. *Oncogene* 19:2331-2337 (2000)
- [29] Danis RP, Bingaman DP, Jirousek M, yang Y: Inhibition of intraocular neovascularization caused by retial ischemia in pigs by PKC beta inhibition with LY333531. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:171-179 (1998)
- [30] DeFronzo RA, Ferrannini E.: Insulin resistance. A multifaceted syndrome responsible for NIDMM, obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care*; 14: 173-194 (1991)
- [31] DeVries J.E., Vork M.M., Roemen T.H.M., deJong Y.F., Cleutjens J.P.M., van der Vusse G.J. & vanBilsen M. *J. Lipid Res* 38, 1384-1394 (1997)
- [32] Dekker, L.V., and Parker, P.J.: Protein kinase C – a question of specificity. *Trends Biochem Sci* 19: 73-77 (1994)
- [33] Denning MF, Wang Y, Nickoloff BJ, Wrone-Smith T: Protein kinase C delta is activated by caspase-dependent proteolysis during ultraviolet radiation-induced apoptosis of human keratinocytes. *J Biol Chem* 273:29995-30002 (1998)
- [34] Dimmeler S, Haendeler J, Rippmann V, Nehls M und Zeiher AM: Shear stress inhibits apoptosis of human endothelial cells. *Febs Lett* 1996M 399:71-4 (1996)
- [35] Dimmeler S, Haendeler J, Galle J, Zeiher AM: Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis of human endothelial cells by activation of CPP32-like proteases: a mechanistic clue to the response to injury hypothesis. *Circulation* 95: 1760 (1997)

- [36] Dimmeler S, Rippmann V, Weiland U, Haendeler J, Zeiher AM: Angiotensin II induces apoptosis of human EC. Protective effect of nitric oxide. *Circ. Res.* 81:970 (1997)
- [37] Dimmeler S, Haendler J, Nehls M et al: Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1 β -converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. *J Exp Med* 185, 601-607 (1997)
- [38] Dimmeler A., Hermann C., Zeiher A.M.: Apoptosis of endothelial cells. Contribution to the pathophysiology of atherosclerosis? *European Cytokine Network*. Vol.9, Issue 4: 697-8 (1998)
- [39] Downs et al. Primary Prevention of Acute Coronary Events With Lovastatin in Men and Women With Average Cholesterol Levels. Results of AFCAPS/TexCAPS. *JAMA* 279:1615-1622 (1998)
- [40] Eitel K, Staiger H, Rieger J, Mischak H, Brandhorst H, Brendel MD, Bretzel RG, Häring HU and Kellerer M: Protein Kinase C δ Activation and Translocation to the Nucleus Are Required for Fatty Acid-Induced Apoptosis of Insulin Secreting cells. *Diabetes* 52:991-997 (2003)
- [41] Eitel K, Staiger H, Brendel MD, Brandhorst D, Bretzel RG, Häring HU, Kellerer M.: Different role of saturated and unsaturated fatty acids in beta-cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* Dec 20; 299(5): 853-6 (2002)
- [42] Erl W, Hristov M, Neureuter M, Yan Z.Y., Hansson G.K., Weber P.C.: HMG-CoA reductase inhibitors induce apoptosis in neointima-derived vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 169: 251-258 (2003)
- [43] Eto M, Kozai T, Cosentino F, Joch H, Luscher TF: Statin prevents tissue factor expression in human endothelial cells: role of Rho/Rho-kinase and Akt pathways. *Circulation* 105:1756-1759 (2002)
- [44] Fagot-Campagna A., Balkau B., Simon D., Warnet J.-M., Claude J.-R., Dicimetière P. und Eschwège E.: High free fatty acid concentration: an independent risk factor for hypertension in the Paris Prospective Study. *Int. J. Epidemiol.* 27, 808-813 (1998)
- [45] Farema JA: Pleiotropic effects of statins. *Curr Atheroscler Rep* 2:208-217 (2000)
- [46] Forst T, Kunt T, Pohlmann T, Boitom K, Engelbach M, Beyer J, Pflutzner A: biological activity of C-peptide on the skin microcirculation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 101: 2036-2041 (1998)
- [47] Fukumoto Y, Libby P, Rabkin E, Hill CC, Enomoto M, Hirouchi Y, Shimomi M, Aikawa M: Statins alter smooth muscle cell accumulation and collagen

content in established atheroma of watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Circulation* 103:993-999 (2001)

[48] Geng Y.I.: Molecular signal transduction in vascular cell apoptosis, *Cell Research*; 11(4):253-264 (2001)

[49] Geng YJ, Libby P.: Progression of atheroma: a struggle between death and procreation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:1370-1380 (2002).

[50] Geng Y, Libby P: Evidence for apoptosis in advanced human atheroma: colocalization with interleukin-1 β converting enzyme. *Am J Pathol* 1995; 147: 251-66

[51] Goekjian PG, Jirousek MR: Protein kinase C inhibitors as novel anticancer drugs. *Expert Opin Investig Drugs*. Dec; 10 (12):2117-40 (2001)

[52] Grimminger F, Mayer K, Kiss L, Wahn H, Walmrath D, seeger W: Synthesis of 4- and 5-series leukotrienes in the lung microvasculature challenged with *Escherichia coli* hemolysin: critical dependence on exogenous free fatty acid supply. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16:317-324 (1997)

[53] Gschwendt M, Muller HJ; Kielbassa K, Zhang R, Kittstein W, Rincke G, and Marks F: Rottlerin, a novel Protein kinase C Inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199, 93-98 (1994)

[54] Gutcher I, Webb PR, Anderson NG: The isoform-specific regulation of apoptosis by protein kinase C. *Cell Mol Life Sci.* Jun; 60(6):1061-70 (2003)

[55] Hall SE, Saunders J, Sonksen PH: Glucose and free fatty acid turnover in normal subjects and in diabetic patients before and after insulin treatment. *Diabetologia* 16:297-306 (1979)

[56] Hall JL, Matter CM, Wang X, Gibbons GH: Hyperglycemia inhibits vascular smooth muscle cell apoptosis through a protein kinase C-dependent pathway. *Circ Res.* 87:574-580 (2000)

[57] Haller H, Ziegler W, Lindschau C, Luft FC: Endothelial cell tyrosine kinase receptor and G protein-coupled receptor activation involves distinct protein kinase C isoforms. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16:678-686 (1999).

[58] Han D, Haudenschild C, Hong M, Tinkle B, Lcon M, Liao G.: Evidence for apoptosis in human atherosclerosis and in a rat vascular injury model. *Am J Pathol* 147: 267-77 (1995).

[59] Hardy S., Langelier Y. & Prentki M.: *Cancer Res.* 60, 6353-6358 (2000)
Hermann C, Zeiher AM, Dimmeler S.: Shear stress inhibits H₂O₂-induced apoptosis of human endothelial cells by modulation of the glutathione redox cycle and nitric oxide synthase. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17: 3588 (1997)

- [60] Hardy S., Langelier Y. & Prentki M.: Oleate Activates Phosphatidylinositol 3-Kinase and Promotes Proliferation and Reduces Apoptosis of MDA-MB-231 Breast Cancer Cells, Whereas Palmitate Has Opposite Effects. *Cancer Res.* 60, 6353-6358 (2000)
- [61] Hasdai D, Sangiorgi G, Spagnoli L.G. et al: Coronary artery apoptosis in experimental hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 142, 317-325 (1999)
- [62] Haunstetter A., Izumo S.: Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res* 82, 1111-1129 (1998)
- [63] Hanauske AR, Sundell K, Lahn M: The role of protein kinase C-alpha (PKC-alpha) in cancer and its modulation by the novel PKC-alpha specific inhibitor aprinocarsen. *Curr Pharm Des.* 10(16):1923-36 (2004)
- [64] Heart Protection Study Group: MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 360:7-22 (2002)
- [65] Inoguchi T, Battan R, Handler E, Sportsman JR, Heath W, King GL: Preferential elevation of protein kinase C isoform Beta II and diacylglycerol levels in the aorta and heart of diabetic rats: differential reversibility to glycemic control by islet cell transplantation. *ProcNatlAcadSci USA* 89: 11059-11063 (1992)
- [66] Isner J, Kearney M, Bortman S, Passeri J.: Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis. *Circulation* 1995; 91: 2703-11
- [67] Ishii H, Jirousek MR, Koya D, Takagi C, Xia P, Clermont A, Bursell SE, Kern TS, Ballas LM, Heath WF, Stramm LE, Freener EP, King GL: Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC beta inhibitor. *Science* 272: 728-731 (1996)
- [68] Ishii H, Jirousek MR, Koya D et al: Amelioration of vascular dysfunctions in diabetic rats by an oral PKC beta inhibitor. *Science* 272:728-31 (1996)
- [69] Itoh H, Yamamura S, Ware J.A., Zhuang S, Mii S, Liu B, Kent K.C.: Differential effects of protein kinase c on human vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H359-H370 (2001)
- [70] Jones PH: Diet and pharmacologic therapy of obesity to modify atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2(4): 314-20. (2000)
- [71] Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br.J. Cancer* 26: 239-57 (1972)

- [72] Kawakami A, Tanaka A, Chiba T, Nakajima K, Shimokado K, Yoshida M: Remnant lipoprotein-induced smooth muscle cell proliferation involves epidermal growth factor receptor transactivation. *Circulation* 108:2679-2688 (2003)
- [73] Khwaja A, Tatton L: Caspase-mediated proteolysis and activation of protein kinase C δ play a central role in neutrophil apoptosis. *Blood* 94:291-301 (1999)
- [74] Kiowski W: Endothelial dysfunction in hypertension. *Clin Exp Hypertens* 21 (5-6): 635-46 (1999)
- [75] Knutson KL, Hoenig M: Arachidonic acid-induced down-regulation of protein kinase C δ in beta-cells. *J Cell Biochem* 62:543-552 (1996)
- [76] Kolodgie FD, Narula J, Burke AP et al: Localization of apoptotic macrophages at the site of plaque rupture in sudden coronary death. *Am J Pathol* 157:1259-1268 (2000)
- [77] Konishi H, Yamauchi E, Taniguchi H: Phosphorylation sites of protein kinase C δ in H₂O₂-treated cells and its activation by tyrosine kinase in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:6587-6592 (2001)
- [78] Krauss, Gerhard. *Biochemie der Regulation und Signaltransduktion*. Wiley-VCH. Weinheim. New York. 1997 1. Auflage
- [79] Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M: The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* 60: 619-42 (1998)
- [80] Laufs U, La Fata V, Plutzky J et al: Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 97, 1129-1135 (1998)
- [81] Laufs U, Marra D, Node K, Liao JK: 3-Hydroxy-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors attenuate vascular smooth muscle proliferation by preventing rho GTPase-induced down-regulation of p27(Kip1). *J Biol Chem* 274:21926-21931 (1999)
- [82] Laufs U; Liao JK: Direct vascular effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Trends Cardiovasc Med* 10:143-148 (2000)
- [83] Laufs U, Liao J.K.: Isoprenoid Metabolism and the Pleotropic Effects of Statins. *Current Atherosclerosis Reports* 5:372-378 (2003)
- [84] Lefer AM, Scalia R, Lefer DJ: Vascular effects of HMG CoA-reductase inhibitors (statins) unrelated to cholesterol lowering: new concepts for cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 49:281-7 (2001)

- [85] Lewis GF, Steiner G: Hypertriglyceridemia and its metabolic consequences as a risk factor for atherosclerotic cardiovascular disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Metab Rev* 12:37-56 (1996)
- [86] Libby P, Aikawa M.: Stabilisation of atherosclerotic plaques: new mechanisms and clinical targets. *Nat Med* 8:1257-1262 (2002)
- [87] Libby P; Aikawa M: Mechanisms of plaque stabilization with statins. *Am J Cardiol* 20:4B-8B (2003)
- [88] Libby P, Aikawa M: Effects of statins in reducing thrombotic risk and modulating plaque vulnerability. *Clin Cardiol.* 26:111-14 (2003)
- [89] Li C, Xu Q: Mechanical stress-initiated signal transductions in vascular smooth muscle cells. *Cell Signal.* 12:435-445 (2000)
- [90] LIPID (Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease) study Group: Prevention of Cardiovascular Events and Death with Pravastatin in Patients with Coronary Heart Disease and a Broad Range of Initial Cholesterol Levels. *N Engl J Med.* 339:1349-1357 (1998)
- [91] Listenberger LL, Ory D.S. & Schaffer J.E. *J. Biol. Chem.* 27, 14890-14895 (2001)
- [92] Littman ED, Pitchumoni S, Garfinkel MR, Opara EC: Role of protein kinase C isoenzymes in fatty acid stimulation of insulin secretion. *Pancreas* 20:256-263 (2000)
- [93] Livneh, E., Fishman, D.D.: Linking protein kinase C to cell-cycle control. *Eur J Biochem* 248: 1-9 (1997)
- [94] Lupi R, Dotta F, Marselli L, Del Guerra S, Msini M, Santangelo C, Patane G, Boggi U, Piro S, Anello M, Bergamini E, Mosca F, Di Mario U, Del Prato S, Marchetti P: Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets: evidence that beta-cell death is caspase mediated, partially dependent on ceramide pathway, and Bcl-2 regulated. *Diabetes May;* 51(5):1437-42 (2002)
- [95] Mabile L, Meilhac O, Escargueil-Blanc I et al: Mitochondrial function is involved in LDL oxidation mediated by human cultured endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17, 1575-1582 (1997)
- [96] Maedler K, Spinas GA, Dyntar D, Moritz W., Kaiser N, et al.: Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on beta-cell-turnover and function. *Diabetes* 2001; 50:69-76 (2001)

- [97] Majumder PK, Mishra NC, Sun X et al: Targeting of protein kinase C δ to mitochondria in the oxidative stress response. *Cell Growth Differ* 129:465-470 (2001)
- [98] Mallat Z, Hugel B, Ohan J, et al: Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation* 99:348-353 (1999)
- [99] Mallat Z, Benamer H, Hugel B, et al.: Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients iwth acute coronary syndromes. *Circulation* 101:841-843 (2000)
- [100] McGarry JD: What if Minkowski had been ageusic? An alternative angle on diabetes. *Science* 258:766-770 (1992)
- [101] McNamara P, FitzGerald GA: Smoking-induced vascular disease: a new twist on an old theme. *Circ Res* 89 (7): 563-5 (2001)
- [102] McArthur MJ, Atshaves BP, Frolov A, Foxworth WD, Kier AB, Schroeder F: Cellular uptake and intracellular trafficking of long chain fatty acids. *J Lipid Res* 40:1371-1383 (1999)
- [103] Meyer R, Arteriosklerose. In: Pathologie. W Remmele (Hrsg.) Berlin, Heidelberg, Springer. Band 1: 284-293 (1999)
- [104] Mitropoulos KA, Armitage JM, Collins R, et al.: Randomized placebo-controlled study of the effects of simvastain on haemostatic variable, lipoproteins and free fatty acids. The Oxford Cholesterol Study Group. *Eur Heart J* 18:235-241 (1997)
- [105] Modan M, Halkin H, Almog S, Lusky A, Eshkol A, Shefi M, et al. Hyperinsulinemia. A link between hypertension obesity and glucose intolerance. *J Clin Invest.* 1985;75:809-17
- [106] Mueck AO, Seeger H, Wallwiener D: Further evidence for direct vascular actions of statins: effect on endothelial nitric oxide synthase and adhesion molecules. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 109:181-183 (2001)
- [107] Mühlbacher C, Karnieli E, Schaff P, Obermaier B, Mushack J, Rattenhuber E, Häring HU: Phorbol esters imitate in rat fat cells the full effect of insulin on glucose carrier translocation, but not on 3-O-methylglucose transport activity. *Biochem J* 249: 856-870 (1988)
- [108] Müller-Wieland D, Kotzka J, Krone W: Stabilization of atherosclerotic plaques during lipid lowering. *Crr Opin Lipidol* 8:348-353 (1997)
- [109] Müller-Wieland D, Faust M, Kotzka J, Krone W: Mechanismen der Plaquestabilisierung. *Herz* 24:26-31 (1999)

- [110] Mu YM, Yanase T, Nishi Y, Tanaka A, Saito M, Jin CH, Mukasa C, Okabe T, Nomura M, Goto K and Nawata H: Saturated FFAs, Palmitic Acid and Stearic Acid, Induce Apoptosis in Human Granulosa Cells. *Endocrinology* Vol.142, No. 8 3590-3597 (2001)
- [111] Murphy MC, Isherwood SG, Sethi S et al.: Postprandial lipid and hormone responses to meals of varying fat contents: modulatory role of lipoprotein lipase? *Eur J clin Nutr* 49:578-588 (1998)
- [112] Musashi M, Ota S, Shiroshita N: The role of protein kinase C isoforms in cell proliferation and apoptosis. *Int J Hematol.* Jul;72(1):12-9 (2000)
- [113] Nakamura J, Kato K, Hamada Y et al: A protein kinase C-beta-selective inhibitor ameliorates neural dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 48:2090-2095 (1999)
- [114] Natarajan V, Scribner WM, Hart CM, Parthasarathy S: Oxidized low density lipoprotein-mediated activation of phospholipase C in smooth muscle cells: a possible role in cell proliferation and atherogenesis. *J. Lipid Res.* 36:2005-2016 (1995)
- [114] Nishizuka Y: the molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 334: 661-665 (1988)
- [115] Nishizuka, Y.: Intracellular signalling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase c. *Science* 258: 607-614 (1992)
- [116] Nitt, Ergin M, Alkans S: Proteinkinase C delta is commonly expressed in multiple myeloma cells and its downregulation by Rottlerin causes apoptosis. *Br J Haematol.* 121 (6): 849-56 (2003)
- [117] Obermaier B, Ermel B, Kirsch D, Mushack J, Rattenhuber E, Biemer E, Machicao F, Häring HU: Catecholamines and tumor promoting phorbol esters inhibit insulin receptor kinase and induce insulin resistance in isolated human adipocytes. *Diabetologia* 30: 93-99 (1987)
- [118] O'Driscoll G, Green D, Taylor RR: Simvastatin, an HMG-coenzyme A reductase inhibitor, improves endothelial function within 1 month. *Circulation* 95:1126 (1997)
- [119] Ono, Y., Fuji, T., Ogita, K., Kikkawa, U., Igarashi, K. und Nishizuka, Y.: The structure, expression, and properties of additional members of the protein kinase C family. *J Biol Chem* 263: 6927-6932 (1988)
- [120] Ono, Y., Fuji, T., Ogita, K., Kikkawa, U., Igarashi, K. und Nishizuka, Y.: Protein kinase C zeta subspecies from rat brain: its structure, expression, and properties. *Proc Natl Acad Sci US* 86: 3099-3103 (1989)

- [121] Ono, Y., Fuji, T., Ogita, K., Kikkawa, U., Igarashi, K. und Nishizuka, Y.: Identification of three additional members of rat protein kinase C family: delta-, epsilon- and zeta-subspecies. *FEBS Lett* 226: 125-128. (1987)
- [122] Opie L.H. and Walfish P.G.: Plasma free fatty acid concentrations in obesity. *N. Engl. J. Med.* 268, 757-760 (1963)
- [123] Ortego M, Bustos C, Hernandez-Presa MA, Tunon J, Diaz C, Hernandez G, Egido J: Atorvastatin reduces NF-kappaB activation and chemokine expression in vascular smooth muscle cells and mononuclear cells. *Atherosclerosis* 147:253-361 (1999)
- [124] Osada, S., Mizuno, K., Saïdo, T.C., Akita, Y., Suzuki, K., Kuroki, T., Ohno, S.: A phorbol ester receptor/protein kinase, η PKC η , a new member of the protein kinase C family predominantly expressed in lung and skin. *J Biol Chem* 265: 22434-22440 (1990)
- [121] Osada S., Mizuno, K., Saïdo, T.C., Suzuki, K., Kuroki, T., Ohno, S.: A new member of the protein kinase C family, θ PKC θ , predominantly expressed in skeletal muscle. *Mol Cell Biol* 12: 3930-3938 (1992)
- [125] Ostrander D.B., Genevive C, Sparagna G.C., Amoscato A.A., McMillin J.B. & Downhan W.: Decreased Cardiolipin Synthesis Corresponds with Cytochrome c Release in Palmitate-induced Cardiomyocyte Apoptosis. *J. Biol. Chem* 276, 38061-38067 (2001)
- [126] Parker P.J., Coussens, L, Totty, N., Rhee, L., Young, S., Chen, E., Stabel, S., Waterfield, M.D., Ullrich, A.: The complete primary structure of protein kinase C- the major phorbol ester receptor. *Science* 233: 853-859 (1986)
- [127] Pedersen TR, Olsson AG, Faergeman O, et al. Lipoprotein changes and reduction in the incidence of major coronary heart disease events in the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Circulation* 97:1453-1460 (1998)
- [128] Pelikanova T, Kazdova L, Chvojkova S, Bas J. Serum phospholipid fatty acid composition and insulin action in type 2 diabetic patients. *Metabolism* 50: 1472-1478 (2001)
- [129] Perticone F, Ceravolo R, Maio R, Cloro C, Candigliota M, Scozaafava A, et al: Effects of atorvastatin and vitamin C on endothelial function of hypercholesterolemic patients. *Atherosclerosis* 152:511 (2000)
- [130] Pongracz J, Webb P, Wang K, Deacon E, Lunn OJ, Lord JM: Spontaneous neutrophil apoptosis involves caspase 3-mediated activation of protein case C- δ . *J Biol Chem* 274:37329-37334 (1999)
- [131] Ragala RP, Weems C, Jamieson L, Copland JA, Thompson EA, Fields AP: Atypical protein kinase C iota plays a critical role in human lung cancer cell

growth and tumorigenicity. *J Biol Chem.* Sep 2;280(35):31109-15. Epub 2005 Jul 1 (2005)

[132] Randle PJ, Garland PG, Hales CN: The glucose fatty acid cycle: Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1:785-789 (1963)

[133] Reaven G.M., Hollenbeck C., Jeng C.Y., Wu M.S. and Chen Y.D.I.: Measurement of plasma glucose, free fatty acid, lactate and insulin for 24 h in patients with NIDDM. *Diabetes* 37, 1020-1024 (1988)

[134] Reilly MP, Pratico D, Delanty N, DiMinno G, Tremoli E, Rader D, Kapoor S, Rokach J, Lawson J, FitzGerald GA: Increased formation of distinct F2 isoprostanes in hypercholesterolemia. *Circulation* 98 (25): 2822-8 (1998)

[135] Reyland ME, Anderson SM, Matassa AA, Barzen KA, Quissell DO: Protein kinase C delta is essential for etoposide-induced apoptosis in salivary gland acinar cells. *J Biol Chem* 274:19115-19123 (1999)

[136] Robaye B, Mosselmans R, Fiers W, Dumont JE, Galand P: TNF induces apoptosis (programmed cell death) in normal endothelial cells in vitro. *Am J Pathol* 138:447. (1991)

[137] Rosenson RS, Tangney CC: Antiatherothrombotic properties of statins. *JAMA* 27:1643-1650 (1998)

[138] Ross R: Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol* 57:791-804 (1995)

[139] Sacks FM, Moye LA, Davis BR, et al. Relationship between plasma LDL concentrations during treatment with pravastatin and recurrent coronary events in the Cholesterol and Recurrent Events trial. *Circulation* 1998;97:1446-1452.

[140] Schatz U, Eitel K, Staiger H, Häring HU; Kellerer M: Isoformen der Proteinkinase C in Endothelzellen und glatten Muskelzellen humaner Koronararterien. P-195. *Diabetes und Stoffwechsel* 12/2003

[141] Schwartz G.G. et al: MIRACL (Myocardia Ischemia Reduction with aggressive Cholesterol Lowering) Study *JAMA* 285:1711-1718 (2001)

[142] Selbie, L.A., Schmitzpfeiffer, C., Sheng, Y.H., Biden, T.J.: Molecular cloning and characterization of PKC iota, an atypical isoform of protein kinase C derived from insulin-secreting cells. *J Biol Chem* 268: 24296-24302 (1993)

[143] Seljeflot I, Tonstad S, Hjermmann I, Arnesen H: Improved fibrinolysis after 1-year treatment with HMG CoA reductase inhibitors in patients with coronary heart disease. *Thromb Res.* 105:285-290 (2002)

- [144] Sever PS, Dahlof B, Poulter NR et al: Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial-Lipid Lowering Arm (ASCOT-LIA): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet* 361:1149-1158 (2003)
- [145] Shen GX: Selective protein kinase C inhibitors and their applications. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord.* Dec; 3 (4): 301-7 (2003)
- [146] Shiba T, Inoguchi T, Sportsman JR, Heath WF, Bursell S, King GL: Correlation of diacylglycerol level and protein kinase C activity in rat retina to retinal circulation. *Am J Physiol* 265: E783-E793 (1993)
- [147] Shimabukuro M, Zhou YT, Levi M, and Unger RH: Fatty acid-induced β cell apoptosis: A link between obesity and diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* March 3; 95 (5): 2498-2502 (1998)
- [148] Shimabukuro M., Wang M.Y., Zhou Y.T., Newgard C.B. & Unger R.H.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 9558-9561 (1998)
- [149] Shizukuda Y, Reyland ME, Buttrick PM: Protein kinase C δ modulates apoptosis induced by hyperglycemia in adult ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282:H1625-634 (2002)
- [150] Sindermann JR, Fan L, Weigel KA, Troyer D, Muller JG, Schmidt A, March KL, Breithardt G: Differences in the effects of HMG-CoA reductase inhibitors on proliferation and viability of smooth muscle cells in culture. *Atherosclerosis* 150:331-341 (2000)
- [151] Singer P, Godicke W, Voigt S, Hajdu I, Weiss M: Postprandial hyperinsulinemia in patients with mild essential hypertension. *Hypertension* 7: 182-186 (1985)
- [152] Skaletz-Rorowski A, Waltenberger J, Muller JG, Pawlus E, Pinkernell K, Breithardt G: Protein kinase C mediates basic fibroblast growth factor-induced proliferation through mitogen-activated protein kinase in coronary smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19:1608-1614 (1999)
- [153] Song HJ, Sneddon AA, Barker PA, Bestwick C, Choe SN, McClinton S, Grant I, Rotondo D, Heys SD, Wahle KW: Conjugated linoleic acid inhibits proliferation and modulates protein kinase C isoforms in human prostate cancer cells. *Nutr Cancer* 49(1):100-8 (2004)
- [154] Soltoff S.P.: Rottlerin is a mitochondrial uncoupler that decreases cellular ATP levels and indirectly blocks protein kinase C δ tyrosine phosphorylation. *JBC Vol.* 276, No. 41, 37986-37992 (2001)

- [155] Stefanec T: Endothelial Apoptosis- could it have a role in the pathogenesis and Treatment of Disease? *Chest* 2000;117: 841-854 (2000)
- [156] Stolba P, Kvapil M, Wichterle D, Dvorak P: Kinetics of free fatty acids in hypertriglyceridemia. Evidence for different types of insulin resistance. *Ann NY Acad Sci* 683:373-374 (1993)
- [157] Strandberg TE, Vanhanen H, Tikkanen MJ: Effect of statins on C-reactive protein in patients with coronary artery disease. *Lancet* 353:118-119 (1999)
- [158] Stulnig TM, Berger M, Roden M, Stingl H, Raederstorff D, Waldhausl W: Elevated serum free fatty acid concentrations inhibit T lymphocyte signalling. *FASEB J* 14:939-947 (2000)
- [159] Sukhova GK, Williams JK, Libby P: Statins reduce inflammation in atheroma of nonhuman primates independent of effects on serum cholesterol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 1452-1458 (2002)
- [160] Takai, Y., Kishimoto, A., Iwasa, Y., Kawashara, Y., Mori, T., Nishizuka, Y.: Calcium-dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipids. *J Biol Chem* 254: 3692-3695 (1979)
- [161] Takayama S, White MF, Kahn CR: Phorbol ester-induced serine phosphorylation of the insulin receptor decreases its tyrosine kinase-dependent proliferation of C3H10T1/2 cells. *J Biol Chem* 272: 12897-12900 (1987)
- [162] Trevor D., Littlewood and Bennett MR: Apoptotic cell death in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* Oct; 14(5):469-75 (2003)
- [163] Tricot O, Mallat Z, Heymes C, et al.: Relation between endothelial cell apoptosis and blood flow direction in human atherosclerotic plaques. *Circulation* 2000: 101:2450-2453 (2000)
- [164] Urbich C, Dernbach E, Zeiher A.M., Dimmeler S: Double-Edged Role of Statins in Angiogenesis Signaling. *Circ Res.* 90:737-744 (2002)
- [165] Vaughan CJ, Murphy MB, Buckley BM: Statins do more than just lower cholesterol. *Lancet* 348:1079-82 (1996)
- [166] Vessby B: Dietary fat, fatty acid composition in plasma and the metabolic syndrome. *Current Opinion in Lipidology* 14:15-19 (2003)
- [167] Way KJ, Katai N, King GL: Protein kinase C and the development of diabetic vascular complications. *Diabet.Med.* 18:945-959 (2001)
- [168] Weis M, Heeschen C, Glassford AJ, Cooke JP: Statins have biphasic effects on angiogenesis. *Circulation* Feb 12; 105(6): 739-45 (2002)

- [169] Welters HJ, Tadayyon M, Scarpello JH, Smith SA, Morgan NG: Mono-unsaturated fatty acids protect against beta-cell apoptosis induced by saturated fatty acids, serum withdrawal or cytokine exposure. *FEBS Lett.* 27;560 (1-3):103-8 (2004)
- [170] Werner N, Nickenig G, Laufs U: Pleiotropic effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Basic Res Cardiol* 97:105-116 (2002)
- [171] West of Scotland Coronary Prevention Study Group (WOSCOPS Study) *Circulation.* 97:1440-1445 (1998)
- [172] Wilson M.M.G., Thomas D.R: Dietary Factors in Atherogenesis. *Current Atherosclerosis Reports* 5:324-330 (2003)
- [173] Wolever TM, Bentum-Williams A, Jenkins DJ: Physiological modulation of plasma free fatty acid concentrations by diet. Metabolic implications by diet. Metabolic implications in nondiabetic subjects. *Diabetes Care* 18: 962-970 (1995)
- [174] Wyllie A.H.: Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature* 284, 555-556 (1980).
- [175] Wyllie A.H.: Apoptosis and carcinogenesis. *Europ. J. Cell. Biol.* 73, 189-197 (1997)
- [176] Xie J, Guo Q, Zhu H, Wooten MW, Mattson MP: Protein kinase C δ protects neural cells against apoptosis induced by amyloid beta-peptide. *Brain Res Mol Brain Res.* Oct 20;82(1-2):107-13 (2000)

10 Danksagung

Ich danke allen, die mich auf dem Weg von der Pipette bis zur PC-Tastatur unterstützt haben.

Herrn Prof. Dr. H.U. Häring danke ich für die freundliche Aufnahme in seine Abteilung, die gute Beratung und die Möglichkeit an seinem Institut promovieren zu dürfen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Monika Kellerer für die Bereitstellung des interessanten Themas und die freundliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe. Ich danke ihr für ihr Engagement, ihre stets schnelle und effiziente Hilfe und ihre hervorragende Betreuung.

Meinen beiden exzellenten Betreuern Dr. med. Katrin Staiger und Dr. rer. nat. Harald Staiger danke ich herzlich für ihre enthusiastische Einführung in die Zellbiologie, die hervorragende Einweisung in die laborchemischen Arbeitsmethoden, die hilfsbereite Unterstützung und die gute Atmosphäre, unter der es Spaß gemacht hat zu arbeiten.

Dr. med. F. Macchicao und Dr. med. Bernd Balletshofer danke ich für ihre freundliche, weiterführende Hilfe.

Schließlich danke ich herzlich meinen Eltern, meinem Bruder Reinhard und meinen Freunden, die mich stets ermutigten, vorantrieben und unterstützten.

11 Lebenslauf

Name: Ulrike Schatz
Geboren: 25.10.1978 in Lahn-Giessen
Eltern: Prof. Dr. med. Helmut Schatz, Dr. med. Christa Schatz

1985-1990 Grundschule Giessen und Ludwig Uhland Schule Giessen
1990-1998 Schiller-Gymnasium Bochum, Abschluss: Abitur
1995-1996 St. Hilda's Collegiate School, Dunedin, Neuseeland
1996 Cambridge Certificate of Proficiency in English

1999-2002 Studium der Humanmedizin an der Philipps-Universität, Marburg
27.03.2001 Ärztliche Vorprüfung an der Philipps-Universität, Marburg
21.03.2002 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung an der Philipps-Universität, Marburg

2002 Fortsetzung des Studiums der Humanmedizin an der Eberhardt-Karls-Universität Tübingen

2001 Famulatur in Innerer Medizin bei Prof. I. Campbell, Schottland
2002 Famulatur in Gynäkologie und Geburtshilfe, Queensland University, Australien.
2004 Famulaturen in Innerer Medizin und Pädiatrie in Tübingen

2002-2005 Medizinische Doktorarbeit in der endokrinologischen Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. M. Kellerer, Innere Medizin IV (Prof. Dr. med. H.U. Häring), Universitätsklinikum Tübingen

23.03.2005 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung an der Eberhardt-Karls-Universität, Tübingen
17.05.2006 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung an der Eberhardt-Karls-Universität, Tübingen