

Lehrstuhl für Ernährungsphysiologie

**Einfluss der Isoflavonoide Genistein und Daidzein auf das Proteom
humaner Endothelzellen *in vitro* und mononukleärer Blutzellen
in vivo im Kontext ihrer postulierten anti-atherogenen Aktivität**

Dagmar Fuchs

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Michael Schemann

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Hannelore Daniel
2. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Gerald Rimbach,
Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Die Dissertation wurde am 06.04.2006 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 19.06.2006 angenommen.

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Vorwort.....	1
1.2	Atherosklerose	3
1.2.1	Definition und Pathogenese der Atherosklerose.....	3
1.2.2	Risikofaktoren	6
1.2.2.1	Homocystein	6
1.2.2.2	Lipoproteine	12
1.3	Phytoöstrogene	19
2	Ziele der vorliegenden Arbeit.....	23
3	Material und Methoden	24
3.1	Materialien.....	24
3.1.1	Verwendete Zellen	24
3.2	Methoden	25
3.2.1	Zellkultur.....	25
3.2.2	Isolierung der PBMC.....	26
3.2.3	Zwei-Dimensionale Gelelektrophorese	26
3.2.3.1	Proteinisolierung	26
3.2.3.2	Isoelektrische Fokussierung.....	27
3.2.3.3	Herstellung von SDS-Gelen	27
3.2.3.4	SDS-Polyacrylamide-Gelelektrophorese.....	27
3.2.3.5	Proteinfärbung.....	28
3.2.4	Software-gestützte Auswertung der 2D-Gele.....	28
3.2.5	Massenspektrometrische Analyse der Proteine.....	29
3.2.5.1	Enzymatischer Verdau und Matrices	29
3.2.5.2	MALDI-TOF-MS	29
3.2.5.3	Peptide Mass Fingerprinting	30
3.2.6	Analyse der mRNA-Spiegel	30
3.2.6.1	RNA-Isolierung.....	30
3.2.6.2	Real-Time PCR.....	30
3.2.7	Ermittlung der Apoptoseinduktion	32
3.2.7.1	Bestimmung der Caspase-3-, Caspase-6- und Caspase-8- Aktivität.....	32
3.2.7.2	Desintegration der Plasmamembran.....	32
3.2.7.3	DNA-Fragmentierung und Chromatin-Kondensation	33
3.2.8	Interventionsstudie mit Phytoöstrogenen - Interventionsstudie „Isoheart“	33
4	Ergebnisse.....	35
4.1	<i>In vitro</i> Studien zur Wirkung von Isoflavonoiden auf Endothelzellen	35
4.1.1	Proteomanalyse von Zellkulturen.....	35
4.1.1.1	Proteomanalyse von HUVEC.....	35
4.1.1.1.1	Einfluss von Genistein auf das Proteom von HUVEC nach Exposition gegenüber Hcy.....	36
4.1.1.1.2	Wirkung von Genistein auf das Proteom ox-LDL behandelter HUVEC	37
4.1.1.2	Proteomanalyse von Extrakten aus EA.hy926 Zellen	39
4.1.1.2.1	Homocystein-vermittelte Effekte auf die Spiegel zellulärer Proteine von EA.hy926 Zellen.....	39

4.1.1.2.2	Effekte von Genistein auf die <i>steady state</i> Spiegel der Proteine von EA.hy926 Zellen nach Exposition gegenüber Hcy.....	40
4.1.1.2.3	Einfluss des Genistein/Daidzein-Gemisches auf das Proteom von EA.hy926 Zellen nach Exposition gegenüber Hcy	42
4.1.1.2.4	Wirkung des Extraktes S40cl auf die Proteinspiegel von EA.hy926 Zellen nach Exposition gegenüber Hcy	45
4.1.1.2.5	Ox-LDL vermittelte Veränderungen der Proteinspiegel von EA.hy926 Zellen	49
4.1.1.2.6	Einfluss von Genistein auf das Proteom von EA.hy926 Zellen nach Exposition gegenüber ox-LDL.....	50
4.1.1.2.7	Wirkung des Genistein/Daidzein-Gemisches auf die Spiegel von Proteinen nach Exposition der Zellen gegenüber ox-LDL.....	52
4.1.1.2.8	Effekte des Extraktes S40cl auf das Proteom von EA.hy926 Zellen nach Exposition gegenüber ox-LDL.....	54
4.1.1.2.9	Stressor-unabhängige Wirkungen von Genistein auf das Proteom von EA.hy926 Zellen.....	56
4.1.1.2.10	Effekte des Genistein/Daidzein-Gemisches auf das Proteom von EA.hy926 Zellen	58
4.1.1.2.11	Einfluss des Extraktes S40cl auf das Proteom von EA.hy926 Zellen	59
4.1.2	Analyse der Apoptose von EA.hy926 Zellen.....	61
4.1.2.1	Homocystein-induzierte Apoptose von EA.hy926 Zellen	62
4.1.2.2	Wirkung von Genistein, GenDai und S40cl auf die durch Homocystein ausgelöste Apoptose von EA.hy926 Zellen	63
4.1.2.3	Ox-LDL-induzierte Apoptose von EA.hy926 Zellen	63
4.1.2.4	Einfluss von Genistein, GenDai und S40cl auf die ox-LDL-induzierte Apoptose von EA.hy926 Zellen.....	64
4.2	<i>In vivo</i> Studie zur Wirkung von Phytoöstrogenen auf das Proteom humaner PBMC	66
5	Diskussion.....	68
5.1	Die Wirkung von Isoflavonoiden in Endothelzellen <i>in vitro</i>	70
5.1.1	Effekte von Genistein auf das Proteom von HUVEC nach Exposition gegenüber Stressoren.....	71
5.1.2	Vergleich der Wirkungen von Genistein, des Genistein/Daidzein-Gemisches und des Extraktes S40cl auf das Proteom von EA.hy926 Zellen nach ihrer Exposition gegenüber Hcy und ox-LDL	74
5.2	Einfluss der Phytoöstrogene auf das Proteom humaner PBMC <i>in vivo</i>	86
6	Synopse	90
7	Zusammenfassung	94
8	Summary	95
9	Literaturverzeichnis.....	96
10	Anhang.....	114
10.1	Eigene Veröffentlichungen.....	114
10.2	Abkürzungsverzeichnis	115
10.3	Abbildungsverzeichnis	118
10.4	Tabellenverzeichnis	120
10.5	Liste identifizierter Proteine.....	121

10.6	Verwendete Primer	142
10.7	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	143
10.8	Geräte	146
10.9	Puffer und Lösungen.....	147
10.10	Danksagung	152
10.11	Curriculum Vitae.....	153

1 Einleitung

1.1 Vorwort

Koronare Herzerkrankungen verursachen über 40% aller Todesfälle in Westeuropa, den Vereinigten Staaten und Australien (Sytkowski PA et al., 1990; Tunstall-Pedoe H et al., 1994; Yutani C et al., 1999; Collins P, 2002). In den letzten 50 Jahren wurden vorwiegend durch epidemiologische Studien eine Vielzahl an Risikofaktoren für die koronare Herzerkrankung erkannt, die in genetische und umweltbedingte Determinanten unterteilt werden können (Lusis AJ, 2000). Tabelle 1.1 fasst die verschiedenen Risikofaktoren zusammen.

Pre-menopausale Frauen scheinen von koronaren Herzerkrankungen seltener betroffen zu sein als Männer, jedoch verringert sich dieser Unterschied im Risiko für eine kardiovaskuläre Erkrankung nach der Menopause (Maxwell SR, 1998; Chase SK & Youngkin EQ, 2004). Die geringere Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen bei pre-menopausalen Frauen wird auf die kardioprotektive Wirkung von Östrogen zurückgeführt (Walters J et al., 2003). Die physiologischen Funktionen des arteriellen Endothels nehmen mit Einsatz der Menopause bei Frauen signifikant schneller ab als bei gleichaltrigen Männern (McCrohon JA et al., 2000). Mit der Menopause steigt auch die Expression und Sekretion an entzündungsfördernden Zytokinen, wie Interleukin-1 und -6 oder des Tumor Nekrose Faktors α (TNF α), was durch die Behandlung mit Östrogen wieder aufgehoben werden kann (Pfeilschifter J et al., 2002). Daher wurde vor einigen Jahren große Hoffnung in die Östrogen-Ersatz-Therapie zur Prävention der Atherosklerose bei postmenopausalen Frauen gesetzt. Die Östrogen-therapie sollte die Plasmalipidspiegel verändern, die Thrombozytenadhäsion und -aggregation verringern, eine durch das Endothel vermittelte Vasodilatation verstärken und antioxidative Effekte ausüben (Maxwell SR, 1998). Jedoch legen neuere Studien die Vermutung nahe, dass die Hormon-Ersatz-Therapie lediglich das gesunde Endothel günstig beeinflusst, aber einen eher schädlichen Einfluss ausübt, wenn sich bereits eine kardiovaskuläre Erkrankung etabliert hat (Maas AH, 2004).

Epidemiologische Studien lassen vermuten, dass der Konsum von Sojaprodukten das Risiko koronarer Herzerkrankungen zu senken vermag (Merz-Demlow BE et al., 2000; Zhang X et al., 2003). Diese protektive Wirkung wird auf die in Soja reichlich vorkommenden Isoflavonoide zurückgeführt, die schwache östrogene Eigenschaften aufweisen (Barnes S, 2004; Valachovicova T, et al., 2004). Diese scheinbar präventive Wirkung der Isoflavonoide konnte durch verschiedene *in vitro* und *in vivo* Studien substantiiert werden, wenngleich die zugrunde liegenden Mechanismen ihrer Wirkung nicht hinreichend geklärt sind (Cassidy A & Griffin B, 1998). In der vorliegenden Schrift werden die Befunde zur Wirkung isolierter Isoflavonoide und eines Soja-Extraktes auf das Proteom von Endothelzellen *in vitro*, sowie auf das Proteom von mononukleären Blutzellen (*peripheral blood mononuclear cells* – PBMC) *in vivo* dargestellt, die mittels Proteomanalyse erhoben wurden und dem Zweck

dienten, Zielproteine der Isoflavonoide und mögliche molekulare Mechanismen ihrer Atherosklerose-protectiven Wirkung zu identifizieren.

Tab 1.1 Mögliche genetische und umweltbedingte Risikofaktoren in der Genese von Atherosklerose und koronaren Herzerkrankungen (Lusis AH, 2000).

Faktoren mit einer starken genetischen Komponente	
Erhöhte Spiegel an LDL/VLDL	Assoziation in epidemiologischen Studien belegt und durch Studien genetischer Funktionsstörungen sowie Tierversuche bestätigt. Klinische Studien belegen zudem den Nutzen einer Reduktion des LDL-Cholesterins.
Verringerte Spiegel an HDL	Assoziation in zahlreichen epidemiologischen Studien belegt und durch Studien genetischer Funktionsstörungen sowie Tierversuche bestätigt.
Erhöhte Spiegel des Lipoprotein(a)	Verbindung in vielen, jedoch nicht allen, epidemiologischen Studien beobachtet. Tierversuche zeigten widersprüchliche Ergebnisse.
Erhöhter Blutdruck	Verbindung konnte in epidemiologischen Studien beobachtet werden. Klinische Studien belegen den Nutzen einer Blutdrucksenkung mit zum Teil starken Effekten auf die Verminderung des Schlaganfallrisikos.
Erhöhte Spiegel an Homocystein	Verbindung konnte in epidemiologischen Studien beobachtet werden und Hyperhomocysteinämie führt zu einer schweren Gefäßverschlusskrankheit.
Familiäre Geschichte	Eigenständiger und umweltunabhängiger Risikofaktor genetischer (familiärer) Prädisposition.
Diabetes und Übergewicht	Verbindung in epidemiologischen Studien und Studien an Tiermodellen beobachtet.
Erhöhte Spiegel an Gerinnungsfaktoren	Signifikante, unabhängige Verknüpfung konnte bei erhöhten Spiegeln an Fibrinogen, Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1 und der Blutplättchen-Reaktivität beobachtet werden.
Depression und weitere Verhaltensanomalien	Assoziation konnte in mehreren Kohortenstudien beobachtet werden.
Geschlecht	In Altersklassen unter 60 Jahren treten koronare Herzerkrankungen bei Männern mehr als zweimal so häufig wie bei Frauen auf.
Systemische Entzündung	Erhöhte Spiegel an pro-inflammatorischen Mediatoren stehen in engem Zusammenhang mit koronaren Herzerkrankungen.
Metabolisches Syndrom	Die Insulinresistenz als Hauptmerkmal des Metabolischen Syndroms ist eng mit der Genese koronarer Herzerkrankungen verknüpft.
Umweltbedingte Faktoren	
Fettreiche Ernährung	Migrationsstudien und andere epidemiologische Studien weisen auf eine starke Verbindung zwischen dem Lebensstil und koronaren Herzerkrankungen hin und die Ernährung scheint dabei der einflußreichste Faktor zu sein.
Rauchen	Starke Assoziation in zahlreichen epidemiologischen Studien belegt. Starke Abnahme des Risikos nach Rauchtätigkeit in Interventionsstudien bestätigt.
Geringer Spiegel an Antioxidantien	Befunde aus klinischen Studien mit erhöhter Antioxidanzzufuhr lassen keinen Nutzen erkennen; in tierexperimentellen Studien ist jedoch der Schutz vor Atherosklerose durch fettlösliche Antioxidantien demonstriert.
Mangel an sportlicher Betätigung	Signifikanter Zusammenhang zur Atherogenese belegt.
Infektionserreger	Epidemiologische Studien lieferten Hinweise auf eine Verbindung einer Infektion mit Chlamydia pneumoniae und Atherosklerose. Vorläufige Befunde aus Tierstudien belegen den Zusammenhang.

1.2 Atherosklerose

1.2.1 Definition und Pathogenese der Atherosklerose

Die Arteriosklerose stellt die häufigste Systemerkrankung der Arterien dar. Sie umschließt eine Reihe chronisch fortschreitender Degenerationen der Gefäßwand, welche sich auf Grund eines fibrösen Umbaus verdickt, verhärtet und an Elastizität verliert. Die der Arteriosklerose zugrunde liegende Atherosklerose bezeichnet eine chronisch fortschreitende, herdförmige Veränderung der Intima und der inneren Schichten der Media von makrovaskulären Blutgefäßen (Lusis AJ, 2000). Im Verlauf der Atherosklerose entsteht durch Bindegewebswucherungen eine Sklerose, die eine Verhärtung und Verdickung der Gefäßwand bedingt. Durch hyaline Quellung von Substanzen des elastischen und kollagenen Bindegewebes und auch durch Einlagerung von Lipiden kommt es zu einer Atheromatose, d.h. einer degenerativ-nekrotisierenden Veränderung der Intima. Im Anfangstadium der Atherosklerose sind keine Symptome erkennbar, erst nach mehreren Jahrzehnten treten klinische Erscheinungen auf (Till U, 1999), wie Myokardinfarkt, Gehirninfarkt oder Schlaganfall bzw. Funktionsverluste in peripheren Gefäßen (Ross R, 1995).

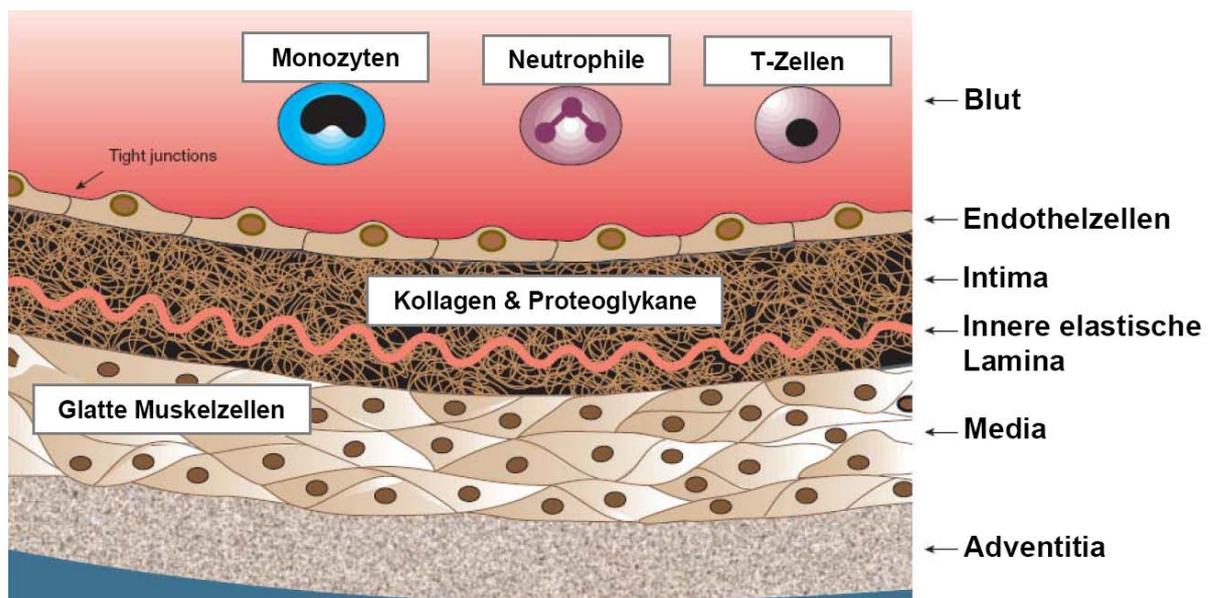


Abb. 1.1 Aufbau einer gesunden Arterie.
(modifiziert nach Lusis AJ, 2000).

Modelle zur Entstehung der Atherosklerose basieren auf der 1973 von Russel Ross und John Glomset aufgestellten *response to injury* Hypothese. Diese geht davon aus, dass vor der Erkrankung eine Verletzung des Endothels erfolgt (Ross R & Glomset JA, 1973). Die Hypothese wurde seitdem vielfach untersucht und modifiziert, doch die aktuellen Modelle basieren noch auf der ursprünglichen Hypothese. Zum besseren Verständnis der Hypothese wird im Folgenden kurz der Aufbau einer Arterie erläutert. Die Arterienwand besteht aus drei Schichten, der inneren Intima, der Media – die in der Mitte gelegene Schicht – und der äußeren Adventitia. Direkt von der Atherogenese ist jedoch lediglich die Intima betroffen

(Hajjar DP & Nicholson AC, 1995). Die Intima, die vor allem aus Proteoglycanen und Kollagen besteht, wird zum Arterienlumen hin von einer Schicht aus Endothelzellen ausgekleidet. Die Media besteht aus einer Schicht aus glatten Muskelzellen, wohingegen sich die Adventitia aus Bindegewebe zusammensetzt, das von Fibroblasten und glatten Muskelzellen durchsetzt ist (siehe Abb. 1.1, Seite 3). In der initialen Phase der Atherosklerose kommt es infolge von funktionellen und/oder strukturellen Beschädigungen der Endothelzellen zu einer veränderten Expression von Genen und einem Einstrom von Lipoproteinen, vornehmlich Lipoproteinen niedriger Dichte (low density lipoproteins - LDL), in den subendothelialen Raum. Die LDL-Partikel werden mittels passiver Diffusion in die Intima aufgenommen und dort verschiedenen Veränderungen, wie Oxidation, Lipolyse, Proteolyse oder Aggregation, unterzogen (Lusis AJ, 2000). Diese Modifikationen tragen zu einem Entzündungsprozeß bei (Langheinrich AC & Bohle RM; 2005). Die Endothelzellen sezernieren Adhäsionsmoleküle, vor allem das interzelluläre Adhäsionsmolekül I (ICAM-I), das vaskuläre Zelladhäsionsmolekül I (VCAM-I) und das Plättchen-Endothelzell-Adhäsionsmolekül (PECAM). Diese stimulieren das Anheften von Monozyten, T-Lymphozyten und Plättchen sowie deren Eindringen in den subendothelialen Raum (Libby P, 2000). Dort werden die Monozyten zu Makrophagen aktiviert und locken T-Lymphozyten an (Ross R, 1995). Die aktivierten Makrophagen nehmen veränderte, vor allem oxidierte, Lipide auf und werden zu Schaumzellen (siehe Abb. 1.2, Seite 5). Die Schaumzellen sind Hauptbestandteil des ersten erkennbaren Schadbildes der Atherosklerose, den sogenannten *fatty streaks* (Hajjar DP & Nicholson AC, 1995). Stimuli wie chemotaktische Faktoren oder Mitogene, die von Endothelzellen und Makrophagen sezerniert werden, führen zur Migration von glatten Muskelzellen, die im gesunden Blutgefäß in der Media angesiedelt sind, in die Intima (Ross R, 1995; Hajjar DP & Nicholson AC, 1995). Die in der Intima proliferierenden glatten Muskelzellen akkumulieren in ihrem Inneren ebenfalls Lipide (Hajjar DP & Nicholson AC, 1995) und es tritt das Schadbild der *fibrofatty lesions* auf. Die *fibrofatty lesions* sind aus Schichten von Schaumzellen oder glatten Muskelzellen, umgeben von Bindegewebe, zusammengesetzt. In der Intima produzieren die glatten Muskelzellen Wachstumsfaktoren (PDGF, FGF, IGF-I, M-CSF, TGF β und HB-EGF) und Zytokine (IL-1 und TNF α), womit sie sich selbst und auch parakrin Nachbarzellen stimulieren (Ross R, 1995). Dies bedingt eine Proliferation von Kollagenfibrillen, elastischen Fasern und Proteoglykanen und somit die Entstehung von extrazellulärer Matrix, die eine fibröse Plaque bildet (Lusis AJ, 2000). T-Zellen setzen Interferon- γ (IFN- γ) frei, das glatte Muskelzellen an der Bildung von extrazellulärer Matrix hindert, und Makrophagen bilden Proteasen, wie die interstitielle Kollagenase, Gelatinase und Stromelysin, die die extrazelluläre Matrix abbauen (Libby P, 2000), was zu Plaquebrüchen führt. In fortgeschrittenen atherosklerotischen Läsionen verknöchert die Intima aufgrund eines von Perizyten-ähnlichen Zellen gebildeten Matrix-Gerüsts, das schließlich kalzifiziert. Dieser

durch Oxysterole und Zytokine regulierte Prozess bestimmt die Stabilität der Plaque entscheidend (Lusis AJ, 2000).

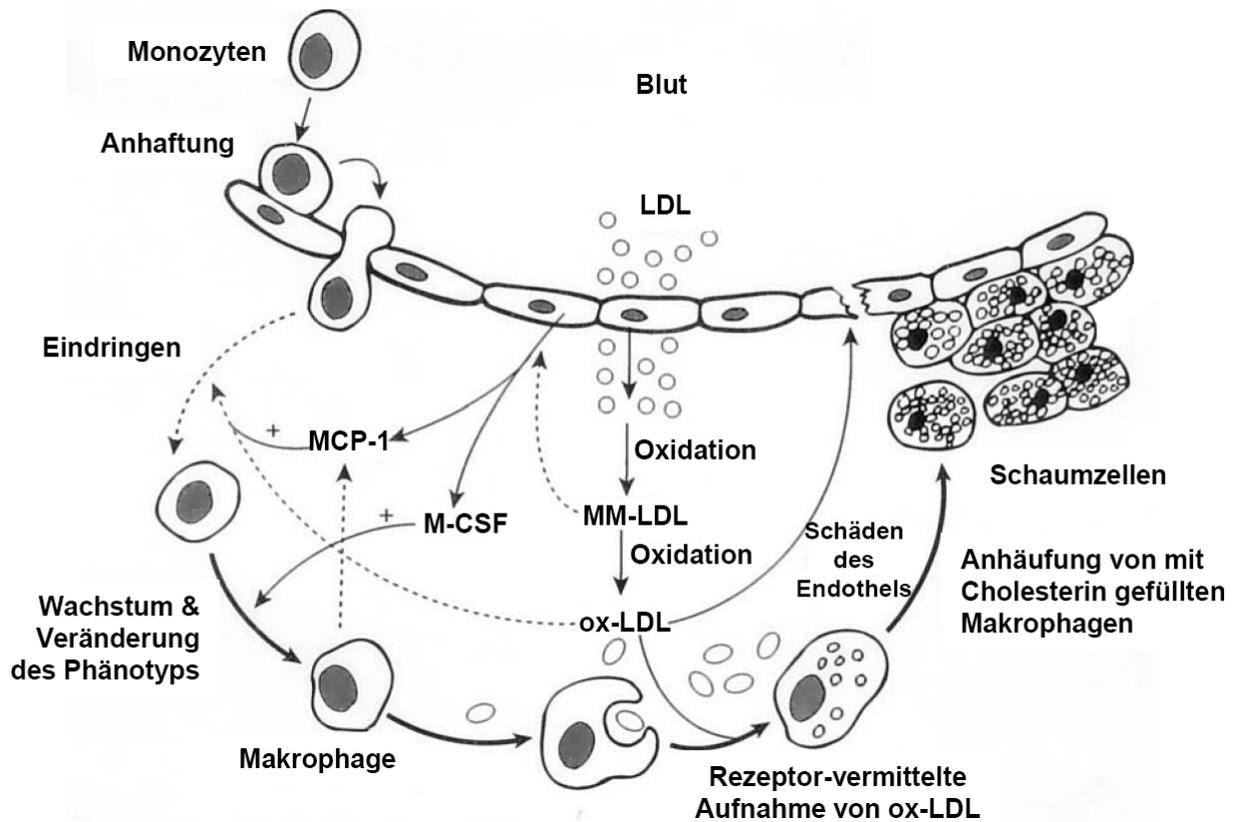


Abb. 1.2 Schematische Darstellung der frühen Phasen der Atherogenese.

Die Endothelschicht wird beschädigt: LDL dringt in die Intima ein, wo es oxidativ verändert wird. Monozyten gelangen in die Gefäßwand und nehmen oxidierte LDL-Partikel auf, so dass Schaumzellen entstehen (Stipanuk MH, 2000). MM-LDL, leicht oxidiertes LDL; ox-LDL, oxidiertes LDL; M-CSF, Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor; MCP-1, Monozyten chemotaktisches Protein.

1.2.2 Risikofaktoren

1.2.2.1 Homocystein

Stoffwechsel des Homocysteins

Homocystein (Hcy) ist eine nicht-proteinogene, schwefelhaltige Aminosäure und wird als Zwischenprodukt des Methioninstoffwechsels durch Abspaltung der Methylgruppe aus Methionin gebildet. Abbildung 1.3 zeigt die Strukturformel der Aminosäure Hcy.

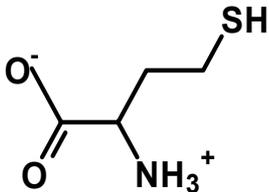


Abb. 1.3 Strukturformel von Homocystein.

Hcy kann entweder durch Remethylierung wieder in Methionin überführt werden oder durch Transsulfurierung in Cystein umgewandelt werden (siehe Abb. 1.4, Seite 7). Bei der Remethylierung entstammt die Methylgruppe dem N-5-Methyltetrahydrofolat oder dem Betain. Die mit N-5-Methyltetrahydrofolat ablaufende Reaktion ist Vitamin B₁₂-abhängig und erfolgt in allen Geweben, wohingegen die Reaktion mit Betain unabhängig von Vitamin B₁₂ ist und lediglich in Leber und Niere abläuft. Aus Methionin wird mittels Aktivierung mit ATP S-Adenosylmethionin (SAM) gebildet, das als wichtiger Methylgruppen-Donor im Intermediär-Stoffwechsel agiert. Nach Abgabe der Methylgruppe entsteht aus SAM S-Adenosylhomocystein (SAH), das zu Hcy und Adenosin hydrolysiert wird. Hcy, das nicht zur Übertragung von Methylgruppen benötigt wird, kann in der Transsulfurierung abgebaut werden. Dazu kondensiert Hcy mit Serin zu Cystathionin, was von der Cystathionin-β-Synthase katalysiert wird. Nach Hydrolyse durch die γ-Cystathionase entsteht aus Cystathionin schließlich Cystein und Homoserin. Cystein kann zu Taurin oder anorganischen Sulfaten oxidiert oder über den Urin ausgeschieden werden (Selhub J, 1999; Finkelstein JD & Martin JJ, 2000; Hajjar KA, 2001; Lawrence de Koning AB et al., 2003). Der vollständige Abbau von Cystein resultiert in der Bildung von Pyruvat, während Homoserin zu Succinyl-CoA abgebaut werden kann. Beide Endprodukte stellen glukogene Substrate dar. Die für die Vitamin B₆ abhängige Transsulfurierung erforderlichen Enzyme werden nur in der Leber, Niere, Dünndarm und Pankreas gebildet (Finkelstein JD & Martin JJ; 2000).

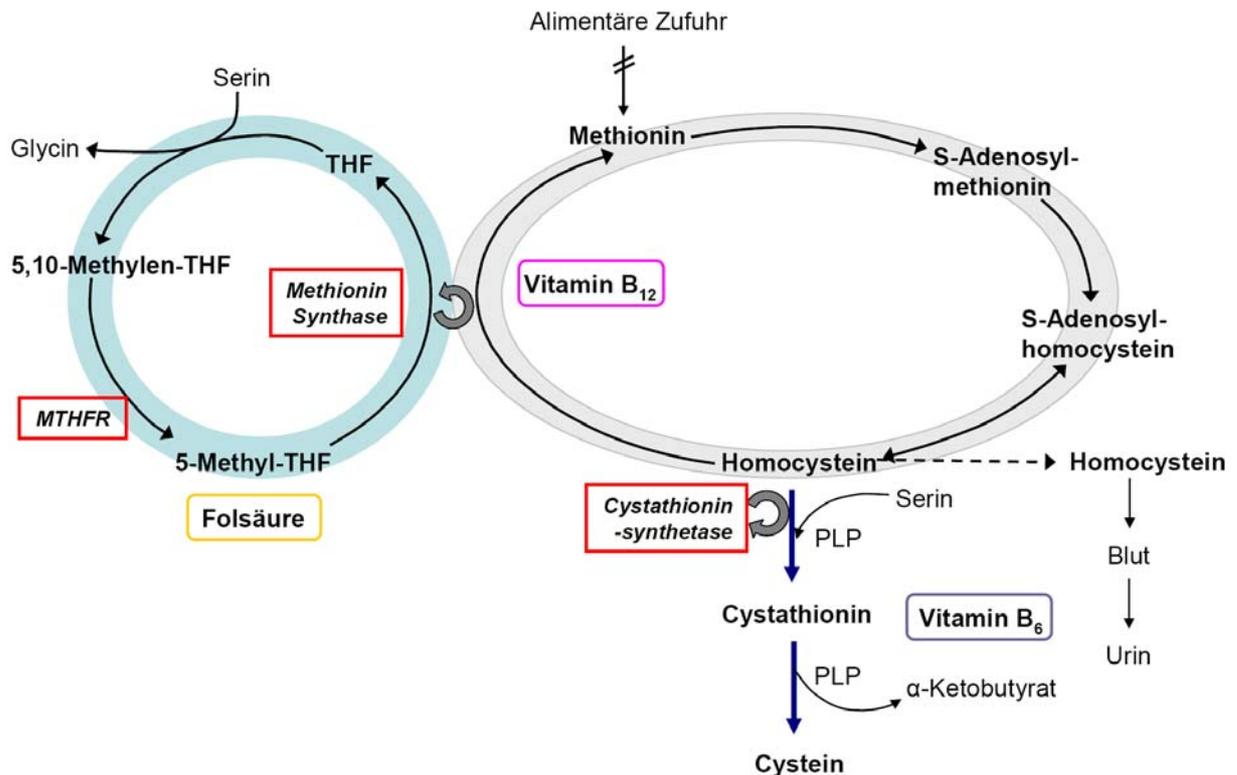


Abb. 1.4 Homocystein-Stoffwechsel
(modifiziert nach Biesalski H.K. & Grimm P., 2004)

Genetische Grundlagen der Hyperhomocysteinämie

Die Hyperhomocysteinämie (HHcy), die durch einen genetischen Enzymdefekt oder aufgrund einer unzureichenden Versorgung eines oder mehrerer am Homocystein-Stoffwechsel beteiligter Vitamine verursacht wird, stellt einen wichtigen unabhängigen Risikofaktor für die Atherosklerose dar (Clarke R et al., 1991; McCully KS, 1996; Selhub J, 1999; Ueland PM et al., 2000). Die HHcy kann in drei verschiedene Schweregrade eingeteilt werden. Bei der milden Form, unter der 5-7% der Bevölkerung leiden, liegen Plasmaspiegel über 10 µmol/L an Hcy vor. Der Plasmaspiegel von Patienten mit einer moderaten HHcy liegt über 30 µmol/L und bei der schweren Variante über 100 µmol/L (Brattstrom L & Wilcken DEL, 2000). Bereits bei einer milden HHcy ist das Risiko an Atherosklerose zu erkranken erhöht (Lawrence de Koning AB et al., 2003), wobei die Relation zur Mortalität bei Plasmaspiegeln über 15 µmol/L am höchsten ist (Nygard O et al., 1997).

Die HHcy kann auf verschiedenen genetischen Defekten beruhen, die die Enzyme Cystathionin-β-Synthase, Methylentetrahydrofolat-Reduktase (MTHFR) und Methionin-Synthase betreffen (Medina MA & Amores-Sánchez MI, 2000). Die Relevanz dieser Enzymdefekte wird in den folgenden Abschnitten erläutert.

Die häufigste Ursache für eine schwere HHcy oder Homocystinurie ist eine autosomal rezessiv vererbte, homozygote Defizienz der Cystathionin-β-Synthase. Mehr als 60 verschiedene Mutationen des Gens sind beschrieben worden, wobei der Austausch von

Aminosäuren, wie z.B. bei den Mutationen I278T und G307S, am weitesten verbreitet sind (Medina MA & Amores-Sánchez MI, 2000). Ein homozygoter Defekt der Cystathionin- β -Synthase beeinträchtigt die Transsulfurierung, Hcy wird verstärkt der Remethylierung unterzogen. Die Methionin Synthese steigt an und zieht eine zeitweilige Zunahme der intrazellulären SAM Konzentration nach sich. Die SAM-Spiegel steigen an, bis sie zu einer Hemmung der MTHFR führen und die Remethylierung unterbunden wird. Beide Reaktionswege des Hcy Stoffwechsels sind somit beeinträchtigt, was in einer schweren HHcy resultiert. Im Fall eines heterozygoten Defekts der Cystathionin- β -Synthase ist die Funktion der Remethylierung gewährleistet und die restliche Aktivität der Transsulfurierung reicht aus, um das Auftreten der HHcy zu verhindern (Selhub J, 1999).

Der genetische Schaden, der am häufigsten mit der milden HHcy in Verbindung gebracht wird, ist eine Punktmutation der MTHFR und zwar eine Substitution des Cytosins an Position 677 des MTHFR-Gens gegen ein Thymin. Die autosomal rezessive Mutation variiert zwischen den Rassen und ethnischen Gruppen, mit 10-13% T/T Homozygoten und 50% C/T Heterozygoten innerhalb der kaukasischen und asiatischen Bevölkerung und einem sehr geringen Vorkommen bei Afro-Amerikanern. (Medina MA & Amores-Sánchez MI, 2000). Die Mutation der MTHFR resultiert in einer thermolabilen Form des Enzyms mit einer geringeren Aktivität und damit in einer verminderten Synthese von Methionin, da Folsäure nicht in einer ausreichenden Menge vorhanden ist. Das für die Remethylierung bestimmte Hcy wird der Transsulfurierung zugeführt. Diese kann jedoch das zusätzliche Hcy nicht umsetzen, da die verringerte Synthese von Methionin zu einer intrazellulären Abnahme der SAM Konzentration führt. Der Mangel an N-5-Methyltetrahydrofolat begünstigt die Aktivität der Glycin-N-Methyltransferase. Diese gesteigerte Aktivität bedingt erneut die Abnahme der SAM-Spiegel und einen Anstieg der Hcy Konzentration als ein Nebenprodukt der Methylierung von Glycin. Die Transsulfurierung wird durch die zunehmende Belastung mit Hcy in Kombination mit einer Konzentration an SAM, die für die Aktivierung der Cystathionin Synthese zu gering ist, außer Kraft gesetzt. Hcy akkumuliert folglich in der Zelle und wird an das Blut abgegeben, was die HHcy verursacht (Selhub J, 1999). Bei Homozygotie des T677 Allels sind die Plasmaspiegel an Hcy gegenüber den Genotypen CC und CT um 40% erhöht, wobei die Konzentration an Hcy im Plasma der Genotypen CC und CT vergleichbar ist (Gudnason V & Humphries SE, 1999). Dem entsprechend scheint das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen nur bei dem MTHFR TT-Polymorphismus erhöht zu sein, jedoch nicht bei dem CT Genotyp (Gardemann A et al., 1998).

Auch für die Methionin Synthese konnten Polymorphismen nachgewiesen werden, wobei die Mutation D929G am weitesten verbreitet ist. Diese Substitution eines Glycin gegen ein Aspartat geht mit einer geringen oder nicht erkennbaren Auswirkung auf das Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen einher (Medina MA & Amores-Sánchez MI, 2000).

Mechanismen der Atherogenesebeeinflussung durch Homocystein

Erhöhte Hcy-Spiegel können die Entstehung und Entwicklung der Atherosklerose über verschiedene Mechanismen fördern. Im Folgenden werden die drei am häufigsten diskutierten Mechanismen - die Stimulierung von Entzündungsprozessen, von oxidativem Stress und von Stress des endoplasmatischen Retikulums - kurz dargestellt.

Die Atherogenese ist durch eine chronische Entzündung gekennzeichnet (siehe Kapitel 1.2.1) und *in vitro* Studien konnten zeigen, dass Hcy die Synthese entzündungsfördernder Zytokine anregt. So exprimieren Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Monozyten, die mit Hcy behandelt wurden, verstärkt MCP-1 (*monocytes chemoattractant protein 1*) (Wang G et al., 2002). MCP-1 fördert die Adhäsion von Monozyten an das Endothel und deren Migration in den subendothelialen Raum. Dieser Prozess geht der Bildung der *fatty streaks* voraus.

Weiterhin wird in Endothelzellen durch Hcy die Expression von Interleukin-8 (IL-8) erhöht, welches das Anlagern von T-Lymphozyten und neutrophilen Zellen bedingt (Poddar R et al., 2001; Zeng XK et al., 2004).

Die vermehrte Expression der Zytokine MCP-1 und IL-8 erfolgt über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Lawrence de Koning AB et al., 2003; Zeng XK et al., 2005). NF- κ B aktiviert die Bildung einer Reihe von Entzündungsmediatoren, wie Chemokinen, Interferonen, Leukozyten Adhäsions-Molekülen und hämopoetischen Wachstumsfaktoren und somit auch die Entwicklung der Atherosklerose (Lawrence de Koning AB et al., 2003). Dies konnte an Apolipoprotein-E-Mangel Mäusen gezeigt werden, in denen Hcy *in vivo* NF- κ B und Entzündungsmarker in atherosklerotischen Läsionen aktivierte und über Entzündungsprozesse in Blutgefäßen zur Entstehung der Atherosklerose beitrug (Hofmann MA et al., 2001).

Endothelzellen bilden die innerste Schicht der Blutgefäße und dienen der Aufrechterhaltung des Gefäßdrucks und der anti-koagulierenden Beschaffenheit der Gefäße. Fehlfunktionen oder die Apoptose von Endothelzellen üben einen bedeutenden Einfluss auf Erkrankungen wie die Atherosklerose aus. Nach einer initialen Schädigung der Endothelzellen haften sich Monozyten an die Schicht der Endothelzellen. Die daraufhin ausgelöste Entzündungsreaktion stimuliert die Akkumulierung von Lipiden, was eine Kaskade der zunehmenden Anhäufung von Lipiden und der belastenden Einwirkung weiterer atherogener Substanzen auslöst. Der oxidative Status der Endothelzellen und die Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-I oder MCP-1 ändern sich (Stonemann VEA & Bennett MR, 2004). Beispielsweise Untersuchungen an HUVEC zeigten, dass die Apoptose zu einer Umverteilung des Phosphatidylserins führt. Da die Exposition von Phosphatidylserin an der äußeren Membran für die effiziente Aktivierung der Koagulationfaktoren von Bedeutung ist, bedingt die Apoptose der HUVEC den Verlust der anti-koagulierenden Eigenschaft der Endothelzellen (Bombeli T et al., 1997). Die fortschreitende Bereitstellung von Zellen der

Immunantwort begünstigt weitere Interaktionen zwischen Monozyten und Endothelzellen und somit die Apoptose der Endothelzellen. Membranvesikel apoptotischer Zellen enthalten oxidierte Phospholipide, die wiederum die Adhäsion der Monozyten an das Endothel fördern (Huber J et al., 2002). Diese Reaktion bedingt erneut die Infiltration von Monozyten in die Läsion und verstärkt die Apoptose (Stonemann VEA & Bennett MR, 2004).

Neben seiner Beteiligung an Entzündungsprozessen wird Hcy auch mit oxidativem Stress in Verbindung gebracht. Annahme für diese Hypothese war die Beobachtung, dass die durch Hcy verursachte Beeinträchtigung der Vasodilatation (Tawakol A et al., 1997; Kanani PM et al., 1999; Eberhardt RT et al., 2000) durch die Gabe von Antioxidantien aufgehoben werden kann (Kanani PM et al., 1999). Die Thiolgruppe von Hcy unterliegt im Plasma einer Autooxidation, parallel hierzu tritt eine starke Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) auf. Allerdings konnte für Cystein dieser Effekt nicht gezeigt werden, obwohl es im Plasma in einer 20- bis 30-fachen Konzentration vorliegt und viel rascher der Autooxidation unterzogen wird. Hcy scheint folglich oxidativen Stress über andere Mechanismen zu verursachen (Lawrence de Koning AB et al., 2003). Hcy führt zur Bildung des Superoxidanions (O_2^-), das mit dem Vasodilator Stickstoffmonoxid (NO) zu Peroxinitrit reagiert und über die verringerte Verfügbarkeit von endothelalem NO die normale Gefäßerweiterung begrenzt. Die ROS- und RNS-Produkte (reaktive Stickstoff-Spezies, *reactive nitrogen species* – RNS) initiieren die Lipidperoxidation von Lipoproteinen, die in der Zellmembran lokalisiert sind oder im Plasma zirkulieren. Folglich führen erhöhte Hcy-Spiegel zu einer starken Belastung antioxidativer Enzyme wie der Superoxid-Dismutase oder der Glutathion-Peroxidase. Dies wiederum führt über eine Aktivierung von Signalketten wie NF- κ B zu einer erhöhten endothelialen Synthese von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen (Eberhardt RT et al., 2000; Lang D et al., 2000; Lentz SR et al., 2001; Weiss N, 2005).

Neben dem zytoplasmatischen oxidativen Stress scheint Hcy auch erhöhten oxidativen Stress im endoplasmatischen Retikulum (ER) zu verursachen. So führen erhöhte Hcy-Spiegel zu einer verstärkten Expression von Genen der Stressantwort des ER wie z.B. GRP78, GRP94, Herp und RTP (Outinen PA et al., 1998; Kokame K et al., 2000; Kokame K et al., 1996). Dies resultiert in der Spaltung von Disulfid-Brückenbindungen und der fehlerhaften Faltung von Proteinen. Diese fehlerhafte Faltung führt zu einer bestimmten Stressantwort, der so genannten *unfolded protein response* (UPR) (Ron D, 2001), die über drei im ER angesiedelte Sensoren vermittelt wird: die Transmembran Proteinkinase IRE-1, den Transkriptionsfaktor ATF-6 und die ER Kinase (PERK) (Lawrence de Koning AB et al., 2003). Da Hcy auf PERK und IRE-1 Einfluss ausübt, wird durch die veränderte Genexpression direkt die UPR ausgelöst (Nonaka H et al., 2001; Ma K et al., 2002; Zhang C et al., 2001a & b). Die Aktivierung der UPR führt über einen Anstieg der Lipid- und Dolichol-Biosynthese zu einer Anreicherung von Lipiden in Hepatozyten, glatten Muskelzellen und

Makrophagen (Cox JS et al., 1997; Welihinda AA et al., 1999; Sriburi R et al., 2004; Doerrler WT & Lehmann MA, 1999; Lawrence de Koning AB et al., 2003). Zusätzlich verursacht die Aktivierung von IRE-1 eine rasche und anhaltende Stimulierung der Januskinase JNK, die den programmierten Zelltod einleitet (Zhang C et al., 2001). Darüber hinaus übt Hcy auch über die Stimulierung von Caspase-3 oder Caspase-ähnlichen Proteasen einen Einfluss auf die Apoptose aus (Huang RF et al., 2001; Zhang C et al., 2001). In HUVEC führt Hcy *in vitro* zum programmierten Zelltod über die Auslösung der UPR, die über die Aktivierung der *ER-resident Proteinkinase* IRE1 erfolgt (Zhang C et al., 2001). Eine weitere Studie zeigt, dass Hcy in HUVEC über die Aktivierung von NF- κ B zu einer verstärkten Expression des Todesrezeptors Fas führt. Fas ist ein Typ I Membranprotein der Tumor-Nekrosefaktor Rezeptoren-Familie. Hcy hemmt die Bildung von cFLIP, ein endogener Inhibitor der Caspase-8, über die Verminderung der Serin/Threonin Proteinkinase AKT, die das Überleben von zahlreichen Zelltypen fördert, wie auch das Überleben der Endothelzellen. Im Gegensatz dazu kann eine Überexpression des AKT Gens die Endothelzellen vor der durch Hcy induzierten Apoptose schützen (Suhara T et al., 2004). Außerdem kann AKT in Epithelzellen die Expression von Fas herabsetzen und somit die über Fas vermittelte Apoptose verhindern. Das Zusammenspiel des Fasliganden mit seinem Rezeptor aktiviert die Caspase 8 und die darauf folgende Aktivierung der Caspasen-Kaskade führt zum irreversiblen Zelltod (Peli J et al., 1999). Atherosklerotische Läsionen von Mäusen mit einer HHcy weisen eine Steigerung der Apoptose und des ER Stresses auf, so dass Hcy vermutlich die Stabilität der Läsionen bzw. das Risiko einer Thrombose bestimmt (Lawrence de Koning AB et al., 2003). Neben den oxidativen Schädigungen fördert Hcy auch die Proliferation von glatten Muskelzellen (Tsai JC et al., 1994) und die Kollagensynthese in glatten Muskelzellen (Majors A et al., 1997). Dies konnte an Patienten mit HHcy bestätigt werden, da sich bei ihnen die Atherosklerose durch eine verdickte Intima und kollagenreiche fibröse Läsionen auszeichnet (Majors AK et al., 2002). In Kulturen von Endothelzellen stimuliert Hcy die Aktivität von Gewebefaktoren (Fryer RH et al., 1993; Durand P et al., 1996) und des Faktor V (Rodgers GM & Kane WH, 1986), hemmt Thrombomodulin auf der Oberfläche von Zellen (Lentz SR et al., 1997) und das Protein C (Rodgers GM & Conn MT, 1990; Lentz SR & Sadler JE, 1991) und verhindert die Bindung des Gewebe-Plasminogen Aktivators an Annexin II (Hajjar KA et al., 1998), wodurch insgesamt die Koagulation verstärkt wird.

1.2.2.2 Lipoproteine

Stoffwechsel der Lipoproteine

Die wasserlöslichen Lipoproteine, die sich aus einer Eiweiß- und einer Lipidkomponente zusammensetzen, dienen dem Transport hydrophober Stoffe, d.h. von Lipiden und lipid-ähnlichen Substanzen, durch die Blutbahn. Eine Unterteilung der Lipoproteine erfolgt anhand ihrer Dichte in Chylomikronen, VLDL (very low density lipoproteins), LDL (low density lipoproteins) und HDL (high density lipoproteins), wobei Chylomikronen und VLDL in erster Linie den Transport von Triglyceriden übernehmen und LDL und HDL den Transport von Cholesterin. Gemäß ihrer unterschiedlichen Dichte variieren die Lipoproteine hinsichtlich ihres Lipidanteils und des Lipid:Protein-Verhältnisses. Dieses Verhältnis liegt bei Chylomikronen bei 99:1, wobei 90% der Lipide Triacylglycerine sind, 6% Cholesterin und 4% Phospholipide. Bei den VLDL-Partikeln beträgt das Verhältnis 90:10, bei LDL 78:22 und ist bei HDL auf 50:50 gesunken. Der Anteil der Triacylglycerine nimmt in den Lipoproteinen mit zunehmender Dichte ab. LDL weist den höchsten Cholesteringehalt und die HDL-Fraktion den höchsten Phosphoglyceridgehalt auf. Die einzelnen Lipoproteine sind mit spezifischen Apolipoproteinen ausgestattet, die als Strukturelemente, der Aktivierung von Enzymen oder als Liganden von Rezeptoren dienen. Chylomikronen werden in den Mukosazellen der duodenalen Schleimhaut gebildet und befördern die mit der Nahrung zugeführten Triacylglycerine über die intestinalen Lymphgänge und den Ductus thoracicus. Die intestinale Mukosa produziert auch geringe Mengen an VLDL, doch vornehmlich entstehen diese in Hepatozyten. Die VLDL-Partikel übernehmen den Transport der in der Leber synthetisierten Triacylglycerine in das Kapillarendothel und andere extrahepatische Gewebe. Am Kapillarendothel werden VLDL von der dort lokalisierten Lipoproteinlipase zu einem Partikel intermediärer Dichte, dem IDL (intermediate density lipoprotein), abgebaut. In der Leber werden aus dem IDL LDL-Partikel gebildet. LDL transportieren Cholesterin von der Leber zu extrahepatischen Geweben. Cholesterin ist hauptsächlich am Aufbau der Zellwände, aber auch am Aufbau der Myelinscheidewände beteiligt und ist ein Ausgangsprodukt der Gallensäuren, der Sexualhormone, der Hormone der Nebennieren und des Vitamin D.

Da der Organismus zum Abbau von Cholesterin nicht ausreichend ausgestattet ist, wird es vor allem über die Galle ausgeschieden. Die Fraktion der HDL ist im Gegensatz zu den anderen Lipoproteinen nicht einheitlich und kann in mindestens drei Gruppen (HDL₁₋₃) eingeteilt werden. Diese unterscheiden sich hinsichtlich ihres Gehalts an Apolipoproteinen und ihres Lipidgehaltes. Beim Abbau der Chylomikronen in extrahepatischen Geweben entstehen diskoidale HDL-Partikel, die Apolipoprotein A, Phospholipide und Cholesterinester aufweisen. Vermutlich stammen weitere HDL-Vorstufen aus dem Darm und der Leber. Das Apolipoprotein AI vermittelt die Kopplung von HDL an LCAT (Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase), durch die der Gehalt an Cholesterinestern ansteigt und parallel der an

Phosphoglyceriden abnimmt. Die durch LCAT gebildeten Cholesterinester siedeln im Inneren der HDL an. Aus den Membranen extrahepatischer Gewebe stammendes Cholesterin kann somit an die Oberfläche der HDL binden, was zur Bildung der HDL₃-Fraktion führt. Durch die LCAT katalysierten Reaktionen und der Aufnahme von Substanzen (Phospholipide, Apolipoprotein C und E), die beim Abbau von VLDL freigesetzt worden sind, entstehen das HDL₂ und das HDL₁, die in der Leber endgültig abgebaut werden (siehe Abb. 1.5) (Löffler G & Petrides PE, 2003).

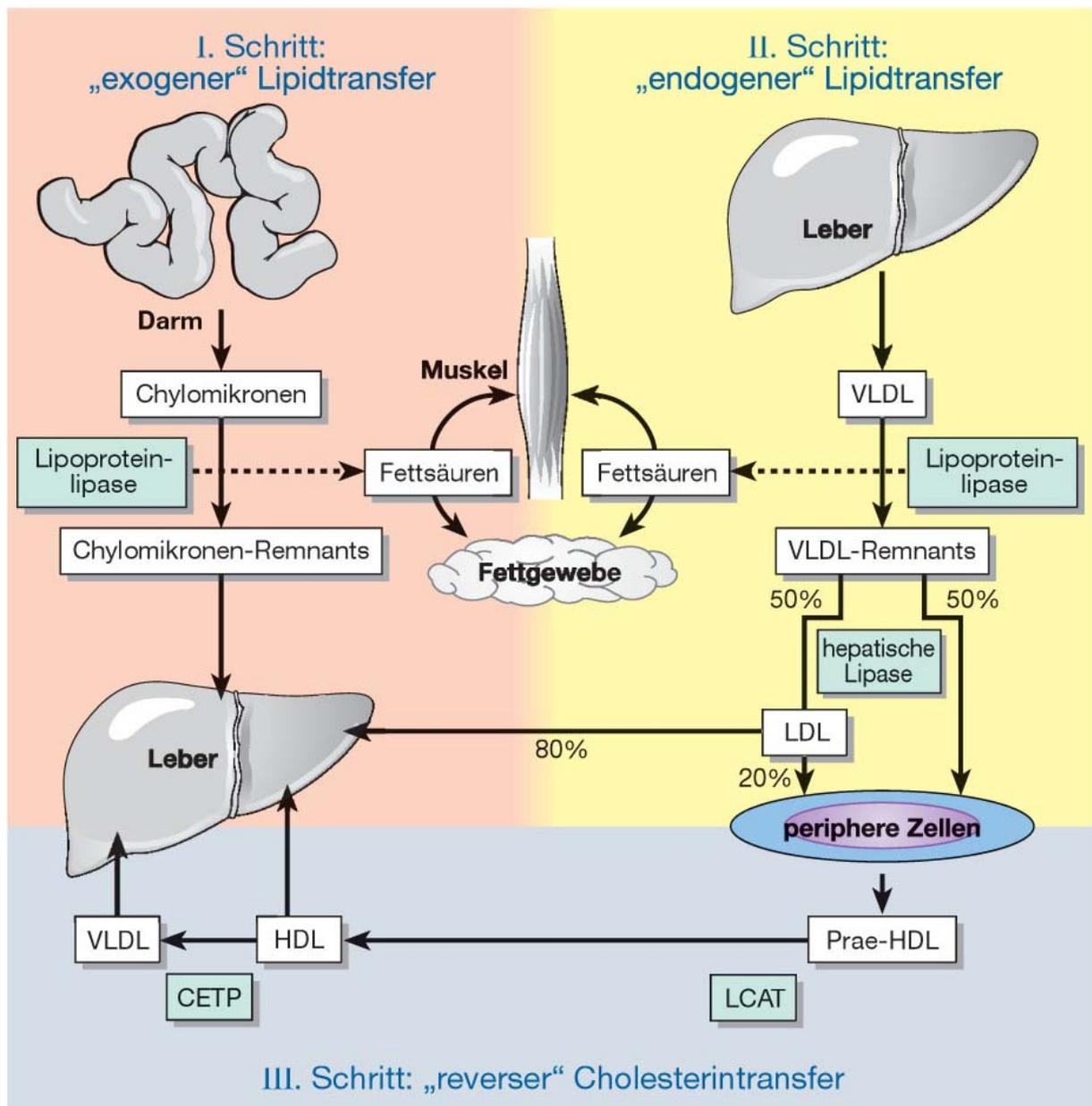


Abb. 1.5 Postprandialer Lipidstoffwechsel.

Der postprandiale Lipidstoffwechsel wird in einen exogenen, endogenen und reversen Lipidtransfer unterteilt. (CETP, Cholesterinester Transfer Protein) (Deetjen et al., 2004).

Genetische Grundlagen erhöhter LDL-Plasmaspiegel

Epidemiologische, klinische und genetische Studien konnten zeigen, dass ein durch den Lebensstil oder die genetische Veranlagung erhöhter Plasmaspiegel an LDL mit einem gesteigerten Risiko eines Myokardinfarktes einhergeht (Heinecke JW, 1998). Als erhöht werden Spiegel betrachtet, die einen Wert von 160-180 mg LDL/dl Plasma überschreiten (Witztum JL & Steinberg D, 1991).

Die familiäre Hypercholesterinämie oder Hyperlipoproteinämie Typ II ist eine autosomal dominante Funktionsstörung. Der klinische Phänotyp, der bei Homozygotie schwerer ausfällt, wird durch einen erhöhten Plasmaspiegel an Cholesterin mit einer Zunahme der LDL-Fraktion gekennzeichnet. Die Häufigkeit eines heterozygoten Genotypus liegt bei 1:500 und betrifft etwa 5% der Patienten, die bereits in einem Alter von unter 60 Jahren einen Myokardinfarkt erlitten haben. Träger des homozygoten Genotypus, der mit einer Häufigkeit von 1:1.000.000 auftritt, weisen von Kindheit an schwere Atherosklerose mit koronaren Herzerkrankungen und Zerebralsklerose auf. Ursachen für die familiäre Hypercholesterinämie können Mutationen im LDL-Rezeptor Gen, im Apolipoprotein B-100 Gen oder im Gen der Proprotein Konvertase Subtilisin/Kexin Typ 9 sein. Letzteres kodiert die Proprotein Konvertase NARC-1. Studien an Individuen mit familiärer Hypercholesterinämie identifizierten zwei Mutationen des Apolipoprotein B-100 Gens und über 700 verschiedene Mutationen des LDL-Rezeptor Gens (Hutter CM et al., 2004). Heterozygote Träger besitzen in der Regel etwa nur halb so viele LDL-Rezeptoren auf den Zellen wie gesunde Menschen und weisen einen zwei- bis dreifachen Anstieg der LDL-Plasmaspiegel auf. Bei homozygoten Individuen zeigt der LDL-Rezeptor keine oder nur eine geringe Aktivität und die Plasmakonzentrationen an LDL sind im Vergleich zu gesunden Menschen um das sechsfache erhöht (Arca M et al., 2002).

Die Mutationen des LDL-Rezeptor Gens können in vier Klassen unterteilt werden, wobei in ca. 50% aller Fälle der Rezeptor in einer geringeren Menge oder gar nicht gebildet wird. In den anderen Fällen erfolgt zwar die Bildung des Rezeptors, jedoch bleibt die posttranslationale Prozessierung und Glykosylierung aus und der Rezeptor kann nicht in die Membran eingebaut werden. Seltener auftretende Defekte betreffen beispielsweise die LDL-Bindungsstelle des Rezeptors bzw. das C-terminale Ende des Rezeptors, wodurch die Assoziation mit Klathrin und somit die Bildung der für die Rezeptorinternalisierung wichtigen *coated pits* beeinträchtigt wird. All diese Funktionsstörungen unterbinden die Aufnahme von LDL, was in einem Anstieg der Cholesterin-Konzentration resultiert. Durch das Ausbleiben der LDL-Aufnahme wird die endokrine Cholesterinbiosynthese in extrahepatischen Geweben aktiviert. Zu der verminderten LDL-Aufnahme kommt es folglich über eine gesteigerte Biosynthese von Cholesterin zum Anstieg der Serumcholesterinkonzentration und damit des Atheroskleroserisikos (Löffler G & Petrides PE, 2003).

Mechanismen der Atherogenesebeeinflussung durch ox-LDL

Primär wird die Entwicklung der Atherosklerose durch oxidativ veränderte LDL-Partikel (ox-LDL) und nicht durch LDL per se begünstigt. Ox-LDL beeinflusst mehrere Komponenten der Atherogenese, wie die Entstehung von Läsionen, die Vasomotorik oder die Thrombogenese. Selbst nur minimal oxidiertes LDL zeigt pro-atherosklerotische Eigenschaften, da es im subendothelialen Raum akkumuliert und dort das Anheften von Leukozyten an Endothelzellen vermittelt. Zusätzlich wird die Migration von Monozyten ausgelöst, die zu Makrophagen aktiviert werden und die Oxidation weiterer LDL-Partikel bewirken, indem ox-LDL in Endothelzellen und glatten Muskelzellen die Expression von Genen wie dem MCP1 oder von Makrophagen-Kolonie stimulierenden Faktoren erhöht (Witztum JL & Steinberg D, 1991; Jialal I, 1998). Da ox-LDL gleichzeitig die Motilität der Makrophagen einschränkt, verbleiben diese im subendothelialen Raum. (Witztum JL & Steinberg D, 1991; Jialal I, 1998) Ein weiteres Protein, das unter dem Einfluß von ox-LDL verstärkt exprimiert wird, ist das Interleukin-1. IL-1 löst die Proliferation von glatten Muskelzellen aus und versetzt diese in einen prokoagulierenden Zustand. Dies stimuliert die Adhäsion von Leukozyten an Endothelzellen (Jialal I, 1998). Das ox-LDL wirkt abhängig von seinem Oxidationsgrad zytotoxisch auf Endothelzellen und glatte Muskelzellen und ist an der Bildung von Schaumzellen beteiligt (Witztum JL & Steinberg D, 1991; Itabe H, 2002). Schaumzellen entstehen aus Makrophagen durch die Aufnahme von ox-LDL, das in den Makrophagen in Lysosomen abgebaut wird. Die Aufnahme von ox-LDL in Makrophagen wird durch eine Reihe von Scavenger Rezeptoren vermittelt. Die Scavenger Rezeptoren erkennen jedoch nur oxidativ veränderte LDL-Partikel. Im Gegensatz zu anderen Rezeptoren unterliegen Scavenger Rezeptoren keiner Regulierung, so dass Makrophagen die Aufnahme von ox-LDL nicht unterbrechen und in ihrem Inneren große Mengen an neutralen Lipiden ansammeln (Itabe H, 2002). Ox-LDL steigert die Aktivität des Gewebe-Thromboplastins, was zur Aggregation der Blutplättchen führt und die prokoagulatorische Aktivität der Oberfläche des Endothels erhöht. Ox-LDL übt auch einen direkten Einfluss auf die Vasomotorik aus. Es vermindert die Antwort auf die Gefäßerweiterung, die durch den NO-enthaltenden *endothelial-dependent relaxin factor* (EDRF) vermittelt wird. Als Ursache wird eine durch Lysolecithin vermittelte Veränderung der endothelialen Membranen vermutet, die zum Verlust von Rezeptoren für vasodilatorische Agonisten führt oder die direkte Inaktivierung von EDRF bewirkt (Witztum JL & Steinberg D, 1991).

Zwar wird angenommen, dass ox-LDL beispielsweise die Bildung von Schaumzellen und die Bildung von Läsionen und damit die Atherosklerose begünstigt, jedoch konnte ox-LDL lange Zeit *in vivo* nicht nachgewiesen werden (Itabe H, 2002).

Da LDL-Partikel *in vitro* in Makrophagen nicht akkumulieren, aber durch Oxidations-Prozesse chemisch verändertes Apolipoprotein B100 über die Scavenger Rezeptoren der

Makrophagen unter Bildung von lipidbeladenen Schaumzellen aufgenommen und abgebaut wurde, wird vermutet, dass es sich hierbei um eine veränderte Form von LDL handeln muss (Heinecke JW, 1998). In einer weiteren *in vitro* Studie konnte gezeigt werden, dass ox-LDL tatsächlich ein gutes Substrat für die Scavenger Receptors darstellt und in einem Zellsystem ohne die Zugabe von chemischen Reagenzien gebildet werden kann (Itabe H, 2002). An der Veränderung des LDL sind Endothelzellen und glatte Muskelzellen, aber auch Monozyten bzw. Makrophagen maßgeblich beteiligt. Kultivierte Zellen aus der Arterienwand oxidieren LDL-Partikel und überführen das LDL in eine Form, die die Scavenger Receptoren erkennen.

Mögliche Mechanismen zur Oxidation der LDL-Partikel stellen die Reaktion mit Metall-Ionen, RNS oder die Oxidation durch die Lipoxygenase oder die Myeloperoxidase dar (Heinecke JW, 1998). Diese vier Mechanismen werden in den folgenden Abschnitten erläutert.

Der genaue Weg, wie Metall-Ionen *in vivo* die Oxidation der LDL-Partikel auslösen ist noch nicht bekannt. Jedoch werden verschiedene Möglichkeiten basierend auf *in vitro* Studien diskutiert. Eine Möglichkeit ist, dass Metall-Ionen wie Kupfer oder Eisen zuerst durch Reduktionsmittel wie Superoxid oder Thiole, die von Zellen abstammen, reduziert werden und im Anschluß LDL im Rahmen der Fenton-Reaktion oxidieren. In Abhängigkeit von dem jeweiligen Metall-Ion und seinem Chelatzustand können Thiole die Oxidation von LDL fördern oder auch unterbinden (Heinecke JW, 1998). So ist eine reduzierte Thiol-Gruppe für die Stimulierung der Fe^{3+} -abhängigen Oxidation von LDL essentiell. Dahingegen wird die Cu^{2+} -abhängige Oxidation von LDL-Partikeln durch Moleküle mit einer Thiol-Gruppe, wie z.B. Glutathion verhindert (Lynch SM & Frei B, 1997). In die Oxidation von LDL-Partikeln können auch Metall-Sauerstoff-Komplexe eingebunden sein. Eine weitere Alternative ist die Oxidation von LDL durch Tocopherolradikale, die während der Reduktion von Metall-Ionen aus Vitamin E gebildet werden. Metall-Ionen könnten auch die Reaktion von Lipidhydroperoxiden zu oxidativ-wirksamen Substanzen katalysieren. Die Bindung von Metall-Ionen an LDL könnte die Reduktion und gleichzeitig die Peroxidation von LDL-Lipiden bedingen (Heinecke JW, 1998).

Während einer späten Phase der Atherosklerose werden von nekrotisierenden Zellen Metall-Ionen freigesetzt, die die Oxidation von LDL und somit die Bildung von Läsionen entsprechend vorantreiben könnten, jedoch konnte deren Beteiligung an der Entstehung der Atherosklerose nicht nachgewiesen werden. Erhöhte Spiegel an Metall-Ionen können alleine die Atherogenese nicht begünstigen. Personen deren Plasma- und Gewebespiegel an Eisen und Kupfer aufgrund genetischer Defekte erhöht sind, weisen kein höheres Risiko, an Atherosklerose zu erkranken, auf (Heinecke JW, 1998).

Zu den RNS gehört neben Peroxinitrit (ONOO⁻) auch NO, dem eine entscheidende Rolle bei der Atherogenese zugeschrieben wird. Peroxinitrit entsteht besonders im Rahmen entzündlicher Reaktionen aufgrund großer Mengen an Superoxidanionen und an NO, das von der induzierbaren NO Synthase gebildet wird. Unter diesen Bedingungen besitzt NO keine anti-atherosklerotischen Eigenschaften mehr, sondern verstärkt die Atherogenese über die Bildung von Peroxinitrit, das LDL-Partikel oxidiert (Heinecke JW, 1998).

Wie vorab erwähnt könnte auch die Lipoxygenase an der Oxidation von LDL beteiligt sein. Die Lipoxygenase ist ein intrazelluläres Enzym, das die Peroxidation polyungesättigter Fettsäuren bedingt. In atherosklerotischem Gewebe wurden sowohl die mRNA als auch das Protein selbst nachgewiesen. *In vitro* oxidiert die Lipoxygenase LDL, was durch die Zugabe von Lipoxygenase-Inhibitoren gehemmt werden kann. Vermutlich oxidiert die Lipoxygenase direkt die LDL-Partikel, aber auch indirekt durch Oxidation anderer Substanzen, die wiederum die Oxidation von LDL fördern (Heinecke JW, 1998).

Während entzündlicher Prozesse wird darüber hinaus von Makrophagen das Enzym Myeloperoxidase sezerniert, das die oxidative Wirkung von Superoxid vervielfacht und somit an der Bildung von zytotoxischen Oxidantien und verschiedenen Radikal-Spezies beteiligt ist. Physiologisch dient dieser Mechanismus der Pathogenabwehr, er kann aber in atherosklerotischen Läsionen weitere Gewebeschädigungen verursachen. In der Tat kolokalisieren in atherosklerotischem Gewebe das Enzym und seine Oxidationsprodukte mit Makrophagen (Heinecke JW, 1998).

In vitro löst ox-LDL fortschreitende Veränderungen der Zellmorphologie und letztlich den Zelltod in Form von Apoptose oder Nekrose aus (Meilhac O et al., 1999). Ox-LDL enthält verschiedene toxische, oxidierte Lipide, wie Lipidperoxide, Oxysterole oder Aldehyde, die unterschiedliche Effekte ausüben. Die oxidierten Lipide der LDL-Partikel führen zu Strukturveränderungen der zellulären Proteine, fördern die Bildung von ROS sowie die Lipidperoxidation zellulärer Lipide und beeinflussen die Regulierung zahlreicher Signalwege und der Genexpression. Ein starkes und anhaltendes Calcium-Signal scheint den Zelltod auszulösen, jedoch sind der initiale Schritt und die folgenden Prozesse, die zum Zelltod führen, nur zum Teil bekannt (Salvayre R et al. 2002). Die Signale für die Apoptose werden von dem Fas-Rezeptor und den TNF-Rezeptoren I und II vermittelt. Die Aktivierung der Apoptose-Rezeptoren durch ox-LDL geht mit einem Anstieg von pro-apoptotischen und einer Abnahme von anti-apoptotischen Proteinen der Bcl-2 Familie einher und führt zu einer Aktivierung der Caspasen der Klassen I und II. Leicht oxidiertes LDL aktiviert die MAP- und Jun-Kinasen und führt zu einem Anstieg von Transkriptionsfaktoren, wie p53, ATF-2, ELK-1, CREB oder AP-1 (Napoli C et al., 2000). Der Transkriptionsfaktor p53 löst bei Fehlern im DNA-Reparatursystem die Apoptose aus (Metzler B et al., 2000). Zu den pro-apoptotischen Proteinen, deren Spiegel durch ox-LDL erhöht werden, zählen BAX und BCL-Xs. Die Hauptfunktion der

Agonisten BAX und BCL-Xs beruht auf der Freisetzung von pro-apoptotischen Faktoren, besonders dem Cytochrom C, aus den Mitochondrien. Über die Bindung an den Apoptose assoziierten Faktor-1 und die Caspase-9 bildet das Cytochrom C das sogenannte Apoptosom, das die Caspase-3 aktiviert und somit die Apoptose in Gang setzt. Die Konzentration der anti-apoptotisch wirkenden Mitglieder der Bcl-2 Familie, die die Freisetzung von Cytochrom-C aus den Mitochondrien hemmen, wird durch ox-LDL vermindert (Metzler B et al., 2000; Napoli C et al., 2000). Weiterhin erhöht ox-LDL die Expression von Zytokinen wie IL-1, TNF und PDGF, die wiederum SAPK/JNK aktivieren (Metzler B et al., 2000). Über einen Prozess, in den Lysosomen und lysosomale Proteasen involviert sind, kann ox-LDL die Apoptose auch relativ unabhängig von den Caspasen bedingen (Salvayre R et al. 2002).

1.3 Phytoöstrogene

Phytoöstrogene sind in Pflanzen natürlich vorkommende Polyphenole, die in Abwehrmechanismen der Pflanzen eine wichtige Rolle spielen. Die Phytoöstrogene selbst oder auch ihre Metabolite können in Wirbeltieren an Östrogenrezeptoren binden und die Wirkung endogen vorkommender Östrogene imitieren oder modulieren. Phytoöstrogene werden als natürliche Vertreter der sogenannten SERMs (*selective estrogen receptor modulators* – selektive Modulatoren der Östrogenrezeptoren) klassifiziert (Mikkola TS & Clarkson TB, 2002). Neben ihrer klassischen Wirkung auf Östrogenrezeptoren und der Aktivierung von spezifischen Genen, üben die Phytoöstrogene auch andere zellspezifische Effekte aus (Branca F & Lorenzetti S, 2005). Dass Pflanzen östrogenähnliche Substanzen enthalten können, wurde in den 40er Jahren erstmals an Schafen beobachtet, die auf Wiesen mit rotem Klee weideten und verschiedene Störungen der Fruchtbarkeit aufwiesen. Roter Klee enthält große Mengen der Isoflavone Formononetin und Biochanin A, die zu den ersten entdeckten Phytoöstrogenen zählen (Cornwell T et al., 2004). Heute werden unter dem Begriff Phytoöstrogene vier verschiedene Familien von phenolischen Verbindungen von Pflanzen zusammengefasst, die Isoflavonoide, Lignane, Stilbene und Coumestane (Duncan AM et al., 2003; Cornwell T et al., 2004). Östrogenartige Substanzen sind in mehr als 300 Pflanzenarten nachzuweisen, von denen jedoch üblicherweise nur wenige vom Menschen oder von Tieren verzehrt werden (Dixon RA, 2004).

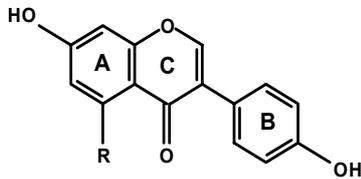
Vorkommen, Struktur und Stoffwechsel der Isoflavonoide

Isoflavonoide sind in Hülsenfrüchten, Ölsaaten und Nüssen, wie Sonnenblumenkernen bzw. Erdnüssen und Walnüssen, enthalten und in besonders großen Mengen in der Sojabohne und entsprechend in Soja enthaltenden Lebensmitteln (Duncan AM et al., 2003; Ososki AL & Kennelly EJ, 2003; Cornwell T et al., 2004). Durchschnittlich enthalten Sojaprodukte 1-3 mg Isoflavonoide/g Trockengewicht, wobei die Menge in Abhängigkeit von der Sojabohnenart, von Umwelteinflüssen und dem Verarbeitungsgrad variieren kann (Duncan AM et al., 2003). In China und Japan werden täglich bis zu 100 mg Isoflavonoide verzehrt, in Europa und den USA jedoch liegt die durchschnittliche Aufnahme an Isoflavonoiden unter 1 mg/Tag. Die intestinale Resorption der Isoflavonoide erfolgt hauptsächlich über Diffusion und bereits nach 15-30 Minuten nach Verzehr steigt der Plasmaspiegel an. Die höchsten Plasmaspiegel werden zwischen drei und sieben Stunden postprandial erreicht (Branca F & Lorenzetti S, 2005). Mit einer sojareichen Mahlzeit werden durchschnittlich 25-40 mg Aglykone konsumiert und Plasmakonzentrationen von bis zu 4,09 µmol/l erreicht (Messina MJ, 1999; Manach C et al., 2005).

Die Isoflavonoide stellen eine Unterklasse der Flavonoide dar, die in vielen Pflanzen vorkommen. Alle Flavonoide sind polyphenolische Verbindungen, die zwei Benzol-Ringe (A

und B) besitzen und durch einen heterozyklischen Pyranring miteinander verbunden sind (siehe Abb. 1.6).

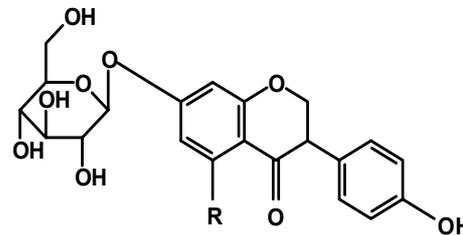
Aglycone



R -OH: Genistein

R -H: Daidzein

Glukoside



R -OH: Genistin

R -H: Daidzin

Abb. 1.6 Grundstruktur der Soja Isoflavonoide.

A und B markieren die Benzolringe, C den heterozyklischen Pyranring.

Die Isoflavonoide unterscheiden sich von den Flavonoiden durch eine Umlagerung des Benzolringes B vom C-3 zum C-2 Atom des Pyranrings (siehe Abb. 1.6) (Messina MJ, 1999; Cornwell T et al., 2004). Die Isoflavonoide selbst variieren in einem großen Spektrum hinsichtlich der Art und Anzahl ihrer Substituenten, der Oxidationsstufe des heterozyklischen Ringes oder der Anwesenheit eines zusätzlichen heterozyklischen Ringes (Dixon RA, 2004). Die beiden am häufigsten vorkommenden Isoflavonoide sind Genistein und Daidzein bzw. ihre Glukoside Genistin und Daidzin (siehe Abb. 1.6) (Izumi T et al., 2000). In nicht-fermentierten Sojaprodukten sind vorwiegend Genistin und Daidzin enthalten, während in den traditionellen japanischen, fermentierten Lebensmitteln Miso, Natto oder Sojasauce die Isoflavonoide vorwiegend als Aglycone vorliegen (Messina MJ, 1999).

Die Bioverfügbarkeit der glukosylierten Isoflavonoide ist gering und damit hängt die Resorption der Isoflavonoide von der hydrolytischen Abspaltung des Zuckerrestes ab, die im Darm von intestinalen oder bakteriellen Glucosidasen katalysiert wird (Izumi et al., 2000; Setchell KD et al., 2002; Duncan AM et al., 2003; Branca F & Lorenzetti S, 2005). Zum Teil werden die Aglycone vor der Absorption weiter von bakteriellen Enzymen metabolisiert und erst die Degradationsprodukte absorbiert. So wird Genistein zu p-Ethylphenol und Daidzein zu Equol und/oder O-Desmethylolesin (O-DMA) metabolisiert (Duncan AM et al., 2003). Equol wird jedoch aufgrund der individuell zusammengesetzten Darmflora nur von etwa 30% aller Konsumenten synthetisiert (Messina MJ, 1999; Ososki AL & Kennelly EJ, 2003). Nach der Absorption werden die Isoflavonoide zum Teil in Darm und Leber mit Glucuronsäuren und zu einem geringeren Teil mit Sulfaten konjugiert und über die Galle (enterohepatischer Kreislauf) wieder in den Darm abgegeben. Dort können sie dekonjugiert und reabsorbiert werden oder über den Faeces ausgeschieden werden (Duncan AM et al., 2003; Dixon RA, 2004; Branca F & Lorenzetti S, 2005). Die Absorption der Isoflavonoide erfolgt in

Abhängigkeit von der Dosis, d.h. die Konzentration in Serum und Urin steigt mit zunehmender Verzehrsmenge an (Duncan AM et al., 2003).

Anti-atherosklerotische Eigenschaften der Isoflavonoide

Verschiedene Faktoren, die zur Entwicklung der Atherosklerose beitragen, wie erhöhte Plasmalipidspiegel, verminderte Gefäßreaktivität oder erhöhte Thromboseneigung, können von Phytoöstrogenen positiv beeinflusst werden (Ososki AL & Kennelly EJ, 2003). Von der FDA (U.S. Food and Drug Administration) wurde eine Verzehrsempfehlung von 25 g isoflavonoidreichem Sojaprotein/Tag herausgegeben, da diese Menge in der Lage ist, den Plasmacholesterinspiegel signifikant zu senken (FDA, 1999). Die FDA ermöglichte somit die gesundheitsbezogene Werbung für sojaproteinreiche Nahrungsmittel. Obwohl sich die Empfehlung auf das Sojaprotein bezieht, wird der gesundheitliche Nutzen meist auf die Isoflavonoide zurückgeführt. Der Verzehr von Isoflavonoiden verringert die Plasmaspiegel an Gesamtcholesterin (TC) und LDL-Cholesterin und erhöht die Plasmakonzentration an HDL-Cholesterin (Nagata C et al., 1998; Potter SM et al., 1998; Merz-Demlow BE et al., 2000; Sanders TA et al., 2002; Branca F & Lorenzetti S, 2005). Die Cholesterin-senkende Wirkung der Isoflavonoide wird auf ihre östrogene Struktur zurückgeführt (Lichtenstein AH, 1998). Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit Östrogenen können Isoflavonoide an Östrogenrezeptoren binden, diese aktivieren und somit als Östrogen-Agonisten der Entwicklung der Atherosklerose entgegenwirken (Anthony MS et al., 1998). Die östrogene Aktivität der Isoflavonoide ist etwa 10^3 und 10^4 -fach schwächer als die von 17- β -Östradiol. Bei entsprechendem Sojakonsum können jedoch aufgrund der im Vergleich zu 17- β -Östradiol sehr hohen Plasmaspiegel physiologische Effekte auftreten (Messina MJ, 1999). Die Isoflavonoide binden mit einer unterschiedlichen Affinität an die verschiedenen Östrogenrezeptoren. Genistein beispielsweise besitzt im Vergleich zu 17- β -Östradiol eine Affinität von nur 4% für den Östrogenrezeptor- α , aber eine Affinität von 87% für den Östrogenrezeptor- β . Da die Östrogenrezeptoren- α und - β in den Geweben unterschiedlich verteilt sind, üben die Isoflavonoide Gewebe-spezifische Effekte aus (Mikkola TS & Clarkson TB, 2002).

Die Bindung der Isoflavonoide an die Östrogenrezeptoren verändert die Plasmalipide über eine Beeinflussung der Genexpression, die letztendlich zu einer verstärkten Ausscheidung von Gallensäuren, einer vermehrten Umsetzung von LDL, einer verstärkten Thyroidfunktion, einer verminderten endogenen Cholesterin-Synthese und einer Aktivierung der Cholesterinrezeptoren führt (Ososki AL & Kennelly EJ, 2003).

Als antioxidativ wirksame Substanz kann Genistein zusätzlich *in vitro* und *in vivo* die Oxidation von LDL-Partikeln hemmen, da es die Aktivität der Katalase, Superoxiddismutase,

Glutathionperoxidase oder Glutathionreduktase fördert (Anthony MS et al., 1998; Ososki AL & Kennelly EJ, 2003).

Weiterhin kann Genistein die Aktivität der Protein-Tyrosinkinase hemmen (Anthony MS et al., 1998), was *in vitro* in einer verminderten Proliferation und Migration von glatten Muskelzellen resultiert (Shimokado K et al., 1995). Dieser Effekt und die antioxidative Kapazität von Genistein können die in Gegenwart von Genistein verminderte Aktivierung und Aggregation von Blutplättchen erklären, die eine geringere Thrombusbildung nach sich zieht (Anthony MS et al., 1998; Ososki AL & Kennelly EJ, 2003). Die antithrombotische Wirkung von Genistein wird noch verstärkt, da es die Bildung von Thrombin unterbindet (Wilcox JN & Blumenthal BF, 1995). Eine langfristige Gabe von Genistein erhöht die Aktivität des endothelialen NO-Synthase-Promotors und somit Bildung und Abgabe von NO aus den Endothelzellen und vermittelt darüber die Dilatation der Blutgefäße (Rathel TR et al., 2005).

Daidzein kann ebenso wie Genistein die Aggregation von Blutplättchen, die Bildung von NO, die Sekretion von TNF- α von murinen Makrophagen und die Freisetzung des MCP-1 aus humanen Endothelzellen reduzieren; doch sind im Vergleich zu Genistein die von Daidzein ausgeübten Effekte schwächer ausgeprägt (Gottstein N et al., 2003).

2 Ziele der vorliegenden Arbeit

Epidemiologische Studien weisen auf einen Zusammenhang zwischen sojareicher Ernährung und der Prävention der Atherosklerose hin. Es wird vermutet, dass die protektive Wirkung der Sojaprodukte zumindest partiell über die Fraktion der Isoflavonoide vermittelt wird. Ursächlich dafür könnte die östrogene Wirkung dieser zu den Phytoöstrogenen zählenden Verbindung sein. Die in der Sojabohne in der höchsten Konzentration vorkommenden Isoflavonoide sind Genistein und Daidzein.

Ziel der Arbeit war die Identifikation zellulärer Zielproteine der Isoflavonoide, um darüber mögliche molekulare Mechanismen ihrer potentiell präventiven Wirkung aufzeigen zu können. Als Modell dienten zwei Zelltypen, die maßgeblich an der Atherogenese beteiligt sind, nämlich Endothelzellen und mononukleäre Blutzellen einschließlich Makrophagen (*peripheral blood mononuclear cells* – PBMC). Als Endothelzellen wurden primäre Endothelzellen aus Nabelschnurvenen (*human umbilical vein endothelial cells* - HUVEC) sowie die Endothel-Zelllinie EA.hy926 genutzt, die durch Fusion von HUVEC mit der Lungenkarzinom-Zelllinie A549 generiert wurde. Die Zielproteine der Isoflavonoide wurden mit Hilfe der Proteomanalyse, d.h. Separierung der Proteine durch 2D-Gelelektrophorese und anschließender Identifizierung der im zellulären Spiegel veränderten Proteine mittels MALDI-TOF MS, erfasst.

Die Wirkung der Isoflavonoide Genistein und Daidzein wurde sowohl in unbehandelten Zellen als auch solchen, die gleichzeitig gegenüber den endothelialen Stressoren Hcy oder ox-LDL exponiert wurden, untersucht. Darüber hinaus wurden Effekte eines Sojaextraktes vergleichend analysiert, um Isoflavonoid-unabhängige Effekte von Soja identifizieren zu können.

Während für die Studien zur Wirkung von Isoflavonoiden auf das Proteom von Endothelzellen *in vitro* Modelle eingesetzt wurden, konnten zur Untersuchung der Effekte der Phytoöstrogene auf das Proteom von PBMC Proben aus *in vivo* Studien, d.h. von einer Interventionsstudie am Menschen genutzt werden.

Im Rahmen einer EU-finanzierten Studie („Isoheart“, QLK1-CT-2001-00221) verzehrte ein Kollektiv von 20 postmenopausalen Frauen über einen Zeitraum von acht Wochen täglich zwei speziell gefertigte und definierte Isoflavonoid-haltige Müsliriegel. Die Wirkung der Intervention mit dem Müsliriegel auf das Proteom der PBMC wurde mit den Effekten eines Placeboriegels im Cross-over Design der Studie verglichen.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Verwendete Zellen

HUVEC

Primäre humane Endothelzellen, sog. *human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC), wurden nach der von Jaffe et al. beschriebenen Methode aus der Nabelschnurvene isoliert (Jaffe EA et al., 2001). Die Nabelschnurvenen stammten aus der Fatebenefratelli-Klinik in Rom (Virgili F et al., 2003). Diese polygonalen Zellen wachsen in Form einer *monolayer*, bilden Weibel-Palade-Körperchen, Myofilamente und Actomyosin und grenzen sich durch ABH Antigene von glatten Muskelzellen und Fibroblasten ab (Jaffe EA et al., 1973).

EA.hy926

Die EA.hy926 Zellen wurden freundlicherweise von Prof. C-J. S. Edgell (University of North Carolina Chapel Hill, USA) zur Verfügung gestellt und dienen als Modell für das humane Endothel. Bei den EA.hy926 handelt es sich um eine sehr gut charakterisierte makrovasculäre Endothelzelllinie (Bouis D et al., 2001), die durch die Fusion von HUVEC mit Zellen der Lungenkarzinomzelllinie A549 generiert wurde. Die Zellen stellen bei Kontakt ihr Wachstum ein, exprimieren den von Willebrand-Faktor (Edgell CJ et al., 1983), *tissue plasminogen activator*, *plasminogen-inhibitor-1*, *tissue factor* und Thrombomodulin (Thornhill MH et al., 1993). Ihre Behandlung mit TNF- α führt zu einer verstärkten Bildung von ICAM-1, VCAM-1 und E-selectin (van Leeuwen EB et al., 2000). Außerdem konnte gezeigt werden, dass EA.hy926 Zellen das *endothelin-converting enzyme* exprimieren.

PBMC

Die Fraktion der *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC), d.h. mononukleärer Zellen des peripheren Blutes, besteht aus Monozyten und Lymphozyten. Die PBMC wurden im Rahmen der Interventionsstudie aus dem Blut von 20 gesunden postmenopausalen Frauen gewonnen.

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultur

Kultivierung der HUVEC

An der Hugh Sinclair Unit of Human Nutrition innerhalb der School of Food Biosciences der University of Reading in Großbritannien wurden die HUVEC wie von Jaffe et al. beschrieben in Medium 199 kultiviert (Jaffe EA et al., 2001) und nach jedem Medienwechsel wurde der endotheliale Zellwachstumsfaktor (1 x) hinzugefügt. Innerhalb der Passagen 3 bis 6 und bei einer Konfluenz von 90-100% wurden die HUVEC für die Versuche genutzt. Beim Passagieren der Zellen nach standardisiertem Protokoll (Rimbach G et al., 2001), wurden die Zellpopulationen 1:3 verdünnt. Die Expression von für Endothelzellen typischen Proteinen wurde mit standardisierten Analysemethoden charakterisiert, um die Identität als Endothelzellen zu sichern (Jaffe EA et al., 2001).

Kultivierung der EA.hy926

Die EA.hy926 Zellen wurden in 75 cm² Flaschen in DMEM kultiviert. Die Zellen wurden konstant in einer feuchten Atmosphäre bei 5% CO₂ und 37°C gehalten. Bei einer Konfluenz von 80–90% wurden sie unter Verwendung einer Lösung aus 0,1% Trypsin und 0,04 mM EDTA passagiert. Alle Versuche wurden mit Zellen der Passage 28 durchgeführt.

Präparation von ox-LDL

Die Isolierung und Oxidation des LDL wurde von Rufus Turner an der School of Food Biosciences der University of Reading in Großbritannien unter standardisierten Bedingungen durchgeführt. Zur Gewinnung von LDL wurde Blut von fastenden, gesunden Personen aus der Antekubitalvene in Vacutainer-Tubes mit 1 mg/ml EDTA gesammelt. Wie von Havel et al. beschrieben, wurde die LDL-Fraktion mit einer Dichte von 1,019-1,063 g/ml über sequentielle Ultrazentrifugation in Salzlösungen mit einer Beckman T-100 Zentrifuge (T-100.3 Rotor) aus dem Plasma isoliert (Havel RJ et al, 1955). Das LDL wurde unter Stickstoff bei 4°C gelagert und innerhalb einer Woche nach der Gewinnung verwendet. Mit BioRad Dye Reagenz wurde nach Bradford der Proteingehalt bestimmt und als Basis für die Bestimmung der Lipoproteinkonzentration genutzt. Vor der Oxidation wurde das LDL für 24 h bei 4°C und Dunkelheit mit dreimaligem Wechsel gegen jeweils 1 l Dialysepuffer dialysiert. Die Oxidation des LDL (200 µg Protein/ml) erfolgte bei 37°C mit Hilfe von 5 µM CuCl₂ in PBS. Die Oxidation wurde über die Beobachtung der zunehmenden Bildung konjugierter Diene bei 234 nm mit einem Beckman DU 70 Spektrometer verfolgt und mit 6 µM EDTA zur Chelatbildung der Metallionen gestoppt. Darauf folgte eine weitere Dialyse über 24 h mit dreimaligem Pufferwechsel. Die EA.hy926 Zellen wurden mit jeweils 5 µg/ml LDL aus dem Mittelpunkt der Propagationphase und damit höchstmöglicher Standardisierung des Oxidationsgrades inkubiert. Zusätzlich wurde eine Elektrophorese der Lipoproteine in einem Beckman Paragon Elektrophorese-System durchgeführt, um auch anhand der veränderten

Oberflächenladung des Apolipoprotein B-100 den Oxidationsgrad der LDL-Partikel einschätzen zu können.

Herstellung des Extraktes Solgen 40 cleaved (S40cl)

Der Sojaextrakt wurde von Solbar Plant Extracts (Ashdod, Israel) bezogen. An der Agrotechnology and Food Innovations B.V. in Wageningen (Niederlanden) wurde der Extrakt zur Gewinnung von deglykosilierten Isoflavonoiden einer enzymatischen Behandlung mit zwei Einheiten β -Glucosidase (Sigma, Deisenhofen) pro mg Isoflavonoid unterzogen. Die Enzyme und Solgen 40 wurden in einem Natriumacetat-Puffer mit einem pH-Wert von 5,0 gemischt und dieses Gemisch wurde für 19 h im Wasserbad bei 37°C und 100 rpm geschüttelt. Im Anschluß wurde das Material gefriergetrocknet.

3.2.2 Isolierung der PBMC

Im Rahmen der Isoheart Interventionsstudie wurden die PBMC im Studienzentrum der University of Reading (Reading, UK) in der achten bzw. 16. Woche der Studie isoliert. Die Isolierung der PBMC erfolgte in 8 ml *CPT™ Cell Preparation Tubes* (Becton Dickinson, Cowley, UK) über einen Dichtegradienten aus dem Vollblut. Nach der Zentrifugation zur Gewinnung der PBMC, die den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt wurde, wurden die PBMC zweimal mit eiskalter 0,35 M Saccharoselösung in Gegenwart des Proteinaseinhibitor *CompleteMini* (Roche Diagnostics, Mannheim) gewaschen.

3.2.3 Zwei-Dimensionale Gelelektrophorese

3.2.3.1 Proteinisolierung

Die Probenaufarbeitung ist ein besonders kritischer Schritt der Proteomanalyse, da die Qualität und Quantität der Probe die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse beeinflusst. In den Versuchen mit HUVEC und den EA.hy926 Zellen wurden die Proteinproben je Inkubationsansatz in zwei unabhängigen Experimenten aus jeweils drei 75 cm² Zellkulturflaschen isoliert. Dazu wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit eiskalter 0,35 M Saccharoselösung und Proteinaseinhibitor mit einem Zellschaber von der Kulturflasche gelöst und zweimal in jeweils 3 ml eiskalter 0,35 M Saccharoselösung aufgenommen. Das durch Zentrifugation (7 Min.) bei 2.500 x g und 4°C gewonnene Zellpellet wurde in 200 μ l Lysepuffer (Gorg A et al., 2000) aufgenommen und mit Hilfe eines Ultraschallstabes mit zehn Stößen bei geringer Amplitude auf Eis homogenisiert. Die daran anschließende Zentrifugation (BR4i Jouan, Saint-Herblain, Frankreich) bei 100.000 g und 4°C für die Dauer von 30 Minuten lieferte einen Überstand, der die gelösten Proteine enthielt. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford mit dem BioRad Dye Reagenz, wurden die Proben sofort für die Elektrophorese verwendet oder Aliquote bei -80°C gelagert. Die PBMC wurden nach ihrer Isolierung aus dem Vollblut, wie zuvor beschrieben, ebenfalls

zweimal mit eiskalter 0,35 M Saccharoselösung gewaschen. Das durch Zentrifugation bei 2.500 g und 4°C für zehn Minuten gewonnene Zellpellet wurde ebenfalls in 200 µl Lysepuffer aufgenommen und entsprechend weiterbearbeitet.

3.2.3.2 Isoelektrische Fokussierung

Von jeder Proteinprobe wurden drei Gele angefertigt, für die entsprechend 18 cm lange Immobiline™ *Dry Strips* (pH 3-10) verwendet wurden. Die *Dry Strips* wurden im *Reswelling Tray* über Nacht mit 340 µl Rehydratisierungspuffer rehydriert. Die gequollenen Streifen wurden in die zur *IPGphor Unit* gehörenden *Strip holder* übertragen und mit 5 ml Silikonöl überschichtet, um das Austrocknen der *Dry Strips* während der Elektrophorese zu verhindern. Mit Hilfe des *cup loadings* wurden je *Dry Strip* 500 µg Protein in einem maximalen Probenvolumen von 120 µl aufgetragen. Bei den Versuchen mit HUVEC konnte je *Dry Strip* nur 350 µg Protein verwendet werden konnten. Die isoelektrische Fokussierung mit der *IPGphor Unit* erfolgte bei 20°C und einer konstanten Stromstärke von 50 µA je *Dry Strip*. Die Trennung erfolgte durch Spannungsänderungen nach folgendem Schema (Gorg A et al. 1998):

Stufe	Spannung (V)	Typ	Dauer (h)	Dauer (Vh)
1	500	Gradient	0.01	
2	4000	Gradient	1.5	
3	8000	Step-n-hold		25.000
Gesamt				28.446

Nach erfolgter isoelektrischer Fokussierung der Proben konnten die Streifen sofort für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (3.2.3.4) genutzt werden oder wurden bei -80°C gelagert.

3.2.3.3 Herstellung von SDS-Gelen

Für die Auftrennung der Proteine entsprechend nach ihrer molekularen Masse wurden 12,5%ige SDS-Trenngele nach Laemmli gegossen (Laemmli UK, 1970). Mit dem *Ettan Dalt Gel Caster* (Amersham Biotech, Freiburg) können bis zu 14 Gele parallel hergestellt werden, die eine Größe von 25,5 cm x 20,5 cm x 0,1 cm (h x b x d) besitzen. Nach der Polymerisierung über 48 h bei 4°C wurden die Gele für die Elektrophorese genutzt oder bis zu einer Woche bei 4°C gelagert.

3.2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Gelstreifen aus der isoelektrischen Fokussierung wurden vor der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zwei Equilibrierungsschritten unterzogen. Dazu wurden sie für die Dauer

von 15 Minuten mit dem Equilibrierungspuffer 1 auf einem Schüttler gewaschen, um die Proteine mit SDS zu sättigen und die vorhandenen Disulfidbrückenbindungen zu reduzieren. In einem zweiten Waschschrift für erneut 15 Minuten im Equilibrierungspuffer 2 wurden freie SH-Gruppen und anschließend die Gelstreifen mit Aqua bidest. gewaschen. Danach wurden sie auf die 12,5%igen SDS-Gele übertragen und mit heißer Agaroselösung, der sog. *Sealing Solution*, fixiert. Die Gelkassetten mit den SDS-Gelen wurden in die *Ettan Dalt II System Separation Unit* gesetzt, die mit einem auf 20°C temperierten 1xSDS-Laufpuffer gefüllt war, und wurden nach folgendem Protokoll der Elektrophorese, wie von Gorg A et al. (2000) beschrieben, unterzogen:

Stufe	Stromstärke/Gel	Dauer (h)	Temperatur
1	4 mA	1	20°C
2	12 mA	mind. 15	20°C

Wenn sich die Lauffront aus Bromphenolblau ca. 0,5 cm oberhalb des unteren Gelrandes befand, wurde der Lauf beendet. Um bei der Auswertung der Gele den detektierten Spots ihre molekulare Masse zuordnen zu können, wurde bei einem Gel je Experiment der Proteinmarker *LMW Calibration Standard for SDS electrophoresis* mit aufgetragen und separiert.

3.2.3.5 Proteinfärbung

Die Proteinspots wurden mit *Coomassie brilliant blue* angefärbt, das unspezifisch an alle Proteine bindet. Vorab wurden die Proteine im Gel für 5 h mit Hilfe einer Fixierlösung fixiert und über Nacht in die Färbelösung gegeben. Um nicht gebundenes *Coomassie brilliant blue* zu entfernen, wurden die Gele nach der Färbung in Aqua bidest. zur Entfernung der Hintergrundfärbung gewaschen.

3.2.4 Software-gestützte Auswertung der 2D-Gele

Für die Auswertung mit der Software ProteomWeaver 1.3.0b wurden die Gele mit dem *ImageScanner* (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) im Durchlicht-Modus eingescannt. Diese Software führt eine automatische Spottedetektion, Hintergrundentfernung und Normalisierung der Spots auf die Gesamtintensität des Gels durch. Zur Spotererkennung mussten stets ein Radiuslimit von 4 und ein Intensitätsminimum von 0,5 Einheiten (als Software-spezifische Einstellungen) erfüllt sein. Danach wurden alle Gele miteinander *gematched* und die Durchschnittsintensitäten der Spots in den Gelen einer Gruppe wurden mit den Durchschnittsintensitäten der Spots von Gelen der Referenzgruppe verglichen. Der so entstandene Quotient bestimmt den Regulierungsfaktor, auf dem die Auswahl der Spots zur massenspektrometrischen Analyse basierte. Die Veränderung des *steady state levels* bzw.

Spiegels des Proteins wurde dann als signifikant betrachtet, wenn die Spotintensität zwischen Kontroll- und Testproben mindestens um den Faktor 2 variierte, d.h. der Regulierungsfaktor $<0,5$ oder $>2,0$ war sowie der zugehörige Proteinspot mindestens in der Hälfte der Gele einer gleichbehandelten Gruppe detektiert werden konnte und eine Signifikanzniveau von $p < 0,05$ gegeben war.

3.2.5 Massenspektrometrische Analyse der Proteine

3.2.5.1 Enzymatischer Verdau und Matrices

Die als reguliert identifizierten Proteinspots wurden mit einer sterilen Hautstanze (\varnothing 2 mm oder 3 mm) aus je vier Gelen ausgestanzt und in 200 μ l Reaktionsgefäße überführt. Zur Entfernung von *Coomassie brilliant blue* und SDS aus dem Gel, wurden die Gelschnipsel vier mal je 15 Minuten abwechselnd mit 50 μ l einer 50 mM Ammoniumbicarbonatlösung und einem Gemisch aus je einem Teil 50 mM Ammoniumbicarbonatlösung und einem Teil Acetonitril gewaschen. In einem letzten Waschschrift von ca. 15 Minuten wurden die Proteinspots mit reinem Acetonitril geschrumpft und danach in einer Vakuumzentrifuge (RC.10.10, Jouan, Saint-Herblain, Frankreich) für die Dauer von 3-5 Minuten getrocknet. Die getrockneten Gelschnipsel konnten in dieser Form bei -20°C gelagert oder sofort dem tryptischen Verdau unterzogen werden. Dazu wurden die Proteinspots je nach Spotgröße in 5-7 μ l einer 0,02 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ *sequencing grade modified* Trypsinlösung auf Eis zur Quellung gelassen. Nach 1-2 h wurde der Überstand an Trypsinlösung entfernt und die Spots zum Verdau für mindestens 4 h bei 37°C in einen Inkubator überführt. Die erhaltenen Peptidfragmente wurden in 7 μ l 1%iger TFA je Spot für 10 Minuten im Ultraschallbad extrahiert. Die im Überstand vorliegenden Peptidfragmente wurden in neue Reaktionsgefäße überführt und der massenspektrometrischen Analyse zugeführt.

3.2.5.2 MALDI-TOF-MS

Die Probe mit den Peptidfragmenten wurde zur Analyse mit einer leicht modifizierten Gobom-Methode nach Bruker Daltoniks auf ein *AnchorChipTM Target* aufgetragen. Dazu wurde zunächst 1 μ l einer Matrix (HCCA gesättigt in Aceton/0,1% TFA, 97:3) auf das Target gegeben und sofort mit der Pipette wieder abgenommen. Auf die HCCA-Kristallschicht wurden je 3 μ l der Probe oder 1 μ l des Peptid-Kalibrierungsstandards zur externen Kalibrierung (Peptidmassenbereich von ~ 1000 bis 4000 Da) aufgetragen und drei Minuten antrocknen lassen. Die Probe wurde auf dem Target mit 2 μ l 0,1% TFA versetzt und nach 30 Sekunden wurde die restliche Probe und das 0,1% TFA mit der Pipette abgenommen und das Target kurz luftgetrocknet. Bei der anschließenden Messung mit dem *Autoflex-Gerät* (Bruker Saxonia, Leipzig) wurden Peptidionen im positiven Ladungszustand im

Massenbereich von 1 bis 3 kDa detektiert. Der Peptid-Kalibrierungsstandard wurde zur Eichung des Gerätes für jeweils acht Proben genutzt.

3.2.5.3 Peptide Mass Fingerprinting

Die erhaltenen Spektren wurden mit Hilfe der Software *FlexAnalysis* extern kalibriert. Das Programm weist den Peaks ihre Masse zu und eliminiert automatisch Peaks, die auf Verunreinigungen oder einen Eigenverdau von Trypsin zurückgeführt werden können. Die so überarbeiteten Spektren wurden in das Programm *Biotoools 2.0* geladen, das die Datenbanksuche in der *Mascot Search Database* (MSDB, Matrix Science Ltd, London, UK; www.matrixscience.com) durchführt. Die Recherche in der Datenbank erfolgte unter folgenden Parametern: humane Aminosäuresequenzen; Carboxyamidomethylierung von Cystein als alleinige zulässige Proteinmodifizierung; monoisotopische Peaks; Peptidmassen >900 Da; höchstens eine fehlende Spaltung im Trypsinverdau; Fehlertoleranz der Peptidmasse von höchstens 100 ppm. Proteine, deren *Score* mindestens bei zwei der vier Messungen bei 63 lag oder diesen Wert überschritten und deren Masse und isoelektrischer Punkt mit denen des Proteinspots aus der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese übereinstimmten, wurden als identifiziert betrachtet.

3.2.6 Analyse der mRNA-Spiegel

3.2.6.1 RNA-Isolierung

Die Gesamt-RNA wurde mit RNAwiz™ den Herstellerangaben entsprechend isoliert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte auf der Grundlage der Absorption bei 260 nm, wobei eine Absorption von 1,0 einem RNA-Gehalt von 40 µg/ml entspricht. Das Verhältnis der Absorption bei 260 nm zu 280 nm (A260/A280; 1,8-2,0) und die denaturierende Agarosegel-Elektrophorese wurden zur Überprüfung der Reinheit und Integrität herangezogen. Bei einem solchen Agarosegel (1 x TAE-Puffer, 1,5% Agarose, 0,0025% Ethidiumbromid) sollte die intakte Gesamt-RNA als zwei Banden sichtbar sein und das Verhältnis der Intensitäten der 28S und der 18S rRNA bei ungefähr 2:1 liegen. Anschließend wurde die RNA in RNase-freiem Wasser bei -80°C gelagert.

3.2.6.2 Real-Time PCR

Die semi-quantitative Real-Time PCR (RT-PCR) wurde mit dem *LightCycler* (Roche Diagnostics, Mannheim) durchgeführt.

Primer Design

Das Primer Design erfolgte mit Hilfe der Software *LightCycler Probe Design* und berücksichtigte die Kreuzkomplementarität (<3) der Primerpaare, die Schmelztemperatur der Primer (max. ± 1°C) und die Größe der Primer (ca. 16–22 bp). Zur Bestimmung der

Genspezifität der Primer wurde die BLAST-Suche in der publizierten Sequenz-Datenbank GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) herangezogen und Primer gewählt, die auf DNA-Ebene mindestens ein Intron abdecken. Die Effizienz und Spezifität aller Primer wurden im LightCycler mit einer geringen Zahl an Proben getestet und durch Variation der Parameter optimiert.

Two-Step RT-PCR

Für die Synthese der cDNA wurden jeweils 14 µl des MasterMix 1 und 0,5 µg der Gesamt-RNA in PCR-Gefäße überführt und auf 30 µl Gesamtvolumen mit sterilem, bi-distilliertem Wasser aufgefüllt. Die Denaturierung der RNA erfolgte im Thermocycler für fünf Minuten bei 65°C. Der denaturierten Probe wurden 9,3 µl des MasterMix 2 zugesetzt und die reverse Transkription bei 37°C für 60 Minuten durch Erhitzen auf 99°C für eine Minute beendet. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Für die RT-PCR wurden jeweils 9 µl MasterMix 3 und 1 µl cDNA, die vorab bei 65°C für fünf Minuten im Thermocycler denaturiert wurde, bzw. 1 µl Wasser für die Negativkontrolle, verwendet.

Protokoll der RT-PCR:

Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (sec)	Anmerkung
1	95	600	Trennung der DNA-Doppelstränge und Reaktivierung der <i>HotStart-Taq-Polymerase</i>
2	95	15	
3	62	10	Annealing
4	73	20	Elongation

Diese Schritte wurden zyklisch 50-mal wiederholt und nach jeder Elongation die Fluoreszenz automatisch ermittelt. Zur Sicherung der Primerspezifität wurde die Schmelzkurvenanalyse nach folgendem Protokoll herangezogen.

Protokoll zur Schmelzkurvenanalyse:

Schritt	Zieltemperatur (°C)	Dauer der Zieltemperatur (°C)	Heizgeschwindigkeit (°C/sec)	Fluoreszenzmessung
1	95	0	20	keine
2	60	10	20	keine
3	99	0	0,1	kontinuierlich

Wies die Schmelzkurve einen einzelnen deutlichen Peak auf, war eine ausreichende Spezifität des Primerpaares gegeben. Breite Peaks und/oder Ausprägung von Schultern wurden als Hinweis auf eine unspezifische Reaktion gewertet. Die amplifizierten Produkte wurden mit Hilfe der Dissoziationsanalyse und anhand einer Agarosegel-Elektrophorese auf ihre Qualität überprüft.

Relative Quantifizierung

Die Ausgangsmenge der Ziel-mRNA wurde als die Differenz der kalkulierten Zykluszahl, bei der die Fluoreszenz die Hintergrundfluoreszenz deutlich überschreitet, zwischen Kontrolle und Probe (ΔC_T) betrachtet. Die relative Menge der mRNA wurde auf das Referenzgen HPRT unter Verwendung folgender Gleichung (Pfaffl MW et al., 2002) normalisiert:

$$\text{RF (Regulierungsfaktor)} = 2^{\Delta C_T \text{ target}(\text{control-sample})/2\Delta C_T \text{ reference}(\text{control-sample})}$$

3.2.7 Ermittlung der Apoptoseinduktion

3.2.7.1 Bestimmung der Caspase-3-, Caspase-6- und Caspase-8-Aktivität

Die Bestimmung der Aktivität der Caspasen-3, -6 und -8 erfolgte auf der Grundlage der von Nicholson et al. beschriebenen Methode (Nicholson DW et al., 1995) mit leichten Modifikationen (Wenzel U et al., 2000). EA.hy926 Zellen wurden in 6-well-Platten in einer Dichte von 5×10^5 /well ausgesät und nach 24 h, nach Adhäsion der Zellen, wurden diese für weitere 24 h mit den jeweiligen Testsubstanzen inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mit Trypsin abgelöst und die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Zur Gewinnung eines zytosolischen Extraktes wurde durch Zentrifugation bei $2500 \times g$ für zehn Minuten zunächst ein Zellpellet gewonnen, das in $750 \mu\text{l}$ „Apoptosepuffer“ resuspendiert und mit Hilfe eines Motor-getriebenen Homogenisators homogenisiert wurde. Nach Zentrifugation bei $100.000 \times g$ und 4°C für 30 Minuten wurde der zytosolische Überstand mit den Caspase-Substraten in einer Endkonzentration von $20 \mu\text{M}$ inkubiert. Für die Bestimmung der Caspase-3-Aktivität wurde das Substrat Ac-DEVD-AMC genutzt, Ac-VKMD-AFC für die Caspase-6 und Z-IETD-AFC für die Caspase-8. Die Aktivität der Caspasen wurde anhand der entstandenen fluoreszierenden Produkte mit einem Multiwell-Plattenreader (Fluoroskan Ascent, Labsystem, Bornheim-Hersel) nach Anregung bei 390 nm und Emission bei 460 nm für das Substrat der Caspase-3 bestimmt, während die durch die Caspasen-6 und -8 generierten Produkte nach Anregung bei 390 nm bei 515 nm emittierten. Die apparente Aktivität der Caspasen aus EA.hy926 Zellen wird in $\Delta F/h \times 10^6$ Zellen Aktivität der Kontrollzellen angegeben.

3.2.7.2 Desintegration der Plasmamembran

Als Marker für die frühe Phase der Apoptose wurde die Veränderung der Membranpermeabilität der Zellen herangezogen. Dazu wurden die EA.hy926 Zellen in einer Dichte von 3×10^4 auf Objektträgern in Quadriperm-Wells kultiviert und dann über 24 h mit den Testsubstanzen inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit $1 \mu\text{g/ml}$ Hoechst 33342 für fünf Minuten gefärbt. Der Farbstoff dringt in Zellen mit desintegrierter Plasmamembran ein und fluoresziert nach Bindung an die DNA (Elstein KH & Zucker RM, 1994). Fluoreszierende Zellen werden

entsprechend als Marker für den Umfang der Apoptoseinduktion in der Zellpopulation herangezogen. Nach Entfernen des Farbstoffes wurde mit einem inversen Fluoreszenz-Mikroskop, das mit einem band-pass Anregungsfilter von 340-380 nm und einem long-pass Emmisionsfilter von 425 nm ausgestattet war, die Akkumulationsrate des Farbstoffes semi-quantitativ bestimmt.

3.2.7.3 DNA-Fragmentierung und Chromatin-Kondensation

Der Farbstoff Hoechst 33258 diente der Beurteilung der DNA-Fragmentierung als Marker für die späte Phase der Apoptose. Die EA.hy926 Zellen wurden auch zu diesem Zweck in einer Dichte von 3×10^4 auf Objektträgern in Quadriperm-Wells kultiviert und dann über 24 h mit den Effektoren inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen, 30 Minuten lang luftgetrocknet und vor der Färbung mit $1 \mu\text{g/ml}$ Hoechst 33258 mit 2% Paraformaldehyd fixiert. Der Farbstoff Hoechst 33258 fluoresziert nach Bindung an die DNA. Durch die Fixierung mit Paraformaldehyd wird die zelluläre DNA frei zugänglich. Mit Hilfe des inversen Mikroskops wurde der Umfang der DNA-Fragmentierung und Chromatinkondensation beurteilt.

3.2.8 Interventionsstudie mit Phytoöstrogenen - Interventionsstudie „Isoheart“

Im Rahmen des im FP 5 von der EU finanzierten Projektes „Isoheart“ wurde eine Interventionsstudie an 20 postmenopausalen Frauen über einen Zeitraum von 16 Wochen durchgeführt. „Isoheart“ hatte zum Ziel, die physiologischen Effekte des Verzehrs von Phytoöstrogenen in Form von mit Soja-Isolflavonoiden angereicherten Nahrungsmitteln zu untersuchen. Der gesundheitliche Nutzen dieser Produkte zur Verringerung des Risikos kardiovaskulärer Erkrankungen bei postmenopausalen Frauen sollte im Rahmen der Intervention belegt werden sowie die Akzeptanz dieser Produkte durch die Konsumenten beurteilt werden.

Die Probandinnen im Alter zwischen 45 und 70 Jahren stammten aus der Umgebung von Reading (UK) und wurden im dortigen Studienzentrum betreut. Die Teilnehmerinnen wiesen einen Body Mass Index von $20\text{-}32 \text{ kg/m}^2$ auf und hatten in den vorausgegangenen 12 Monaten keine Menstruation. Eine Hormonersatz-Therapie während der letzten sechs Monate vor Studienbeginn galt als Ausschlusskriterium ebenso wie eine Impfung oder die Verwendung von Antibiotika drei Monate vor Studienbeginn. Weitere Ausschlusskriterien für die Teilnahme an der Interventionsstudie waren bereits vorliegende kardiovaskuläre oder entzündliche Erkrankungen, Diabetes mellitus oder weitere Erkrankungen und die Einnahme von Medikamenten, die die Ergebnisse der Untersuchung hätten beeinträchtigen können vor allem Entzündungshemmer, Blutdrucksenker oder Statine. Die Teilnehmerinnen rauchten weniger als fünf Zigaretten/Woche, verzehrten sonstig nur wenige Soja-haltige Lebensmittel,

konsumierten keine Nahrungssupplemente, führten keine Diät zur Gewichtsreduktion durch, spendeten nicht regelmäßig Blut und waren keine trainierten Athleten oder Leistungssportler. Zur Absicherung der Eignung der Frauen für die Studie wurden Routine-Untersuchungen zur Leber- und Nierenfunktion durchgeführt, einschließlich der Bestimmung der Hämoglobin- und Glucosewerte, der Plasmaspiegel an TC und HDL-Cholesterin und Triacylglycerol (TAG). Ein TC >8 mMol/l, TAG >3 mMol/l, Hämoglobin <12 mg/dl und ein Blutdruck >160/90 mmHg führten zum Ausschluss von der Interventionsstudie. Zusätzlich wurde als Einschlusskriterium der Teilnehmerinnen, deren letzte Menstruation ein bis drei Jahre vor Beginn der Studie zurücklag, durch Untersuchung des Follikel-stimulierenden Hormons (41-124 IU/l) und des luteinisierenden Hormons der Status der Menopause bestätigt.

Im Rahmen der doppelblinden Studie im Crossover-Design verzehrten die Frauen täglich zwei mit Isoflavonoiden angereicherte Riegel, die eine Gesamtaufnahme von 50 mg/d an Isoflavonoiden bedingte. Der Riegel für den Placebo-Arm unterschied sich mit Ausnahme der Isoflavonoide in ihrer Zusammensetzung nicht von den Isoflavonoid-haltigen Riegeln. Während der Studiendauer durften die Frauen keine weiteren Lebensmittel, die größere Mengen an Phytoöstrogenen enthalten, wie Sojaprodukte, Leinsamen oder Kürbiskerne, verzehren. Nach acht Wochen wurde den Frauen Blut entnommen, um die Wirkung der Riegel auf das Proteom der PBMC zu untersuchen. Nach der ersten Blutabnahme wurden die Riegel ausgetauscht, d.h. die Placebogruppe erhielt nun für weitere acht Wochen den Isoflavonoidhaltigen Riegel und umgekehrt (siehe Abb. 3.1). Nach der 16. Woche wurde erneut Blut für die Proteomanalyse der PBMC gewonnen.

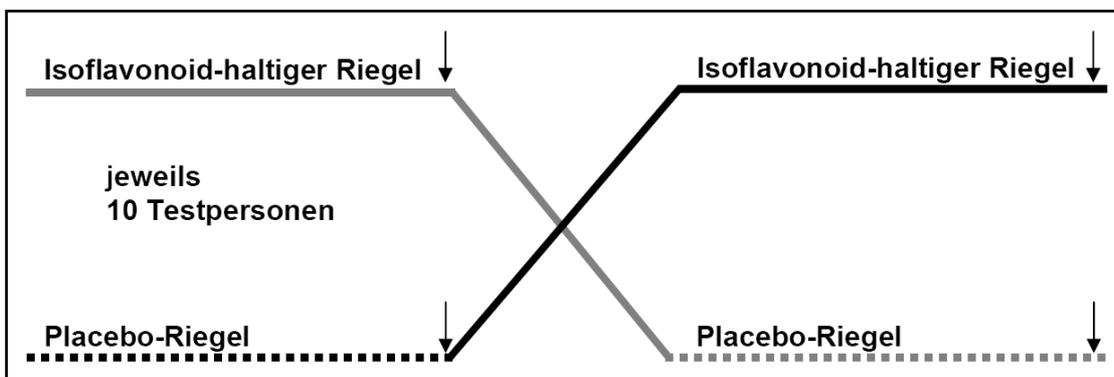


Abb. 3.1 Studiendesign der humanen Interventionsstudie mit einem Isoflavonoid-haltigen Riegel. Die Pfeile markieren die Zeitpunkte der Blutabnahme (nach 8 bzw. 16 Wochen).

Die Gele von PBMC nach dem Verzehr des Isoflavonoid-haltigen Riegels (schwarze Linie in Abb. 3.1) wurden mit den Gelen von PBMC nach Gabe der Placeboriegel (gestrichelte, schwarze Linie in Abb. 3.1) verglichen, um die Wirkung der Isoflavonoide auf das Proteom der PBMC derselben Probandin zu bestimmen. Zur Überprüfung der Reversibilität der Effekte wurde ein Vergleich der Gele der zweiten Placebogruppe (gestrichelte, graue Linie in Abb. 3.1) mit den Gelen nach dem Verzehr der Isoflavonoid-haltigen Riegeln (graue Linie in Abb. 3.1) herangezogen.

4 Ergebnisse

4.1 *In vitro* Studien zur Wirkung von Isoflavonoiden auf Endothelzellen

Phytoöstrogenen werden präventive Eigenschaften im Rahmen der Entstehung und des Voranschreitens der Atherosklerose zugeschrieben. Um mögliche zugrunde liegende Mechanismen dieser präventiven Wirkung der Phytoöstrogene zu identifizieren, diente hier die Proteomanalyse auf der Basis der 2D-Gelelektrophorese und der Identifizierung der Proteine anhand ihres Peptid-Massen-Fingerabdrucks mittels MALDI-TOF MS. Der Einfluss von Isoflavonoiden wurde einerseits an Endothelzellen *in vitro* und im Rahmen einer humanen Interventionsstudie *in vivo* analysiert. In der humanen Interventionsstudie dienen PBMC als Reporterzellsysteme und die Proteomanalyse vor allem der Identifizierung von Markerproteinen, die zum Nachweis einer spezifischen Wirkung der Isoflavonoide herangezogen werden können.

4.1.1 Proteomanalyse von Zellkulturen

Als *in vitro* Modelle für die Wirkung der Isoflavonoide auf Endothelzellen wurden die primären, aus Nabelschnurvenen stammenden Endothelzellen HUVEC und die Endothelzelllinie EA.hy926 verwendet. Die Zellen wurden für die Dauer von 24 h mit den endothelialen Stressoren Hcy, in einer Konzentration von 25 μ M, oder ox-LDL, in einer Konzentration von 5 μ g/ml, jeweils in Ab- und Anwesenheit der Isoflavonoide kultiviert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Endothelzellen. Gele von Proteinextrakten von Zellen, die nur mit einem der Stressoren behandelt worden waren, wurden mit den Gelen von Extrakten aus Kontrollzellen verglichen, um die Wirkungen der Stressoren aufzudecken. Gele von Extrakten aus Zellen der Co-Inkubation von Stressor und Isoflavonoiden wurden mit Extrakten von Zellen der alleinigen Kultivierung mit den Stressoren verglichen. Dieser Vergleich sollte zeigen, ob die Isoflavonoide die Wirkung der Stressoren aufzuheben vermögen. Der Vergleich von Proteinextrakten aus Zellen, die nur mit den Isoflavonoiden kultiviert wurden, mit solchen aus Kontrollzellen wurde durchgeführt, um zelluläre Effekte der Isoflavonoide aufzuzeigen, die unabhängig vom endothelialen Stress zu beobachten sind.

4.1.1.1 Proteomanalyse von HUVEC

Die primären Endothelzellen HUVEC wurden für 24 h mit den endothelialen Stressoren Hcy und ox-LDL in Ab- und Anwesenheit von 2,5 μ M bzw. 25 μ M Genistein inkubiert. 2,5 μ M Genistein entspricht einer Konzentration, die im Plasma nach dem Verzehr einer einzelnen sojareichen Mahlzeit gemessen werden kann (Izumi T et al., 2000); 25 μ M Genistein entspricht eher einer pharmakologischen Dosis. Hcy wurde in einer Konzentration von 25 μ M eingesetzt, was einer Konzentration bei einer milden Form der HHcy entspricht (siehe Kapitel 1.2.2.1) (Jacobsen DW, 1998). Obwohl das Risiko der Atherosklerose erst bei einem

Plasmaspiegel von 30 mg/ml ox-LDL zunimmt (siehe 1.2.2.2) (Holvoet P et al., 2001), wurden die Endothelzellen mit nur 5 µg/ml ox-LDL kultiviert, da höhere Konzentrationen bereits zytotoxische Wirkungen aufwiesen.

4.1.1.1.1 Einfluss von Genistein auf das Proteom von HUVEC nach Exposition gegenüber Hcy

In mit *Coomassie brilliant blue* gefärbten Gelen von Proteinextrakten aus HUVEC konnten im Mittel etwa 700 Proteinspots mit Hilfe der Software-gestützten Analyse identifiziert werden. In HUVEC, die mit Hcy behandelt wurden, konnten zehn Proteine vorgefunden werden, deren *steady state* Spiegel durch Genistein signifikant verändert wurden. Sieben dieser Proteine waren nach der Exposition der Zellen gegenüber Hcy in einer geringeren Konzentration vorhanden als in Extrakten aus Kontrollzellen. Die durch Hcy verursachte Abnahme der Spotintensität konnte durch 2,5 µM Genistein im Falle von vier Proteinen, *ANNEXIN V*¹ (Abb. 4.1, Spot 1), *KERATIN TYPE 2 CYTOSKELETAL* (Abb. 4.1, Spot 4), dem genregulierenden *CHROMOSOME SEGREGATION PROTEIN SMC1* (Abb. 4.1, Spot 7) und dem *APOPTOSIS LINKED GENE-2 INTERACTING PROTEIN 1* (Abb. 4.1, Spot 9) verhindert werden. Bei drei weiteren Proteinen, dem Chaperon *UBIQUITIN CARBOXY-TERMINAL HYDROLASE L* (Abb. 4.1, Spot 2), dem zytoskeletalen Protein *LAMIN A* (Abb. 4.1, Spot 6) und dem Protein der Genregulierung *HETEROGENOUS NUCLEAR RIBONUCLEOPROTEIN (HNRNP) A2* (Abb. 4.1, Spot 8), nahm die Spotintensität erst in Anwesenheit von 25 µM Genistein wieder zu. Signifikant erhöht wurde durch Hcy nur die Expression des *HOMER-2 PROTEIN HOMER-2B SPLICING FORM* (Abb. 4.1, Spot 10), das bisher jedoch keiner funktionellen Bedeutung zugeordnet werden kann. Wurde neben Hcy zeitgleich Genistein den Zellen angeboten, führte dies in beiden Konzentrationen zu einem weiteren Anstieg der Spotintensität dieses Proteins um das Fünffache. Die Befunde dieser Versuchsserie können Tab. 10.1 im Anhang entnommen werden.

¹ Diese Schreibweise symbolisiert Proteine, die im Rahmen dieser Arbeit identifiziert wurden.

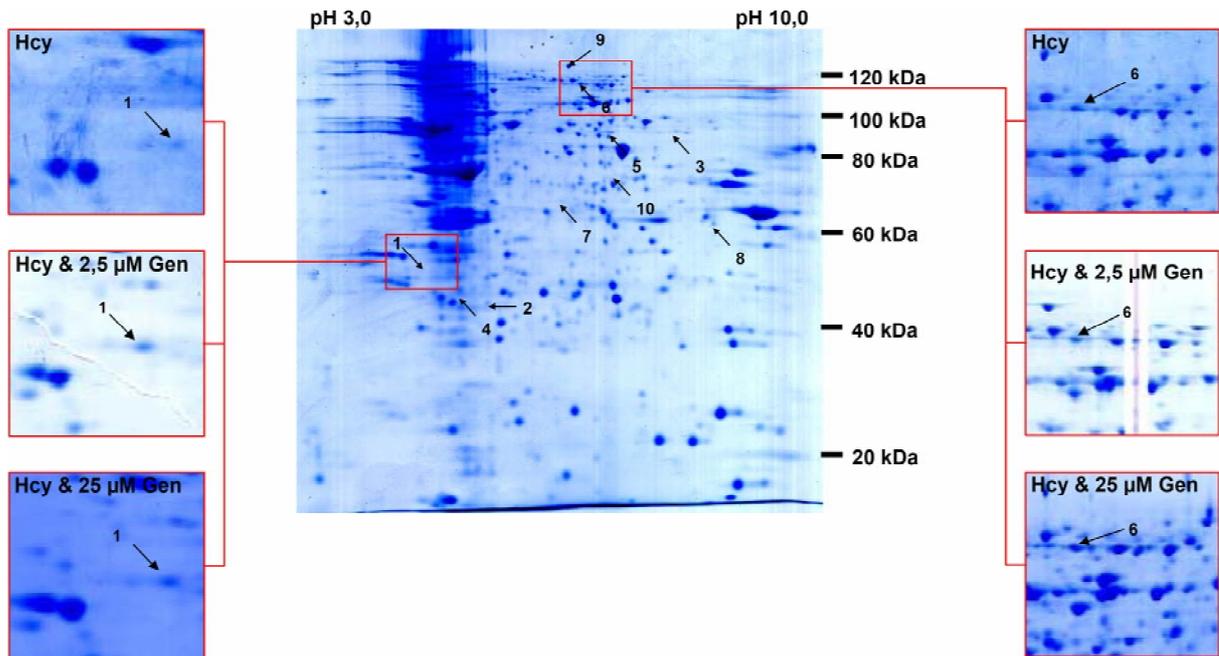


Abb. 4.1 Repräsentative 2D-PAGE von Proteinen aus HUVEC, die für 24 h mit 25 µM Hcy alleine bzw. in Gegenwart von 2,5 µM oder 25 µM Genistein inkubiert wurden.

Die isoelektrische Fokussierung der Proteine erfolgte mit IPG-Strips pH 3-10 und die zweite Dimension mit einem 12,5 %igen SDS-Polyacrylamidgel. In der Mitte ist ein typisches Coomassie-gefärbtes Gel von HUVEC Kontrollzellen abgebildet. Daneben befinden sich vergrößerte Ausschnitte aus Gelen von Proteinextrakten unterschiedlich behandelte HUVEC. Die Spot-Nummern stimmen mit denen in Tab. 10.1 überein.

4.1.1.1.2 Wirkung von Genistein auf das Proteom ox-LDL behandelter HUVEC

Neun Proteine wurden durch Genistein in ox-LDL behandelten Zellen in ihrem *steady state* Spiegel beeinflusst. Sechs dieser Proteine, darunter die *ALDEHYDE DEHYDROGENASE 1A1* (Abb. 4.2, Spot 3), wurden durch ox-LDL alleine nicht in ihrer Expression beeinflusst, was darauf schließen lässt, dass diese Wirkungen von Genistein auf die Expression dieser Proteine unabhängig von ox-LDL sind (Tab. 10.2). Zwei der Proteine, das *26S PROTEASOME SUBUNIT P28* (Abb. 4.2, Spot 6) und das *P167* (Abb. 4.2, Spot 8), waren in Kontrollzellen nicht detektierbar, wurden durch ox-LDL und noch stärker durch 25 µM Genistein in ihren Spiegeln erhöht. Die nach Kultivierung mit ox-LDL signifikante Erhöhung der Spiegel des pro-atherosklerotischen Proteins *UBIQUITIN CONJUGATING ENZYME 12* (Abb. 4.2, Spot 1) wurde besonders durch 2,5 µM Genistein verhindert (Tab. 10.2).

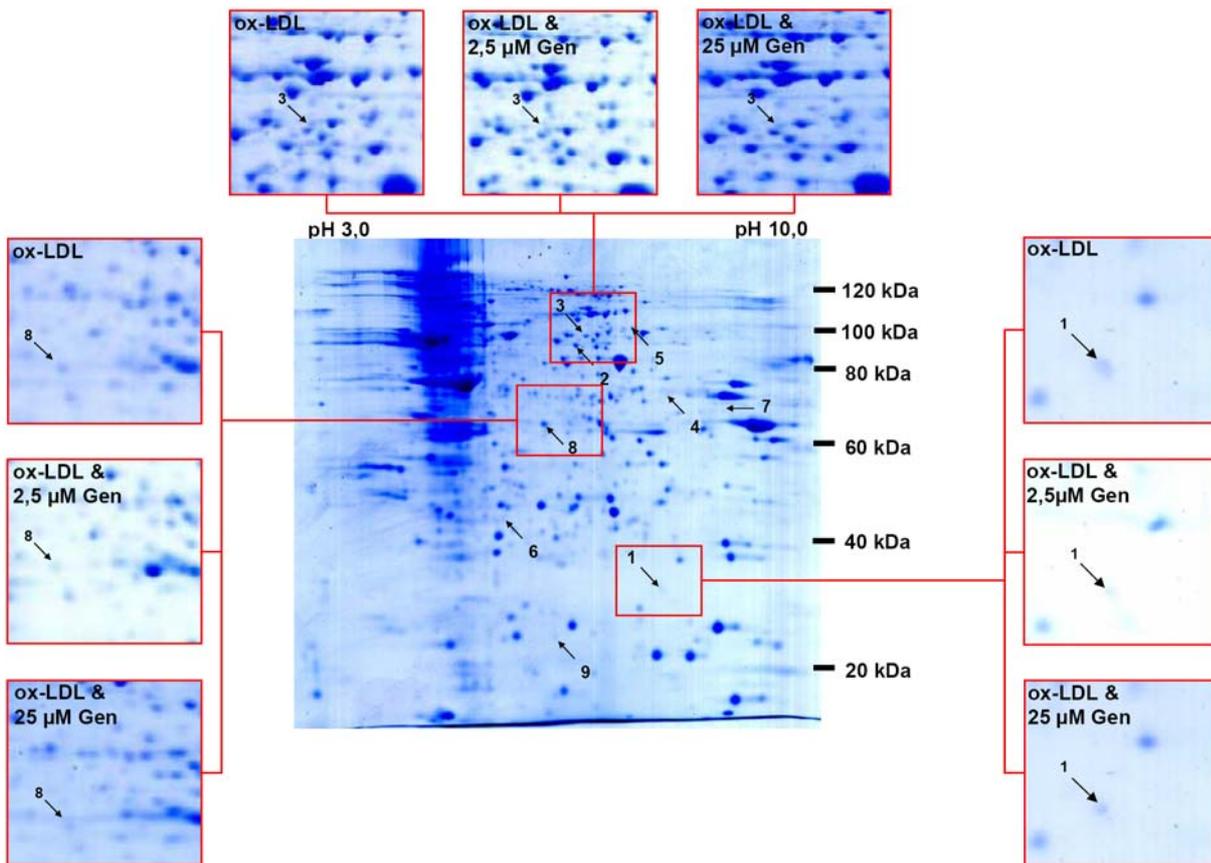


Abb. 4.2 Repräsentative 2D-PAGE von Proteinen aus HUVEC, die mit 5 µg/ml ox-LDL in Ab- und Anwesenheit von 2,5 µM bzw. 25 µM Genistein kultiviert wurden. Die Spot-Nummern sind mit denen in Tab. 10.2 identisch.

Untersuchungen zur Wirkung des Isoflavonoidgemisches aus Genistein und Daidzein sowie des Extraktes S40cl auf das Proteom der HUVEC konnten nicht durchgeführt werden, da zur Gewinnung einer für die Proteomanalyse ausreichenden Proteinmenge eine sehr große Menge an HUVEC in Kultur gehalten werden musste, was aus technischen wie finanziellen Gründen nicht realisiert werden konnte.

4.1.1.2 Proteomanalyse von Extrakten aus EA.hy926 Zellen

Alle weiterführend beschriebenen Studien wurden an der Endothelzelllinie EA.hy926 durchgeführt, die neben den beschriebenen endothelialen Eigenschaften (3.1.4) ein den HUVEC sehr ähnliches Proteinmuster aufweist, wie der Vergleich der Gele von Abb. 4.2 und 4.3 dokumentiert.

EA.hy926 Zellen wurden, wie vorab beschrieben, ebenfalls für 24 h mit 25 μ M Hcy bzw. mit 5 μ g/ml ox-LDL kultiviert und der Einfluss der endothelialen Stressoren in Ab- und Anwesenheit von 2,5 μ M Genistein auf das Proteom untersucht. Zusätzlich zur Inkubation mit 2,5 μ M Genistein wurden die Zellen auch mit einem Isoflavonoidgemisch aus 2,5 μ M Genistein und 1 μ M Daidzein (GenDai) oder dem Sojaextrakt S40cl, der dem Isoflavonoidgemisch entsprechende Isoflavonoid-Konzentrationen aufwies, in Ab- und Anwesenheit der beiden Stressoren behandelt. Die Behandlung der Zellen mit S40cl und GenDai und deren Vergleich sollte prüfen, welche Effekte des Sojaextraktes durch die quantitativ bedeutensten Isoflavonoide vermittelt werden. Auf die Gabe von 25 μ M Genistein wurde verzichtet, da bei den Untersuchungen an HUVEC schon bei einer Konzentration von 2,5 μ M Genistein deutliche Effekte auf das Proteom auftraten und diese Konzentration physiologischen Plasmakonzentrationen entspricht. Aus je zwei Zellkulturansätzen wurden Proteinlysate gewonnen und von jedem Extrakt jeweils drei 2D-Gele angefertigt. Die Gele der Extrakte von mit Hcy bzw. ox-LDL behandelten Zellen wurden wieder mit Gelen von Kontrollzellen verglichen, um die Wirkung der Stressoren zu identifizieren. Die nach Inkubation der EA.hy926 Zellen mit Hcy oder ox-LDL in Anwesenheit von Genistein, GenDai oder S40cl gewonnenen Proteinextrakte wurden mit denen aus Zellen, die mit den Stressoren alleine inkubiert wurden, verglichen. Damit wurde überprüft, inwieweit die isolierten Isoflavonoide bzw. der Extrakt den Einfluss der Stressoren aufheben können. Proteinextrakte von Zellen, die nur mit den Isoflavonoiden oder dem Extrakt kultiviert worden waren, wurden ebenfalls mit denen von Kontrollzellen verglichen, um von Stressoren unabhängige Effekte charakterisieren zu können.

4.1.1.2.1 Homocystein-vermittelte Effekte auf die Spiegel zellulärer Proteine von EA.hy926 Zellen

Die Behandlung der Zellen mit 25 μ M Hcy veränderte die Spotintensität von 87 Proteinen um mindestens den Faktor 2, von denen 56 Proteine mittels MALDI-TOF MS identifiziert werden konnten (Tab. 10.3 - 10.6; Abb. 4.3 - 4.9). Bei 17 Proteinen wurden bei Exposition gegenüber 2,5 μ M Genistein, die durch Hcy vermittelten Veränderungen der Proteinspiegel verhindert (Tab. 10.4; Abb. 4.4, 4.5). 12 Proteine konnten identifiziert werden, bei denen die kombinierte Gabe von 2,5 μ M Genistein und 1 μ M Daidzein in EA.hy926 die Hcy-induzierten

Effekte aufzuheben vermochte (Tab. 10.5; Abb. 4.6, 4.7) und 10 Proteine, bei denen der Extrakt S40cl eine ähnliche Wirkung entfaltet (Tab. 10.6; Abb. 4.8, 4.9).

Bei 25 Proteinen konnten sowohl die isolierten Isoflavonoide als auch der Extrakt die durch Hcy verursachten Effekte nicht verändern (Tab. 10.3). Von diesen refraktären Proteinen wurden elf in ihren Spiegeln durch Hcy verringert (ein Annexin, drei Chaperone, drei Proteine des Zytoskeletts, eines des Stoffwechsels, eine Kinase und zwei Proteine der Genregulierung) (Tab. 10.3) und 14 im Spiegel durch Hcy erhöht (z.B. die zytoskelettalen Proteine *VIMENTIN* (Abb. 4.3, Spot 7) und *MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN EB1* (Abb. 4.3, Spot 9) oder des *CATHEPSIN B PRECURSOR* (Abb. 4.3, Spot 13), das zu den Proteinen des Stoffwechsels gehört) (Tab. 10.3).

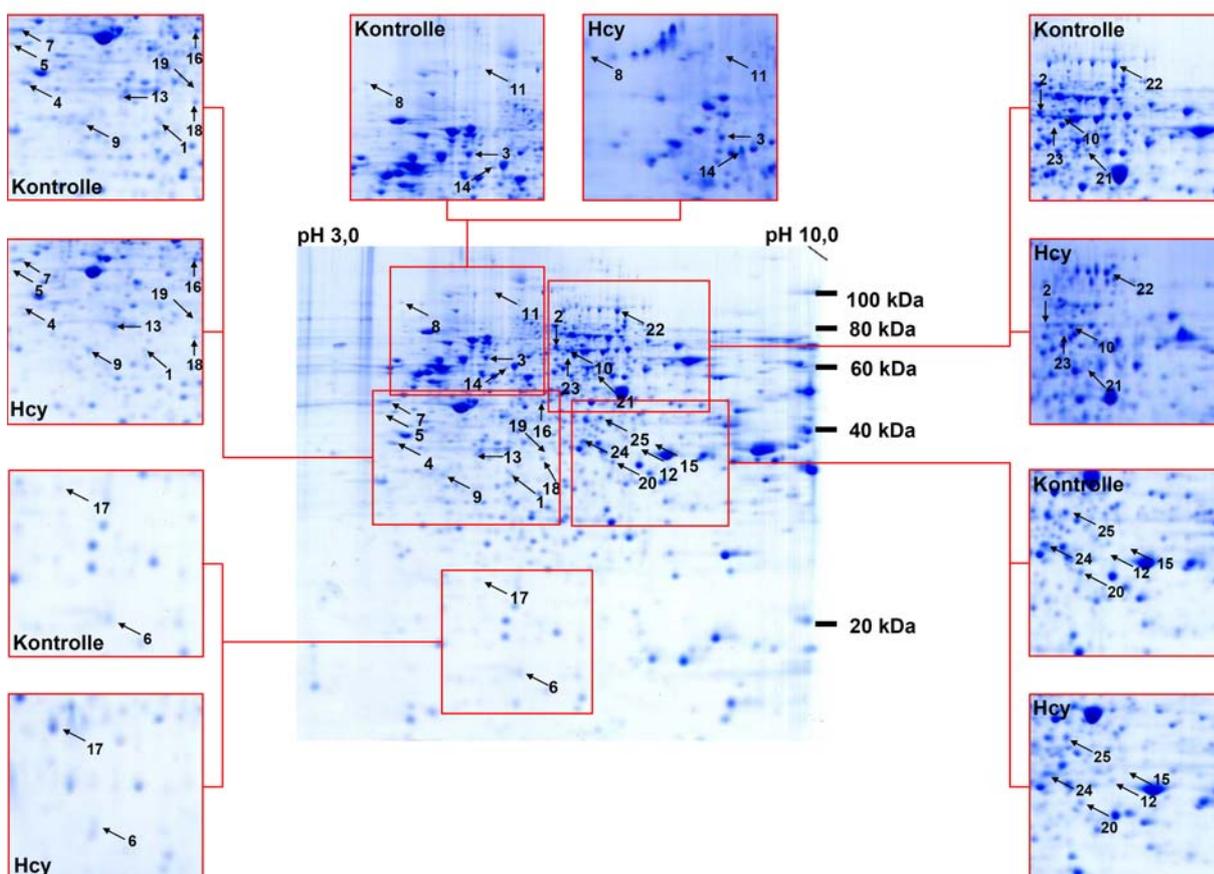


Abb. 4.3 Repräsentative 2D-PAGE von Proteinen aus EA.hy926 Zellen nach Inkubation mit 25 µM Hcy für 24 h.

In der Mitte ist ein typisches mit *Coomassie brilliant blue* gefärbtes Gel von EA.hy926 Kontrollzellen dargestellt, das von vergrößerten Ausschnitten der Gele von Kontrollzellen und mit Hcy gestressten Zellen umgeben ist. Die Spot-Nummern sind mit denen in Tab. 10.3 identisch.

4.1.1.2.2 Effekte von Genistein auf die *steady state* Spiegel der Proteine von EA.hy926 Zellen nach Exposition gegenüber Hcy

Genistein konnte bei 28 Proteinen die Effekte des endothelialen Stressors Hcy teilweise oder sogar vollständig wieder aufheben. Von diesen 28 Proteinen konnten 17 mittels MALDI-TOF MS identifiziert werden (Tab. 10.4; Abb. 4.4, 4.5).

Zwei Chaperone, das *T-COMPLEX-TYPE MOLECULAR CHAPERONE TCP1* (Abb. 4.4, Spot 3) und der *HEAT SHOCK PROTEIN GP PRECURSOR* (Abb. 4.4, Spot 2), konnten nur in Gelen von Kontrollzellen oder der Co-Inkubation von Hcy mit Genistein vorgefunden werden. Von den Proteinen des Zytoskeletts waren zwei durch Hcy in ihrer Intensität verringert und die drei zytoskelettalen Proteine *LAMIN A* (Abb. 4.4, Spot 9), *LAMIN C* (Abb. 4.4, Spot 7) und *MOESIN/ANAPLASTIC LYMPHOMA KINASE FUSION PROTEIN* (Abb. 4.4, Spot 8) wiesen nach Kultivierung der Zellen mit Hcy eine erhöhte Intensität auf. Die gleichzeitige Gabe von Genistein konnte diesen Einflüssen von Hcy entgegenwirken. Bei den Proteinen, die dem Stoffwechsel zugeordnet werden konnten, erhöhte Genistein bei dreien die durch Hcy reduzierten Spiegel wieder und reduzierte die Spiegel von zwei Proteinen, die nach Kultivierung mit Hcy erhöhte Mengen aufwiesen. Das *THIOREDOXIN RELATED PROTEIN* (Abb. 4.4, Spot 15), das zur Klasse der an der Detoxifikation beteiligten Proteine gehört sowie ein Protein der Genregulierung und ein Protein ohne bekannte Funktion wiesen nach Hcy-Gabe einen starken Abfall der Spot-Intensität auf, was Genistein verhindern konnte.

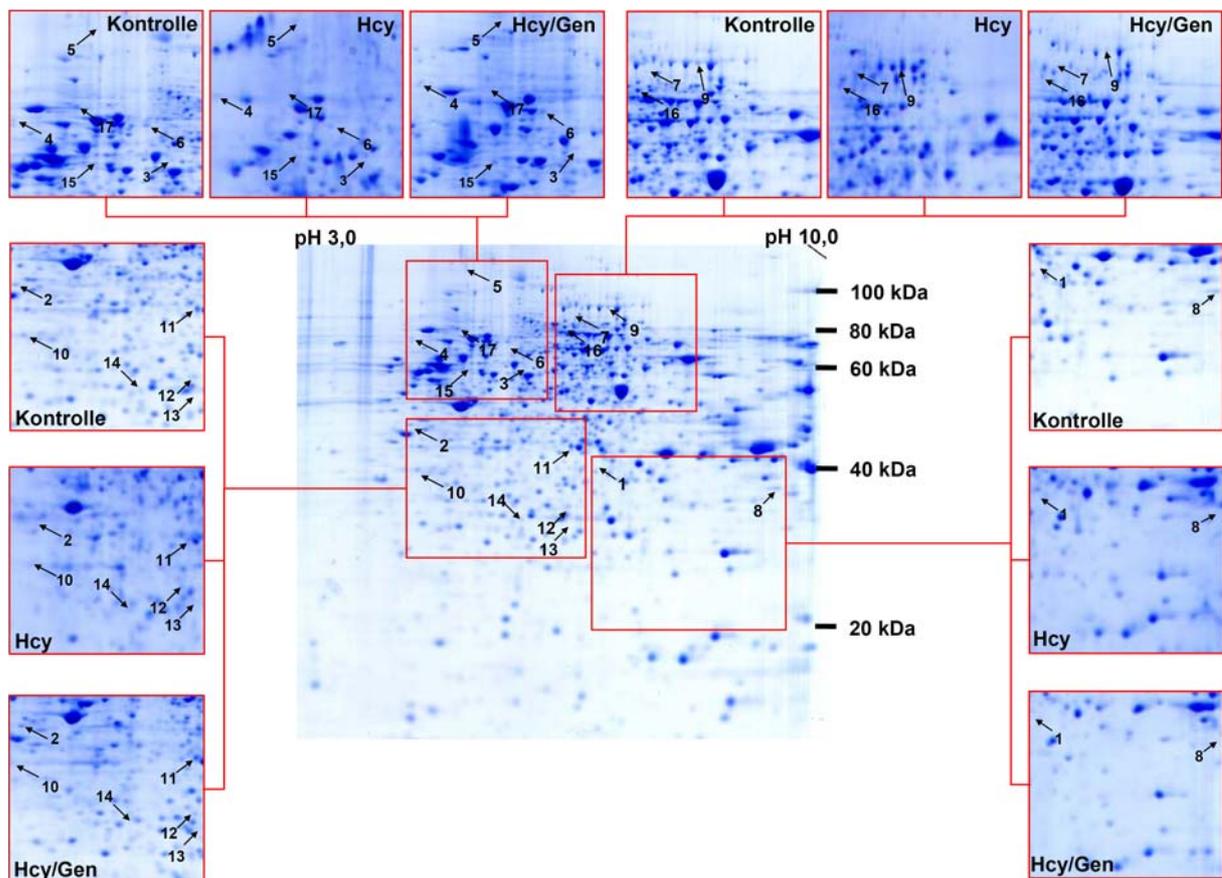


Abb. 4.4 Repräsentative 2D-PAGE von Proteinen aus EA.hy926 Zellen nach Inkubation mit 25 μM Hcy in Ab- oder Anwesenheit von 2,5 μM Genistein für 24 h.

In der Mitte ist ein typisches mit *Coomassie brilliant blue* gefärbtes Gel von EA.hy926 Kontrollzellen abgebildet, das von vergrößerten Ausschnitten der Gele von Kontrollzellen, Hcy-exponierten Zellen und Zellen der Co-Inkubation von Hcy mit Genistein (Hcy/Gen) umgeben ist. Die Spot-Nummern entsprechen denen von Abb. 4.5 und Tab. 10.4.

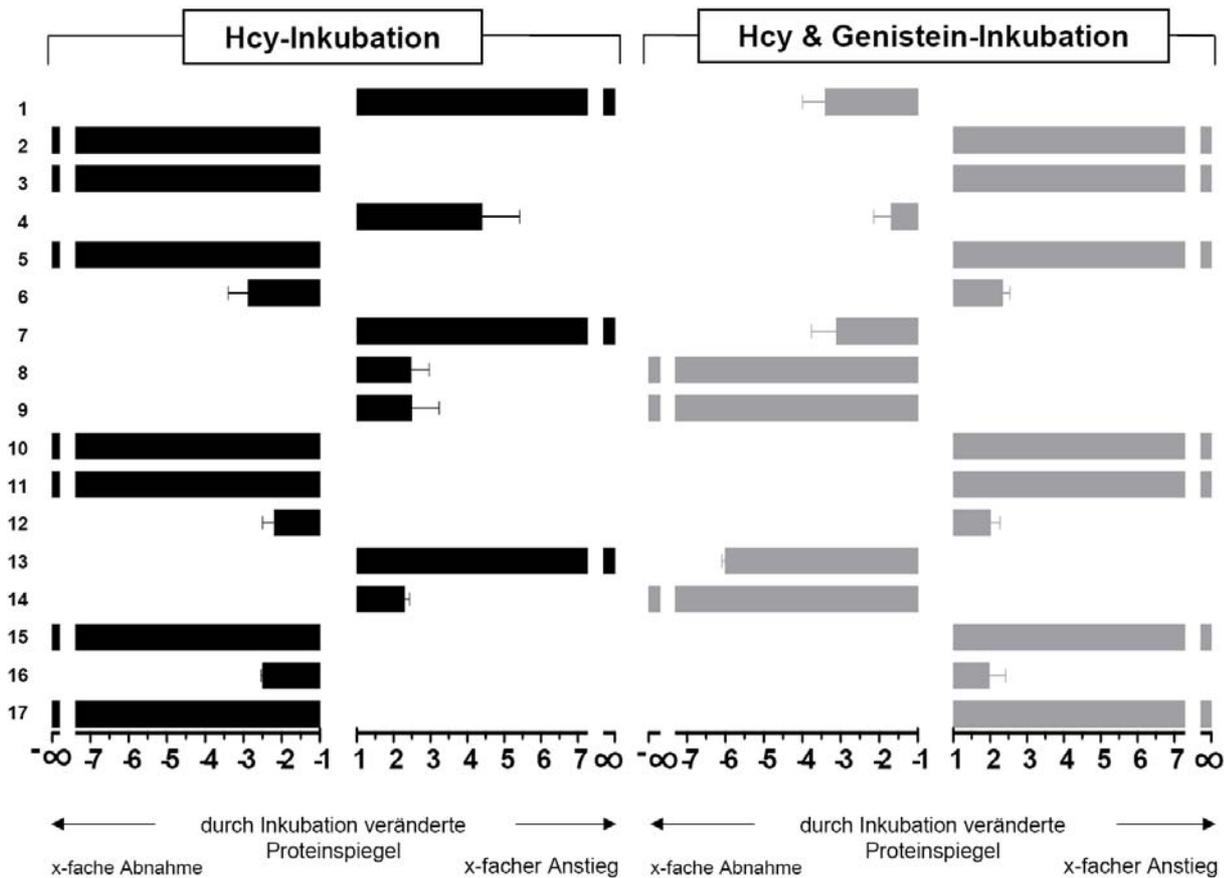


Abb. 4.5 Relative Spotintensitäten der identifizierten Proteine von EA.hy926 Zellen nach Inkubation der Zellen mit Hcy in Anwesenheit von Genistein im Vergleich zur Kultivierung in Anwesenheit von Hcy alleine.

Dargestellt sind die Veränderungen im *steady state* Spiegel (mindestens zweifache Abweichung) in Hcy-exponierten Zellen gegenüber Kontrollzellen (schwarze Balken) bzw. in Zellen, die mit Hcy in Anwesenheit von Genistein behandelt wurden im Vergleich zur Inkubation der Zellen mit Hcy alleine (graue Balken).

Identifizierte Proteine: 1. ANNEXIN; 2. HEAT SHOCK PROTEIN GP PRECURSOR; 3. T-COMPLEX-TYPE MOLECULAR CHAPERONE TCP1; 4. BIP PROTEIN; 5. LAMIN B1; 6. T-PLASTIN; 7. LAMIN C; 8. MOESIN; 9. LAMIN A; 10. NUDIX HYDROLASE NUDT5; 11. UDP-GALACTOSE-4-EPIMERASE; 12. C3.4.25.1 PROTEASOME ENDOPEPTIDASE COMPLEX; 13. TRIOSEPHOSPHATE ISOMERASE (TIM); 14. 6-PHOSPHO-GLUCONOLACTONASE; 15. THIOREDIXIN-RELATED PROTEIN; 16. ELONGATION FACTOR G1; 17. FLJ20403 PROTEIN (FRAGMENT)

4.1.1.2.3 Einfluss des Genistein/Daidzein-Gemisches auf das Proteom von EA.hy926 Zellen nach Exposition gegenüber Hcy

Unter den Proteinen, deren Spotintensität durch Hcy verändert wurde, konnte bei 18 Proteinen durch die zeitgleiche Gabe des Isoflavonoidgemisches GenDai, das aus 2,5 μ M Genistein und 1 μ M Daidzein bestand, die Hcy-verursachte Änderung der Proteinspiegel gehemmt werden. Von diesen 18 Proteinen konnten 13 anhand ihres Peptid-Massen-Fingerabdruckes identifiziert werden (Tab. 10.5; Abb. 4.6, 4.7). Nur zwei dieser 13 Proteine wurden auch von Genistein in Hcy-exponierten Zellen beeinflusst (Tab 10.4, 10.5; Abb. 4.4-4.7). Ein Proteinspot mit einer geschätzten molekularen Masse von 82 kDa und einem *pI* von 6,7, der als *LAMIN A* identifiziert wurde, zeigte nach der Inkubation der Zellen mit Hcy einen erhöhten Spiegel, wobei Genistein diesen Anstieg verhinderte (Tab. 10.4; Abb. 4.4, 4.5). GenDai jedoch hemmte den durch Hcy verursachten Intensitätsverlust eines Proteinspots mit einer molekulare Masse von 72 kDa und einem isoelektrischen Punkt (*pI*) von 5,8, dessen Peptid-Massen-Fingerabdruck ebenfalls mit *LAMIN A* (Abb. 4.5, Spot 2)

übereinstimmt, der sich aber hinsichtlich der Masse und des *pI* deutlich von dem durch Genistein regulierten unterschied (Tab. 10.5; Abb. 4.6, 4.7). Die durch Hcy bedingten erhöhten Spiegel der *6-PHOSPHOGLUCONOLACTONASE* (Abb. 4.5, Spot 6) wurden sowohl von Genistein wie auch von GenDai signifikant reduziert (Tab. 10.4, 4.5; Abb. 4.4-4.7).

Darüberhinaus verringerte GenDai die Hcy-vermittelten Effekte auf die Expression einer Reihe von Proteinen, die durch Genistein in Hcy-behandelten Zellen nicht beeinflusst wurden. Die durch Hcy verringerte Spotintensität des Chaperons *CHAPERONIN CONTAINING T-COMPLEX POLYPEPTIDE 1 DELTA SUBUNIT* (Abb. 4.5, Spot 1), näherte sich in Anwesenheit von GenDai wieder dem Niveau der Kontrolle. Hcy verminderte neben der Spotintensität von *LAMIN A* (72 kDa, *pI* 5,8) auch die des zytoskelettalen Proteins *MATRIN 3*, was ebenfalls durch GenDai aufgehoben werden konnte. Der Spiegel des *VOLTAGE-DEPENDENT ANION-SELECTIVE CHANNEL PROTEIN 1* (Abb. 4.5, Spot 4) war hingegen nach Gabe von Hcy erhöht und die Co-Inkubation mit GenDai minderte seine Intensität wieder. Die Spotintensitäten von *CATHEPSIN D CHAIN B* (Abb. 4.5, Spot 5) war in Proteinextrakten Hcy-gestresster EA.hy926 Zellen vermindert, was durch GenDai-Gabe wieder aufgehoben wurde. GenDai veränderte ebenfalls die Spiegel von sechs Proteinen, die durch Hcy beeinflusst wurden und die der Genregulierung zugeordnet werden konnten (Tab. 10.5; Abb. 4.6, 4.7). Von diesen konnten zwei Proteinspots, die durch Hcy eine erhöhte Intensität und in Anwesenheit von GenDai wieder eine der Kontrolle entsprechende Intensität aufwiesen, dem Protein *HETEROGENOUS NUCLEAR RIBONUCLEOPROTEIN H* zugewiesen werden. Bei einem dieser Proteinspots betrug die geschätzte molekulare Masse 27 kDa und der *pI* lag bei 5,9 (Abb. 4.5, Spot 7), die geschätzte molekulare Masse des zweiten lag bei 34 kDa und der *pI* bei 4,6 (Abb. 4.5, Spot 8).

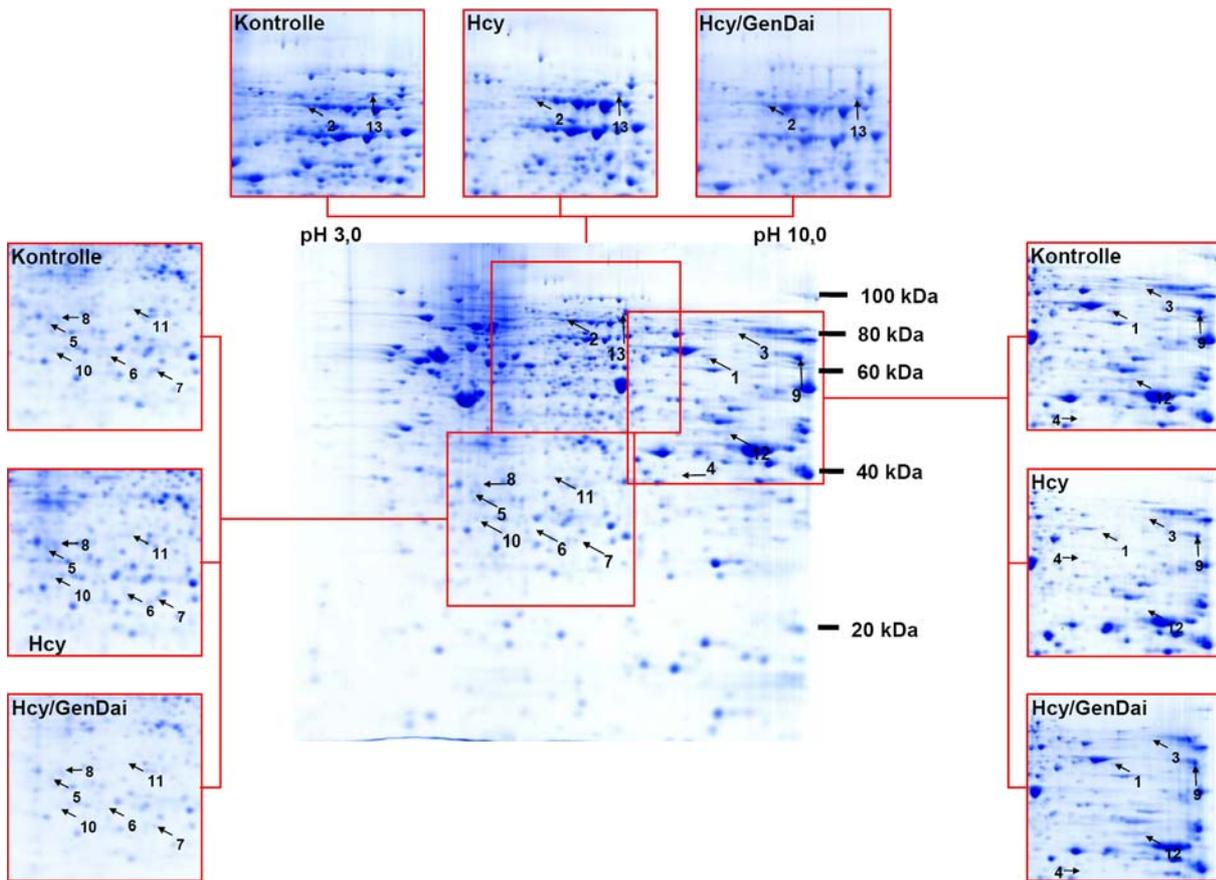


Abb. 4.6 Repräsentative 2D-PAGE von Proteinen aus EA.hy926 Zellen nach Inkubation mit 25 µM Hcy in Ab- oder Anwesenheit von 2,5 µM Genistein und 1 µM Daidzein (GenDai) für 24 h. In der Mitte ist ein repräsentatives Coomassie gefärbtes Gel von EA.hy926 Kontrollzellen dargestellt, das von vergrößerten Ausschnitten der Gele von Kontrollzellen, Hcy-exponierten Zellen und Zellen, die mit Hcy in Anwesenheit von GenDai gestresst worden sind (Hcy/GenDai), umrahmt wird. Die Spot-Nummern sind mit denen in Abb. 4.7 und Tab. 10.5 identisch

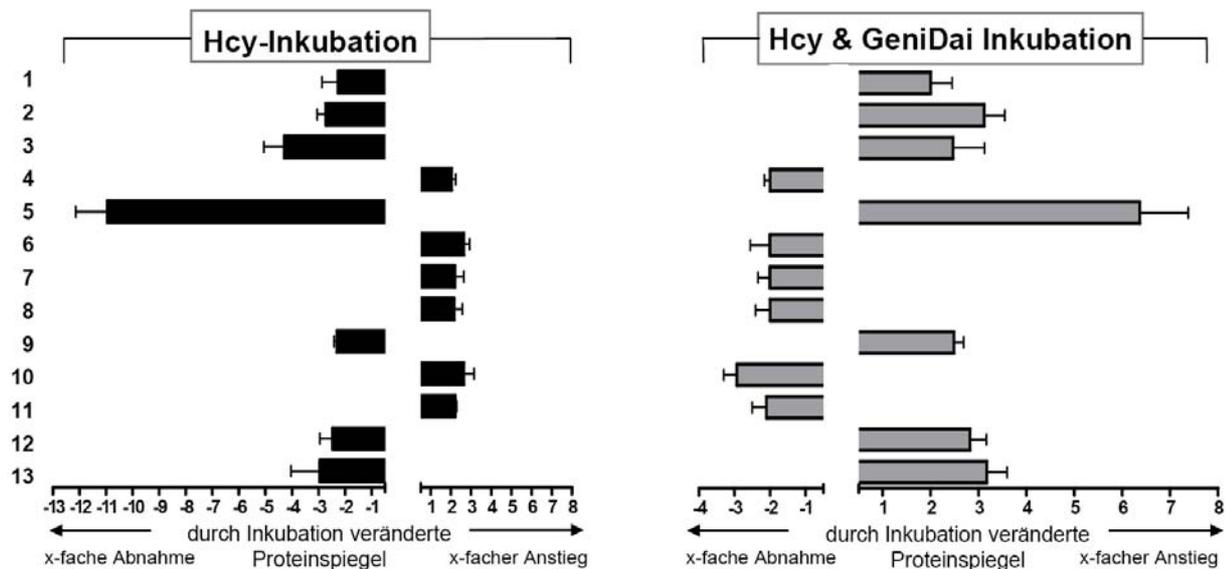


Abb. 4.7 Relative Spotintensitäten der identifizierten Proteine von EA.hy926 Zellen nach Inkubation der Zellen mit Hcy in Anwesenheit von GenDai im Vergleich zur Kultivierung in Anwesenheit von Hcy alleine. Dargestellt sind die Veränderungen im *steady state* Spiegel (mindestens zweifache Abweichung) in Hcy-exponierten Zellen gegenüber Kontrollzellen (schwarze Balken) bzw. in Zellen, die mit Hcy in Anwesenheit von GenDai behandelt wurden im Vergleich zur Inkubation der Zellen mit Hcy alleine (graue Balken). Identifizierte Proteine : 1. CCT 1, DELTA SUBUNIT; 2. LAMIN A; 3. MATRIN 3; 4. VDAC-1; 5. CATHEPSIN D CHAIN B; 6. 6-PHOSPHOGLUCONOLACTONASE; 7. HETEROGENOUS NUCLEAR RIBONUCLEOPROTEIN H; 8. HETEROGENOUS NUCLEAR RIBONUCLEOPROTEIN H; 9. 54 kDa NUCLEAR RNA- AND DNA-BINDING PROTEIN; 10. PUTATIVE SPLICEOSOME ASSOCIATED PROTEIN; 11. TRANSLATION ELONGATION FACTOR EF-TU PRECURSOR; 12. U5 snRNP-SPECIFIC 40 kDa PROTEIN; 13. KSRP

4.1.1.2.4 Wirkung des Extraktes S40cl auf die Proteinspiegel von EA.hy926 Zellen nach Exposition gegenüber Hcy

Wurden die mit Hcy behandelten Zellen gleichzeitig mit dem Extrakt S40cl behandelt, konnte bei 13 Proteinen die durch Hcy vermittelte Wirkung aufgehoben werden. Von diesen 13 Proteinen konnten zehn mittels MALDI-TOF MS identifiziert werden (Tab. 10.6; Abb. 4.8, 4.9). Zwei dieser Proteine wurden auch durch Genistein als beeinflusst identifiziert (Tab. 10.4; Abb. 4.4, 4.5) und zwei weitere durch das Isoflavonoid-Gemisch (Tab. 10.5; Abb. 4.8, 4.9). In Analogie zum Genistein konnte auch S40cl den durch Hcy verursachten Anstieg des Spiegels von *ANNEXIN II* (Abb. 4.8, Spot 1) verhindern und die durch Hcy reduzierte Spotintensität des *HEAT SHOCK PROTEIN GP PRECURSOR* (Abb. 4.8, Spot 2) wieder steigern (Tab. 10.4, 10.6; Abb. 4.4, 4.5, 4.8, 4.9). Die Spotintensität von *MATRIN 3* (Abb. 4.8, Spot 5) und *U5 SNRNP-SPECIFIC 40 KDA PROTEIN* (Abb. 4.8, Spot 10) war in Extrakten von Hcy-exponierten EA.hy926 Zellen deutlich verringert und S40cl als auch GenDai konnten diese Wirkung antagonisieren (Tab. 10.5, 10.6; Abb. 4.6-4.9).

Weitere, nur bei S40cl identifizierte Wirkungen betrafen u.a. den Protein *DNAK-TYPE MOLECULAR CHAPERONE PRECURSOR* (Abb. 4.8, Spot 3), dessen Spiegel durch Hcy reduziert und durch S40cl wieder erhöht wurde. Die Intensitäten der *PROBABLE THIOREDOXIN PEROXIDASE PAGA* (Abb. 4.8, Spot 6), der *DUAL SPECIFICITY PHOSPHOPROTEIN PHOSPHATASE DUSP3* (Abb. 4.8, Spot 7) und des *IKK INTERACTING PROTEIN ISOFORM 1* (Abb. 4.8, Spot 8) wurden unter Hcy-Gabe reduziert und durch S40cl wieder erhöht (Tab. 10.6; Abb. 4.8, 4.9).

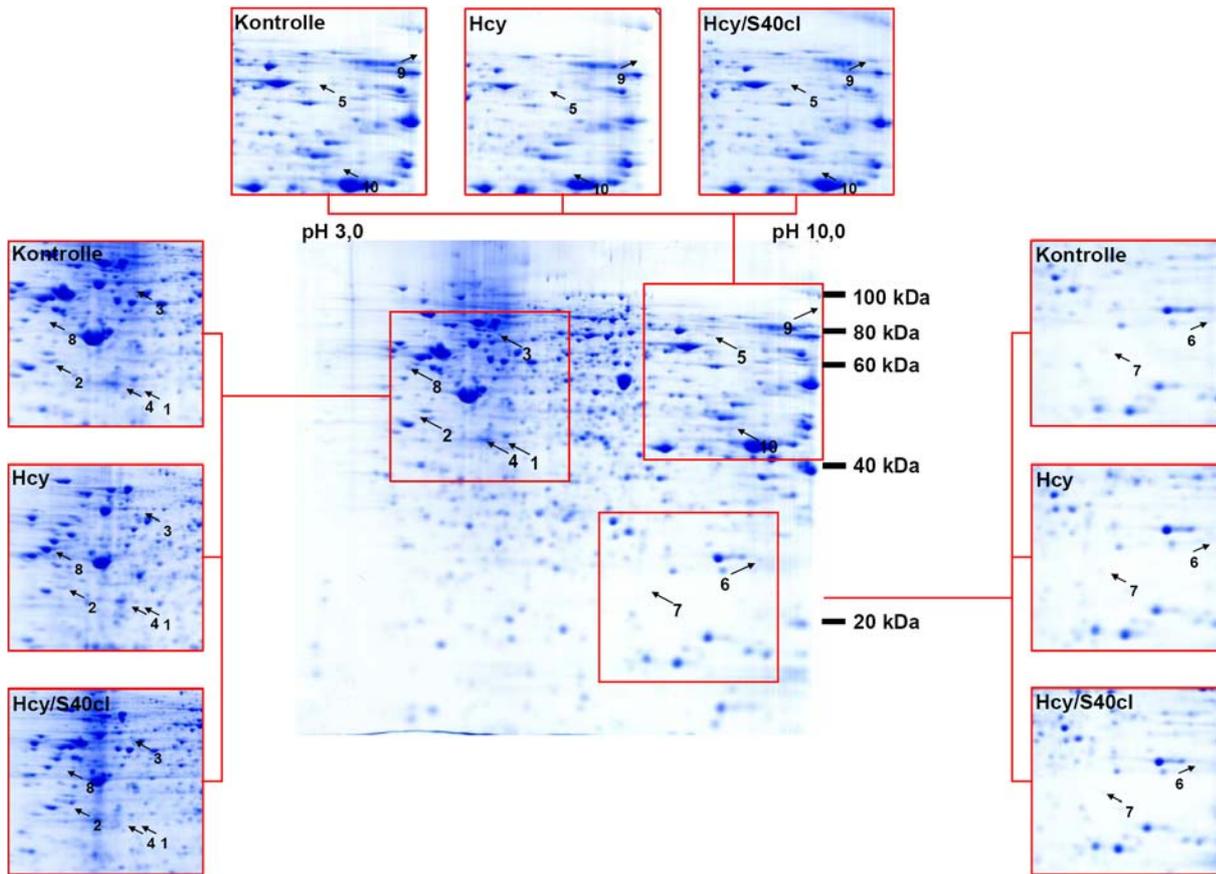


Abb. 4.8 Repräsentative 2D-PAGE von Proteinen aus EA.hy926 Zellen nach Kultivierung mit 25 µM Hcy alleine bzw. in der Gegenwart des Extraktes S40cl für 24 h. In der Mitte ist ein repräsentatives mit *Coomassie brilliant blue* gefärbtes Gel von EA.hy926 Kontrollzellen dargestellt, das von vergrößerten Ausschnitten der Gele mit Proteinen aus Kontrollzellen, Hcy gestressten Zellen und Zellen, die mit Hcy in Anwesenheit von S40cl behandelt worden sind (Hcy/S40cl), umgeben ist. Die Spot-Nummern sind mit denen in Abb. 4.9 und Tab. 10.6 identisch.

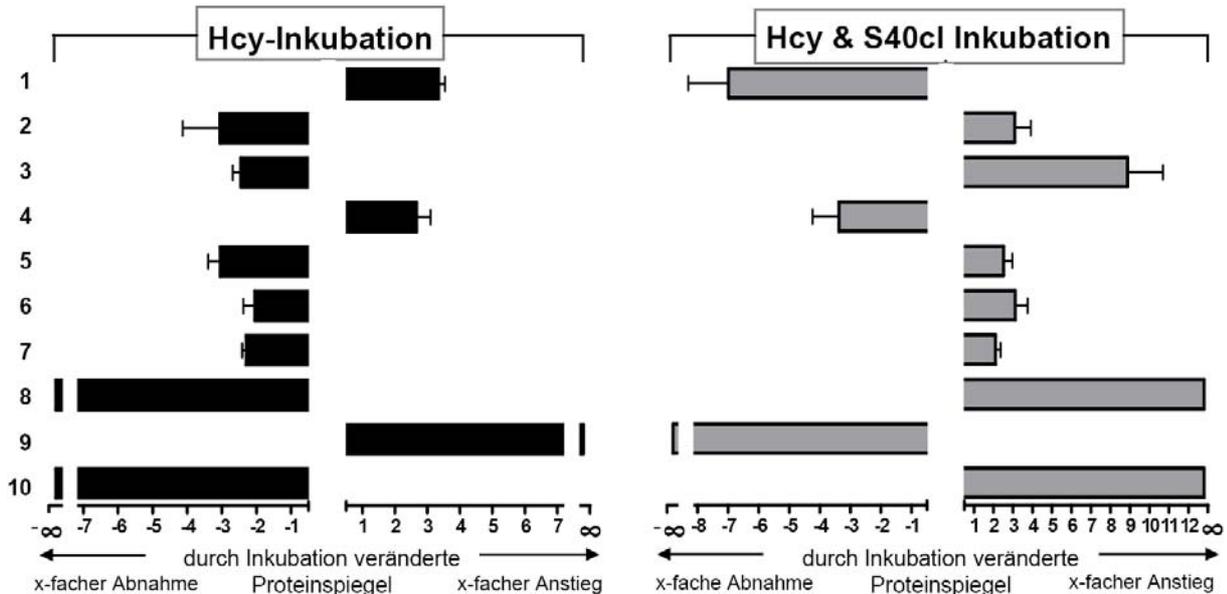


Abb. 4.9 Relative Spotintensitäten der identifizierten Proteine von EA.hy926 Zellen nach Inkubation der Zellen mit Hcy in Anwesenheit von GenDai im Vergleich zur Kultivierung in Anwesenheit von Hcy alleine. Dargestellt sind die Veränderungen im *steady state* Spiegel (mindestens zweifache Abweichung) in Hcy-exponierten Zellen gegenüber Kontrollzellen (schwarze Balken) bzw. in Zellen, die mit Hcy in Anwesenheit von GenDai behandelt wurden im Vergleich zur Inkubation der Zellen mit Hcy alleine (graue Balken). Identifizierte Proteine: 1. ANNEXIN II; 2. HSP GP; 3. DNAK-TYPE MOLECULAR CHAPERONE; 4. CAPPING PROTEIN A; 5. MATRIN 3; 6. PAGA; 7. DUSP3; 8. IKK; 9. SPLICING FACTOR PROLINE/GLUTAMINE RICH; 10. U5 SNRNP-SPECIFIC 40 KDA PROTEIN

Um Hinweise auf die zugrundeliegenden Mechanismen der veränderten Proteinexpression zu erhalten, wurden die mRNA-Spiegel ausgewählter Gene, die auf der Proteinebene durch den Extrakt S40cl in Hcy-exponierten EA.hy926 Zellen als verändert identifiziert wurden, analysiert. Der *MITOCHONDRIAL DNAK-TYPE MOLECULAR CHAPERONE PRECURSOR* zeigte eine Verringerung der Proteinexpression in Hcy-gestressten Zellen und durch die Co-Inkubation mit S40cl stieg die Expression des Proteins auf das nahezu vierfache der Kontrolle (Tab. 10.6; Abb. 4.8, 4.9). Auch die Proteinspiegel der *DUAL SPECIFICITY PHOSPHOPROTEIN PHOSPHATASE DUSP3* und von *MATRIN 3* waren durch Hcy reduziert worden und S40cl konnte diese durch Hcy ausgelösten Effekte wieder aufheben (Tab. 10.6; Abb. 4.8, 4.9). Auf mRNA-Ebene wurden dagegen die drei Transkripte in Hcy-exponierten Zellen als in die entgegengesetzte Richtung reguliert identifiziert, diese Veränderung wurde jedoch auch von S40cl verhindert (Abb. 4.25). Somit scheint die Regulation der Proteine *DNAK-TYPE MOLECULAR CHAPERONE PRECURSOR*, *DUSP3* und *MATRIN 3* hauptsächlich über den veränderten Abbau der Proteine vermittelt worden zu sein. Das *ANNEXIN A2* und das *CAPPING PROTEIN ALPHA*, die auf Proteinebene unter Hcy im Spiegel erhöht waren und bei Co-Inkubation mit S40cl wieder mit der Kontrolle vergleichbare Proteinspiegel aufwiesen, waren auch auf mRNA-Ebene durch Hcy im Spiegel erhöht, was S40cl ebenso verhindern konnte (Tab. 10.6; Abb. 4.8, 4.9, 4.25). Die Regulation des Proteinspiegels scheint damit in erster Linie über veränderte Transkription und Translation zu erfolgen.

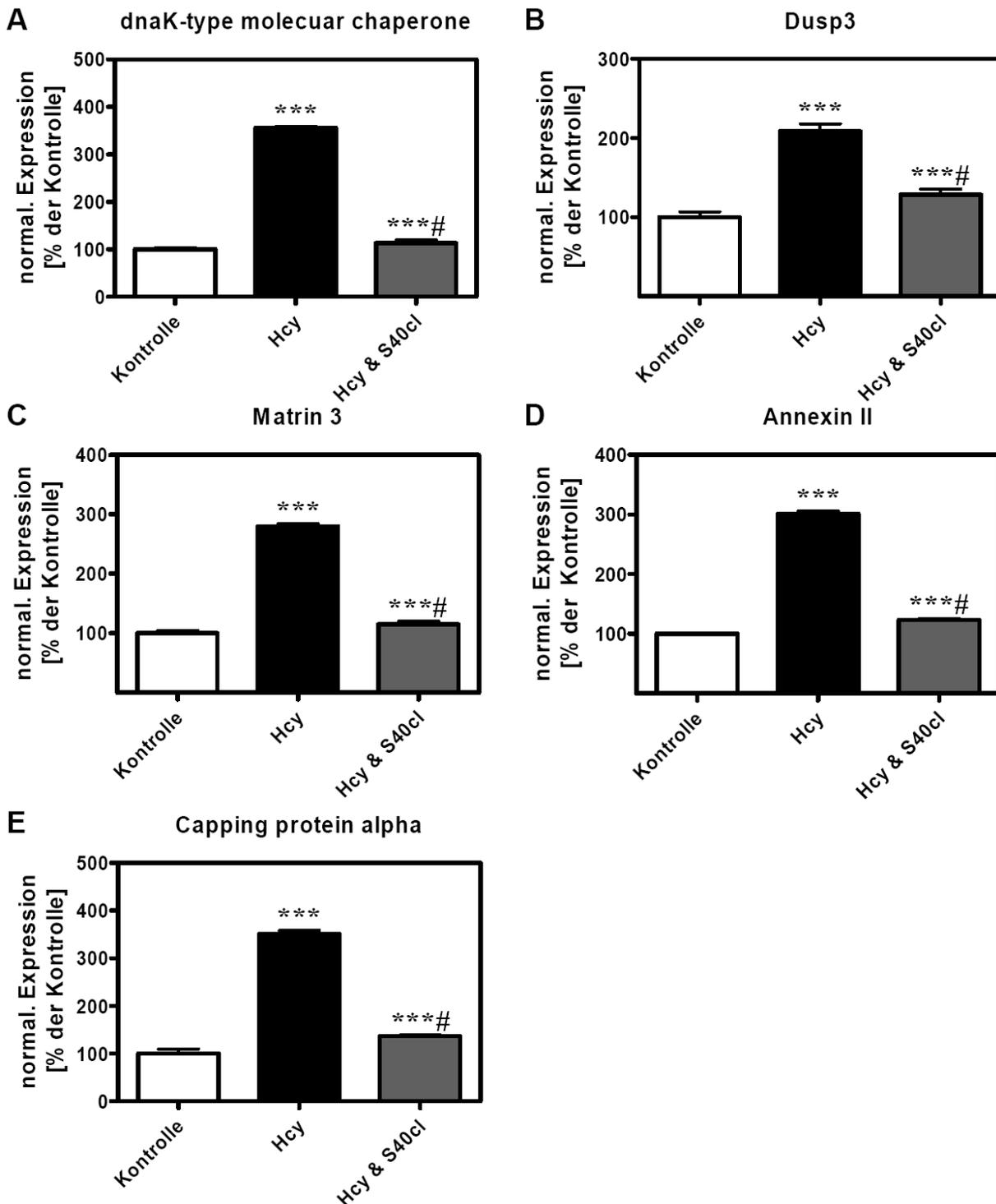


Abb. 4.10 Relative mRNA-Spiegel ausgewählter Gene in EA.hy926 Kontrollzellen und EA.hy926 Zellen nach der Inkubation mit dem endothelialen Stressor Hcy in An- oder Abwesenheit des Extraktes S40cl. Die Transkriptspiegel dieser fünf Gene wurden mit Hilfe der Real-Time PCR bestimmt und auf die Menge des Referenzgens HPRT bezogen. Die relative Expressionshöhe dieser Gene in Kontrollzellen wurde mit 100% gleichgesetzt. *** $p < 0,001$ versus Kontrollzellen, ***# $p < 0,001$ versus Hcy-exponierte Zellen.

4.1.1.2.5 Ox-LDL vermittelte Veränderungen der Proteinspiegel von EA.hy926 Zellen

Nach 24 h Inkubation der Zellen in Gegenwart von 5 µg/ml ox-LDL war die Intensität von 82 Proteinspots in den Extrakten verändert; von diesen wurden 47 anhand ihres Peptid-Massen-Fingerabdrucks identifiziert (Tab. 10.7 - 10.10; Abb. 4.11 - 4.17). Dazu zählen 29 Proteine, bei denen die Anwesenheit von 2,5 µM Genistein die durch ox-LDL induzierte Veränderung ihres Spiegels verhindern konnte (Tab. 10.8; Abb. 4.12, 4.13), jedoch nur zehn, bei denen durch GenDai die durch ox-LDL ausgelösten Effekte auf die Proteinspiegel aufgehoben werden konnten (Tab. 10.9; Abb. 4.14, 4.15). Nach Gabe von ox-LDL zusammen mit S40cl konnten 31 Proteinspots, die durch ox-LDL gegenläufig reguliert worden waren, identifiziert und damit eindeutig einem Protein zugeordnet werden (Tab. 10.10; Abb. 4.16, 4.17).

Unter ox-LDL waren z.B. das *LAMIN C* (Abb. 4.11, Spot 5) und der *SERINE (OR CYSTEINE) PROTEINASE INHIBITOR CLADE H MEMBER 1 PRECURSOR* (Abb. 4.11, Spot 7) in ihrem Spiegel herabgesetzt. Nur das *UBIQUINOL-CYTOCHROME-C-REDUCTASE CORE PROTEIN I* (Abb. 4.11, Spot 10), war unter dem Einfluss von ox-LDL verstärkt exprimiert worden. Ox-LDL reduzierte auch die Spiegel von zwei Proteinen der Genregulation, von denen eines, der *ELONGATION FACTOR 2* (Abb. 4.11, Spot 12, 14 & 15), drei verschiedenen Proteinspots zugewiesen werden konnte. Lediglich ein Protein aus der Gruppe der Genregulation, das *HNRNP2H9A*, war in Gegenwart von ox-LDL im Spiegel erhöht (Abb. 4.11, Spot 16).

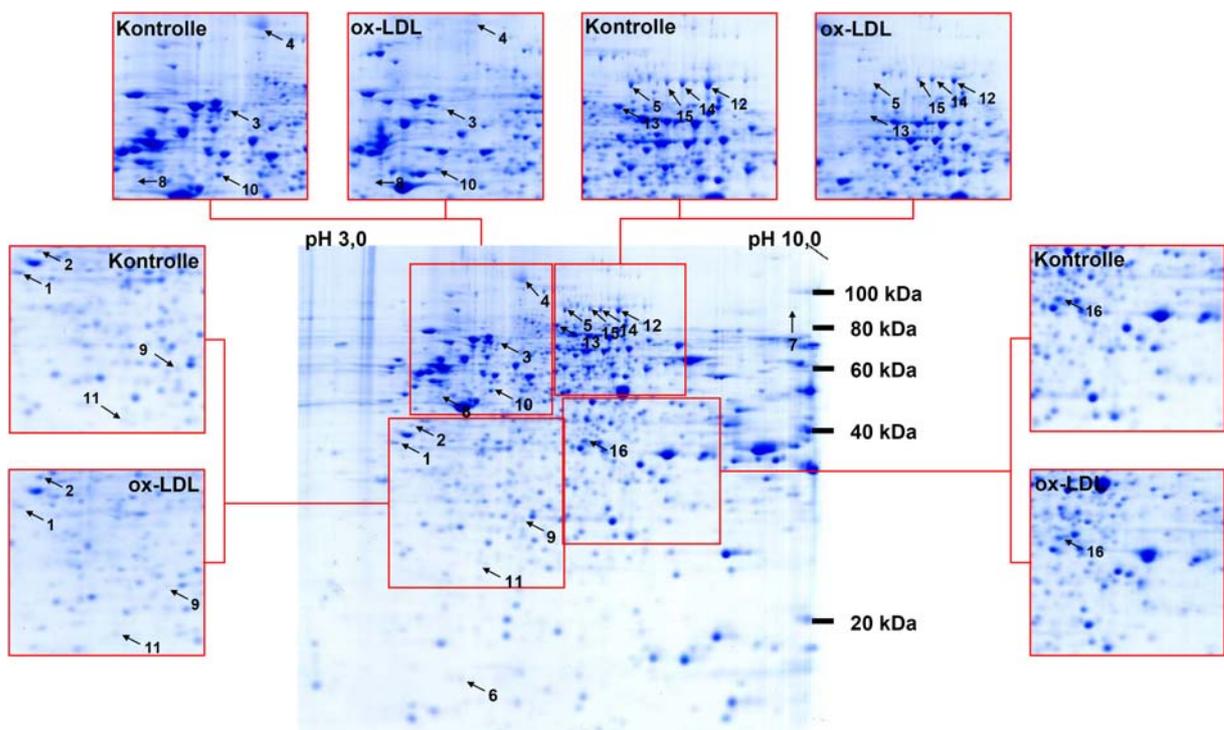


Abb. 4.11 Repräsentative 2D-PAGE von Proteinen aus EA.hy926 Zellen, die für 24 h mit 5 µg/ml ox-LDL inkubiert wurden.

In der Mitte ist ein repräsentatives mit *Coomassie brilliant blue* gefärbtes Gel von unbehandelten EA.hy926 Kontrollzellen dargestellt, das von vergrößerten Ausschnitten der Gele von Kontrollzellen und mit ox-LDL gestressten Zellen eingerahmt ist. Die Spot-Nummern entsprechen denen von Tab. 10.7.

4.1.1.2.6 Einfluss von Genistein auf das Proteom von EA.hy926 Zellen nach Exposition gegenüber ox-LDL

Genistein (2,5 μ M) konnte bei 44 Proteinen, die in EA.hy926 Zellen durch ox-LDL induzierten Effekte verhindern. Von diesen 44 Proteinen konnten 29 anhand ihres Peptid-Massen-Fingerabdrucks identifiziert werden (Tab. 10.8; Abb. 4.12, 4.13).

Genistein konnte die durch ox-LDL ausgelöste Abnahme der Spotintensität von zwei Annexinen und zwei Chaperonen verhindern. Ein weiteres Chaperon zeigte eine erhöhte Expression nach Kultivierung der Zellen mit ox-LDL, was durch Genistein ebenfalls verhindert werden konnte. Die Intensität von vier zytoskelettalen Proteinen wurde in Extrakten von ox-LDL exponierten Zellen verringert, wobei eines dieser Proteine, das *LAMIN A* (Abb. 4.12, Spot 6 & 10), zwei verschiedenen Spots (64 kDa, pI 6,5; 82 kDa, pI 6,7) zugewiesen werden konnte. Im Gegensatz dazu zeigten zwei weitere Proteine des Zytoskeletts, beispielsweise das *LAMIN B1* (Abb. 4.12, Spot 11), einen erhöhten Spiegel in Zellen nach Kultivierung mit ox-LDL. Genistein konnte die Effekte von ox-LDL auf diese zytoskelettalen Proteine weitgehend aufheben. Ox-LDL bewirkte weiterhin eine Abnahme der Spiegel von sieben Proteinen, denen eine Rolle im Intermediärstoffwechsel zugeordnet werden kann, etwa die *METHIONINE ADENOSYLTRANSFERASE REGULATORY BETA SUBUNIT* (38 kDa, pI 7,4) (Abb. 4.12, Spot 16) oder das Enzym *S-ADENOSYL HOMOCYSTEINE HYDROLASE* (Abb. 4.12, Spot 17). In Gegenwart von Genistein konnte die durch ox-LDL bedingte Abnahme dieser Proteinspiegel reduziert werden. Zwei Proteinspots, u.a. die der *METHIONINE ADENOSYLTRANSFERASE REGULATORY BETA SUBUNIT* (Abb. 4.12, Spot 20) konnten nur in Extrakten von mit ox-LDL behandelten Zellen gefunden werden. Ein Proteinspot dieses Proteins wies eine molekulare Masse von 38 kDa und einen pI von 7,4 auf (Tab. 10.8). Der zweite Proteinspot, der der *METHIONINE ADENOSYLTRANSFERASE REGULATORY BETA SUBUNIT* zugeordnet werden konnte, besaß eine molekulare Masse von 45 kDa und einen pI von 7,0 (Tab. 10.8). Weitere Proteine, deren Spotintensität durch ox-LDL vermindert wurde und durch Genistein wieder zunahm, gehören zur Klasse der Kinasen, jenen der Genregulation oder der Detoxifikation, wie beispielsweise das *THIOREDOXIN RELATED PROTEIN* (Abb. 4.12, Spot 23). Nur das *HETEROGENOUS RIBONUCLEOPROTEIN H* (Abb. 4.12, Spot 28) wurde im Spiegel durch ox-LDL erhöht und durch Genistein wieder reduziert vorgefunden.

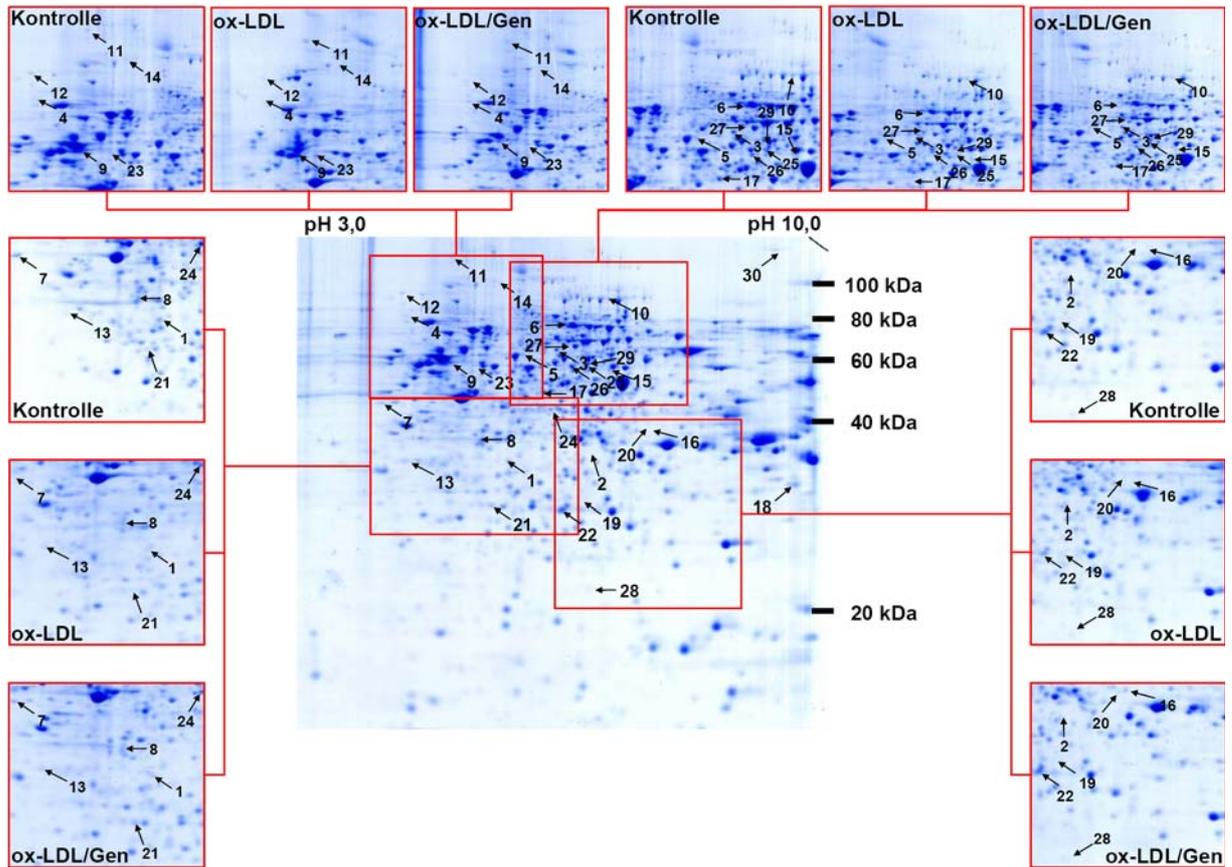


Abb. 4.12 Repräsentative 2D-PAGE von Proteinen aus EA.hy926 Zellen nach Kultivierung mit Medium alleine (Kontrolle) oder mit 5 µg/ml ox-LDL in Ab- oder Anwesenheit von 2,5 µM Genistein für 24 h.

In der Mitte ist ein repräsentatives mit *Coomassie brilliant blue* gefärbtes Gel von EA.hy926 Kontrollzellen abgebildet, das von vergrößerten Ausschnitten der Gele von Kontrollzellen, ox-LDL-exponierten Zellen und Zellen der Co-Inkubation von ox-LDL mit Genistein (ox-LDL/Gen) eingerahmt ist. Die Spot-Nummern sind mit denen in Abb. 4.13 bzw. Tab. 10.8 identisch.

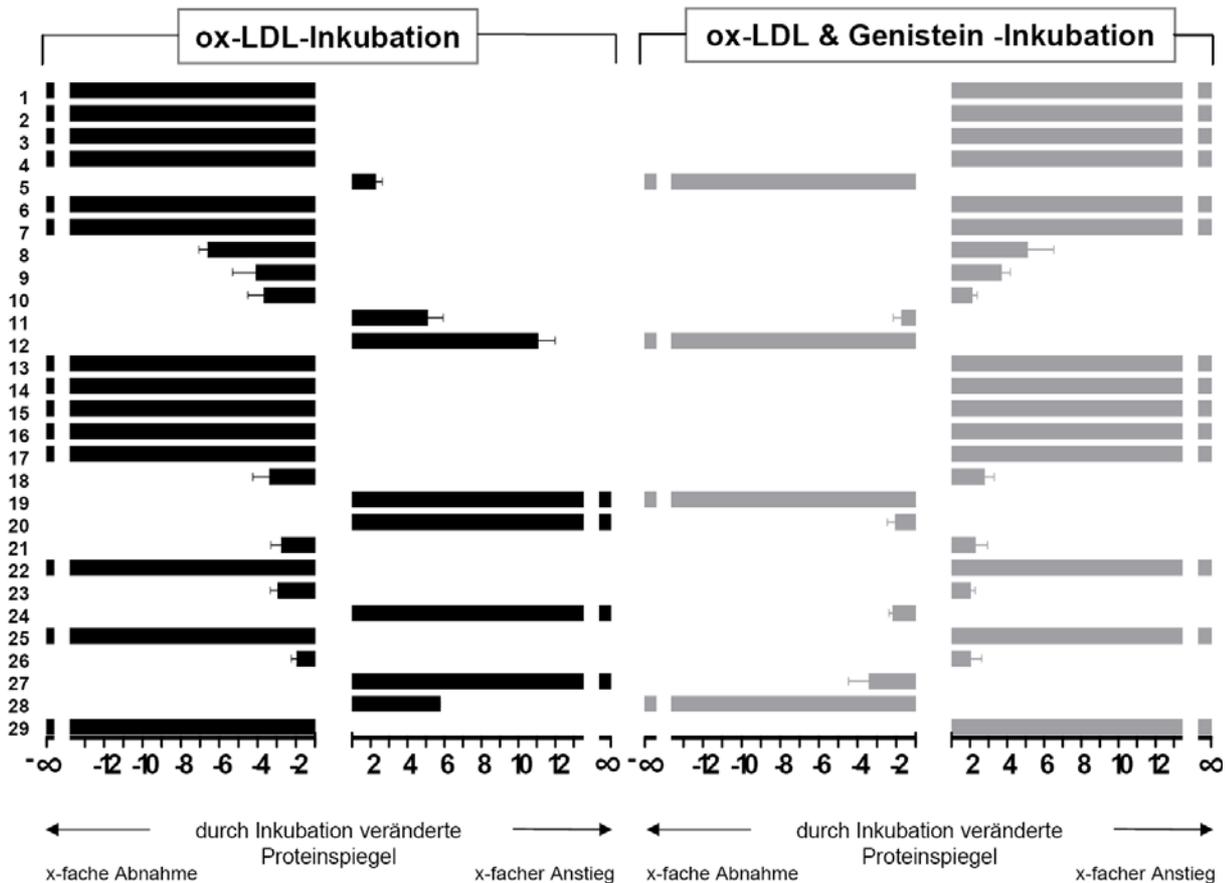


Abb. 4.13 Relative Spotintensitäten der identifizierten Proteine von EA.hy926 Zellen nach Inkubation der Zellen mit ox-LDL in Anwesenheit von Genistein im Vergleich zur Kultivierung in Anwesenheit von ox-LDL alleine.

Dargestellt sind die Veränderungen im *steady state* Spiegel (mindestens zweifache Abweichung) in ox-LDL-exponierten Zellen gegenüber Kontrollzellen (schwarze Balken) bzw. in Zellen, die mit ox-LDL in Anwesenheit von Genistein behandelt wurden im Vergleich zur Inkubation der Zellen mit ox-LDL alleine (graue Balken).

Identifizierte Proteine: 1. ANNEXIN IV; 2. ANNEXIN II; 3. CHAPERONIN CONTAINING TCP1; 4. BIP PROTEIN; 5. T-COMPLEX-TYPE MOLECULAR CHAPERONE; 6. LAMIN A; 7. LAMININ-BINDING PROTEIN; 8. CAPPING PROTEIN ALPHA SUBUNIT ISOFORM; 9. SIMILAR TO TUBULIN ALPHA 2; 11. LAMIN A; 12. LAMIN B1; 13. ENDOLPASMIN PRECURSOR; 14. NUDIX HYDROLASE NUDT 5; 15. GLUCOSIDASE II PRECURSOR; 16. INTERSTITIAL COLLAGENASE PRECURSOR; 17. METHIONINE ADENOSYLTRANSF. REGUL. SUBUNIT; 18. S-ADENOSYL HOMOCYSTEINE HYDROLASE; 19. NAD(P)H DEHYDROGENASE, QUININE; 20. TRIOSEPHOSPHATE ISOMERASE (TIM); 21. METHIONINE ADENOSYLTRANSF. REGUL. SUBUNIT; 22. NADH2 DEHYDROGENASE CHAIN NDUFS3; 23. PEROXIREDOXIN 6; 24 THIOREDOXIN-RELATED PROTEIN; 25. GALACTOKINASE; 26. MITOCHONDRIAL SERYL T-RNA SYNTETHASE; 27 RIBONUCLEOPROTEIN LA; 28. TRANSFORMATION-SENSITIVE PROTEIN; 29. HETEROGENOUS NUCLEAR RIBONUCLEOPROTEIN H; 30. ANTIQUITIN

4.1.1.2.7 Wirkung des Genistein/Daidzein-Gemisches auf die Spiegel von Proteinen nach Exposition der Zellen gegenüber ox-LDL

GenDai konnte bei 18 Proteinen die durch ox-LDL hervorgerufene Wirkung auf die Proteinspiegel aufheben, von denen 10 anhand ihres Peptid-Massen-Fingerabdrucks identifiziert werden konnten (Tab. 10.9; Abb. 4.14, 4.15). GenDai verhinderte die Effekte von ox-LDL auf die Spiegel von Proteinen, die Funktionen im Stoffwechsel, in der Detoxifikation und der Genregulation ausüben (Tab. 10.9; Abb. 4.14, 4.15). Keines der Proteine zeigte nach Inkubation mit Genistein alleine in ox-LDL-exponierten EA.hy926 Zellen eine entsprechend veränderte Spotintensität (Tab. 10.8, 4.9; Abb. 4.12-4.15).

Die Spiegel von *CATHEPSIN D CHAIN B* (Abb. 4.14, Spot 1), der *CMP-N-ACETYLNEURAMINIC ACID SYNTHASE* (Abb. 4.14, Spot 2) oder dem *MITOCHONDRIAL COPROPORPHYRINOGEN*

OXIDASE PRECURSOR (Abb. 4.14, Spot 3) wurden durch ox-LDL verringert und GenDai konnte diese Effekte von ox-LDL hemmen. Nur ein Protein des Stoffwechsels, die *PURINE-NUCLEOSIDE PHOSPHORYLASE* (Abb. 4.14, Spot 4), wurde in ox-LDL-gestressten Zellen verstärkt vorgefunden und durch GenDai wieder reduziert. GenDai konnte weiterhin die unter ox-LDL reduzierte Spotintensität der *GLUTATHIONE TRANSFERASE* (Abb. 4.14, Spot 6) wieder auf ein mit der Kontrolle vergleich-bares Niveau anheben. Ähnliche Effekte zeigten sich bei zwei Proteinen mit Funktionen im Rahmen der Genregulation, wie dem *HETEROGENOUS NUCLEAR RIBONUCLEOPROTEIN D* (Abb. 4.14, Spot 8). Im Gegensatz dazu erhöhte ox-LDL die Spiegel von zwei anderen Proteinen der Genregulation, wie des *ALTERNATIVE SPLICING FACTOR ASF-2* (Abb. 4.14, Spot 7). Auch diese durch ox-LDL herbeigeführte Regulation wurde durch GenDai verhindert.

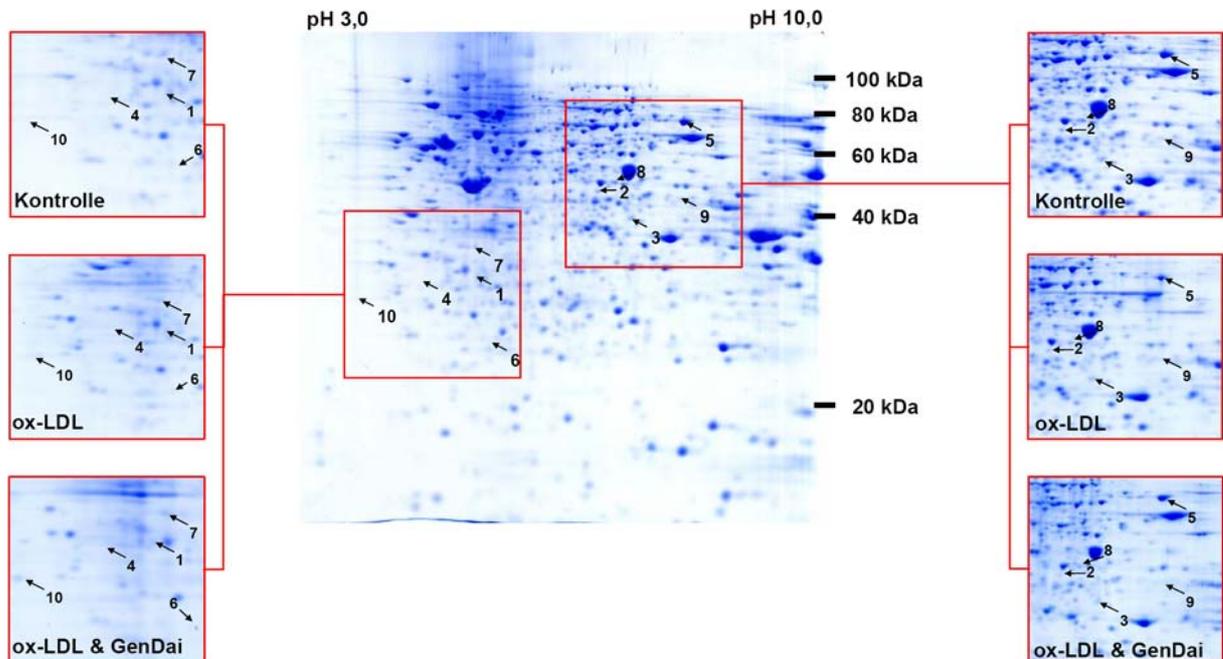


Abb. 4.14 Repräsentative 2D-PAGE von Proteinen aus EA.hy926 Zellen nach Kultivierung mit Medium alleine (Kontrolle) oder mit 5 µg/ml ox-LDL in Ab- oder Anwesenheit von 2,5 µM Genistein und 1 µM Daidzein (GenDai) für 24 h.

In der Mitte ist ein repräsentatives *Coomassie* gefärbtes Gel von EA.hy926 Kontrollzellen abgebildet, das von vergrößerten Ausschnitten der Gele von Kontrollzellen, ox-LDL-exponierten Zellen und Zellen der Co-Inkubation von ox-LDL mit GenDai (ox-LDL/GenDai) umgeben ist. Die Spot-Nummern stimmen mit denen von Abb. 4.15 und Tab. 10.9 überein.

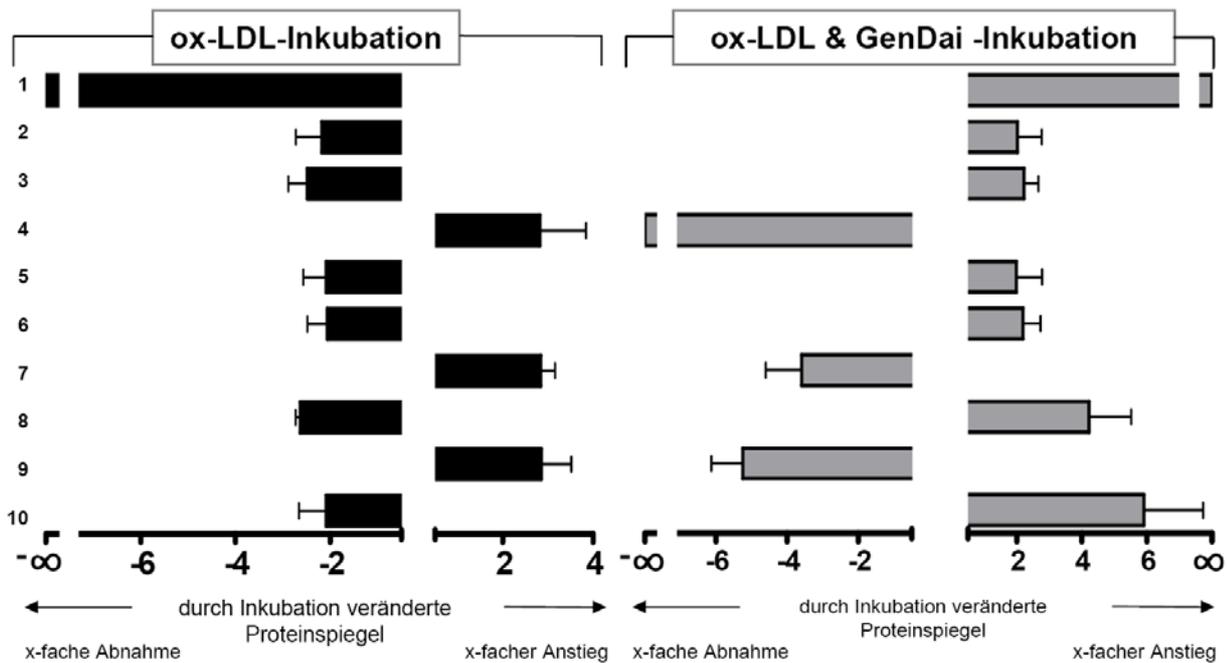


Abb. 4.15 Relative Spotintensitäten der identifizierten Proteine von EA.hy926 Zellen nach Inkubation der Zellen mit ox-LDL in Anwesenheit von GenDai im Vergleich zur Kultivierung in Anwesenheit von ox-LDL alleine.

Dargestellt sind die Veränderungen im *steady state* Spiegel (mindestens zweifache Abweichung) in ox-LDL-exponierten Zellen gegenüber Kontrollzellen (schwarze Balken) bzw. in Zellen, die mit ox-LDL in Anwesenheit von GenDai behandelt wurden im Vergleich zur Inkubation der Zellen mit ox-LDL alleine (graue Balken).

Identifizierte Proteine: 1. CATHEPSIN D CHAIN B; 2. CMP NEURAMINIC ACID SYNTHASE; 3. COPROPORPHYRINOGEN OXIDASE; 4. PURINE-NUCLEOSIDE PHOSPHORYLASE; 5. TRANSKETOLASE; 6. GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE PI; 7. ALTERNATIVE SPLICING FACTOR ASF-2; 8. HNRP D; 9. T-CLUSTER BINDING PROTEIN; 10. TRANSLATION INITIATION FACTOR 6

4.1.1.2.8 Effekte des Extraktes S40cl auf das Proteom von EA.hy926 Zellen nach Exposition gegenüber ox-LDL

Der Extrakt S40cl war in der Lage die von ox-LDL ausgelöste Veränderung der Spiegel von 43 Proteinspots zu verhindern, von welchen 31 mittels MALDI-TOF MS identifiziert werden konnten (Tab. 10.10; Abb. 4.16, 4.17). Jeweils zwei dieser Proteine wurden auch als von Genistein bzw. GenDai in ox-LDL-exponierten EA.hy926 Zellen reguliert vorgefunden (Tab. 10.8-10.10; Abb. 4.12-4.17). Wie Genistein konnte auch S40cl die Reduktion des *ANNEXIN 2*-Spiegels (Abb. 4.16, Spot 1) in ox-LDL-gestressten Zellen aufheben (Tab. 10.8, 10.10; Abb. 4.12, 4.13, 4.16, 4.17). Genistein und der Extrakt übten dagegen auf das *HETEROGENOUS NUCLEAR RIBONUCLEOPROTEIN H* (Abb. 4.16, Spot 21, 24) eine entgegengesetzte Wirkung aus (Tab. 10.8, 10.10; Abb. 4.12, 4.13, 4.16, 4.17). S40cl beeinflusste zwei Formen des *HETEROGENOUS NUCLEAR RIBONUCLEOPROTEIN H* (57 kDa, pI 5,5 bzw. 53 kDa, pI 5,3) (Tab. 10.10), jedoch gegensätzlich zu der von Genistein regulierten Form (21 kDa, pI 6,2) (Tab. 10.8). Bei den beiden Spots der *CMP-N-ACETYLNEURAMINIC ACID SYNTHASE* (Abb. 4.16, Spot 12) und des mitochondrialen *COPROPORPHYRINOGEN OXIDASE PRECURSOR* (Abb. 4.16, Spot 15) konnten GenDai und der Extrakt die durch ox-LDL verursachte Abnahme der Proteinspiegel verhindern (Tab. 10.9, 10.10; Abb. 4.14-4.17). An diesen beiden Proteinen zeigen sich gleich gerichtete Effekte der isolierten Isoflavonoide (GenDai) und des Soja-

extraktes S40cl, die als Hinweise auf die den Isoflavonoiden zugesprochene anti-atherosklerotische Wirkung von Soja dienen könnten.

S40cl konnte bei 27 Proteinen die Spiegel erhöhen, die durch ox-LDL alleine signifikant reduziert worden waren. Dazu zählen zwei Annexine, wie das zuvor genannte *ANNEXIN 2* (Abb. 4.16, Spot 1), das Chaperon *MITOCHONDRIAL DNAK-TYPE MOLECULAR CHAPERONE PRECURSOR* (Abb. 4.16, Spot 3), fünf zytoskelettale Proteine, neun Proteine des Stoffwechsels, wie die bereits erwähnten Proteine *CMP-N-ACETYLNEURAMINIC ACID SYNTHASE* (Abb. 4.16, Spot 12) oder der mitochondriale *COPROPORPHYRINOGEN OXIDASE PRECURSOR* (Abb. 4.16, Spot 15), und neun Proteine der Genregulation, wie z.B. das *PLATELET-ACTIVATING FACTOR ACETYLHYDROLASE IBA SUBUNIT* (Abb. 4.16, Spot 23). Nur bei fünf Proteinen konnte die Anwesenheit von S40cl die durch ox-LDL ausgelöste Erhöhung der Proteinspiegel verhindern. Dazu zählen das zytoskelettale Protein *FASCIN* (Abb. 4.16, Spot 9), das Enzym *26S PROTEASE REGULATORY SUBUNIT 6A* (Abb. 4.16, Spot 16), die *PYRUVATE KINASE M2 ISOZYME* (Abb. 4.16, Spot 20) und zwei Proteine aus der Gruppe der Genregulation, das *HXC-26 PROTEIN* (Abb. 4.16, Spot 25) und der *SPLICING FACTOR PROLINE /GLUTAMINE RICH* (Abb. 4.16, Spot 26).

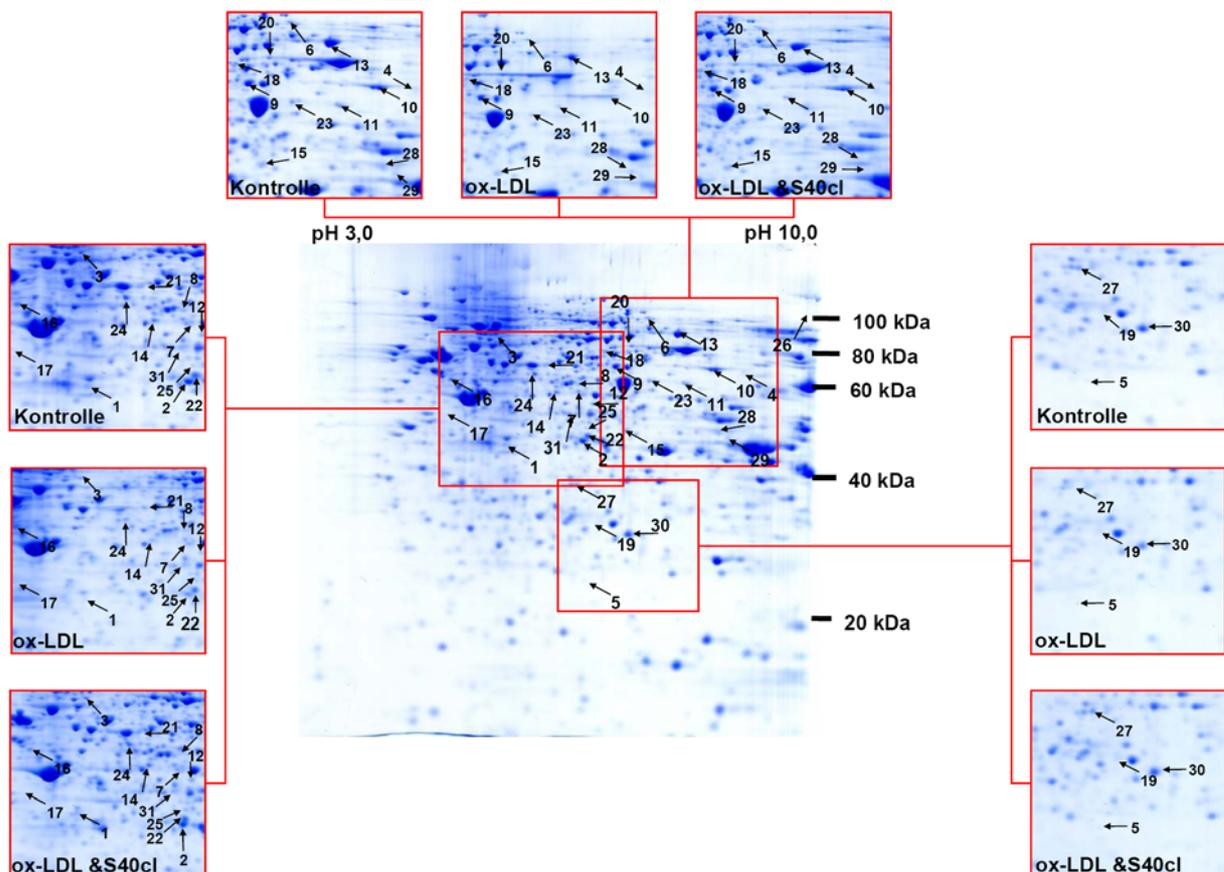


Abb. 4.16 Repräsentative 2D-PAGE von Proteinen aus EA.hy926 Kontrollzellen oder aus EA.hy926 Zellen, die mit 5 µg/ml ox-LDL in Ab- oder Anwesenheit des Extraktes S40cl für 24 h inkubiert wurden.

In der Mitte ist ein typisches mit *Coomassie brilliant blue* gefärbtes Gel von EA.hy926 Kontrollzellen dargestellt, das von vergrößerten Ausschnitten der Gele von Kontrollzellen, mit ox-LDL gestressten Zellen und Zellen der Co-Inkubation von ox-LDL mit S40cl (ox-LDL/S40cl) eingerahmt ist. Die Spot-Nummern entsprechen denen von Abb. 4.17 und Tab. 10.10.

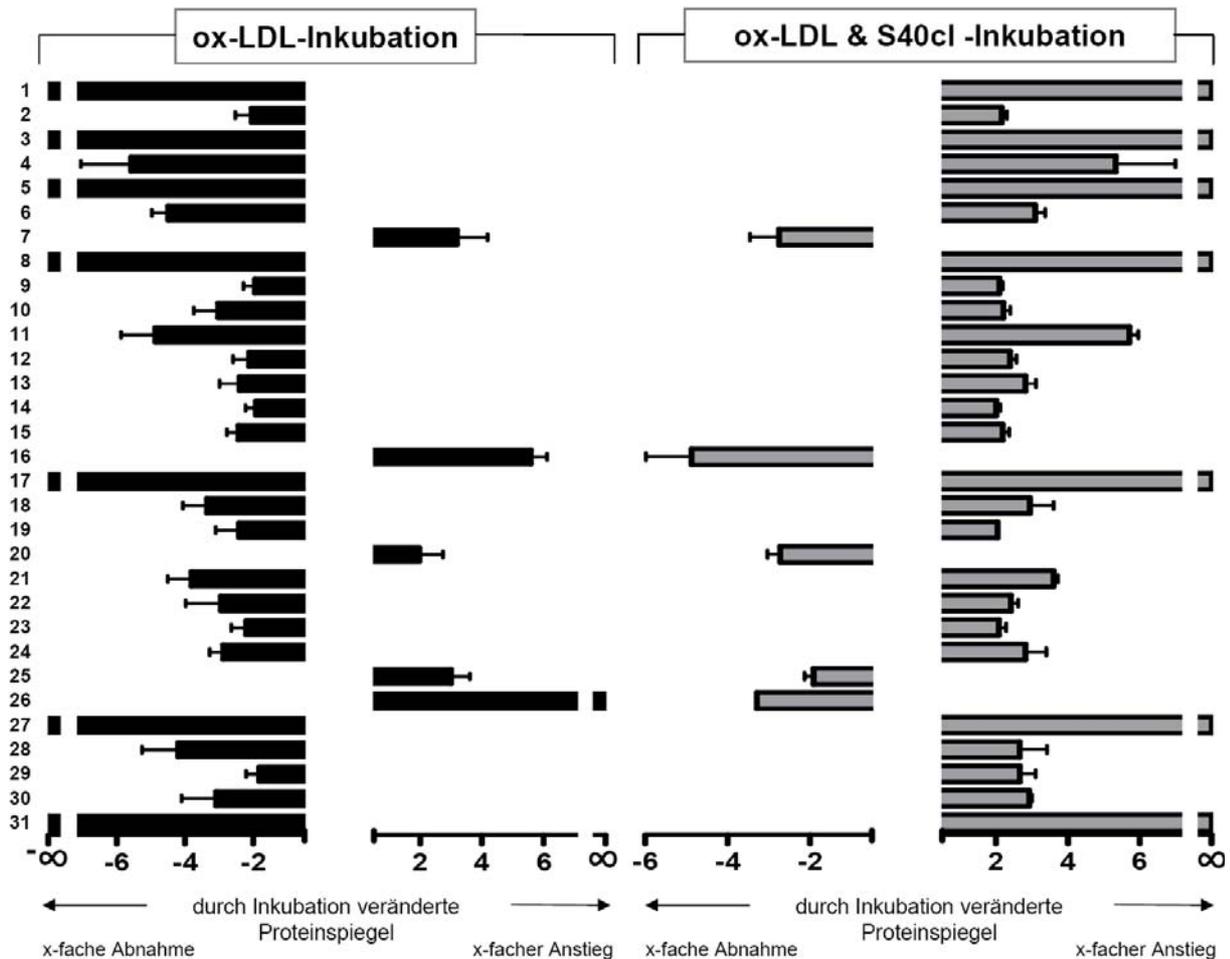


Abb. 4.17 Relative Spotintensitäten der identifizierten Proteine von EA.hy926 Zellen nach der Inkubation der Zellen mit ox-LDL in Anwesenheit von S40cl im Vergleich zur Kultivierung mit ox-LDL alleine.

Dargestellt sind die Veränderungen im *steady state* Spiegel (mindestens zweifache Abweichung) in ox-LDL-exponierten Zellen gegenüber Kontrollzellen (schwarze Balken) bzw. in Zellen, die mit ox-LDL in Anwesenheit von S40cl behandelt wurden im Vergleich zur Inkubation der Zellen mit ox-LDL alleine (graue Balken).

Identifizierte Proteine: 1. ANNEXIN II; 2. ANNEXIN I; 3. DNAK-TYPE MOL. CHAPERONE; 4. OXYGEN-REGULATED PROTEIN 150K; 5. VPS29-LIKE PHOSPHOEST.-RELATED PROTEIN; 6. THYMOPOIETIN ALPHA; 7. ALPHA-CENTRACTIN; 8. LMNA PROTEIN; 9. FASCIN; 10. ATP5A1 PROTEIN; 11. FERRODOXIN REDUCTASE, ISOFORM 1; 12. CMP NEURAMINIC ACID SYNTHASE; 13. TRANSKETOLASE (EC 2.2.1.1); 14. ORNITHINE-OXO-ACID TRANSAMINASE; 15. COPROPORPHYRINOGEN OXIDASE; 16. 26S PROTEASE REG. SUBUNIT 6A; 17. PROTEIN-DISULFIDE-ISOMERASE PRECURSOR; 18. 3-METHYLCROTONYL-CoA CARBOXYLASE; 19. TRIOSEPHOSPHATE ISOMERASE 1; 20. PYRUVATE KINASE, M2 ISOZYME; 21. HNRP H; 22. HNRNP 2H9B; 23. PAFAH; 24. HNRP H; 25. HXC-26 PROTEIN; 26. SPLICING FACTOR PROLINE/GLUTAMINE RICH; 27. PURINE-NUCLEOSIDE PHOSPHORYLASE; 28. U5 SNRNP-SPECIFIC PROTEIN; 29. U5 SNRNP-SPEC. 40 KDA PROTEIN; 30. RAN-GPPNHP-RANBD1; 31. ALPHA-COMPLEX PROTEIN 1

4.1.1.2.9 Stressor-unabhängige Wirkungen von Genistein auf das Proteom von EA.hy926 Zellen

Die EA.hy926 Zellen wurden auch mit 2,5 μ M Genistein in Abwesenheit der Stressoren Hcy oder ox-LDL kultiviert, um zu prüfen inwieweit Genistein auch in ungestressten Zellen Wirkungen entfaltet. In Anwesenheit von Genistein war die Intensität von 64 Proteinspots gegenüber Kontrollzellen verändert, von denen 36 anhand ihres Peptid-Massen-Fingerabdrucks erfolgreich identifiziert werden konnten (Tab. 10.11; Abb. 4.18).

Zwölf dieser Proteine waren durch Genistein auch in Anwesenheit von Hcy als im Spiegel verändert vorgefunden worden (Tab. 10.4, 10.11; Abb. 4.4, 4.5, 4.18). Fünf dieser Proteine, z.B. die 6-PHOSPHOGLUCONOLACTONASE (Abb. 4.18, Spot 18), zeigten dabei gleichartige

Veränderungen unabhängig von der An- oder Abwesenheit von Hcy. Die Spiegel von sieben der zwölf Proteine, wie z.B. des *ANNEXIN II* (Abb. 4.18, Spot 1), wurden in Abhängigkeit von der An- bzw. Abwesenheit von Hcy durch Genistein in unterschiedliche Richtungen verändert. Fünf Proteine waren durch Genistein in Hcy-exponierten Zellen beeinflusst worden, die durch Genistein in Kontrollzellen nicht reguliert wurden. Die Wirkungen von Genistein auf manche Proteine scheinen folglich stark von der Anwesenheit des Stressors Hcy abzuhängen./Die Wirkungen von Genistein auf Zielproteine sind somit in Anwesenheit des Stressors Hcy stärker ausgeprägt als in nicht mit Hcy behandelten Zellen.

Ein ähnliches Bild zeigte sich im Falle des ox-LDL. Von den 29 identifizierten Proteinen, bei denen Genistein die durch ox-LDL-induzierten Effekte aufzuheben vermochte, zeigten zwar 16 auch durch die alleinige Gabe von Genistein veränderte *steady state* Spiegel; jedoch war nur bei drei Proteinen, darunter *ANNEXIN II*, der Einfluss von Genistein unabhängig von der Anwesenheit von ox-LDL (Tab. 10.8, 10.11; Abb. 4.12, 4.13, 4.18).

Es konnten 23 Proteine unter der Wirkung von Genistein identifiziert werden, von denen einige auch im Kontext atherosklerotischer Prozesse diskutiert werden, wie etwa die *S-ADENOSYL HOMOCYSTEINE HYDROLASE* (Abb. 4.18, Spot 17) oder das *LAMININ-BINDING PROTEIN* (Abb. 4.18, Spot 8), die unter Genistein verringerte Spotintensitäten aufwiesen (Tab. 10.11; Abb. 4.18). Diese Wirkung von Genistein war damit unabhängig von seinem Einfluss auf Stressor-induzierte Veränderungen, so dass Genistein nicht nur Stressor-antagonisierende Wirkungen besitzt.

Von den 23 Proteinen, die Genistein in Abwesenheit aber nicht in Anwesenheit von Hcy in ihrer Expression veränderte, wurden 14 auch von Hcy alleine beeinflusst (Tab. 10.3, 10.11; Abb. 4.3, 4.18). Mit Ausnahme des *ENDOPLASMIN PRECURSOR (15)* wurden die Spiegel der Proteine des Zytoskeletts von Genistein in gleicher Weise wie durch Hcy verändert. Die Spotintensitäten der Proteine *ANNEXIN II* und *S-ADENOSYL HOMOCYSTEINE HYDROLASE* (Abb. 4.18, Spot 17) wurden von Genistein und Hcy in gegenläufiger Weise reguliert.

Von den 16 Proteinen, deren Spotintensität Genistein nur in Abwesenheit von ox-LDL verändern konnte, waren bei acht Proteinen die Spiegel auch durch ox-LDL als reguliert vorgefunden worden (Tab. 10.7, 10.11; Abb. 4.11, 4.18). Dabei waren lediglich die Spotintensitäten des zytoskelettalen Proteins *LAMIN C* (Abb. 4.17, Spot 12), des Proteins *DJ776F14.1* (Abb. 4.18, Spot 21), das Stoffwechselfunktionen besitzt sowie des gen-regulierenden Proteins *HNRNP2H9A* (Abb. 4.18, Spot 34) von Genistein und ox-LDL in entgegengesetzte Richtungen verändert worden. Die Spiegel der anderen fünf Proteine, darunter das zytoskelettale *T-PLASTIN* (Abb. 4.18, Spot 7), wurden von Genistein und ox-LDL in ähnlicher Weise beeinflusst (Tab. 10.7, 10.11; Abb. 4.11, 4.17).

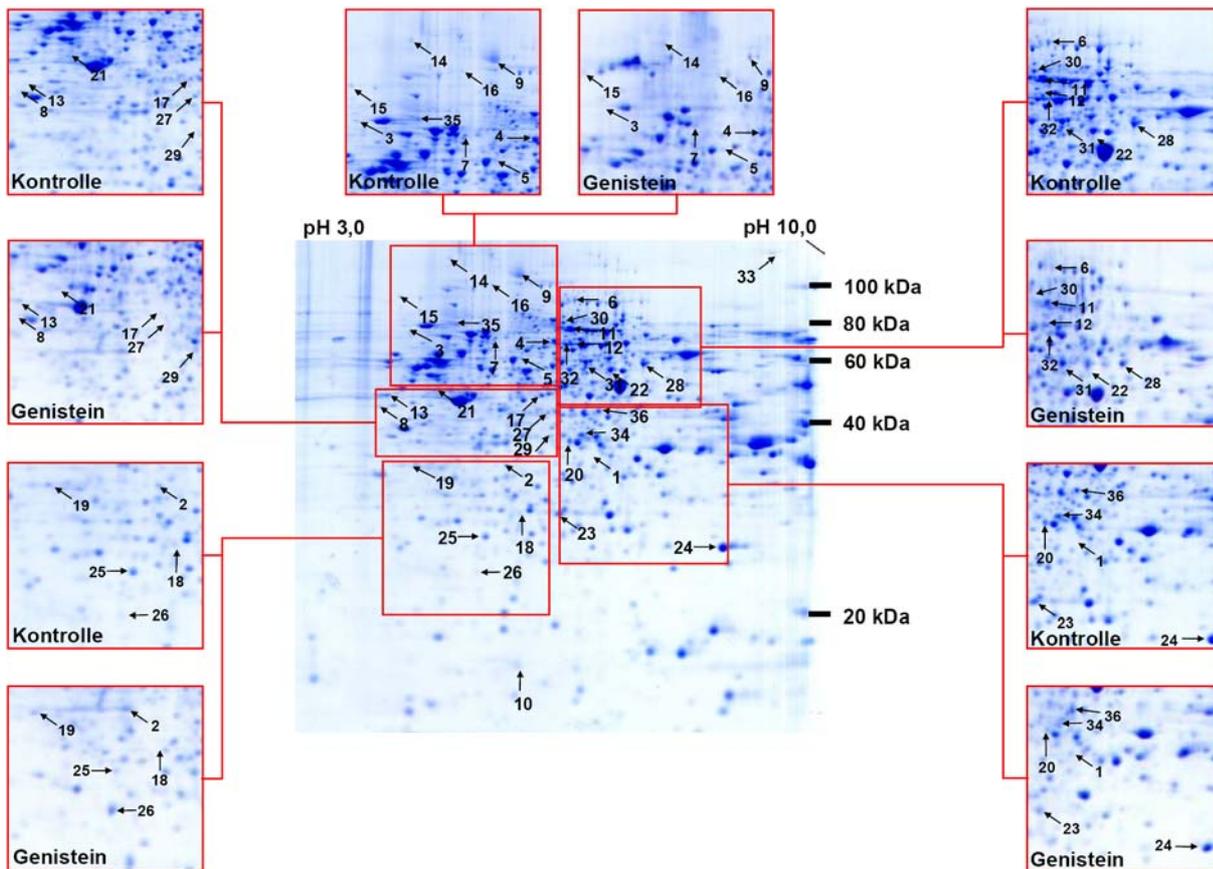


Abb. 4.18 Repräsentative 2D-PAGE von Proteinen aus Kontrollzellen oder EA.hy926 Zellen nach der Gabe von 2,5 μ M Genistein für 24 h.

In der Mitte ist ein repräsentatives mit *Coomassie brilliant blue* gefärbtes Gel von EA.hy926 Kontrollzellen abgebildet, das von vergrößerten Ausschnitten der Gele von Kontrollzellen und Genistein-exponierten Zellen umgeben ist. Die Spot-Nummern stimmen mit denen von Tab. 10.11 überein.

4.1.1.2.10 Effekte des Genistein/Daidzein-Gemisches auf das Proteom von EA.hy926 Zellen

EA.hy926 Zellen wurden auch mit GenDai in Abwesenheit der endothelialen Stressoren für 24 h inkubiert. Dies führte zur Veränderung der Intensität von 30 Proteinspots, von denen 14 mittels MALDI-TOF MS identifiziert werden konnten.

Fünf dieser Proteine wurden vom Isoflavonoidgemisch auch in Anwesenheit von Hcy verändert, wobei nur das *HETEROGENOUS NUCLEAR RIBONUCLEOPROTEIN H* (Abb. 4.19, Spot 11) in Ab- und Anwesenheit von Hcy durch GenDai in seiner Spotintensität verringert wurde (Tab. 10.5, 10.12; Abb. 4.6, 4.7, 4.19). Bei den vier anderen Proteinen, darunter das *U5 SNRNP-SPECIFIC 40 KDA PROTEIN* (Abb. 4.19, Spot 12), erfolgte die Regulierung durch GenDai in Abhängigkeit von der Anwesenheit oder Abwesenheit des Stressors Hcy in unterschiedlicher Weise.

Nur das *CATHEPSIN D* (Abb. 4.19, Spot 4) wurde durch GenDai in An- bzw. Abwesenheit von ox-LDL im Spiegel erhöht bzw. verringert (Tab. 10.9, 10.12; Abb. 4.14, 4.15, 4.19).

GenDai führte im Vergleich zu Genistein zu deutlich anderen Wirkungen auf das Proteom der Zellen. Genistein alleine veränderte die Spiegel von 36, GenDai dagegen nur von 14

Proteinen. Nur die *6-PHOSPHOGLUCONOLACTONASE* (Abb. 4.19, Spot 6) wurde sowohl von Genistein als auch von GenDai im Spiegel reguliert, jedoch verursachten Genistein und das Gemisch eine gegengerichtete Veränderung (Tab. 10.11, 10.12; Abb. 4.18, 4.19). Von den Proteinen, deren Intensität nur durch GenDai verändert wurde, können das *MOESIN* (Abb. 4.19, Spot 1) und die *ATP SULFURYLASE/APS KINASE 2* (Abb. 4.19, Spot 9) mit der Prävention der Atherosklerose funktionell in einen Zusammenhang gebracht werden (5.1.2).

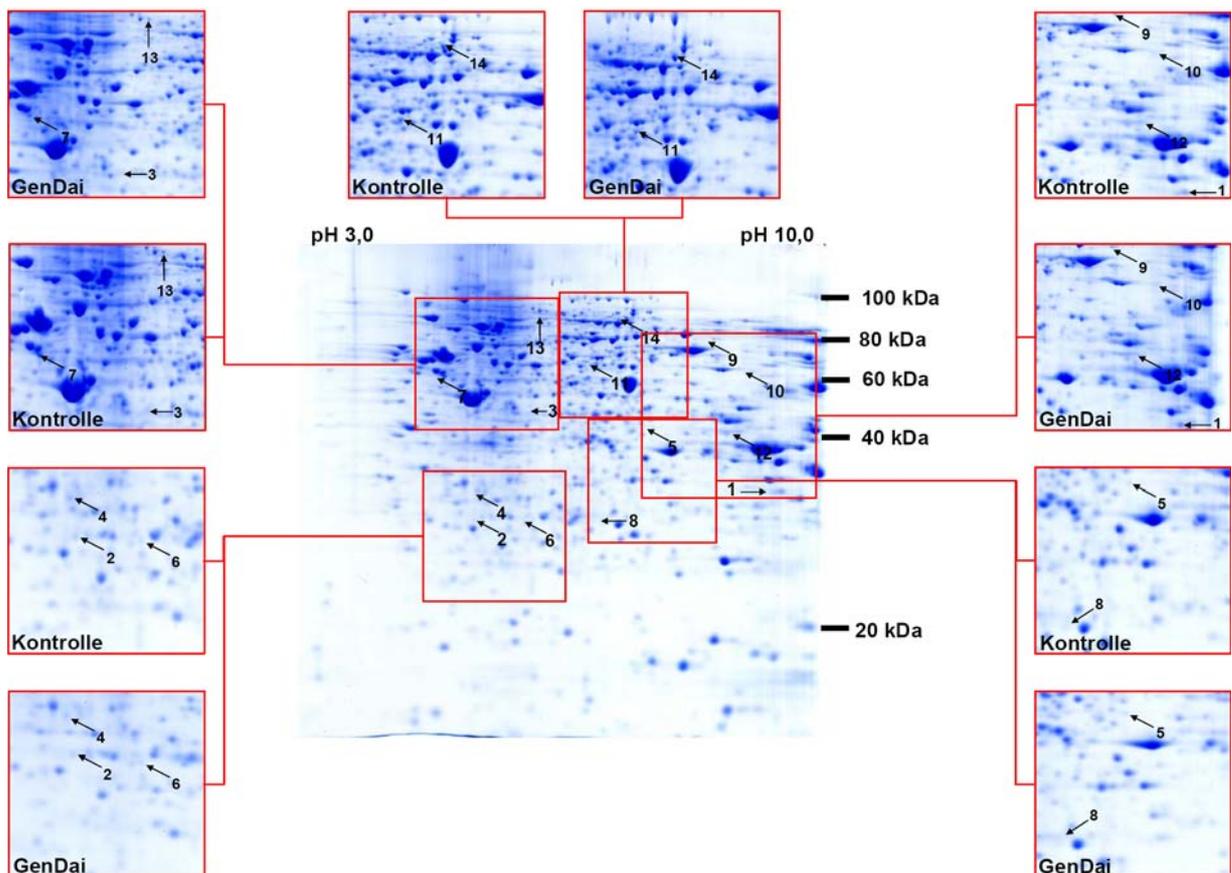


Abb. 4.19 Repräsentative 2D-PAGE von Proteinen aus EA.hy926 Zellen nach Kultivierung der Zellen mit 2,5 μM Genistein und 1 μM Daidzein (GenDai) für 24 h.

In der Mitte ist ein klassisches Coomassie gefärbtes Gel von EA.hy926 Kontrollzellen abgebildet, das von vergrößerten Ausschnitten der Gele von Kontrollzellen und GenDai-exponierten Zellen eingerahmt ist. Die Spot-Nummern entsprechen denen von Tab. 10.12.

4.1.1.2.11 Einfluss des Extraktes S40cl auf das Proteom von EA.hy926 Zellen

Der Extrakt S40cl führte in Abwesenheit endothelialer Stressoren zur Veränderung von 54 Proteinspots, von denen 34 anhand ihres Peptid-Massen-Fingerabdrucks identifiziert werden konnten (Tab. 10.13; Abb. 4.20).

Fünf der identifizierten Proteine wurden auch bei Behandlung Hcy-exponierter Zellen von S40cl beeinflusst. Von diesen war nur das Protein *PROBABLE THIOREDOXIN PEROXIDASE PAGA* (Abb. 4.20, Spot 22) im Spiegel sowohl in An- als auch Abwesenheit von Hcy durch den Extrakt erhöht. Die Wirkungen des Extraktes auf die Menge von vier weiteren Proteinen, wie dem *IKK INTERACTING PROTEIN* (Abb. 4.20, Spot 24), erfolgte in Abhängigkeit von der An-

oder Abwesenheit von Hcy in unterschiedliche Richtungen (Tab. 10.6, 10.13; Abb. 4.8, 4.9, 4.20).

Von den identifizierten Proteinen wiesen 15 auch in ox-LDL-exponierten Zellen eine durch S40cl veränderte Spotintensität auf und bei drei dieser Gruppe, dem *PROTEIN DISULFIDE-ISOMERASE PRECURSOR* (Abb. 4.20, Spot 16), der *3-METHYLCROTONYL-COA CARBOXYLASE SUBUNIT MCCB* (Abb. 4.20, Spot 17) und dem *HXC-26 PROTEIN* (Abb. 4.20, Spot 30) war die durch den Extrakt verursachte Veränderung unabhängig vom Stressor ox-LDL. Der Einfluss von S40cl auf die Spiegel der anderen zwölf Proteine, u.a. dem *OXYGEN-REGULATED PROTEIN 150K PRECURSOR* (Abb. 4.20, Spot 9), erfolgte in Abhängigkeit von der An- oder Abwesenheit von ox-LDL in unterschiedlicher Weise (Tab. 10.10, 10.13; Abb. 4.16, 4.17, 4.20).

Nur drei der identifizierten Proteine wurden auch durch GenDai als im Spiegel verändert vorgefunden. So zeigte sich die *TRIOSEPHOSPHATE ISOMERASE 1* (Abb. 4.20, Spot 18) in GenDai-exponierten Zellen als erhöht, während der Extrakt eine Abnahme der Spotintensität bedingte. Im Gegensatz dazu konnte für das *HETEROGENOUS NUCLEAR RIBONUCLEO-PROTEIN H* (Abb. 4.20, Spot 25) und das *U5 SNRNP-SPECIFIC 40 KDA PROTEIN* (Abb. 4.20, Spot 33) durch GenDai und durch den Extrakt ein Abfall des zellulären Spiegels beobachtet werden (Tab. 10.12, 10.13; Abb. 4.19, 4.20). Von den Proteinen, die in Abwesenheit der Stressoren nur durch den Extrakt beeinflusst wurden, werden das zytoskelettale *LAMIN A* (Abb. 4.20, Spot 7) und *LAMIN C* (Abb. 4.20, Spot 12) im Kontext der Atherosklerosegenese diskutiert. Die Wirkungen des Extraktes S40cl auf das Proteom von EA.hy926 Zellen scheinen somit nur zu einem geringen Teil über die in ihm enthaltenen Isoflavonoide vermittelt zu werden.

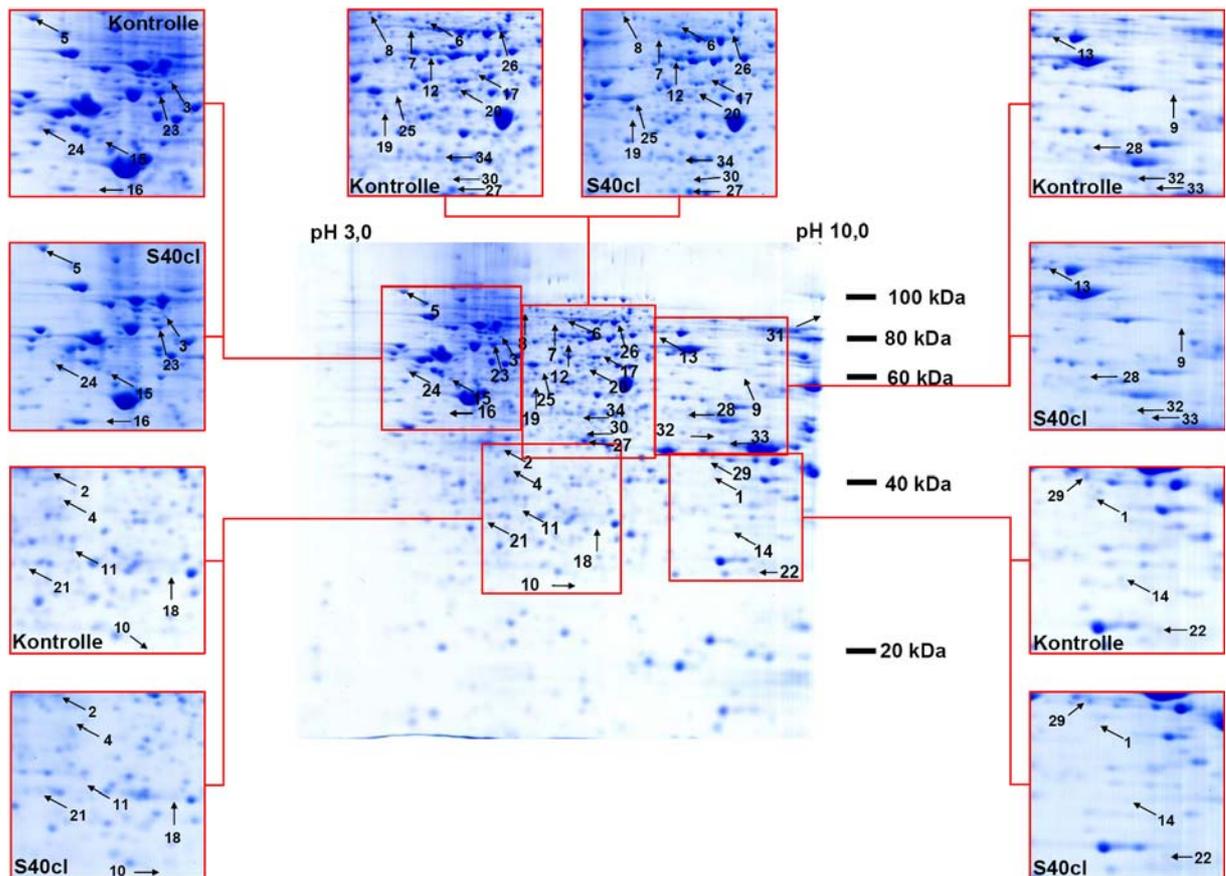


Abb. 4.20 Repräsentative 2D-PAGE von Proteinen aus EA.hy926 Zellen nach Inkubation der Zellen mit S40cl für 24 h.

In der Mitte ist ein repräsentatives mit *Coomassie brilliant blue* gefärbtes Gel von EA.hy926 Kontrollzellen abgebildet, das von vergrößerten Ausschnitten der Gelle von Kontrollzellen und S40cl-exponierten Zellen umgeben ist. Die Spot-Nummern stimmen mit denen von Tab. 10.13 überein.

Die Exposition der EA.hy926 Zellen gegenüber den endothelialen Stressoren Hcy und ox-LDL veränderte vor allem die zellulären Spiegel von zahlreichen Proteinen des Zytoskeletts und diese Veränderungen konnten durch Genistein, GenDai und S40cl teilweise verhindert werden. Da viele Proteine des Zytoskeletts den Caspasen als Substrate dienen (Badock V et al., 2001), lag die Vermutung nahe, dass die endothelialen Stressoren Hcy und ox-LDL die Apoptose von EA.hy926 Zellen zu induzieren vermögen und die Isoflavonoide sowie der Extrakt S40cl der Stressor-bedingten Apoptose der Endothelzellen entgegen wirken.

4.1.2 Analyse der Apoptose von EA.hy926 Zellen

Die Apoptose ist ein wichtiger Schritt in der Genese der Atherosklerose. Die Folgen einer erhöhten Apoptoserate von Endothelzellen entsprechen denen des Verlustes der Endothelschicht und führen zu einer Zunahme der Permeabilität, einer gesteigerten Proliferation von glatten Muskelzellen und einer verstärkten Thromboseneigung (Choy JC et al., 2001).

4.1.2.1 Homocystein-induzierte Apoptose von EA.hy926 Zellen

25 μM Hcy bedingte eine Abnahme der Spotintensität zahlreicher Proteine des Zytoskeletts, die im Verlauf der Apoptose von Caspasen gespalten werden (Tab. 10.3, 10.4; Abb. 4.3-4.5). darüber hinaus konnte eine deutliche Veränderung in der Intensität von weiteren an der Apoptose beteiligten Proteinen, wie der Spiegel des *THIOREDOXIN-RELATED PROTEINS* oder verschiedener Chaperone beobachtet werden (Tab. 10.3, 10.4; Abb. 4.3-4.5). Das *THIOREDOXIN-RELATED PROTEIN* hemmt über die Bindung an die *Apoptosis signal-regulating kinase 1* die stressinduzierte Signalkaskade der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK), die die Apoptose auslöst (Shao LE et al., 2002). Daher lag die Vermutung nahe, dass Hcy über die Auslösung der Apoptose in den Endothelzellen pro-atherosklerotische Effekte ausübt.

Über die Bestimmung der Aktivität der Caspasen-3, -6 und -8, der Desintegration der Plasmamembran und der DNA-Fragmentierung sollte geprüft werden, ob Hcy die Apoptose von EA.hy926 Zellen auslösen kann. Erstaunlicherweise vermochte Hcy jedoch die Aktivität der Caspasen-3, -6 und -8 im Vergleich zu Kontrollzellen nicht signifikant zu verändern (Abb. 4.21A). Dennoch erhöhte Hcy die Permeabilität der Plasmamembran deutlich (Abb. 4.21B) und führte zur DNA-Fragmentierung und Chromatin-Kondensation (Abb. 4,21C).

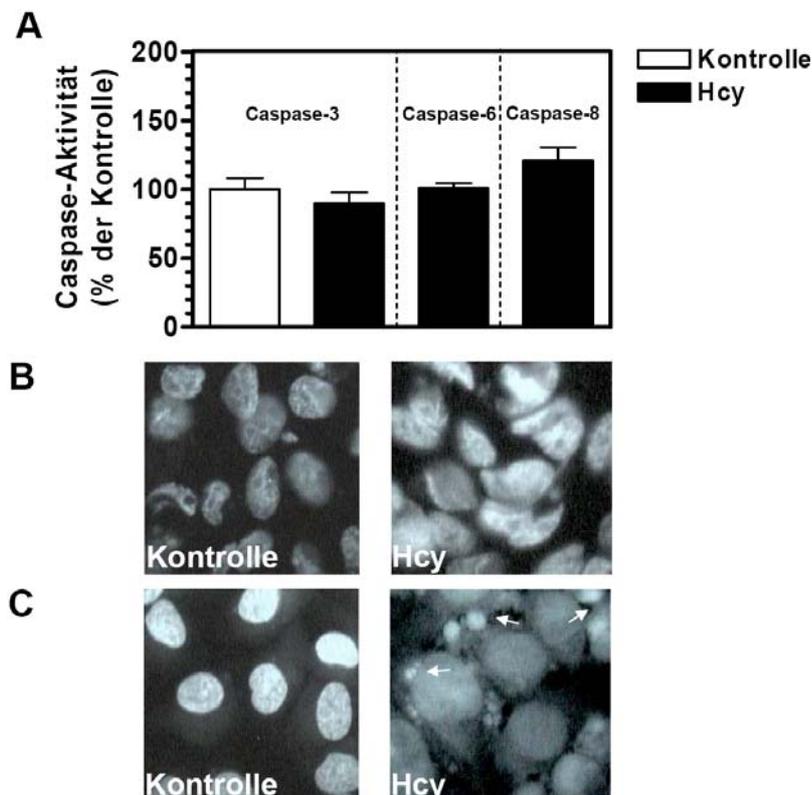


Abb. 4.21 Apoptose in Hcy-exponierten EA.hy926 Zellen.

(A) Caspase-3-, Caspase-6- und Caspase-8-Aktivität nach 24 h Inkubation der Zellen in Abwesenheit (Kontrolle), oder Anwesenheit von 25 μM Hcy. (B) Aufnahme des Farbstoffes Hoechst 33342 in Kontrollzellen und Zellen, die mit 25 μM Hcy gestresst wurden. (C) Färbung der fixierten Zellen mit dem Farbstoff Hoechst 33258 zum Nachweis der DNA-Fragmentierung und Chromatin-Kondensation. EA.hy926 Zellen wurden für die Dauer von 24 h nur mit Medium (Kontrolle) oder mit 25 μM Hcy inkubiert. Die Pfeile markieren eine verstärkte DNA-Fragmentierung und Chromatinkondensation.

4.1.2.2 Wirkung von Genistein, GenDai und S40cl auf die durch Homocystein ausgelöste Apoptose von EA.hy926 Zellen

Abbildung 4.22 zeigt, dass Genistein die durch Hcy bedingte Membrandesintegration (4.22A) und auch die durch Hcy verursachte DNA-Fragmentierung und Chromatin-Kondensation (4.22B) unterbinden kann. Ebenso wie Genistein konnte auch GenDai die Apoptose von Hcy-gestressten Zellen vollständig verhindern. Dies wird in Abbildung 4.22 verdeutlicht, da GenDai die Membrandesintegration (Abb. 4.22A) und die Kernfragmentierung (Abb. 4.22B) blockiert. Analog zu den Effekten von Genistein und GenDai auf die Hcy-induzierte Apoptose wurde auch in Zellen nach Hcy-Exposition die Wirkung des Extraktes S40cl auf die Veränderung der Membranpermeabilität (Abb. 4.22A), die DNA-Fragmentierung und die Chromatin-Kondensation (Abb. 4.22B) untersucht. Wie Abb. 4.22 veranschaulicht, ist auch der Extrakt S40cl in der Lage die Apoptose in EA.hy926 Zellen zu blockieren.

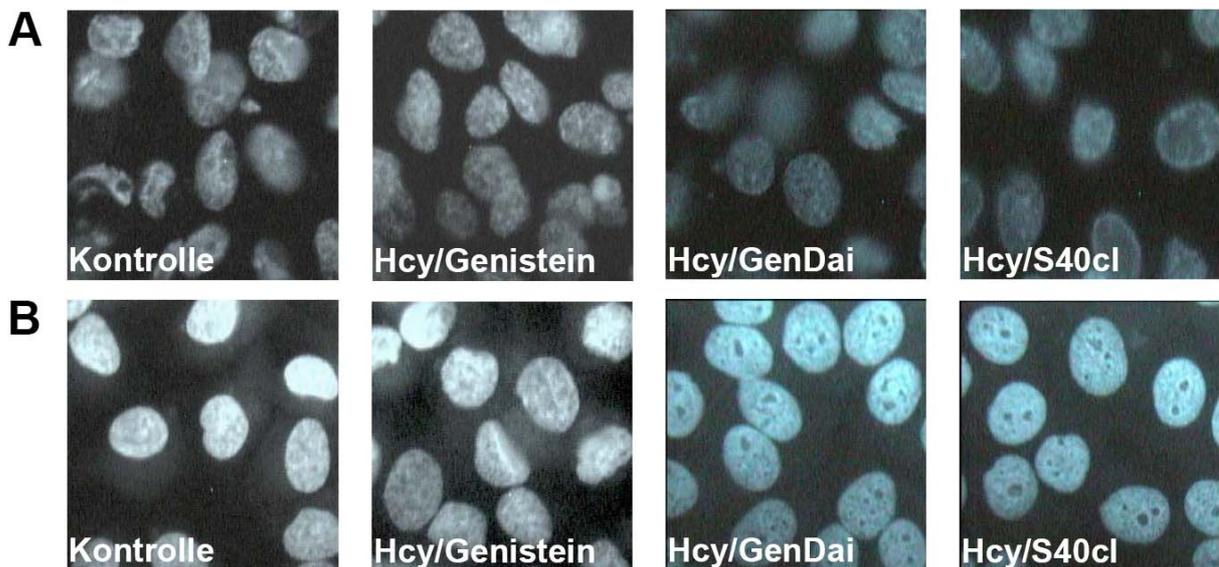


Abb. 4.22 Einfluss von Genistein, GenDain und S40cl auf die Apoptose in Hcy-exponierten EA.hy926 Zellen.

(A) Aufnahme des Farbstoffes Hoechst 33342 in Kontrollzellen und Zellen, die mit 25 μM Hcy in Ab- und Anwesenheit von 2,5 μM Genistein, GenDai bzw. S40cl inkubiert wurden. (B) Färbung der fixierten Zellen mit dem Farbstoff Hoechst 33258 zum Nachweis der DNA-Fragmentierung und Chromatinkondensation. EA.hy926 Zellen wurden für 24 h mit reinem Medium (Kontrolle) oder mit 25 μM Hcy alleine oder zusammen mit 2,5 μM Genistein, GenDai oder S40cl inkubiert.

4.1.2.3 Ox-LDL-induzierte Apoptose von EA.hy926 Zellen

Auch nach der Inkubation der Zellen mit ox-LDL konnten verminderte Spiegel zytoskelettaler Proteine beobachtet werden (Tab. 10.7; Abb. 4.11), was auf eine apoptotische Wirkung des endothelialen Stressors schließen ließ. Auch ox-LDL konnte jedoch die Aktivitäten der Caspasen-3, -6 und -8 im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant verändern (Abb. 4.23A). Hingegen stieg auch nach LDL-Exposition die Permeabilität der Plasmamembran (Abb. 4.23B) an und eine DNA-Fragmentierung und Chromatin-Kondensation konnte ebenfalls beobachtet werden (Abb. 4.23C).

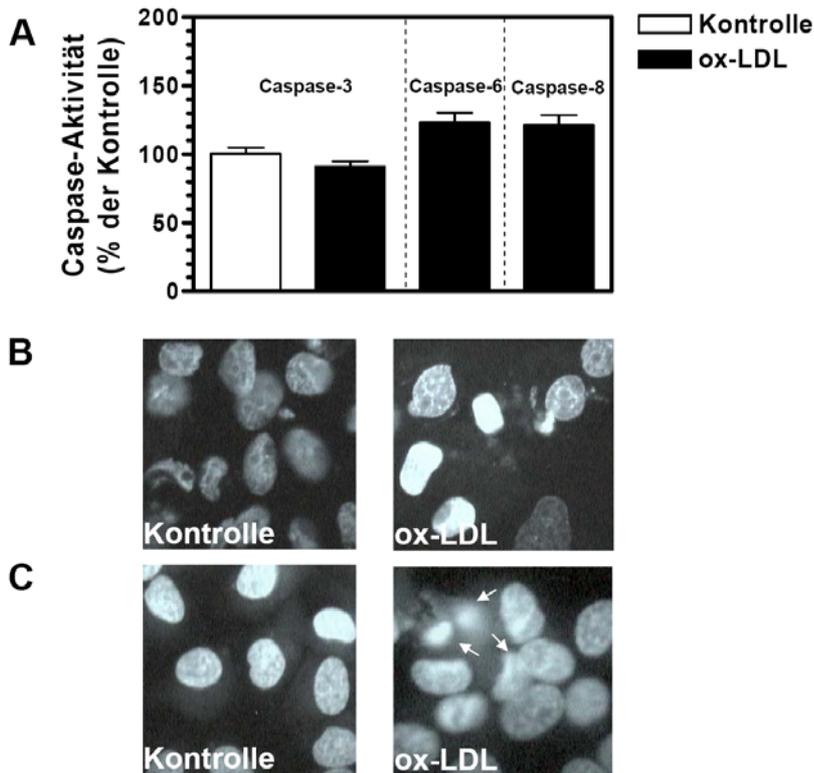


Abb. 4.23 Apoptose in ox-LDL-exponierten EA.hy926 Zellen.

(A) Caspase-3-, Caspase-6- und Caspase-8-Aktivität nach Inkubation der Zellen in Abwesenheit (Kontrolle) oder Anwesenheit von 5 µg/ml ox-LDL für die Dauer von 24 h. (B) Aufnahme des Farbstoffes Hoechst 33342 in Kontrollzellen und Zellen, die mit 5 µg/ml ox-LDL behandelt wurden. (C) Färbung der fixierten Zellen mit dem Farbstoff Hoechst 33258 zum Nachweis der DNA-Fragmentierung und Chromatin-Kondensation. EA.hy926 Zellen wurden für 24 h mit Medium (Kontrolle) oder mit 5 µg/ml ox-LDL inkubiert. Die Pfeile markieren die verstärkte DNA-Fragmentierung und Chromatinkondensation.

4.1.2.4 Einfluss von Genistein, GenDai und S40cl auf die ox-LDL-induzierte Apoptose von EA.hy926 Zellen

Abbildung 4.24 zeigt, dass Genistein die durch ox-LDL ausgelöste Membrandesintegration (4.24A) und auch die durch ox-LDL verursachte DNA-Fragmentierung und Chromatin-Kondensation (4.24B) verhindern kann. GenDai, bestehend aus 2,5 µM Genistein und 1 µM Daidzein, konnte die in EA.hy926 Zellen durch ox-LDL verursachte Membrandesintegration (4.24A) wie auch die DNA-Fragmentierung und Chromatin-Kondensation (4.24B) ebenfalls blockieren. Auch die Inkubation mit S40cl hemmte die durch ox-LDL bedingte Membrandesintegration (4.24A), die DNA-Fragmentierung und Chromatin-Kondensation (4.24B) in EA.hy926 Zellen vollständig.

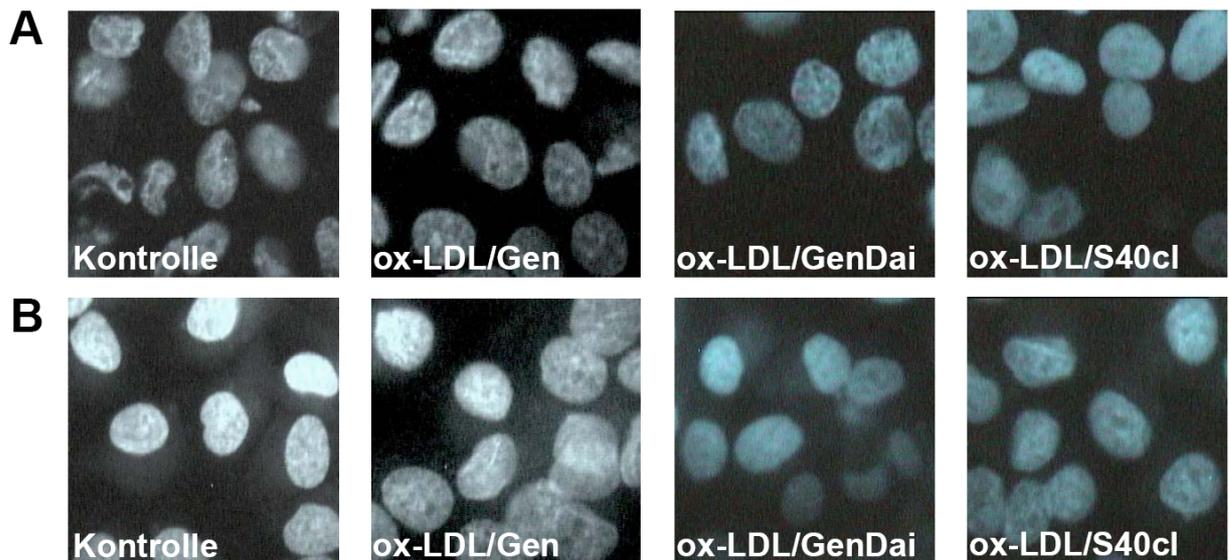


Abb. 4.24 Einfluss von Genistein, GenDai und S40cl auf die Apoptose in ox-LDL-exponierten EA.hy926 Zellen.

(A) Aufnahme des Farbstoffes Hoechst 33342 in Kontrollzellen und Zellen, die mit 5 $\mu\text{g/ml}$ ox-LDL in Ab- und Anwesenheit von 2,5 μM Genistein, GenDai oder S40cl behandelt wurden. (B) Färbung der fixierten Zellen mit dem Farbstoff Hoechst 33258 zum Nachweis der DNA-Fragmentierung und Chromatin-Kondensation. EA.hy926 Zellen wurden für 24 h mit Medium (Kontrolle) oder mit 5 $\mu\text{g/ml}$ ox-LDL alleine oder zusammen mit 2,5 μM Genistein, GenDai bzw. S40cl inkubiert.

4.2 *In vivo* Studie zur Wirkung von Phytoöstrogenen auf das Proteom humaner PBMC

Im Rahmen des im FP5 geförderten Projektes „Isoheart“ wurden die physiologischen Effekte des Verzehrs von Phytoöstrogenen in Form von Cerealienriegeln, die mit Isoflavonoiden aus der Sojabohne angereichert wurden, bei postmenopausalen Frauen untersucht. Über einen Zeitraum von 16 Wochen wurde in einer Interventionsstudie u.a. der Effekte des Isoflavonoid-haltigen Riegels auf das Proteom der PBMC von 20 postmenopausalen Frauen analysiert. PBMC bieten als Reporterzellen für das *biomarker-discovery* beim Menschen ideale Voraussetzungen, da sie mit einem geringen labortechnischen Aufwand gewonnen werden können. Da sie auch an der Entstehung und dem Voranschreiten der Atherosklerose beteiligt sind (Ludewig B, Laman JD, 2004; Osiecki H, 2004), können potentielle anti-atherosklerotische Wirkungen u.a. von Nahrungsinhaltsstoffen an den PBMC untersucht werden.

Im Rahmen der doppelblinden Crossover-Studie verzehrten die Frauen täglich zwei Riegel, die mit Isoflavonoiden angereichert worden waren (50 mg/d) oder einen Placeboriegel, der sich mit Ausnahme der Isoflavonoide in der Zusammensetzung nicht von den Isoflavonoid-haltigen Riegeln unterschied. Nach acht Wochen (crossover-point) und 16 Wochen wurde den Frauen Blut entnommen, um die Wirkung der Intervention auf das Proteom der mononukleären Blutzellen (*peripheral blood mononuclear cells* – PBMC) zu untersuchen (siehe Kapitel 3.2.8.1; Abb. 3.1).

Die durchgeführte Intervention mit dem Isoflavonoide enthaltenden Müsliriegel veränderte im Vergleich zum Verzehr des Placeboriegels die Spiegel von 39 Proteinen der PBMC, von denen 29 anhand ihres Peptid-Massen-Fingerabdrucks identifiziert werden konnten (Tab. 10.14; Abb. 4.25). Nur vier Proteine wurden im Supplementierungsarm vermindert vorgefunden, wobei die Spotintensität von drei Proteinen dabei sogar unter die Detektionsgrenze gesunken war. Dabei handelt es sich um den *ACONITASE 2 PRECURSOR* (Abb. 4.25, Spot 20), ein Protein mit Funktionen innerhalb des Stoffwechselgeschehens, den *RNA POLYMERASE III TRANSCRIPTION INITIATION FACTOR B* (Abb. 4.25, Spot 22) sowie die Proteine *GALECTIN 1* (Abb. 4.25, Spot 23) und *PLECKSTRIN* (Abb. 4.25, Spot 29). Bei den übrigen 25 Proteinen war die Spot-Intensität nach Verzehr der Isoflavonoid-haltigen Riegel im Vergleich zu den Placeboriegeln signifikant erhöht. Zu diesen 25 Proteinen gehörten u.a. ein Annexin und ein Chaperon, sieben Proteine des Zytoskeletts, fünf Proteine, die Funktionen im Stoffwechsel ausüben, ein Protein mit Beteiligung an der Genregulation und fünf Proteine, denen bisher keine Funktion zugewiesen werden konnte. Besonders interessant erscheinen im Hinblick auf eine potentielle anti-atherosklerotische Wirkung der Isoflavonoide die Regulation der entzündungshemmenden Proteine *CHAIN A HEAT-SHOCK 70 K D PROTEIN 42 K D ATPASE N-TERMINAL DOMAIN* (Abb. 4.25, Spot 2) und *FLNA PROTEIN*

(Abb. 4.25, Spot 7), der anti-apoptotischen Proteine *GALECTIN 1* (Abb. 4.25, Spot 23) und *PROHIBITIN* (Abb. 4.25, Spot 21), des anti-oxidativ wirkenden Enzyms *NADP⁺-DEPENDENT ISOCITRATE DEHYDROGENASE IDPC* (Abb. 4.25, Spot 19), des anti-thrombotisch wirksamen Proteins *α -ENOLASE* (Abb. 4.25, Spot 16) und des Enzyms *26S PROTEASE REGULATORY SUBUNIT 8* (Abb. 4.25, Spot 15), das der Bildung von Schaumzellen entgegenwirkt (5.1.3).

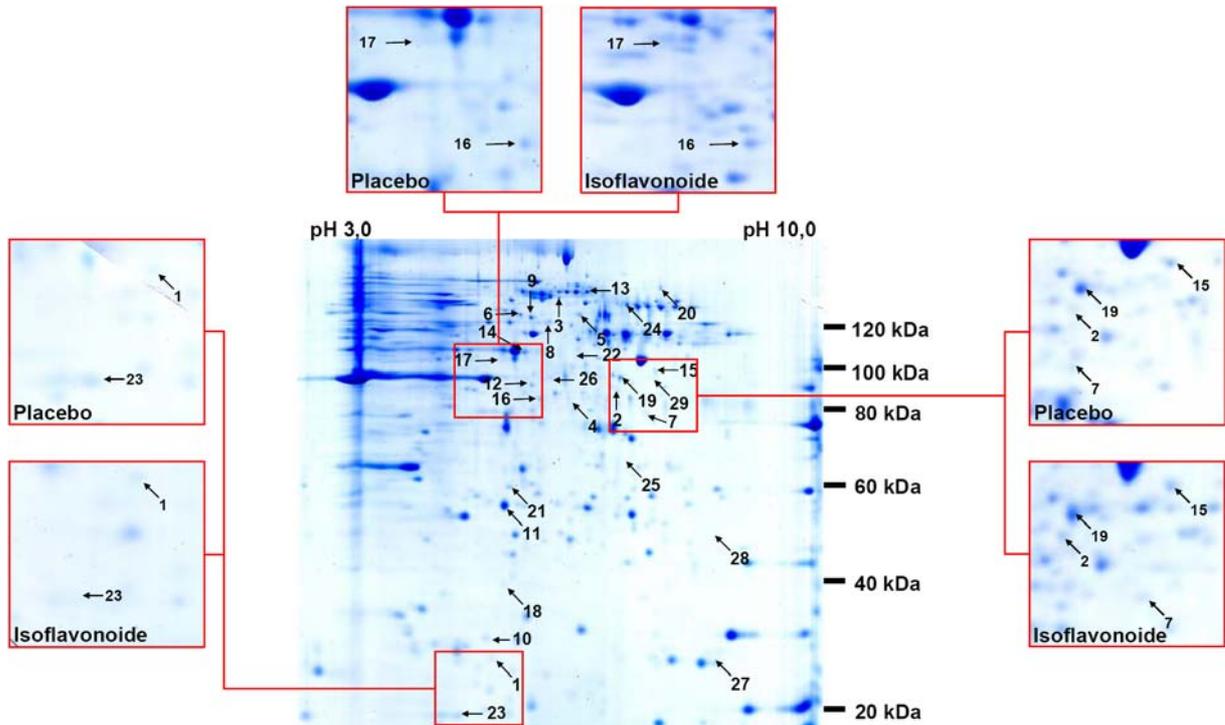


Abb. 4.25 Repräsentative 2D-PAGE von Proteinen aus PBMC postmenopausaler Frauen nach der Intervention mit einem Isoflavonoid-haltigen Müsliriegel.

In der Mitte ist ein repräsentatives mit *Coomassie brilliant blue* gefärbtes Gel von PBMC Kontrollzellen abgebildet, das von vergrößerten Ausschnitten der Gele mit Proteinen von PBMC nach der Intervention mit Isoflavonoid-haltigenen Riegeln oder Placebo-Riegeln umrahmt ist. Die Spot-Nummern sind mit denen von Tab. 10.14 identisch.

5 Diskussion

Koronare Herzerkrankungen stellen mit über 40% die häufigste Todesursache in Westeuropa und den USA dar (Yutani C et al., 1999). Der regelmäßige Verzehr von Sojaprodukten scheint zur Prävention der Atherosklerose beitragen zu können (Zhang X et al., 2003). Für die Effekte auf das kardiovaskuläre System werden die in Soja reichlich enthaltenen Isoflavonoide verantwortlich gemacht (Cassidy A & Griffin B, 1999; Clarkson TB, 2002). Mehrere Studien mit isolierten Isoflavonoiden konnten positive Wirkungen dieser Sojainhaltsstoffe auf Biomarker der Atherosklerose-Entwicklung nachweisen. Wurden die Isoflavonoide aus Sojapräparaten entfernt, ließen sich die Effekte auf das kardiovaskuläre System kaum mehr nachweisen (Wiseman H et al., 2000). So ließ sich beispielsweise im Rahmen einer Interventionsstudie an 156 Männern und Frauen mit leicht erhöhten LDL-Spiegeln zeigen, dass die durch den Verzehr von Sojaprodukten vermittelte Reduktion der Plasmaspiegel an LDL-Cholesterin durch die Isoflavonoide vermittelt wird (Crouse JR 3rd et al., 1999). Eine weitere Interventionsstudie von sechs Monaten mit 60 postmenopausalen Frauen brachte den Nachweis, dass die tägliche Zufuhr von 50 mg Genistein das Verhältnis zwischen NO und Endothelin-1 zu Gunsten von NO ändert. Das von Endothelzellen sezernierte Endothelin-1 wirkt dem Vasodilator NO entgegen. Eine Zunahme des Verhältnisses von NO zu Endothelin-1 führt daher zu erhöhter Vasodilation und mindert die Adhäsion von Monozyten, die Aktivierung von Makrophagen sowie die Stimulation der Proliferation und Migration glatter Muskelzellen (Squadrito F et al., 2002). Allerdings wird auch der Proteinfraction der Sojabohne eine protektive Wirkung zugesprochen, die neben den Isoflavonoiden für die anti-atherosklerotischen Eigenschaften Soja-haltiger Lebensmittel verantwortlich sein könnte. Der Proteinkomponente, d.h. bestimmten Peptidfraktionen und Speicherproteinen, wie β -Conglycinin oder 7S Globulin, werden dabei besondere Funktionen zugesprochen (Adams MR et al., 2004). Darüberhinaus werden den in Soja enthaltenen Saponinen, Phytinsäure und Mineralstoffen biofunktionelle Eigenschaften zugeschrieben (Potter SM, 1995). Ausgewählte Wirkungen dieser Inhaltsstoffe sollen im Folgenden kurz beschrieben werden:

Nach der enzymatischen Hydrolyse von Sojaprotein bleibt eine hydrolyse-resistente und unlösliche Fraktion mit einer hohen molekularen Masse (high-molecular-weight fraction, HMF) zurück. Diese Fraktion fördert beim Menschen im Vergleich zum Verzehr von Casein oder eines Sojaproteinisolats die Ausscheidung von Gallensäuren, erhöht die HDL-Spiegel und verringert die Plasmaspiegel an LDL (Wang MF et al., 1995). Dass bekanntlich große Peptide, so auch das 7S Globulin, im Gastrointestinaltrakt effektiv hydrolysiert und intakte Peptide in einer eher unbedeutenden Menge absorbiert werden, lässt den postulierten Wirkbeitrag resorbierter intakter Peptide eher fragwürdig erscheinen (Adams MR et al., 2004). Kurz-kettige Peptide (vor allem Di- und Tripeptide) können der weiteren Hydrolyse im Magen-

Darmtrakt entgehen und in den Kreislauf gelangen, wo sie Bioaktivitäten unterschiedlicher Art entfalten können (Adams MR et al., 2004).

Nach Untersuchungen von Adams MR et al. an Mäusen kommt dem β -Conglycinin, einem wichtigen Speicherprotein von Sojabohnen, eine besondere Bedeutung bei der kardioprotektiven Wirkung von Soja zu und diese Wirkungen scheinen unabhängig von LDL-Rezeptoren oder Einflüssen auf Plasmalipoproteine zu sein (Adams MR et al., 2004).

Saponine in Sojaprodukten beeinflussen vermutlich die Cholesterinspiegel über die Komplexbildung mit Cholesterin im Darm und eine erhöhte Ausscheidung von Gallensäuren (Sidhu GS & Oakenfull DG, 1986). Zusätzlich konnte für Saponine beispielsweise aus Ginseng eine vasodilatatorische Wirkung gezeigt werden (Achike FI & Kwan CY, 2003).

Phytinsäuren gelten als effektivere Antioxidantien als die Isoflavonoide, da sie Metallchelate bilden können und damit pro-oxidative Wirkungen von Metallen, z.B. freier Eisenionen, unterdrücken und somit der Entwicklung atherosklerotischer Läsionen entgegen wirken können (Engelmann HM et al., 2005). Zwar sind die meisten Wirkungen der Phytate nur *in vitro* belegt und die Resorptionsrate der Phytinsäuren beim Menschen sehr gering, dennoch kann eine Wirkung auch *in vivo* nicht ausgeschlossen werden (Engelmann HM et al., 2005).

Epidemiologische Studien lassen einen Zusammenhang zwischen der Aufnahme von Magnesium und Kalium und der Entstehung von koronaren Herzerkrankungen vermuten (Rayssiguier Y, 1984). Der Konsum von Soja-haltigen Lebensmitteln geht mit einer erhöhten Aufnahme von Magnesium einher (McNeill DA et al., 1985) und auch Kalium ist in der Sojabohne reichlich enthalten (Belitz HD et al., 2001). Ein Magnesiummangel begünstigt die Bildung initialer Läsionen über den veränderten Elastin-, Kollagen- und Lipidstoffwechsel, einer vermehrten Kalzifikation, erhöhten Plättchenaggregationsrate und der Entstehung von Bluthochdruck (Rayssiguier Y, 1984). Da der Magnesiumumsatz eng mit dem Kaliumstoffwechsel verbunden ist, tritt häufig zusätzlich ein kombinierter Mangel an Magnesium und Kalium auf, der den Krankheitsverlauf weiter erschweren kann (Rayssiguier Y, 1984). Wenngleich es somit auch Hinweise auf andere funktionelle wirksame Soja-Inhaltsstoffe gibt, werden die Isoflavonoide vordergründig für die Mehrzahl der dokumentierten biologischen Effekte verantwortlich gemacht.

Der protektive Einfluss von Soja-Isoflavonoiden auf die Atherogenese wird über eine Senkung der Plasmaspiegel der atherogenen Stressoren Homocystein und ox-LDL (Merz-Demlow BE et al., 2000; Wagner JD et al., 2000; Jenkins DJ et al., 2002; Tonstad S et al., 2002) und der verminderten LDL Oxidation und Lipidperoxidationsrate erklärt (Tikkanen MJ et al., 1998; Kapiotis S et al., 2002; Jenkins DJ et al., 2002). Weitere anti-atherosklerotische Eigenschaften der Isoflavonoide werden in der Aufrechterhaltung der Gefäßaktivität (Steinberg FM et al., 2003), einer verringerten Sekretion von entzündungsfördernden Zytokinen,

einer veränderten Expression von Zelladhäsionsproteinen (Rimbach G et al., 2004; Takano-Ishikawa Y et al., 2003), niedrigeren Spiegeln an reaktiven Stickstoffspezies (Yen GC & Lai HH, 2003) und einer verminderten Thrombozyten-Aggregationsrate gesehen (Gottstein N et al., 2003). Die Struktur der Isoflavonoide gleicht der endogener Östrogene, was zu der Vermutung führte, dass die anti-atherosklerotische Wirkung der Isoflavonoide neben z.B. antioxidativen Wirkungen über das Zusammenspiel mit Östrogenrezeptoren vermittelt wird (Barnes S et al., 2000). Die Affinität der Isoflavonoide für die Bindung an die verschiedenen Östrogenrezeptorklassen variiert sehr stark. Beispielsweise weist das am häufigsten vorkommende Isoflavonoid Genistein im Vergleich zu 17- β -Östradiol nur 4% der Affinität zum Östrogenrezeptor- α , aber von 87% für den Östrogenrezeptor- β auf (Mikkola TS & Clarkson TB, 2002). Die Affinität von Genistein für den Östrogenrezeptor- β entspricht damit ungefähr der von 17 β -Östradiol (Kuiper GG et al., 1998). Der Östrogenrezeptor- β reguliert die Transkription von Genen, die u.a. Einfluss auf Gefäßfunktionen ausüben und zur Aufrechterhaltung einer physiologischen Gefäßkontraktion oder der Funktion von Ionenkanälen und damit der Erhaltung eines physiologischen Blutdrucks beitragen (Zhu Y et al., 2002). Als weitere Wirkmechanismen über die Genistein anti-atherosklerotische Aktivitäten entfalten könnte, werden die Hemmung von Tyrosin-Kinasen (Akiyama T et al., 1987; Shimokado K et al., 1994) und die Hemmung von Entzündungsprozessen in verschiedenen Zelltypen angesehen (Barnes S et al., 2000; Gottstein N et al., 2003).

5.1 Die Wirkung von Isoflavonoiden in Endothelzellen *in vitro*

Der Atherosklerose liegt der *response to injury* Hypothese zufolge eine Verletzung des Endothels zu Grunde (Ross R & Glomsett JA, 1973). In den hier vorliegenden *in vitro* Studien sollte daher an Endothelzellen mittels Stressoren eine entsprechende Situation geschaffen werden, die es erlaubt mit Hilfe der Proteomanalyse, die zellulären Zielproteine der Stressoren und der Isoflavonoide zu identifizieren. Als Modell für das humane Endothel wurden primäre Endothelzellen aus humanen Nabelschnurvenen (HUVEC) verwendet.

HUVEC müssen im Labor in einem aufwendigen Verfahren aus humanen Nabelschnurvenen isoliert werden. Aufgrund individueller Entnahmen und Präparationen zeigen HUVEC zudem eine gewisse Heterogenität. Außerdem gelang es aus HUVEC eine im Vergleich zu anderen Zellkulturen nur geringe Menge an Protein zu isolieren, so dass für die 2D-Gelelektrophorese nur wenig Proteinlysate zur Verfügung stand. Daher wurde für die weitergehenden Studien die stabile Zelllinie EA.hy926 verwendet, bei der generell Ergebnisse mit einer höheren Konsistenz als bei HUVEC erwartet werden können (Watson CA et al., 1995). EA.hy926 Zellen sind durch Fusion von HUVEC mit der Lungenkarzinom-Zelllinie A549 generiert worden. Diese Zellen stellen ein sehr gut charakterisiertes Modell für makrovaskuläre

Endothelzellen dar (Bouis D et al., 2001). Wie bereits beschrieben, wurden die Endothelzellen stets mit 25 μM Hcy bzw. 5 $\mu\text{g/ml}$ ox-LDL in Ab- und Anwesenheit von 2,5 μM Genistein, des Isoflavonoidgemisches aus 2,5 μM Genistein und 1 μM Daidzein oder des Extraktes S40cl behandelt.

5.1.1 Effekte von Genistein auf das Proteom von HUVEC nach Exposition gegenüber Stressoren

Genistein führte in Hcy-exponierten HUVEC zu Veränderungen in den zellulären Spiegeln einer Reihe von Proteinen, die mit der Atherogenese in Verbindung gebracht werden können, darunter *ANNEXIN V*. *In vivo* kann *ANNEXIN V* die durch Endothelzellen vermittelte Bildung von Thrombin unterbinden (van Heerde WL et al., 1994), was es als ein interessantes Zielprotein für die postulierte präventive Wirkung von Genistein erscheinen lässt. Zusätzlich wird postuliert, dass ein häufiger Polymorphismus im *ANNEXIN V* Gen zu einer erhöhten Translationsrate und somit gestiegenen Plasmaspiegeln an *ANNEXIN V* führt, was schließlich mit einem verringerten Risiko eines Myokardinfarktes einhergeht (Gonzalez-Conejero R et al., 2002). Hcy bedingte auch einen deutlich reduzierten Spiegel an *LAMIN A*, was 2,5 μM Genistein mindern und 25 μM Genistein vollständig aufheben konnte. Die Wirkung von Genistein auf die veränderte Intensität des *LAMIN A* erfolgte somit dosisabhängig. *LAMIN A* gehört zu der Familie der nukleären Lamine, die an der DNA-Replikation, der Chromatin-Organisation, der Arrangierung der Kernpore, dem Kernwachstum und der Verankerung der Kernmembranen beteiligt sind (Moir RD & Spann TP, 2001). Patienten mit einer Missense-Mutation des *LAMIN A* Gens leiden unter Lipodystrophie, Hyperinsulinämie, Dyslipidämie, Diabetes mellitus und Bluthochdruck (Hegele RA et al., 2000; Haque WA et al., 2002). Missense-Mutationen eines Gens können mit der verminderten Expression des entsprechenden Proteins funktionell gleichgesetzt werden. Da Genistein in HUVEC eine verstärkte Bildung des *LAMIN A* herbeiführte, könnte es einer Lipodystrophie, Hyperinsulinämie, Dyslipidämie, Diabetes mellitus und Bluthochdruck entgegenwirken.

Die Überexpression der C-terminalen Hälfte des *APOPTOSIS-LINKED GENE 2 INTERACTING PROTEINS* kann die durch verschiedene Stimuli bedingte Apoptose verhindern (Chatellard-Causse C et al., 2002). Die Spotintensität des *APOPTOSIS-LINKED GENE 2 INTERACTING PROTEIN* wurde unter Hcy-Exposition der Zellen vermindert, was zur Apoptose der HUVEC beitragen könnte. Auch die Abnahme der Spotintensität des zytoskelettalen *KERATIN TYPE 2* deutet auf die auch experimentell in EA.hy926 Zellen belegte erhöhte Apoptoserate nach Hcy-Exposition der Zellen hin. Keratine dienen den Caspasen als Substrate und werden von diesen im Verlauf der Apoptose gespalten (Badock V et al., 2001). Eine Folge der erhöhten Apoptose-Rate ist ein höherer Gehalt an Phosphatidylserin in der äußeren Zellmembran. Diese Zunahme an Phosphatidylserin wiederum führt zur Aktivierung von Thrombin und

somit zu einem höheren Risiko einer arteriellen Thrombose (Lesauskaite V et al., 2003). Genistein konnte in beiden Dosierungen die durch Hcy bedingte Abnahme der Intensität der Proteinspots des *APOPTOSIS-LINKED GENE 2 INTERACTING PROTEIN* und des zytoskeletalen *KERATIN TYPE 2* verhindern, was auf eine anti-apoptotische Wirkung von Genistein in HUVEC schließen lässt.

Die Induktion der Apoptose geht üblicherweise mit einer erhöhten Expression des Ubiquitinhydrolase-Gens einher. Hasegawa R et al. konnten aus humanem Plasma aus der frühen Phase eines akuten Myokardinfarktes verschiedene Serumfaktoren isolieren, welche in Fibroblasten *in vitro* die Apoptose über eine verstärkte Expression des Ubiquitinhydrolase-Gens induzierten (Hasegawa R et al., 2003). Die Spotintensität der *UBIQUITIN CARBOXY-TERMINAL HYDROLASE L1* war in HUVEC nach Exposition gegenüber Hcy und 25 µM Genistein erhöht. Diese Befunde zeigen, dass Hcy auch bestimmte Proteine im Sinne einer verzögerten Atherogenese beeinflussen kann und hohe Dosen an Genistein umgekehrt Proteine im Sinne einer Atheroskleroseförderung beeinflussen können.

Bei Erkrankungen wie der Atherosklerose oder einer Restenose nehmen Proteine, die an der Kontrolle des Zellzyklus zur Initiierung der Zellteilung und Proliferation beteiligt sind, eine besondere Stellung ein (Bicknell KA et al., 2003). So vermindert der endotheliale Stressor Hcy offenbar auch die Regeneration von beschädigten Endothelzellen über eine Hemmung des Zellwachstums (Wang J et al., 1992). In diesem Zusammenhang erscheint der Befund interessant, dass Genistein eine Zunahme der Proteinspiegel des *CHROMOSOME SEGREGATION PROTEIN SMC1* und des *HETEROGENOUS NUCLEAR RIBONUCLEOPROTEIN A2* in Hcy-behandelten Zellen herbeiführte; beide Proteine sind für die Zellproliferation essentiell (Rocques PJ et al., 1995; Pino I et al., 2003).

In HUVEC, die gegenüber ox-LDL exponiert wurden, konnte Genistein nur bei drei Proteinen die durch ox-LDL verursachten Veränderungen der Proteinspiegel verhindern. Eines dieser Proteine, die zytosolische *ALDEHYDE DEHYDROGENASE 1A1* war nach Inkubation mit ox-LDL verstärkt und nach der Gabe von Genistein wieder vermindert. Allerdings kann die *ALDEHYDE DEHYDROGENASE 1A1* bislang nicht in einen funktionellen Zusammenhang mit der Atherogenese gebracht werden.

Auch das *UBIQUITIN CONJUGATING ENZYME 12* zeigte unter der Wirkung von ox-LDL in HUVEC einen erhöhten Spiegel, der in Anwesenheit von Genistein wieder das Niveau der Kontrolle gesenkt werden konnte. Im Verlauf der durch ox-LDL induzierten Apoptose in Endothelzellen, die auch hier gezeigt wurde, kommt der Ubiquitinierung von zellulären Proteinen eine große Bedeutung zu (Vieira O et al., 2000). In HUVEC könnte Genistein über seinen Einfluss auf das *UBIQUITIN CONJUGATING ENZYME 12* den folgenden Abbau der ubiquitinierten Proteine durch das *26S PROTEASOME* verändern und die Apoptose unter-

binden. Allerdings führte die Exposition der HUVEc gegenüber ox-LDL zu einem stark erhöhten Spiegel der *26S PROTEASOME SUBUNIT P28* und dieser wurde durch die hohe Genisteinkonzentration noch weiter erhöht. Bei einer hohen Genisteindosis sind somit ein erhöhter Proteinabbau und mögliche pro-apoptische Effekte nicht auszuschließen.

Genistein beeinflusst in hoher Konzentration aber offenbar auch andere Proteine, so die *URIDINE DIPHOSPHOGLUCOSE DEHYDROGENASE*, die in die Bildung von strukturgebenden Proteoglykanen involviert ist (Wegrowski Y et al., 1998) und für die belegt ist, dass sie in Gefäßen mit atherosklerotischen Läsionen in geringerer Menge vorkommt (Pillarisetti S, 2000). Die Erhöhung ihres Spiegels in HUVEC war nur bei hoher, nicht aber niedriger Genisteinkonzentration zu beobachten.

Die hier in HUVEC identifizierten Zielproteine des Genisteins in Zellen, die Stressoren ausgesetzt waren, können mit gewissen Plausibilitäten in den Kontext einer präventiven Aktivität in der Atherogenese eingeordnet werden. Sie repräsentieren somit Biomarker seiner Wirkung und diese übt Genistein bereits in Konzentrationen aus (2,5 µM), die in vivo über die Zufuhr sojahaltiger Nahrung erreicht werden können.

5.1.2 Vergleich der Wirkungen von Genistein, des Genistein/Daidzein-Gemisches und des Extraktes S40cl auf das Proteom von EA.hy926 Zellen nach ihrer Exposition gegenüber Hcy und ox-LDL

Im Falle der EA.hy926 Zellen wurden unter Hcy-Wirkung deutlich mehr Proteine als in HUVEC in ihrem Spiegel verändert; darunter auch zahlreiche Proteine, die mit atherosklerotischen Prozessen in Verbindung gebracht werden können. So waren die Spiegel von *VIMENTIN*, *MICROTUBULE-ASSOCIATED PROTEIN EB1* und *CATHEPSIN B* in Gegenwart von Hcy erhöht. Die Spiegel des zytoskelettalen Proteins *VIMENTIN* sind gewöhnlich bei einer Cardiomyopathie erhöht (Wilke A et al., 1995). *EB1* führt über die Polymerisation der Mikrotubuli zur Apoptose (Nakamura M et al., 2002; Zheng XL et al., 2004) und *CATHEPSIN B* konnte beim Menschen in atherosklerotischen Läsionen (Liu J et al., 2004) und auch in apoE und apoE/endothelial NO-Synthase Knock-out Mäusen (Chen J et al., 2002), einem Tiermodell für die Atherogenese, vermehrt nachgewiesen werden. Dort ist *CATHEPSIN B* vermutlich an der Neoangiogenese, der Atherogenese und an Plaque-Brüchen beteiligt (Chen J et al., 2002; Liu J et al., 2004).

Genistein konnte bei 17 Proteinen die durch Hcy verursachte Veränderung der Spotintensitäten verhindern, so auch den Anstieg des *ANAPLASTIC LYMPHOMA KINASE FUSION PROTEIN MOESIN*. Dieses Protein fördert die Adhäsion von Monozyten an Endothelzellen und deren Migration in die Intima (Wojciak-Stothard B et al., 1999; Thompson PW et al., 2002; Gamulescu MA et al., 2003).

Die aortische Intima eines Gesunden enthält mehr Tubulin als die Intima mit *fibro-fatty lesions* (Stastny JJ & Fosslie E, 1992). Für die Synthese von Tubulin wird das Chaperon *TCP1* benötigt (Yaffe MB et al., 1992). Der Proteinspot von *TCP1* war nach der Inkubation der Endothelzellen mit Hcy nicht mehr detektierbar, während die Anwesenheit von Genistein wieder eine signifikante Zunahme der Spotintensität des *TCP1* bedingte. Die Wirkung von Genistein auf das Chaperon *TCP1* und damit auf die Biogenese von Tubulin lässt Genistein somit auch in Zusammenhang mit dem Erhalt einer funktionellen Intima in Verbindung treten. Das *THIOREDOXIN-RELATED PROTEIN* ist ein weiteres anti-atherosklerotisch wirksames Protein, dessen Expression in Hcy-gestressten Zellen verringert war und nach Zusatz von Genistein wieder anstieg. Dieses Protein scheint vor allem die NO-Synthase in der Gegenwart von NO vor Modifikationen zu schützen und somit den Erhalt seiner Enzym-Aktivität zu gewährleisten (Shao LE et al., 2002). Das *THIOREDOXIN-RELATED PROTEIN* ist allerdings auch am Apoptosegeschehen beteiligt. Über die Bindung an die *Apoptosis signal-regulating kinase 1* (ASK1) verhindert es die Aktivierung der stressinduzierten Signalkaskade der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK), die die Apoptose auslöst (Shao LE et al., 2002), wie Abb. 5.1 veranschaulicht. Dies kann als weiterer Hinweis für eine apoptoseinduzierende

Wirkung von Hcy in EA.hy926 Zellen bzw. eine Inhibierung der Apoptose durch Genistein gewertet werden.

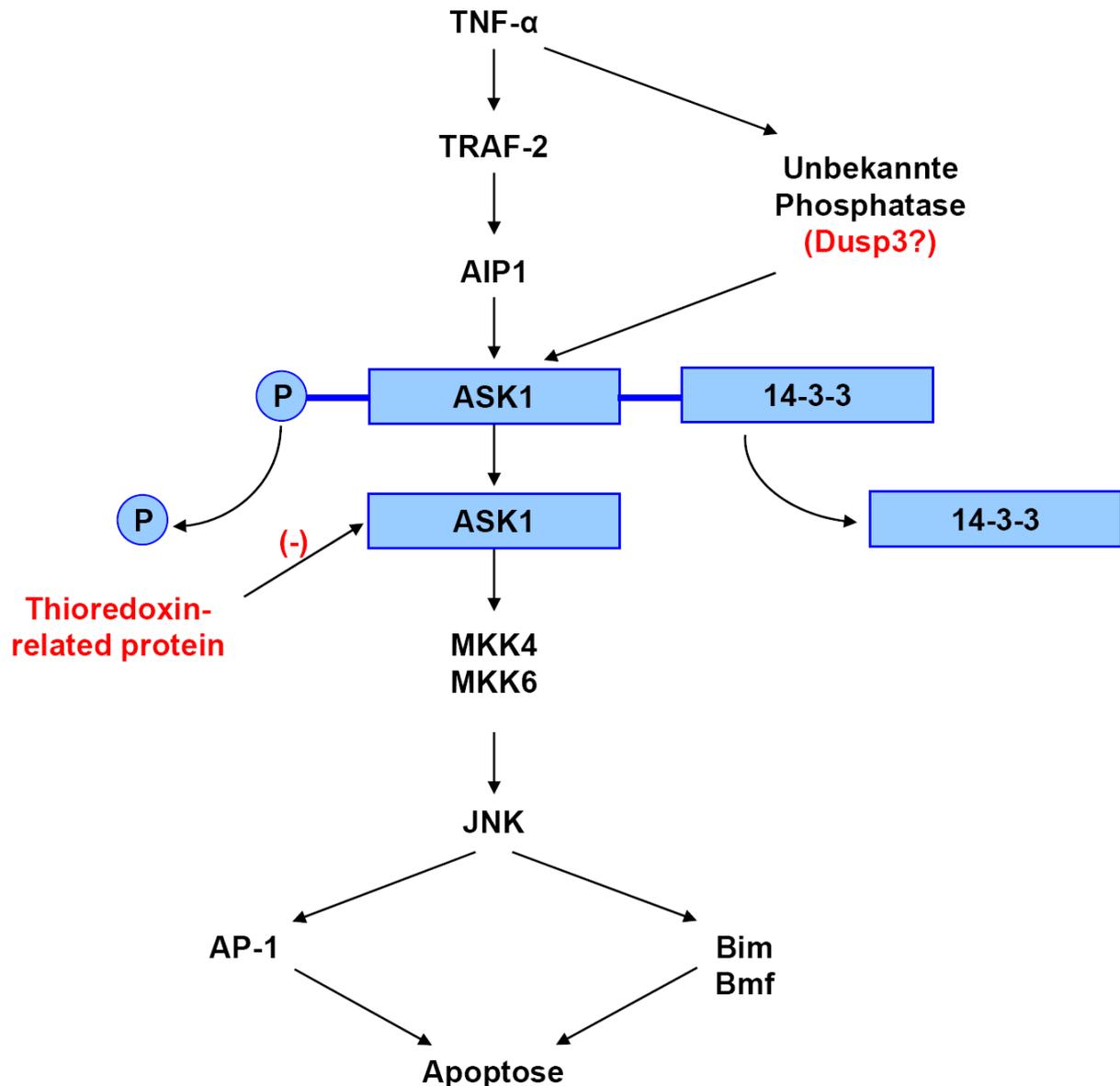


Abb. 5.1 Modell der stressinduzierten Aktivierung der MAPK.

Die Stimulierung des TNF- α Rezeptors führt zur Verstärkung des Adaptors TRAF2 und gleichzeitig zur Aktivierung einer unbekannt Phosphatase (möglicherweise DUSP3). TRAF2 vermittelt die Reaktion von ASK1 mit AIP1, was die Freisetzung von ASK1 von seinem endogenen Inhibitor 14-3-3 bewirkt. Die Aktivierung von ASK1 erfolgt über die Abspaltung von 14-3-3 und die Dephosphorylierung von ASK1 durch eine unbekannt Phosphatase (möglicherweise DUSP3). ASK1 aktiviert in Abhängigkeit von MKK4 oder MKK6 die JNK, die wiederum die Apoptose induziert (modifiziert nach Guicciardi ME & Gores GJ, 2003). AIP1, ASK1-interacting protein-1; ASK1, Apoptosis signal regulating kinase 1; JNK, c-Jun N-terminal kinase; MKK4/6, MAP kinase kinase 4/6; TRAF2, TNF- TNF-Rezeptor-associated factor 2

Ein weiteres Indiz für pro-apoptotische Prozesse in den Endothelzellen bot die verminderte Intensität von verschiedenen Proteinen des Zytoskeletts, die im Verlauf der Apoptose proteolytisch gespalten werden (Broers JL et al., 2002). Allerdings fanden sich auch einzelne zytoskelettale Proteine, wie die Proteine *LAMIN A* und *C*, in Hcy-exponierten Zellen in höheren Spiegeln. Da diese Lamine jedoch während der Apoptose aus dem Zellkern in das Zytosol freigesetzt werden, könnten sie in der Folge für die Proteomanalyse besser

verfügbar sein als Material aus dem Zellkern und dies könnte die erhöhten Spiegel erklären. Darüber hinaus werden die Lamine des A-Typs im Gegensatz zu den B-Typ Laminen während des programmierten Zelltods nur partiell gespalten, was ebenfalls einen Anstieg der Proteinspiegel erklären könnte (Broers JL et al., 2002). Diese aus der Proteomanalyse gewonnenen Hinweise auf die Apoptose der Endothelzellen wurden durch entsprechende funktionelle Analysen von Apoptosemarkern bestätigt. So stieg nach Kultivierung der Endothelzellen mit Hcy nicht nur die Membranpermeabilität, sondern auch die DNA-Fragmentierung und Chromatin-Kondensation, die als Marker für die späte Apoptoseprozesse herangezogen werden können, an. Bemerkenswerterweise induziert Hcy die Apoptose in EA.hy926 Zellen ohne eine erkennbare Veränderung der Aktivität der Caspasen-3, -6 und -8. Dies steht jedoch im Einklang mit früheren Untersuchungen an primären humanen Endothelzellen (HUVEC), bei denen die durch Hcy-Thiolacton vermittelte Apoptose ebenfalls ohne einhergehende Aktivierung der Caspasen erfolgte (Mercie P et al., 2000). Genistein konnte in Hcy-exponierten EA.hy926 Zellen der Apoptose, an allen Markern beobachtbar, entgegenwirken, was auch für die aus der Proteomanalyse abgeleiteten Veränderungen gilt.

Die Wirkung des Isoflavonoidgemisches aus Genistein und Daidzein (GenDai) auf das Proteom Hcy-exponierter EA.hy926 Zellen unterschied sich deutlich von der des Genisteins. Nur zwei Proteine wurden in Anwesenheit von Hcy durch Genistein als auch GenDai in ihrer Spotintensität verändert, darunter die *6-PHOSPHOGLUCONOLACTONASE*. Ihr Spiegel stieg unter Hcy-Exposition an und Genistein und GenDai vermochten dies zu verhindern. Dieses Protein steht jedoch in keinem bekannten Zusammenhang zu einem der Atherosklerose zugehörigen Stoffwechselweg. In Zellen, die mit Hcy gestresst wurden, war neben der *6-PHOSPHOGLUCONOLACTONASE* auch das nukleäre *LAMIN A* von Genistein und GenDai beeinflusst worden. Genistein konnte die durch Hcy ausgelöste Zunahme der Spotintensität des *LAMIN A* verhindern. In dem Experiment mit dem Gemisch GenDai wies ein Proteinspot nach Kultivierung mit Hcy eine verminderte Intensität auf, dessen Peptid-Massen-Fingerabdruck ebenfalls mit *LAMIN A* übereinstimmt. GenDai konnte die Konzentration dieses Proteins wieder erhöhen. Aufgrund posttranslationaler Modifikationen wie Glycosylierung, Phosphorylierung und Methylierung treten verschiedene Typen der Lamine mit unterschiedlichen Eigenschaften auf (Ferraro A et al., 1989). Offenbar werden in Hcy-behandelten Zellen insbesondere kleinere Lamine (72 kDa, p/ 5,8) in ihrem Spiegel reduziert und größere (82 kDa, p/ 6,7) erhöht. GenDai verhinderte die Abnahme der kleineren Lamine, während Genistein die Menge der größeren Lamine reduzierte. Ein Mangel des *LAMIN A* wird, wie bereits beschrieben, mit Lipodystrophie, Hyperinsulinämie, Dyslipidämie, Diabetes mellitus

und Bluthochdruck in Verbindung gebracht (Haque WA et al., 2002). Dies könnte nach den hier erhaltenen Befunden insbesondere die kleineren Laminformen betreffen.

Die Spotintensität eines weiteren Proteins des Zytoskeletts, des *MATRIN 3*, war in Zellen nach Hcy-Exposition ebenfalls reduziert. Sein Abfall könnte mit einer Spaltung durch Proteasen im Verlauf der Apoptose erklärt werden (Broers JL et al., 2002), wobei GenDai diesen Abfall verhindern konnte. Das *VOLTAGE-DEPENDENT ANION-SELECTIVE CHANNEL PROTEIN 1 (VDAC-1)* ist ein weiteres an der Apoptose beteiligtes Protein. *VDAC-1* agiert als Rezeptor des *plasminogen kringle 5*, das in humanen Endothelzellen den programmierten Zelltod zu induzieren vermag (Gonzalez-Gronow M et al., 2003, Hanford HA et al., 2003). GenDai konnte die durch Hcy verursachte Zunahme des Proteinspiegels antagonisieren und alle sonstigen pro-apoptotischen Wirkungen von Hcy (Membrandesintegration bzw. DNA-Fragmentierung und Chromatin-Kondensation) revertieren.

Neben Proteinen des Apoptosegeschehens konnten weitere anti-atherosklerotisch wirksame Proteine identifiziert werden, die von GenDai in ihrem Spiegel verändert wurden, wie z.B. das am Abbau von LDL beteiligte *CATHEPSIN D* (Leake DS & Peters TJ, 1981). Seine Spotintensität war in Gelen mit Proteinlysaten Hcy-exponierter Zellen reduziert und stieg in Anwesenheit von GenDai wieder an. GenDai konnte auch die Abnahme der Intensität des anti-atherosklerotischen Proteins *CHAPERONIN CONTAINING T-COMPLEX POLYPEPTIDE 1 DELTA SUBUNIT (CCT-DELTA)* unterbinden. Das Protein *CCT-DELTA* ist an der Bildung von Tubulin beteiligt (Kubota H, 2002), das in aortischer Intima mit sogenannten *fibro-fatty lesions* in einer geringeren Menge vorliegt als in gesunder aortischer Intima (Stastny JJ & Fosslie E, 1992). *CCT-DELTA* wirkt demnach ebenso wie *TCP-1*, dessen Spiegel durch Genistein in Hcy-behandelten Zellen erhöht wurden, an der Synthese von Tubulin mit.

Der Extrakt S40cl zeigte nur auf die Proteine *ANNEXIN II* und *HEAT SHOCK PROTEIN GP PRESURSOR* eine Wirkung, die mit der von Genistein in Hcy-behandelten Zellen vergleichbar war. Die Beeinflussung dieser Proteine kann jedoch bislang mit keinem der Atherosklerose zugehörigen Prozess in Verbindung gebracht werden. S40cl konnte nur bei einer kleineren Anzahl von Proteinen die durch Hcy hervorgerufenen Veränderungen der Spotintensität aufheben als GenDai. Außerdem waren von der Wirkung von S40cl auf das Proteom Hcy-behandelter Endothelzellen überwiegend andere Proteine betroffen als nach der Kultivierung mit GenDai. Nur die Intensitäten der beiden Proteine *MATRIN 3* und *U5 SNRNP-SPECIFIC 40 KDA PROTEIN* zeigten vergleichbare Veränderungen in Anwesenheit von GenDai bzw. S40cl. Wie bereits beschrieben verringerte Hcy die Spotintensität des zytoskelettalen Proteins *MATRIN 3*, was auf die Spaltung durch Proteasen im Verlauf der Apoptose zurückgeführt werden könnte (Broers JL et al., 2002). Ebenso wie GenDai war

S40cl in der Lage die durch Hcy bedingte Reduktion von *MATRIN 3* zu verhindern. Manche Effekte des Extrakts auf das Proteom der EA.hy926 Zellen sind somit durch die Isoflavonoide vermittelt worden, was auch die Bestimmung der Apoptose in Form von Membrandesintegration, sowie DNA-Fragmentierung und Chromatin-Kondensation zeigt. Ebenso wie die isolierten Isoflavonoide kann der Soja-Extrakt S40cl der Wirkung von Hcy auf die Apoptose der EA.hy926 Zellen entgegenwirken.

Ein Protein, das durch Hcy verringert wurde und durch S40cl erhöhte Spiegel aufwies war die *DUAL SPECIFICITY (THREONINE/TYROSINE) PHOSPHOPROTEIN PHOSPHATASE DUSP3*. Eine anti-apoptotische Wirkung des Extraktes S40cl könnte somit über die Hemmung der Stress-induzierten MAP-Kinase Signalkaskade durch Mitglieder der *DUSP3* Familie vermittelt werden (siehe Abb. 5.1, Seite 75) (Bueno OF et al., 2001; Shao LE et al., 2002), ähnlich wie es für Genistein aufgrund der erhöhten Spiegel des *THIOREDOXIN-RELATED PROTEINS* postuliert wurde. Bestärkt wird diese Hypothese durch eine erhöhte Bildung der *THIOREDOXIN PEROXIDASE* in mit Hcy gestressten Endothelzellen in Gegenwart von S40cl. Dies könnte die Hemmung der Apoptose verstärken, da Thioredoxin Peroxidasen die Endothelzellen vor oxidativen Schäden und somit vor der Apoptose schützen können (Zhang P et al., 1997).

S40cl beeinflusste in Hcy-exponierten EA.hy926 auch die Intensität von Proteinen, die unabhängig von der Apoptose an der Entwicklung der Atherosklerose beteiligt sind. So verhinderte S40cl beispielsweise die durch Hcy verursachte Abnahme der Spotintensität des *DNAK-TYPE MOLECULAR CHAPERONE*, das auch als *MORTALIN-2* oder *HEAT-SHOCK PROTEIN 70 (HSP70)* bekannt ist. *HSP70* mindert die durch Angiotensin-II vermittelte Bluthochdruckantwort, vermutlich aufgrund von Wechselwirkungen mit dem NF- κ B Signalweg (Chen Y et al., 2004a & b). Da *HSP70* in Zellen die I κ B Kinase- α (IKK- α) inhibiert und die Freisetzung des Inhibitor κ B- α (I κ B- α) blockiert (Chen Y et al., 2004a), wird die durch NF- κ B vermittelte Signalkaskade gehemmt (siehe Abb. 5.2, Seite 79). Zwar konnte hier kein Effekt auf die Spiegel von IKK- α oder I κ B- α beobachtet werden, doch war die Intensität des *IKK INTERACTING PROTEINS* in Hcy-gestressten EA.hy926 verringert und in Anwesenheit von S40cl wieder erhöht. Dies lässt vermuten, dass das *IKK INTERACTING PROTEIN* mit der Hemmung der Aktivität von NF- κ B in Verbindung steht.

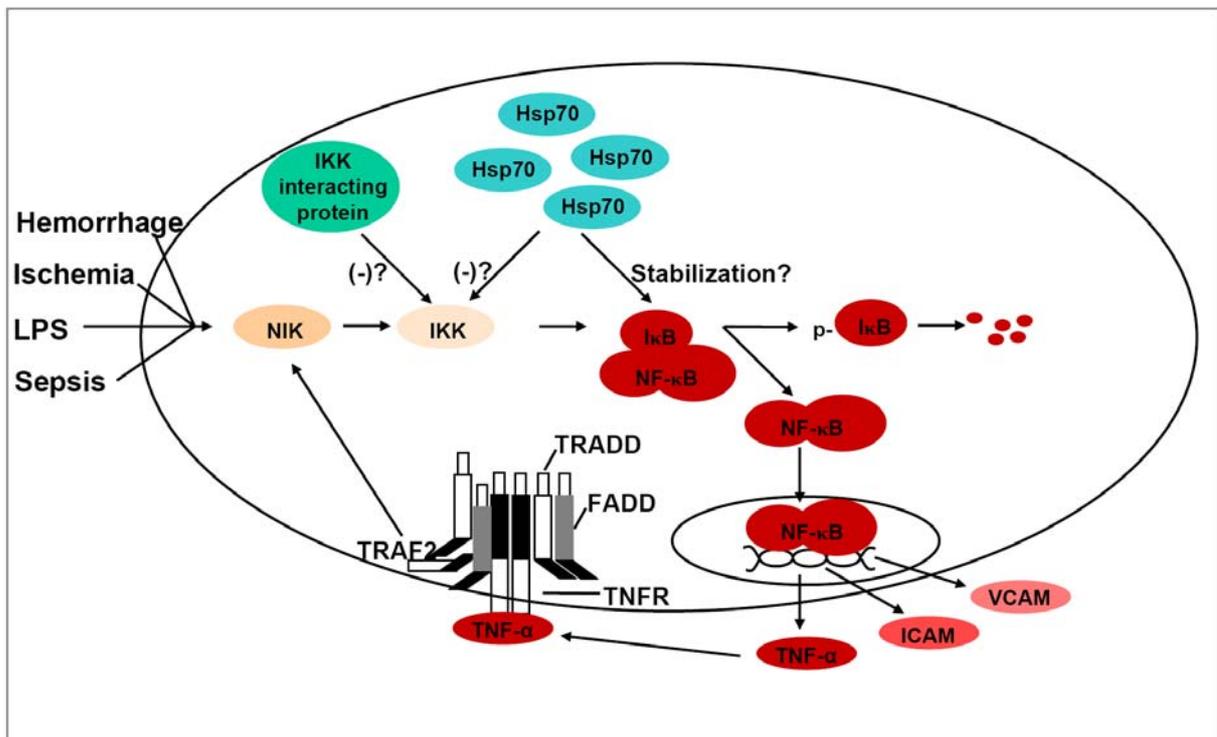


Abb. 5.2 Signaltransduktion zur Förderung der Synthese von TNF- α und potentielle Mechanismen, über die Hsp70 die Bildung von TNF- α hemmt als Hypothese zur Erklärung der Wirkungen von Hcy und Isoflavonoiden auf das Endothel.

Die Aktivität von NF- κ B wird von I κ B reguliert, das an NF- κ B bindet und dabei einen inaktiven Komplex im Zytoplasma bildet. Über Faktoren wie Lipopolysaccharide (LPS), Sepsis, Ischämie oder Hämorrhagie wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, die die *NF- κ B inducing kinase* (NIK) aktiviert. NIK aktiviert über Phosphorylierung der Untereinheiten die *I κ B kinase* (IKK). Die aktivierte IKK phosphoryliert I κ B, was zum Abbau von I κ B und somit zur Freisetzung von NF- κ B führt. NF- κ B gelangt in den Zellkern, wo es die Transkription u.a. von TNF- α oder der Adhäsionsmoleküle ICAM und VCAM auslöst: TNF- α wiederum verstärkt über den TNF- α Rezeptor die Reaktion entzündlicher Prozesse. Hsp70 reguliert die Aktivierung von NF- κ B vermutlich über die Hemmung der IKK bzw. über die Immobilisierung von NF- κ B oder durch Beeinflussung des *IKK-INTERACTING PROTEINS* (modifiziert nach Meng X & Harken AH, 2002; Yang CR et al., 2005).

Um die Mechanismen zur Wirkung des Extraktes S40cl auf das Proteom von EA.hy926 Zellen näher zu charakterisieren, wurden die mRNA-Spiegel ausgewählter Transkripte in EA.hy926 Zellen mittels RealTime-PCR untersucht. Die mRNA-Spiegel aller ausgewählten Gene waren unter Wirkung von Hcy erhöht und bei gleichzeitiger Kultivierung mit S40cl wurde der Anstieg der Expression verhindert. Auf Proteinebene war auch die Expression von *ANNEXIN II* und *CAPPING PROTEIN ALPHA* in Gegenwart von Hcy erhöht, was S40cl unterbinden konnte. Im Gegensatz dazu war die Spotintensität der Proteine *DUSP3*, *DNAK-TYPE MOLECULAR CHAPERONE* und *MATRIN 3* in Anwesenheit von Hcy reduziert und bei gleichzeitigem Angebot von S40cl wieder erhöht. Mehrere Studien haben bereits eine vergleichbare Diskordanz der mRNA-Spiegel und korrespondierenden Proteinspiegel belegt (Gygi SP, 1999; Chen G et al., 2002) und diese werden durch Einflüsse auf die Kontrolle der Proteintranslation, der Stabilität der Proteine oder Proteinmodifikationen zurückgeführt. Die hier beobachteten Unterschiede in Protein- und mRNA-Spiegel beruhen vermutlich in erster Linie auf der durch Hcy herbeigeführten Apoptose und der damit verbundenen Hydrolyse von Zielproteinen.

Auch die Exposition der Zellen gegenüber dem pro-atherosklerotischen Stressor ox-LDL führte zu Veränderungen der Expression von Proteinen, die mit der Entwicklung der Atherosklerose in einen biologischen Kontext gebracht werden können. Zu diesen gehörte beispielsweise das nukleäre *LAMIN C*. Wie auch das *LAMIN A* ist es an der Replikation der DNA, der Chromatin-Organisation, der Anordnung von Kernporen und Verankerung der Kernmembranen beteiligt (Moir R et al., 2001). In mit ox-LDL behandelten Zellen konnte der entsprechende Proteinspot nicht mehr detektiert werden, so dass man hier in der Veränderung des *LAMIN C* möglicherweise einen Marker für ox-LDL induzierte pro-atherosklerotische Läsionen sehen könnte. Die unter ox-LDL verminderten Spiegel des *SERINE/CYSTEINE PROTEINASE INHIBITORS, CLADE H* mag den schädlichen Einfluss von ox-LDL auf Endothelzellen ebenfalls zum Teil erklären, da der Verlust der Hemmung der Serine/Cysteine Proteasen zur ausgedehnten Neubildung von extrazellulärer Matrix der Arterienwand während der Atherosklerose beiträgt (Liu J et al., 2004).

Die *UBIQUINOL-CYTOCHROM-C-REDUCTASE*, ein Bestandteil des Komplex III der mitochondrialen Atmungskette, ist in den Mitochondrien, u.a. im Rattenherz, für die Bildung von ROS verantwortlich (Chen Q et al., 2003). In einer Vielzahl von Zellen ist die vermehrte Bildung von ROS in der Zelle ein essentieller Schritt zur Auslösung der Apoptose (Milovanova T et al., 2004; Robertson RP, 2004; Wenzel U et al., 2004). Die durch ox-LDL ausgelöste Zunahme der Proteinintensität der *UBIQUINOL-CYTOCHROM-C-REDUCTASE* mag daher als Indiz für eine Begünstigung der Atherosklerose durch vermehrte ROS-Bildung und Apoptose-induktion betrachtet werden.

Interessante Genistein-Wirkungen in ox-LDL-exponierten Zellen betreffen z.B. die *METHIONINE ADENOSYLTRANSFERASE REGULATORY BETA SUBUNIT*. Der Spiegel dieses Enzyms lag in ox-LDL behandelten Zellen unterhalb der Detektionsgrenze. Belegt ist, dass eine verminderte Expression der *B-UNTEREINHEIT* der *METHIONINE ADENOSYLTRANSFERASE* die intrazellulären Spiegel an S-Adenosylmethionin auf das 6-10-fache ansteigen lässt (LeGros L et al., 2001), was auf Kosten freien Adenosins erfolgt (Riksen NP et al., 2003). Die Beeinflussung der *METHIONINE ADENOSYLTRANSFERASE REGULATORY BETA SUBUNIT* führt somit zu einem Verlust an kardio- und vasoprotektivem Adenosin. Genistein konnte die durch ox-LDL verursachte Abnahme der *METHIONINE ADENOSYLTRANSFERASE REGULATORY BETA SUBUNIT* unterbinden. Die Intensität eines zweiten Proteinspots, dem ebenfalls die *METHIONINE ADENOSYLTRANSFERASE REGULATORY BETA SUBUNIT* zugeordnet werden konnte, wurde durch den Stressor ox-LDL erhöht. Genistein konnte auch dessen Veränderung verhindern. Der *pI* dieses zweiten Proteinspots war etwas niedriger im Vergleich zu dem Spot, der in Gelen mit Proteinen ox-LDL-exponierter Zellen nicht mehr detektiert werden konnte. Das deutet auf Modifikationen des Proteins wie Phosphorylierung hin, die zur

Regulierung der *METHIONINE ADENOSYLTRANSFERASE SUBUNIT* durch ox-LDL und Genistein beitragen könnten.

Ebenfalls verringert wurde unter ox-LDL-Wirkung, wie auch bereits für Hcy beschrieben, der Spiegel des *THIOREDOXIN RELATED PROTEINS*. Die Co-Inkubation mit Genistein führte ebenso wie in Hcy-gestressten Zellen zu einem Anstieg der Expression dieses Proteins. Auch dies ist ein Indiz für die pro-apoptotische Wirksamkeit von ox-LDL bzw. die effektive Hemmung der Apoptose durch Genistein auch in ox-LDL-gestressten Zellen. In gleicher Weise sind die Befunde zu veränderten Spotintensitäten mehrerer Proteine des Zytoskeletts zu werten.

Die Wirkung von ox-LDL auf Proteine wie *LAMIN B1* oder *LAMIN A* unterschied sich jedoch von der durch Hcy induzierten Veränderung dieser Proteine, was auf unterschiedliche Mechanismen der Apoptoseinduktion hinweist. *LAMIN A* konnte zwei Proteinspots (64 kDa, pI 6,5; 82 kDa, pI 6,7) zugewiesen werden, deren durch ox-LDL verringerte Proteinspiegel von Genistein wieder erhöht wurden.

GenDai beeinflusste in Gegenwart von ox-LDL weniger Proteine als Genistein alleine und darüber hinaus vollkommen andere Proteine. Die Anwesenheit von Daidzein scheint somit die Wirkung von Genistein also entscheidend zu verändern. In ähnlicher Weise wie bei Hcy konnte auch in ox-LDL-exponierten EA.hy926 Zellen der Spot des Proteins *CATHEPSIN D* nicht mehr nachgewiesen werden; GenDai konnte aber diesen Abfall des Proteins, das auch am Abbau von LDL beteiligt ist (Leake DS & Peters TJ, 1981), ebenso wie in Hcy-exponierten Zellen auch hier verhindern.

In aortischer Intima mit atherosklerotischen Läsionen ist der von Glutathion-abhängigen Enzymen vermittelte Schutz vor oxidativem Stress schwächer ausgeprägt. Daher kommt offenbar der *GLUTATHIONE-S-TRANSFERASE PI (GSTPI)* eine Schlüsselrolle im anti-oxidativen Schutz der Zellen zu (Lapenna D et al., 1998). *GSTPI* agiert als negativer Repressor von Kinasen wie der *c-Jun NH₂-terminal kinase* und nimmt somit Einfluss auf Kinase-Kaskaden, die die Stressantwort, Proliferation oder die Apoptose regulieren (Ruscoe JE et al., 2001). In ox-LDL-exponierten EA.hy926 Zellen war der Spiegel der *GSTPI* reduziert, was durch GenDai-Gabe kompensiert werden konnte. Somit könnte GenDai über die *GSTPI* in Analogie zur Wirkung von Genistein auf das *THIOREDOXIN-RELATED PROTEINS* und die MAPK Signalkaskade an der Apoptose beteiligt sein, die von GenDai ebenso effektiv verhindert werden kann wie von Genistein.

Als interessanter Befund kann die verringerte Menge der anti-atherosklerotischen *CMP-N-ACETYLNEURAMINIC ACID SYNTHASE* in ox-LDL-exponierten Zellen gewertet werden, die durch GenDai wieder erhöht wurde. Dieses Enzym katalysiert die Bildung des aktivierten Zuckernukleotids Cytidine-Monophosphate N-Acetylneuraminsäure (CMP-Neu5Ac) (Rodriguez-Aparicio LB et al., 1992), ein Substrat der Golgi-Sialyltransferasen. Die Sialyltransferasen sind für die Aktivierung der freien Sialinsäure verantwortlich (Munster AK et al., 1998), deren

Gehalt in Endothelzellen negativ mit der Aufnahme an LDL-Partikeln korreliert (Gorog P & Pearson JD, 1984). Über die erhöhten Spiegel der *CMP-N-ACETYLNEURAMINIC ACID SYNTHASE* und der damit verstärkten Synthese von Sialinsäure, könnten die Isoflavonoide somit auch die Aufnahme des pro-atherosklerotischen Stressors LDL in Endothelzellen mindern.

Der *COPROPORPHYRINOGEN OXIDASE PRECURSOR* ist an der Synthese von Porphyrinen beteiligt, die Bestandteile der Cytochrome sind. (Charalampous FC, 1974). Ox-LDL führt in Endothelzellen zu einer verstärkten ROS-Synthese (Zmijewski JW et al., 2005), die auf dem durch ox-LDL verminderten Proteinspiegel des *COPROPORPHYRINOGEN OXIDASE PRECURSORS* beruhen könnte. Eine starke ROS-Produktion löst eine endotheliale Dysfunktion aus, die zur Apoptose führt und damit die Atherosklerose begünstigt (Puddu P et al., 2005). Da GenDai die Abnahme des *COPROPORPHYRINOGEN OXIDASE PRECURSORS* in ox-LDL-behandelten Zellen zu verhindern vermochte, könnten die Isoflavonoide auch auf diesem Weg zur Prävention der Atherosklerose über eine verminderte Apoptoserate beitragen. Auch der Extrakt S40cl wirkte in gleicher Weise wie GenDai auf die *CMP-N-ACETYLNEURAMINIC ACID SYNTHASE* und den mitochondrialen *COPROPOR-PHYRINOGEN OXIDASE PRECURSOR*.

Zwei der Proteine deren durch ox-LDL bewirkte Veränderung im Spiegel durch den Extrakt S40cl unterbunden werden konnte, wurden auch durch Genistein in ox-LDL-exponierten EA.hy926 Zellen beeinflusst. *ANNEXIN II* wurde auch in ox-LDL-gestressten Zellen in einer verringerten Menge vorgefunden, was Genistein gleichermaßen wie S40cl verhindern konnte. Im Gegensatz dazu übten Genistein und der Extrakt eine sehr gegensätzliche Wirkung auf das an der Genregulation beteiligte Protein *HETEROGENOUS RIBONUCLEOPROTEIN H* aus. Beide Proteine scheinen jedoch hinsichtlich der Entstehung der Atherosklerose keine Bedeutung zu besitzen. Alle weiteren durch S40cl ausgelösten Effekte auf das Proteom von ox-LDL-exponierten EA.hy926 Zellen konnten in Anwesenheit der isolierten Isoflavonoide nicht beobachtet werden. Der Einfluss von S40cl auf die Proteinexpression von Endothelzellen scheint somit nur bedingt durch die Isoflavonoide vermittelt worden zu sein. Jedoch werden die zentralen Mechanismen der Wirkung des Extraktes S40cl auf das Proteom der EA.hy926 Zellen durch die Isoflavonoide verursacht.

Doch können auch einige Proteine, deren durch ox-LDL verursachte Intensitätsänderung nur durch den Extrakt verhindert werden konnte, mit atherosklerotischen Prozessen in Verbindung gebracht werden. Das *DNAK-TYPE MOLECULAR CHAPERONE* wird auch als *heat-shock protein 70* (Hsp70) bezeichnet (Meng X & Harken AH, 2002). Dieses Chaperon, das in EA.hy926 Zellen schon nach Kultivierung mit Hcy in einer verminderten Menge vorlag, konnte in ox-LDL-behandelten Zellen nicht mehr detektiert werden. S40cl konnte der Abnahme der Proteinmenge entgegenwirken. *In vitro* wurde gezeigt, dass *HSP70* in

Monozyten und Makrophagen und nach Verletzungen infolge ischämischer Reperfusion auch *in vivo* die TNF- α Synthese verringert (siehe Abb. 5.2, Seite 79) (Meng X & Harken AH, 2002). In Endothelzellen fördert TNF- α u.a. die Expression von Adhäsionsmolekülen, die Bildung von Zytokinen und die prokoagulierende Aktivität von Gewebefaktoren (Paleolog EM et al., 1994).

S40cl kompensiert auch die durch ox-LDL verursachte Abnahme der Spotintensität des Proteins *OXYGEN-REGULATED PROTEIN 150K (ORP150)*. Über die gesteigerte Toleranz gegenüber oxidativem Stress wirkt das Protein auf der Ebene des Endoplasmatischen Retikulums zytoprotektiv (Ozawa K et al., 1999).

Das Enzym *PLATELET ACTIVATING FACTOR ACETYLHYDROLASE (PAFAH)* setzt mittels Hydrolyse des *platelet activating factors (PAF)* inaktives lyso-PAF frei (Peplow PV, 1999). PAF ist an Entzündungsprozessen und der Thrombose beteiligt und partizipiert somit an der Entstehung der Atherosklerose (Zimmermann GA et al., 2002). *PAFAH* scheint zusätzlich eine Schutzfunktion bei Bildung und Aktivität von mild-oxidiertem LDL zu besitzen (Watson AD et al., 1995). In ox-LDL-exponierten EA.hy926 Zellen wurde sein Spiegel reduziert, was pro-atherogen wirken könnte und S40cl konnte dem Abfall des Proteinspiegels entgegenwirken.

Zwar führte der Extrakt S40cl in ox-LDL-behandelten EA.hy926 Zellen nicht zu Veränderungen von Proteinen, die in einem direkten Zusammenhang mit der Apoptose stehen, doch vermochte er ebenso wie Genistein und das Gemisch GenDai die durch ox-LDL induzierte Zunahme der Membranpermeabilität und Kernfragmentierung vollständig zu verhindern.

Wirkung der Isoflavonoide auf Endothelzellen ohne Exposition gegenüber Stressoren

Zwar konnte Genistein eine Vielzahl der Wirkungen von Hcy und ox-LDL aufheben, es zeigte aber – wenn alleine angeboten - zusätzliche und mitunter sogar zur Wirkung in Hcy- und ox-LDL-exponierten Zellen gegensätzliche Effekte. So wurden sechs Proteine von Genistein unabhängig von der An- bzw. Abwesenheit von Hcy und drei Proteine abhängig von der An- bzw. Abwesenheit von ox-LDL als reguliert vorgefunden. Eine Anzahl als pro-atherosklerotisch zu kategorisierender Proteine wurde von Genistein und den Stressoren in gleicher Weise im Spiegel verändert. Dennoch kann wohl der Einfluss von Genistein beispielsweise bei postmenopausalen Frauen in Bezug auf Atherosklerose-relevante Parameter als positiv bewertet werden, wie der Anstieg von NO-Abbauprodukten im Plasma, die Abnahme der Spiegel an Endothelin-1 und die Aufrechterhaltung der Endothel-abhängigen Vasodilatation (Squadrito F et al., 2002) belegen. Diese Wirkungen des Genisteins mögen daher als stressspezifische Effekte eingestuft werden, die sich hier bei der Proteomanalyse in ähnlicher Weise nach Hcy- oder ox-LDL-Behandlung der Endothelzellen zeigen.

Die gleichzeitige Anwesenheit von Daidzein scheint dabei die Wirkung von Genistein deutlich zu verändern, wie die vergleichenden Analysen mit dem Gemisch belegen. Die Genistein-Exposition beeinflusste signifikant mehr Proteine als GenDai und nur ein Protein, die *6-PHOSPHOGLUCONOLACTONASE* erwies sich als unabhängig von der Anwesenheit von Daidzein reguliert. Vier der von S40cl beeinflussten Proteine ließen sich auch durch Genistein in Abwesenheit der Stressoren als in ihrem Spiegel verändert identifizieren. Jedoch war die Wirkung von S40cl und Genistein nur im Falle der beiden *LAMINE A* und *C* vergleichbar: *ANNEXIN II* und die *PROBABLE THIOREDOXIN PEROXIDASE PAGA* wurden von S40cl und Genistein in entgegengesetzte Richtungen verändert. GenDai und S40cl führten jedoch gleichermaßen zu Veränderungen der Spiegel der *TRIOSEPHOSPHAT ISOMERASE 1*, des *HETEROGENOUS NUCLEAR RIBONUCLEOPROTEIN H* und des *U5 SNRNP-SPECIFIC 40 KDA PROTEIN*.

Die Mehrzahl der Proteine, die von GenDai und S40cl in gestressten EA.hy926 Zellen in ihrer Menge beeinflusst wurden, zeigten keine Änderung des Spiegels in Abwesenheit der Stressoren. GenDai und S40cl scheinen daher ebenfalls vor allem Stress-spezifische Zellantworten zu beeinflussen. Dennoch ließen sich auch einige Proteine in Abwesenheit der Stressoren als von GenDai und S40cl reguliert identifizieren, die in einen Zusammenhang mit der Atherosklerose zu bringen sind. So, die *ATP SULFURYLASE/APS KINASE 2*, die die Synthese von 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat vermittelt und an Sulfatierungen, u.a. der Proteoglykane, beteiligt ist. Wobei diese in atherosklerotisch veränderten Gefäßen in einer geringeren Menge vorgefunden werden (Pillarsetti S, 2000). Das Isoflavonoidgemisch GenDai erhöhte die Spiegel dieses Enzyms. Das *ANAPLASTIC LYMPHOMA KINASE FUSION*

PROTEIN MOESIN war in GenDai-exponierten Zellen reduziert. *MOESIN* begünstigt das Anheften von Monozyten an die Plasmamembran von Endothelzellen und somit deren Adhäsion und Migration (Thompson PW et al., 2002). S40cl verursachte darüber hinaus eine Erhöhung des nuklären *LAMIN C* und ein durch einen Polymorphismus des LMNA Gens ausgelöster Funktionsverlust von *LAMIN C* zieht wie im Falle von Lamin A Veränderungen nach sich, die zur Entwicklung einer Atherosklerose beitragen (Al-Shali KZ & Hegele RA 2004).

Genistein, das Isoflavonoidgemisch und der Extrakt S40cl üben ihre biologischen Wirkungen in Endothelzellen offenbar auf gemeinsamen sowie unterschiedlichen Wegen und über gemeinsame aber eben auch unterschiedliche Zielproteine aus. Nur wenige Proteine wurden von Genistein, dem Gemisch und dem Soja-Extrakt in gleicher Weise reguliert, dazu zählen die *CMP-N-ACETYLNEURAMINIC ACID SYNTHASE* und der *COPROPOR-PHYRINOGEN OXIDASE PRECURSOR*, deren Spiegel von GenDai und S40cl in ox-LDL-behandelten Zellen gleichsinnig verändert wurden. Der Soja-Extrakt scheint aber einige von seinem Isoflavonoidgehalt unabhängige Effekte auf atheroskleroserelevante Proteine auszuüben, die u.a. das *DNAK-TYPE MOLECULAR CHAPERONE* oder das Protein *ORP150* betreffen. Gemeinsam hatten alle geprüften Isoflavonoidzubereitungen, dass sie effektiv anti-apoptotisch auf die durch Hcy oder ox-LDL initiierte Apoptose wirkten. Zwar werden in Folge der Apoptoseinduktion einige Proteine als gleichartig und gleichsinnig von den Isoflavonoidpräparationen reguliert vorgefunden, doch lassen sich ebenso spezifische Wirkungen der einzelnen Effektoren belegen. In diesem Sinne zeigen auch die hier vorgelegten Befunde die in der Literatur vielfach dokumentierten pleiotropen Wirkungen der Isoflavonoide. Sie besitzen aber eine stressspezifische Komponente, die es gestattet, ihnen in Endothelien eine protektive Funktion zuzuschreiben.

5.2 Einfluss der Phytoöstrogene auf das Proteom humaner PBMC *in vivo*

Bei postmenopausalen Frauen nimmt die funktionelle Integrität der Arterien in einem höheren Ausmaß ab als bei gleichaltrigen Männern. Der Grund hierfür wird im Abfall der Östrogen-Spiegel im Verlauf der Menopause gesehen, die eine kardioprotektive Aktivität besitzen. So kommt es in der Menopause zu einer Reihe von markanten Veränderungen atherosklerotischer Risikoindikatoren mit einem Anstieg der Plasmaspiegel von Triglyceriden und Cholesterol, einer erhöhten fibrinolytischen Aktivität, einem verringerten Spiegel des *plasminogen activator inhibitor type 1* und einer gesteigerten Freisetzung entzündungsfördernder Zytokine, wie Interleukin-1, Interleukin-6 und TNF- α (Pfeilschiffer J et al., 2002; Walters J et al., 2003). Da die durchschnittliche Lebenserwartung von Frauen in Westeuropa 80 Jahre überschreitet und die Frauen damit ein Drittel ihres Lebens in der postmenopausalen Phase verbringen, kommt der durch die Abnahme der Östrogen-Spiegel rasch fortschreitenden Atherosklerose eine große Bedeutung zu (Pfeilschiffer J et al., 2002).

Im Rahmen der im Isoheart-Projekt vorgenommenen acht Wochen andauernden placebo-kontrollierten Supplementierung mit einem Isoflavonoid-haltigen Müsliriegel in einer Kohorte von postmenopausalen Frauen wurde das Proteom der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) von 20 Probandinnen analysiert. PBMC sind nachweislich an der Genese der Atherosklerose beteiligt (Ludewig B, Laman JD, 2004; Osiecki H, 2004), lassen sich als zirkulierende Rezeptorzellen beschreiben und können im Vergleich zu Endothelzellen mit einem geringen labortechnischen Aufwand gewonnen werden.

Im Supplementierungsarm der Studie ließ sich bei den Probandinnen bei 25 Proteinen ein Anstieg des Spiegels und bei vier Proteinen ein Abfall nachweisen. U.a. zählte *HSP70* zu den Proteinen, deren Menge nach dem Verzehr des Isoflavonoid-haltigen Riegels signifikant erhöht war. In Monozyten und Makrophagen der PBMC-Fraktion unterbindet *HSP70 in vitro* nach Stimulierung mit bakteriellen Lipopolysacchariden die Bildung von TNF- α und verringert auch *in vivo* die Synthese von TNF- α (siehe Abb. 5.2, Seite 79) (Meng X & Harken AH, 2002). TNF- α wird vor allem von Makrophagen nach ihrer Stimulation mit pro-atherogenen Faktoren sezerniert (Shioi A et al., 2002) und fördert in Endothelzellen die Bildung von Adhäsionsmolekülen (Kevil CG et al., 2004) und in glatten Muskelzellen die Aktivität der Alkalischen Phosphatase, wodurch die Kalzifizierung der Gefäße begünstigt wird (Shioi A et al., 2002). Niedrige Plasmaspiegel des *HSP70* infolge einer endothelialen Dysfunktion (Hooper PL & Hooper JJ, 2004) können als Marker für das Voranschreiten der Atherosklerose betrachtet werden (Pockley AG et al., 2003).

Der Verzehr des Isoflavonoid-haltigen Riegels beeinflusste bei den Probandinnen auch das *FLNA PROTEIN*, das auch als *FILAMIN A* bekannt ist (Robertson SP, 2004). Die erhöhten

FLNA-Spiegel könnten über die Hemmung des NF- κ B-Weges und der Kinasen der JNK/SAPK Klasse eine anti-inflammatorische Wirkung hervorrufen. So führt die Überexpression von *FILAMIN A* zu einer verminderten Aktivierung von NF- κ B und eine über den *TNF receptor-associated factor 2* vermittelte Aktivierung der *c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase* (JNK/SAPK) (Leonardi A et al., 2000). Die JNK/SAPK ist ein Mitglied der Mitogen aktivierten Kinase-Familie. Sie wird von Stressfaktoren und entzündungsfördernden Zytokinen wie Interleukin 1 und TNF- α stimuliert (Gee K et al., 2002) und ist an der Auslösung der Apoptose beteiligt (Chen YR et al., 1999). NF- κ B wiederum ist, wie bereits erläutert, in die Aktivierung der TNF- α -Produktion involviert (Meng X & Harken AH, 2002). In T Lymphozyten wird das *FLNA PROTEIN* offenbar unabhängig von Caspasen durch Granzym B gespalten (Browne KA et al., 2000). Da die Spiegel des *FLNA PROTEINS* in PBMC der postmenopausalen Frauen nach der Isoflavonoid-Intervention deutlich angestiegen waren, könnten die Isoflavonoide an einer Hemmung der Apoptose von T-Lymphozyten beteiligt sein.

Ein weiteres in den Ablauf der Apoptose eingebundenes Protein ist das *GALECTIN 1*, das zu den β -Galactosid-bindenden Proteinen gehört (Rabinovich GA et al., 1999). *GALECTIN 1* war in den PBMC unter Isoflavonoid-Gabe in seiner Menge signifikant reduziert. In aktivierten Makrophagen ist die Konzentration dieses Proteins üblicherweise erhöht, was zu Beeinflussungen des Immunsystems führt und die Apoptose aktivierter T-Zellen mit bedingt (Rabinovich GA et al., 1999; Rabinovich GA, 2000). *GALECTIN 1* vermag die Apoptose unabhängig von p53 oder Steroiden zu induzieren und ist möglicherweise in die T Zell-Rezeptor-vermittelte Apoptose ebenso involviert (Perillo NL et al., 1997).

PROHIBITIN, das vor fehlerhafter Faltung neu gebildeter Proteine schützt (Nijtmans LG et al., 2000), wurde im Isoflavonoidarm in erhöhter Menge in PBMC vorgefunden. Die fehlerhafte Faltung von Proteinen, besonders von Lipoproteinen, trägt zur Entwicklung der Atherosklerose bei (Ursini F et al., 2002). Da *PROHIBITIN* an der physiologischen Reifung von T-Zellen beteiligt ist (Dixit VT et al., 2003), lässt seine Veränderung unter Isoflavonoid-Gabe auch Effekte auf das Immunsystems erwarten.

Das 26S Proteasom besteht bekanntlich aus mehreren Einheiten und spaltet polyubiquitinierte Proteine. Seine regulatorische Untereinheit bestimmt seine ATP-Abhängigkeit und Spezifität (Ferrell K et al., 2000). Das 26S Proteasom ist über die Regulierung der NF- κ B-Aktivität an der Kontrolle von Entzündungsprozessen beteiligt (Grisham MB et al., 1999). Da die Intervention zu einem Anstieg des Spiegels der *26S PROTEASE REGULATORY SUBUNIT 8* führte, ist nicht auszuschließen, dass die Isoflavonoide auch über einen verstärkten proteolytischen Abbau von NF- κ B anti-inflammatorisch wirken.

Die *NADP+-DEPENDENT ISOCITRATE DEHYDROGENASE IDPC* war ebenfalls unter Isoflavonoid-Wirkung in den PBMC erhöht. *IDPC* ist für die Regenerierung von reduziertem Glutathion

essentiell. *In vitro* führt ein verringerter *IDPC*-Spiegel zur vermehrten Lipidperoxidation, der intrazellulären Bildung von Peroxiden und oxidativen DNA-Schäden. Ein erhöhter zellulärer Spiegel der *IDPC* führt dagegen zur verbesserten Resistenz gegenüber oxidativem Stress (Lee SM et al., 2002). Die unter Isoflavonoid-Gabe erhöhten PBMC-Spiegel der *IDPC* lassen somit ein verbessertes oxidatives Milieu in Immunzellen, wie Makrophagen, erwarten, was auch zur verminderten Bildung von Schaumzellen beitragen könnte.

Die α -*ENOLASE* ist an der Aktivierung von Plasminogen auf der Oberfläche von Leukozyten beteiligt. Die Aktivierung von Plasminogen schützt das Zell-gebundene Plasmin vor seinem Inhibitor α_2 -Antiplasmin und führt zur fortgeschrittenen proteolytischen Aktivität von Zell-gebundenem Plasmin (Lopez-Aleman R et al., 2003). Da die Fibrinolyse zum Schutz vor einer überschüssigen Fibrin-Akkumulation erforderlich ist (Walsh PN and Ahmad SS, 2002), könnten die Isoflavonoide über eine Erhöhung der Expression der α -*ENOLASE* auch anti-thrombotische Effekte ausüben.

PROTEIN TYROSIN PHOSPHATASEN gewährleisten den Phänotyp ruhender Lymphozyten und spielen im Rahmen der Beendigung der Immunantwort eine Rolle bei der Überführung von aktivierten Lymphozyten in einen ruhenden Zustand (Mustelin T et al., 2005). Die erhöhten Spiegel der *PROTEIN TYROSIN PHOSPHATASE* in PBMC postmenopausaler Frauen nach Isoflavonoid-Supplementierung, lässt auch hier auf einen Einfluss der Isoflavonoide auf das Immunsystem im Sinne der Hemmung von Entzündungsprozessen schließen.

Das Protein *CALELECTRIN*, auch als *ANNEXIN VI* oder *CALCIUM-BINDING PROTEIN P68* bekannt (Clark DM et al., 1991), ist ein Bestandteil submembranärer Komplexe des Zytoskeletts (Owens RJ et al., 1984). Im Herzen führt die Überexpression von *ANNEXIN VI* zu einer Störung der Ca^{2+} -Homöostase, was vermutlich über die Änderung der Aktivität von Ionen-Pumpen und/oder Austauschern in der Membran der Cardiomyozyten vermittelt wird (Guteski-Hamblin et al., 1996). Die erhöhten Spiegel von *CALELECTRIN* nach dem Konsum des Isoflavonoid-haltigen Riegels sind im Hinblick auf mögliche Konsequenzen für das kardiovaskuläre System ohne spezifische Kenntnis der PBMC-Subpopulation, in der diese Veränderungen stattgefunden haben, nicht zu bewerten.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in der Supplementationsphase bei den Probandinnen signifikante Änderungen im Proteom der PBMC nachweisbar waren. Zum Teil erwiesen sich einzelne Veränderungen in der Auswaschphase bzw. der Placebophase als reversibel. Unter den identifizierten Proteinen, die auf die Isoflavonoid-Gabe mit Veränderungen im zellulären Spiegel ansprachen, ließen sich einige in den Kontext der Atherogenese stellen. So lässt sich vermuten, dass die Isoflavonoide *in vivo* u.a. über *HSP70* und das *FLNA PROTEIN* anti-inflammatorisch wirken können und zu einer verminderten Synthese von Adhäsionsmolekülen beitragen. Über *GALECTIN 1* und *PROHIBITIN* könnten sie ferner anti-apoptotische Aktivität entfalten sowie über eine verminderte Bildung von

Schaumzellen (*26S PROTEASE REGULATORY SUBUNIT 8, IDPC*) und die anti-thrombotische Wirksamkeit (α -*ENOLASE*) indirekt endotheliale Veränderungen positiv beeinflussen.

6 Synopse

Die Analyse der Veränderungen in den zellulären Spiegeln von Proteinen der Endothelzellen nach Behandlung mit isoliertem Genistein sowie dem Isoflavonoidgemisch GenDai in An- und Abwesenheit der pro-atherosklerotischen Stressoren Hcy und ox-LDL ermöglichte die Identifizierung zahlreicher Zielproteine der Stressoren als auch der Isoflavonoide. Eine Vielzahl davon ließ sich pathogenetischen Prozessen der Atherogenese zuordnen und auf vermutlich anti-atherosklerotische Effekte der Isoflavonoide schließen. Abb. 6.1 zeigt einige der identifizierten Proteine im Kontext ihrer biologischen Bedeutung im Gefäßsystem und bei der Initiation und Progression der Atherosklerose.

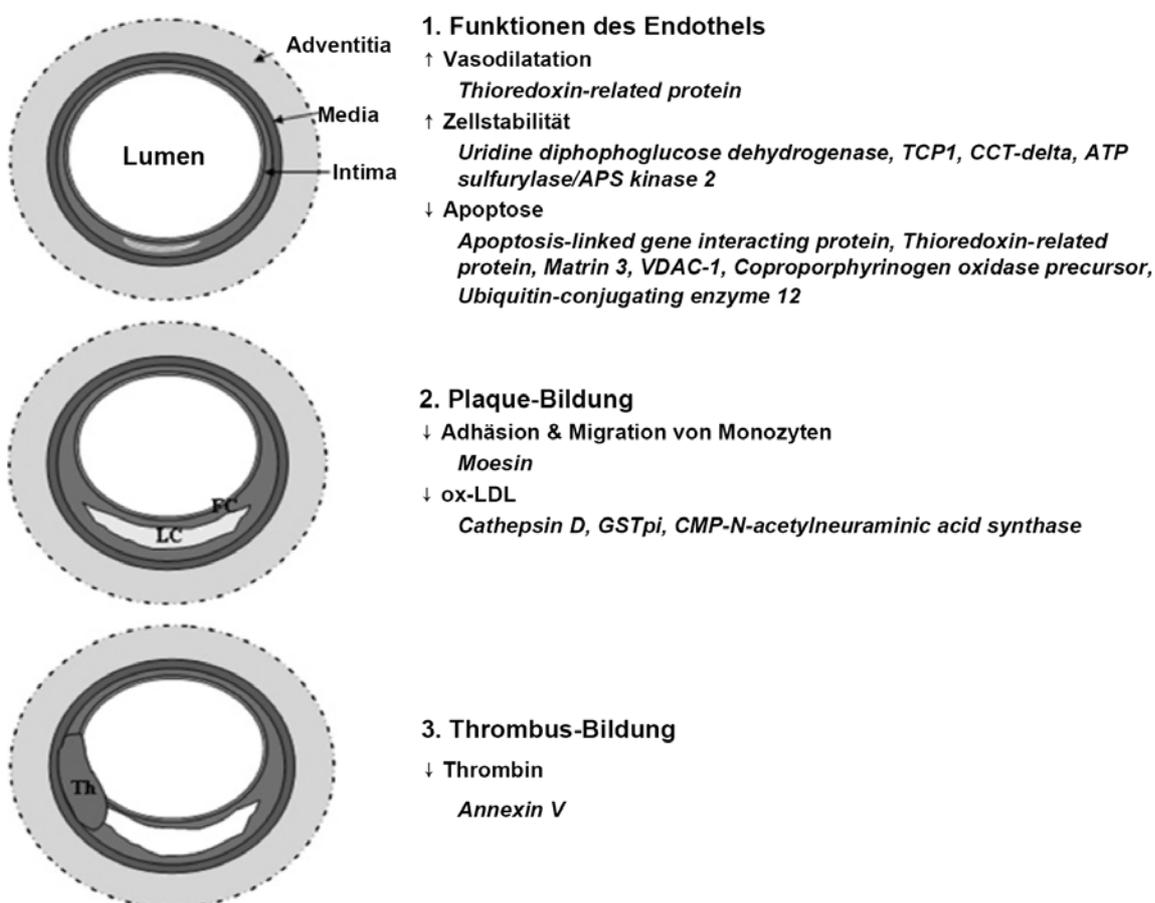


Abb. 6.1 Durch die Isoflavonoide im zellulären Spiegel veränderte Proteine und deren anzunehmende präventive Wirksamkeit im Rahmen der Atherosklerose.

An einem Querschnitt einer Arterie sind das gesunde Endothel (1) und das frühe (2) sowie späte Stadium (3) der Atherogenese dargestellt. In kursiv sind die von den Isoflavonoiden beeinflussten Proteine und die von diesen Proteinen möglicherweise ausgeübten Effekte aufgeführt. FC, Fibröse Kappe (fibrous cap); LC, Lipidkern (lipid core); Th, Thrombus.

So können die Isoflavonoide vermutlich über die verstärkte Expression des *THIOREDOXIN-RELATED PROTEIN* auf die Bildung von NO und damit vasodilatatorisch und anti-thrombotisch wirken. Die Effekte auf die Expression des *MOESINS* vermag die Adhäsion und Migration von Monozyten zu reduzieren und der Einfluss der Isoflavonoide auf die Proteine *CATHEPSIN D* und *CMP-N-ACETYLNEURAMINIC ACID SYNTHASE* könnte der Aufnahme von ox-LDL in die

Endothelzellen entgegenwirken. Die Isoflavonoide erhöhten auch den Proteinspiegel der *GSTPI*, die LDL vor Oxidation zu schützen vermag. Außerdem scheinen die Isoflavonoide über die Erhöhung des *ANNEXIN V*-Spiegels auf die Synthese von Thrombin Einfluss zu nehmen.

Nur wenige Proteine der Endothelzellen, die in Gegenwart der Isoflavonoide im Spiegel verändert waren, konnten auch mit dem Soja-Extrakt S40cl als beeinflusst identifiziert werden. Doch auch der Soja-Extrakt bedingte die Regulation von Proteinen, die in einen Zusammenhang mit der Atherosklerose gebracht werden können und auf präventive Effekte schließen lassen. Abbildung 6.2 zeigt exemplarisch dazu einige durch S40cl beeinflusste Proteine in ihrer Funktion im kardiovaskulären System.

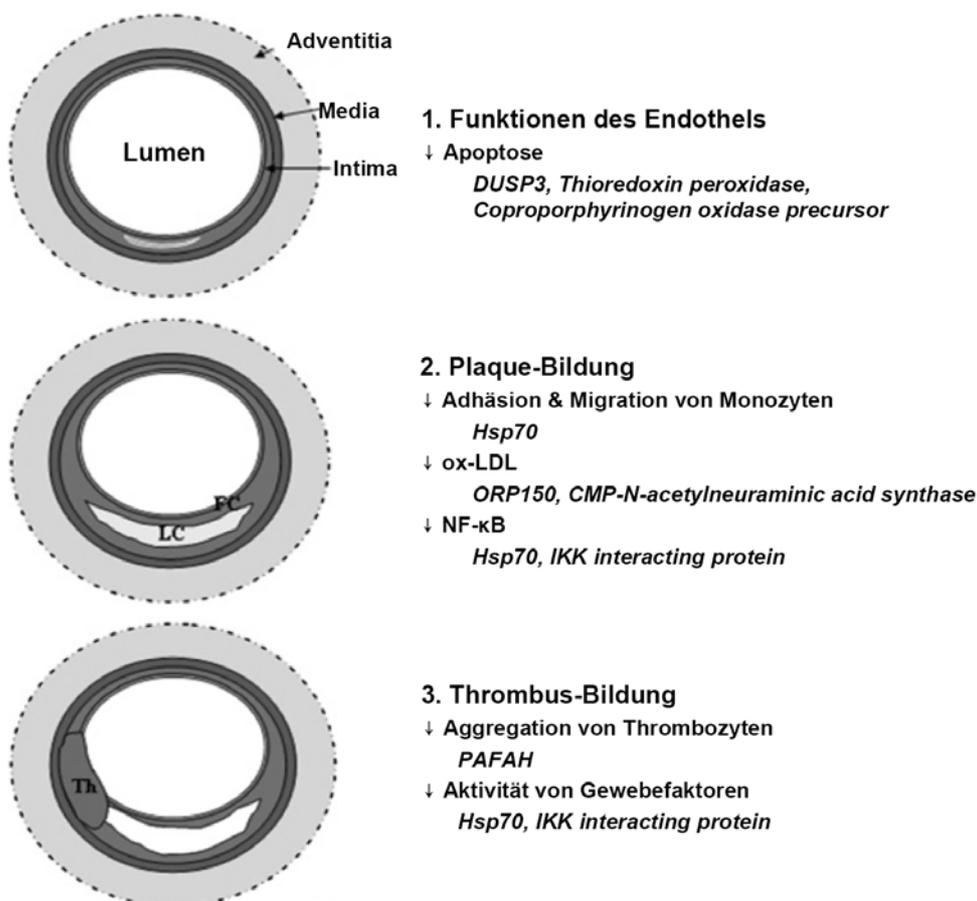


Abb. 6.2 Die vom Extrakt S40cl ausgehenden Wirkungen auf Proteinfunktionen und Mechanismen der Atheroskleroseentstehung.

An einem Querschnitt einer Arterie sind das gesunde Endothel (1) und das frühe (2) sowie späte Stadium (3) der Atherogenese dargestellt. Exemplarisch genannt sind einige der Proteine (kursiv), die durch S40cl, nicht aber durch GenDai reguliert wurden und die von diesen Proteinen vermutlich vermittelten Effekte. (siehe Abb. 6.1). FC, Fibröse Kappe (fibrous cap); LC, Lipidkern (lipid core); Th, Thrombus.

Die veränderten Spiegel der Proteine *DUSP3* und *THIOREDOXIN PEROXIDASE* weisen auf eine anti-apoptotische Wirkung von S40cl hin und somit auf einen Beitrag zum Funktionserhalt des Endothels (siehe Abb. 5.1, Seite 75). Auch S40cl könnte über die Erhöhung der Resistenz gegenüber oxidativem Stress vor der oxidativen Veränderungen der LDL-Partikel

und somit der Bildung atherosklerotischer Plaques schützen. Hier mag dem Protein *ORP150* eine besondere Bedeutung zukommen. Der Einfluss von S40cl auf die Proteine *HSP70* und *IKK INTERACTING PROTEIN* könnte eine Hemmung der NF- κ B Signalkette bedingen, die in Endothelzellen zur Bildung von Adhäsionsmolekülen, vor allem von ICAM und VCAM, und damit zur Infiltration von Makrophagen führt. Dies würde sich hemmend auf die Plaquebildung und die Entstehung von Thromben auswirken. Die durch *HSP70* und das *IKK INTERACTING PROTEIN* vermittelte Hemmung der Synthese von Adhäsionsmolekülen wird in Abbildung 5.2 (Seite 79) dargestellt. Eine zusätzliche anti-thrombotische Wirkung des Soja-Extraktes könnte von der Regulation des Enzyms *PAFAH* ausgehen und der damit verbundenen Abnahme der Aggregation von Thrombozyten (siehe Abb. 6.2, Seite 91).

Die Analyse der Apoptose in den Endothelzellen nach Exposition gegenüber den Stressoren belegte anhand erhöhter Membrandesintegration sowie Kern-Fragmentierung und Chromatin-Kondensation die Initiation und Exekution der Apoptose mit charakteristischen Veränderungen der Spiegel Apoptose-relevanter Proteine. Genistein als auch das Gemisch von Genistein und Daidzein und der Extrakt konnten effektiv der Apoptose entgegenwirken (siehe Abb. 6.1, Seite 90 & 6.2, Seite 91). Auch diese Veränderungen stehen im Einklang mit einer durch Isoflavonoide herbeigeführten höheren Widerstandskraft des Endothels gegenüber chemischen und mechanischen Noxen und somit gemäß der *response to injury* Theorie mit einem erhöhten Schutz gegenüber atherosklerotischen Veränderungen (Ross R & Glomset JA, 1973).

Aus den Befunden der humanen Interventionsstudie mit einem Isoflavonoid-haltigen Müsliriegel bei postmenopausalen Frauen lassen sich ebenso eine Reihe von Markerproteinen ableiten, die in PBMC Wirkungen der Isoflavonoide in atheroskleroserelevante Prozesse übersetzen (siehe Abb. 6.3).

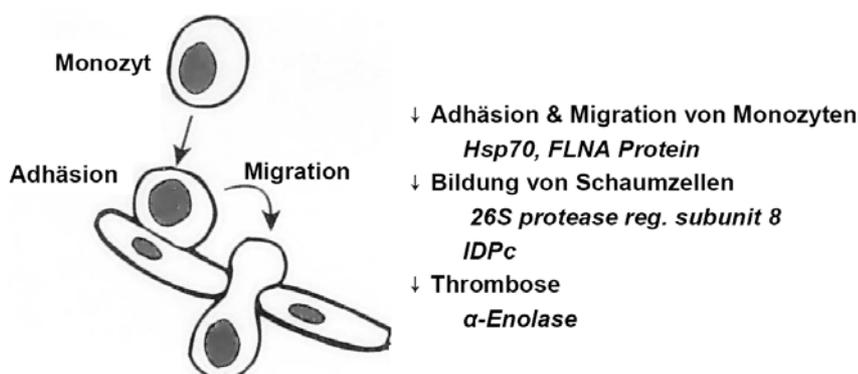


Abb. 6.3 Mechanismen und Markerproteine (kursiv) des Atherosklerosegeschehens, die im Rahmen der humanen Interventionsstudie mit einem Isoflavonoid-haltigen Müsliriegel in PBMC identifiziert werden konnten.

Zu den möglichen Mechanismen, über die die Isoflavonoide hier *in vivo* Einfluss auf die Prävention der Atherosklerose nehmen könnten, zählen Wechselwirkungen mit dem NF- κ B-Signalweg durch veränderte Spiegel des *HSP70* und *FLNA PROTEINS* in PBMC. Die Regulation von *HSP70* durch die Isoflavonoide konnte *in vitro* bereits in Endothelzellen gezeigt werden (siehe Abb. 5.2, Seite 79). Diese Veränderungen führen u.a. in Makrophagen zur Hemmung der Synthese des entzündlichen Mediators TNF- α . Isoflavonoide könnten somit der Monozytenadhäsion über die Regulation von *HSP70* sowohl in den PBMC, als auch in den Endothelzellen entgegenwirken. Das erhöhte *HSP70* geht in Endothelzellen vermutlich mit einer verminderten Bildung von Zelladhäsionsproteinen, wie dem ICAM oder VCAM, einher. In Makrophagen vermag ein Anstieg der *HSP70*-Spiegel neben der reduzierten Synthese von Zelladhäsionsproteinen auch eine Abnahme der TNF- α Transkription herbeizuführen. Weiterhin wird durch die Regulation der Intensität der *26S PROTEASE REG. SUBUNIT 8* möglicherweise die Bildung von Schaumzellen vermindert, ebenso wie die erhöhte Detoxifikation von ROS durch hohe *IDPc*-Spiegel zu einer reduzierten Bildung von Schaumzellen beitragen könnte. Die erhöhten Mengen der α -*ENOLASE* lassen auch auf eine anti-thrombotische Wirkung der Isoflavonoide *in vivo* schließen.

7 Zusammenfassung

Über 40% aller Todesfälle in Westeuropa, den USA und Australien werden der Atherosklerose und ihren Folgen zugeschrieben. Postmenopausale Frauen besitzen aufgrund der Abnahme der Östrogenspiegel ein gegenüber prämenopausalen Frauen und gleichaltrigen Männern deutlich erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen. Epidemiologische Studien lassen vermuten, dass einer hohen Aufnahme von Sojaprodukten und den darin vorkommenden Isoflavonoiden, die eine östrogene Wirkung besitzen, eine besondere protektive Funktion in der Atherosklerose zukommt.

Unter Verwendung der klassischen Gelelektrophorese kombiniert mit MALDI-TOF basierter Analyse der tryptisch generierten Peptidmassenfragmente konnten in verschiedenen experimentellen Systemen Zielproteine der Phytoöstrogene in Endothelzellen und peripheren mononukleären Zellen des Blutes identifiziert werden. Als Endothelzellmodelle dienten einerseits primäre *human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC), andererseits die EA.hy926 Zellen, die durch Fusion von HUVEC mit der Lungenkarzinom-Zelllinie A549 entwickelt wurden. Der Einfluss der Isoflavonoide wurde auf das Proteom von unbehandelten Endothelzellen, aber auch von Zellen, die mit den bekannten endothelialen Stressoren Hcy und ox-LDL kultiviert wurden, untersucht. Genistein konnte in einem Konzentrationsbereich, der im Plasma über die Nahrungszufuhr erreicht werden kann, zahlreiche der durch die endothelialen Stressoren herbeigeführten Veränderungen in Proteinspiegeln pro-atherogener Prozesse revertieren. Auch das Gemisch aus Genistein und Daidzein (GenDai) zeigte ähnliche, wenngleich nicht identische Wirkungen. Der Soja-Extrakt und auch GenDai beeinflussten die Spiegel zahlreicher Proteine, die in atherosklerotische Prozesse involviert sind, doch nur wenige Proteine wurden durch den Soja-Extrakt und GenDai gleichartig reguliert. Sowohl die isolierten Isoflavonoide als auch der Soja-Extrakt beeinflussten Proteine, die beispielweise auf eine Hemmung von Signalkaskaden zur Synthese von Adhäsionsmolekülen, der Förderung der Zellproliferation oder auf die Hemmung der Apoptose in Endothelzellen hindeuten. Es konnte schließlich auch gezeigt werden, dass die isolierten Isoflavonoide und der Soja-Extrakt die Apoptose in Endothelzellen, die in Gegenwart von Hcy oder ox-LDL stark gefördert ist, vollständig inhibieren können.

Effekte von Isoflavonoiden *in vivo* konnten durch die Proteomanalyse von PBMC im Rahmen einer Interventionsstudie am Menschen untersucht werden. Im Verlauf der Intervention im Vorhaben „Isoheart“ (EU-Projekt, QLK1-CT-2001-00221) verzehrten gesunde postmenopausale Frauen Isoflavonoid-haltige Riegel oder Placebo-Riegel. Wirkungen der Zufuhr der Isoflavonoide ließen sich im Proteom der PBMC durch charakteristische Veränderungen in den Spiegeln einzelner Proteine abbilden. Eine Reihe dieser Proteine konnte mit der Entwicklung der Atherosklerose in Zusammenhang gebracht werden, in deren Mittelpunkt eine Hemmung der Signalkaskade zur Synthese von TNF- α stehen könnte.

8 Summary

Atherosclerosis causes over 40% of all deaths in Western Europe, the USA and Australia. In particular, postmenopausal women show a high risk for cardiovascular diseases due to the decline in estrogen levels. Epidemiological studies suggest a beneficial effect of soy consumption and this is believed to be caused by the isoflavones based on their estrogenic activity.

The aim of this thesis was the identification of target proteins for phytoestrogen action *in vitro* and *in vivo* to gain insight into the molecular mechanisms underlying their potential athero-protective properties. Two *in vitro* cell culture models were employed to determine the response of endothelial cells to soy isoflavonoids and human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were used for assessing the effects of a soy-based cereal bar *in vivo*. Classical 2D-gel electrophoresis and identification of the regulated proteins via MALDI-TOF MS based peptide mass fingerprinting was used to identify the nature of regulated proteins. Besides primary endothelial cells (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC), also the endothelial cell line EA.hy926 generated by fusion of HUVEC with the lung carcinoma cell line A549 were used for determining the response of cells to the treatment with isoflavones, both in the absence or presence of the endothelial stressors Hcy and ox-LDL. Changes in steady state levels of a large number of proteins that responded to the stressors were reversed by genistein treatment at concentrations that can be achieved in plasma by dietary intervention. Moreover, the effects of a genistein/daidzein mixture (GenDai) as well as a soy extract were compared with genistein in stressed and non-stressed cells. The isoflavones and the soy extract also exerted effects on proteins that participate in signal transduction processes that control the synthesis of adhesion molecules or cell proliferation and apoptosis. As proven by increased plasma cell membrane permeability as well as increased DNA-fragmentation, both stressors elicited apoptosis in endothelial cells and isoflavones and soy extract were able to prevent apoptosis induction and execution. Whereas the soy extract and also GenDai affected the levels of many proteins with relevance to atherosclerotic processes, only few proteins were found to be regulated in common. However, the data also suggest that soy as a complex food might provide atherosclerosis preventing effects also by other mechanisms as those exerted by the isolated isoflavones.

Phytoestrogens effects *in vivo* were assessed in a human intervention trial by proteome analysis of PBMC. Within the intervention study conducted by the project "Isoheart" (EU-project QLK1-CT-2001-00221) healthy postmenopausal women consumed either an isoflavone containing cereal bars or bars that were devoid of a soy extract. The comparative analysis of the PBMC proteome identified numerous proteins involved in or related to atherogenesis that specifically responded to the dietary isoflavones.

9 Literaturverzeichnis

- Achike FI, Kwan CY (2003) Nitric oxide, human diseases and the herbal products that affect the nitric oxide signalling pathway. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **30**: 605-615.
- Adams MR, Golden DL, Franke AA, Potter SM, Smith HS, Anthony MS (2004) Dietary soy beta-conglycinin (7S globulin) inhibits atherosclerosis in mice. *J Nutr* **134**: 511-516.
- Akiyama T, Ishida J, Nakagawa S, Ogawara H, Watanabe S, Itoh N, Shibuya M, Fukami Y (1987) Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem* **262**: 5592-5595.
- Al-Shali KZ, Hegele RA (2004) Laminopathies and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**: 1591-1595.
- Anthony MS, Clarkson TB, Williams JK (1998) Effects of soy isoflavones on atherosclerosis: potential mechanisms. *Am J Clin Nutr* **68**: 1390S-1393S.
- Anthony MS (2002) Phytoestrogens and cardiovascular disease: where's the meat? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**: 1245-1247.
- Arca M, Zuliani G, Wilund K, Campagna F, Fellin R, Bertolini S, Calandra S, Ricci G, Glorioso N, Maioli M, Pintus P, Carru C, Cossu F, Cohen J, Hobbs HH (2002) Autosomal recessive hypercholesterolaemia in Sardinia, Italy, and mutations in ARH: a clinical and molecular genetic analysis. *Lancet* **359**: 841-847.
- Assmann G, Carmena R, Cullen P, Fruchart JC, Jossa F, Lewis B, Mancini M, Paoletti R (1999) Coronary heart disease: reducing the risk: a worldwide view. International Task Force for the Prevention of Coronary Heart Disease. *Circulation* **100**: 1930-1938.
- Badock V, Steinhilber U, Bommert K, Wittmann-Liebold B, Otto A (2001) Apoptosis-induced cleavage of keratin 15 and keratin 17 in a human breast epithelial cell line. *Cell Death Differ* **8**: 308-315.
- Barnes S, Boersma B, Patel R, Kirk M, Darley-Usmar VM, Kim H, Xu J (2000) Isoflavonoids and chronic disease: mechanisms of action. *Biofactors* **12**: 209-215.
- Barnes S (2004) Soy isoflavones--phytoestrogens and what else? *J Nutr* **134**: 1225S-1228S.
- Belitz HD, Grosch W, Schieberle P (2001) Lehrbuch der Lebensmittelchemie 5. Auflage Springer-Verlag, Heidelberg.
- Bicknell KA, Surry EL, Brooks G (2003) Targeting the cell cycle machinery for the treatment of cardiovascular disease. *J Pharm Pharmacol* **55**: 571-591.
- Bombeli T, Karsan A, Tait JF, Harlan JM (1997) Apoptotic vascular endothelial cells become procoagulant. *Blood* **89**: 2429-2442.
- Bouis D, Hospers GA, Meijer C, Molema G, Mulder NH (2001) Endothelium in vitro: a review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research. *Angiogenesis* **4**: 91-102.
- Branca F, Lorenzetti S (2005) Health effects of phytoestrogens. *Forum Nutr* **57**: 100-111.

- Brattstrom L, Wilcken DE (2000) Homocysteine and cardiovascular disease: cause or effect? *Am J Clin Nutr* **72**: 315-323.
- Broers JL, Bronnenberg NM, Kuijpers HJ, Schutte B, Hutchinson CJ, Ramaekers FC (2002) Partial cleavage of A-type lamins concurs with their total disintegration from the nuclear lamina during apoptosis. *Eur. J. Cell Biol.* **81**: 677-691.
- Browne KA, Johnstone RW, Jans DA, Trapani JA (2000) Filamin (280-kDa actin-binding protein) is a caspase substrate and is also cleaved directly by the cytotoxic T lymphocyte protease granzyme B during apoptosis. *J Biol Chem* **275**: 39262-39266.
- Bueno OF, De Windt LJ, Lim HW, Tymitz KM, Witt SA, Kimball TR, Molkentin JD (2001) The dual-specificity phosphatase MKP-1 limits the cardiac hypertrophic response in vitro and in vivo. *Circ Res* **88**: 88-96.
- Cassidy A, Griffin B (1999) Phyto-oestrogens: a potential role in the prevention of CHD? *Proc Nutr Soc* **58**: 193-199.
- Charalampous FC (1974) Coproporphyrin 3, inhibitor of the synthesis of cytochrome oxidase in anaerobic yeast protoplasts. *J Biol Chem* **249**: 1014-1021.
- Chase SK, Youngkin EQ (2004) Postmenopausal hormone replacement and cardiovascular disease: incorporating research into practice. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs* **33**: 648-656.
- Chatellard-Causse C, Blot B, Christina N, Torch S, Missotten M, Sadoul R (2002) Alix (Alg-2-interacting protein X), a protein involved in apoptosis, binds to endophilins and induces cytoplasmic vacuolization. *J Biol Chem* **277**: 29108-29115.
- Chen G, Gharib TG, Huang CC, Taylor JM, Misek DE, Kardina SL, Giordano TJ, Iannettoni MD, Orringer MB, Hanash SM, Beer DG (2002) Discordant protein and mRNA expression in lung adenocarcinomas. *Mol Cell Proteomics* **1**: 304-313.
- Chen J, Tung CH, Mahmood U, Ntziachristos V, Gyurko R, Fishman MC, Huang PL, Weissleder R (2002) In vivo imaging of proteolytic activity in atherosclerosis. *Circulation* **105**: 2766-2771.
- Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ (2003) Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem* **278**: 36027-36031.
- Chen Y, Ross BM, Currie RW (2004a) Heat shock treatment protects against angiotensin II-induced hypertension and inflammation in aorta. *Cell Stress Chaperones* **9**: 99-107.
- Chen Y, Arrigo AP, Currie RW (2004b) Heat shock treatment suppresses angiotensin II-induced activation of NF-kappaB pathway and heart inflammation: a role for IKK depletion by heat shock? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**: 1104-1114.
- Chen YR, Meyer CF, Tan TH (1996) Persistent activation of c-Jun N-terminal kinase 1 (JNK1) in irradiation-induced apoptosis *J Biol Chem* **271**: 631-634.
- Choy JC, Granville DJ, Hunt DW, McManus BM (2001) Endothelial cell apoptosis: biochemical characteristics and potential implications for atherosclerosis. *J Mol Cell Cardiol* **33**: 1673-1690.

- Clark DM, Moss SE, Wright NA, Crumpton MJ (1991) Expression of annexin VI (p68, 67 kDa-callectrin) in normal human tissues: evidence for developmental regulation in B- and T-lymphocytes. *Histochemistry* **96**: 405-412.
- Clarke R, Daly L, Robinson K, Naughten E, Cahalane S, Fowler B, Graham I (1991) Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. *N Engl J Med* **324**: 1149-1155.
- Clarkson TB (2002) Soy, soy phytoestrogens and cardiovascular disease. *J Nutr* **132**: 566S-569S.
- Collins P (2002) Clinical cardiovascular studies of hormone replacement therapy. *Am J Cardiol* **90**: 30F-34F.
- Cornwell T, Cohick W, Raskin I (2004) Dietary phytoestrogens and health. *Phytochemistry* **65**: 995-1016.
- Cox JS, Chapman RE, Walter P (1997) The unfolded protein response coordinates the production of endoplasmic reticulum protein and endoplasmic reticulum membrane. *Mol Biol Cell* **8**: 1805-1814.
- Crouse JR 3rd, Morgan T, Terry JG, Ellis J, Vitolins M, Burke GL (1999) A randomized trial comparing the effect of casein with that of soy protein containing varying amounts of isoflavones on plasma concentrations of lipids and lipoproteins. *Arch Intern Med* **159**: 2070-2076.
- Deetjen P, Speckmann EJ, Hescheler J (2004) Physiologie 4. Auflage Elsevier Urban & Fischer, München Jena.
- Dixit VD, Sridaran R, Edmonson MA, Taub D, Thompson WE (2003) Gonadotropin-releasing hormone attenuates pregnancy-associated thymic involution and modulates the expression of antiproliferative gene product prohibitin. *Endocrinology* **144**: 1496-1505.
- Dixon RA (2004) Phytoestrogens. *Annu Rev Plant Biol* **55**: 225-261.
- Doerrler WT, Lehmann MA (1999) Regulation of the dolichol pathway in human fibroblasts by the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 13050-13055.
- Duncan AM, Phipps WR, Kurzer MS (2003) Phyto-oestrogens. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **17**: 253-271.
- Durand P, Prost M, Blache D (1996) Pro-thrombotic effects of a folic acid deficient diet in rat platelets and macrophages related to elevated homocysteine and decreased n-3 polyunsaturated fatty acids. *Atherosclerosis* **121**: 231-243.
- Eberhardt RT, Forgione MA, Cap A, Leopold JA, Rudd MA, Trolliet M, Heydrick S, Stark R, Klings ES, Moldovan NI, Yaghoubi M, Goldschmidt-Clermont PJ, Farber HW, Cohen R, Loscalzo J (2000) Endothelial dysfunction in a murine model of mild hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest* **106**: 483-491.
- Edgell CJ, McDonald CC, Graham JB (1983) Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc Natl Acad Sci* **80**: 3734-3737.
- Elstein KH, Zucker RM (1994) Comparison of cellular and nuclear flow cytometric techniques for discriminating apoptotic subpopulations. *Exp Cell Res* **211**: 322-331.

- Engelmann HM, Alekel DL, Hanson LN, Kanthasamy AG, Reddy MB (2005) Blood lipid and oxidative stress responses to soy protein with isoflavones and phytic acid in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* **81**: 590-596.
- Ferraro A, Eufemi M, Cervoni L, Marinetti R, Turano C (1989) Glycosylated forms of nuclear lamins. *FEBS Lett* **257**: 241-246.
- Ferrell K, Wilkinson CR, Dubiel W, Gordon C (2000) Regulatory subunit interactions of the 26S proteasome, a complex problem. *Trends Biochem Sci* **25**: 83-88.
- Finkelstein JD, Martin JJ (2000) Homocysteine. *Int J Biochem Cell Biol* **32**: 385-389.
- Food and Drug Administration (1999): U.S. Department of Health and Human Services. FDA approves new health claim for soy protein and coronary heart disease. FDA talk paper 20.10.1999 <http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/tpsoypr2.html> (online 10/2004)
- Fryer RH, Wilson BD, Gubler DB, Fitzgerald LA, Rodgers GM (1993) Homocysteine, a risk factor for premature vascular disease and thrombosis, induces tissue factor activity in endothelial cells. *Arterioscler Thromb* **13**: 1327-1333.
- Gamulescu MA, Seifert K, Tingart M, Falet H, Hoffmeister KM (2003) Platelet moesin interacts with PECAM-1 (CD31). *Platelets* **14**: 211-217.
- Gardemann A, Weidemann H, Philipp M, Katz N, Tillmanns H, Hehrlein FW, Haberbosch W (1999) The TT genotype of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T gene polymorphism is associated with the extent of coronary atherosclerosis in patients at high risk for coronary artery disease. *Eur Heart J* **20**: 584-592.
- Gee K, Lim W, Ma W, Nandan D, Diaz-Mitoma F, Kozlowski M, Kumar (2002) A Differential regulation of CD44 expression by lipopolysaccharide (LPS) and TNF-alpha in human monocytic cells: distinct involvement of c-Jun N-terminal kinase in LPS-induced CD44 expression. *J Immunol* **169**: 5660-5672.
- Gerhard GT, Duell PB (1999) Homocysteine and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* **10**: 417-428.
- Gonzalez-Conejero R, Corral J, Roldan V, Martinez C, Marin F, Rivera J, Iñesta JA, Lozano ML, Marco P, Vicente V (2002) A common polymorphism in the annexin V Kozak sequence (-ic>T) increases translation efficiency and plasma levels of annexin V, and decreases the risk of myocardial infarction in young patients. *Blood* **100**: 2081-2086.
- Gonzalez-Gronow M, Kalfa T, Johnson C E, Gawdi G, Pizzo SV (2003) The voltage-dependent anion channel is a receptor for plasminogen kringle 5 on human endothelial cells. *J Biol Chem* **278**: 27312-27318.
- Gordon DJ, Rifkind BM (1989) High-density lipoprotein--the clinical implications of recent studies. *N Engl J Med* **321**: 1311-1316.
- Gorg A, Boguth G, Obermaier C, Weiss W (1998) Two-dimensional electrophoresis of proteins in an immobilized pH 4-12 gradient. *Electrophoresis* **19**: 1516-1519.
- Gorg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W (2000) The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **21**:1037-1053.
- Gorog P, Pearson JD (1984) Surface determinants of low density lipoprotein uptake by endothelial cells. *Atherosclerosis* **53**: 21-29.

- Gottstein N, Ewins BA, Eccleston C, Hubbard GP, Kavanagh IC, Minihane AM, Weinberg PD, Rimbach G (2003) Effect of genistein and daidzein on platelet aggregation and monocyte and endothelial function. *Br J Nutr* **89**: 607-616.
- Grisham MB, Palombella VJ, Elliott PJ, Conner EM, Brand S, Wong HL, Pien C, Mazzola LM, Destree A, Parent L, Adams J (1999) Inhibition of NF-kappa B activation in vitro and in vivo: role of 26S proteasome *Methods Enzymol* **300**: 345-363.
- Guicciardi ME, Gores GJ (2003) AIP1: a new player in TNF signaling. *J Clin Invest* **111**: 1813-1815.
- Gudnason V, Humphries SE (1999) Hyperhomocysteinaemia, genetics and cardiovascular disease risk. *Eur Heart J* **20**: 552-553.
- Gunteski-Hamblin AM, Song G, Walsh RA, Frenzke M, Boivin GP, Dorn GW 2nd, Kaetzel MA, Horseman ND, Dedman JR (1996) Annexin VI overexpression targeted to heart alters cardiomyocyte function in transgenic mice. *Am J Physiol* **270**: H1091-1100.
- Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R (1999) Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol* **19**: 1720-1730.
- Hajjar DP, Nicholson AC (1995) Atherosclerosis. An understanding of the cellular and molecular basis of the disease promises new approaches for its treatment in the near future. *Am Sci* **83**: 460-467.
- Hajjar KA, Mauri L, Jacovina AT, Zhong F, Mirza UA, Padovan JC, Chait BT. (1998) Tissue plasminogen activator binding to the annexin II tail domain. Direct modulation by homocysteine. *J Biol Chem* **273**: 9987-9993.
- Hajjar KA (2001) Homocysteine: a sulph'rous fire. *J Clin Invest* **107**: 663-664.
- Hanford HA, Wong CA, Kassan H, Cundiff DL, Chandel N, Underwood S, Mitchell CA, Soff GA (2003) Angiostatin(4.5)-mediated apoptosis of vascular endothelial cells. *Cancer Res* **63**: 4275-4280.
- Haque WA, Viutch F, Garg A (2002) Postmortem findings in familial partial lipodystrophy, Dunnigan variety. *Diabet Med* **19**: 1022-1025.
- Hasegawa R, Kita K, Hasegawa R, Fusejima K, Fukuzawa S, Wano C, Watanabe S, Saisho H, Masuda Y, Nomura F, Suzuki N (2003) Induction of apoptosis and ubiquitin hydrolase gene expression by human serum factors in the early phase of acute myocardial infarction. *J Lab Clin Med* **141**: 168-178.
- Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH (1955) The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* **34**: 1345-1353.
- Hegele RA, Anderson CM, Wang J, Jones DC, Cao H (2000) Association between nuclear lamin A/C R482Q mutation and partial lipodystrophy with hyperinsulinemia, dyslipidemia, hypertension, and diabetes. *Genome Res* **10**: 652-658.
- Heinecke JW (1998) Oxidants and antioxidants in the pathogenesis of atherosclerosis: implications for the oxidized low density lipoprotein hypothesis. *Atherosclerosis* **141**: 1-15.
- Hofmann MA, Lalla E, Lu Y, Gleason MR, Wolf BM, Tanji N, Ferran LJ Jr, Kohl B, Rao V, Kisiel W, Stern DM, Schmidt AM (2001) Hyperhomocysteinemia enhances vascular

- inflammation and accelerates atherosclerosis in a murine model. *J Clin Invest* **107**: 675-683.
- Holvoet P, Mertens A, Verhamme P, Bogaerts K, Beyens G, Verhaeghe R, Collen D, Muls E, Van de Werf F (2001) Circulating oxidized LDL is a useful marker for identifying patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**: 844-848.
- Hooper PL, Hooper JJ (2004) Is low-heat shock protein 70 a primary or a secondary event in the development of atherosclerosis? *Hypertension* **43**: e18-19; author reply e18-19.
- Hu H, Pierce GN, Zhong G (1999) The atherogenic effects of chlamydia are dependent on serum cholesterol and specific to *Chlamydia pneumoniae*. *J Clin Invest* **103**: 747-753.
- Huang RF, Huang SM, Lin BS, Wei JS, Liu TZ (2001) Homocysteine thiolactone induces apoptotic DNA damage mediated by increased intracellular hydrogen peroxide and caspase 3 activation in HL-60 cells. *Life Sci* **68**: 2799-2811.
- Huber J, Vales A, Mitulovic G, Blumer M, Schmid R, Witztum JL, Binder BR, Leitinger N (2002) Oxidized membrane vesicles and blebs from apoptotic cells contain biologically active oxidized phospholipids that induce monocyte-endothelial interactions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**: 101-107.
- Hutter CM, Austin MA, Humphries SE (2004) Familial hypercholesterolemia, peripheral arterial disease, and stroke: a HuGE minireview. *Am J Epidemiol* **160**: 430-435.
- Iitabe H (2002) Oxidized Low-density Lipoproteins: What is understood and what remains to be clarified. *Biol Pharm Bull* **26**: 1-9.
- Izumi T, Piskula MK, Osawa S, Obata A, Tobe K, Saito M, Kataoka S, Kubota Y, Kikuchi M (2000) Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *J Nutr* **130**: 1695-1699.
- Jacobsen DW (1998) Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease. *Clin Chem* **44**: 1833-1843.
- Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR (1973) Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* **52**: 2745-2756.
- Jaffe EA, Nachmann RL, Becker CG, Minick CR (2001) Cultiv of human endothelial cells derived from umbilical veins. *J Clin Invest* **52**: 2745-2756.
- Jenkins DJ, Kendall CW, Vidgen E, Agarwal S, Rao AV, Rosenberg RS, Diamandis EP, Novokmet R, Mehling CC, Perera T, Griffin LC, Cunnane SC (1999) Health aspects of partially defatted flaxseed, including effects on serum lipids, oxidative measures, and ex vivo androgen and progestin activity: a controlled crossover trial. *Am J Clin Nutr* **69**: 395-402.
- Jenkins DJ, Kendall CW, Jackson CJ, Connelly PW, Parker T, Faulkner D, Vidgen E, Cunnane SC, Leiter LA, Josse RG (2002) Effects of high- and low-isoflavone soyfoods on blood lipids, oxidized LDL, homocysteine, and blood pressure in hyperlipidemic men and women. *Am J Clin Nutr* **76**: 365-372.
- Jialal I (1998) Evolving lipoprotein risk factors: lipoprotein(a) and oxidized low density lipoprotein. *Clin Chem* **44**: 1827-1832.

- Kanani PM, Sinkey CA, Browning RL, Allaman M, Knapp HR, Haynes WG (1999) Role of oxidant stress in endothelial dysfunction produced by experimental hyperhomocyst(e)inemia in humans. *Circulation* **100**: 1161-1168.
- Kapiotis S, Hermann M, Held I, Seelos C, Ehringer H, Gmeiner BM (1997) Genistein, the dietary-derived angiogenesis inhibitor, prevents LDL oxidation and protects endothelial cells from damage by atherogenic LDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**: 2868-2874.
- Kevil CG, Pruitt H, Kavanagh TJ, Wilkerson J, Farin F, Moellering D, Darley-Usmar VM, Bullard DC, Patel RP (2004) Regulation of endothelial glutathione by ICAM-1: implications for inflammation. *FASEB J* **18**: 1321-1323.
- Kokame K, Kato H, Miyata T (1996) Homocysteine-respondent genes in vascular endothelial cells identified by differential display analysis. GRP78/BiP and novel genes. *J Biol Chem* **271**: 29659-29665.
- Kokame K, Agarwala KL, Kato H, Miyata T (2000) Herp, a new ubiquitin-like membrane protein induced by endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* **275**: 32846-32853.
- Kronenberg F, Kronenberg MF, Kiechl S, Trenkwalder E, Santer P, Oberhollenzer F, Egger G, Utermann G, Willeit J (1999) Role of lipoprotein(a) and apolipoprotein(a) phenotype in atherogenesis: prospective results from the Bruneck study. *Circulation* **100**: 1154-1160.
- Kubota H (2002) Function and regulation of cytosolic molecular chaperone CCT. *Vitam Horm* **5**: 313-331.
- Kugiyama K, Ota Y, Takazoe K, Moriyama Y, Kawano H, Miyao Y, Sakamoto T, Soejima H, Ogawa H, Doi H, Sugiyama S, Yasue H (1999) Circulating levels of secretory type II phospholipase A(2) predict coronary events in patients with coronary artery disease. *Circulation* **100**: 1280-1284.
- Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA (1998) Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* **139**: 4252-4263.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lang D, Kredan MB, Moat SJ, Hussain SA, Powell CA, Bellamy MF, Powers HJ, Lewis MJ (2000) Homocysteine-induced inhibition of endothelium-dependent relaxation in rabbit aorta: role for superoxide anions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**: 422-427.
- Langheinrich AC, Bohle RM (2005) Atherosclerosis: humoral and cellular factors of inflammation. *Virchows Arch* **446**: 101-111. Epub 2005 Feb 2.
- Lapenna DF, de Gioia S, Ciofani G, Mezzetti A, Uchino S, Calafiore AM, Napolitano AM, Di Ilio C, Cuccurullo F (1998) Glutathione-related antioxidant defenses in human atherosclerotic plaques. *Circulation* **97**: 1930-1934.
- Lawrence de Koning AB, Werstuck GH, Zhou J, Austin RC (2003) Hyperhomocysteinemia and its role in the development of atherosclerosis. *Clin Biochem* **36**: 431-441.
- Leake DS, Peters TJ (1981) Proteolytic degradation of low density lipoproteins by arterial smooth muscle cells: the role of individual cathepsins. *Biochim Biophys Acta* **664**: 108-116.

- Leasuskaite V, Ivanoviene L, Valanciute A (2003) Programmed cellular death and atherogenesis: from molecular mechanisms to clinical aspects. *Medicina* **39**: 529-534.
- Lee SM, Koh HJ, Park DC, Song BJ, Huh TL, Park JW (2002) Cytosolic NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase status modulates oxidative damage to cells. *Free Radic Biol Med* **32**: 1185-1196.
- LeGros L, Halim AB, Chamberlin ME, Geller A, Kotb M (2001) Regulation of the human MAT2B gene encoding the regulatory beta subunit of methionine adenosyltransferase, MAT II. *J Biol Chem* **276**: 24918-24924.
- Lentz SR, Sadler JE (1991) Inhibition of thrombomodulin surface expression and protein C activation by the thrombogenic agent homocysteine. *J Clin Invest* **88**: 1906-1914.
- Lentz SR, Malinow MR, Piegors DJ, Bhopatkar-Teredesai M, Faraci FM, Heistad DD (1997) Consequences of hyperhomocyst(e)inemia on vascular function in atherosclerotic monkeys. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**: 2930-2934.
- Lentz SR, Piegors DJ, Malinow MR, Heistad DD (2001) Supplementation of atherogenic diet with B vitamins does not prevent atherosclerosis or vascular dysfunction in monkeys. *Circulation* **103**: 1006-1011.
- Leonardi A, Ellinger-Ziegelbauer H, Franzoso G, Brown K, Siebenlist U (2000) Physical and functional interaction of filamin (actin-binding protein-280) and tumor necrosis factor receptor-associated factor 2. *J Biol Chem* **275**: 271-278.
- Libby P (2000) Changing concepts of atherogenesis. *J Intern Med* **247**: 349-358.
- Lichtenstein AH (1998) Soy protein, isoflavones and cardiovascular disease risk. *J Nutr* **128**: 1589-1592.
- Littlewood TD, Bennett MR (2003) Apoptotic cell death in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* **14**: 469-475.
- Liu J, Sukhova GK, Sun JS, Xu WH, Libby P, Shi GP (2004) Lysosomal cysteine proteases in atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **24**: 1359-1366.
- Löffler G, Petrides PE (2003) Biochemie und Pathobiochemie 7. Auflage Springer-Verlag, Berlin.
- Lopez-Alemany R, Longstaff C, Hawley S, Mirshahi M, Fabregas P, Jardi M, Merton E, Miles LA, Felez J (2003) Inhibition of cell surface mediated plasminogen activation by a monoclonal antibody against alpha-Enolase. *Am J Hematol* **72**: 234-242.
- Ludewig B, Laman JD (2004) The in and out of monocytes in atherosclerotic plaques: Balancing inflammation through migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 11529-11530.
- Lusis AJ (2000) Atherosclerosis. *Nature* **407**: 233-241.
- Lussow AR, Barrios C, van Embden J, Van der Zee R, Verdini AS, Pessi A, Louis JA, Lambert PH, Del Giudice G (1991) Mycobacterial heat-shock proteins as carrier molecules. *Eur J Immunol* **21**: 2297-2302.
- Lynch SM, Frei B (1997) Physiological thiol compounds exert pro- and anti-oxidant effects, respectively, on iron- and copper-dependent oxidation of human low-density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta* **1345**: 215-221.

- Ma K, Vattem KM, Wek RC (2002) Dimerization and release of molecular chaperone inhibition facilitate activation of eukaryotic initiation factor-2 kinase in response to endoplasmic reticulum stress. *J Biol Chem* **277**: 18728-18735. Epub 2002 Mar 20.
- Maas AH (2004) The lost promise of hormone replacement therapy and heart disease. *Semin Vasc Med* **4**: 135-144.
- Majors A, Ehrhart LA, Pezacka EH (1997) Homocysteine as a risk factor for vascular disease. Enhanced collagen production and accumulation by smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**: 2074-2081.
- Majors AK, Sengupta S, Jacobsen DW, Pyeritz RE (2002) Upregulation of smooth muscle cell collagen production by homocysteine-insight into the pathogenesis of homocystinuria. *Mol Genet Metab* **76**: 92-99.
- Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C (2005) Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* **81**: 230S-242S.
- Maxwell SR (1998) Women and heart disease. *Basic Res Cardiol* **93**: 79-84.
- McCrohon JA, Woo KS, Celermajer DS (2000) A comparison of endothelial function in Caucasian and Chinese women before and after the menopause. *Maturitas* **35**: 31-37.
- McCully KS (1996) Homocysteine and vascular disease. *Nat Med* **2**: 386-389.
- McNeill DA, Ali PS, Song YS (1985) Mineral analyses of vegetarian, health, and conventional foods: magnesium, zinc, copper, and manganese content. *J Am Diet Assoc* **85**: 569-572.
- Medina MA, Amores-Sánchez MI (2000) Genetic basis of hyperhomocysteinemia. *Mol Genet Metab* **71**: 478-480.
- Meilhac O, Escargueil-Blanc I, Thiers JC, Salvayre R, Negre-Salvayre A (1999) Bcl-2 alters the balance between apoptosis and necrosis, but does not prevent cell death induced by oxidized low density lipoproteins. *FASEB J* **13**: 485-494.
- Meng X, Harken AH (2002) The interaction between Hsp70 and TNF-alpha expression: a novel mechanism for protection of the myocardium against post-injury depression. *Shock* **17**: 345-353.
- Mercie P, Garnier O, Lascoste L, Renard M, Closse C, Durrieu F, Marit G, Boisseau RM, Belloc F (2000) Homocysteine-thiolactone induces caspase-independent vascular endothelial cell death with apoptotic features. *Apoptosis* **5**: 403-411.
- Merz-Demlow BE, Duncan AM, Wangen KE, Xu X, Carr TP, Phipps WR, Kurzer MS (2000) Soy isoflavones improve plasma lipids in normocholesterolemic, premenopausal women. *Am J Clin Nutr* **71**: 1462-1469.
- Messina MJ (1999) Legumes and soybeans: overview of their nutritional profiles and health effects. *Am J Clin Nutr* **70**: 439S-450S.
- Metzler B, Hu Y, Dietrich H, Xu Q (2000) Increased expression and activation of stress-activated protein kinases/c-Jun NH(2)-terminal protein kinases in atherosclerotic lesions coincide with p53. *Am J Pathol* **156**: 1875-1886.

- Mikkola TS, Clarkson TB (2002) Estrogen replacement therapy, atherosclerosis, and vascular function. *Cardiovasc Res* **53**: 605-619.
- Milovanova T, Manevich Y, Haddach A, Chatterjee S, Moore JS, Fisher AB (2004) Endothelial cell proliferation associated with abrupt reduction in shear stress is dependent on reactive oxygen species. *Antioxid Redox Signal* **6**: 245-258.
- Moir RD, Spann TP (2001) The structure and function of nuclear lamins: implications for disease. *Cell Mol Life Sci* **58**: 1748-1757.
- Munster AK, Eckhardt M, Potvin B, Muhlenhoff M, Stanley P, Gerardy-Schahn R (1998) Mammalian cytidine 5'-monophosphate N-acetylneuraminic acid synthetase: a nuclear protein with evolutionarily conserved structural motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 9140-9145.
- Mustelin T, Vang T, Bottini N (2005) Protein tyrosine phosphatases and the immune response. *Nat Rev Immunol* **5**: 43-57.
- Nagata C, Takatsuka N, Kurisu Y, Shimizu H (1998) Decreased serum total cholesterol concentration is associated with high intake of soy products in Japanese men and women. *J Nutr* **128**: 209-213.
- Nakamura M, Zhou XZ, Kishi S, Lu KP (2002) Involvement of the telomeric protein Pin2/TRF1 in the regulation of the mitotic spindle. *FEBS Lett* **514**: 193-198.
- Napoli C, Quehenberger O, De Nigris F, Abete P, Glass CK, Palinski W (2000) Mildly oxidized low density lipoprotein activates multiple apoptotic signaling pathways in human coronary cells. *FASEB J* **14**: 1996-2007.
- Nathan L, Chaudhuri G (1997) Estrogens and atherosclerosis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **37**: 477-515.
- Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA, et al. (1995) Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature* **376**: 37-43.
- Nijtmans LG, de Jong L, Artal Sanz M, Coates PJ, Berden JA, Back JW, Muijsers AO, van der Spek H, Grivell LA (2000) Prohibitins act as a membrane-bound chaperone for the stabilization of mitochondrial proteins. *EMBO J* **19**: 2444-2451.
- Nonaka H, Tsujino T, Watari Y, Emoto N, Yokoyama M (2001) Taurine prevents the decrease in expression and secretion of extracellular superoxide dismutase induced by homocysteine: amelioration of homocysteine-induced endoplasmic reticulum stress by taurine. *Circulation* **104**: 1165-1170.
- Nygaard O, Nordrehaug JE, Refsum H, Ueland PM, Farstad M, Vollset SE. (1997) Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* **337**: 230-236.
- Osiecki H (2004) The role of chronic inflammation in cardiovascular disease and its regulation by nutrients. *Altern Med Rev* **9**: 32-53.
- Ososki AL, Kennelly EJ (2003) Phytoestrogens: a review of the present state of research. *Phytother Res* **17**: 845-869.

- Outinen PA, Sood SK, Liaw PC, Sarge KD, Maeda N, Hirsh J, Ribau J, Podor TJ, Weitz JI, Austin RC (1998) Characterization of the stress-inducing effects of homocysteine. *Biochem J* **332**: 213-221.
- Owens RJ, Gallagher CJ, Crumpton MJ (1984) Cellular distribution of p68, a new calcium-binding protein from lymphocytes. *EMBO J* **3**: 945-952.
- Ozawa K, Kuwabara K, Tamatani M, Takatsuji K, Tsukamoto Y, Kaneda S, Yanagi H, Stern DM, Eguchi Y, Tsujimoto Y, Ogawa S, Tohyama M (1999) 150-kDa oxygen-regulated protein (ORP150) suppresses hypoxia-induced apoptotic cell death *J Biol Chem* **274**: 6397-6404.
- Paleolog EM, Delasalle SA, Buurman WA, Feldmann M (1994) Functional activities of receptors for tumor necrosis factor-alpha on human vascular endothelial cells. *Blood* **84**: 2578-2590.
- Peli J, Schroter M, Rudaz C, Hahne M, Meyer C, Reichmann E, Tschopp J (1999) Oncogenic Ras inhibits Fas ligand-mediated apoptosis by downregulating the expression of Fas. *EMBO J* **18**: 1824-1831.
- Peplow PV (1999) Regulation of platelet-activating factor (PAF) activity in human diseases by phospholipase A2 inhibitors, PAF acetylhydrolases, PAF receptor antagonists and free radical scavengers. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **61**: 65-82.
- Perillo NL, Uittenbogaart CH, Nguyen JT, Baum LG (1997) Galectin-1, an endogenous lectin produced by thymic epithelial cells, induces apoptosis of human thymocytes. *J Exp Med* **185**: 1851-1858.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Real-time expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* **30**: e36.
- Pfeilschifter J, Koditz R, Pfohl M, Schatz H (2002) Changes in proinflammatory cytokine activity after menopause. *Endocr Rev* **23**: 90-119.
- Pillarsetti S (2000) Lipoprotein modulation of subendothelial heparan sulfate proteoglycans (perlecan) and atherogenicity. *Trends Cardiovasc Med* **10**: 60-65.
- Pino I, Pio R, Toledo G, Zabalegui N, Vicent S, Rey N, Lozano MD, Torre W, Garcia-Foncillas J, Montuenga LM (2003) Altered patterns of expression of members of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) family in lung cancer. *Lung Cancer* **41**: 131-143.
- Pockley AG, Georgiades A, Thulin T, de Faire U, Frostegard J (2003) Serum heat shock protein 70 levels predict the development of atherosclerosis in subjects with established hypertension. *Hypertension* **42**: 235-238.
- Poddar R, Sivasubramanian N, DiBello PM, Robinson K, Jacobsen DW (2001) Homocysteine induces expression and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in human aortic endothelial cells: implications for vascular disease. *Circulation* **103**: 2717-2723.
- Potter SM (1995) Overview of proposed mechanisms for the hypocholesterolemic effect of soy. *J Nutr* **125**: 606S-611S.

- Potter SM, Baum JA, Teng H, Stillman RJ, Shay NF, Erdman JW Jr (1998) Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* **68**: 1375S-1379S.
- Puddu P, Puddu GM, Galletti L, Cravero E, Muscari A (2005) Mitochondrial dysfunction as an initiating event in atherogenesis: a plausible hypothesis. *Cardiology* **103**: 137-141.
- Rabinovich GA, Riera CM, Sotomayor CE (1999) Galectin-1, an alternative signal for T cell death, is increased in activated macrophages. *Braz J Med Biol Res* **32**: 557-567.
- Rabinovich GA (2000) Apoptosis as a target for gene therapy in rheumatoid arthritis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **95**: 225-233.
- Rayssiguier Y (1984) Role of magnesium and potassium in the pathogenesis of arteriosclerosis. *Magnesium* **3**: 226-238.
- Rathel TR, Leikert JF, Vollmar AM, Dirsch VM (2005) The soy isoflavone genistein induces a late but sustained activation of the endothelial nitric oxide-synthase system in vitro. *Br J Pharmacol* **144**: 394-399.
- Riksen NP, Rongen GA, Blom HJ, Russel FG, Boers GH, Smits P (2003) Potential role for adenosine in the pathogenesis of the vascular complications of hyperhomocysteinemia. *Cardiovasc Res* **59**: 271-276.
- Rimbach G, Saliou C, Canali R, Virgili F (2001) Interaction between cultured endothelial cells and macrophages: in vitro model for studying flavonoids in redox-dependent gene expression. *Meth Enzymol* **335**: 238-242.
- Rimbach G, Weinberg PD, de Pascual-Teresa S, Alonso MG, Ewins BA, Turner R, Miniñane AM, Botting N, Fairley B, Matsugo S, Uchida Y, Cassidy A (2004) Sulfation of genistein alters its antioxidant properties and its effect on platelet aggregation and monocyte and endothelial function. *Biochim Biophys Acta* **1670**: 229-237.
- Robertson RP (2004) Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J Biol Chem* **279**: 42351-42354.
- Robertson SP (2004) Molecular pathology of filamin A: diverse phenotypes, many functions. *Clin Dysmorphol* **13**: 123-131.
- Rocques PJ, Clark J, Ball S, Crew J, Gill S, Christodoulou Z, Borts RH, Louis EJ, Davies KE, Cooper CS (1995) The human SB1.8 gene (DXS423E) encodes a putative chromosome segregation protein conserved in lower eukaryotes and prokaryotes. *Hum Mol Genet* **4**: 243-249.
- Rodgers GM, Kane WH (1986) Activation of endogenous factor V by a homocysteine-induced vascular endothelial cell activator. *J Clin Invest* **77**: 1909-1916.
- Rodgers GM, Conn MT (1990) Homocysteine, an atherogenic stimulus, reduces protein C activation by arterial and venous endothelial cells. *Blood* **75**: 895-901.
- Rodriguez-Aparicio LB, Luengo JM, Gonzalez-Clemente C, Reglero A (1992) Purification and characterization of the nuclear cytidine 5'-monophosphate N-acetylneuraminic acid synthetase from rat liver. *J Biol Chem* **267**: 9257-9263.
- Ron D (2001) Hyperhomocysteinemia and function of the endoplasmic reticulum. *J Clin Invest* **107**: 1221-1222.

- Ross R, Glomset JA (1973) Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science* **180**: 1332-1339.
- Ross R (1995) Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol* **57**: 791-804.
- Rusco JE, Rosario LA, Wang T, Gate L, Arifoglu P, Wolf CR, Henderson CJ, Ronai Z, Tew KD (2001) Pharmacologic or genetic manipulation of glutathione S-transferase P1-1 (GSTpi) influences cell proliferation pathways. *J Pharmacol Exp Ther* **298**: 339-345.
- Salvayre R, Auge N, Benoist H, Negre-Salvayre A (2002) Oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis. *Biochim Biophys Acta* **1585**: 213-221.
- Sanders TA, Dean TS, Grainger D, Miller GJ, Wiseman H (2002) Moderate intakes of intact soy protein rich in isoflavones compared with ethanol-extracted soy protein increase HDL but do not influence transforming growth factor beta(1) concentrations and hemostatic risk factors for coronary heart disease in healthy subjects. *Am J Clin Nutr* **76**: 373-377.
- Selhub J (1999) Homocysteine metabolism. *Annu Rev Nutr* **19**: 217-246.
- Setchell KD, Brown NM, Desai P, Zimmer-Nechemias L, Wolfe BE, Brashear WT, Kirschner AS, Cassidy A, Heubi JE (2001) Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *J Nutr* **131**: 1362S-1375S.
- Setchell KD, Brown NM, Zimmer-Nechemias L, Brashear WT, Wolfe BE, Kirschner AS, Heubi JE (2002) Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *Am J Clin Nutr* **76**: 447-453.
- Shackleton S, Lloyd DJ, Jackson SN, Evans R, Niermeijer MF, Singh BM, Schmidt H, Brabant G, Kumar S, Durrington PN, Gregory S, O'Rahilly S, Trembath RC (2000) LMNA, encoding lamin A/C, is mutated in partial lipodystrophy. *Nat Genet* **24**: 153-156.
- Shao LE, Tanaka T, Gribi R, Yu J (2002) Thioredoxin-related regulation of NO/NOS activities. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **962**: 140-150.
- Shimokado K, Yokota T, Umezawa K, Sasaguri T, Ogata J (1994) Protein tyrosine kinase inhibitors inhibit chemotaxis of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb* **14**: 973-981.
- Shimokado K, Umezawa K, Ogata J (1995) Tyrosine kinase inhibitors inhibit multiple steps of the cell cycle of vascular smooth muscle cells. *Exp Cell Res* **220**: 266-273.
- Shioi A, Katagi M, Okuno Y, Mori K, Jono S, Koyama H, Nishizawa Y (2002) Induction of bone-type alkaline phosphatase in human vascular smooth muscle cells: roles of tumor necrosis factor-alpha and oncostatin M derived from macrophages. *Circ Res* **91**: 9-16.
- Sidhu GS, Oakenfull DG (1986) A mechanism for the hypocholesterolaemic activity of saponins. *Br J Nutr* **55**: 643-649.
- Squadrito F, Altavilla D, Morabito N, Crisafulli A, D'Anna R, Corrado F, Ruggeri P, Campo GM, Calapi G, Caputi AP, Squadrito G (2002) The effect of the phytoestrogen genistein on plasma nitric oxide concentrations, endothelin-1 levels and endothelium dependent vasodilation in postmenopausal women. *Atherosclerosis* **163**: 339-347.

- Sriburi R, Jackowski S, Mori K, Brewer JW (2004) XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **167**: 35-41. Epub 2004 Oct 4.
- Stastny JJ, Fosslie E (1992) Quantitative alteration of some aortic intima proteins in fatty streaks and fibro-fatty lesions. *Exp. Mol. Pathol.* **57**: 205-214.
- Steinberg FM, Guthrie NL, Villablanca AC, Kumar K, Murray MJ (2003) Soy protein with isoflavones has favorable effects on endothelial function that are independent of lipid and antioxidant effects in healthy postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* **78**: 123-130.
- Stipanuk MH (2000) Biochemical and Physiological Aspects of Human Nutrition. W.B.Saunders Company, Philadelphia.
- Stoneman VE, Bennett MR (2004) Role of apoptosis in atherosclerosis and its therapeutic implications. *Clin Sci (Lond)* **107**: 343-354.
- Suhara T, Fukuo K, Yasuda O, Tsubakimoto M, Takemura Y, Kawamoto H, Yokoi T, Mogi M, Kaimoto T, Ogihara T (2004) Homocysteine enhances endothelial apoptosis via upregulation of Fas-mediated pathways. *Hypertension* **43**: 1208-1213.
- Sytkowski PA, Kannel WB, D'Agostino RB (1990) Changes in risk factors and the decline in mortality from cardiovascular disease. The Framingham Heart Study. *N Engl J Med* **322**: 1635-1641.
- Takano-Ishikawa Y, Goto M, Yamaki K (2003) Inhibitory effects of several flavonoids on E-selectin expression on human umbilical vein endothelial cells stimulated by tumor necrosis factor-alpha. *Phytother Res* **17**: 1224-1227.
- Tawakol A, Omland T, Gerhard M, Wu JT, Creager MA (1997) Hyperhomocyst(e)inemia is associated with impaired endothelium-dependent vasodilation in humans. *Circulation* **95**: 1119-1121.
- Thompson PW, Randi AM, Ridley AJ (2002) Intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, but not ICAM-2, activates RhoA and stimulates c-fos and rhoA transcription in endothelial cells. *J. Immunol.* **169**: 1007-1013.
- Thornhill MH, Li J, Haskard DO (1993) Leucocyte endothelial cell adhesion: a study comparing human umbilical vein endothelial cells and the endothelial cell line EA-hy-926. *Scand J Immunol* **38**: 279-286.
- Tikkanen MJ, Wahala K, Ojala S, Vihma V, Adlercreutz H (1998) Effect of soybean phytoestrogen intake on low density lipoprotein oxidation resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 3106-3110.
- Till U (1999) Pathophysiologie/Pathobiochemie systematisch. 1. Auflage UNI-MED Verlag AG, Bremen. S 255.
- Tonstad S, Smerud K, Hoie L (2002) A comparison of the effects of 2 doses of soy protein or casein on serum lipids, serum lipoproteins, and plasma total homocysteine in hypercholesterolemic subjects. *Am J Clin Nutr* **76**: 78-84.
- Tsai JC, Perrella MA, Yoshizumi M, Hsieh CM, Haber E, Schlegel R, Lee ME (1994) Promotion of vascular smooth muscle cell growth by homocysteine: a link to atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 6369-6373.

- Tunstall-Pedoe H, Kuulasmaa K, Amouyel P, Arveiler D, Rajakangas AM, Pajak A (1994) Myocardial infarction and coronary deaths in the World Health Organization MONICA Project. Registration procedures, event rates, and case-fatality rates in 38 populations from 21 countries in four continents. *Circulation* **90**: 583-612.
- Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Andersson A, Allen RH (1993) Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. *Clin Chem* **39**: 1764-1779.
- Ueland PM, Refsum H, Beresford SA, Vollset SE. (2000) The controversy over homocysteine and cardiovascular risk. *Am J Clin Nutr* **72**: 324-332.
- Ursini F, Davies KJ, Maiorino M, Parasassi T, Sevanian A (2002) Atherosclerosis: another protein misfolding disease? *Trends Mol Med* **8**: 370-374.
- Valachovicova T, Slivova V, Sliva D (2004) Cellular and physiological effects of soy flavonoids. *Mini Rev Med Chem* **4**: 881-887.
- Van Heerde WI, Poort S, van't Veer C, Reutelingsperger CP, de Groot PG (1994) Binding of recombinant annexin V to endothelial cells: effect of annexin V binding on endothelial-cell-mediated thrombin formation. *Biochem J* **302**: 305-312.
- Van Leeuwen EB, Veenstra R, van Wijk R, Molema G, Hoekstra A, Ruiters MH, van der Meer J (2000) Characterization of immortalized human umbilical and iliac vein endothelial cell lines after transfection with SV40 large T-antigen. *Blood Coagul Fibrinolysis* **11**:15-25.
- Vieira O, Escargueil-Blanc I, Jurgens G, Borner C, Almeida L, Salvayre R, Negre-Salvayre A (2000) Oxidized LDLs alter the activity of the ubiquitin-proteasome pathway: potential role in oxidized LDL-induced apoptosis. *FASEB J* **14**: 532-542.
- Virgili F, Ambra R, Muratori F, Natella F, Majewicz J, Minihane AM, Rimbach G (2003) Effect of oxidized low-density lipoprotein on differential gene expression in primary human endothelial cells. *Antiox Redox Signal* **5**: 237-247.
- Wadhwa R, Takano S, Robert M, Yoshida A, Nomura H, Reddel RR, Mitsui Y, Kaul SC (1998) Inactivation of tumor suppressor p53 by mot-2, a hsp70 family member. *J Biol Chem* **273**: 29586-29591.
- Wagner JD, Zhang L, Greaves KA, Shadoan MK, Schwenke DC (2000) Soy protein reduces the arterial low-density lipoprotein (LDL) concentration and delivery of LDL cholesterol to the arteries of diabetic and nondiabetic male cynomolgus monkeys. *Metabolism* **49**: 1188-1196.
- Walsh PN, Ahmad SS (2002) Proteases in blood clotting. *Essays Biochem* **38**: 95-111.
- Walters J, Skene D, Hampton SM, Ferns GA (2003) Biological rhythms, endothelial health and cardiovascular disease. *Med Sci Monit* **9**: RA1-8.
- Wang G, Woo CW, Sung FL, Siow YL, O K (2002) Increased monocyte adhesion to aortic endothelium in rats with hyperhomocysteinemia: role of chemokine and adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**: 1777-1783.
- Wang J, Dudman NP, Wilcken DE, Lynch JF (1992) Homocysteine catabolism: levels of 3 enzymes in cultured human vascular endothelium and their relevance to vascular disease. *Atherosclerosis* **97**: 97-106.

- Wang MF, Yamamoto S, Chung HM, Chung SY, Miyatani S, Mori M, Okita T, Sugano M (1995) Antihypercholesterolemic effect of undigested fraction of soybean protein in young female volunteers. *J Nutr Sci Vitaminol* **41**: 187-195.
- Watson CA, Camera-Benson L, Palmer-Crocker R, Pober JS (1995) Variability among human umbilical vein endothelial cultures. *Science* **268**: 447-448.
- Watson AD, Navab M, Hama SY, Sevanian A, Prescott SM, Stafforini DM, McIntyre TM, Du BN, Fogelman AM, Berliner JA (1995) Effect of platelet activating factor-acetylhydrolase on the formation and action of minimally oxidized low density lipoprotein. *J Clin Invest* **95**: 774-782.
- Wegrowski Y, Perreau C, Bontemps Y, Marquart FX (1998) Uridine diphosphoglucose dehydrogenase regulates proteoglycan expression: cDNA cloning and antisense study. *Biochem Biophys Res Commun* **250**: 206-211.
- Weiss N (2005) Mechanisms of increased vascular oxidant stress in hyperhomocysteinemia and its impact on endothelial function. *Curr Drug Metab* **6**: 27-36.
- Welihinda AA, Tirasophon W, Kaufman RJ (1999) The cellular response to protein misfolding in the endoplasmic reticulum. *Gene Expr* **7**: 293-300.
- Wenzel U, Kuntz S, Brendel MD, Daniel H (2000) Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. *Cancer Res* **60**: 3823-3831.
- Wenzel U, Nickel A, Kuntz S, Daniel H (2004) Ascorbic acid suppresses drug-induced apoptosis in human colon cancer cells by scavenging mitochondrial superoxide anions. *Carcinogenesis* **25**: 703-712.
- Wilcox JN & Blumenthal BF (1995) Thrombotic mechanisms in atherosclerosis: potential impact of soy proteins. *J Nutr* **125**: 631S-638S.
- Wilke A, Schonian U, Herzum M, Hengstenberg C, Hufnagel G, Brilla CG, Maisch B (1995) [The extracellular matrix and cytoskeleton of the myocardium in cardiac inflammatory reaction] *Herz* **20**: 95-108.
- Wiseman H, O'Reilly JD, Adlercreutz H, Mallet Ai, Rowland IR, Sanders TA (2000) Isoflavone phytoestrogens consumed in soy decrease F(2)-isoprostane concentrations and increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation in humans. *Am J Clin Nutr* **72**: 395-400.
- Witztum JL, Steinberg D (1991) Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* **88**: 1785-1792.
- Wojciak-Stothard B, Williams L, Ridley AJ (1999) Monocyte adhesion and spreading on human endothelial cells is dependent on Rho-regulated receptor clustering. *J. Cell Biol.* **145**: 1293-1307.
- Woo KS, Chook P, Lolin YI, Cheung AS, Chan LT, Sun YY, Sanderson JE, Metreweli C, Celermajer DS (1997) Hyperhomocyst(e)inemia is a risk factor for arterial endothelial dysfunction in humans. *Circulation* **96**: 2542-2544.
- Wynford-Thomas D (1996) p53: guardian of cellular senescence. *J Pathol* **180**: 118-121.
- Yaffe MB, Farr GW, Miklos D, Horwich AL, Sternlicht ML, Sternlicht H (1992) TCP1 complex is a molecular chaperone in tubulin biogenesis. *Nature* **358**: 245-248.

- Yang CR, Hsieh SL, Ho FM, Lin WW (2005) Decoy receptor 3 increases monocyte adhesion to endothelial cells via NF-kappa B-dependent up-regulation of intercellular adhesion molecule-1, VCAM-1, and IL-8 expression. *J Immunol* **174**: 1647-1656.
- Yen GC, Lai HH (2003) Inhibition of reactive nitrogen species effects in vitro and in vivo by isoflavones and soy-based food extracts. *J Agric Food Chem* **51**: 7892-7900.
- Yutani C, Imakita M, Ishibashi-Ueda H, Tsukamoto Y, Nishida N, Ikeda Y (1999) Coronary atherosclerosis and interventions: pathological sequences and restenosis. *Pathol Int* **49**: 273-290.
- Zeng XK, Remick DG, Wang X (2004) Homocysteine induces production of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in cultured human whole blood. *Acta Pharmacol Sin* **25**: 1419-1425.
- Zeng XK, Guan YF, Remick DG, Wang X (2005) Signal pathways underlying homocysteine-induced production of MCP-1 and IL-8 in cultured human whole blood. *Acta Pharmacol Sin* **26**: 85-91.
- Zhang C, Cai Y, Adachi MT, Oshiro S, Aso T, Kaufman RJ, Kitajima S (2001a) Homocysteine induces programmed cell death in human vascular endothelial cells through activation of the unfolded protein response. *J Biol Chem* **276**: 35867-35874. Epub 2001 Jul 10.
- Zhang C, Kawauchi J, Adachi MT, Hashimoto Y, Oshiro S, Aso T, Kitajima S (2001b) Activation of JNK and transcriptional repressor ATF3/LRF1 through the IRE1/TRAF2 pathway is implicated in human vascular endothelial cell death by homocysteine. *Biochem Biophys Res Commun* **289**: 718-724.
- Zhang P, Liu B, Kang SW, Seo MS, Rhee SG, Obeid LM (1997) Thioredoxin peroxidase is a novel inhibitor of apoptosis with a mechanism distinct from that of Bcl-2. *J Biol Chem* **272**: 30615-30618.
- Zhang W, Shokeen M, Li D, Mehta JL (2003) Identification of apoptosis-inducing factor in human coronary artery endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **301**: 147-151.
- Zhang W, Li D, Mehta JL (2004) Role of AIF in human coronary artery endothelial cell apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **286**: H354-358.
- Zhang X, Shu XO, Gao YT, Yang G, Li Q, Li H, Jin F, Zheng W (2003) Soy food consumption is associated with lower risk of coronary heart disease in Chinese women. *J Nutr* **133**: 2874-2878.
- Zheng XL, Gui Y, Du G, Frohman MA, Peng DQ (2004) Calphostin-C induction of vascular smooth muscle cell apoptosis proceeds through phospholipase D and microtubule inhibition. *J. Biol. Chem.* **279**: 7112-7118.
- Zhu Y, Bian Z, Lu P, Karas RH, Bao L, Cox D, Hodgins J, Shaul PW, Thoren P, Smithies O, Gustafsson JA, Mendelsohn ME (2002) Abnormal vascular function and hypertension in mice deficient in estrogen receptor beta. *Science* **295**: 505-508.
- Zimmermann GA, McIntyre TM, Prescott SM, Stafforini DM (2002) The platelet-activating factor signaling system and its regulators in syndromes of inflammation and thrombosis. *Crit Care Med* **30**: S294-301.

-
- Zmijewski JW, Moellering DR, Le Goffe C, Landar A, Ramachandran A, Darley-Usmar VM (2005) Oxidized LDL induces mitochondrially associated reactive oxygen/nitrogen species formation in endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289: H852-861.

10 Anhang

10.1 Eigene Veröffentlichungen

Fuchs D, de Pascual-Teresa S, Rimbach G, Virgili F, Ambra R, Turner R, Daniel H, and Wenzel U. Proteome analysis for identification of target proteins of genistein in primary human endothelial cells stressed with oxidized LDL or homocysteine.

Eur J Nutr., 44, 95-104 (2005)

tom Dieck H, Doring F, Fuchs D, Roth HP, and Daniel H. Transcriptome and proteome analysis identifies the pathways that increase hepatic lipid accumulation in zinc-deficient rats.

J Nutr., 135, 199-205 (2005)

Fuchs D, Erhard P, Turner R, Rimbach G, Daniel H, and Wenzel U. Genistein reverses changes of the proteome induced by oxidized-LDL in EA.hy 926 human endothelial cells.

J Proteome Res., 4, 369-376 (2005)

Fuchs D, Erhard P, Rimbach G, Daniel H, and Wenzel U. Genistein blocks homocysteine-induced alterations in the proteome of human endothelial cells.

Proteomics., 5, 2808-2818 (2005)

Kindermann B, Doring F, Fuchs D, Pfaffl MW, and Daniel H. Effects of increased cellular zinc levels on gene and protein expression in HT-29 cells.

Biometals., 18, 243-253 (2005)

Fuchs D, Winkelmann I, Johnson IT, Mariman E, Wenzel U, and Daniel H. Proteomics in nutrition research: principles, technologies and applications.

Br J Nutr. 94, 302-314 (2005)

Ambra R, Rimbach G, de Pascual Teresa S, Fuchs D, Wenzel U, Daniel H, Virgili F. Genistein affects the expression of genes involved in blood pressure regulation and angiogenesis in primary human endothelial cells.

Nutr Metab Cardiovasc Dis. 16, 35-43 (2006)

Fuchs D, Dirscherl B, Erhard P, Schroot JH, Daniel H, and Wenzel U. Soy extract has different effects than the isolated isoflavones on the proteome of homocysteine-stressed endothelial cells.

Mol Nutr Food Res. 50, 58-69 (2006)

Fuchs D, Dirscherl B, Erhard P, Daniel H, and Wenzel U. Different effects of isolated isoflavones and a soy extract on the proteome of ox-LDL-exposed endothelial cells.

(Manuscript vorbereitet)

Fuchs D, Vafeiadou K, Hall WL, Williams CM, Schroot JH, Daniel H, and Wenzel U. A soy-containing cereal bar alters the proteome of peripheral blood mononuclear cells from postmenopausal women.

(Manuscript vorbereitet)

Fuchs D, Piller R, Linseisen J, Daniel H, and Wenzel U. Effects of a linseed-intervention on the proteome of human peripheral blood mononuclear cells.

(Manuscript vorbereitet)

10.2 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
2D-PAGE	Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese
µA	Mikro-Ampère
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar (µmol/l)
AIF	Apoptosis inducing factor
AIP1	ASK1-interacting protein-1
APS	Ammoniumpersulfat (Ammoniumperoxidsulfat)
ASK1	Apoptosis signal regulating kinase 1
ATF-6	Activating transcription factor 6
ATP	Adenosintriphosphat
BME	Eagle's Basismedium
bp	Basenpaare (base pairs)
CBS	Cystathionin-β-Synthase
CCT-delta	Chaperonin containing t-complex polypeptide 1 delta subunit
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethyl-amino]-1-propanesulfat
cm	Zentimeter
CMP-Neu5Ac	Cytidine monophosphate N-acetylneuraminic acid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CuCl ₂	Kupfer(II)chlorid
Da	Dalton
DMEM/HEPES	Dulbecco's Modified Eagle's Medium/4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
dNTPs	2'-Desoxy-nucleotid 5'Triphosphat (deoxynucleotide triphosphates)
DTT	Dithiothreitol
DUSP3	Dual specificity phosphoprotein phosphatase 3
EDRF	Endothelial-dependant relaxin factor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FKS	Fetales Kälber-Serum
G	Gramm
<i>g</i>	Relative centrifugal force (RCF) (= 1,119 x 10 ⁻⁵ x rpm ² x r)
Gen	Genistein
GenDai	Isoflavonoidgemisch aus 2,5 µM Genistein und 1 µM Daidzein
GSH	Glutathion in einem reduzierten Zustand
GSTpi	Glutathione-S-transferase pi
H	Stunde (hora)
HCCA	α-Cyano-4-Hydroxy-cinnamic acid (α -Cyano-Hydroxy-Zimtsäure)
HCl	Salzsäure
Hcy	Homocystein
HDL	High density lipoproteins
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulfonic acid
HHcy	Hyperhomocysteinämie
HPRT	Hypoxanthin Phosphoribosyltransferase
Hsp	Heat shock protein
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
IκB-α	Inhibitor κB-α
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
IDL	Intermediate density lipoprotein
IDPc	NADP+-dependent isocitrate dehydrogenase

IEF	Isoelektrische Fokussierung
IFN- γ	Interferon- γ
IKK	I κ B Kinase
IKK- α	I κ B Kinase- α
IL-1	Interleukin-1
IL-8	Interleukin-8
IPG	Immobilized pH-gradient
IRE-1	Type-I ER transmembrane protein kinase
JNK	c-Jun N-terminal kinase
JNK/SAPK	C-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo-Dalton
KG	Körpergewicht
LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase
LDL	Low density lipoproteins
LPS	Lipopolysaccharide
M	Molar (mol/l)
MALDI-TOF MS	Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry
MCP-1	Monocytes chemoattractant protein 1
MEM	Modified Eagle's Medium
MKK4/6	MAP kinase kinase 4/6
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar (mmol/l)
MMLV-Puffer	Moloney Murine Leukemia Virus-Puffer
MMLV-RT	Moloney Murine Leukemia Virus-Reverse Transkriptase
MOPS	Morpholinpropansulfonsäure
MSDB	Mascot Search Database
MTHFR	Methylentetrahydrofolat-Reduktase
mRNA	Messenger RNA
NaCl	Natriumchlorid
NF- κ B	Necrosis factor - κ B
NIK	NF- κ B inducing Kinase
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
O ₂ ⁻	Superoxidanion
ORP150	Oxygen-regulated protein 150K
oxLDL	oxidiertes LDL
PAF	Platelet activating factor
PAFAH	Platelet activating factor acetylhydrolase
PAGA	Probable thioredoxin peroxidase
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCMT	Protein carboxyl methyltransferase
PCR	Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction)
PECAM	Platelet-endothelial cell-adhesion molecule
PERK	PKR like ER kinase
pI	Isoelektrischer Punkt
pM	Picomolar (pmol/l)
PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride
ppm	parts per million
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNS	Reactive nitrogen species
ROS	Reactive oxygen species

rRNA	Ribosomale RNA
RT-PCR	Real-Time PCR
S40cl	Solgen 40 cleaved
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAM	S-Adenosylmethionin
SDG	Secoisolariciresinol diglucosid
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SSL	Steady state level
TAE-Puffer	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TAG	Triacylglycerol
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoressigsäure
TIM	Triosephosphate isomerase
TNF α	Tumor necrosis factor α
TRAF2	TNF-Rezeptor-associated factor 2
Tris	Tris-hydroxymethyl-amino-methan
U/ml	Units pro Milliliter
UPR	Unfolded protein response
V	Volt
Vh	Voltstunden
VCAM-I	Vascular cell adhesion molecule-I
VDAC-1	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1
VLDL	Very low density lipoproteins

10.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Aufbau einer gesunden Arterie.....	3
Abb. 1.2	Schematische Darstellung der frühen Phasen der Atherogenese.	5
Abb. 1.3	Strukturformel von Homocystein.	6
Abb. 1.5	Postprandialer Lipidstoffwechsel.....	13
Abb. 1.6	Grundstruktur der Soja Isoflavonoide.....	20
Abb. 4.1	Repräsentative 2D-PAGE von Proteinen aus HUVEC, die für 24 h mit 25 µM Hcy alleine bzw. in Gegenwart von 2,5 µM oder 25 µM Genistein inkubiert wurden.	37
Abb. 4.2	Repräsentative 2D-PAGE von Proteinen aus HUVEC, die mit 5 µg/ml ox-LDL in Ab- und Anwesenheit von 2,5 µM bzw. 25 µM Genistein kultiviert wurden.....	38
Abb. 4.3	Repräsentative 2D-PAGE von Proteinen aus EA.hy926 Zellen nach Inkubation mit 25 µM Hcy für 24 h.....	40
Abb. 4.4	Repräsentative 2D-PAGE von Proteinen aus EA.hy926 Zellen nach Inkubation mit 25 µM Hcy in Ab- oder Anwesenheit von 2,5 µM Genistein für 24 h.	41
Abb. 4.5	Relative Spotintensitäten der identifizierten Proteine von EA.hy926 Zellen nach Inkubation der Zellen mit Hcy in Anwesenheit von Genistein im Vergleich zur Kultivierung in Anwesenheit von Hcy alleine.	42
Abb. 4.6	Repräsentative 2D-PAGE von Proteinen aus EA.hy926 Zellen nach Inkubation mit 25 µM Hcy in Ab- oder Anwesenheit von 2,5 µM Genistein und 1 µM Daidzein (GenDai) für 24 h.....	44
Abb. 4.7	Relative Spotintensitäten der identifizierten Proteine von EA.hy926 Zellen nach Inkubation der Zellen mit Hcy in Anwesenheit von GenDai im Vergleich zur Kultivierung in Anwesenheit von Hcy alleine.	44
Abb. 4.8	Repräsentative 2D-PAGE von Proteinen aus EA.hy926 Zellen nach Kultivierung mit 25 µM Hcy alleine bzw. in der Gegenwart des Extraktes S40cl für 24 h.	46
Abb. 4.9	Relative Spotintensitäten der identifizierten Proteine von EA.hy926 Zellen nach Inkubation der Zellen mit Hcy in Anwesenheit von GenDai im Vergleich zur Kultivierung in Anwesenheit von Hcy alleine.	46
Abb. 4.11	Repräsentative 2D-PAGE von Proteinen aus EA.hy926 Zellen, die für 24 h mit 5 µg/ml ox-LDL inkubiert wurden.....	49
Abb. 4.12	Repräsentative 2D-PAGE von Proteinen aus EA.hy926 Zellen nach Kultivierung mit Medium alleine (Kontrolle) oder mit 5 µg/ml ox-LDL in Ab- oder Anwesenheit von 2,5 µM Genistein für 24 h.	51
Abb. 4.13	Relative Spotintensitäten der identifizierten Proteine von EA.hy926 Zellen nach Inkubation der Zellen mit ox-LDL in Anwesenheit von Genistein im Vergleich zur Kultivierung in Anwesenheit von ox-LDL alleine.	52
Abb. 4.14	Repräsentative 2D-PAGE von Proteinen aus EA.hy926 Zellen nach Kultivierung mit Medium alleine (Kontrolle) oder mit 5 µg/ml ox-LDL in Ab- oder Anwesenheit von 2,5 µM Genistein und 1 µM Daidzein (GenDai) für 24 h.	53
Abb. 4.15	Relative Spotintensitäten der identifizierten Proteine von EA.hy926 Zellen nach Inkubation der Zellen mit ox-LDL in Anwesenheit von GenDai im Vergleich zur Kultivierung in Anwesenheit von ox-LDL alleine.	54
Abb. 4.16	Repräsentative 2D-PAGE von Proteinen aus EA.hy926 Kontrollzellen oder aus EA.hy926 Zellen, die mit 5 µg/ml ox-LDL in Ab- oder Anwesenheit des Extraktes S40cl für 24 h inkubiert wurden.	55
Abb. 4.17	Relative Spotintensitäten der identifizierten Proteine von EA.hy926 Zellen nach der Inkubation der Zellen mit ox-LDL in Anwesenheit von S40cl im Vergleich zur Kultivierung mit ox-LDL alleine.....	56
Abb. 4.18	Repräsentative 2D-PAGE von Proteinen aus Kontrollzellen oder EA.hy926 Zellen nach der Gabe von 2,5 µM Genistein für 24 h.....	58

Abb. 4.19	Repräsentative 2D-PAGE von Proteinen aus EA.hy926 Zellen nach Kultivierung der Zellen mit 2,5 µM Genistein und 1 µM Daidzein (GenDai) für 24 h.	59
Abb. 4.20	Repräsentative 2D-PAGE von Proteinen aus EA.hy926 Zellen nach Inkubation der Zellen mit S40cl für 24 h.	61
Abb. 4.21	Apoptose in Hcy-exponierten EA.hy926 Zellen.	62
Abb. 4.22	Einfluss von Genistein, GenDain und S40cl auf die Apoptose in Hcy-exponierten EA.hy926 Zellen.	63
Abb. 4.23	Apoptose in ox-LDL-exponierten EA.hy926 Zellen.	64
Abb. 4.24	Einfluss von Genistein, GenDai und S40cl auf die Apoptose in ox-LDL-exponierten EA.hy926 Zellen.	65
Abb. 4.25	Repräsentative 2D-PAGE von Proteinen aus PBMC postmenopausaler Frauen nach der Intervention mit einem Isoflavonoid-haltigen Müsliriegel.	67
Abb. 5.1	Modell der stressinduzierten Aktivierung der MAPK.	75
Abb. 5.2	Signaltransduktion zur Förderung der Synthese von TNF-α und potentielle Mechanismen, über die <i>HSP70</i> die Bildung von TNF-α hemmt als Hypothese zur Erklärung der Wirkungen von Hcy und Isoflavonoiden auf das Endothel.	79
Abb. 6.1	Durch die Isoflavonoide im zellulären Spiegel veränderte Proteine und deren anzunehmende präventive Wirksamkeit im Rahmen der Atherosklerose.	90
Abb. 6.2	Die vom Extrakt S40cl ausgehenden Wirkungen auf Proteinfunktionen und Mechanismen der Atheroskleroseentstehung.	91

10.4 Tabellenverzeichnis

Tab 1.1	Mögliche genetische und umweltbedingte Risikofaktoren in der Genese von Atherosklerose und koronaren Herzerkrankungen (Lusis AH, 2000).	2
Tab. 10.1	Einfluss von 2,5 μ M oder 25 μ M Genistein (Gen) auf die Proteinspiegel von Hcy exponierten HUVEC.	121
Tab. 10.2	Wirkung von 2,5 μ M oder 25 μ M Genistein auf die Proteinspiegel von ox-LDL gestressten HUVEC.....	122
Tab. 10.3	Relative Spiegel von mittels MALDI-TOF MS identifizierten Proteinen der EA.hy926 nach der Kultivierung mit 25 μ M Hcy.	123
Tab. 10.4	Relative Spiegel von Proteinen, deren Regulierung durch Hcy in EA.hy926 Zellen durch die gleichzeitige Gabe von 2,5 μ M Genistein (Gen) aufgehoben worden war.....	125
Tab. 10.5	Relative Spiegel von Proteinen, deren durch Hcy verursachte Regulierung in EA.hy926 durch die zeitgleiche Inkubation mit 2,5 μ M Genistein und 1 μ M Daidzein (GenDai) signifikant reduziert wurde.....	126
Tab. 10.6	Relative Spiegel von Proteinen, deren durch Hcy ausgelöste Regulierung durch die Co-Inkubation mit S40cl verhindert werden konnte.....	128
Tab. 10.7	Ratio der Spiegel von mittels MALDI-TOF MS identifizierter Proteine von EA.hy926 Zellen, die mit 5 μ g/ml ox-LDL behandelt worden sind.....	129
Tab. 10.8	Relative Spiegel von Proteinen, deren durch 5 μ g/ml ox-LDL induzierte Regulierung in EA.hy926 in Anwesenheit von 2,5 μ M Genistein (Gen) verhindert werden konnte.	130
Tab. 10.9	Relative Spiegel von Proteinen, deren durch ox-LDL verursachte Regulierung in EA.hy926 durch die gleichzeitige Inkubation mit 2,5 μ M Genistein und 1 μ M Daidzein (Gen/Dai) aufgehoben werden konnte.	132
Tab. 10.10	Relative Spiegel von Proteinen, deren durch ox-LDL induzierte Veränderung der Spotintensität in Gelen von EA.hy926 Zellen durch Co-Inkubation dem Extrakt S40cl verhindert werden konnte.	133
Tab. 10.12	Relative Spiegel der mittels MALDI-TOF MS identifizierten Proteine von EA.hy926, die mit 2,5 μ M Genistein und 1 μ M Daidzein (Gen/Dai) inkubiert worden sind.	137
Tab. 10.13	Relative Spiegel von Proteinen der EA.hy926 Zellen, die mit dem Extrakt S40cl behandelt worden sind.	138
Tab. 10.14	Relative Spiegel von Proteinen der PBMC postmenopausaler Frauen nach der Supplementierung mit einem Isoflavonoid-haltigen Müsliriegel im Vergleich zum Verzehr eines Placebo-Riegels.	140
Tab 10.15	Oligonukleotid-Primer für die RealTime-PCR.....	142

10.5 Liste identifizierter Proteine

Tab. 10.1 Einfluss von 2,5 μM oder 25 μM Genistein (Gen) auf die Proteinspiegel von Hcy exponierten HUVEC. Die HUVEC wurden für 24 h mit 25 μM Hcy in Ab- und Anwesenheit von 2,5 μM bzw. 25 μM Genistein inkubiert. Die Spot-Nummern entsprechen denen von Abb. 4.1.

Spot-Nr.	Proteinbezeichnung	Theo. M_r /pI	Exp. M_r /pI	Regulierungsfaktor			% Sequenzdeckung	Accession Nr.
				Hcy/ Kontrolle	Hcy & 2,5 μM Gen/Hcy	Hcy & 25 μM Gen/Hcy		
1	Annexine Annexin V	35/5,1	60/5,2	0,11	2,90	4,27	42	1HVE
2	Chaperone ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1	23/5,3	46/6,0	0,32	1,04	3,04	41	AAD09172
3	Proteine des Zytoskeletts Desmoplakin I	309/6,4	90/8,7	0,90	0,40	0,85	9	A38194
4	Keratin, type 2 cytoskeletal 1	66/8,2	50/5,6	0,54	2,23	1,35	19	K2C1_HUMAN
5	Fascin	55/6,8	93/7,8	1,41	1,97	2,62	27	FSC1_HUMAN
6	Lamin A	74/6,6	117/7,1	0,46	1,64	3,95	41	VEHULA
7	Genregulierung Chromosome segregation protein smc1	143/6,1	66/7,0	0,32	2,00	2,31	16	I54383
8	Heterogenous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) A2	36/8,7	60/9,2	0,42	1,43	2,61	17	AAB60650
9	Weitere Proteine ALG-2 interacting protein 1	97/6,1	120/7,1	0,40	2,05	4,33	29	AAF08220
10	Homer-2 protein, Homer-2B splicing form	41/6,0	38/7,0	nur in Homocystein	5,08	5,60	42	CAB75538

Tab. 10.2 Wirkung von 2,5 μM oder 25 μM Genistein auf die Proteinspiegel von ox-LDL gestressten HUVEC. Die HUVEC wurden für 24 h mit 5 $\mu\text{g/ml}$ ox-LDL in Ab- und Anwesenheit von 2,5 μM bzw. 25 μM Genistein inkubiert. Die Spot-Nummern entsprechen denen von Abb. 4.2.

Spot-Nr.	Proteinbezeichnung	Theo. M./ μl	Exp. M./ μl	Regulierungsfaktor			% Sequenzdeckung	Accession Nr.
				ox-LDL/ Kontrolle	ox-LDL & 2,5 μM Gen/ox-LDL	ox-LDL & 25 μM Gen/ox-LDL		
	Chaperone							
1	Ubiquitin conjugating enzyme 12	21/7,6	34/8,4	2,42	0,26	0,58	37	AAC26141
	Proteine des Zytoskeletts							
2	Nuclear matrix protein NMP 238	50/6,0	100/7,2	0,81	1,10	2,37	37	JE0334 (CAA08986)
	Stoffwechsel							
3	Aldehyde dehydrogenase 1A1 (cytosolic)	55/6,3	100/7,4	1,63	0,35	0,11	24	P00352
4	Phosphoserine aminotransferase		72/8,6	0,62	0,47	0,66	29	AAN71736
5	Uridine diphosphoglucose dehydrogenase	56/7,1	100/8,0	1,47	1,22	2,25	19	JE0353
	Detoxifikation							
6	26S proteasome subunit p 28 Kinasen/Phosphatasen	25/5,7	47/6,3	nur in ox-LDL	1,35	2,27	42	BAA33215
7	KIAA 1505 Protein (fragment) Genregulierung	82/9,1	66/9,4	1,30	0,20	1,49	34	BAA96029
8	p167 Weitere Proteine	166/6,4	66/6,9	nur in ox-LDL	0,75	3,01	8	AAB41584
9	KRAB zinc finger protein HFB101S	74/6,3	28/6,9	1,16	0,29	0,54		BAA88522

Tab. 10.3 Relative Spiegel von mittels MALDI-TOF MS identifizierten Proteinen der EA.hy926 nach der Kultivierung mit 25 µM Hcy.
Die Tabelle enthält nur Proteine, bei denen die Wirkung von Hcy nicht durch Genistein, GenDai oder S40cl beeinflusst wurde. Die Spot-Nummern entsprechen denen von Abb. 4.3.

Spot-Nr.	Proteinbezeichnung	Theo. M _r /pI	Exp. M _r /pI	Regulierungsfaktor Hcy/Kontrolle	% Sequenzdeckung	Accession Nr.
1	Annexine Annexin IV	36/5,8	32/5,4	nur in Kontrolle	43	A42007
	Chaperone					
2	Chaperonin containing TCP1, subunit 3 (gamma)	61/6,1	57/5,9	0,42	45	AAH08019
3	Chaperonin containing TCP1, subunit 5 (epsilon)	60/5,5	57/5,0	0,42	42	AAH06543
4	Heat shock protein gp 96 precursor	90/4,7	38/3,6	0,31	12	AAK74072
	Proteine des Zytoskeletts					
5	Laminin-binding protein	32/4,8	47/3,8	0,27	47	CAA43469
6	Coactosin-like 1	16/5,5	17/4,9	0,42	42	AAH10039
7	Vimentin	54/5,1	43/4,0	3,28	52	VIME_HUMAN
8	Endoplasmic precursor	93/4,8	100/4,1	nur in Kontrolle	31	A35954
9	Microtubule-associated protein EB1	30/5,0	33/4,3	3,51	38	I52726
10	Lamin C	65/6,4	60/5,9	nur in Hcy	44	VEHULC
	Stoffwechsel					
11	Glucosidase II precursor	107/5,7	102/5,3	0,33	28	CAA04006
12	Methionine adenosyltransferase regulatory beta subunit	38/6,9	41/7,6	nur in Hcy	45	AAF28477
13	Cathepsin B (EC 3.4.22.1) precursor	39/5,9	32/4,8	2,09	39	KHHUB
14	ATPase, H ⁺ -transporting, lysosomal 56/58kD, V1 subunit B, isoform 2	57/5,6	53/5,3	2,51	42	AAH03100
15	Methionine adenosyltransferase regulatory beta subunit	38/6,9	38/7,4	2,51	29	AAF28477

16	S-adenosyl homocysteine hydrolase	48/6,0	43/5,9	2,60	30	1A7AB
	Detoxifikation					
17	Glutathione-S-transferase P (GST class-pi)	24/5,4	23/5,2	3,11	69	O00460
	Kinasen / Phosphatasen					
18	Phosphoprotein phosphatase (EC3.1.3.16)	37/6,3	36/5,8	0,46	66	S41052
19	Galactokinase 1	43/6,0	38/5,8	nur in Hcy	46	AAH01166
20	Ribose-phosphate pyrophosphokinase I	35/6,6	43/6,9	2,02	31	KPR1_HUMAN
	Genregulierung					
21	Mitochondrial seryl t-RNA syntetase	59/8,4	50/6,7	0,06	43	BAA99557
22	Elongation factor 2	96/6,4	81/6,8	0,49	34	EF2_HUMAN
23	Transformation-sensitive protein IEF SSP 3521	63/6,4	58/6,0	nur in Hcy	28	A38093
24	hnRNP2H9A	35/6,4	38/6,5	2,17	52	AAF68847
	Weitere Proteine					
25	Testis mitotic checkpoint BUB3	38/6,4	42/6,7	2,02	38	AAC28439

Tab. 10.4 Relative Spiegel von Proteinen, deren Regulierung durch Hcy in EA.hy926 Zellen durch die gleichzeitige Gabe von 2,5 μ M Genistein (Gen) aufgehoben worden war.
Die Spot-Nummern sind mit denen in Abb. 4.4 und 4.5 identisch.

Spot-Nr.	Proteinbezeichnung	Theo. M _r /pI	Exp. M _r /pI	Regulierungsfaktor		% Sequenzdeckung	Accession Nr.
				Hcy/Kontrolle	Hcy&Gen/Hcy		
	Annexine						
1	Annexin II	39/7,6	31/6,2	nur in Hcy	0,29	45	ANX2_HUMAN
	Chaperone						
2	Heat shock protein gp precursor	90/4,7	44/4,2	nur in Kontrolle	nur in Hcy&Gen	11	AAK74072
3	T-complex-type molecular chaperone TCP1	61/5,8	55/5,6	nur in Kontrolle	nur in Hcy&Gen	29	S10486
4	BiP Protein	71/5,2	67/3,8	4,40	0,50	29	AAF13605
	Proteine des Zytoskeletts						
5	Lamin B1	67/5,1	113/4,8	nur in Kontrolle	nur in Hcy&Gen	44	VEHULB
6	T-Plastin	71/5,5	60/5,4	0,35	2,34	20	PLST_HUMAN
7	Lamin C	65/6,4	88/6,1	nur in Hcy	0,32	42	VEHULC
8	Moesin/Anaplastic lymphoma kinase fusion protein (fragment)	62/7,6	31/9,1	2,47	nur in Hcy	23	AAK71522
9	Lamin A	74/6,6	82/6,7	2,49	nur in Hcy	29	VEHULA
	Stoffwechsel						
10	Nudix hydrolase NUDT5	25/4,7	33/4,2	nur in Kontrolle	nur in Hcy&Gen	35	AAF25479
11	UDP-galactose-4-epimerase	39/6,3	37/6,4	nur in Kontrolle	nur in Hcy&Gen	40	AAH01273
12	C3,4,25,1 proteasome endopeptidase complex/chain	28/6,3	31/6,4	0,46	2,00	39	S30274
13	Triosephosphate isomerase (TIM)	27/6,5	28/6,4	nur in Hcy	0,17	47	P00938
14	6-Phosphogluconolactonase	28/5,7	27/5,6	2,29	nur in Hcy	44	CAB57866
	Detoxifikation						
15	Thioredoxin related protein	41/5,5	51/4,9	nur in Kontrolle	nur in Hcy&Gen	28	CAD29430
	Genregulierung						
16	Elongation factor G1	84/6,6	72/6,2	0,40	2,01	26	AAK53402
	Weitere Proteine						
17	FLJ20403 protein (fragment)	33/9,9	77/4,7	nur in Kontrolle	nur in Hcy&Gen	43	AAH52645

Tab. 10.5 Relative Spiegel von Proteinen, deren durch Hcy verursachte Regulierung in EA.hy926 durch die zeitgleiche Inkubation mit 2,5 μ M Genistein und 1 μ M Daidzein (GenDai) signifikant reduziert wurde. Die Spot-Nummern stimmen mit denen von Abb. 4.6 und 4.7 überein.

Spot-Nr.	Proteinbezeichnung	Theo. M./pI	Exp. M./pI	Regulierungsfaktor		% Sequenzdeckung	Accession Nr.		
				Hcy/ Kontrolle	Hcy & GenDai/Hcy				
1	Chaperonin containing t-complex polypeptide 1, delta subunit; CCT-delta	58/8,0	58/7,8	0,4313	2,0647	29	AAC96010		
								Chaperone	
								Proteine des Zytoskeletts	
2	Lamin A	74/6,6	72/5,8	0,4124	2,705	33	VEHULA		
3	Matrin 3	95/5,9	64/8,1	0,229	2,5266	23	AAH15031		
4	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 (VDAC-1) (hVDAC1) (Outer mitochondrial membrane protein porin 1) (Plasmalemmal porin) (Porin 31HL) (Porin 31HM)	31/8,6	34/7,3	2,0566	0,4998	43	POR1_HUMAN		
								Stoffwechsel	
5	Chain B, Cathepsin D At Ph 7.5	26/5,3	32/4,5	0,1027	6,2268	47	1LYWB		
								Genregulierung	
6	6-phosphogluconolactonase	28/5,7	29/5,3	2,6064	0,4965	44	CAB57866		
7	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	49/5,9	27/5,9	2,2014	0,4987	28	I39358		
8	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	49/5,9	34/4,6	2,1582	0,4896	28	I39358		
9	54 kDa nuclear RNA- and DNA-binding protein (p54(nrbb)) (p54nrbb) (55 kDa nuclear protein) (NMT55) (Non-POU domain-containing octamer-binding protein) (DNA-binding P52/P100 complex, 52 kDa subunit)	54/9,0	60/8,9	0,4322	2,492	30	NR54_HUMAN		

10	Putative spliceosome associated protein (breast carcinoma amplified sequence 2)	26/5,5	29/4,6	2,6051	0,3403	51	AAC64059
11	Translation elongation factor EF-Tu precursor	50/7,7	35/5,5	2,2021	0,498	44	S62767
12	U5 snRNP-specific 40 kDa protein	40/8,3	41/8,0	0,3455	3,5	41	AAC69625
	Weitere Proteine						
13	KSRP	73/6,8	74/6,5	0,4987	1,8209	27	AAB53222

Tab. 10.6 Relative Spiegel von Proteinen, deren durch Hcy ausgelöste Regulierung durch die Co-Inkubation mit S40cl verhindert werden konnte.
Die Spot-Nummern sind mit denen von Abb. 4.8 und 4.9 identisch.

Spot-Nr.	Proteinbezeichnung	Theo. Mr/pl	Exp. Mr/pl	Regulierungsfaktor		% Sequenzdeckung	Accession Nr.
				Hcy/Kontrolle	Hcy & S40cl/Hcy		
1	Annexin Annexin A2	39/7,6	39/4,8	3,343	0,186	24	ANX2_HUMAN
2	Chaperone Heat shock protein gp precursor	90/4,7	43/3,8	0,3234	1,9570	11	AAK74072
3	Dnak-type molecular chaperone precursor, mitochondrial	74/5,9	66/4,7	0,416	8,754	30	B48127
4	Proteine des Zytoskelett Capping protein alpha	33/5,5	39/4,5	2,668	0,297	41	G02639
5	Matrin 3	95/5,9	63/7,4	0,323	2,512	23	AAH15031
6	Detoxifikation probable Thioredoxin peroxidase (EC 1.11.1.-) PAGA	22/8,3	24/8,9	0,497	3,320	59	A46711
7	Kinasen/Phosphatasen Dual specificity phosphoprotein phosphatase (EC 3.1.3.-) DUSP3	21/7,7	22/7,1	0,444	2,048	60	A47196
8	Genregulierungn IKK interacting protein, isoform 1	43/4,9	53/3,4	nur in Kontrolle	nur in Hcy & S40cl	26	AAH58933
9	Splicing factor proline/glutamine rich (polypyrimidine tract binding protein associated)	76/9,5	103/9,5	nur in Hcy	nur in Hcy	21	AAH51192
10	U5 snRNP-specific 40 kDa protein	40/8,3	39/8,5	nur in Kontrolle	nur in Hcy & S40cl	28	AAC69625

Tab. 10.7 Ratio der Spiegel von mittels MALDI-TOF MS identifizierter Proteine von EA.hy926 Zellen, die mit 5 µg/ml ox-LDL behandelt worden sind.

Diese Tabelle enthält nur Proteine, bei denen die durch ox-LDL induzierten Effekte durch Genistein, GenDai oder S40cl nicht aufgehoben werden konnten. Die Spot-Nummern entsprechen denen von Abb. 4.11.

Spot-Nr.	Proteinbezeichnung	Theo. M _r /pI	Exp. M _r /pI	Regulierungsfaktor ox-LDL/Kontrolle	% Sequenzdeckung	Accession Nr.
	Chaperone					
1	Heat shock protein gp 96 precursor	90/4,7	38/3,6	0,4574	12	AAK74072
2	Heat shock protein gp precursor	90/4,7	44/4,2	2,0363	11	AAK74072
	Proteine des Zytoskelett					
3	T-Plastin	71/5,5	60/5,4	0,4241	20	PLST_HUMAN
4	Matrin 3	95/5,9	122/5,6	0,2885	37	AAH15031
5	Lamin C	65/6,4	88/6,1	nur in Kontrolle	42	VEHULC
6	Coactosin-like 1	16/5,5	17/4,9	0,4797	42	AAH10039
	Stoffwechsel					
7	Serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade H, member 1, precursor	47/8,8	84/9,3	0,355	32	AAH14623
8	dJ776F14.1 (P47 protein)	41/5,0	45/4,6	nur in Kontrolle	46	Q9H102
9	6-Phosphogluconolactonase	28/5,7	27/5,6	nur in Kontrolle	44	CAB57866
10	Ubiquinol-cytochrome-c-reductase (EC1.10.2.2) core protein I	53/6,0	45/5,1	3,1428	44	A48043
	Detoxifikation					
11	Glutathione-S-transferase P (GST class-pi)	24/5,4	23/5,2	2,1532	69	O00460
	Genregulierung					
12	Elongation factor 2	96/6,4	81/6,8	0,3532	34	EF2_HUMAN
13	Elongation factor G1	84/6,6	72/6,2	nur in Kontrolle	26	AAK53402
14	Elongation factor 2 (EF-2)	96/6,4	81/6,8	0,4004	34	EF2_HUMAN
15	Elongation factor 2 (EF-2)	96/6,4	81/6,8	0,3651	34	EF2_HUMAN
16	hnRNP2H9A	35/6,4	38/6,5	2,2084	52	AAF68847

Tab. 10.8 Relative Spiegel von Proteinen, deren durch 5 µg/ml ox-LDL induzierte Regulierung in EA.hy926 in Anwesenheit von 2,5 µM Genistein (Gen) verhindert werden konnte. Die Spot-Nummern stimmen mit denen von Abb. 4.12 und 4.13 überein.

Spot-Nr.	Proteinbezeichnung	Theo. M _r /pI	Exp. M _r /pI	Regulierungsfaktor		% Sequenzdeckung	Accession Nr.
				ox-LDL/Kontrolle	ox-LDL&Gen/ ox-LDL		
1	Annexine Annexin IV	36/5,8	32/5,4	nur in Kontrolle	nur in ox-LDL&Gen	43	A42007
2	Annexin II Chaperone	39/7,6	31/6,2	nur in Kontrolle	nur in ox-LDL&Gen	45	ANX2_HUMAN
3	Chaperonin containing TCP1, subunit 3 (gamma)	61/6,1	57/5,9	nur in Kontrolle	nur in ox-LDL&Gen	45	AAH08019
4	BIP Protein	71/5,2	67/3,8	nur in Kontrolle	nur in ox-LDL&Gen	29	AAF13605
5	T-complex-type molecular chaperone TCP1	61/5,8	55/5,6	2,2864	nur in ox-LDL	29	S10486
	Proteine des Zytoskeletts						
6	Lamin A	74/6,6	64/6,5	nur in Kontrolle	nur in ox-LDL&Gen	50	VEHULA
7	Laminin-binding protein	32/4,8	47/3,8	nur in Kontrolle	nur in ox-LDL&Gen	47	CAA43469
8	Capping protein alpha subunit isoform 1	33/5,5	35/5,2	0,1518	5,0895	42	G02639
9	Similar to tubulin alpha 2	38/4,9	53/4,6	0,2456	3,6777	85	Q8WU19
10	Lamin A	74/6,6	82/6,7	0,2702	2,124	29	VEHULA
11	Lamin B1	67/5,1	113/4,8	5,0634	0,5829	44	VEHULB
12	Endoplasmic precursor	93/4,8	100/4,1	10,9893	nur in ox-LDL	31	A35954
	Stoffwechsel						
13	Nudix hydrolase NUDT5	25/4,7	33/4,2	nur in Kontrolle	nur in ox-LDL&Gen	35	AAF25479
14	Glucosidase II precursor	107/5,7	102/5,3	nur in Kontrolle	nur in ox-LDL&Gen	28	CAA04006
15	Interstitial collagenase (EC3.4.24.7) precursor [validated]	54/6,5	48/6,9	nur in Kontrolle	nur in ox-LDL&Gen	30	KCHUI
16	Methionine adenosyltransferase regulatory beta subunit	38/6,9	38/7,4	nur in Kontrolle	nur in ox-LDL&Gen	29	AAF28477
17	S-adenosyl homocysteine hydrolase	48/6,0	43/5,9	nur in Kontrolle	nur in ox-LDL&Gen	30	1A7AB
18	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	31/8,9	30/9,2	0,2964	2,7796	39	AAP20940

19	Triosephosphate isomerase (TIM)	26/6,5	28/6,4	nur in ox-LDL	nur in ox-LDL	47	P00938
20	Methionine adenosyltransferase regulatory beta subunit	38/6,9	45/7,0	nur in ox-LDL	0,4919	45	AAF28477
21	NADH2 dehydrogenase (ubiquinone) (EC1.6.5.3) chain NDUFS3	30/7,0	27/5,2	0,3605	2,2781	50	JE0195
	Detoxifikation						
22	Peroxisredoxin 6	25/6,0	27/6,2	nur in Kontrolle	nur in ox-LDL&Gen	26	AAH35857
23	Thioeredoxin related protein	41/5,5	51/4,9	0,341	2,011	28	CAD29430
	Kinasen/Phosphatasen						
24	Galactokinase 1	43/6,0	38/5,8	nur in ox-LDL	0,4587	46	AAH01166
	Genregulierung						
25	Mitochondrial seryl t-RNA synthetase	59/8,4	50/6,7	nur in Kontrolle	nur in ox-LDL&Gen	43	BAA99557
26	Ribonucleoprotein La	47/6,7	48/6,6	0,5159	2,0231	32	A31888
27	Transformation-sensitive protein IEF SSP 3521	63/6,4	58/6,0	nur in ox-LDL	0,2939	28	A38093
28	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	49/5,9	21/6,2	5,7508	nur in ox-LDL	23	I39358
	Weitere Proteine						
29	Antiquitin	59/8,0	52/6,8	nur in Kontrolle	nur in ox-LDL&Gen	30	AAH02515

Tab. 10.9 Relative Spiegel von Proteinen, deren durch ox-LDL verursachte Regulierung in EA.hy926 durch die gleichzeitige Inkubation mit 2,5 μ M Genistein und 1 μ M Daidzein (Gen/Dai) aufgehoben werden konnte. Die Spot-Nummern sind mit denen von Abb. 4.14 und 4.15 identisch.

Spot-Nr.	Proteinbezeichnung	Theo. M _r /pI	Exp. M _r /pI	Regulierungsfaktor		% Sequenzdeckung	Accession Nr.
				ox-LDL/Kontrolle	ox-LDL & GenDai/ox-LDL		
Stoffwechsel							
1	Chain B, Cathepsin D At Ph 7.5	26/5,3	32/4,5	nur in Kontrolle	nur in oxLDL & GenDai	47	1LYWB
2	CMP-N-acetylneuraminic acid synthase	50/8,1	44/6,1	0,4624	2,0125	34	AAF76203
3	coproporphyrinogen oxidase (EC 1,3,3,3) precursor, mitochondrial	41/6,6	40/6,6	0,4010	2,2486	50	I52444
4	Purine-nucleoside phosphorylase (EC 2,4,2,1)	32/6,5	34/3,8	2,7063	nur in oxLDL	49	PHHUPN
5	Transketolase	68/7,9	65/7,4	0,3594	2,4908	34	CAA47919
Detoxifikation							
6	Glutathione-S-transferase (EC 2,5,1,18) pi	24/5,4	26/4,6	0,4902	2,1811	60	A37378
Genregulierung							
7	Alternative splicing factor ASF-2	32/5,6	36/4,5	2,3535	0,3231	39	B40040
8	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D	36/8,1	45/6,4	0,2973	4,2242	25	AAC23476
9	T-cluster binding protein	30/9,1	44/7,8	2,6545	0,1977	38	JC5530
10	Translation initiation factor 6	27/4,6	30/3,0	0,4736	5,9365	56	AA97735

Tab. 10.10 Relative Spiegel von Proteinen, deren durch ox-LDL induzierte Veränderung der Spotintensität in Gelen von EA.hy926 Zellen durch Co-Inkubation dem Extrakt S40cl verhindert werden konnte. Die Spot-Nummern entsprechen denen von Abb. 4.16 und 4.17.

Spot-Nr.	Proteinbezeichnung	Theo. M _r /pI	Exp. M _r /pI	Regulierungsfaktor		% Sequenzdeckung	Accession Nr.
				ox-LDL/Kontrolle	ox-LDL & S40cl/ox-LDL		
	Annexine						
1	Annexin A2	39/7,6	39/4,8	nur in Kontrolle	nur in oxLDL & S40cl	24	ANX2_HUMAN
2	Annexin 1	39/6,6	39/6,2	0,489	2,154	54	ANX1_HUMAN
	Chaperone						
3	DnaK-type molecular chaperone precursor, mitochondrial	74/5,9	66/4,7	nur in Kontrolle	nur in oxLDL & S40cl	30	B48127
	Proteine des Zytoskeletts						
4	Oxygen-regulated protein 150K precursor	111/5,2	55/8,9	0,178	6,016	17	JC5278
5	VPS29-like phosphoesterase-related protein	21/6,3	23/6,2	nur in Kontrolle	nur in oxLDL & S40cl	36	JC7515
6	thymopoietin alpha	76/7,2	78/7,1	0,223	3,092	27	G01161
7	α-Centractin	43/6,2	48/5,9	3,202	0,365	36	S29089
8	LMNA protein	53/6,0	51/5,9	nur in Kontrolle	nur in oxLDL & S40cl	36	AAH33088
9	Fascin	55/6,8	54/6,6	0,4544	1,9693	50	FASC1_HUMAN
	Stoffwechsel						
10	ATP5A1 protein	61/9,1	54/8,2	0,331	2,200	32	AAH39135
11	Ferredoxin reductase, isoform 1 precursor	54/8,7	50/7,7	0,207	6,161	40	AAH02960
12	CMP-N-acetylneuraminic acid synthase	49/8,2	42/6,2	0,468	2,400	34	AAF76203
13	Transketolase (EC 2.2.1.1)	68/7,9	66/7,6	0,419	2,811	35	A45050
14	Ornithine-oxo-acid transaminase (EC 2.6.1.13) precursor	49/6,6	46/5,7	0,498	2,003	31	XNHUO
15	Coproporphyrinogen oxidase (EC 1.3.3.3) precursor, mitochondrial	41/6,7	40/6,8	0,411	2,181	58	I52444

16	26S protease regulatory subunit 6A (TAT-binding protein 1) (TBP-1) (Proteasome subunit P50)	49/5,1	53/4,0	5,569	0,206	25	PRSA_HUMAN
17	Protein disulfide-isomerase (EC 5.3.4.1) precursor	57/4,8	42/4,0	nur in Kontrolle	nur in oxLDL & S40cl	24	ISHUSS
18	3-methylcrotonyl-CoA carboxylase subunit MCCB	62/7,6	59/6,4	0,297	3,712	32	AAK49409
19	Triosephosphate isomerase 1	27/6,5	29/6,3	0,415	2,045	46	AAH17917
20	Kinasen/Phosphatasen Pyruvate kinase, M2 isozyme	58/8,0	63/6,7	2,011	0,369	33	KPY2_HUMAN
	Genregulierung						
21	Heterogenous nuclear ribonucleoprotein H	49/5,9	57/5,5	0,26	3,363	48	I39358
22	HnRNP 2H9B	35/6,4	40/6,2	0,339	2,334	62	AAF68844
23	Platelet-activating factor acetylhydrolase IB alpha subunit (PAF acetylhydrolase 45 kDa subunit) (PAF-AH 45 kDa subunit) (PAF-AH alpha) (PAFAH alpha) (Lisencephaly-1 protein) (LIS-1)	47/7,0	49/7,2	0,456	2,064	30	LIS1_HUMAN
24	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	49/5,9	53/5,3	0,350	2,802	40	I39358
25	HXC-26 protein	39/6,2	41/6,0	3,023	0,527	36	JC5276
26	Splicing factor proline/glutamine rich (polypyrimidine tract binding protein associated)	76/9,5	103/9,5	nur in ox-LDL	0,3751	21	AAH51192
27	Purine-nucleoside phosphorylase (EC 2.4.2.1)	32/6,5	34/5,9	nur in Kontrolle	nur in oxLDL & S40cl	56	PHHUPN
28	U5 snrnp-specific protein, putative	40/8,3	40/8,4	0,238	2,655	39	O95320
29	U5 snRNP-specific 40 kDa protein	40/8,3	39/8,5	0,548	2,664	28	AAAC69625
	weitere Proteine						
30	Chain C, Structure Of The Ran-Gpphhp-Ranbd1 Complex	21/9,6	27/6,7	0,322	2,927	73	1RRPC
31	Alpha-complex protein 1	38/6,7	43/5,9	nur in Kontrolle	nur in oxLDL & S40cl	57	S58529

Tab. 10.11 Relative Spiegel von Proteinen der EA.hy926 Zellen, die für 24 h mit 2,5 µM Genistein inkubiert worden sind.
Die Spot-Nummern sind mit denen in Abb. 4.18 identisch.

Spot Nr.	Proteinbezeichnung	Theo. M _r /pI	Exp. M _r /pI	regulierungsfaktor 2.5 µM Genistein/Kontrolle	% Sequenzdeckung	Accession Nr.
	Annexine					
1	Annexin II	39/7,6	31/6,2	nur in Genistein	45	ANX2_HUMAN
2	Annexin IV	36/5,8	32/5,4	4,01	43	A42007
	Chaperone					
3	BIP Protein	71/5,2	67/3,8	nur in Kontrolle	29	AAF13605
4	Chaperonin containing TCP1, subunit 3 (gamma)	61/6,1	57/5,9	0,47	45	AAH08019
5	T-complex-type molecular chaperone TCP1	61/5,8	55/5,6	2,72	29	S10486
	Proteine des Zytoskeletts					
6	Lamin A	74/5,6	84/6,3	nur in Kontrolle	34	VEHULA
7	T-Plastin	71/5,5	60/5,4	nur in Kontrolle	20	PLST_HUMAN
8	Laminin-binding protein	32/4,8	47/3,8	nur in Kontrolle	47	CAA43469
9	Matrin 3	95/5,9	122/5,6	nur in Kontrolle	37	AAH15031
10	Coactosin-like 1	16/5,5	17/4,9	0,35	42	AAH10039
11	Lamin A	74/6,6	64/6,5	0,40	50	VEHULA
12	Lamin C	65/6,4	60/5,9	nur in Genistein	44	VEHULC
13	Vimentin	54/5,1	43/4,0	2,09	52	VIME_HUMAN
14	Lamin B1	67/5,1	113/4,8	2,32	44	VEHULB
15	Endoplasmin precursor	93/4,8	100/4,1	4,64	31	A35954
	Stoffwechsel					
16	Glucosidase II precursor	107/5,7	102/5,3	nur in Kontrolle	28	CAA04006
17	S-adenosyl homocysteine hydrolase	48/6,0	43/5,9	nur in Kontrolle	30	1A7AB
18	6-Phosphogluconolactonase	28/5,7	27/5,6	nur in Kontrolle	44	CAB57866
19	Nudix hydrolase NUDT5	25/4,7	33/4,2	0,37	35	AAF25479
20	UDP-galactose-4-epimerase	39/6,3	37/6,4	0,47	40	AAH01273
21	dJ776F14.1 (P47 protein)	41/5,0	45/4,6	2,17	46	Q9H102
22	Interstitial collagenase (EC3.4.24.7) precursor	54/6,5	48/6,9	2,86	30	KCHUI

23	Detoxifikation Peroxiredoxin 6	25/6,0	27/6,2		0,46	26	AAH35857
24	Probable thioredoxin peroxidase (EC 1.11.1.-) PAGA	22/8,3	25/8,2		0,48	60	A46711
25	Glutathione transferase (EC 2.5.1.18) pi	24/5,4	25/5,3		0,48	60	A37378
26	Glutathione-S-transferase P (GST class-pi)	24/5,4	23/5,2		3,53	69	O00460
	Kinasen/Phosphatasen						
27	Galactokinase 1	43/6,0	46/7,5		0,33	41	AAH01166
28	Pyruvate kinase, M1 isozyme	58/8,0	50/7,4		0,44	46	KPY1_HUMAN
29	Galactokinase 1	43/6,0	38/5,8			46	AAH01166
	Genregulierung						
30	Elongation factor G1	84/6,6	72/6,2			26	AAK53402
31	Mitochondrial seryl t-RNA synthetase	59/8,4	50/6,7		0,20	43	BAA99557
32	Transformation-sensitive protein IEF SSP 3521	63/6,4	58/6,0			28	A38093
33	Probable transcription factor CA150	124/8,8	130/8,9		nur in Genistein	20	T08599
34	hnRNP2H9A	35/6,4	38/6,5		nur in Kontrolle	52	AAF68847
	weitere Proteine						
35	FLJ20403 protein (Fragment)	33/9,9	77/4,7		0,43	43	AAH52645
36	Testis mitotic checkpoint BUB3	38/6,4	42/6,7		2,16	38	AAAC28439

Tab. 10.12 Relative Spiegel der mittels MALDI-TOF MS identifizierten Proteine von EA.hy926, die mit 2,5 µM Genistein und 1 µM Daidzein (Gen/Dai) inkubiert worden sind.
Die Spot-Nummern sind mit denen in Abb. 4.19 identisch.

Spot-Nr.	Proteinbezeichnung	Theo. M _r /pI	Exp. M _r /pI	Regulierungsfaktor GenDai/Kontrolle	% Sequenzdeckung	Accession Nr.
1	Proteine des Zytoskelett MSN protein (moesin)	39/9,4	32/8,6	0,4801	33	AAH01112
	Stoffwechsel					
2	Putative spliceosome associated protein (breast carcinoma amplified sequence 2)	26/5,5	29/4,6	2,4356	51	AAC64059
3	Acyl-CoA dehydrogenase (EC 1.3.99.-) short/branched chain specific precursor	48/6,5	42/5,3	2,2395	38	A55680
4	Cathepsin D Chain B; Cathepsin D At Ph 7.5	26/5,3	32/4,5	0,2735	47	1LYWB
5	Methionine adenosyltransferase regulatory beta subunit	38/6,9	41/6,9	2,1412	47	AAF28477
6	6-phosphogluconolactonase (Hydrolase)	28/5,7	29/5,3	2,388	44	CAB57866
7	P5 protein precursor	48/4,9	52/4,0	nur in Kontrolle	30	JC4369
8	Triosephosphate isomerase 1 Kinasen/Phosphatasen	27/6,4	29/6,1	2,0017	35	AAH17917
9	ATP sulfurylase/APS kinase 2	70/7,9	64/7,9	2,4837	23	AAC64583
10	Oxygen-regulated protein 150K precursor	111/5,1	53/8,3	0,5057	16	JC5278
	Genregulierung					
11	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	49/5,9	55/6,1	0,2734	36	I39358
12	U5 snRNP-specific 40 kDa protein	40/8,3	41/8,0	0,1674	41	AAC69625
	Weitere Proteine					
13	Hypothetical protein	83/6,1	77/5,5	0,4902	29	CAD97612
14	KSRP	73/6,8	74/6,5	0,4128	27	AAB53222

Tab. 10.13 Relative Spiegel von Proteinen der EA.hy926 Zellen, die mit dem Extrakt S40cl behandelt worden sind.
Die Spot-Nummern entsprechen denen von Abb. 4.20.

Spot-Nr.	Proteinbezeichnung	Theo. M _r /pI	Exp. M _r /pI	Regulierungsfaktor S40cl/control	% Sequenzdeckung	Accession Nr.
Annexine						
1	Annexin A2	39/7,6	34/8,3	nur in Kontrolle	19	ANX2_HUMAN
2	Annexin A2	39/7,6	39/4,8	5,378	24	ANX2_HUMAN
Chaperone						
3	DnaK-type molecular chaperone precursor, mitochondrial	74/5,9	66/4,7	nur in Kontrolle	30	B48127
4	DnaJ protein SB73	36/5,8	36/4,9	nur in Kontrolle	32	AAL56008
5	Endoplasmic precursor	93/4,8	100/3,3	0,3581	28	A35954
Proteine des Zytoskelett						
6	NAG22 protein	56/5,7	83/5,9	0,421	28	AAF69498
7	Lamin A	74/6,6	80/5,8	0,497	33	VEHULA
8	Motor protein	80/5,7	90/5,3	0,489	28	BAA04654
9	Oxygen-regulated protein 150K precursor	111/5,2	55/8,9	0,498	17	JC5278
10	VPS29-like phosphoesterase-related protein	21/6,3	23/6,2	0,455	36	JC7515
11	Endoplasmic-reticulum-luminal protein 28	29/6,8	28/5,2	nur in Kontrolle	42	T09549
12	Lamin C	65/6,4	72/6,1	2,1642	39	VEHULC
Stoffwechsel						
13	TKT protein	59/6,5	70/7,2	0,478	36	AAH24026
14	Coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 3	26/8,5	8/8,7	0,385	28	AAH11596
15	26S protease regulatory subunit 6A (TAT-binding protein 1) (TBP-1) (Proteasome subunit P50)	49/5,1	53/4,0	2,065	25	PRSA_HUMAN
16	Protein disulfide-isomerase (EC 5.3.4.1) precursor	57/4,8	42/4,0	2,474	24	ISHUSS
17	3-methylcrotonyl-CoA carboxylase subunit MCCB	62/7,6	59/6,4	2,438	32	AAK49409

18	Triosephosphate isomerase 1	27/6,5	29/6,3	0,469	46	AAH17917
19	Mitochondrial processing peptidase beta-subunit Detoxifikation	55/6,2	47/5,5	nur in Kontrolle	29	AAC39915
20	Aldehyde dehydrogenase family 7 member A1 (Antiquitin 1)	56/6,2	55/6,2	0,426	33	D7A1_HUMAN
21	Probable Thiol-specific reductase (EC 1.-.-.-) AOE37-2	31/5,9	29/4,6	2,145	36	G01790
22	Probable Thioredoxin peroxidase (EC 1.1.1.1.-) PAGA Kinasen/Phosphatasen	22/8,3	24/8,9	2,004	59	A46711
23	Phosphoprotein phosphatase (EC 3.1.3.16) 1-alpha catalytic chain, splice form 2 [validated]	39/6,2	40/5,4	0,381	54	A46240
24	IKK interacting protein, isoform 1 Genregulierung	43/4,9	53/3,4	0,3387	26	AAH58933
25	Heterogenous nuclear ribonucleoprotein H	49/5,9	57/5,5	0,395	48	I39358
26	DEAD-box protein 3 (Helicase-like protein 2) (HLP2) (DEAD-box, X isoform)	73/6,7	80/6,5	0,433	31	DDX3_HUMAN
27	HnRNP 2H9B	35/6,4	40/6,2	0,497	62	AAF68844
28	mRNA export protein	42/8,0	43/7,8	0,482	40	AAC28126
29	HnRNP protein A2	36/8,7	36/8,1	2,813	34	AAB60650
30	HXC-26 protein	39/6,2	41/6,0	nur in Kontrolle	36	JC5276
31	Splicing factor proline/glutamine rich (polypyrimidine tract binding protein associated)	76/9,5	103/9,5	nur in S40cl	21	AAH51192
32	U5 snrnp-specific protein, putative	40/8,3	40/8,4	0,214	39	O95320
33	U5 snRNP-specific 40 kDa protein Weitere Proteine	40/8,3	39/8,5	nur in Kontrolle	28	AAC69625
34	α -Complex protein 1	38/6,7	43/5,9	0,408	57	S58529

Tab. 10.14 Relative Spiegel von Proteinen der PBMC postmenopausaler Frauen nach der Supplementierung mit einem Isoflavonoid-haltigen Müsliriegel im Vergleich zum Verzehr eines Placebo-Riegels. Die Spot-Nummern stimmen mit denen von Abb. 4.25 überein.

Spot Nr.	Proteinbezeichnung	Theo. M _r /pI	Exp. M _r /pI	Regulierungsfaktor Intervention /Kontrolle	% Sequenz-deckung	Accession Nr.
	Annexine					
1	Catelectrin	76/5,5	18/5,5	2,63	10	AAA35656
	Chaperone					
2	Chain A, heat-shock 70 kD protein 42 kD ATPase N-terminal domain	42/6,7	41/7,1	2,33	25	1HJQA
	Proteine des Zytoskelett					
3	Talin	272/5,8	76/6,4	2,15	10	AAF27330
4	Myosin heavy chain, nonmuscle type A	228/5,5	41/6,7	3,40	7	MYH9_HUMAN
5	Talin	272/5,8	76/6,4	3,62	8	AAF27330
6	Vinculin	117/5,8	64/5,9	2,76	16	AAH39174
7	FLNA protein	89/5,9	38/7,5	2,37	22	AAH14654
8	Talin	272/5,8	76/6,4	2,70	8	AAF27330
9	Vinculin	117/5,8	64/5,9	3,93	18	AAH39174
10	ACTG1 protein	19/5,2	19/5,4	4,18	30	AAH10417
11	Gamma-actin	26/5,7	28/5,7	2,60	40	AAA51580
12	Actin beta	41/5,6	41/6,0	5,79	33	AAH08633
13	Talin	272/5,8	76/6,4	3,66	12	AAF27330
14	Myosin heavy chain, nonmuscle type A	228/5,5	41/6,7	2,06	6	MYH9_HUMAN
	Stoffwechsel					
15	26S protease reg. subunit 8	31/7,0	43/7,6	2,24	36	O43208
16	Alpha enolase	47/7,0	40/6,1	3,96	35	ENOA_HUMAN
17	Protein tyrosine phosphatase	50/5,6	51/5,6	2,33	41	AAA59531
18	YWHAZ protein	33/4,9	22/5,7	3,13	37	AAH68456
19	NADP+-dependent isocitrate dehydrogenase IDPc	47/6,5	42/7,1	3,39	25	AAD29284

20	Aconitase 2, precursor Genregulierung	86/7,6	82/7,7	nur in Kontrolle	44	AAH26196
21	Prohibitin	30/5,6	29/5,7	2,39	55	I52690
22	RNA polymerase III transcription initiation factor B Weitere Proteine	16/5,0	53/6,5	nur in Kontrolle	10	AAG30220
23	Galectin 1	15/5,3	14/5,1	0,31	45	LNHUGB
24	Fibrinogen alpha chain precursor, extended splice form	96/5,7	26/5,7	3,37	15	D44234
25	Thrombospondin	42/6,6	34/7,3	4,92	38	AAA61237
26	Cytosolic thyroid hormone-binding protein	59/8,0	43/6,3	2,13	32	AAA36672
27	Chain A, human platelet profiling complexed with the L-Pro10 peptide	19/8,2	20/8,8	2,76	57	1AWIA
28	Electron transfer flavoprotein beta chain	28/8,6	28/8,8	2,03	38	S32482
29	Pleckstrin	40/8,3	42/7,5	nur in Kontrolle	45	S00755

10.6 Verwendete Primer

Tab 10.15 Oligonukleotid-Primer für die RealTime-PCR.

Kodiertes Protein	Gen Accession Nr.	Forward-Primer (FP) Backward-Primer (BP)	Größe des Amplikons
Dank-type molecular chaperone	OO5345	FP: TCTCTACTGCCGCTGA BP: ACGTCCTGTGCCTTTAT	209 bp
Dusp3	NM004090	FP: CACCCATGTGCTGAAC BP: CCCGGCCATTCTTTTGA	191 bp
Matrin 3	NM018834	FP: AAGTCACAGTCGTCGAT BP: AGGCCTTGCAGGTTT	220 bp
Annexin II	NM004090	FP: GTCTACTGTTACGAAATCC BP: AGGCCCAAATCACCG	303 bp
Capping protein α	NM006135	FP: TCGTGTGTCGGATGAGG BP: GGTCACCGTGCTCTGTAA	227 bp
HPRT	NM000194	FP: CCCTCTGTGTGCTCAAG BP: CTGCCTGACCAAGGAA	266 bp

10.7 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Sofern nicht anders kenntlich gemacht, wurden alle Chemikalien in p.a.-Qualität verwendet.

5 x MMLV-Puffer	Promega, Madison, WI USA
6-Well-Platten	Renner, Dannstadt
30% Acrylamide/ 0,8% Bisacrylamide	Roth, Karlsruhe
Acetonitril	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumhydrogencarbonate	Roth, Karlsruhe
Ammoniumsulfat	Sigma, Deisenhofen
Aprotinin	Sigma, Deisenhofen
BME Vitaminlösung	Gibco BRL, Karlsruhe
Biorad-Reagenz zur Proteinbestimmung	Bio-Rad, München
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe
CHAPS	Sigma, Deisenhofen
Chloroform	Merck, Darmstadt
Commassie brilliant blue (G250)	Serva, Heidelberg
Daidzein	Sigma, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Deisenhofen
DMEM/HEPES	Gibco BRL, Karlsruhe
DNTPs	Fermentas, St. Leon-Rot
EDTA	Roth, Karlsruhe
Essigsäure (konz.)	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Ethylendiamintetraacid (EDTA/Na ₂)	Sigma, Deisenhofen
F1 Hoechst 33342	Hoechst, Frankfurt
F1 Hoechst 33258	Hoechst, Frankfurt
FKS	Sigma, Deisenhofen
Formaldehyd 37%	Roth, Karlsruhe
Genistein	Sigma, Deisenhofen
Gentamycin	Gibco BRL, Karlsruhe
Glasplättchen	Roth, Karlsruhe
Glutardialdehyde	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Gradientengelstreifen pH 3-10 L	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
HCCA (α -Cyano-4-Hydroxy-cinnamic acid (α - Cyano-Hydroxy-Zimtsäure))	Bruker Daltonics, Leipzig

Harnstoff	Roth, Karlsruhe
HEPES	Roth, Karlsruhe
Homocystein	Sigma, Deisenhofen
Iodacetamid	Merck, Darmstadt
Immobiline II	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
IPG Puffer	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Isopropanol	Roth, Karlsruhe
Kaliumchlorid	Roth, Karlsruhe
Leupeptin	Sigma, Deisenhofen
LightCycler – FastStart DNA Master SYBR Green I Kit	Roche Diagnostics, Mannheim
LMW Calibration Standard for SDS electrophoresis	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Magnesiumchlorid	Roth, Karlsruhe
MEM Aminosäuren	Gibco BRL, Karlsruhe
Methanol	Roth, Karlsruhe
MMLV-RT	Fermentas, St. Leon-Rot
MOPS	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe
Natriumcarbonat	Roth, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Natriumthiosulfat	Roth, Karlsruhe
Natriumthiosulfat Pentahydrat	Roth, Karlsruhe
Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Paraformaldehyd	Sigma, Deisenhofen
Penicillin-Streptomycin	Gibco BRL, Karlsruhe
Pepstatin A	Sigma, Deisenhofen
Peptide Calibration Standard	Bruker Daltonics, Leipzig
Pharmalyte	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
PMSF	Sigma, Deisenhofen
Proteinaseinhibitor Mix Complete Mini	Roche Diagnostics, Mannheim
Quadriperm-Platten	Renner, Dannstadt
random-Hexamers	Fermentas, St. Leon-Rot
Reaktionsgefäße (2,0; 1,5; 0,2 ml safe lock)	Eppendorf, Hamburg
RNase-Inhibitor	Fermentas, St. Leon-Rot
RNAwiz	Ambion, Huntingdon, UK
Saccharose	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Roth, Karlsruhe
Silikonöl	Serva, Heidelberg
Tetramethylenethyldiamine (TEMED)	Roth, Karlsruhe
Thioharnstoff	Roth, Karlsruhe
Trypsin	Promega, Madison, WI USA

Trypsin-EDTA	Gibco BRL, Karlsruhe
Trypan Blau-Lösung	Sigma, Deisenhofen
Tubes (15, 50 ml)	Renner, Dannstadt
Zellkulturflaschen	Renner, Dannstadt
Zellschaber	Renner, Dannstadt

10.8 Geräte

Autoklav	Webecco, Fridolfing
Bio-Photometer	Eppendorf AG, Hamburg
Confocal-laser scanning microscope TCS SP2 einschl. Inverted Fluoreszenz-Mikroskop	Leica, Wetzlar
CO ₂ -Brutschrank	Forma Scientific, Frankfurt
Ettan Dalt II large vertical system	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Ettan Dalt II Gel caster	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Ettan Dalt staining tray set	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Fluoroscans Ascent Fluoreszenz Multiwell- Plattenreader	Labsystem, Bornheim-Hersel
Hautstanze, Ø 2 mm, 3 mm	Stiefel Laboratorium GmbH, Offenbach
Heidolph Unimax 1010 kombiniert mit Heidolph Inkubator 1000	Elmer Perkin, Wellesley, USA
Heizkammer	Jouan, Saint-Herblain, Frankreich
ImageScanner	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
IPGcup loading strip holder	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
IPGphor	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Feinwaage	Sartorius GmbH, Göttingen
LightCycler	Roche Diagnostics, Mannheim
Mikroskop Leica DMIL	Leica, Wetzlar
MALDI-TOF-MS Autoflex	Bruker Saxonia, Leipzig
Neubauer-Zählkammer	Roth, Karlsruhe
PCR-Personal Cycler	Biometra, Göttingen
Potter RW20n	MAGV GmbH, Rabenau-Londorf
Reswelling Tray	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Schüttler Rocky	Fröbel Labortechnik GmbH, Lindau
Schüttler Rocky 3D	Fröbel Labortechnik GmbH, Lindau
Sterilbank, FASTER Bio 48	Recon, Stadthagen
Thermocycler PCR-Express	Thermo Life Sciences, Egelsbach
Tischzentrifuge A 14	Jouan, Saint-Herblain, Frankreich
Tischzentrifuge B 4	Jouan, Saint-Herblain, Frankreich
Ultraschallbad	MAGV GmbH, Rabenau-Londorf
Ultraschallstab UP 200s Ultraschallprocessor	Dr. Hielscher GmbH, Teltow
Vakuumpzentrifuge RC 10.10	Jouan, Saint-Herblain, Frankreich
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Zentrifuge B4i	Jouan, Saint-Herblain, Frankreich
Zentrifuge BR4i	Jouan, Saint-Herblain, Frankreich

10.9 Puffer und Lösungen

Medien und Puffer für die Zellkultur

HUVEC

Medium 199

20% hitze-inaktiviertes fetales Kälberserum

2 mM l-glutamine

1% d-glucose

20 mM HEPES

100 U/ml Penicillin

100 µg/ml Streptomycin

EA.hy926 Zellen

DMEM

25 mM Hepes

10% FKS

12,5 µg/ml Gentamycin

1 x MEM-Aminosäurenlösung

1 x BME-Vitaminlösung

400 U/ml Penicillin

400 µg/ml Streptomycin

Phosphat gepufferte Lösung, PBS

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

0,5 mM MgCl₂

1,5 mM KH₂PO₄

4 mM Na₂HPO₄

Der Puffer wurde auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

Aufbereitung von LDL

Dialysepuffer

0,01 M Phosphat-gepufferte Salzlösung

2,7 mM KCl

138 mM NaCl

Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt.

Puffer und Lösungen für die 2D-Gelelektrophorese

Für alle Puffer wurde Aqua bidest. verwendet.

Lysepuffer

7M Harnstoff

2M Thioharnstoff

2% CHAPS

1% DTT

0,8% Pharmalyte

5 mM Proteaseinhibitor CompleteMini

Aliquote von 1 ml wurden bei -80°C gelagert und DTT und Pharmalyte erst vor Gebrauch zugegeben.

Rehydratisierungspuffer

8 M Harnstoff

0,5% CHAPS

15 mM DTT

0,5% Pharmalyte 3-10

Lösung für 12,5%ige SDS-Trenngele

12,5% Acrylamid

0,375 M Tris-HCl, pH 8,8

0,1% SDS

0,1% APS

0,01% TEMED

Equilibrierungspuffer 1

1,5 M Tris-HCl, pH 8,8

6 M Harnstoff

26% Glycerin

2% SDS

1% DTT

Equilibrierungspuffer 2

1,5 M Tris-HCl, pH 8,8

6 M Harnstoff

26% Glycerin

2% SDS

4% Iodacetamid

Sealing Solution

25 mM Tris

192 mM Glycin

0,1% SDS

0,5% Agarose

Bromphenolblau

1xSDS-Laufpuffer

25 mM Tris

192 mM Glycin

0,1% SDS

Fixierlösung

40% Ethanol

10% Essigsäure

Färbelösung

10% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

2% H_3PO_4

25% Methanol

0,625% Coomassie brilliant blue G250

Puffer und Lösungen zur Analyse der mRNA-Spiegel

Agarosegellösung

1 x TAE-Puffer

1,5% Agarose

0,0025% Ethidiumbromid

MasterMix 1 für die Two-Step RT-PCR

Reagenz	Volumen	Hersteller
1) totalRNA	x µl (0,5 µg)	
2) 5xMMLV-Puffer (Endkonzentration von 3 mM MgCl ₂)	8 µl	Promega
3) dNTPs (je 300 µM)	6 µl	Fermentas
4) Aqua bidest. steril	ad 30 µl	

MasterMix 2 für die Two-Step RT-PCR

Reagenz	Konzentration	Volumen	Hersteller
random-Hexamers (0.2µg/µl)	0.08 µg	0.4 µl	Fermentas
RNase Inhibitor (40U/µl)	12.5 U	0.3 µl	Fermentas
MMLV-RT (200U/µl)	200 U	1 µl	Fermentas
Aqua bidest. steril		7.6 µl	

MasterMix 3 für die Two-Step RT-PCR

Reagenz	Endkonzentration	Volumen (in µl)
1) Aqua bidest. steril		6,4
2) MgCl ₂	4 mM	1,2
3) F-Primer (20 µM)	4 pmol	0,2
4) B-Primer (20 µM)	4 pmol	0,2
LigtCycler FastStart DNA Master SYBR Green I	1x	1

Alle für den MasterMix 3 verwendeten Substanzen wurden dem LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I Kit entnommen.

Analyse der Apoptose*Apoptosepuffer*

2 mM EDTA

0,1% CHAPS

5 mM DTT

1 mM PMSF

10 µg/ml Pepstatin A

20 µg/ml Leupeptin

10 µg/ml Aprotinin

10 mM HEPES/KOH

10.10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die einen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet haben und mich in dieser für mich sehr wichtigen Zeit begleitet haben.

Mein Dank gilt besonders Dr. Uwe Wenzel. Du hast mir im Verlauf der letzten Jahre gezeigt, wie echte wissenschaftliche Arbeit erfolgt und wie viel Freude die Wissenschaft bieten kann. Du hast Dir auch für „dumme“ Fragen immer Zeit genommen und mich mit Deinen berühmten Zetteln auf den richtigen Weg gebracht. Deine schier unendliche Geduld mit mir vor einem Vortrag oder einer Posterpräsentation werde ich nie vergessen.

Frau Prof. Dr. Daniel, Ihnen danke ich, für die Möglichkeit in ihrer Arbeitsgruppe als erste Weihenstephaner-Ökotoxikologin eine Promotion verfassen zu dürfen, für ihre konstruktive Kritik und die Möglichkeit meine organisatorischen Fähigkeiten entfalten zu dürfen.

Prof. Dr. Gerald Rimbach danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Mein besonderer Dank richtet sich an Daniela Kolmeder für die große Unterstützung bei meinen ersten Schritten auf dem Gebiet der Transkriptom-Analyse. Isabelle und Katja möchte ich für die Hilfe am Light-Cycler und die endlosen Gespräche zum optimalen Primerdesign und Ansatz zur Auswertung der Daten danken.

Bei allen Teilnehmern der Leinsamen-Interventionsstudie bedanke ich mich dafür, dass sie tapfer Leinsamen gegessen und mir ihr Blut überlassen haben.

Allen Mitgliedern der Isoheart-Gruppe möchte ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit danken.

Katrin, Alex und Daniel, ich danke Euch für die schöne Zeit in unserem Büro, den gemeinsamen Spaß und die Geduld, mit der Ihr meinen Schreibfrust hingenommen habt. Katrin und Katrin, ohne Euch wäre ich manchmal verhungert, unsere gemeinsamen Mittagspausen vermisse ich sehr. Ich möchte mich auch bei allen weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die einzigartige Atmosphäre und die schönen Augenblicke auch jenseits des Laboralltags bedanken.

Meinen Eltern danke ich für ihren Glauben an mich und meine Arbeit. Lieber Martin, ich danke Dir für die fürsorgliche Pflege während meines Schreibwahns, das Korrekturlesen mit Deinen „???“ und Deine Geduld, wenn ich wieder meinen Schlaptop aus dem Fenster werfen wollte.

10.11 Curriculum Vitae

Dagmar Fuchs
Defreggerstraße 12
82110 Germering

geboren am 14. Mai 1977 in St. Wendel
Familienstand: ledig

Schulbildung

- | | |
|-------------|--|
| 1983 – 1987 | Grundschule in Marpingen |
| 1987 – 1994 | Privatgymnasium St. Paulusheim in Bruchsal |
| 1994 – 1996 | Staatliches Landschulheim Marquartstein, Abitur im Juni 1996 |

Hochschulbildung

- | | |
|-------------------|--|
| 11/1996 - 03/2002 | Studium der Ökotoxikologie an der Technischen Universität München

Diplomarbeit: Einflussfaktoren bei der Entkeimung von Verpackungsmaterialien mittels Plasma. |
| seit 04/2002 | Promotion am Lehrstuhl für Ernährungsphysiologie der Technischen Universität München in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. H. Daniel

Thema: Einfluss der Isoflavonoide Genistein und Daidzein auf das Proteom humaner Endothelzellen <i>in vitro</i> und mononukleärer Blutzellen <i>in vivo</i> im Kontext ihrer postulierten anti-atherogenen Aktivität. |