

Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie
der Technischen Universität München
und
Institut für Klinische Chemie
der Medizinischen Hochschule Hannover

**OZONIERTES LOW DENSITY-LIPOPOTEIN (OzLDL) –
HERSTELLUNG UND EFFEKTE AUF NF- κ B-ASSOZIIERTE SIGNALWEGE**

Christian Cappello

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. K. Köhler

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Bacher, i.R.
2. Univ.-Prof. Dr. K. Brand,
Medizinische Hochschule Hannover
3. Univ.-Prof. Dr. S. Weinkauff

Die Dissertation wurde am 10.12.2008 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 20.04.2009 angenommen.

Meinen lieben Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Transkriptionelle Regulation der Genexpression.....	1
1.2. Das NF- κ B-System	2
1.2.1. Transkriptionsfaktoren der NF- κ B/Rel Familie.....	3
1.2.2. I κ B-Inhibitorproteine	3
1.2.3. Die Aktivierung des NF- κ B-Systems	3
1.2.4. Der LPS-Signalweg	7
1.2.5. Der TNF-Signalweg.....	10
1.2.6. NF- κ B-regulierte Gene und deren Funktion.....	11
1.3. Ozon.....	12
1.3.1. Allgemeine Grundlagen	12
1.3.2. Ozon in der Medizin	13
1.3.3. Einfluss von Ozon auf Mechanismen der NF- κ B-Signalübertragung	13
1.3.4. Ozon – ein endogen nachgewiesenes Produkt im Organismus	14
1.4. Arteriosklerose	15
1.4.1. Definition, Ätiologie und Epidemiologie	15
1.4.2. Die Pathogenese der Arteriosklerose – Schaumzellbildung und modifizierte Lipoproteine.....	16
1.4.3. Die Rolle von NF- κ B bei Arteriosklerose	17
1.4.4. Ozon und Arteriosklerose	18
1.5. Fragestellung.....	19
2. Material und Methoden	20
2.1. Material	20
2.1.1. Antikörper	20
2.1.2. Reagenzien und Kits	20
2.2. Methoden	21
2.2.1. Zellkultur.....	21
2.2.2. Ozonierung von Medium, PBS.....	21
2.2.3. Ozonierung von Lipoproteinen bzw. Cholesterin.....	22
2.2.4. Lipidextraktion.....	23
2.2.5. Massenspektrometrie	23

2.2.6. Endotoxin-Test.....	24
2.2.7. Zellvitalitätstest.....	24
2.2.8. Apoptosetest.....	24
2.2.9. Isolierung zytosolischer und nukleärer Extrakte.....	24
2.2.10. Western blot-Analyse.....	25
2.2.11. Gelretardierungsassay.....	26
2.2.12. Immunpräzipitation und Kinaseassay.....	27
2.2.13. Luziferase-Assay.....	27
2.2.14. Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest.....	28
2.2.15. Bestimmung der reaktiven Sauerstoffspezies.....	28
2.2.16. Bestimmung der LPS-Bindung.....	28
2.2.17. Statistische Auswertung.....	29
3. Ergebnisse.....	30
3.1. Vorausgehende Experimente zum Arbeiten mit Ozon und ozLDL.....	30
3.1.1. Löslichkeit von Ozon in wässrigem Milieu.....	30
3.1.2. Effekt von Ozon in wässrigem Milieu auf BHY-Zellen.....	31
3.1.3. Charakterisierung von ozLDL.....	34
3.1.3.1. TBARS-Messung von ozLDL.....	34
3.1.3.2. Die Ozonierung von LDL führt zu einer Abnahme des darin enthaltenen Cholesterins.....	36
3.1.3.3. Massenspektrometrische Untersuchungen von LDL, oxLDL und ozLDL.....	38
3.1.4. Toxizität von ozLDL.....	40
3.1.4.1. Überprüfung der Toxizität von ozLDL.....	40
3.1.4.2. ozLDL zeigt keinen Effekt auf die Zellvitalität.....	42
3.2. Effekte von ozLDL auf das NF- κ B-System.....	43
3.2.1. Hemmung der LPS-induzierten Aktivierung von NF- κ B durch ozLDL.....	43
3.2.2. Dosisabhängigkeit der Inhibierung des NF- κ B-Systems durch ozLDL.....	44
3.2.3. Die ozLDL-abhängige Hemmung der LPS-induzierten Aktivierung von NF- κ B ist in verschiedenen Zelllinien zu beobachten.....	46
3.2.4. Die Inhibierung von NF- κ B durch ozLDL beruht nicht auf einem direkten Effekt von Ozon oder der alleinigen Anwesenheit des Lipoproteins.....	47
3.2.5. Die Inhibierung von NF- κ B durch ozLDL wird nicht durch reaktive Sauerstoffspezies vermittelt.....	48

3.2.6. Es gibt keine Korrelation zwischen den TBARS-Werten und der Inhibierung von NF- κ B durch ozLDL.....	49
3.2.7. Selektive Hemmung des LPS-vermittelten Signalwegs	50
3.2.8. Die Hemmung LPS-induzierter NF- κ B-Aktivierung ist nicht von einem direkten Kontakt mit ozLDL abhängig und ist reversibel.....	51
3.2.9. Die LPS-Bindung an die Zelloberfläche wird nicht von ozLDL blockiert.....	52
3.2.10. Hemmung der I κ B α -Proteolyse durch ozLDL-Vorbehandlung.....	53
3.2.11. Hemmung der NF- κ B-Zielgenexpression durch ozLDL.....	55
3.2.12. ozLDL hemmt die κ B-Promotor-abhängige Transkription.....	57
3.2.13. Hemmung der I κ B-Kinaseaktivität durch ozLDL	58
3.2.14. Hemmung der IRAK-1-Phosphorylierung durch ozLDL	59
3.2.15. Hemmung der IRAK-1-Degradierung durch ozLDL	60
3.2.16. Weitere Anhaltspunkte für eine selektive Hemmung des LPS-vermittelten Signalwegs	61
3.3. Aktive Komponente von ozLDL.....	62
3.3.1. Hemmung des NF- κ B-Systems durch ozoniertes Cholesterin (ozChol)	63
3.3.2. Hemmung von NF- κ B durch α -EChol	64
3.3.3. Hemmung von NF- κ B durch Atheronal A.....	65
4. Diskussion	67
4.1. Ozon in der arteriosklerotischen Läsion	67
4.2. Charakterisierung von ozLDL	67
4.3. Dosisabhängige Hemmung des NF- κ B-Systems durch ozLDL	68
4.4. NF- κ B und modifiziertes LDL.....	70
4.5. Selektivität der inhibierenden Wirkung von ozLDL auf LPS-vermittelte Signalwege	70
4.6. Wirkung von ozLDL und der Ozonierungsprodukte von Cholesterin.....	73
4.7. Immunmodulation durch ozLDL	75
4.8. Dysregulation von NF- κ B bei Arteriosklerose	76
5. Zusammenfassung.....	79
6. Literaturverzeichnis.....	82
7. Anhang	93
7.1. Abkürzungen.....	93
7.2. Anorganische Verbindungen.....	98

7.3. Publikationen	100
7.4. Kongressbeiträge.....	100
7.5. Lebenslauf.....	102

1. Einleitung

In der vorliegenden Arbeit wird der Effekt von ozoniertem Low density-Lipoprotein (ozLDL) auf das NF- κ B (Nuklearfaktor- κ B)-System näher untersucht. ozLDL spielt möglicherweise bei der Pathogenese der Arteriosklerose eine wichtige Rolle. In der folgenden Einleitung wird zunächst das NF- κ B-System näher beschrieben. Im Weiteren werden die Grundlagen zu Ozon erarbeitet und anschließend ein Bezug zu Arteriosklerose hergestellt. Die speziellen Fragestellungen sind in Kapitel 1.5. näher beschrieben.

1.1. Transkriptionelle Regulation der Genexpression

Die Expression spezifischer Gene wird durch ein komplexes Netzwerk von Transkriptionsfaktoren gesteuert, die man in generelle und in regulatorisch wirkende Transkriptionsfaktoren einteilt (1) (Abb.1).

Die generellen Transkriptionsfaktoren, die man zusammenfassend als TFII bezeichnet („Transkriptionsfaktoren der RNA-Polymerase II“, genannt im Einzelnen TFIIA, TFIIB, TFIIC, TFIID, TFIIIE und TFIIF), bilden zusammen mit der RNA-Polymerase II den basalen Transkriptionskomplex, der für die Umschreibung von DNA in RNA benötigt wird (1). Die Aufgabe dieser Gruppe genereller Transkriptionsfaktoren besteht in der Herstellung und in der Stabilisierung eines Kontaktes zwischen der DNA und der RNA-Polymerase II im Bereich eines festgelegten DNA-Abschnittes, dem so genannten Promotor (1, 2). Von einer genau definierten Startstelle innerhalb der Promotorregion wird die RNA-Synthese initialisiert (1, 2).

Die regulatorischen Transkriptionsfaktoren, wie z.B. NF- κ B, sind eine heterogene Gruppe von Proteinen (3), die durch verschiedene Stimuli, wie z.B. Zytokine, bakterielle oder virale Produkte sowie durch verschiedene Formen von zellulärem Stress in ihrem Aktivitätsgrad modifiziert werden können (3). Diese Faktoren binden sequenzspezifisch an regulatorische DNA-Motive innerhalb von Promotor- und von Enhancer-Regionen und tragen so zur Aktivierung oder Hemmung transkriptionaler Prozesse bei. Sie vermitteln ihre Fähigkeit zur Stimulation, indem sie direkt oder indirekt durch Adapterproteine mit den generellen Transkriptionsfaktoren des basalen transkriptionellen Komplexes interagieren und eine Initiierung der Transkription bewirken (1).

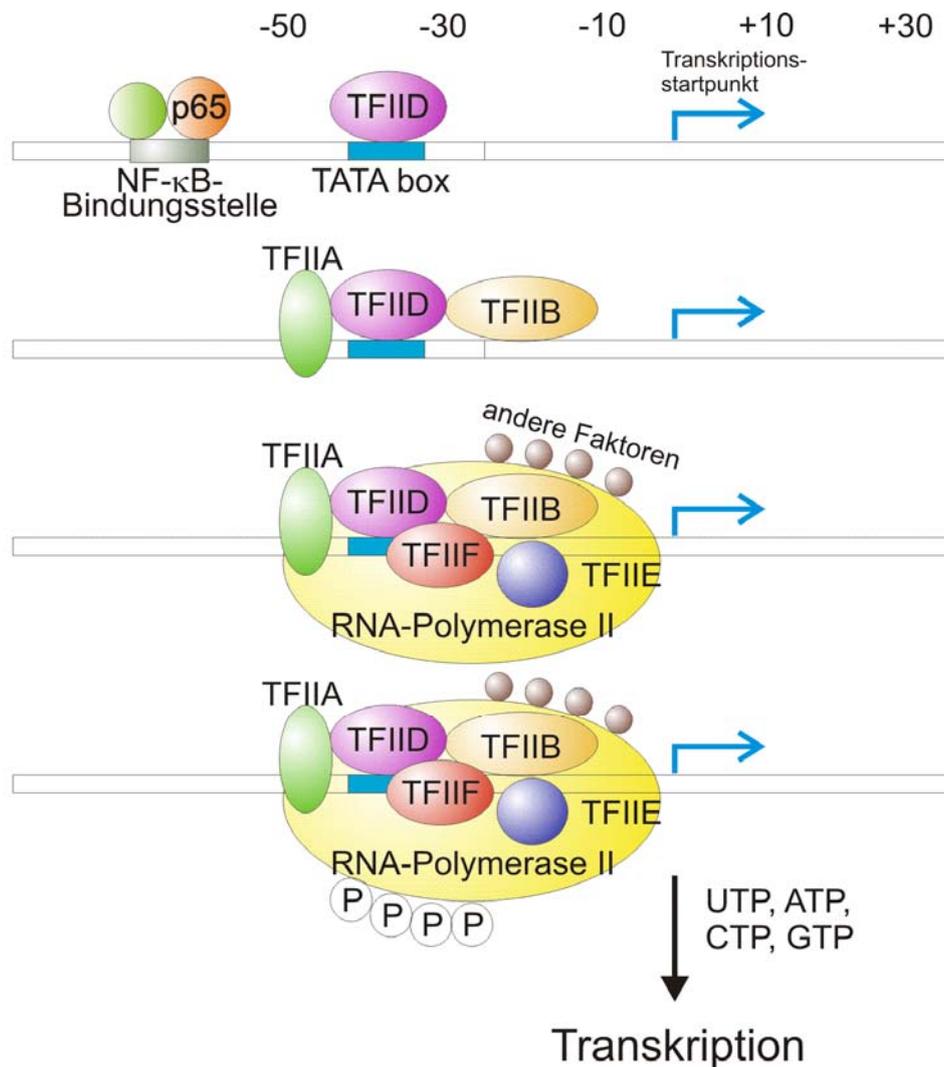


Abbildung 1: Die Initiierung der Transkription. Nach der Bindung von regulatorischen Transkriptionsfaktoren wie NF-κB an DNA-Motive innerhalb von Promotor- und von Enhancer-Regionen bilden die generellen Transkriptionsfaktoren, z.B. TFIIA, B, D, E und F, mit der RNA-Polymerase II den basalen Transkriptionskomplex, der unentbehrlich für die Initiierung der Transkription ist.

1.2. Das NF-κB-System

Transkriptionsfaktoren der NF-κB/Rel-Protein-Familie spielen bei der Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse eine wichtige Rolle. Von zentraler Bedeutung sind sie als Vermittler bei entzündlichen und immunologischen Vorgängen. Außerdem sind sie entscheidend an Proliferations- und Differenzierungsvorgängen sowie am programmierten Zelltod (Apoptose) beteiligt (4-11). Sowohl bei akut und chronisch inflammatorischen Prozessen als auch bei malignen Erkrankungen wird eine Dysregulation von NF-κB postuliert (10-18).

1.2.1. Transkriptionsfaktoren der NF- κ B/Rel Familie

Bei den NF- κ B-Transkriptionsfaktoren handelt es sich um regulatorische Proteine, die aus zwei Untereinheiten zusammengesetzt sind, welche miteinander Homo- und Heterodimere bilden. Der prototypische dimere NF- κ B-Komplex besteht aus p50 und p65 (RelA) (7). Letztere können teilweise durch c-Rel, p52 oder RelB sowie die Vorläuferproteine p105 (p50) und p100 (p52) ersetzt sein (4, 5, 7, 13, 19-21). Ihr gemeinsames Kennzeichen ist die so genannte Rel-Homologie-Domäne (RHD, 300 Aminosäuren), deren Bestandteile für die Dimerisierung (Dimerisierungsdomäne), DNA-Bindung (Helix-Loop-Helix-Motiv, HLH) und nukleäre Translokation („nuclear localization sequence“, NLS) verantwortlich sind (7, 20-22). Zur Komplexbildung mit inhibitorischen I κ B („inhibitor of κ B“-)-Proteinen tragen die NLS und zusätzlich eine C-terminal zur NLS gelegene Region der RHD bei (22). Darüber hinaus verfügen Untereinheiten, wie z.B. p65, in ihrer RHD über eine N-terminale NF- κ B/Rel/dorsal (NRD)-Domäne. Diese ist ebenfalls für die Interaktion mit den I κ B-Proteinen verantwortlich (5, 22).

1.2.2. I κ B-Inhibitorproteine

In unstimulierten Zellen kommt der dimere NF- κ B-Komplex im Zytosol gebunden an verschiedene I κ B-Inhibitorproteine wie I κ B α , - β und - ϵ , vor und wird dadurch neutralisiert (4, 7, 8, 23-25). Außerdem können auch die NF- κ B-Vorstufenproteine p105 (I κ B γ) und p100 (I κ B δ) inhibitorische Funktionen übernehmen (5, 20, 21). Drei bedeutende Regionen sind den I κ B-Inhibitorproteinen gemeinsam: eine N-terminale Signal-Empfänger-Domäne („signal receiving domain“, SRD), eine zentrale ARD („ankyrin repeat domain“) und eine C-terminale säurehaltige PEST („proline-, glutamic acid-, serine- and threonine-rich region“-)ähnliche Domäne (7, 13, 20, 22). Die ARD ist für die Bindung an die NF- κ B-Dimere und die Maskierung der NLS von entscheidender Bedeutung. Über die PEST-Region erfolgt der Kontakt mit der N-terminalen Domäne von p65 (22). Die Vorläuferproteine p105 und p100 verfügen sowohl über die für die NF- κ B-Proteine typische RHD als auch über eine C-terminale ARD, wodurch die beiden Funktionen dieser Proteine widergespiegelt werden (7).

1.2.3. Die Aktivierung des NF- κ B-Systems

Eine Vielzahl verschiedener Stimuli und Bedingungen kann eine Aktivierung des NF- κ B-Systems bewirken (4, 13) (Abb. 2). Hierzu zählen proinflammatorische Zytokine,

einschließlich Tumornekrosefaktor (TNF) oder Interleukin (IL) 1, Bakterien und bakterielle Produkte (z.B. Lipopolysaccharid, LPS), Viren und virale Produkte sowie Wachstumsfaktoren. Darüber hinaus können auch verschiedene Formen von Stress eine Aktivierung des NF- κ B-Systems bewirken. So aktivieren z.B. physikalische (ultraviolette Strahlung) ebenso wie umweltbedingte (Schwermetalle, Zigarettenrauch) Stressfaktoren das NF- κ B-System. Des Weiteren können auch oxidative Produkte, z.B. leicht oxidiertes Low density-Lipoprotein (LDL), so genanntes MM-LDL („minimally modified LDL“), NF- κ B induzieren (5, 7, 13, 19, 21, 26-28).

Für den initialen Schritt der NF- κ B Aktivierung, die Serin-Phosphorylierung der I κ B-Proteine, ist der so genannte I κ B-Kinase (IKK)-Komplex verantwortlich (4, 29-31) (Abb. 3). Dieser hochmolekulare IKK-Komplex besteht aus den Kinasen IKK α , IKK β sowie dem Adapterprotein IKK γ (auch bezeichnet als NF- κ B essential modulator, NEMO; IKK-associated protein 1, IKKAP 1) (7, 32-39). IKK α und IKK β sind die beiden kinaseaktiven Komponenten dieses Komplexes. Sie verfügen über eine N-terminale Serin-Threonin Kinasedomäne (KD) und ein C-terminales HLH-Motiv. Der dazwischen liegende Leucin-Zipper spielt eine wichtige Rolle für die Heterodimerisierung (32, 38, 40). Verschiedene Studien unter Verwendung proinflammatorischer Stimuli zeigen eine essentielle Rolle von IKK β bei der Aktivierung/Inaktivierung des IKK-Komplexes, während für IKK α eine Beteiligung an spezifischen Signalwegen z.B. bei Proliferation bzw. Differenzierung angenommen wird (29, 30, 32, 41). Als weitere Komponente des IKK-Komplexes konnte das Adapterprotein IKK γ nachgewiesen werden, dem regulatorische Funktionen zugeschrieben werden (29, 30).

Eine Stimulation der Zelle induziert eine Phosphorylierung der I κ B-Proteine, z.B. I κ B α , I κ B β und I κ B ϵ , durch den IKK-Komplex. Die Phosphorylierung erfolgt an zwei spezifischen N-terminalen Serinresten in der SRD der I κ B-Proteine: I κ B α an Ser-32/Ser-36, I κ B β an Ser-19/Ser-23 und I κ B ϵ an Ser-18/Ser-22 (25, 40). Dieser Phosphorylierungsschritt ist gefolgt von einer Ubiquitinmarkierung an spezifischen Lysinresten (40, 42, 43). Daraufhin erfolgt der Proteasom-vermittelte Abbau der Inhibitorproteine (4, 21, 23, 44-46). Das nun frei gewordene und damit aktivierte NF- κ B-Dimer transloziert dann in den Zellkern, wo dieser Faktor an regulatorische κ B-Promotor- und an Enhancer-Elemente bindet und in Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren die spezifische Expression zahlreicher Gene steuert (4, 5, 13, 20, 30).

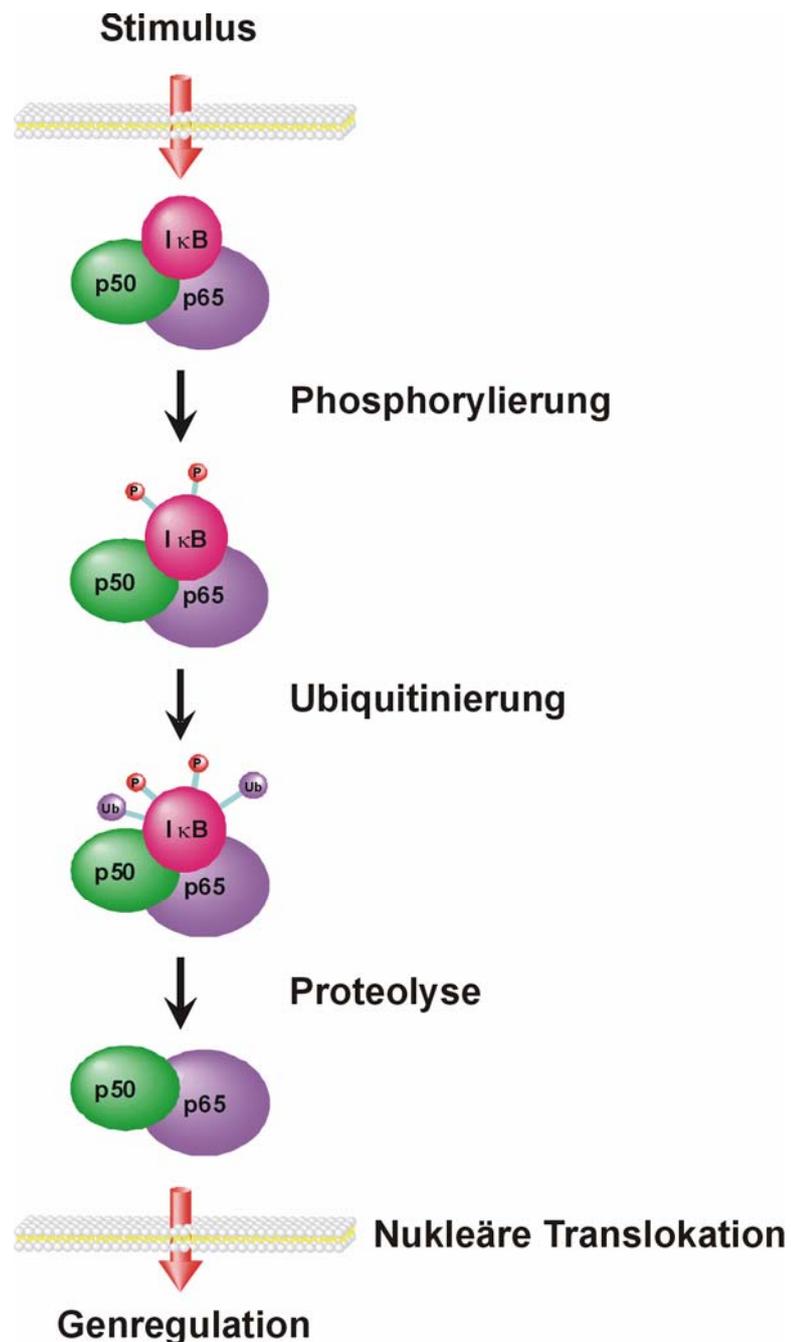


Abbildung 2: Die Aktivierung von NF- κ B. Durch eine Stimulierung der Zelle kommt es zur Phosphorylierung und Ubiquitinmarkierung von I κ B. Dieser Vorgang ist das Signal zur Proteolyse der I κ B-Proteine. Der vom Inhibitor befreite und damit aktivierte NF- κ B-Komplex kann nun in den Zellkern übertreten, um dort an regulatorische κ B-Promotor- und an Enhancer-Elemente verschiedener Zielgene zu binden und so deren Transkription zu beeinflussen.

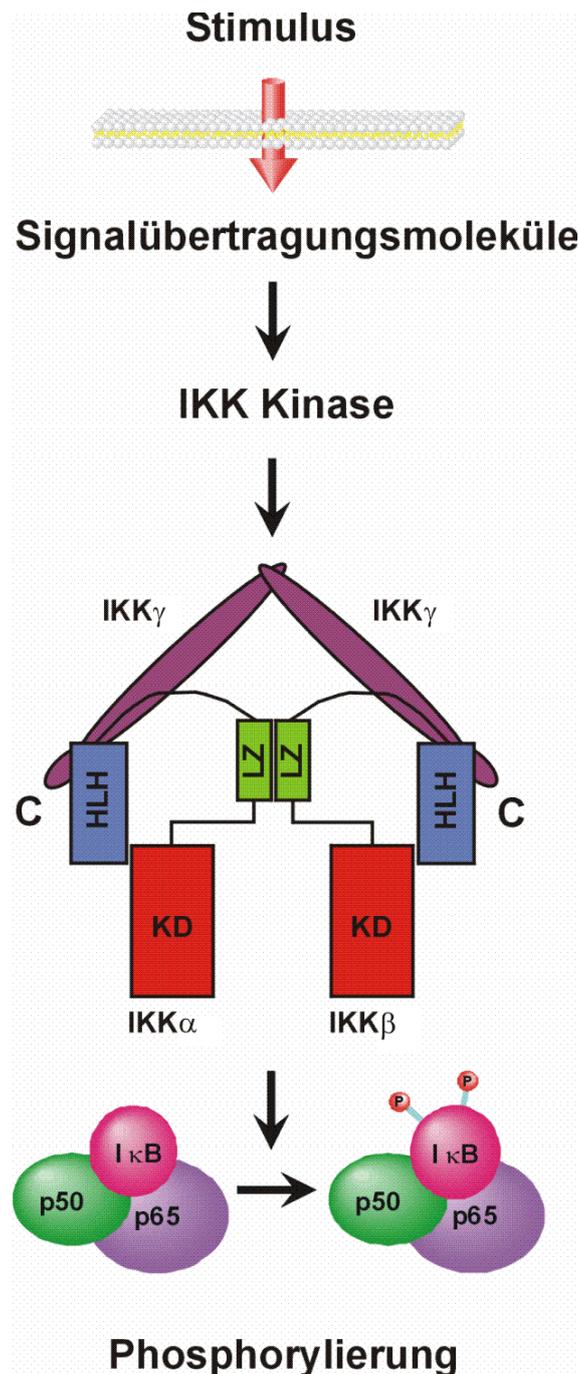


Abbildung 3: Die zentrale Rolle des IKK-Komplexes im NF- κ B-Signalweg. Nach erfolgter Stimulation der Zelle kommt es durch IKK-Kinasen zur Phosphorylierung und damit zur Aktivierung des IKK-Komplexes. Der IKK-Komplex ist aus den beiden Untereinheiten IKK α und IKK β aufgebaut, die jeweils über eine HLH-Domäne, einen Leucin Zipper (LZ) und eine Kinasedomäne (KD) verfügen. Ein weiterer Bestandteil des IKK-Komplexes ist das Adapterprotein IKK γ , welches an die beiden kinaseaktiven Komponenten IKK α und IKK β über seine C-terminale Region bindet. Der IKK-Komplex wird für die Phosphorylierung der I κ B-Proteine und damit letztlich für ihre Degradierung verantwortlich gemacht. Die Abkürzungen sind im Text erklärt.

1.2.4. Der LPS-Signalweg

Lipopolysaccharide sind wichtige Bestandteile der äußeren Membran gramnegativer Bakterien (47). Sie wirken als Antigene und ihre Identifizierung durch das Immunsystem führt z.B. in Monozyten/Makrophagen zur Synthese von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF α und IL1 β (47) (Abb. 4). Zusätzlich ermöglicht ihre Struktur eine serologische Charakterisierung (47). LPS besteht aus drei Teilbereichen: 1) Lipid A (Endotoxin), 2) der Kernregion sowie 3) den Polysaccharidketten. Die meisten Lipid A-Moleküle werden in Konzentrationen im pM-Bereich durch den TLR („toll-like receptor“) 4-Rezeptor detektiert, welcher eine wichtige Rolle im angeborenen Abwehrsystem spielt (47). Das Akute-Phase-Protein LBP („LPS-binding protein“) erkennt in der Blutbahn das LPS und bildet mit dem Lipid A-Rest (in Form von frei zirkulierenden oder noch in der Bakterienmembran eingebetteten Molekülen) stabile Komplexe (48). Die Aufgabe von LBP liegt in der Beschleunigung der Bindung von LPS an CD14 (49). CD14 besitzt weder eine Transmembran- noch eine zytoplasmatische Domäne. Dieses Molekül scheint bei der Präsentation von LPS an dem TLR4/MD2 („myeloid differentiation protein 2“)-Komplex eine wichtige Rolle zu spielen (Abb. 4). MD2 wirkt als extrazelluläres Adapterprotein, bindet LPS und leitet durch die Bindung an extrazelluläre Leucin-reiche Regionen („leucine-rich-repeats“) von TLR4 die Signalübertragung ein. Das Glykoprotein TLR4 besitzt zusätzlich eine zytoplasmatische Domäne, die so genannte Toll/IL1R (TIR)-Domäne. Bis heute sind 4 Adaptermoleküle mit TIR-Domäne bekannt, die für die TLR4-Signalübertragung verantwortlich sind: MyD („myeloid differentiation factor“) 88, Mal („MyD88 adapter-like“) bzw. TIRAP („TIR-domain-containing adapter protein“), TRIF („TIR-domain-containing adapter inducing interferon β “) bzw. TICAM1 („TIR-domain-containing adapter molecule 1“) und TRAM („TRIF-related adapter molecule“) bzw. TIRP („TIR-containing protein“) genannt (49).

Bis jetzt wurden mehrere Signalwege identifiziert, die zur einer MyD88-abhängigen bzw. einer zeitlich verzögerten MyD88-unabhängigen Antwort führen (48). Der erste und schnellere Weg erfolgt über eine Homodimerisierung von TLR4, was zur Rekrutierung von MyD88 führt. Dieses Protein besteht aus einer TIR-Domäne, die durch eine kurze Sequenz mit einer N-terminalen DD („death domain“)-Region verbunden ist. MyD88 bildet außerdem Homo- oder Heterodimere mit anderen TIR-Domäne-Adaptermolekülen wie Mal (48). Die folgende Assoziation von MyD88 mit Proteinen der IL1-Rezeptor-assoziierten Kinasen (IRAK)-Familie erfolgt über DD/DD-Interaktionen (49). Die Familie der IRAK-Proteine besteht aus 4

Mitgliedern: IRAK-1, IRAK-2, IRAK-4 und IRAK-M, denen eine N-terminale DD und eine zentrale Serin/Threonin-Kinase-Domäne gemein sind (50). So führt die Assoziation von IRAK-4 zu einer ersten Phosphorylierung von IRAK-1, was eine Autophosphorylierung dieses Proteins zur Folge hat. Das hyperphosphorylierte IRAK-1 und das daran gebundene TRAF6 („TNF receptor-associated factor 6“) dissoziieren nun vom Rezeptorkomplex und assoziieren an der Membran mit TAB2 („TAK1 binding protein 2“), welches seinerseits die MAPK („mitogen-activated protein kinase“)-Kinase TAK1 („transforming growth factor- β -activated kinase 1“) aktiviert. IRAK-1 wird jetzt, möglicherweise durch einen Ubiquitin-abhängigen Mechanismus, an der Membran abgebaut (48, 51, 52). Das konstitutiv an das Adapterprotein TAB1 gebundene TAK1 fungiert dann als Aktivator der NF- κ B-, p38- und JNK (c-Jun N-terminal kinase)-Signalwege (48). Die Aktivierung von NF- κ B erfolgt jetzt über den IKK-Komplex, wie oben beschrieben.

Der langsamere MyD88-unabhängige Signalweg führt über den Rezeptorkomplex TLR4/TRAM/TRIF. Während TRAM nur ein Verbindungsprotein ist, bindet TRIF an TRAF6 über verschiedene N-terminale TRAF6-Bindungsdomänen (48). Die Weiterführung des Signals verläuft nun wie im MyD88-abhängigen Weg über den IKK-Komplex bis zur Aktivierung von NF- κ B.

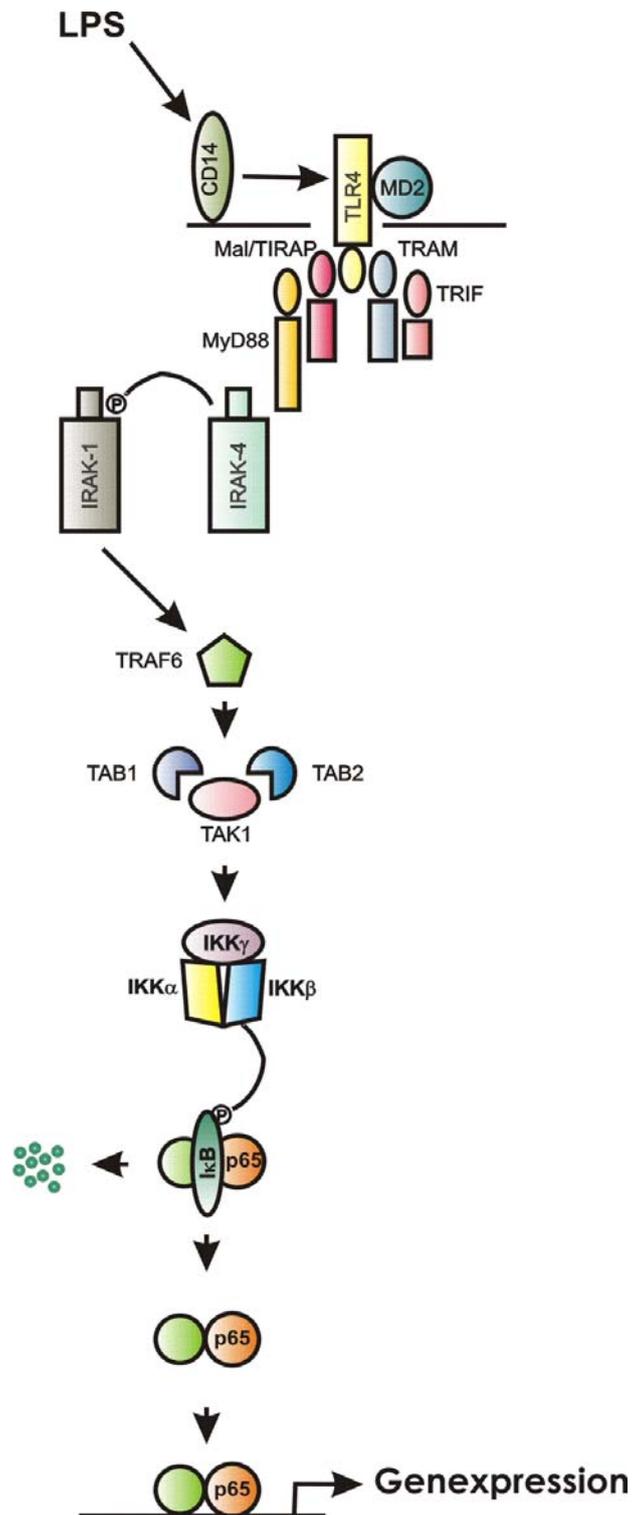


Abbildung 4: Der MyD88-abhängige LPS-Signalweg. LPS wird an CD14 gebunden, welches wiederum am TLR4/MD2-Komplex bindet. Somit wird MyD88 rekrutiert, das mit IRAK-4 assoziiert. IRAK-4 führt zur Phosphorylierung von IRAK-1. An das phosphorylierte IRAK-1-Protein bindet dann TRAF6. Dieser Weg führt über den TAB2/TAK1/TAB1-Komplex zur Phosphorylierung des IKK-Komplexes und der darauf folgenden Aktivierung von NF- κ B. Die Abkürzungen sind im Text erklärt.

1.2.5. Der TNF-Signalweg

Das Zytokin TNF (TNF α) wird von unterschiedlichen Zelltypen und einigen Tumoren produziert und als Mediator bei entzündlichen, immunologischen und malignen Vorgängen angesehen (26, 53). TNF besitzt eine wichtige Funktion bei fundamentalen zellulären Abläufen wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose (26). Eine Dysregulation TNF-vermittelter Signalübertragung besitzt eine Bedeutung bei zahlreichen Erkrankungen wie Sepsis und septischem Schock, rheumatoider Arthritis, chronisch entzündlichen Darm-erkrankungen und bei malignen Prozessen (53, 54).

TNF vermittelt seine Wirkungen durch zwei unterschiedliche Rezeptoren, TNF-R1 (p55) und TNF-R2 (p75) (26). Die Bindung von TNF an TNF-R1/2 führt zu einer Trimerisierung des jeweiligen Rezeptors und zur Anlagerung spezifischer Signalproteine an die zytoplasmatische Domäne (26) (Abb. 5). An TNF-R1 bindet zunächst das TRADD („TNF-R1-associated death domain“-)Protein, welches mindestens drei zusätzliche Mediatoren rekrutiert: RIP1 („receptor-interacting protein 1“), FADD („Fas-associated death domain protein“) sowie TRAF2 („TNF-R-associated factor 2“) (26). Eine Belegung des TNF-R2 resultiert in einer direkten Bindung von TRAF2, welches seinerseits TRAF1 anlagert (26). TRAF2 spielt demnach für beide Rezeptoren eine zentrale Rolle in den frühen Vorgängen der Signalübertragung, die zu einer Aktivierung des IKK-Komplexes und der MAP-Kinasen wie JNK oder p38 führen und den darauf folgenden Aktivierungen von NF- κ B bzw. AP („activator protein“-)1 (26). Die TNF-R1-vermittelte IKK-Aktivierung erfordert sowohl TRAF2 als auch RIP, wobei TRAF2 den IKK-Komplex rekrutiert, während RIP durch eine nicht-enzymatische Interaktion mit IKK γ zur IKK-Aktivierung führt (55). Weitere Studien weisen auf eine Rolle von MEKK3 („mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase-3“) (56), Cdc37 („cell division cycle 37 homolog“), Hsp90 („Hitzeschockprotein 90“) (57), Sphingomyelinasen sowie aPKC („atypische Proteinkinase C“) (26, 58) bei der Aktivierung von NF- κ B durch TNF hin.

Wie schon oben erwähnt, kann TNF α auch die Apoptose einleiten (26). Eine Stimulation mit TNF führt über TRADD und FADD zur Aktivierung von Caspase 8. Anschließend aktiviert die durch TNF α induzierte Caspase 8 das Bid („BH3 interacting domain death agonist“-)Protein oder die Caspase 3, die zahlreiche Proteine spaltet und dadurch den Zelltod induziert (59).

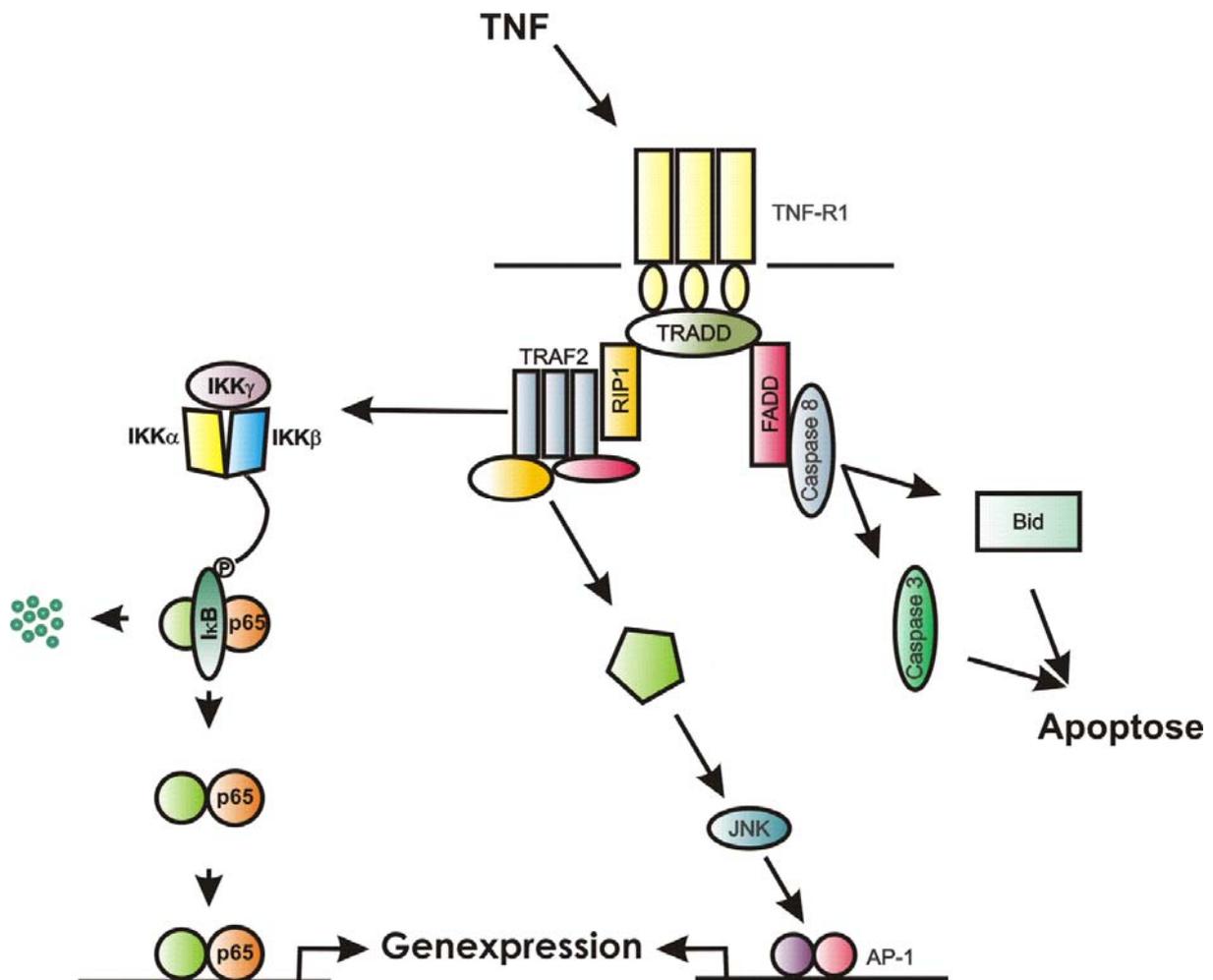


Abbildung 5: Der TNF-Signalweg. Die Anlagerung von TNF an TNF-R1 führt zur Trimerisierung und zur Rekrutierung von TRADD. An TRADD können dann FADD, RIP und TRAF2 binden. TRAF2 spielt eine zentrale Rolle bei der Aktivierung des IKK-Komplexes und der MAP-Kinasen wie JNK und letztendlich bei der Aktivierung von NF- κ B sowie AP-1. Außerdem vermittelt TNF den programmierten Zelltod. Die Abkürzungen sind im Text erklärt.

1.2.6. NF- κ B-regulierte Gene und deren Funktion

NF- κ B reguliert die Expression vieler verschiedener Gene. Diese sind sowohl an entzündlichen und immunologischen Prozessen (TNF, IL1, IL6) als auch an Vorgängen der Zellproliferation (z.B. G/M-CSF, „granulocyte/macrophage-colony stimulating factor“; c-myc) beteiligt (7, 10, 13, 23). Darüber hinaus spielen NF- κ B-Zielgene eine Rolle bei Chemotaxis (z.B. IL8; MCP1, „monocyte chemotactic protein 1“), Adhäsionsvorgängen (z.B. ICAM1, „intercellular adhesion molecule 1“; VCAM1, „vascular cell adhesion molecule 1“; ELAM, „endothelial-leucocyte adhesion molecule“) und der Thrombogenese (z.B. Tissue-

Faktor) (28, 60-67). Eine entscheidende Rolle wird NF- κ B auch bei apoptotischen Vorgängen zugeschrieben. Dabei beruht die antiapoptotische Wirkung von NF- κ B einerseits auf einer Induktion antiapoptotischer Gene (z.B. Mangan-Superoxid-Dismutase, Zinkfingerprotein A20, die Bcl-2-Homologen A1/Bfl-1, IAP- und TRAF-verwandte Moleküle) und andererseits auf einem Antagonismus der Caspase 8-Aktivität und p53-Funktion (68-70). Eine Autoregulation des Systems ist dadurch gewährleistet, dass das Inhibitorprotein I κ B α ebenfalls der transkriptionellen Regulation durch NF- κ B unterliegt.

1.3. Ozon

1.3.1. Allgemeine Grundlagen

Ozon ist ein dreiatomiges Sauerstoffmolekül, dessen starkes Oxidationsvermögen fast das des atomaren Sauerstoffs erreicht und nur von wenigen Stoffen übertroffen wird (F_2 , $S_2O_8^{2-}$, H_4XeO_6 , KrF_6) (71). Im Gaszustand ist Ozon blau, im flüssigen Zustand (Sdp. $-110.5^\circ C$) violettblau und im festen Zustand (Smp. $-192.5^\circ C$) schwarz-violett. Es besteht aus gewinkelten Molekülen (Bindungswinkel 117°) mit gleich langen O–O-Abständen (128 pm) und somit einer delokalisierten π -Bindung (71) (Abb. 6).

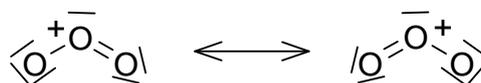
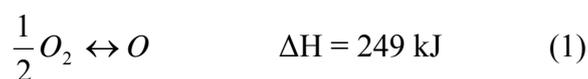


Abbildung 6: Mesomere Grenzstrukturen von Ozon.

Die Darstellung erfolgt ganz allgemein durch Einwirkung von Sauerstoffatomen auf Sauerstoffmoleküle:



Demnach ist Ozon eine endotherme Verbindung ($\Delta H = 143 \text{ kJ}$) und thermodynamisch so instabil, dass es selbst bei $-120^\circ C$ stark explosiv ist. In der Stratosphäre wird Ozon durch UV-Strahlung gebildet. Die Energie, die dafür benötigt wird, entspricht einer Wellenlänge von $\lambda < 240 \text{ nm}$. Demnach wird Ozon bei $\lambda < 310 \text{ nm}$ wieder abgebaut. Dieses Gleichgewicht führt

zur Bildung der Ozonschicht, einem wichtigen Schutzschild gegen ultraviolette Strahlung. Industriell wird Ozon durch stille elektrische Entladungen hergestellt (71).

Auf Grund seiner herausragenden Fähigkeit, Mikroorganismen (Bakterien, Viren, Parasiten) abzutöten, wurde Ozon schon sehr früh zur Wasserdesinfektion sowie zur Konservierung von Lebensmitteln eingesetzt (72-76). Jüngste Untersuchungen entdeckten Ozon sogar als hoch potentes bakterizides Biomolekül an der Schnittstelle zwischen angeborener und erworbener Immunität und postulieren eine regulatorische Rolle bei entzündlichen Prozessen (77, 78). Die therapeutische Bedeutung von Ozon in der Medizin bzw. Zahnmedizin ist nur ungenügend untersucht.

1.3.2. Ozon in der Medizin

In der Vergangenheit wurde Ozon für mehrere therapeutische Ansätze verwendet. So wurde z.B. versucht, frische Hautwunden (Ulcera cruris, Fisteln, Abszesse, Gangrän, Dekubitalgeschwüre), Verbrennungen und Virusinfekte (Herpes simplex, Herpes zoster) durch Spülen mit ozoniertem Wasser zu desinfizieren und dadurch schneller zur Ausheilung zu bringen. Darüber hinaus wurde Ozon aber auch in Form von subkutanen, intramuskulären und intraarteriellen Injektionen sowie als rektale Insufflationstherapie (chronisch entzündliche Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa) zum Einsatz gebracht. Die Brennpunkte der Zahnmedizin (Karies, Endo- und Parodontopathien) erscheinen jedoch aufgrund ihrer in erster Linie mikrobiellen Ätiologie besonders geeignet für einen kurativen Einsatz von Ozon (79). Ein weiterer, eher spekulativer therapeutischer Ansatz, ist die so genannte extrakorporale Ozon-Eigenblutbehandlung, bei der dem Patienten Blut entnommen wird, welches dann extrakorporal mit exakt vorgegebenen Mengen Ozon angereichert und reinfundiert wird. Dieses Verfahren soll bei der Behandlung arterieller Verschlusskrankheiten und zur Anregung einer geschwächten Immunabwehr therapeutischen Nutzen erbringen (80).

1.3.3. Einfluss von Ozon auf Mechanismen der NF- κ B-Signalübertragung

Neben seiner Fähigkeit Mikroorganismen abzutöten, besitzt Ozon eine hohe Reaktivität gegenüber verschiedenen Biomolekülen und nimmt möglicherweise Einfluss auf immunologische zelluläre Prozesse (77, 78, 81). In Zellen des Respirationstrakts bzw. in Leukozyten bewirkte Ozon, das allerdings in diesen Experimenten ausschließlich in Gasform appliziert wurde, eine Modulation des Aktivierungsstatus von Transkriptionsfaktoren wie NF-

κ B, C/EBP β („CCAAT/enhancer-binding protein β “) und AP-1, bestimmt durch Gel-retardierungsassays (82-84). Je nach Bedingung aktivierte Ozon die Expression von Zytokinen oder Chemokinen wie IL8 oder MCP1 bzw. hemmte die Expression von IL2 (85-88). Eine Transkriptom-Analyse mit Lungengewebe identifizierte 260 Ozon-sensitive Gene, von denen 80% inhibiert und 20% induziert waren (89). Unter den Ozon-sensitiven Genen wurden mehrere NF- κ B-regulierte sowie einige mit der Immunantwort in Zusammenhang stehende Gene gefunden. Die Effekte von Ozon auf die NF- κ B-assoziierte Signalübertragung/Transkription sind zum jetzigen Zeitpunkt nicht weiter charakterisiert. Außerdem wurde die Wirkung von Ozon in wässrigem Milieu auf die genannten transkriptionellen Systeme nicht untersucht.

1.3.4. Ozon – ein endogen nachgewiesenes Produkt im Organismus

Neben dem Vorkommen von Ozon in unserer Atmosphäre wurde in letzter Zeit überraschenderweise in mehreren Studien ein endogenes Vorkommen von Ozon im menschlichen Organismus postuliert (77, 78, 81, 90). Dabei soll Ozon insbesondere an der körpereigenen Immunabwehr beteiligt sein. In diesem Zusammenhang ist sehr interessant, dass in neueren Studien Hinweise dafür gefunden werden konnten, dass Ozon auch *in vivo* als Teil der Immunabwehr generiert wird und eine wichtige Rolle bei der körpereigenen Regulation von Entzündungen spielt (77, 90). Es wurde nachgewiesen, dass während der Bekämpfung von Bakterien ein Molekül gebildet wird, das exakt die chemischen Eigenschaften von Ozon aufweist (77, 90). Dieses Ozon wird offenbar von körpereigenen Antikörpern gebildet, wenn bakterielle Infektionen durch aktivierte Leukozyten, insbesondere B-Lymphozyten, bekämpft werden (77, 90). Diese Produktion von Ozon als Antwort auf Inflammation durch Antigen-Antikörper-Komplexe wurde als „antibody-catalyzed water-oxidation pathway“ bezeichnet (77, 90). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass das auf diese Weise gebildete Ozon in der Lage ist, Bakterien abzutöten (77, 90). Diese Hinweise auf das *in vivo*-Vorkommen eines so reaktiven Moleküls wie Ozon und dessen Beteiligung an der körpereigenen Immunabwehr eröffnen völlig neue Forschungsansätze, wenn die Vielzahl von potentiellen Reaktionspartnern von Ozon im menschlichen Gewebe vor Augen geführt wird. Auf die Rolle von Ozon bei der Entstehung von arteriosklerotischen Veränderungen von Arterien wird in Kapitel 1.4.4. eingegangen.

1.4. Arteriosklerose

1.4.1. Definition, Ätiologie und Epidemiologie

Die Arteriosklerose ist eine chronisch-entzündliche, systemische Erkrankung mit herdförmigen Veränderungen der mesenchymalen Zellen der inneren Gefäßwand (Intima) und der inneren Schichten der mittleren Gefäßwand (Media), die bevorzugt große und mittelgroße elastische sowie muskuläre Arterien befällt (91).

Die Arteriosklerose beginnt asymptomatisch schon im Kindesalter, entwickelt sich bei Menschen über viele Jahre und führt im mittleren und hohen Alter zu den typischen Organschädigungen. Die Erkrankung hat eine multifaktoriell bedingte Genese, der sowohl exogene Risikofaktoren als auch genetische Veranlagung zu Grunde liegen. Dabei werden unbeeinflussbare Risikofaktoren (familiäre Disposition, Lebensalter, männliches Geschlecht) abgegrenzt von beeinflussbaren Faktoren, die in zwei Gruppen eingeteilt werden können. Zu den Risikofaktoren erster Ordnung werden Dyslipoproteinämien (hohes Gesamtcholesterin, hohes LDL-Cholesterin, niedriges HDL-Cholesterin), Bluthochdruck, Diabetes mellitus und Nikotinabusus gezählt. Als Risikofaktoren zweiter Ordnung gelten hohes Lipoprotein (a), Antiphospholipid-Antikörper, Hyperfibrinogenämie, Hyperhomocysteinämie, Bewegungsmangel und Adipositas. Am Beginn der arteriosklerotischen Läsion steht die endotheliale Dysfunktion. Dieses Stadium ist charakterisiert durch die Einlagerungen von Lipiden, Einwanderung von Makrophagen und T-Lymphozyten sowie Migration und Proliferation glatter Muskelzellen in die Gefäßwand (61, 91). Daraus entwickelt sich die so genannte arteriosklerotische Plaque. Die verminderte Vasorelaxation sowie die Raumforderung in der Gefäßwand behindern den Blutstrom. Hinzu kommen prokoagulatorische Prozesse (65). Es treten Thrombosen durch Lumeneinengung oder Ruptur der Plaques auf. Unter lokaler Aktivierung der Blutgerinnung führen diese zum kompletten Gefäßverschluss. Das Endstadium der Arteriosklerose ist daher die Infarzierung des abhängigen Gewebes (91). Prinzipiell kann die Arteriosklerose jede Arterie des Organismus befallen. Am häufigsten sind jedoch die Gefäße folgender Organe betroffen: Herz (Angina pectoris, Herzinfarkt), Gehirn (transitorische ischämische Attacke, Schlaganfall), Extremitäten (periphere arterielle Verschlusskrankheit mit Claudicatio intermittens, Gangrän).

Die Arteriosklerose ist, als Folge der Veränderungen an Herz und Gehirn, die häufigste Ursache für Tod und Behinderung in den westlichen Industrienationen (91). Die ischämische

Herzerkrankung und der Myokardinfarkt stellen hierbei die bedeutsamsten Organschädigungen dar.

1.4.2. Die Pathogenese der Arteriosklerose – Schaumzellbildung und modifizierte Lipoproteine

Die Arteriosklerose entwickelt sich in mehreren Stadien. Die oben beschriebenen Risikofaktoren führen zu Beginn des arteriosklerotischen Krankheitsprozesses zur Schädigung der Endothelzelle. Dadurch können die eigentlichen Aufgaben der Zelle – Aufrechterhaltung des Gefäßtonus, Regulation von Thrombozyten- und Leukozyten-Adhäsion, Hemmung der Migration und Proliferation glatter Muskelzellen – nicht mehr erfüllt werden (61, 67, 92). Molekulare Mechanismen sind dabei die verminderte Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO) und die vermehrte Bildung von freien Sauerstoffradikalen. Der daraus resultierende oxidative Stress ist für jedes Stadium der Arteriosklerose pathophysiologisch von großer Bedeutung.

Durch Einlagerung von Lipiden und Migration von Makrophagen und glatten Muskelzellen in die arteriosklerotische Läsion kommt es zur Entstehung so genannter „Fatty-Streak“-Läsionen. Oxidiertes LDL (oxLDL) wandert durch das Endothel in die Gefäßwand ein und führt dort zu einer abnormen Lipidablagerung innerhalb der Gefäßwand (93-97). In der Folge kommt es zur Akkumulation von Makrophagen und die glatten Gefäßmuskelzellen proliferieren in der so entstandenen Neointima (61, 91). Zu diesem Zeitpunkt der Arteriosklerose besteht allenfalls eine geringe Raumforderung in der Gefäßwand und nur selten eine Lumeneinengung.

Ein weiteres Charakteristikum ist das Auftreten von so genannten Schaumzellen (98). Diese Zellen entstehen dadurch, dass Makrophagen das im Überschuss vorhandene Fett phagozytieren und so zu Adipozyten-ähnlichen Zellen degenerieren. Bei der Entstehung von Schaumzellen spielt die Modifizierung von Lipoproteinen eine große Rolle. Durch die Einlagerungen in die Arterienwand können diese Lipoproteine enzymatisch oder nicht-enzymatisch modifiziert werden (97, 99, 100). Dabei stellte sich heraus, dass die Oxidation von LDL (oxLDL) zu einer erhöhten Bindung dieses Lipoproteins an Makrophagen führt.

Durch eine weitere Einwanderung von Makrophagen und T-Zellen und insbesondere eine verstärkte Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen kommt es dann zur Entstehung der arteriosklerotischen Plaque. Dies führt zu einer Raumforderung im Bereich der Gefäßwand und zu einer Beeinträchtigung des Blutflusses. Die Plaque wird meist durch eine fibröse

Kappe und die darüber liegende Endothelzellschicht vom Gefäßlumen abgeschirmt. Dabei treten zusätzlich Kalzifizierungsprozesse auf, die der kalzifizierenden Arteriosklerose („Gefäßverkalkung“) ihren Namen gegeben haben .

Als Komplikation kann es bei der Arteriosklerose zur Ruptur einer Gefäßläsion kommen. Die Ruptur führt zum Kontakt der Gefäßwand und des Plaqueinhalts mit dem zirkulierenden Blut. Dieser direkte Kontakt bedingt eine rasche Aktivierung der Thrombozyten und eine nachfolgende Thrombose, die zum kompletten Verschluss des betroffenen Gefäßes und damit zur Infarzierung des abhängigen Gewebes führt.

1.4.3. Die Rolle von NF- κ B bei Arteriosklerose

Wie schon in Kapitel 1.2. erwähnt spielt der Transkriptionsfaktor NF- κ B bei der Regulation zahlreicher zellulärer Prozesse eine wichtige Rolle. Viel deutet darauf hin, dass eine Dysregulation des NF- κ B-Systems auch zur Entstehung der Arteriosklerose beiträgt (61, 65, 92). *In situ* kann in der arteriosklerotischen Läsion aktiviertes NF- κ B nachgewiesen werden (16, 62). Hierbei wird die aktivierte Form von NF- κ B vor allem in Monozyten und Makrophagen sowie in glatten Muskelzellen gefunden. In früheren Stadien der Arteriosklerose lässt sich aktiviertes NF- κ B auch in Endothelzellen nachweisen. Es wird vermutet, dass mehrere NF- κ B-Zielgene bei Vorgängen der Atherogenese eine Rolle spielen. Dabei sind sowohl Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren, Adhäsionsmoleküle und Proteasen als auch prokoagulatorische und anti-apoptotische Proteine beteiligt. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass sich in der Läsion zahlreiche Moleküle befinden, die zumindest *in vitro* das NF- κ B-System in den pathogenetisch entscheidenden Zellen modulieren können. Hierzu zählen TNF, IL1, aktivierte Thrombozyten, bakterielle und virale Produkte, oxLDL, Thrombin und Fibronectin (10, 27, 64, 101). Diese Induktion von NF- κ B-regulierten Genen könnte auf die Entstehung der arteriosklerotischen Läsion und auf den Progress der beteiligten entzündlichen Prozesse Einfluss haben. Funktionell wird durch die Induktion von NF- κ B-Zielgenen die Chemotaxis von Monozyten und Lymphozyten gefördert, deren Transmigration wiederum durch spezifische NF- κ B-regulierte, endotheliale Adhäsionsmoleküle gesteuert wird. Außerdem kommt es in dieser frühen Phase durch die Aktivierung des NF- κ B-Systems zu einer vermehrten Expression von Wachstumsfaktoren, die die Proliferationsvorgänge im Gefäßendothel fördern. NF- κ B ist aber auch in späteren Stadien der Arteriosklerose von Bedeutung, z.B. wiederum bei der Produktion von Wachstumsfaktoren, bei der Expression von prokoagulatorischen Proteinen aber auch bei der

Produktion von Proteasen sowie bei der Apoptose (16). Desweiteren kommt es zu einer vermehrten Produktion von Tissue-Faktor, wodurch das Risiko thrombotischer Ereignisse erhöht wird (27).

1.4.4. Ozon und Arteriosklerose

Neuere Studien geben Hinweise auf das Vorkommen von Ozon in humanen arteriosklerotischen Arterien (77, 78, 81). Bestimmte Moleküle, die ausschließlich durch die Ozonierung von Lipiden entstehen, wurden in arteriosklerotischem Gewebe nachgewiesen, welches durch Endarteriektomie der Arteria carotis gewonnen wurde. Dies lässt vermuten, dass Ozon während der Entstehung der arteriosklerotischen Läsion gebildet wird. Zusätzlich wurde eine Zunahme dieser Ozon-spezifischen Produkte festgestellt, wenn arteriosklerotisches Gewebe aus der Plaque kultiviert und *in vitro* aktiviert wurde (78). Außerdem konnte die Produktion von Ozon durch Antikörper bei der körpereigenen Immunantwort nachgewiesen werden (antibody-catalyzed water-oxidation pathway, siehe Kap. 1.3.4.). Alle Komponenten, die nötig sind, diesen Ozon-produzierenden Abwehrmechanismus zu aktivieren, finden sich interessanterweise in arteriosklerotischen Läsionen. Die arteriosklerotische Läsion zeichnet sich durch die Akkumulation von Lipoproteinen aus (77, 78, 90). Von diesen Lipoproteinen ist bekannt, dass sie in modifizierter Form zur Entstehung der Arteriosklerose beitragen. Daher stellte sich die Frage, wie sich die Ozonierung von Lipoproteinen auf zelluläre Funktionen auswirkt.

1.5. Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, wie Lipoproteine, die mit Ozon behandelt wurden, das NF- κ B-System beeinflussen. Dafür wurde eine Bedingung zur Herstellung von ozLDL für Zellkultur-Experimente erarbeitet und anschließend wurden diese Lipoproteine weiter charakterisiert. Schließlich sollten die aktiven Komponenten von ozLDL identifiziert werden, die den NF- κ B-Signalweg modulieren.

Folgende Fragestellungen wurden dabei behandelt:

- In initialen Experimenten wurde ozLDL hergestellt und mittels verschiedener Methoden charakterisiert. Dabei sollte der Unterschied zwischen ozLDL und dem schon bekannten oxLDL herausgearbeitet werden.
- Anschließend sollten weitere Untersuchungen einen toxischen Effekt auf die eingesetzten Zellmodelle ausschließen.
- Als nächstes sollten die Auswirkungen von dem hergestellten ozLDL auf die durch LPS- und TNF-induzierte NF- κ B-abhängige Signalübertragung in monozytären Zellen aber auch Endothelzellen untersucht werden.
- Schließlich wurde die Wirkung von ozoniertem Cholesterin (ozChol) und verschiedener Ozonierungsprodukte von Cholesterin auf das NF- κ B-System überprüft.

Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse zeigen die Herstellung und Charakterisierung von ozLDL. Dieses modifizierte Lipoprotein weist einen hemmenden Effekt auf die LPS-vermittelte Signalübertragung des NF- κ B-Wegs auf. Diese Tatsache bedeutet wiederum, dass die vorgestellten Daten möglicherweise wichtige Ansatzpunkte für die Entwicklung neuer therapeutischer und diagnostischer Strategien bei entzündlichen oder auch malignen Erkrankungen liefern.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Antikörper

In der vorliegenden Studie wurden Antikörper (Ak) gegen folgende Antigene verwendet:

Aktin	polyklonaler (p)Ak gegen C-Terminus (Sigma, Deisenhofen)
IκBα	pAk gegen C-Terminus (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)
p65	pAk gegen C-Terminus (Santa Cruz Biotechnology)
IKKγ	pAk (Santa Cruz Biotechnology)
IRAK-1	pAk gegen C-Terminus (Santa Cruz Biotechnology)
IRAK-1	monoklonaler (m)Ak gegen C-Terminus (Santa Cruz Biotechnology)
ApoB	pAk gegen C-Terminus (Santa Cruz Biotechnology)
Sekundäre Ak	Peroxidase-konjugierter, polyklonaler Ziege-Ak gegen Kaninchen-IgG (Dianova, Hamburg)

2.1.2. Reagenzien und Kits

Tumornekrosefaktor (TNF), Lipopolysaccharid bzw. Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-Lipopolysaccharid (LPS, *E. coli* 0111:B4) sowie das 5α,6α-Cholesterinepoxid (α-EChol) wurden von Sigma (München) bezogen. 3β-Hydroxy-5-oxo-5,6-secocholestan-6-al (Atheronal A) wurde von Prof. P. Wentworth (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA) zur Verfügung gestellt. Alle weiteren Reagenzien stammten von den Firmen Biochrom (Berlin), Miltenyi-Biotec (Bergisch Gladbach), GibcoBRL (Carlsbad, CA, USA) Merck (Darmstadt) Bio Whittaker (Verviers, Belgien), Promega (Mannheim), Biorad (München) und Sigma. Sie entsprachen der „Qualität zur Synthese“.

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

Für den Großteil der Untersuchungen wurden monozytäre THP-1-Zellen (DSMZ, Braunschweig) eingesetzt. Die toxikologischen Untersuchungen im Rahmen zahnmedizinischer Studien fanden mit mundepithelialen BHY-Zellen (DSMZ) statt. Weiterhin wurden Experimente mit primären humanen Monozyten/Makrophagen und in HUVEC (Promocell, Heidelberg) Endothelzellen durchgeführt.

BHY-Zellen wurden in DMEM (Biochrom) unter Zusatz von 10% fötalem Kälberserum (FKS), 100 U/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin bis zur Konfluenz kultiviert (37°C, 5% CO₂) und alle 2-3 Tage nach Ablösen mittels EDTA/Trypsin gesplittet. Für die Experimente wurden die BHY-Zellen in 6-Well-Zellkulturplatten (Nunc, Wiesbaden) ausgesät und nach Erreichen einer lockeren Konfluenz mit dem jeweiligen Versuch begonnen.

THP-1 Zellen wurden in RPMI 1640 (Biochrom) unter Zusatz von 7,5% FKS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (alle Reagenzien von Biochrom) bis zu einer Dichte von 5×10^5 bis 1×10^6 Zellen/ml kultiviert (37°C, 5% CO₂). Die Zellen wurden für die Experimente in einer Dichte von $2-3 \times 10^6$ Zellen pro Schale in 6-Well-Kulturplatten (Nunc) ausgesät.

HUVEC Endothelzellen wurden in Zellkulturmedium („endothelial cell growth medium“, Promocell, Heidelberg) unter Zusatz von 10% FKS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin sowie 12,3 ml Supplement Mix (Promocell) kultiviert (37°C, 5% CO₂) und alle 2-3 Tage nach Ablösen mittels EDTA/Trypsin gesplittet.

Humane Monozyten wurden aus Blut eines gesunden Spenders isoliert mittels Biocoll (Biochrom), gefolgt von der Isolierung mittels „monocyte-isolation kit“ (Miltenyi-Biotec). Anschließend wurden sie in 24-Well-Kulturplatten ($2,5 \times 10^6$ / well) in THP-1-Medium (0.5 Ampulle/L OPI-Media-Supplement, Sigma; 1% MEM, GibcoBRL) (Reinheit > 95%, Durchflusszytometrie) 24 Stunden (adherente Monozyten) oder 8 Tage (Makrophagen) ausgesät.

2.2.2. Ozonierung von Medium, PBS

Medium oder PBS wurde durch einen Ozongenerator (Ozonosan photonik, Dr. Hänsler GmbH, Iffezheim) mit gasförmigem Ozon der Ausgangskonzentration 75 µg/ml für 15 min

behandelt (durchperlt). Eine Behandlung mit ozoniertem Gas dieser Konzentration führt aufgrund des physikalischen Lösungsverhaltens und des Erreichens der Sättigungsgrenze in deionisiertem Wasser zu einer Konzentration von Ozon in Wasser von 17 µg/ml bei 4°C.

Die Ozonherstellung wurde mit einem Photometer (Ozonosan photonik, Dr. Hänsler GmbH), das in den Ozongasprozessor integriert ist, überwacht und mit einem weiteren Messgerät bestätigt (GM-6000-NZL, Anseros, Tübingen). Um die Ozonierung von Medium und PBS zu überprüfen, wurde die entsprechende Ozonkonzentration in Wasser unter identischen Bedingungen photometrisch gemessen (Palintest, Gateshead, England).

2.2.3. Ozonierung von Lipoproteinen bzw. Cholesterin

Humanes LDL wurde von Biomedical Technologies Inc. (Stoughton, MA, USA) bezogen. Zur Herstellung der LDL-Lösung wurden 200 µl humanes LDL (Proteinkonzentration 5mg/ml) mit PBS in einer zuvor mit PBS gewaschenen PD-10-Säule (Amersham Biosciences, Freiburg) dialysiert, um EDTA zu entfernen. Dann wurde das LDL in 100 ml PBS gelöst, um eine Endkonzentration von 10 µg/ml zu erreichen. Um eine Cholesterin-Lösung zu erhalten, wurden drei Formen von Cholesterin (alle von Sigma) angewendet. So wurde mit Cholesterin (3 mg/100 mL PBS) eine Suspension hergestellt, die vor einer Filtration 7 Tage bei 4°C gerührt wurde, um eine ausreichende Löslichkeit zu erhalten. Die anderen zwei Cholesterin-Sorten waren wasserlösliche Formen, namentlich „cholesterol-PEG600“ und „water-soluble cholesterol“ (30 µg/mL). Um ozLDL oder ozChol herzustellen, wurden die entsprechenden Lösungen mit dem Ozongasprozessor (siehe Kap. 2.2.2.) ozoniert. Die Lösung wurde gemäß den Anweisungen des Herstellers mit Ozongas durchperlt.

Die Ozonherstellung wurde mit einem Photometer, das in den Ozongasprozessor integriert ist, überwacht und mit einem weiteren Messgerät bestätigt (siehe Kap. 2.2.2.). Um die Ozonierung der PBS-LDL- bzw. PBS-Cholesterin-Lösungen zu überwachen, wurde die entsprechende Ozonkonzentration in Wasser unter identischen Bedingungen photometrisch gemessen (Palintest).

Basierend auf Halbwertszeit-Untersuchungen wurde die ozonierte Lösung mindestens eine Stunde unter sterilen Bedingungen stehen gelassen, sodass das nicht reagierte Ozon entweichen konnte. Die Reaktion von LDL mit Ozon wurde durch die Bestimmung so genannten TBARS („thiobarbituric acid reactive substances“) überwacht. Dies ist die Methode der Wahl, um den Oxidationsgrad von Lipiden zu bestimmen. Außerdem wurde die Apolipoprotein B-Fragmentierung durch Coomassie-Färbung von SDS-Gelen bestimmt.

2.2.4. Lipidextraktion

Lipidextrakte aus nativem LDL, oxLDL oder ozLDL (je 3 mg) wurden mit einer Lösung aus Chloroform/Methanol (2:1) mit 0,01% Butylhydroxytoluol (Sigma) extrahiert, die organischen Fraktionen gesammelt, in Stickstoffatmosphäre vollständig eingedampft und anschließend in 300 µl Hexan für eine weitere Trennung gelöst. Die Trennung des Gesamtlipidextrakts erfolgte mittels einer Bakerbond spe Diol (Baker, Paris, Frankreich) Extraktionssäule (3 ml), die mit 5 ml Hexan vorgewaschen wurde (102, 103). Die Lipide wurden mit 2 ml von 8 Lösungsmittelgemischen steigender Polarität eluiert: Fraktion 1, 1% Ethylacetat in Hexan; Fraktion 2, 5% Ethylacetat in Hexan; Fraktion 3, 15% Ethylacetat in Hexan; Fraktion 4, 30% Ethylacetat in Hexan; Fraktion 5, 60% Ethylacetat in Hexan; Fraktion 6, 100% Ethylacetat; Fraktion 7, 30% Methanol in Dichlormethan und Fraktion 8, 100% Methanol. Die Eluate wurden vollständig eingedampft und in 300 µl Methanol gelöst. Fraktion 1 enthielt Cholesterinester, Fraktion 3 Triglyceride und freies Cholesterin und Fraktion 7 Phospholipide. Die Lipide wurden enzymatisch mittels Cholesterol C System (Roche, Penzberg) bestimmt.

2.2.5. Massenspektrometrie

Wässrige Lösungen aus 1 mg LDL, oxLDL und ozLDL, Cholesterin, α -EChol und Atheronal A wurden vollständig eingedampft und in 1 ml Methanol oder Isopropanol gelöst. Die Massenspektrometrie mit Ionisierung unter Atmosphärendruck („atmospheric pressure ionization“, API) erfolgte an einem API 3000 dreifacher Quadrupol Massenspektrometer (SCIEX, Applied Biosystems, Darmstadt), ausgestattet mit einer APCI („atmospheric pressure chemical ionization“)-Quelle (aufgeheizter Nebulizer). Die Instrumente wurden so eingestellt, dass ein Masse/Ladung-Verhältnis (m/z) von 100 bis 500 mit Schritten von 0,1 amu („atomic mass unit) und eine Gesamtscanzeit von 4 Sekunden für 45 Zyklen im einzelnen Quadrupolmodus vorherrschten. Die Analyse wurde bei einem Nadelstrom von 4 µA, einer Spannung von 100 V und einer Fokussierungsspannung von 350 V im positiven Modus bzw. bei einem Nadelstrom von -4 µA, einer Spannung von -100 V und einer Fokussierungsspannung von -350 V im negativen Modus durchgeführt. Der Verdampfer wurde auf 350°C eingestellt, sowohl für den positiven als auch für den negativen Modus. 50 µl Probenvolumen wurden zu 0,3 ml/min Fluss an Methanol mit 0,1% Essigsäure für den positiven Modus bzw. an 10 mM Ammoniumacetat (Merck) für den negativen Modus gegeben.

Für MS/MS-Analysen wurden dieselben Bedingungen gewählt, mit der Ausnahme, dass der erste Quadrupol für die Wahl der erwünschten Masse benutzt wurde. Der Gasdruck wurde auf $3,8 \times 10^{-5}$ eingestellt und die Beschleunigungsspannung auf 20-50 V, während der dritte Quadrupol die Fragmente scannte (m/z 100-500).

2.2.6. Endotoxin-Test

Alle eingesetzten Medien und Reagenzien wurden vor Beginn der Experimente auf ihren Gehalt an Endotoxinen überprüft. Hierfür wurde in dem quantitativen, chromogenen Limulus-Amöbozyten-Lysat Assay (Bio Whittaker) die Endotoxin-abhängige Spaltung des Substrats Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNA bei 405 nm bestimmt. Es fanden ausschließlich Substanzen Verwendung, deren Pyrogen-Endkonzentration weniger als 10 pg/ml betrug.

2.2.7. Zellvitalitätstest

Die Vitalität der Zellen wurde durch den so genannten „CellTiter-Glo luminescent cell viability test“ (Promega) überprüft. Mit Hilfe dieses Tests lässt sich die Menge an ATP als Marker für die metabolische Aktivität in den kultivierten Zellen quantifizieren. Dabei ist die Menge an ATP direkt proportional zu der Zahl intakter Zellen in der Kultur.

Nach Präinkubation der Zellen in Mikrotiterplatten (Nunc) mit den zu testenden Bedingungen wurde das CellTiter-Glo-Reagenz zugegeben und 10 min inkubiert. Das durch das ATP intakter Zellen erzeugte Lumineszenzsignal wurde bei 405 nm photometrisch gemessen und über die erhaltene optische Dichte (OD) die Stoffwechselaktivität der Zellen quantitativ ermittelt.

2.2.8. Apoptosetest

Der Apoptosegrad wurde mittels Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega) untersucht. Dadurch lässt sich die Aktivität der Caspasen 3 und 7, die eine Schlüsselrolle im Apoptosevorgang haben, überprüfen. Nach Behandlung der Zellen wurden 100 µl Caspase-Glo 3/7 Reagent in 100 µl Medium für 1 h zugegeben und die Lumineszenz gemessen.

2.2.9. Isolierung zytosolischer und nukleärer Extrakte

Zur Isolierung der zytosolischen und nukleären Proteine wurde ein in der Literatur beschriebenes und leicht modifiziertes Verfahren eingesetzt (104). Dazu wurden THP-1-

Zellen (3×10^6) abzentrifugiert ($400 \times g$, 5 min, 4°C) und einmal in PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation ($5.000 \times g$, 2 min, 4°C) wurden die Zellpellets in Puffer A (0,1% Nonidet P-40; 10 mM Hepes, pH 7,9; 10 mM KCl; 1,5 mM MgCl_2 ; 0,5 mM Dithiothreitol (DTT); 300 mM Saccharose; je 0,75 $\mu\text{g/ml}$ Pepstatin, Antipain, Chymostatin, Aprotinin und Leupeptin sowie 0,5 mM PMSF) resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert, um die äußeren Zellmembranen aufzubrechen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt ($15.800 \times g$, 30 sec, RT) wurde der Überstand mit der zytosolischen Fraktion von den noch intakten Zellkernen abgenommen und auf Eis gelagert. Eine Kontamination der nukleären Extrakte durch zytosolische Proteine wurde durch einen Waschschrift der Kerne in Puffer A und erneute Zentrifugation vermieden. Um die Proteinausbeute zu verbessern, wurde der Überstand anschließend abgenommen, mit der oben erhaltenen zytosolischen Fraktion vereint und bei -80°C aufbewahrt. Die im Pellet enthaltenen Zellkerne wurden daraufhin in Puffer B (20 mM Hepes, pH 7,9; 100 mM KCl; 100 mM NaCl; 20% Glycerin, 0,5 mM DTT; Proteaseinhibitoren wie in Puffer A) aufgenommen und die Kernmembranen mit Hilfe eines Ultraschalldesintegrators zerstört. Die Membranfragmente konnten durch Zentrifugation ($15.800 \times g$, 30 sec, RT) abgetrennt werden. Die nukleären Proteine wurden ebenfalls bei -80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Um Proteine aus adhären Zellen zu isolieren, wurden diese zunächst mit PBS gewaschen und anschließend abgeschabt. Im Anschluss daran wurden sie wie oben beschrieben weiterbehandelt.

Die Proteinkonzentrationen der zytosolischen und der nukleären Extrakte wurden mit Hilfe des Bradford-Assays (Biorad) bestimmt. Als Messgröße diente hierbei die Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie Brilliant Blau G 250 von 465 nm zu 595 nm durch Proteinbindung.

2.2.10. Western blot-Analyse

Zytosolische Extrakte wurden mittels Western blot-Analyse auf die Anwesenheit bestimmter Proteine untersucht. Nach Zugabe von SDS-Probenpuffer (20,8 mM Tris-HCl, pH 7,5; 1,27% SDS; 4% Glycerin; 1,25% Mercaptoethanol; 330 μM EDTA; 0,2% Bromphenolblau) wurden 5-10 μg der jeweiligen Proteinextrakte 5 min auf 95°C erhitzt. Die anschließende Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 12%-igen Polyacrylamid-Fertiggel (Novex Pre-Cast Gel, Invitrogen, Groningen, Niederlande). Zur Feststellung der Proteingrößen wurden vorgefärbte Molekulargewichtsstandards (Rainbow, Amersham Biosciences; Low Range, Biorad) aufgetragen. Nach Auftrennung der Proteine wurden die Gele 15 min in

Transferpuffer (25 mM Tris-HCl, pH 8,3; 0,2 M Glycin) äquilibriert und die Proteine im Western blot-Verfahren auf eine ebenfalls äquilibrierte Nitrocellulosemembran (PALL Gelman Sciences, Dreieich) transferiert. Die gewaschenen Membranen wurden mit Ponceau S (Sigma) gefärbt, um eine gleichmäßige Übertragung der Proteine aus den Gelen zu dokumentieren. Nach 10 min wurden die Färbelösungen abgespült, das Proteilmuster fotografiert und die Membranen durch 1-stündige Inkubation in PBST (PBS + 0,05% Tween 20) mit 5% Magermilchpulver abgesättigt, um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden. Die Membranen wurden anschließend mit den entsprechenden primären Antikörpern (siehe Kap. 2.1.1.; Verdünnung je nach Antikörper 1 : 200 bis 1 : 2.000, jeweils in PBST + 1% Milchpulver) für 1 h bei RT bzw. über Nacht bei 4 °C behandelt. Nach Waschen mit PBST + 1% Milchpulver (3 x 10 min, RT) erfolgte die Inkubation (1 h, RT) mit dem entsprechenden sekundären, Peroxidase-konjugierten Antikörper (siehe Kap. 2.1.1.; Verdünnungen in PBST + 1% Milchpulver wie folgt: Anti-Kaninchen und Anti-Ziege je 1 : 20.000; Anti-Maus: 1 : 7.500). Im Anschluss an weitere Waschschrte mit PBST (1 x 15 min, 4 x 5 min, RT) wurden die Antigen-Antikörper-Komplexe auf den Membranen mit Hilfe des ECL-Verfahrens auf Röntgenfilmen (beides von Perkin Elmer Life Sciences, Jügesheim) sichtbar gemacht und je nach Fragestellung mittels Densitometrie ausgewertet bzw. direkt gescannt.

2.2.11. Gelretardierungsassay

Nukleäre Extrakte wurden mittels Gelretardierungsassays auf die Anwesenheit aktiver DNA-bindender Transkriptionsfaktoren untersucht. Hierfür kamen doppelsträngige Oligonukleotide mit Erkennungssequenzen für die jeweiligen Transkriptionsfaktoren zum Einsatz. Als NF- κ B-Konsensussequenz diente ein Oligonukleotid mit dem prototypischen Ig κ -Motiv (5'-CAGAGGGGACTTTCCGAGA-3', MWG-Biotech, Ebersberg). Dieses wurde in Anwesenheit der erforderlichen Nukleotide durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I (Roche Diagnostics, Penzberg) mit [α -³²P]dCTP (>3000 Ci/mmol) (Perkin Elmer Life Sciences) markiert. Nicht gebundene Nukleotide konnten mittels Sephadex G50-Säulen (Roche Diagnostics) abgetrennt werden. Gleiche Proteinmengen nukleärer Extrakte (2 - 4 μ g) wurden in Bindepuffer (20 mM HEPES, pH 7,9; 50 mM KCl; 1 mg/ml BSA; 0,5 mM EDTA; 1 mM DTT; 0,1% Nonidet P-40; 5% Glycerin; 50 ng Poly[d(I-C)]/ μ l (Roche Diagnostics)) aufgenommen und 30 min mit dem radioaktiv markierten Oligonukleotid (10 ng, 10⁵ cpm) inkubiert (105). Nach Zugabe des Ladepuffers (0,25 x TBE-Puffer [10 x TBE:

890 mM Tris; 890 mM Borsäure; 20 mM EDTA pH 8,0]; 40% Glycerin; 0,2% Bromphenolblau) erfolgte anschließend die Auftrennung der Proteine mittels Gelelektrophorese in einem 4%- bzw. 6%-igen Polyacrylamidgel in 0,25 x TBE-Puffer. Als positive Kontrollen dienten routinemäßig nukleäre Extrakte LPS-stimulierter THP-1-Zellen. Die quantitative Auswertung der getrockneten Gele erfolgte mittels Autoradiographie und Densitometrie.

2.2.12. Immunpräzipitation und Kinaseassay

Zur Analyse der IKK-Aktivität bzw. der IRAK-1-Autophosphorylierung verschiedener zytosolischer Extrakte wurde der Kinasekomplex einer Immunpräzipitation (IP) in TNT-Puffer (TN-Puffer + 1% Triton X-100) unterzogen. Die Präzipitation (2 h, 4°C) erfolgte mit 1 µg eines IKK γ - bzw. IRAK-1-Antikörpers (siehe Kap. 2.1.1.) und 35 µl 6%-iger Protein-A-Agarose bzw. 6%-iger Protein-G-Agarose für murine monoklonale IgG₁ Antikörper. Im Falle von IRAK-1 fand die IP mit Protein-A-Dynabeads statt. Nach dreimaligem Waschen mit TNT-Puffer (ohne Zusatz von BSA) und drei weiteren Waschschritten mit Kinasepuffer (20 mM Hepes, pH 8,0; 10 mM MgCl₂; 100 µM Na₃VO₄; 20 mM β -Glycerophosphat; 50 mM NaCl; 2 mM DTT; 0,5 µM AEBSF; und jeweils 0,75 µg/ml Leupeptin, Antipain, Aprotinin, Pepstatin A und Chymostatin) wurde die Kinaseaktivität der präzipitierten Proteine im Kinaseassay untersucht. Die Kinasereaktion (30 min, 30°C) wurde in Anwesenheit von [γ -³²P]ATP (5 µCi) (Perkin Elmer Life Sciences) und 500 ng GST-I κ B α , bzw. IRAK-1 (Santa Cruz Biotechnology) als Substrat durchgeführt. Nach Auftrennung der Proteine im Polyacrylamidgel wurden die Proteine im Western blot-Verfahren auf Membranen transferiert (siehe Kap. 2.2.10.). Diese konnten anschließend quantitativ mittels Autoradiographie (Perkin Elmer Life Sciences) und Densitometrie ausgewertet werden. Um die gleichmäßige Ladung zu untersuchen, wurden die Membranen anschließend mit Antikörpern gegen die gefällte Kinase inkubiert.

2.2.13. Luziferase-Assay

Zur Bestimmung der Luziferaseaktivität wurden 2 µg des entsprechenden Plasmids (pGL2-3 κ B-Luc) sowie 0,2 µg Renilla-Luziferase-Plasmid (pRLtk, Promega) transient kotransfiziert. Das Renilla-Luziferase-Plasmid, dessen konstitutive Expression durch den HSV-Thymidinkinase-Promotor reguliert wird, diente dabei als Kontrolle. In STBS (25 mM Tris-HCl, pH 7,4; 5 mM KCl; 0,7 mM CaCl₂; 137 mM NaCl; 0,6 mM Na₂HPO₄; 0,5 mM MgCl₂)

gewaschene Zellen wurden im DNA-Mix (4 µg Indikatorgenplasmid; 0,2 µg pRLTk; 15 µg/ml DEAE-Dextran; STBS) resuspendiert und 15 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe des 10-fachen Volumens an STBS gestoppt und die überschüssige DNA durch Zentrifugation (200 x g, 5 min, RT) abgetrennt. Die transfizierten Zellen wurden einmal in RPMI 1640 (ohne Zusatz von FKS und Penicillin/Streptomycin) gewaschen, anschließend in 6-Well-Zellkulturplatten in Medium ausgesät, der jeweiligen Bedingung folgend behandelt und bei 37°C (5% CO₂) inkubiert. Nach Zentrifugation (400 x g, 5 min, RT) und einmaligem Waschen der Zellen in PBS erfolgte die Gewinnung der zellulären Extrakte durch Inkubation (15 min, schütteln bei RT) in Lysis-Puffer (Promega). Nach Entfernen der Zelldebris (14.000 x g, 1 min, 4°C) wurde die Aktivität der induzierten Firefly-Luziferase mit dem Luziferase-Reporter-Assay (Promega) mit Hilfe eines Luminometers quantitativ bestimmt und das Ergebnis unter Einbeziehung der Aktivität der konstitutiv exprimierten Renilla-Luziferase normalisiert. Die Ergebnisse wurden als relative Luziferase-Aktivität (RLA), d.h. als Quotient der „relative light units“ (RLU) des Firefly-Plasmids und des konstitutiven Renilla-Plasmides, abgebildet.

2.2.14. Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest

Die IL8-Proteinkonzentration im Überstand wurde durch Immunoassays (Quantikine, R&D systems, Wiesbaden) bestimmt.

2.2.15. Bestimmung der reaktiven Sauerstoffspezies

Zur Bestimmung der reaktiven Sauerstoffspezies („reactive oxygen species“, ROS) wurden THP-1-Zellen mit 10 µM 2',7'-Dichlorfluoresceindiacetat (DCFH-DA, Sigma) 30 min inkubiert. Dann wurden die Zellen gewaschen und mit PBS, LDL, oxLDL (10 µg/ml) 30 min vorbehandelt und mit LPS (10 µg/ml) 1 h stimuliert. Nach einmaligem Waschen wurde die ROS-Produktion photometrisch bestimmt.

2.2.16. Bestimmung der LPS-Bindung

Zur Untersuchung der Bindung von LPS an die Zelloberfläche wurden die Zellen mit LPS (10 µg/ml) stimuliert. Nach 5 min erfolgte die Zugabe von FITC-markiertem LPS (1 µg/ml) für eine weitere Stunde. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und 10⁴ Zellen pro Probe wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert.

2.2.17. Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde Microsoft Excel 2002 eingesetzt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung (MW \pm SD) angegeben.

3. Ergebnisse

3.1. Vorausgehende Experimente zum Arbeiten mit Ozon und ozLDL

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden Vorversuche durchgeführt, die zur Untersuchung von Stabilität und Toxizität des in wässrigem Milieu gelösten Ozons dienen. Außerdem sind in diesem Abschnitt Studien zur Charakterisierung und Toxizität von Lipoproteinen dargestellt, die mit Ozon behandelt wurden. Diese Experimente waren notwendig, um Ozon für weitere Studien einsetzen zu können.

3.1.1. Löslichkeit von Ozon in wässrigem Milieu

Zunächst sollte die Löslichkeit und der anschließende Zerfall von Ozon in wässrigem Milieu untersucht werden. Von besonderem Interesse war es, den Zeitpunkt zu ermitteln, an dem ein kompletter Abbau des Gases stattgefunden hat. Dazu wurden drei Flüssigkeiten verwendet: destilliertes Wasser, PBS-Pufferlösung (eine isotonische Salzlösung, die NaCl, Na₂HPO₄, KCl und KH₂PO₄ enthält) und DMEM-Zellkulturmedium, das sich außer aus Salzen u.a. auch aus zahlreichen Aminosäuren und Vitaminen zusammensetzt. Alle Flüssigkeiten wurden mittels eines Ozongenerators mit einer Ozonausgangskonzentration von 75 µg/ml und einer Ozonierungszeit von 15 min hergestellt und auf ihre Ozonendkonzentration untersucht (wie in Kap. 2.2.2. beschrieben). Während das im salzfreien Wasser gelöste Ozon bei 4°C in einer Konzentration von 17 µg/ml vorliegt und einen linearen und langsamen Zerfall zeigt, konnte in PBS, bei dem eine vergleichbare maximale Löslichkeit zu sehen ist, schon nach einer Stunde ein fast komplettes Entweichen des Gases beobachtet werden (Abb. 7). Interessanterweise konnte kein frei gelöstes Ozon im Zellkulturmedium nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass das Ozon mit den Substanzen, aus denen das Medium besteht, stark reagiert.

Diese Ergebnisse hatten zur Folge, dass die weiteren Experimente in PBS durchgeführt wurden. Somit wurden alle Lösungen mittels eines Ozongenerators mit einem Gasgemisch für 15 min durchperlt. Das Gas bestand aus reinem Sauerstoff und 5% Ozon mit einer Ausgangskonzentration von 75 µg/ml. Zusätzlich führten diese Daten zu der allgemeinen Bedingung für weitere Versuche mit ozLDL und ozChol, die ozonierten Flüssigkeiten für 1 h stehen zu lassen. Nach dieser Zeit sollte das gelöste Gas fast vollständig entwichen sein (Abb. 7).

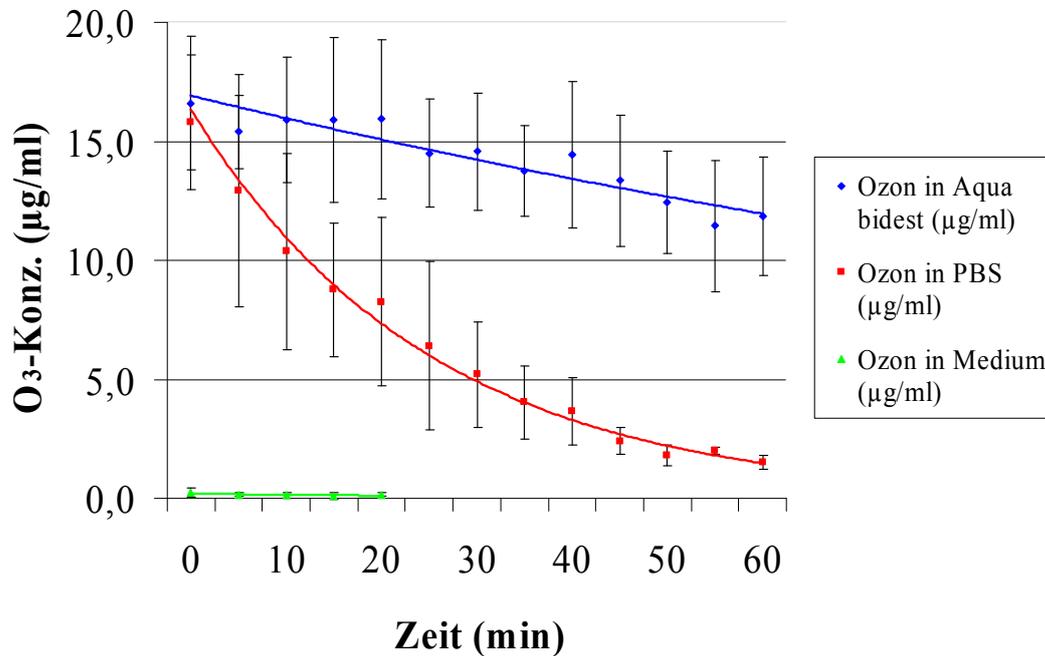


Abbildung 7: Zerfall von Ozon in wässrigen Lösungen. Destilliertes Wasser, PBS und DMEM-Zellkulturmedium wurden mit Ozon bis zur Sättigung durchperlt. Dann wurde der Zerfall des gelösten Ozons zeitabhängig photometrisch untersucht (n=3, MW ± SD).

3.1.2. Effekt von Ozon in wässrigem Milieu auf BHY-Zellen

Als nächstes wurde ein möglicher toxischer Effekt von ozoniertem PBS auf Zellen getestet. Für diese Versuche wurde eine humane Epithelzelllinie (BHY) verwendet. Als Vergleich diente Wasserstoffperoxid (H_2O_2). Diese Untersuchungen fanden im Rahmen zahnmedizinischer Studien statt, in denen der Einsatz von in wässrigem Milieu gelöstem Ozon als Antiseptikum getestet wurde. Sie besitzen keinen direkten Bezug zu den später in dieser Arbeit dargestellten Experimenten. Trotzdem sind die Erkenntnisgewinne dieser Vorversuche für anschließende Arbeiten mit ozLDL von Relevanz und werden deshalb ebenso hier aufgeführt.

Die Zählung lebender und toter Zellen durch Trypanblau-Färbung nach Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von ozoniertem PBS (10-20 µg/ml, 1 min) zeigte nur eine geringe Abnahme der Zellzahl. Als Kontrolle diente dabei die Zahl lebender Zellen in unbehandeltem PBS, deren Wert als 100% definiert wurde (Abb. 8A). So belief sich der

Anteil der Zellen bei 20 µg/ml bzw. 10 µg/ml gelöstem Ozon auf 86% bzw. 91% gegenüber der Kontrolle. Dagegen führte eine Behandlung der Zellen mit 3%-igem H₂O₂ zu einer deutlichen Abnahme der lebenden Zellen (34% der Kontrolle).

Vergleichbare Ergebnisse wurden durch den Zellvitalitätstest erhalten. Bei einer Gaskonzentration in der Lösung von 20 µg/ml bzw. 10 µg/ml nahm die ATP-Konzentration leicht ab (16% bzw. 4% gegenüber der Kontrolle) (Abb. 8B). Im Gegensatz dazu war bei einer Behandlung der Zellen mit H₂O₂ nur noch eine geringe Stoffwechselaktivität detektierbar.

Um toxische Effekte von gelöstem Ozon auf die Zellen durch weitere unabhängige Techniken auszuschließen, wurden die Menge an konstitutiv exprimiertem Aktinprotein dargestellt sowie mögliche apoptotische Effekte untersucht. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit unbehandeltem PBS inkubiert wurden.

In der Western blot-Analyse blieb die Konzentration an Aktinprotein bei Kontakt mit ozPBS unverändert im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 8C). Nach einer Behandlung mit H₂O₂ war jedoch die Menge dieses Proteins deutlich verringert.

Schließlich wurde durch Messung der Aktivität von Caspase 3 und 7 der Anteil apoptotischer Zellen ermittelt (Abb. 8D, linker Teil). Die in ozPBS inkubierten epithelialen BHY-Zellen zeigten, dass auch eine hohe Ozonkonzentration in der Lösung keine Caspaseaktivität induziert. Als positive Kontrolle wurde Apoptose durch Gabe von 40 µM TNF/Cycloheximid (CHX) induziert (Abb. 8D, rechter Teil).

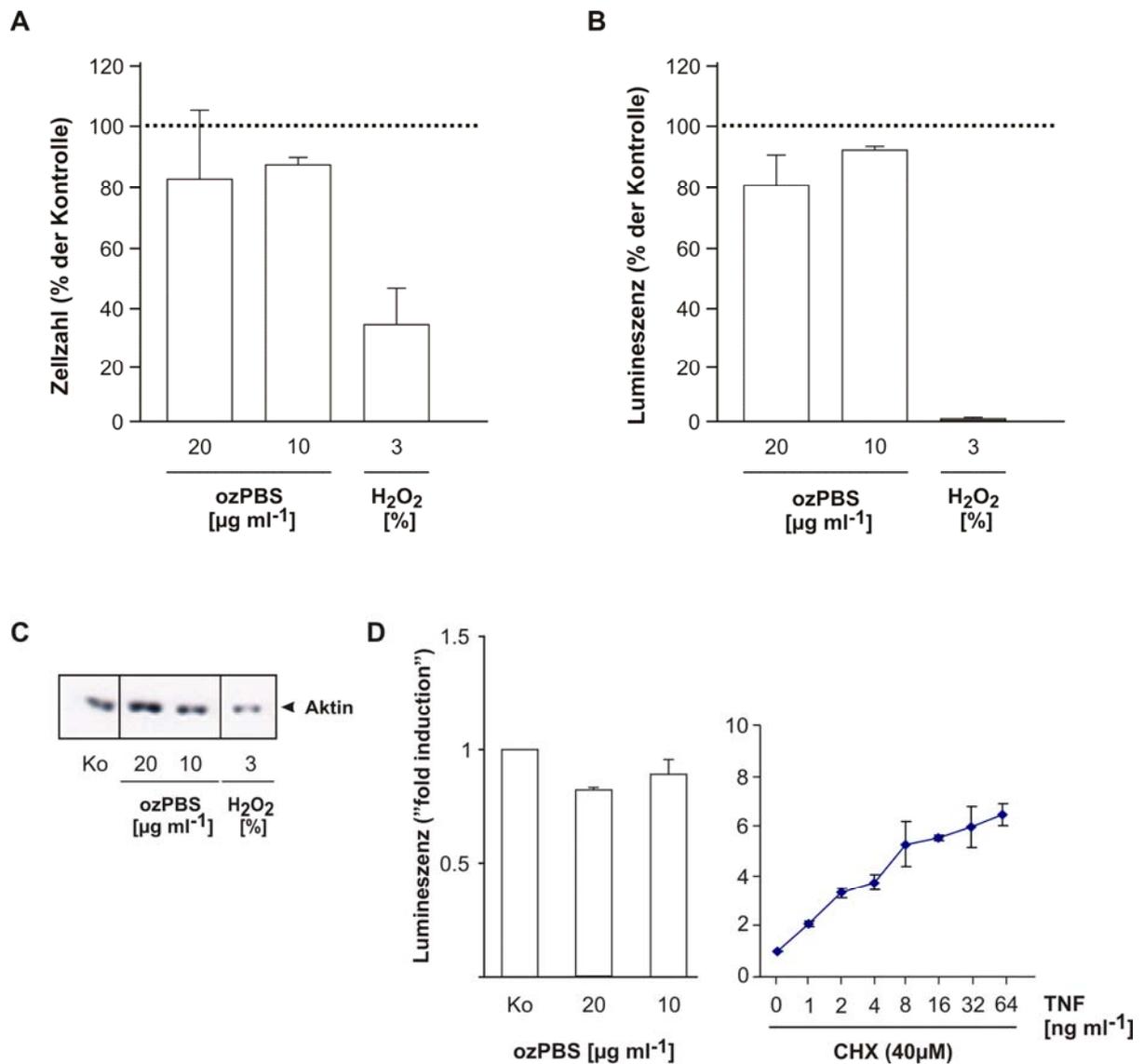


Abbildung 8: Effekt von Ozon in wässrigem Milieu auf BHY-Zellen. A) Zellzahl von BHY-Zellen nach Inkubation für 1 min in ozPBS (O₃-Konzentration: 20 bzw. 10 $\mu\text{g/ml}$). Als Vergleich dienen in H₂O₂ inkubierte Zellen. Die Zellzahl in PBS wurde als Kontrolle benutzt und als 100% (gestrichelte Linie) definiert (n=3, MW \pm SD). B) Untersuchung der ATP-Konzentration mittels Zellvitalitätstest in BHY-Zellen, die in PBS (Kontrolle), in ozoniertem PBS und in H₂O₂ (als Vergleich) für 1 min inkubiert wurden. Die Daten beziehen sich prozentual auf die Lumineszenz der Kontrolle (n=3, MW \pm SD). C) BHY-Zellen wurden wie in A behandelt. Das Aktinprotein wurde mittels Western blot-Analyse dargestellt. D) Die Aktivität der Caspasen 3 und 7 wurde mittels Caspase-Assay untersucht. Dafür wurden BHY-Zellen für 1 min in PBS bzw. in ozoniertem PBS exponiert und anschließend 6 h bei 37°C in Medium inkubiert. Die Daten zeigen das Lumineszenzverhältnis zwischen den jeweiligen Proben und der in PBS exponierten Kontrolle (n=3, MW \pm SD) (linker Teil). Als Positivkontrolle ist eine dosisabhängige Induktion der Apoptose durch TNF und 40 μM CHX dargestellt (rechter Teil).

3.1.3. Charakterisierung von ozLDL

Für die geplanten Versuche mit ozLDL war zunächst eine erste Charakterisierung dieses modifizierten Lipoproteins notwendig. Dabei konzentrierten sich die Untersuchungen auf Ozon-induzierte Modifikationen von Cholesterin, welches mit einem Anteil von ungefähr 50% der Gesamtmasse der Hauptbestandteile von LDL ist (106).

3.1.3.1. TBARS-Messung von ozLDL

Um ozLDL herzustellen, wurde humanes LDL wie in Material und Methoden (Kap. 2.2.3.) beschrieben ozoniert.

TBARS-Werte sind ein Maß für die Oxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, da Malondialdehyd gemessen wird. Diese Substanz entsteht bei der oxidativen Spaltung von Doppelbindungen, die in verschiedenen ungesättigten Fettsäuren mit mindestens 3 Doppelbindungen (z.B. Linolensäure, Arachidonsäure) vorkommen (107) (Abb. 9).

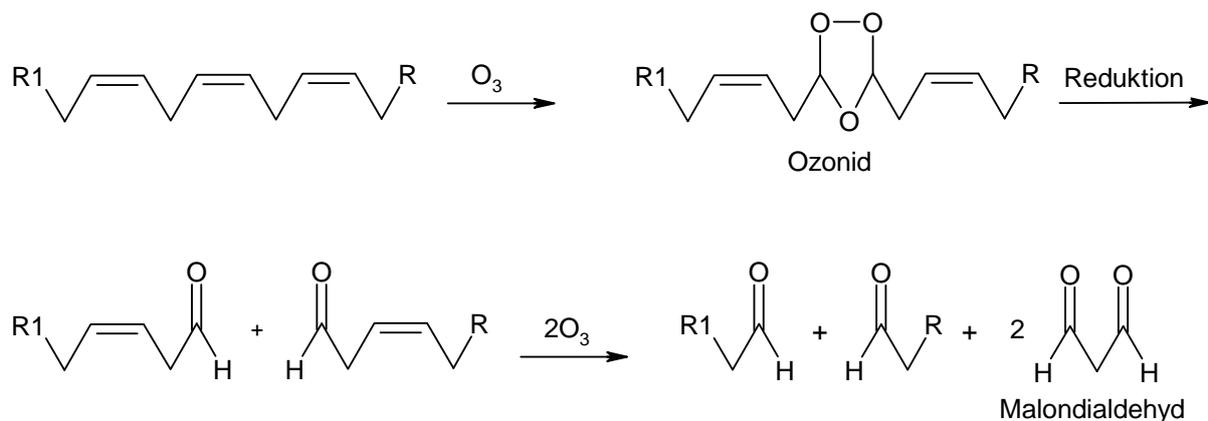


Abbildung 9: Reaktion von ungesättigten Fettsäuren mit Ozon. Ozon reagiert mit der Doppelbindung der Fettsäure unter Bildung eines Ozonid-Zwischenprodukts. Die darauffolgende Spaltung führt zur Entstehung von Malondialdehyd.

Ungesättigte Fettsäuren sind langkettige Kohlenwasserstoffe, die bis zu 4 Doppelbindungen besitzen können. Sie sind ein wichtiger Bestandteil von LDL, da sie die Restgruppen von Phospholipiden, Triglyceriden und verestertem Cholesterin bilden.

Die in n=7 Experimenten nach Behandlung von LDL mit Ozon gemessenen TBARS-Werte reichten von 42,3 nmol/mg bis 144,7 nmol/mg (Mittelwert 90,5 nmol/mg; natives LDL: nicht messbar; Tab. 1).

ozLDL	TBARS (nmol/mg)
Präp. Nr. 1	42,3
Präp. Nr. 2	144,7
Präp. Nr. 3	141,9
Präp. Nr. 4	46,2
Präp. Nr. 5	49,6
Präp. Nr. 6	72,7
Präp. Nr. 7	136,7

Tabelle 1: Messung der TBARS: 7 LDL-Lösungen wurden 16 min mit Ozon behandelt. Anschließend wurden die TBARS-Konzentrationen ermittelt.

Weitere Daten (n=6) zeigten eine Abnahme der TBARS-Werte bei längerer Dauer der Ozonierung. So war bei 16-minütiger Ozonierung von LDL die Menge an nachweisbarem Malondialdehyd um 32% gegenüber einer 2-minütigen Behandlung mit Ozon reduziert. Dies deutet darauf hin, dass die Ozonierungsmethode zu einer sehr starken Oxidation führt, die das Malondialdehyd weiter oxidiert und somit eine Messung dieses Moleküls verhindert (Abb. 10). Zusätzlich wurde in den ozonierten LDL-Proben eine signifikante Proteolyse von Apolipoprotein B im Vergleich zu unbehandelten LDL-Proben festgestellt (Daten nicht gezeigt).

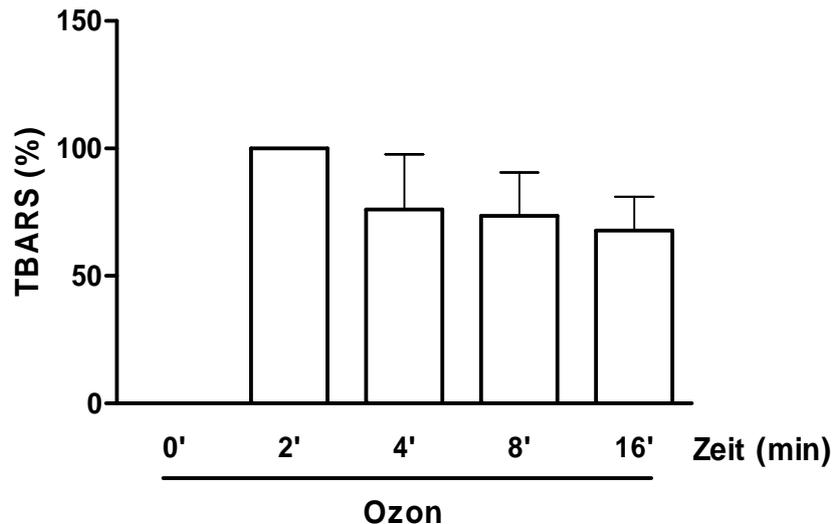


Abbildung 10: Messung der TBARS in ozLDL bei unterschiedlicher Ozonierungsdauer. LDL-Lösungen wurden für die angegebene Zeit mit Ozon behandelt. Anschließend wurden die TBARS-Werte ermittelt (n=6, MW ± SD).

3.1.3.2. Die Ozonierung von LDL führt zu einer Abnahme des darin enthaltenen Cholesterins

Um die Cholesterinkonzentrationen von LDL, oxLDL und ozLDL zu bestimmen, wurde vorab eine Lipidextraktion mit allen drei Substanzen (jeweils 3 mg Protein) durchgeführt. Lipoproteine wurden durch Lösungsmittelgemische steigender Polarität aus einer Säule eluiert. Die Eluenten gingen von 1% Ethylacetat in Hexan, über 100% Ethylacetat bis zu 100% Methanol. Die acht gesammelten Fraktionen enthielten Cholesterinester in Fraktion 1, freies Cholesterin und Triglyceride in Fraktion 3 und schließlich Phospholipide in Fraktion 7. Die Cholesterinkonzentrationen wurden dann mittels Cholesterinoxidase-Untersuchungen ermittelt. Dieser Test beruht auf der Fähigkeit des Enzyms Cholesterinoxidase, an die 3-Hydroxygruppe zu binden und somit eine Oxidation zum 5-Cholesten-3-on zu ermöglichen. Die darauf folgende Reaktion, die durch dieses Enzym katalysiert wird, ist die Isomerisierung zum 4-Cholesten-3-on (Abb. 11). Das aus der Redoxreaktion entstandene Wasserstoffperoxid wird von einem Peroxidase-Enzym reduziert, während ein oxidiertes Indikatormolekül die Peroxidase aktiviert und mit ihr ein Chromophor bildet, das photometrisch gemessen werden kann.

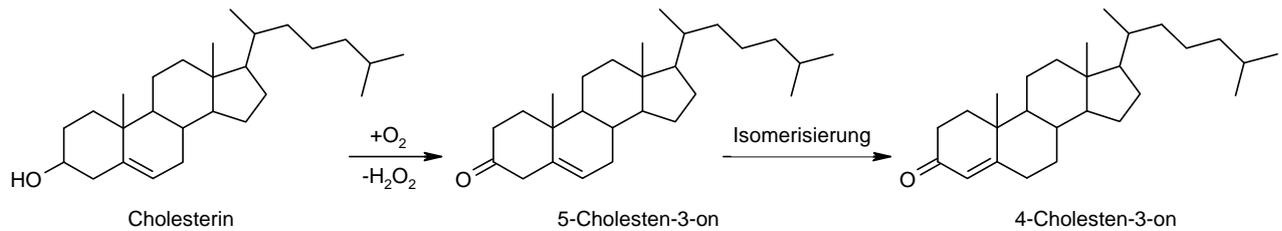


Abbildung 11: Prinzip des Cholesterinoxidase-Tests. Wasserstoffperoxid entsteht bei der Oxidation von Cholesterin zu 5-Cholesten-3-on mittels Cholesterinoxidase. Dabei findet die Reaktion an der 3-Hydroxygruppe statt. Wasserstoffperoxid fungiert als Substrat für die darauffolgende Reaktion mit einem Indikator, die anschließend photometrisch erfasst werden kann.

LDL und oxLDL wiesen vergleichbare Cholesterinkonzentrationen auf. So war in LDL eine Konzentration an Gesamtcholesterin von 45,35 mg/dl (n=4) und in oxLDL von 57,15 mg/dl vorhanden (Tab. 2). Zudem bestand bei beiden Substanzen auch ein ähnliches Verhältnis zwischen freiem und verestertem Cholesterin. Die Werte an freiem Cholesterin in LDL aus n=4 Experimenten schwankten zwischen 9,52 mg/dl und 19,05 mg/dl (Mittelwert 13,57 mg/dl), während die an verestertem Cholesterin zwischen 26,14 mg/dl und 36,21 mg/dl (Mittelwert 31,78 mg/dl) lagen. Die Durchschnittskonzentrationen von freiem bzw. verestertem Cholesterin in oxLDL beliefen sich auf 14,05 mg/dl bzw. 43,1 mg/dl (n=2). Im Gegensatz dazu konnte in oxLDL kaum Gesamtcholesterin gemessen werden (Mittelwert 4,16 mg/dl, n=4), wobei in der untersuchten Fraktion kein freies Cholesterin detektiert wurde. Dies deutet darauf hin, dass bei der Ozonierung von LDL das Cholesteringerüst gespalten wird oder zumindest eine Oxidation stattfindet, die zur Bildung einer Ketogruppe an der 3-Position führt.

Lipoproteine	Gesamt- cholesterin (Konzentration in mg/dl)	Freies Cholesterin (Konzentration in mg/dl)	Verestertes Cholesterin (Konzentration in mg/dl)
LDL Nr. 1	44,52	12,86	31,66
LDL Nr. 2	49,17	12,86	36,31
LDL Nr. 3	45,18	19,05	26,14
LDL Nr. 4	42,52	9,52	33,00
oxLDL Nr. 1	47,84	14,76	33,08
oxLDL Nr. 2	66,45	13,33	53,11
ozLDL Nr. 1	3,99	0,00	3,99
ozLDL Nr. 2	3,99	0,00	3,99
ozLDL Nr. 3	3,99	0,00	3,99
ozLDL Nr. 4	4,65	0,00	4,65

Tabelle 2: Cholesterinkonzentration in den verschiedenen Lipoproteinen. Natives LDL, oxLDL und ozLDL (jeweils 3 mg) wurden über eine Extraktionssäule durch Lösungsmittelgemische steigender Polarität eluiert. Die erste Fraktion enthielt Cholesterinester und Fraktion 3 das freie Cholesterin. Die Cholesterinkonzentrationen wurden anschließend enzymatisch analysiert. Die dargestellte Gesamtcholesterinkonzentration wurde aus der Summe von freiem und verestertem Cholesterin ermittelt.

3.1.3.3. Massenspektrometrische Untersuchungen von LDL, oxLDL und ozLDL

Um ozLDL weiter zu charakterisieren, wurden massenspektrometrische Analysen von LDL, oxLDL und ozLDL durchgeführt. Dabei wurden zuerst die Substanzen in destilliertem Wasser gelöst, gegebenenfalls behandelt, die Flüssigkeit anschließend eingedampft und der Rückstand in Methanol aufgenommen.

LDL sowie oxLDL zeigten einen Hauptpeak bei m/z 369,7, welcher mit dem Hauptpeak von Cholesterin übereinstimmt (Abb. 12A; Daten nicht gezeigt). Dieses Signal ergibt sich durch

die Zunahme von einem Proton und die Abnahme von einem Wassermolekül $[M \text{ (Molekül-Ion)} + \text{H}^+ - \text{H}_2\text{O}]^+$.

Dagegen konnte in oxLDL dieser Peak nicht dargestellt werden. Hier war der Hauptpeak bei m/z 399,9 zu sehen (Abb. 12B). Dieses Signal entspricht der Masse des Atheronal A, das eine oxidative Dehydrierung an der 3-Hydroxygruppe eingegangen ist.

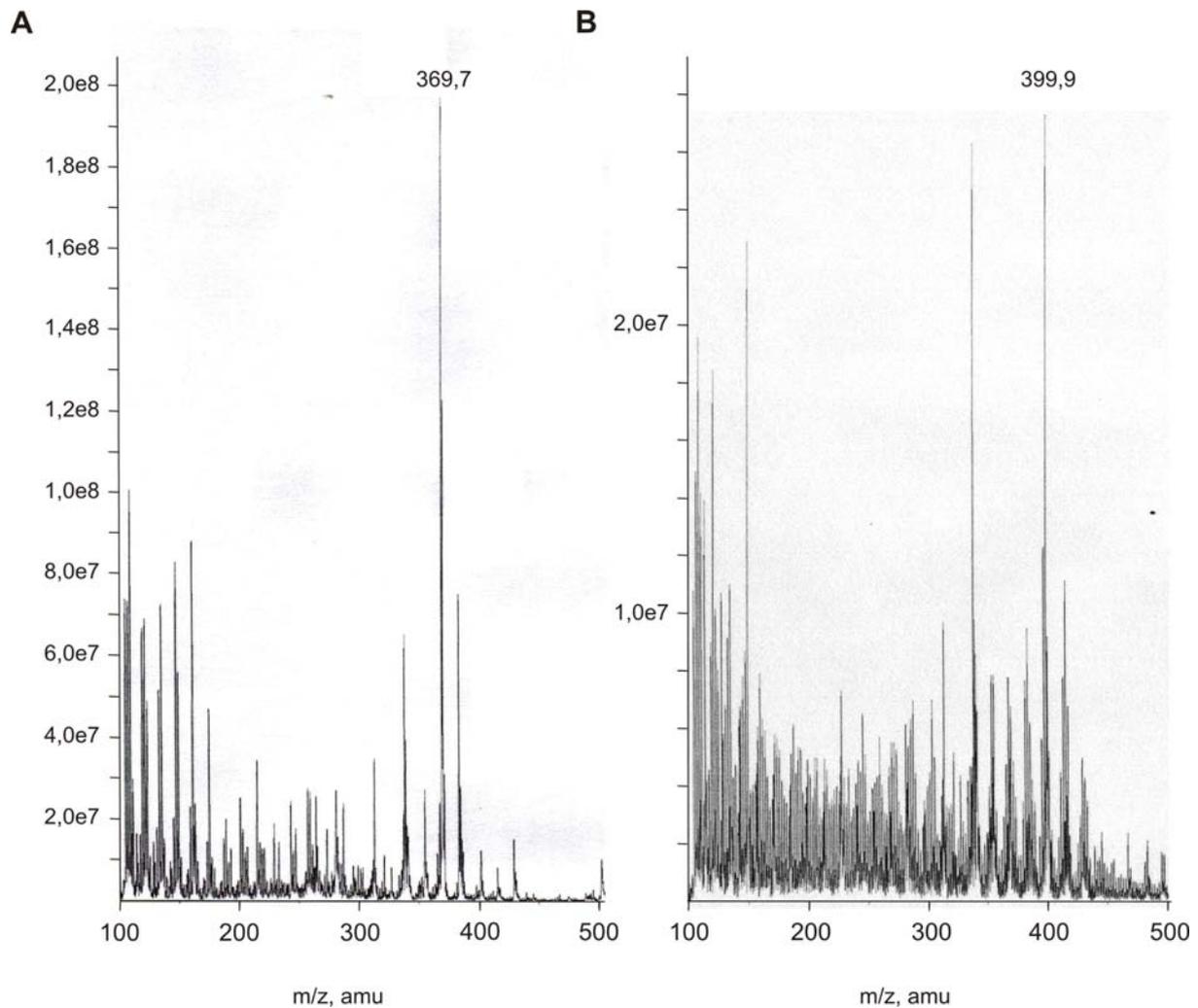


Abbildung 12: Vergleich zwischen oxLDL und ozLDL mittels Massenspektrometrie. A) Massenspektrum von oxLDL. B) Massenspektrum von ozLDL. m/z , Masse/Ladung-Verhältnis. amu („atomic mass unit“) ist eine Atommassenkonstante und entspricht 1/12 der Masse eines ^{12}C -Atoms.

Die massenspektrometrischen Analysen für $5\alpha,6\alpha$ -Cholesterinepoxid (α -Echol) ergaben Signale bei 403,6 $[M+\text{H}^+]^+$, 385,5 $[M+\text{H}^+-\text{H}_2\text{O}]^+$ und 367,4 $[M+\text{H}^+-2\text{H}_2\text{O}]^+$. Im Vergleich dazu traten die Peaks für käuflich erhältliches Atheronal A bei 419,5 $[M+\text{H}^+]^+$, 401,5 $[M+\text{H}^+-\text{H}_2\text{O}]^+$, 383,4 $[M+\text{H}^+-2\text{H}_2\text{O}]^+$ und 365,5 $[M+\text{H}^+-3\text{H}_2\text{O}]^+$ auf (Daten nicht gezeigt).

Weitere massenspektrometrische Untersuchungen (MS/MS; Daten nicht gezeigt) bestätigten, dass bei der Ozonierung von LDL nach der in dieser Arbeit verwendeten Methode das Cholesterin stark oxidiert wird, was nicht nur zur ozonolytischen Spaltung der 5,6-Doppelbindung führt sondern möglicherweise auch zur Bildung einer Ketogruppe in 3-Position.

Diese Daten in Zusammenhang mit den in Kapitel 3.2.1. vorgestellten Resultaten deuten darauf hin, dass bei der Ozonierung von LDL mit der oben beschriebenen Methode (siehe Kap. 2.2.3.) das neue Produkt 3,5-Dioxo-5,6-secocholestan-6-al (hier als Ketoatheronal A bezeichnet) entsteht. Diese Ergebnisse zeigen, dass sich das ozLDL deutlich von dem schon mehrfach untersuchten oxLDL unterscheidet.

3.1.4. Toxizität von ozLDL

Für die geplanten Versuche mit ozLDL waren weiterhin toxikologische Studien mit ozLDL notwendig, um schädliche Effekte dieser neuen Substanz auf die Zellen auszuschließen. So sollte untersucht werden, ob den beobachteten Wirkungen von ozLDL ein toxischer Effekt auf die Zellen zu Grunde liegt. Sämtliche Bedingungen der später aufgeführten Experimente wurden hier hinsichtlich der Toxizität überprüft.

3.1.4.1. Überprüfung der Toxizität von ozLDL

In jedem Experiment wurde die Zellmorphologie genau beobachtet und die Zellzahl bestimmt. Zusätzlich wurde die potentielle Toxizität des Lipoproteins auf die Zellen durch Trypanblau-Färbung überwacht. Außerdem wurde der Proteingehalt mit Hilfe des Bradford-Assays sowohl im Zytosol als auch im Kern der behandelten Zellen bestimmt. Wie Tabelle 3 deutlich macht, sind ozLDL sowie die beiden eingesetzten Stimuli (LPS und TNF) in den verwendeten Konzentrationen und Bedingungen nicht toxisch.

A

Behandlung der Zellen	Zellzahl	Trypanblau	Proteingehalt	
	(% Kontrolle) MW±SD (n=4)	(% d. Gesamtzellzahl) MW±SD (n=4)	Zytosol (% Kontrolle) MW±SD (n=8)	Nukleus (% Kontrolle) MW±SD (n=8)
PBS	100	6.1±0.7	100	100
ozPBS	105±17	5.3±0.5	98±5	116±17
LDL	104±30	4.7±2.4	98±3	113±25
ozLDL	118±16	4.7±1.4	99±5	106±13
PBS+LPS	109±31	4.3±1.0	98±6	97±17
ozPBS+LPS	89±22	4.7±1.1	100±3	103±17
LDL+LPS	107±22	3.8±0.6	97±6	114±17
ozLDL+LPS	106±14	5.7±1.4	98±3	99±9

B

Behandlung der Zellen	Zellzahl	Trypanblau	Proteingehalt	
	(% Kontrolle) MW±SD (n=3)	(% d. Gesamtzellzahl) MW±SD (n=3)	Zytosol (% Kontrolle) MW±SD (n=8)	Nukleus (% Kontrolle) MW±SD (n=8)
PBS	100	3.6±2,2	100	100
PBS+TNF	106±5	3.2±1.9	101±7	119±23
ozPBS+TNF	96±2	2.8±1.5	101±6	116±23
LDL+TNF	111±11	3.0±1.9	99±5	110±29
ozLDL+TNF	92±8	2.6±2.3	99±7	111±33

Tabelle 3: Testung der Toxizität von ozLDL. THP-1-Zellen wurden mit PBS, ozPBS, LDL (10 µg/ml) und ozLDL (10 µg/ml) für 30 min vorinkubiert und daraufhin entweder unstimuliert gelassen oder mit A) LPS (10 µg/ml, 60 min) bzw. B) TNF (2 ng/ml, 15 min) stimuliert. In vier unabhängigen Experimenten wurde die Zellzahl mittels mikroskopischer Zellzählung bestimmt. Die Zellzahl der nur mit PBS behandelten Proben wurde als 100%-Wert definiert (MW ± SD). Zusätzlich wurden Trypanblau-Tests durchgeführt. Die Ergebnisse sind in % toter Zellen an der Gesamtzellzahl angegeben (MW ± SD, n=4 bzw. n=3). Der zytosolische und nukleäre Proteingehalt von acht unabhängigen Experimenten wurde mittels Bradford-Assays bestimmt. Der Proteingehalt in Proben, die nur mit PBS behandelt wurden, wurde als 100%-Wert definiert und die Ergebnisse sind als MW ± SD dargestellt.

3.1.4.2. ozLDL zeigt keinen Effekt auf die Zellvitalität

Weitere Toxizitätsuntersuchungen erfolgten mittels eines Zellvitalitätstests. Dabei wurden die Zellen wie in Kapitel 3.1.4.1. vorbehandelt und mit LPS (10 µg/ml) bzw. TNF (2 ng/ml) stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit dem Kit-Reagenz (siehe Kap. 2.2.7.) inkubiert, um deren metabolische Aktivität zu ermitteln. Die ATP-Konzentration zeigte, dass ozLDL die Zellvitalität nicht beeinflusst (Tab. 4).

A	Behandlung der Zellen	Zellvitalitäts-Test (% Kontrolle) MW±SD (n=4)	B	Behandlung der Zellen	Zellvitalitäts-Test (% Kontrolle) MW±SD (n=4)
	PBS	100		PBS	100
	ozPBS	111±20		PBS+TNF	110±45
	LDL	115±27		ozPBS+TNF	122±53
	ozLDL	96±12		LDL+TNF	131±91
	PBS+LPS	90±13		ozLDL+TNF	123±57
	ozPBS+LPS	101±23			
	LDL+LPS	83±14			
	ozLDL+LPS	93±8			

Tabelle 4: ozLDL hat keinen Einfluss auf die Zellvitalität. THP-1-Zellen wurden mit PBS, ozPBS, LDL (10 µg/ml) und ozLDL (10 µg/ml) für 30 min vorinkubiert und daraufhin entweder unstimuliert gelassen oder mit A) LPS (10 µg/ml, 60 min) bzw. B) TNF (2 ng/ml, 15 min) stimuliert. Die Ergebnisse des Zellvitalitätstests stellen die prozentuale ATP-Konzentration der Zellen in den jeweiligen Proben im Vergleich zu der ATP-Menge in PBS behandelten Zellen (100% Kontrolle) dar (MW ± SD, n=4).

3.2. Effekte von ozLDL auf das NF- κ B-System

Dieser Teil der Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss von ozLDL auf das NF- κ B-System. Die meisten Versuche wurden mit monozytären Zellen durchgeführt.

3.2.1. Hemmung der LPS-induzierten Aktivierung von NF- κ B durch ozLDL

Die initialen Experimente dienten der Untersuchung der Aktivierung von NF- κ B durch ozLDL. Dafür wurden promonozytäre THP-1-Zellen mit ozLDL in verschiedenen Konzentrationen (0,1 bis 10 μ g/ml) für verschiedene Zeitintervalle (15 bis 90 min) inkubiert. Die Aktivität von NF- κ B wurde mit Hilfe von Gelretardierungsassays bestimmt. Diese Experimente zeigten, dass ozLDL *per se* keinerlei Effekt auf die NF- κ B-Aktivität hatte (Abb. 13, Daten nicht gezeigt). In den folgenden Experimenten sollte getestet werden, ob eine Vorinkubation mit ozLDL die NF- κ B-Aktivierung durch andere Stimuli beeinflusst. Dazu wurden die Zellen 30 min mit ozLDL vorinkubiert und danach eine weitere Stunde mit LPS (10 μ g/ml) stimuliert. In der Abwesenheit von ozLDL konnte die erwartete deutliche Aktivierung von NF- κ B durch LPS beobachtet werden (Abb. 13). Diese Zunahme der NF- κ B-Aktivität durch LPS wurde durch die Vorinkubation mit ozLDL vollständig gehemmt. In denselben nukleären Extrakten war die Bindungsaktivität des konstitutiven Transkriptionsfaktors Sp-1 durch ozLDL nicht beeinflusst. Durch diese Experimente konnte demonstriert werden, dass eine Vorinkubation mit ozLDL die LPS-vermittelte Aktivierung von NF- κ B inhibiert.

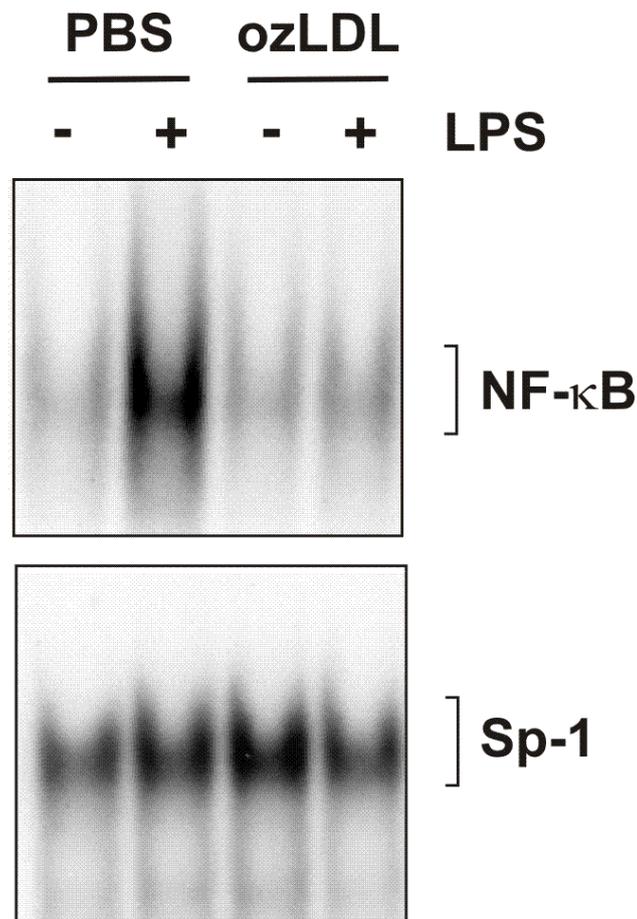


Abbildung 13: Hemmung der Aktivierung von NF-κB durch ozLDL. ozLDL wurde hergestellt wie in Kapitel 2.2.3. beschrieben. Monozytäre THP-1-Zellen wurden mit ozLDL (10 µg/ml) für 30 min vorinkubiert und anschließend wurde LPS der Konzentration 10 µg/ml für eine weitere Stunde zugegeben. Die Aktivität von NF-κB wurde in den nukleären Extrakten mit Gelretardierungsassay erfasst. Die Sp-1-Bindungsaktivität diente zusätzlich der Überprüfung gleicher Ladung und Qualität der Extrakte.

3.2.2. Dosisabhängigkeit der Inhibierung des NF-κB-Systems durch ozLDL

Im folgenden Experiment sollte gezeigt werden, dass der Effekt von ozLDL dosisabhängig ist. Dafür wurden die Zellen mit ozLDL in Konzentrationen von 0,1 µg/ml bis 10 µg/ml vorinkubiert. Es zeigte sich, dass die LPS-induzierte Aktivierung von NF-κB durch eine Vorbehandlung mit ozLDL in einer Dosis von 0,1 µg/ml kaum beeinflusst war (Abb. 14A und B). Eine deutlich stärkere Hemmung zeigte sich bei einer Vorbehandlung mit dem modifizierten Lipoprotein in einer Konzentration von 1 µg/ml. Nahezu vollständig wurde die LPS-vermittelte Aktivierung von NF-κB durch eine ozLDL-Dosis von 10 µg/ml verhindert. Diese Ergebnisse zeigen, dass die inhibierende Wirkung von ozLDL auf die LPS-induzierte Aktivierung von NF-κB dosisabhängig ist.

Somit wurde als Standardbedingung für die weiteren Experimente eine Präinkubation mit 10 $\mu\text{g/ml}$ LDL bzw. ozLDL (30 min) ausgewählt, gefolgt von einer LPS-Stimulation mit 10 $\mu\text{g/ml}$ (1 h). Sofern nicht anders erwähnt, gilt dies für alle weiteren Versuche.

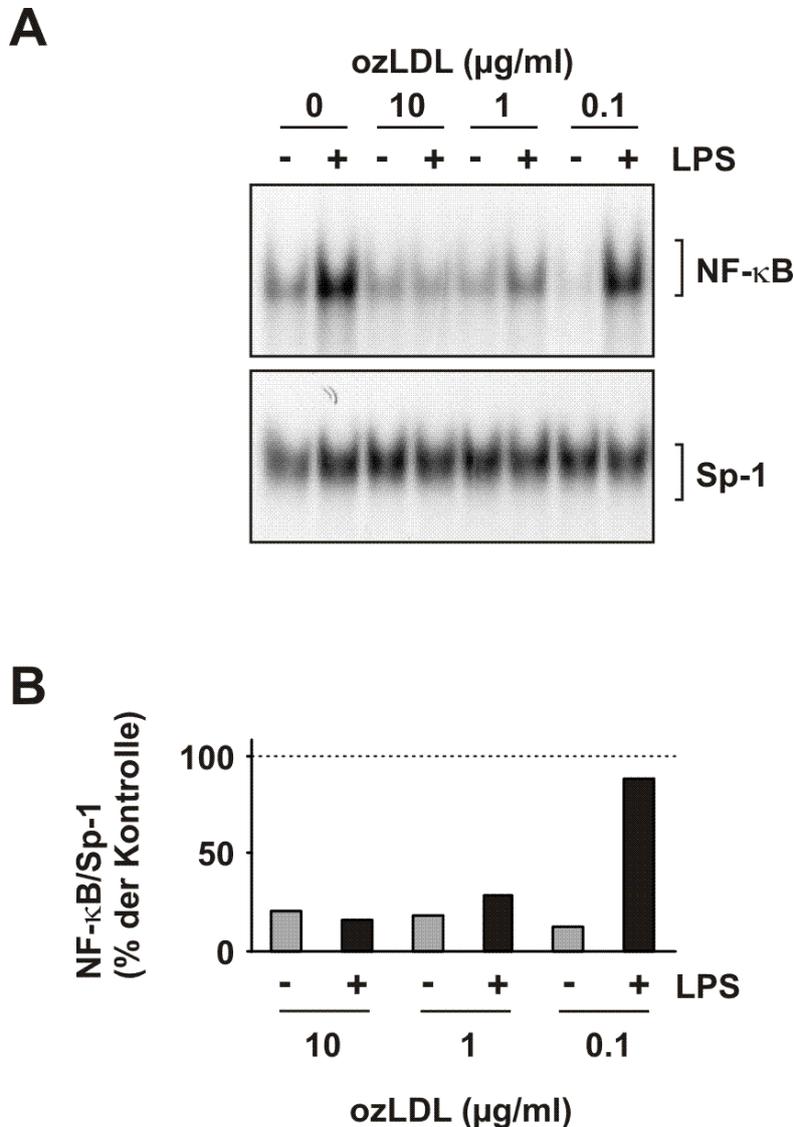


Abbildung 14: Dosisabhängigkeit der Hemmung von NF- κ B durch ozLDL. A) Monozytäre THP-1-Zellen wurden mit ozLDL der Konzentrationen 0,1 $\mu\text{g/ml}$ bis 10 $\mu\text{g/ml}$ für 30 min vorinkubiert. LPS (10 $\mu\text{g/ml}$) wurde daraufhin für eine weitere Stunde zugegeben. Die Aktivität von NF- κ B wurde in den nukleären Extrakten mit Gelretardierungsassays erfasst. Die Sp-1-Bindungsaktivität wurde zur Überprüfung gleicher Ladung und Qualität der Extrakte zusätzlich bestimmt. B) Die in A gezeigte Intensität der Banden wurde densitometrisch ermittelt. Die NF- κ B/Sp-1-Werte wurden berechnet, wobei die Sp-1-Werte als Ladungskontrolle dienten. Der Wert der LPS-stimulierten, aber nicht ozLDL-behandelten Zellen wurde als 100% definiert.

LPS (10 µg/ml) für eine weitere Stunde zugegeben. Die Aktivität von NF-κB wurde in den nukleären Extrakten durch Gelretardierungsassays dargestellt.

3.2.4. Die Inhibierung von NF-κB durch ozLDL beruht nicht auf einem direkten Effekt von Ozon oder der alleinigen Anwesenheit des Lipoproteins

An diesem Punkt der Studie waren einige Kontrollexperimente nötig. Zuerst sollte ausgeschlossen werden, dass die Inhibierung von NF-κB durch ozLDL auf einem direkten Effekt von Ozon beruht. Weiterhin sollte getestet werden, ob der inhibitorische Effekt durch die alleinige Anwesenheit des Lipoproteins selbst oder nur durch die Modifikation des Lipoproteins durch Ozon hervorgerufen werden kann. Hierzu wurden die monozytären Zellen mit PBS, ozoniertem PBS (ozPBS, siehe Kap. 2.2.2.), unbehandeltem LDL und ozoniertem LDL 30 min vorbehandelt und danach mit 10 µg/ml LPS eine weitere Stunde stimuliert. Eine deutliche Aktivierung von NF-κB konnte in den Proben beobachtet werden, die mit PBS, ozoniertem PBS und unbehandeltem LDL vorinkubiert wurden (Abb. 16). Dagegen führte die Vorbehandlung mit ozLDL zu einer beinahe vollständigen Hemmung der NF-κB-Aktivierung wie bereits oben beschrieben. Dadurch konnte gezeigt werden, dass der inhibitorische Effekt von ozLDL allein auf die Modifikation des Lipoproteins zurückzuführen ist. OzPBS und natives LDL wurden während der gesamten nun folgenden Studie als Kontrollen verwendet. Darüberhinaus muss erwähnt werden, dass in den Kurzzeit-Experimenten LDL in PBS und nicht in Medium gelöst wurde, um Interaktionen zwischen Ozon, Bestandteilen des Mediums und den Lipoproteinen zu verhindern (siehe Kap. 3.1.1.).

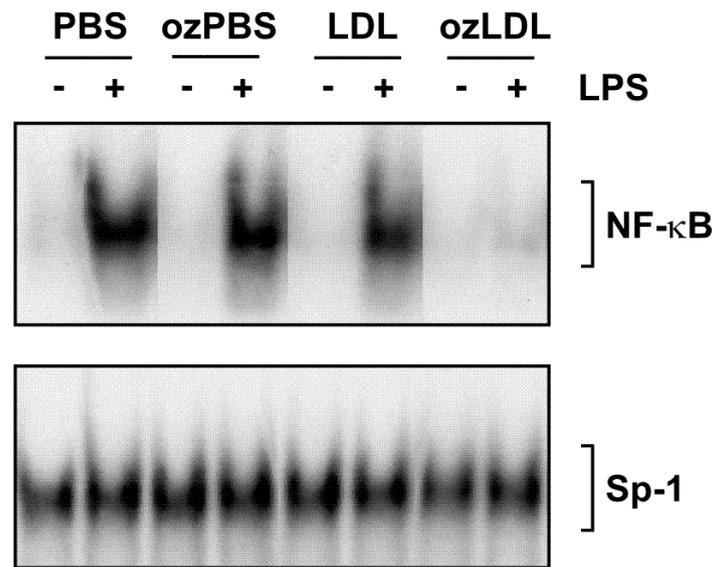


Abbildung 16: Die Hemmung der NF-κB-Aktivierung beruht auf dem Effekt von ozLDL. Monozytäre Zellen wurden mit PBS, ozPBS, unbehandeltem LDL und ozLDL (10 µg/ml) für 30 min vorbehandelt. Daraufhin wurde LPS (10 µg/ml) für eine weitere Stunde zugegeben. Die Aktivität von NF-κB wurde mit Gelretardierungsassays erfasst. Die Aktivität des konstitutiven Transkriptionsfaktors Sp-1 diente zur Kontrolle gleicher Ladung und Qualität der Extrakte.

3.2.5. Die Inhibierung von NF-κB durch ozLDL wird nicht durch reaktive Sauerstoffspezies vermittelt

Unter den Bedingungen von Kapitel 3.2.4. wurde die Konzentration der ROS in den Proben untersucht, um auszuschließen, dass die beobachtete Hemmung der LPS-induzierten NF-κB-Aktivität mit einer Zunahme von oxidativem Stress in der Zelle assoziiert ist.

Dafür wurden THP-1-Zellen mit 10 µM nicht fluoreszierenden DCFH-DA 30 Minuten lang präinkubiert. Danach wurden sie gewaschen und mit LDL oder ozLDL behandelt und anschließend mit LPS stimuliert. Das entstandene Dichlorfluorescein konnte durch Fluoreszenz-Messung ermittelt werden. Dabei zeigte sich keine deutliche Zunahme der ROS in mit ozLDL vorbehandelten Proben im Vergleich zur Kontrolle (Tab. 5). Das bedeutet, dass die Hemmung des LPS-induzierten Signals nicht von der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies abhängig ist.

Behandlung der Zellen	ROS (% Kontrolle) MW±SD (n=3)
PBS	100
LDL	102±7
ozLDL	149±6
PBS+LPS	88±6
LDL+LPS	92±17
ozLDL+LPS	104±27

Tabelle 5: Messung der ROS. THP-1-Zellen wurden mit 10 μ M DCFH-DA für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und mit PBS, LDL oder ozLDL (10 μ g/ml) 30 min lang vorbehandelt und mit LPS (10 μ g/ml) für 1 h stimuliert. Nach einmaligem Waschen wurde die ROS-Produktion photometrisch bestimmt. Der Wert der PBS-Kontrolle wurde als 100% definiert.

3.2.6. Es gibt keine Korrelation zwischen den TBARS-Werten und der Inhibierung von NF- κ B durch ozLDL

Um den Zusammenhang zwischen dem Oxidationsgrad von ozLDL und der NF- κ B-Inhibierung zu untersuchen, wurden in sieben unterschiedlichen Präparationen die TBARS gemessen. Gleichzeitig wurden die Zellen entweder mit ozPBS oder ozLDL 30 min vorinkubiert und danach 1 h mit LPS behandelt. Anschließend wurde die Hemmung von NF- κ B mittels Gelretardierungsassays untersucht.

Die TBARS-Werte der mit Ozon behandelten LDL-Proben reichten von 42,3 nmol/mg bis 144,7 nmol/mg (Mittelwert 90,59 nmol/mg) (Tab. 6). Dabei sollte erwähnt werden, dass wie erwartet die unbehandelten LDL-Proben einen nicht messbaren Wert ergaben, da natives LDL nicht im oxidierten Zustand vorliegt. Die Hemmung der NF- κ B-Aktivierung bei den Zellen, die mit denselben ozLDL-Präparationen vorbehandelt wurden, variierte dabei von 81% bis 100% (Mittelwert 93,9%). In diesen Untersuchungen war keinerlei direkte Korrelation zwischen beiden Werten auszumachen. Dies deutet darauf hin, dass die

Ozonierungsprodukte der ungesättigten Fettsäuren (siehe Kap. 3.1.3.1.) nicht für die beobachtete Inhibierung von NF- κ B verantwortlich sind.

ozLDL	Hemmung von NF-κB (%)	TBARS (nmol/mg)
Präp. Nr. 1	100	42,3
Präp. Nr. 2	100	144,7
Präp. Nr. 3	99	141,9
Präp. Nr. 4	98	46,2
Präp. Nr. 5	92	49,6
Präp. Nr. 6	87	72,7
Präp. Nr. 7	81	136,7

Tabelle 6: Korrelation zwischen der Hemmung der LPS-induzierten NF- κ B-Aktivierung durch ozLDL und den TBARS-Werten. THP-1-Zellen wurden mit 10 μ g/ml ozLDL 30 min vorbehandelt und dann mit 10 μ g/ml LPS 1 h stimuliert. Die LPS-induzierte NF- κ B-Aktivität wurde mittels Gelretardierungsassays untersucht und densitometrisch analysiert. Dabei diente die Aktivierung durch LPS in Abwesenheit von Lipoprotein als 100%-Wert. Die Hemmung bei ozLDL-Präinkubation wurde in % dargestellt. Die Modifikation von LDL durch Ozon wurde mittels TBARS-Messung der für die Gelretardierungsassays benutzten Ansätze ermittelt.

3.2.7. Selektive Hemmung des LPS-vermittelten Signalwegs

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, ob die Vorinkubation mit ozLDL die Aktivierung von NF- κ B auch dann beeinflusst, wenn nicht LPS sondern ein anderer Stimulus zur Aktivierung verwendet wird. Zu diesem Zweck wurde den mit ozLDL vorbehandelten Zellen entweder TNF (2 ng/ml) oder LPS (10 μ g/ml) für weitere 30 min zugegeben. Es zeigte sich, dass ozLDL die NF- κ B-Aktivierung nur in den Proben hemmte, die mit LPS stimuliert wurden, wohingegen der TNF-induzierte Signalweg nicht beeinflusst wurde (Abb. 17). Diese

Daten deuten darauf hin, dass ozLDL selektiv die LPS-vermittelte NF- κ B-Aktivierung hemmt.

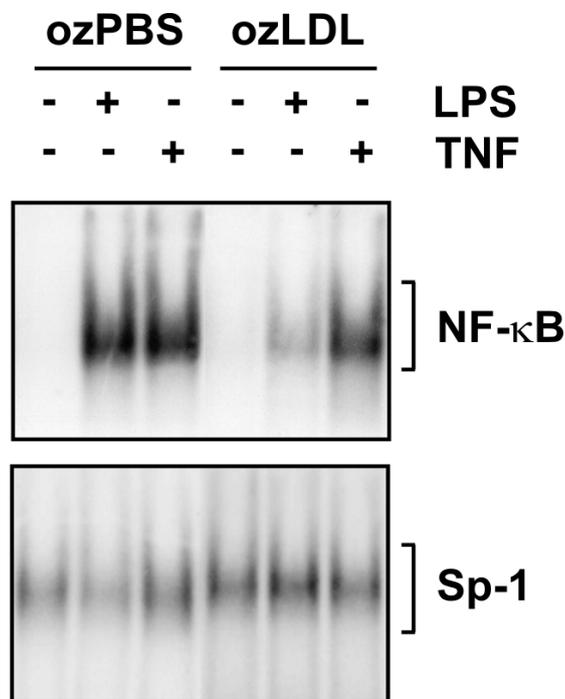


Abbildung 17: ozLDL hemmt nur den LPS-Signalweg. THP-1-Zellen wurden mit ozLDL (10 μ g/ml, 30 min) vorbehandelt und danach mit TNF (2 ng/ml) oder LPS (10 μ g/ml) für weitere 30 min stimuliert. Die Aktivität von NF- κ B und Sp-1 wurde mit Gelretardierungsassays bestimmt.

3.2.8. Die Hemmung LPS-induzierter NF- κ B-Aktivierung ist nicht von einem direkten Kontakt mit ozLDL abhängig und ist reversibel

Als nächster Schritt sollten die zeitlichen Auswirkungen der durch ozLDL induzierten NF- κ B-Inhibierung untersucht werden, um die Hemmungsbedingungen besser zu charakterisieren. Dabei galt es zu prüfen, ob die beobachtete Inhibierung von einer direkten Wechselwirkung zwischen ozLDL und LPS im Kulturmedium abhängt und ob die Hemmung reversibel ist.

Dafür wurden die THP-1-Zellen mit ozLDL präinkubiert. Anschließend wurden das modifizierte Lipoprotein entfernt und die Zeitspanne zwischen der Vorstimulation und der anschließenden LPS-Stimulierung variiert. Um die Aktivität von NF- κ B zu ermitteln, wurden Gelretardierungsassays verwendet. Eine sofortige Behandlung mit LPS ergab eine 90%-ige Hemmung durch ozLDL. Interessanterweise konnte ein vergleichbares Ausmaß der Hemmung erhalten werden, wenn die Zugabe von LPS 2 h nach der Vorinkubation erfolgte

(Abb. 18). Das deutet darauf hin, dass kein Kontakt zwischen ozLDL und LPS in der Lösung notwendig ist, um eine Inhibierung der NF- κ B-Aktivierung zu erhalten.

Wurde LPS 6 h nach Entfernen von ozLDL zugegeben, konnte nur noch ein sehr geringes Maß an NF- κ B-Inhibierung gezeigt werden. Dieser Effekt wurde auch nach längeren zeitlichen Abständen bestätigt. Diese Ergebnisse belegen, dass die ozLDL-abhängige Hemmung der LPS-induzierten NF- κ B-Aktivierung reversibel ist.

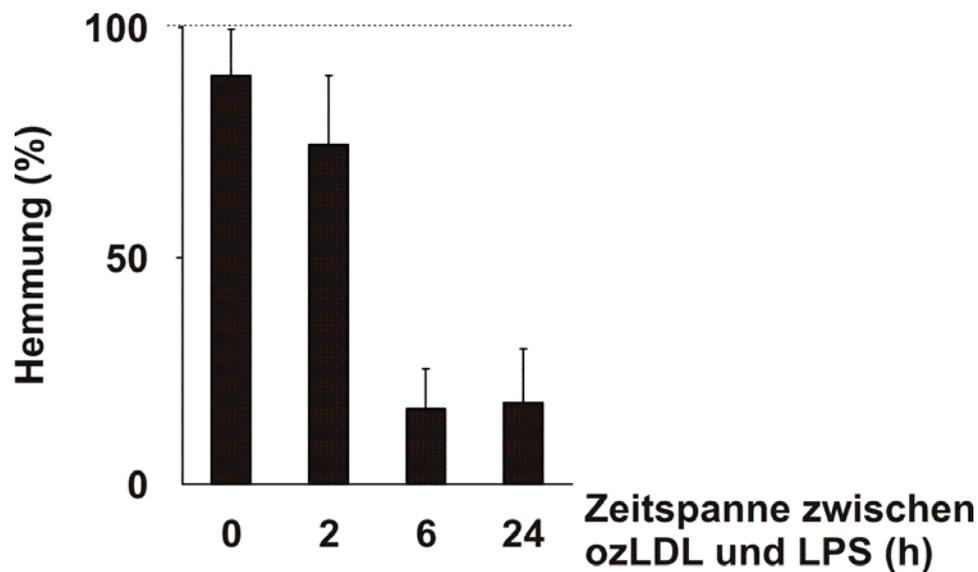


Abbildung 18: Die ozLDL-induzierte Hemmung der NF- κ B-Aktivierung hängt nicht von einem direkten Kontakt mit LPS ab und ist reversibel. THP-1-Zellen wurden 30 min mit ozLDL (10 μ g/ml) präinkubiert, bevor LPS (10 μ g/ml) für 1 h zugegeben wurde. Für die weiteren Zeitpunkte wurden die Zellen 90 min mit ozLDL vorbehandelt und dann in eine frische Zellkulturschale überführt. LPS wurde anschließend zu unterschiedlichen Zeitpunkten für 1 h zugegeben. Die LPS-induzierte NF- κ B-Aktivität diente als 100%-Wert (gestrichelte Linie) und das Ausmaß der Hemmung wurde als % dieses Wertes angegeben (n=3, MW \pm SD).

3.2.9. Die LPS-Bindung an die Zelloberfläche wird nicht von ozLDL blockiert

Im Anschluss daran sollte untersucht werden, ob die Hemmung der LPS-induzierten NF- κ B-Aktivierung durch eine Blockade der LPS-Bindung an die Zellmembran verursacht wird. Mittels Durchflusszytometrie konnten Zellen detektiert werden, an deren Oberfläche LPS gebunden war. Dafür wurde LPS eingesetzt, an das ein Fluorochrom (Fluoresceinisothiocyanat, FITC) gebunden ist.

Monozytäre Zellen wurden mit PBS, ozPBS, LDL bzw. ozLDL vorbehandelt. Danach wurde LPS (10 µg/ml) sowie 5 min später FITC-markiertes LPS (1 µg/ml) für insgesamt 1 h zugegeben. Es ist eine vergleichbare Bindung von LPS an die Zelloberfläche in Anwesenheit von ozLDL verglichen mit der Kontrolle zu sehen (Tab. 7).

Behandlung der Zellen	LPS- Bindung (% der Kontrolle) MW±SD (n=3)
PBS+LPS	100
ozPBS+LPS	98±5
LDL+LPS	103±12
ozLDL+LPS	104±7

Tabelle 7: Bindung von LPS an die Zelloberfläche bei ozLDL-Präinkubation. Monozytäre Zellen wurden mit PBS, ozoniertem PBS, unbehandeltem LDL oder ozoniertem LDL (10 µg/ml) für 30 min vorbehandelt. Danach wurden LPS (10 µg/ml) und FITC-markiertes LPS (1 µg/ml) für eine weitere Stunde zugegeben. Je Probe wurden mindestens 10^4 Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. Als 100% diente der Wert der in PBS präinkubierten Probe.

3.2.10. Hemmung der IκBα-Proteolyse durch ozLDL-Vorbehandlung

Wie bereits in Kapitel 1.2.2. beschrieben liegt NF-κB im nicht aktivierten Zustand im Zytosol an IκB-Inhibitorproteine gebunden vor (4, 7, 8, 23-25). Bei Stimulation degradieren diese Inhibitorproteine und geben NF-κB frei. Deshalb sollte als nächster Schritt der Einfluss von ozLDL auf die aktivierungsabhängige Proteolyse von IκBα untersucht werden. Diese Proteolyse wurde mittels Western blot-Analyse bestimmt. Erwartungsgemäß führte die Stimulation monozytärer Zellen mit LPS zu einer signifikanten IκBα-Proteolyse. Die Vorbehandlung mit ozLDL verschiedener Konzentrationen ergab eine dosisabhängige Hemmung der LPS-vermittelten Degradierung von IκBα (Abb. 19A und B). Passend zu den Bindungsaktivität-Daten (siehe Kap. 3.2.2.) zeigte eine Vorbehandlung mit ozLDL der Konzentration von 0,1 µg/ml keinen Effekt auf die LPS-vermittelte IκBα-Proteolyse,

während die Vorinkubation mit ozLDL der Konzentration 1 $\mu\text{g/ml}$ zu einer deutlichen Inhibierung der Degradierung von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ führte. Eine vollständige Hemmung der Proteolyse der Inhibitorproteine konnte mit einer Konzentration des modifizierten Lipoproteins von 10 $\mu\text{g/ml}$ erreicht werden. Als Kontrolle wurde die Konzentration an Aktin bestimmt, die erwartungsgemäß unbeeinflusst von der Vorinkubation blieb. In Übereinstimmung mit den Daten der zuvor beschriebenen Kontrolllexperimente (siehe Kap. 3.2.4.) war die LPS-vermittelte $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Proteolyse bei Vorinkubation mit ozPBS und unbehandeltem LDL nicht gehemmt (Abb. 20).

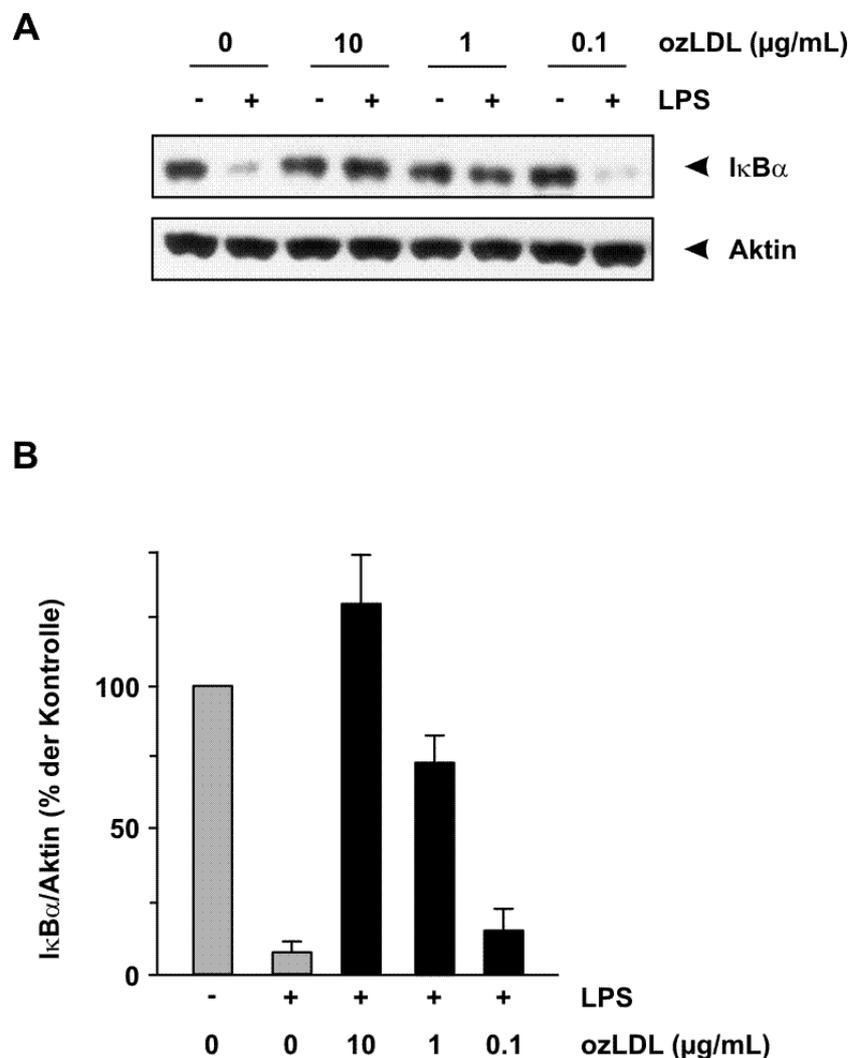


Abbildung 19: Hemmung der $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Proteolyse durch ozLDL-Vorbehandlung. A) Monozytäre Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen ozLDL für 30 min vorinkubiert, bevor LPS (10 $\mu\text{g/ml}$) für eine weitere Stunde zugegeben wurde. In den zytosolischen Extrakten erfolgte die Messung der Menge an $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ und Aktin durch Western blot-Analysen. B) Densitometrische Analyse von zwei unabhängigen Experimenten. Die Zellen wurden behandelt wie in A beschrieben. Der $\text{I}\kappa\text{B}\alpha/\text{Aktin}$ -Wert der unstimulierten und unbehandelten Proben wurde als 100% definiert (MW \pm SD).

Wie schon in Abbildung 17 gezeigt, findet die ozLDL-bedingte Hemmung auf transkriptioneller Ebene nur nach Stimulation mit LPS und nicht mit TNF statt. Dieses Ergebnis galt es weiter aufwärts in der Signalkaskade zu untersuchen. So konnte mittels Western blot-Analyse nachgewiesen werden, dass bei ozLDL-Vorinkubation nur die Proben, die anschließend mit LPS für 1 h behandelt wurden, eine Hemmung der I κ B α -Degradierung aufweisen. Im Gegensatz dazu ist bei einer Stimulierung der Zellen mit TNF in Abb. 20 eine deutliche Proteolyse des NF- κ B-Inhibitors zu beobachten. Dies gab einen Hinweis darauf, dass die Regulation an einem Punkt der teilweise divergenten Signalkaskaden ansetzt, der sich in Rezeptornähe befinden muss.

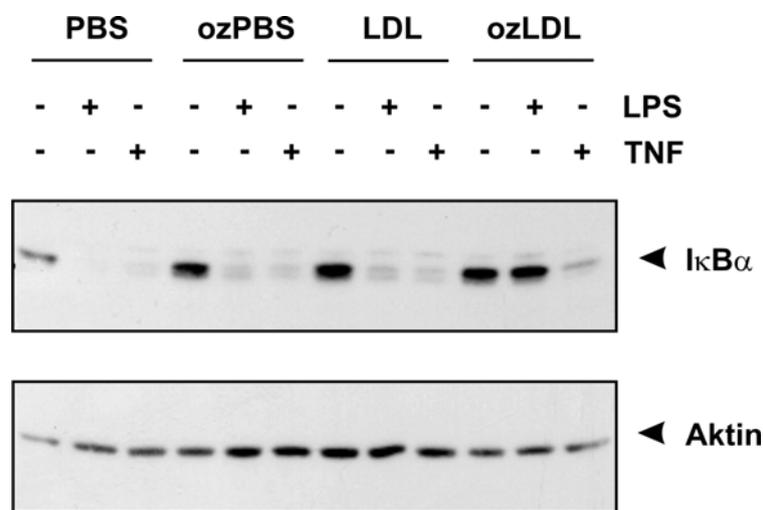


Abbildung 20: Die Hemmung der I κ B α -Proteolyse durch ozLDL ist LPS-spezifisch. THP-1-Zellen wurden mit PBS, ozonisiertem PBS, unbehandeltem LDL oder ozonisiertem LDL (10 μ g/ml) für 30 min vorbehandelt. Daraufhin wurden entweder LPS (10 μ g/ml) für eine weitere Stunde oder TNF (2 ng/ml) für weitere 15 min zugegeben. Die Menge an I κ B α wurde durch Western blot-Analyse bestimmt. Zusätzlich diente Aktin zur Kontrolle gleicher Ladung und Qualität der Extrakte.

3.2.11. Hemmung der NF- κ B-Zielgenexpression durch ozLDL

Um zu testen, ob sich die Hemmung von NF- κ B durch ozLDL auf die Expression von Zielgenen dieses Transkriptionsfaktors auswirkt, wurde die Produktion des Chemokins IL8 mittels ELISA gemessen. Nach der in Kapitel 3.2.4. beschriebenen Behandlung der THP-1-Zellen wurden die PBS-Lösungen durch Medium ersetzt, um anschließend nach den angegebenen Zeitintervallen die Zellen zu ernten. Wie zu erwarten, führte die LPS-Stimulation zu einem Anstieg der Produktion von IL8 (Abb. 21). Die mit ozLDL

vorbehandelten Zellen zeigten eine deutlich inhibierte LPS-induzierte Produktion von IL8, wenn diese 2,5 h und 5 h nach LPS-Stimulation gemessen wurde. Bei späteren Zeitpunkten wurde ein stetig abnehmender Verlauf der Hemmung der IL8-Produktion deutlich. So zeigten Messungen 10 h bzw. 20 h nach der Zugabe von LPS eine 58%-ige bzw. 10%-ige Inhibierung. Dies bestätigt, dass der inhibierende Effekt von ozLDL reversibel ist (siehe Kap. 3.2.8.). Weiterhin wurde untersucht, ob die Produktion von IL8 nach Vorbehandlung mit ozLDL beeinflusst ist, wenn mit TNF statt LPS stimuliert wird. Übereinstimmend mit den oben gezeigten Ergebnissen des Gelretardierungsassays und der Western blot-Analyse (siehe Kap. 3.2.7. und 3.2.10.) führte TNF zu einem signifikanten Anstieg der Produktion von IL8 unabhängig von der Vorbehandlung mit ozLDL (Daten nicht gezeigt). Dadurch konnte zum einen erneut die Selektivität der Hemmung der LPS-vermittelten Signalübertragung bewiesen und zum anderen gezeigt werden, dass die bisher beobachteten Effekte von ozLDL auch mit der Zielgenexpression korrelieren.

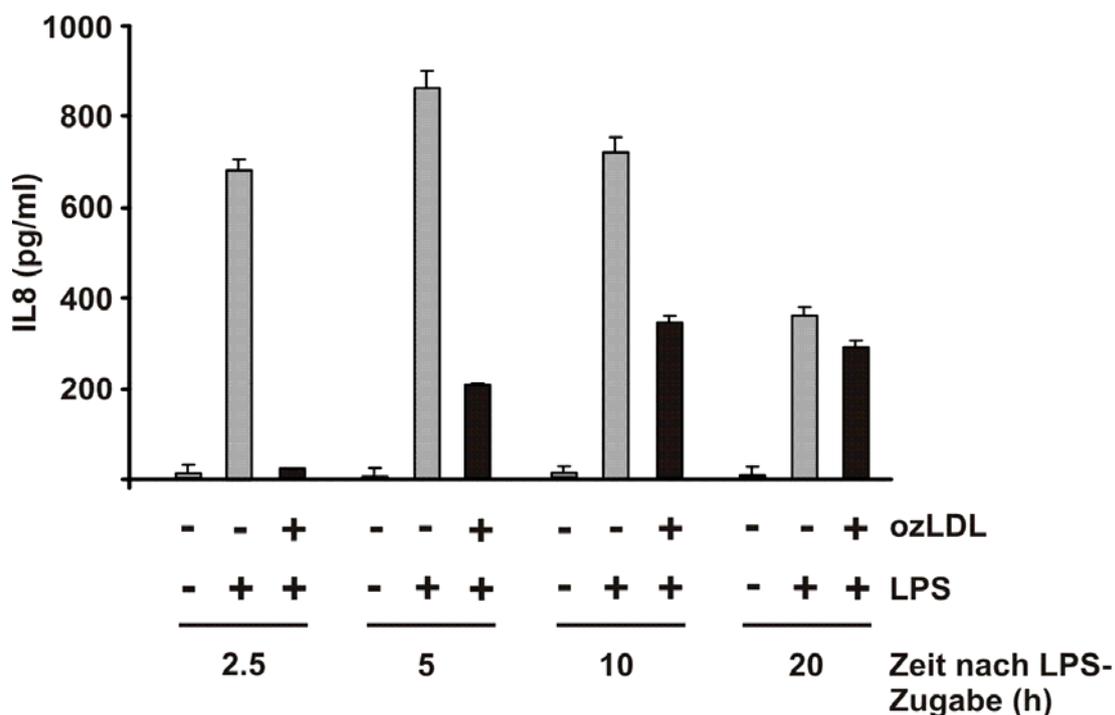


Abbildung 21: Hemmung der NF- κ B-Zielgenexpression durch ozLDL. THP-1-Zellen wurden mit ozLDL (10 μ g/ml) für 30 min vorinkubiert und anschließend wurde LPS der Konzentration 10 μ g/ml für eine weitere Stunde zugegeben. Die Produktion des Chemokins IL8 wurde im Zellkultur-Überstand mittels ELISA gemessen. Der IL8-Proteingehalt (pg/ml) ist als MW \pm SD dargestellt (n=2).

3.2.12. ozLDL hemmt die κ B-Promotor-abhängige Transkription

Um zu sehen, ob die Hemmung von NF- κ B durch ozLDL auch tatsächlich funktionelle Auswirkungen hat, wurden Untersuchungen mit einem 3 κ B-abhängigen Luziferasekonstrukt durchgeführt. Der hier verwendete Plasmid enthält das Luziferasegen als Reporter hinter einem Promotor bestehend aus 3 NF- κ B-Bindestellen. Dafür wurden THP-1-Zellen mit 2 μ g pGL2-3 κ B-Luc Reporter- und dem Renilla-Plasmid (0.2 μ g) transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS oder ozLDL vorbehandelt und mit LPS versetzt. Nach einer einstündigen Stimulierung wurde PBS durch Medium ersetzt. Es folgte die Gewinnung von Gesamtzellextrakten zu verschiedenen Zeitpunkten. Die Aktivität der induzierten Firefly-Luziferase konnte photometrisch ermittelt werden. Wie in Abbildung 22 zu sehen ist, aktiviert LPS schon 2,5 h nach seiner Zugabe deutlich die NF- κ B-abhängige transkriptionelle Aktivität, welche jedoch durch ozLDL-Präinkubation stark gehemmt ist. Schon nach 5 h ist die ozLDL-bedingte Wirkung auf die LPS-induzierte Transkription geringer und nach 10 bzw. 20 h kaum mehr vorhanden.

Durch diese Experimente konnte auf transkriptioneller Ebene die Korrelation der ozLDL-induzierten Hemmung des LPS-Signalwegs demonstriert werden. Dieses Ergebnis bestätigt die zuvor gewonnenen Erkenntnisse auf Protein- und Zielgenexpressionsebene auch hinsichtlich der Reversibilität des Effekts (siehe Kap. 3.2.8. und 3.2.11).

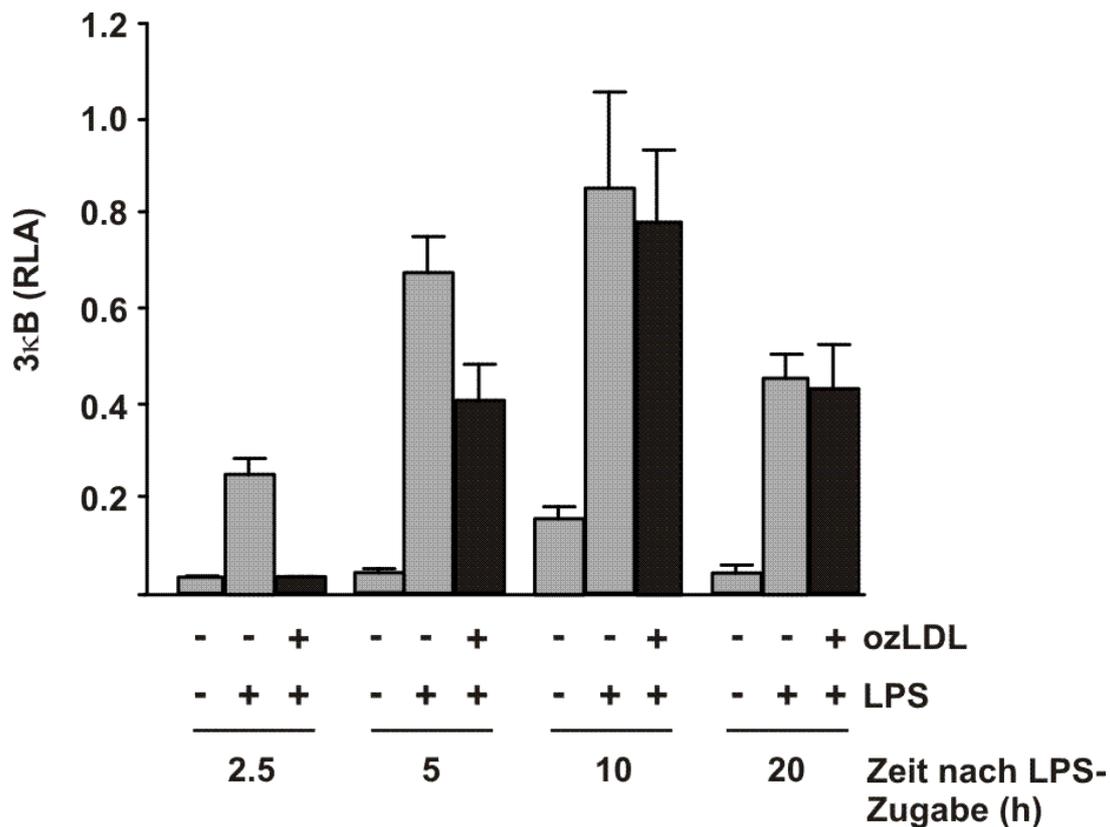


Abbildung 22: Hemmung der NF- κ B-Transkription durch ozLDL. Ein von einem Minimalpromotor, der dreimal das κ B-Motiv enthält (pGL2-3 κ B-Luc), reguliertes Luziferasereporterplasmid wurde zusammen mit dem pRLtk Renilla-Plasmid zur Normalisierung der Transfektionseffizienz in THP-1-Zellen kotransfiziert. Danach wurden die Zellen für 30 min mit ozLDL (10 μ g/ml) vorbehandelt, bevor LPS (10 μ g/ml) 1 h zugegeben wurde. Die Ergebnisse sind in RLA dargestellt (n=3, MW \pm SD).

3.2.13. Hemmung der I κ B-Kinaseaktivität durch ozLDL

Um den Einfluss von ozLDL auf die Signalübertragung oberhalb der I κ B-Inhibitorproteine zu untersuchen, wurde die Aktivität des IKK-Komplexes, der die I κ B-Proteine phosphoryliert (4, 29-31), in Anwesenheit von ozLDL gemessen. Die Zellen wurden mit ozLDL vorbehandelt, anschließend mit LPS (10 μ g/ml) für 30 min stimuliert. Die Aktivität des IKK-Komplexes wurde in zytosolischen Extrakten mittels Kinaseassays bestimmt, wobei der Phosphorylierungsstatus des Substrates GST-I κ B α gemessen wurde. Die Stimulation mit LPS induzierte erwartungsgemäß eine signifikante Zunahme der IKK-Aktivität (Abb. 23). In Übereinstimmung mit den zuvor beschriebenen Daten wurde eine deutliche Hemmung der IKK-Aktivität festgestellt, wenn die Zellen vor der LPS-Stimulierung mit ozLDL behandelt wurden. Diese Experimente deuten darauf hin, dass der inhibierende Effekt von ozLDL auf

die LPS-vermittelte NF- κ B-Aktivierung durch eine Hemmung auf Ebene des IKK-Komplexes oder weiter aufwärts in der Signalübertragungskaskade hervorgerufen wird.

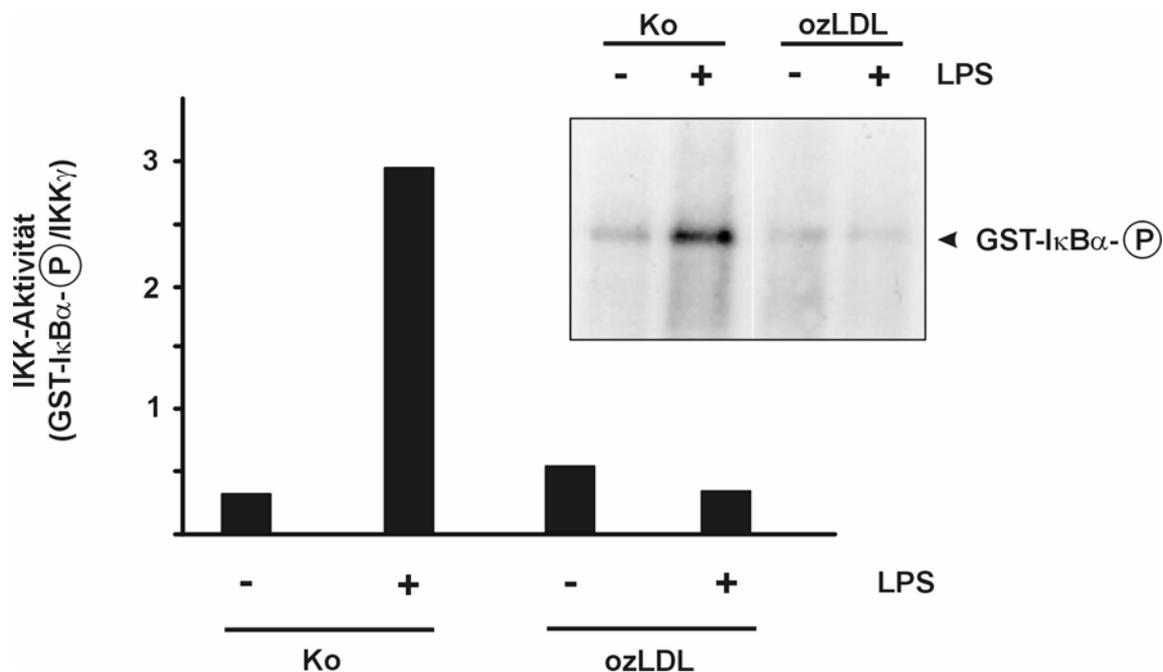


Abbildung 23: Hemmung der IKK-Aktivität durch ozLDL. Monozytäre Zellen wurden mit ozLDL (10 μ g/ml) für 30 min präinkubiert, und anschließend wurde LPS (10 μ g/ml) für 30 min hinzugegeben. Die IKK-Aktivität wurde durch einen Kinaseassay bestimmt (Inset) und der Quotient aus phosphoryliertem GST-I κ B α (GST-I κ B α -P) und IKK γ (Ladungskontrolle; nicht gezeigt) densitometrisch berechnet. Ko, Kontrolle.

3.2.14. Hemmung der IRAK-1-Phosphorylierung durch ozLDL

Um den Signalweg weiter aufwärts zu charakterisieren, wurden Untersuchungen auf IRAK-1-Ebene durchgeführt. Wie schon in Kapitel 1.2.4. beschrieben, führt eine Aktivierung von im Signalweg weiter oben befindlichem IRAK-4 zu einer Phosphorylierung von IRAK-1, was weitere Autophosphorylierungsprozesse dieses Proteins zur Folge hat (48, 51). Die Phosphorylierung von IRAK-1 wurde mittels Kinaseassays untersucht, nachdem die Zellen erst mit ozLDL und anschließend mit LPS behandelt wurden. Nach 15 Minuten ist deutlich eine LPS-bedingte Phosphorylierung von IRAK-1 zu erkennen (Abb. 24). Dieser Phosphatgruppentransfer konnte wiederum durch ozLDL-Präinkubation inhibiert werden. In Abbildung 24 ist auch das Verhältnis zwischen phosphoryliertem und unmodifiziertem IRAK-1 (als Ladungskontrolle) dargestellt. Dieses Experiment zeigt, dass die Hemmung des

LPS-induzierten Signals ihren Ursprung auf der Ebene von IRAK-1 oder weiter oberhalb in der Signalkaskade hat.

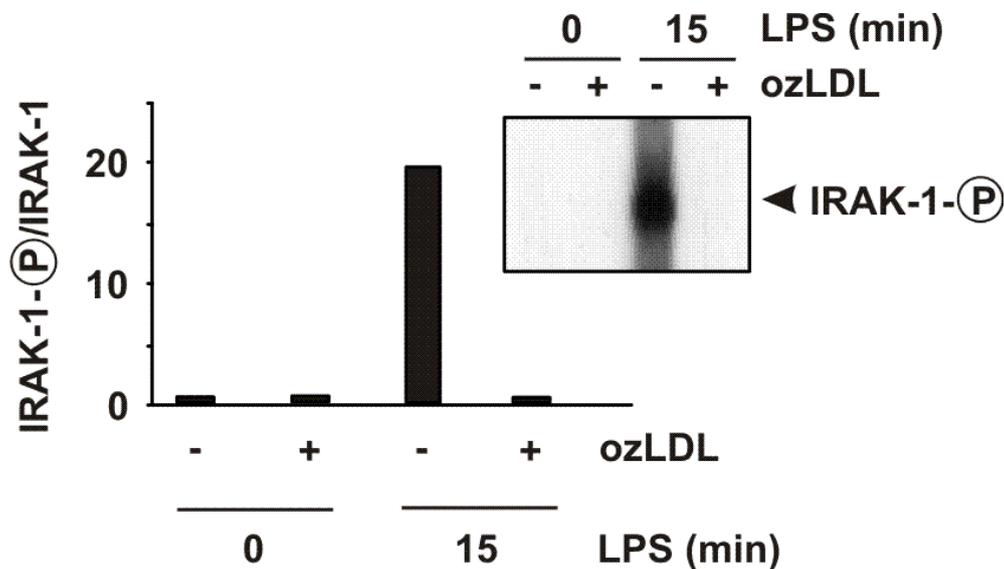


Abbildung 24: Hemmung der IRAK-1-Aktivität durch ozLDL. Monozytäre Zellen wurden 30 min mit 10 µg/ml ozLDL vorbehandelt. Dann wurde mit 10 µg/ml LPS 15 min stimuliert. Die Phosphorylierung von IRAK-1 wurde mittels Kinaseassay bestimmt (Inset) und das Verhältnis aus phosphoryliertem IRAK-1 (IRAK-1-P) und IRAK-1 (Ladungskontrolle) densitometrisch berechnet und dargestellt.

3.2.15. Hemmung der IRAK-1-Degradierung durch ozLDL

Die oben gezeigte Phosphorylierung von IRAK-1 (siehe Kap. 3.2.14.), die nach LPS-Stimulation erfolgt, führt zur anschließenden Degradierung des Proteins (51, 52). Somit war es wichtig, die vorherigen Ergebnisse durch Western blot-Analysen zu bestätigen. Dafür wurden THP-1-Zellen mit PBS oder ozLDL vorbehandelt und dann mit 10 µg/ml LPS für verschiedene Zeitintervalle (0 bis 120 min) versetzt. Dabei zeigte sich, dass schon nach 30 min in nur mit PBS vorbehandelten Zellen ein proteolytischer Abbau stattfindet (Abb. 25). Im Gegensatz dazu ist keine Degradierung von IRAK-1 zu sehen, wenn die Zellen mit ozLDL präinkubiert wurden. Somit konnte bestätigt werden, dass ozLDL den LPS-induzierten Signalweg auf IRAK-1-Ebene hemmt.

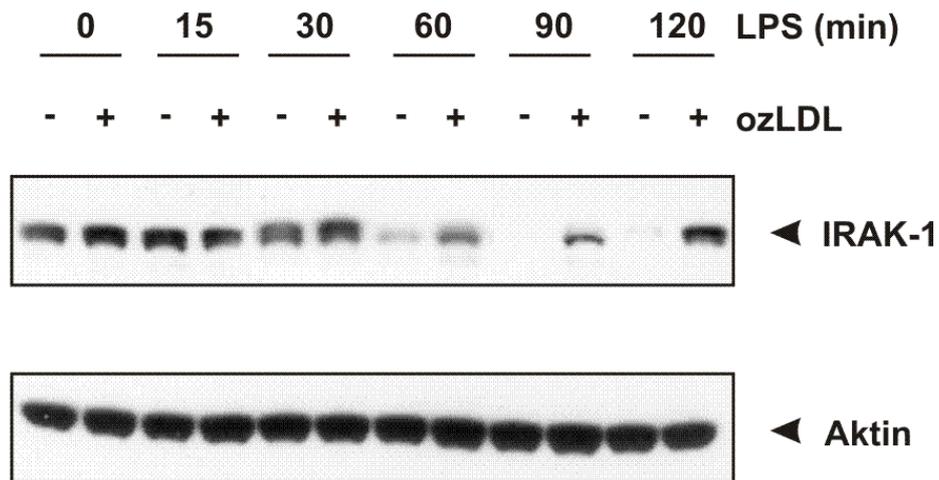


Abbildung 25: ozLDL inhibiert die LPS-induzierte Degradierung von IRAK-1. THP-1-Zellen wurden für 30 min mit ozLDL (10 µg/ml) präinkubiert. Dann wurde mittels Western blot-Analyse die Degradierung von IRAK-1 nach LPS-Stimulation (10 µg/ml) in Zeitverlaufsexperimenten untersucht. Das Aktinprotein diente dabei als Ladungskontrolle.

3.2.16. Weitere Anhaltspunkte für eine selektive Hemmung des LPS-vermittelten Signalwegs

Als weiterer Schritt sollte untersucht werden, ob bei der ozLDL-bedingten Hemmung der NF-κB-Aktivierung (siehe Kap. 3.2.7 und 3.2.10) auch auf IRAK-1-Ebene eine Selektivität hinsichtlich des Stimulus zu beobachten ist. In einem Zeitverlaufsexperiment ist im Western blot schon nach 60 min eine Degradierung von IRAK-1 bei LPS-Stimulation zu sehen. Handelt es sich jedoch bei dem Stimulus um TNF, so findet keine Proteolyse dieses Proteins statt (Abb. 26).

Zusammengefasst zeigen diese Experimente, dass erwartungsgemäß die durch ozLDL hervorgerufene Hemmung von NF-κB selektiv nur die TLR4-vermittelte Signaltransduktion betrifft.

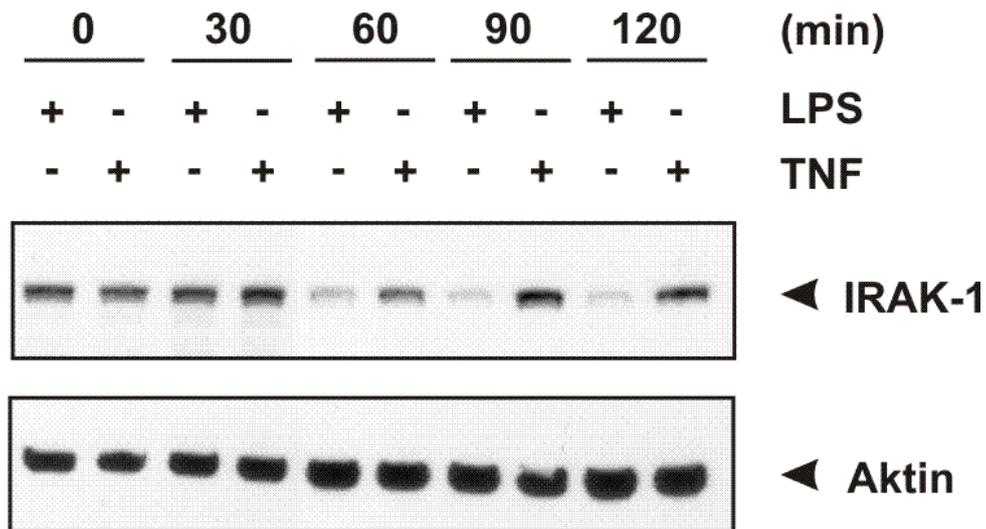


Abbildung 26: Die Proteolyse von IRAK-1 ist LPS-spezifisch. THP-1-Zellen wurden im Rahmen von Zeitverlaufsexperimenten mit LPS (10 µg/ml) oder TNF (2 ng/ml) stimuliert. Die Menge an IRAK-1 wurde durch Western blot-Analyse bestimmt. Zusätzlich diente Aktin zur Kontrolle gleicher Ladung und Qualität der Extrakte.

3.3. Aktive Komponente von ozLDL

In diesem Teil der Arbeit wurden Experimente mit ozoniertem Cholesterin (ozChol) und mit einzelnen Produkten der Ozonierung von Cholesterin durchgeführt. LDL besteht zu ungefähr 50% aus Cholesterin (106). Wie schon in Kapitel 3.1.3.2. gezeigt, erhält man bei der Ozonierung von Cholesterin eine starke Modifikation dieses Moleküls. In der Literatur sind mehrere Produkte dieser Reaktion beschrieben (78, 108). Die Suche nach der aktiven Komponente von ozLDL wurde mit Experimenten mit ozChol, einem Gemisch aus verschiedenen Produkten, das bei der Ozonierung von Cholesterin entsteht sowie mit einigen käuflich erhältlichen Reinsubstanzen, die Produkte der Ozonierungsreaktion darstellen, durchgeführt (Abb. 27).

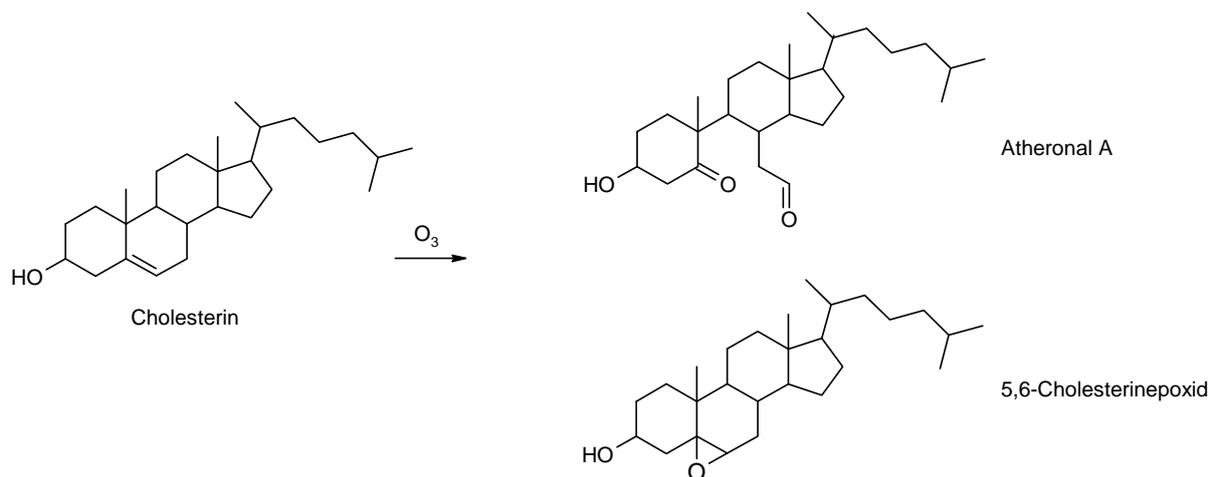


Abbildung 27: Produkte der Reaktion von Cholesterin mit Ozon nach Gumulka *et al.* (108).

3.3.1. Hemmung des NF- κ B-Systems durch ozoniertes Cholesterin (ozChol)

Da Cholesterin ein wichtiger Bestandteil von LDL ist, waren Experimente notwendig, in denen die Zellen nur mit ozoniertem Cholesterin vorbehandelt wurden. Dafür wurde eine Cholesterin-Suspension in PBS hergestellt und anschließend ozoniert (siehe Kap. 2.2.3.). Monozytäre THP-1-Zellen wurden mit PBS, Cholesterin (Chol) oder ozChol 30 min vorbehandelt und anschließend mit LPS stimuliert. Dabei konnte im Falle einer PBS- bzw. Chol-Präinkubation eine deutliche Bindung von NF- κ B im Gelretardierungsassay nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu zeigten die ozChol-vorbehandelten Zellen eine komplette Inhibierung der NF- κ B-Aktivierung (Abb. 28). Experimente mit ozoniertem Cholesterin, welches aus der Ozonierung von wasserlöslichem Cholesterin erhalten wurde, lieferten vergleichbare Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

Diese Daten deuten darauf hin, dass ozoniertes Cholesterin die Komponente ist, welche für die von ozoniertem LDL vermittelte Hemmung des LPS-induzierten Signalwegs verantwortlich ist.

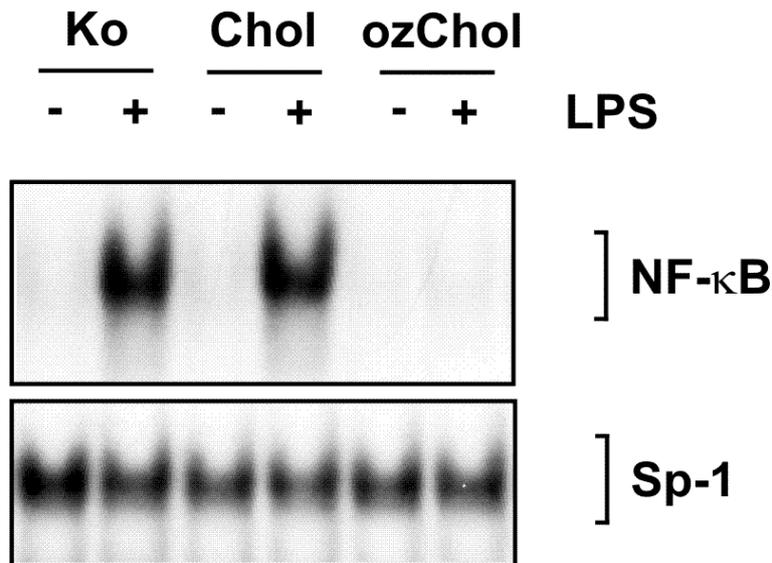


Abbildung 28: Die LPS-induzierte NF-κB-Aktivierung wird durch ozChol gehemmt. THP-1-Zellen wurden mit Cholesterin (Suspension) und ozoniertem Cholesterin vorbehandelt. Anschließend wurde LPS (10 µg/ml) 1 h hinzugefügt. Die Aktivität von NF-κB wurde in den nukleären Extrakten durch Gelretardierungsassays dargestellt. Die Sp-1-Bindungsaktivität diente zur Kontrolle gleicher Ladung und Qualität der Extrakte. Als Kontrolle (Ko) wurde eine in ozPBS präinkubierte Probe verwendet.

3.3.2. Hemmung von NF-κB durch α-EChol

Um weiterführende Analysen der aktiven Komponente von ozLDL und ozChol zu realisieren, wurde mittels Gelretardierungsassays die Hemmung von NF-κB nach Vorinkubation der Zellen mit einigen bekannten Produkten der Ozonierung von Cholesterin untersucht. Zunächst wurden THP-1-Monozyten 30 min mit 30 µg/ml (α-EChol) vorbehandelt und anschließend mit LPS stimuliert. Wie in Abbildung 29 deutlich dargestellt, führt eine Präinkubation mit dem Epoxid zu einer Hemmung der NF-κB-Aktivität. Die Anwesenheit dieses Moleküls ist kein besonderes Merkmal von ozLDL, da es auch schon in oxLDL nachgewiesen wurde. Dieses Experiment zeigt jedoch, dass schon eine geringere als die in den vorliegenden Versuchen stattfindende Ozonierung von Cholesterin zu einer Hemmung des LPS-induzierten Signalwegs führt.

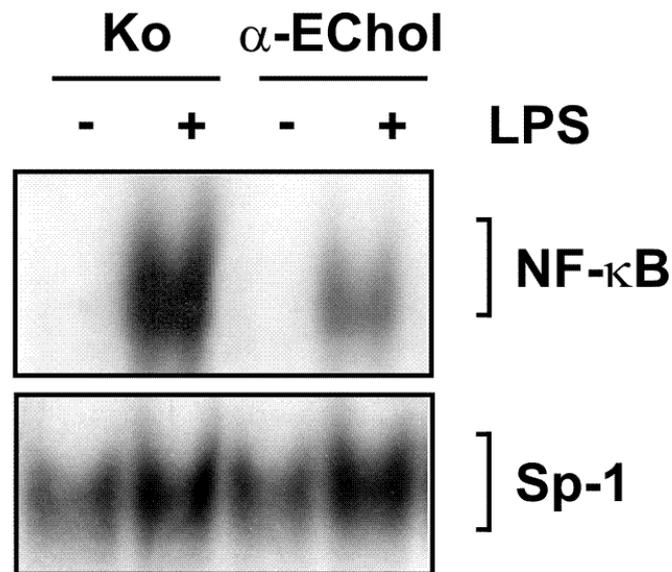


Abbildung 29: Hemmung der LPS-induzierten NF- κ B-Aktivierung durch α -EChol. THP-1-Zellen wurden mit 30 μ g/ml α -EChol 30 min präinkubiert. Dann wurde LPS 10 μ g/ml für 1 h zugegeben. Die Aktivität von NF- κ B und Sp-1 wurde mit Gelretardierungsassays dargestellt. Die Bindungsaktivität von Sp-1 wurde als Ladungskontrolle verwendet.

3.3.3. Hemmung von NF- κ B durch Atheronal A

Schließlich war es von Interesse, den Effekt von Atheronal A auf monozytäre Zellen zu untersuchen. Diese bereits publizierte (78, 109), in der arteriosklerotischen Läsion identifizierte Substanz ist ebenfalls ein Produkt der Ozonierung von Cholesterol und somit ein Bestandteil von ozChol sowie ozLDL. Dazu wurden THP-1-Zellen mit 30 μ g/ml AthA 30 min präinkubiert und anschließend mit LPS versetzt. Die Gelretardierungsexperimente zeigten eine deutliche Hemmung der NF- κ B-Aktivierung in AthA-vorbehandelten Proben gegenüber der PBS-Kontrolle (Abb. 30). Dieses Ergebnis zeigt, dass Produkte der Ozonierung von LDL einen starken Effekt auf entzündungsassoziierte Mechanismen der Signalübertragung ausüben.

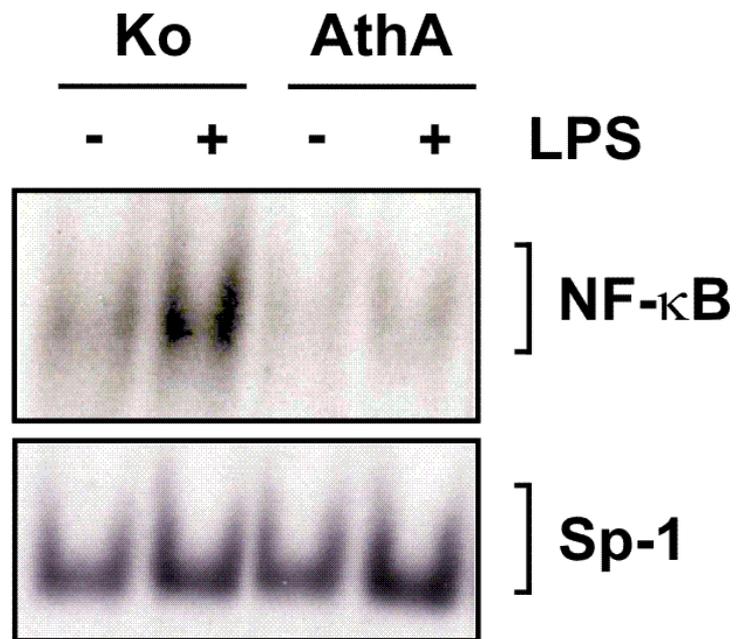


Abbildung 30: Hemmung der Aktivierung von NF-κB durch Atheronal A. Monozytäre THP-1-Zellen wurden mit 30 µg/ml Atheronal A 30 min vorbehandelt, bevor LPS 10 µg/ml für 1 h zugegeben wurde. Die Aktivität von NF-κB wurde in den nukleären Extrakten mit Gelretardierungsassays erfasst. Die Sp-1-Bindungsaktivität diente als Ladungskontrolle

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals in Zellkultur-Experimenten untersucht, in welcher Weise oxLDL das NF- κ B-System moduliert. Dafür wurde vor allem im monozytären Modell die durch LPS sowie TNF induzierte NF- κ B-Signaltransduktion untersucht. Schließlich wurden Studien zur Charakterisierung der aktiven Komponente von oxLDL durchgeführt.

4.1. Ozon in der arteriosklerotischen Läsion

In letzter Zeit wurde in mehreren Studien ein endogenes Vorkommen von Ozon im menschlichen Organismus postuliert (77, 78, 81, 90). So geben neuere Untersuchungen deutliche Hinweise darauf, dass Ozon in humanen arteriosklerotisch veränderten Arterien vorkommt und auch bei anderen inflammatorischen Erkrankungen eine Rolle spielen könnte (77, 78, 81). Bestimmte Moleküle, die ausschließlich durch die Ozonierung von Lipiden entstehen, wurden in arteriosklerotischem Gewebe nachgewiesen, welches durch Endarteriektomie der Arteria carotis gewonnen wurde. Dies lässt vermuten, dass Ozon während der Entstehung der arteriosklerotischen Läsion gebildet wird. Zusätzlich wurde eine Zunahme dieser Ozon-spezifischen Produkte festgestellt, wenn arteriosklerotisches Gewebe aus der Plaque kultiviert und *in vitro* aktiviert wurde. In diesem Zusammenhang wird diskutiert, ob Ozon eine bisher nicht geahnte Schlüsselrolle bei der Entstehung der arteriosklerotischen Plaque einnimmt (110). Da sich arteriosklerotische Läsionen durch eine Akkumulation von Lipoproteinen auszeichnen, von denen bekannt ist, dass sie in modifizierter Form zur Entstehung der Arteriosklerose beitragen (77, 78, 90), stellte sich die Frage, wie sich die Ozonierung von Lipoproteinen auf zelluläre Funktionen auswirkt.

4.2. Charakterisierung von oxLDL

Die vorliegende Arbeit beschreibt ein Verfahren zur Modifikation von LDL durch Ozon. Im Rahmen von Vorversuchen wurde die geeignete wässrige Lösung für Experimente mit Zellen ermittelt. Dabei war das Ziel, zunächst eine Reaktion des Gases mit einer LDL-Lösung und anschließend ein Entweichen des Gases zu erhalten, um direkte Effekte von noch frei gelöstem Ozon auf die Zellen ausschließen zu können. Wasser ist kein geeignetes Medium für Zellversuche. Es konnte gezeigt werden, dass in PBS eine vergleichbare Ozonkonzentration wie in Wasser gelöst ist, hier jedoch das Gas schneller entweicht. Das

Zellkulturmedium erwies sich für diese Zwecke als ungeeignet, da keine Löslichkeit zu beobachten war. Diese Tatsache deutet darauf hin, dass in diesem Milieu das Ozon sofort mit den gelösten Substanzen wie Aminosäuren weiterreagiert (111, 112). Andererseits konnte gezeigt werden, dass die Effekte von ozonierten Lösungen, die erst eine Stunde nach Ozonierung verwendet werden, nur auf die veränderten Eigenschaften der Lösung und nicht auf das gelöste Ozon zurückzuführen sind, da das Ozon nach einer Stunde aus der Flüssigkeit entwichen ist.

Da Cholesterin ein wichtiger Bestandteil von LDL und in der Literatur ein Produkt der Ozonierung von Cholesterin als Bestandteil des arteriosklerotischen Gewebes beschrieben ist (78), galten die ersten Bemühungen zur Charakterisierung von oxLDL der Untersuchung der Veränderungen von LDL-Cholesterin. Cholesterinoxidase-Assays zeigten in oxLDL geringfügige Mengen an Cholesterinester und kein freies Cholesterin. Im Gegensatz dazu konnten in LDL und oxLDL beträchtliche und in Übereinstimmung mit der Literatur (113) vergleichbare Konzentrationen an freiem sowie an verestertem Cholesterin dargestellt werden. Auch massenspektrometrische Untersuchungen (LC/MS bzw. MS/MS) von in wässrigem Medium ozonierten LDL bzw. Cholesterin lieferten das gleiche Ergebnis. Der Peak für Cholesterin war in LDL sowie in oxLDL deutlich zu erkennen. Die hier vorgestellten Daten zeigten das Verschwinden dieses Signals, aber das Auftreten eines neuen Hauptpeaks mit höherer relativer Molekülmasse, das auf ein Oxidationsprodukt von Cholesterin durch das Ozon hindeutet. Weiterhin zeigten die ApoB100-Analysen von LDL und oxLDL eine gemeinsame Proteinbande, obwohl ApoB100 in oxLDL einer ausgesprochenen Proteinfragmentierung unterliegt (114). Im Vergleich dazu wurde bei ozonierten LDL-Proben eine komplette Proteolyse von Apolipoprotein B festgestellt.

Zusammen genommen führen diese Experimente zur Schlussfolgerung, dass oxLDL eine neue Substanz darstellt, die sich von dem schon relativ gut untersuchten oxLDL (27, 93, 115) deutlich unterscheidet. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass eine starke Ozonierung des LDL-Cholesterins von, wie in der Literatur beschrieben (108) zur Entstehung eines Secosterols führt, was sich durch die oben beschriebenen Ergebnisse als das 3,5-dioxo-5,6-secocholestan-6-al (Ketoatheronal A) identifizieren ließ.

4.3. Dosisabhängige Hemmung des NF- κ B-Systems durch oxLDL

Im zweiten Teil der Studie wurden die Effekte von oxLDL auf das NF- κ B-System in inflammatorischen Prozessen untersucht. LPS wurde dabei als Stimulus verwendet, da es ein

wirksamer Aktivator für Mechanismen der angeborenen Immunantwort ist (28). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass mit Ozon behandeltes LDL keinen Effekt auf die NF- κ B-Bindungsaktivität hat. Jedoch war ozLDL in der Lage, das NF- κ B-System, welches durch LPS aktiviert wird, in verschiedenen Zellen dosisabhängig und reversibel zu inhibieren. Diese Hemmung wurde allein durch die Modifikation des Lipoproteins verursacht, weil ozoniertes PBS oder unbehandeltes LDL keinerlei hemmende Wirkung hervorriefen. Eine nahezu vollständige Hemmung der durch LPS induzierten NF- κ B-Aktivierung nach Vorinkubation mit ozLDL konnte in monozytären THP-1-, in Endothelzellen sowie in humanen primären Monozyten/Makrophagen gezeigt werden. Somit zeigten diese Ergebnisse, dass ozLDL beträchtliche Auswirkungen auf unterschiedlichen Zelltypen hervorruft, die mit den verschiedenen Stadien der Entwicklung der Arteriosklerose assoziiert sind (61, 92).

Da der Weg der LPS-vermittelten Aktivierung von NF- κ B über die Degradierung des Inhibitorproteins I κ B α führt (4, 21, 40), konnte der Hemmeffekt von ozLDL auf das NF- κ B-System durch Untersuchungen von I κ B α bestätigt werden. In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass der proteolytische Abbau von I κ B α durch die Vorbehandlung mit ozLDL verschiedener Konzentrationen dosisabhängig gehemmt ist. Die funktionelle Relevanz dieser Hemmung ergibt sich aus der Tatsache, dass die LPS-vermittelte Expression von NF- κ B-Zielgenen (28) sowie die Promotor-abhängige Transkription ebenfalls selektiv gehemmt waren.

Bei dem hochreaktiven und aggressiven Agens Ozon (71) musste streng überwacht werden, ob die beobachteten Effekte von ozLDL nicht auf einer toxischen Wirkung beruhen. Dabei sprach der reversible Charakter der beschriebenen Inhibierung der LPS-vermittelten NF- κ B-Aktivierung und der darauffolgenden Expression von IL8 in Langzeitexperimenten gegen eine ozLDL-bedingte Toxizität. Darüber hinaus zeigten sich sowohl der konstitutive Transkriptionsfaktor Sp-1 als auch das Gerüstprotein Aktin in allen Experimenten durch die Behandlung mit ozLDL nicht beeinflusst. Auch die Beobachtung der Zellmorphologie und Zellzahl sowie die Auswertung der verwendeten Toxizitätstests gaben unter den Bedingungen der Experimente keinen Hinweis auf einen potentiellen toxischen Effekt des modifizierten Lipoproteins.

Oxidativer Stress tritt auf, wenn eine übermäßige Produktion von ROS stattfindet (116). Unter physiologischen Bedingungen werden ROS während der Zellatmung und durch aktivierte phagozytierende Zellen gebildet, die an der Immunantwort beteiligt sind (116). In der Literatur beschriebene Studien zeigten, dass ROS in THP-1 nach Stimulierung mit LPS

eine Zunahme erfahren (117) und somit NF- κ B aktivieren (28). Andererseits wurde bei starkem oxidativen Stress auch eine Hemmung des NF- κ B-Systems beobachtet (118). In dieser Arbeit konnten ROS als Initiatoren der Inhibierung ausgeschlossen werden, da eine deutliche Zunahme der ROS in oxLDL-vorbehandelten Proben im Vergleich zur Kontrolle ausblieb.

4.4. NF- κ B und modifiziertes LDL

In der Vergangenheit wurden verschiedene Effekte von modifiziertem LDL auf das NF- κ B-System beschrieben. Auf der einen Seite wurde gezeigt, dass eine Kurzzeitinkubation mit leicht oxidiertem LDL, MM-LDL, und mit durch Kupfer modifiziertem LDL NF- κ B auf Gelshiftebene aktiviert und die NF- κ B-Zielgenexpression fördert (27, 119-121). Andererseits wurde eine hemmende Wirkung von modifizierten Lipoproteinen auf das NF- κ B-System belegt, wenn jene vollständig oxidiert waren und längere Inkubationszeiten angewendet wurden (27, 122-124). Außerdem wurde eine Inhibierung der Stimulus-abhängigen Degradierung von I κ B α in Gegenwart von oxLDL festgestellt (115). Weiterhin wurden Bestandteile von oxLDL als Inhibitoren der LPS-induzierten NF- κ B-Aktivierung bei einer kurzen Vorbehandlung der Zellen beschrieben (101, 125, 126). In der vorliegenden Arbeit führte die Ozonierung von LDL zur Entstehung von Produkten, die eine Aktivierung von NF- κ B hemmten. Dabei war ein sehr kurzes Präinkubationsintervall mit den entstandenen Produkten ausreichend, um das NF- κ B-System zu inhibieren, ohne dabei toxisch zu wirken.

4.5. Selektivität der inhibierenden Wirkung von oxLDL auf LPS-vermittelte Signalwege

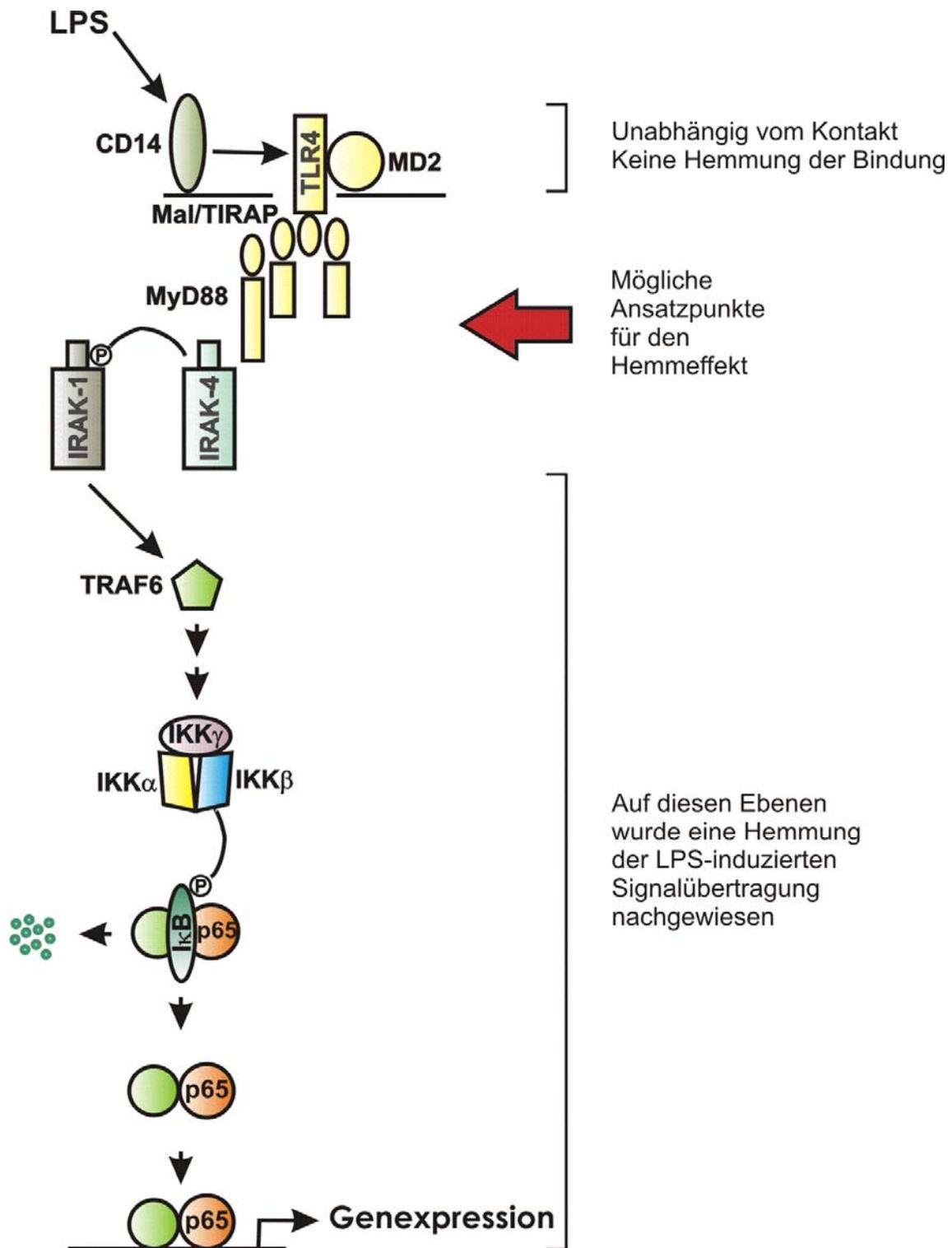
In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass oxLDL die Aktivierung des NF- κ B-Systems selektiv in den Proben hemmte, die mit LPS stimuliert wurden, während TNF-vermittelte Signalwege durch die Vorbehandlung mit oxLDL unbeeinflusst blieben. In diesem Zusammenhang sollte erwähnt werden, dass durch das Zytokin TNF ein anderer Signalweg induziert wird als durch LPS (48, 127). Bei dem durch TNF vermittelten Signalweg führt die Stimulation zu der Formation eines spezifischen Multiproteinkomplexes an der Zellmembran und zur anschließenden Aktivierung des IKK-Komplexes (127). Auf der anderen Seite führt die LPS-induzierte Signalübertragung, nachdem LPS im Serum an das LBP und an CD14 gebunden hat, initial zur Bildung des so genannte LPS-Erkennungs-Komplexes ("LPS recognition complex") (Abb. 31) (48). Dieser Erkennungs-Komplex besteht neben dem

TLR4-Rezeptor und CD14 aus einem zusätzlichen Protein, das als MD2-Protein bezeichnet wird. Dies setzt eine Kaskade von Assoziations- und Phosphorylierungsschritten in Gang (128). Der LPS-Signalweg führt über weitere Signalproteine wie z.B. MyD88 und Proteine der IRAK-Familie (51). Das IRAK-1-Protein wird dabei (auto)phosphoryliert (51). Aktiviertes IRAK-1 interagiert mit weiteren Signalproteinen, wodurch es letztendlich zur Phosphorylierung und Aktivierung von IKK und zum anschließenden Proteasom-vermittelten Abbau der $\text{I}\kappa\text{B}$ -Inhibitorproteine kommt (51). Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Experimente zeigten bei der Präinkubation mit ozLDL eine Hemmung der durch LPS-induzierten Proteolyse von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, der Aktivität des IKK-Komplexes und der IRAK-1-Phosphorylierung (Abb. 28). Diese Ergebnisse zusammen mit der Tatsache, dass nur LPS und nicht TNF die Degradierung von IRAK-1 bewirkt, führen zu dem Schluss, dass die TLR4-vermittelte Signalübertragung auf der Ebene von IRAK-1 oder oberhalb von IRAK-1 durch ozLDL beeinflusst ist.

Andererseits konnte bewiesen werden, dass für die Hemmung kein direkter Kontakt von ozLDL mit LPS notwendig ist, da der inhibitorische Effekt auch zu beobachten ist, wenn LPS 2 Stunden nach Entfernen von ozLDL zugegeben wird. An dieser Stelle sollte erwähnt werden, dass in früheren Studien gezeigt wurde, dass oxidierte Phospholipide die LPS-induzierte NF- κ B-Aktivierung durch Blockade der Interaktion zwischen LPS und LBP sowie CD14 hemmen (125, 126, 128). Im Gegensatz dazu konnte in der vorliegenden Arbeit demonstriert werden, dass eine Präinkubation der Zellen mit ozLDL keine Abnahme der LPS-Bindung an die Zelloberfläche verursacht. Daraus folgt, dass eine Abnahme der LPS-Bindung an die Zelloberfläche nicht für die beobachtete Hemmung des NF- κ B-Systems verantwortlich ist.

Abbildung 31: Hemmung der LPS-vermittelten Signalübertragung durch ozLDL. Bei Präinkubation mit ozLDL konnte in LPS-stimulierten Zellen eine Inhibition der Phosphorylierung und der anschließenden Degradierung von IRAK-1 beobachtet werden verglichen mit den durch LPS induzierten Kontrollen. Außerdem konnte bei Vorbehandlung mit ozLDL eine Hemmung der Aktivität von IKK, der Proteolyse von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$, der Aktivität von NF- κ B und der Expression von NF- κ B-Zielgenen nachgewiesen werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass diese Hemmeffekte nicht durch Kontakt von ozLDL mit LPS in Lösung und nicht durch eine Blockade der LPS-Bindung an die Zelle bedingt ist. Diese Ergebnisse führen zu dem Schluss, dass die TLR4-vermittelte Signalübertragung durch ozLDL oberhalb oder auf IRAK-1-Ebene, aber unterhalb der LPS-Zellbindungsebene beeinflusst ist. Dafür kommen als potentielle Zielmoleküle verschiedene

Bestandteile des LPS-Initiierungskomplexes oder die in Richtung IRAK-1 gerichteten Signalmoleküle in Betracht.



4.6. Wirkung von ozLDL und der Ozonierungsprodukte von Cholesterin

Sollte Ozon tatsächlich an der körpereigenen Immunabwehr beteiligt sein und somit im Körper produziert werden, stellt sich die Frage, wie sich die Ozonierung von LDL auswirken würde und welche Produkte bei der Regulation von entzündlichen Prozessen eine entscheidende Rolle spielen.

Wie schon erwähnt, entstehen aus der Ozonierung von Cholesterin u.a. so genannte Secosterole, wie Atheronal A, Atheronal B (78, 108) oder das Ketoatheronal A bei der hier verwendeten Methode. Die hier vorgestellten Daten zeigen, dass Ozonierungsprodukte von Cholesterin als aktive Komponente für eine Inhibierung des LPS-induzierten Signalwegs verantwortlich sind. So wurde in dieser Arbeit eine hemmende Wirkung von durch Ozon modifiziertem Cholesterin (ozChol) auf das NF- κ B-System belegt. Zusätzlich zeigten auch verschiedene Produkte der Ozonierung von Cholesterin, namentlich das 5 α ,6 α -Cholesterinepoxid und das von Wentworth *et al.* (78) identifizierte 5,6-Secosterol inhibierende Effekte auf die NF- κ B-Aktivität. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Charakterisierung von ozLDL und untermauern die Daten aus den Experimenten mit ozLDL.

Als Secosteroide oder Secosterole werden Steroid-Derivate mit einem aufgebrochenen Ring bezeichnet (129). Der Name leitet sich aus der lateinischen Vorsilbe Seco (schneiden) und ebenso aus der Substanzklasse der Steroide ab. Es gibt eine Vielfalt an Secosterolen im Menschen und im Tierreich. Die bekanntesten Secosterole im menschlichen Körper sind die 9,10-Secosterole Ergocalciferol (Vitamin D₂) sowie das Cholecalciferol (Vitamin D₃) und seine aktive Form, das Cholecalcitriol (1,25-Dihydroxycholecalciferol) (Abb. 32) (129). Interessanterweise sind die Strukturen von Ketoatheronal A und von den Vitamin D₂- bzw. D₃-Molekülen sehr ähnlich. Alle drei Substanzen besitzen ein gleiches Grundgerüst, bestehend aus den C- und D-Ringen und aus einer Methylgruppe des Cholesterins. Dies könnte zu einer analogen Endozytose oder Bindung an einen Membranrezeptor führen, was eine gleiche biologische Aktivität zur Folge haben könnte.

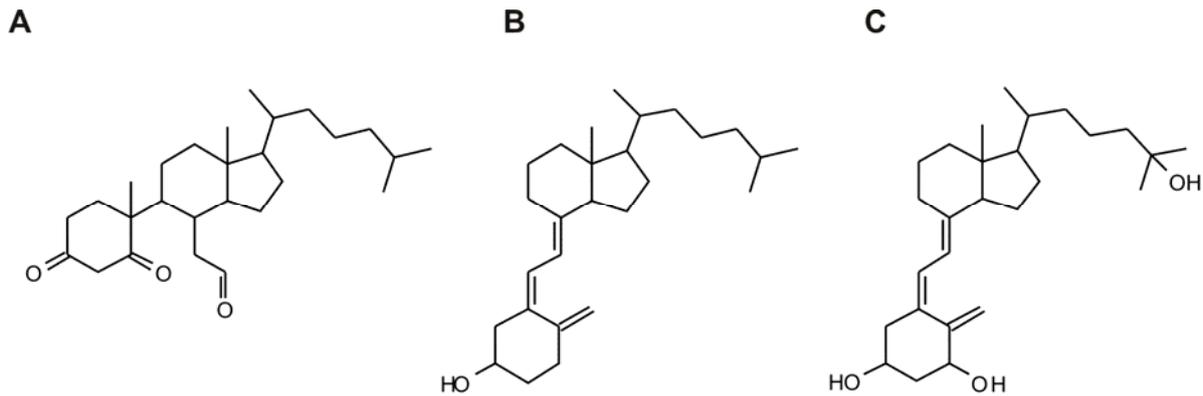


Abbildung 32: Vergleich der Molekülstruktur von Vitamin D₃ und Ketoatheronal A. Die Molekülstrukturen des 5,6-Secosterols Ketoatheronal A (A) und der 9,10-Secosterole Cholecalciferol (B) bzw. Cholecalcitriol (C) zeigen eine deutliche Ähnlichkeit. So bleiben in den drei Substanzen die C,D-Sterolringe und eine Methylgruppe des Cholesterins erhalten.

Die meisten Funktionen von Vitamin D₃ bzw. von dem aktiven Metaboliten 1,25(OH)₂D₃ werden durch den Vitamin D-Rezeptor (VDR) vermittelt (130). Dieser verhält sich wie ein Liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor und spielt eine wichtige Rolle u.a. bei der Regulation der Calciumkonzentration der Zellen (130). Langzeitexperimente zeigen, dass 1,25(OH)₂D₃ eine LPS-vermittelte NF-κB-Aktivierung in humanen Endothelzellen hemmt (131). Zusätzlich gibt es einen nicht VDR-abhängigen Signalweg, der zu einer sehr schnellen Aktivität durch Cholecalcitriol führt (130). Außerdem bewirkt 1,25(OH)₂D₃ eine Hemmung der Proteinkinase Cζ (PKCζ) (132), die für eine Endotoxin-induzierte Aktivierung der Makrophagen essentiell ist. Eine Inhibierung der PKCζ ist mit einer Verminderung der Beweglichkeit von TLR4 in Richtung der Lipid rafts-Bereiche in der Zellmembran assoziiert (133). Es soll hier noch erwähnt werden, dass in Makrophagen eine Aufnahme von Atheronal schon nach 5 min beobachtet wurde (109). Ein mögliches Szenario für den in dieser Arbeit beschriebenen Effekt wäre die schnelle Aufnahme von Secosterolen als Bestandteile von ozLDL bzw. ozChol in die Zelle, die zu einer Hemmung der TLR4-Beweglichkeit und somit des LPS-Signalwegs führt. Gestützt wäre diese Annahme zusätzlich durch die hier präsentierten Experimente, die zeigen, dass die Hemmung der LPS-induzierten NF-κB-Aktivierung durch ozLDL nicht durch eine Blockade der LPS-Bindung an die Zelloberfläche verursacht wird.

Es soll abschließend darauf hingewiesen werden, dass die in dieser Arbeit verwendete Methode der Ozonierung bei dem komplexen Molekül LDL eine Vielzahl unterschiedlicher Produkte bilden kann, die ebenso zu dem beobachteten Hemmeffekt beitragen könnten. Die Ozonierung von ungesättigten Fettsäuren führt zu einer Criegee-Ozonolyse und somit der Bildung von Aldehyden oder Ketonen über ein Ozonid-Intermediat (134). Solche Aldehyde wie z. B. das 4-Hydroxynonenal (4-HNE) oder das 1-Palmitoyl-2-oxoaleroyl-*sn*-glycero-3-phosphorylcholin, die als Produkte einer milderen Oxidation von LDL bzw. von Fettsäuren oder Phospholipiden auch in oxLDL zu finden sind, wurden als Inhibitor der NF- κ B-Aktivität bei einer kurzen Vorbehandlung der Zellen (siehe Kap. 4.4 und 4.5) in früheren Studien beschrieben (101, 125, 126). Es sollte hier angemerkt werden, dass die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten TBARS-Untersuchungen, die ein Maß für die Oxidation der Fettsäuren darstellen, keine Korrelation zwischen der Hemmung von NF- κ B und der Malondialdehyd-Produktion erkennen lassen.

Weiterhin soll erwähnt werden, dass in Abwesenheit eines reduktiven Abbruchs der Reaktion mit Ozon, wie im Falle der vorliegenden Arbeit, für ein Aldehyd oder ein Ozonid die Möglichkeit einer weiteren Oxidation zu Carbonsäure besteht (135, 136). Auch Alkoholgruppen werden mit Ozon weiter zu Carbonylen oxidiert (137). Frühere Untersuchungen über die Wirkung von Ozon auf Proteine zeigten, dass das Gas eine Reaktion mit verschiedenen Aminosäuren eingeht und eine Denaturierung der Proteine hervorruft (111, 112). Das bedeutet, dass Ozon mit Aminosäuren des LDL-Proteins ApoB100 reagiert (111, 125). Überdies können die aus dieser Oxidation entstandenen Carbonyle durch eine nukleophile Addition von Aminen, wie sie in Proteinen aber auch in Aminolipiden vorkommen (138), zu Iminen oder so genannten Schiffischen Basen kondensieren.

4.7. Immunmodulation durch ozLDL

Das Gefäßsystem als Schauplatz der LDL-Akkumulation ist eng assoziiert mit der Entstehung von entzündlichen und malignen Prozessen. Darüber hinaus ist die Immunantwort in der Arterienwand durch die Produktion von Antikörpern und Chemotaxis von Leukozyten charakterisiert. Sowohl Antikörper als auch Leukozyten werden mit der Produktion von Ozon in Verbindung gebracht, da starke Hinweise dafür existieren, dass Ozon sowohl im so genannten „antibody-catalyzed water-oxidation pathway“ als auch während der Freisetzung von aggressiv-lytischen Sauerstoffradikalen durch neutrophile Granulozyten und Makrophagen (den so genannten „oxidative burst“ aktivierter humaner Leukozyten)

produziert wird (77, 90). Dabei soll Ozon an der körpereigenen Immunabwehr beteiligt sein, indem es *in vivo* als Teil der Immunabwehr generiert wird und durch seine Kurzlebigkeit seine Funktion spezifisch auf den Entzündungsherd eingeschränkt ist (77, 90). Es konnte gezeigt werden, dass bei der Abwehr von Bakterien ein Molekül, das exakt die chemischen Eigenschaften von Ozon aufweist, gebildet wird (77, 90). Dieses Ozon-ähnliche Molekül wird offenbar von körpereigenen Antikörpern gebildet, wenn bakterielle Infektionen durch aktivierte Leukozyten, insbesondere B-Lymphozyten, bekämpft werden (77, 90). Das so entstandene Ozon könnte im Gefäßsystem mit Lipoproteinen reagieren. Dabei entstehen möglicherweise Lipid-Ozonierungsprodukte, die in der Lage sind, verschiedene zelluläre Funktionen, wie z.B. die LPS-vermittelte NF- κ B-Signalübertragung, zu beeinflussen. Neuere Studien zeigen einen Zusammenhang zwischen einer Dysregulation der erworbenen Immunität und der Entstehung von Arteriosklerose (139). Interessanterweise besteht eine Verbindung zwischen Erkrankungen mit einer Akkumulation von Antikörpern in menschlichem Gewebe und Arteriosklerose. Dabei ist z.B. das Risiko der Entstehung einer kardiovaskulären Erkrankung bei Vorliegen eines systemischen Lupus Erythematoses oder einer rheumatoiden Arthritis stark erhöht (139, 140). In diesem Zusammenhang könnte die Hemmung der angeborenen Immunität durch oxLDL nicht nur für die Entstehung der Arteriosklerose sondern auch für die Entstehung anderer entzündlicher und maligner Krankheiten von entscheidender Bedeutung sein.

4.8. Dysregulation von NF- κ B bei Arteriosklerose

Studien der letzten Zeit deuten darauf hin, dass sowohl bei der Entstehung der arteriosklerotischen Läsion als auch beim Fortschreiten dieser Erkrankung eine Dysregulation des NF- κ B-Systems zu beobachten ist (61, 65, 92). Dabei besteht in der arteriosklerotischen Läsion ein Nebeneinander von Aktivierung und Inhibierung des NF- κ B-Systems (Abb. 33). Auf der einen Seite kann *in situ* aktiviertes NF- κ B in der arteriosklerotischen Läsion nachgewiesen werden (16, 62). Aktivierend wirken dabei z.B. TNF, IL1, aktivierte Thrombozyten, bakterielle und virale Produkte, minimal oxidiertes LDL, Thrombin und Fibronectin (10, 27, 64, 101). Durch diese Aktivierung von NF- κ B kommt es zu einer vermehrten Expression von NF- κ B-Zielgenen wie Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen. Diese Substanzen spielen eine Rolle bei inflammatorischen Prozessen und tragen zur Initiierung der arteriosklerotischen Läsion bei. Ebenfalls vermehrt produzierte

Wachstumsfaktoren und prokoagulatorische Proteine wie Tissue-Faktor fördern Proliferationsvorgänge und begünstigen die Entstehung thrombotischer Komplikationen.

Auf der anderen Seite wird über hemmende Substanzen, wie z.B. ozoniertes LDL, vollständig oxidiertes LDL oder 4-HNE, eine Inhibierung von NF- κ B vermittelt (101, 115). Vor allem in späteren Stadien der Arteriosklerose spielen diese immunmodulatorischen Effekte möglicherweise eine wichtige Rolle. Diese Hemmung könnte zu einer Beeinträchtigung der immunologischen Antwort und zur Störung von Reparaturmechanismen führen. Außerdem könnten durch die Inhibierung antiapoptotischer Proteine apoptotische Vorgänge gefördert werden, wodurch es zu einer Instabilität arteriosklerotischer Plaques kommen könnte.

Eine simultane Aktivierung und Inhibierung des NF- κ B-Systems nebeneinander im gleichen Gefäß in verschiedenen Stadien der arteriosklerotischen Läsion könnte eine wichtige mechanistische Grundlage für die Entwicklung des charakteristischen chronisch-entzündlichen Prozesses der Arteriosklerose darstellen (4, 10, 91).

Aktivierung von NF- κ B

Zytokine, Chemokine,
Adhäsionsmoleküle

- Initiierung der Läsion
- Entzündung

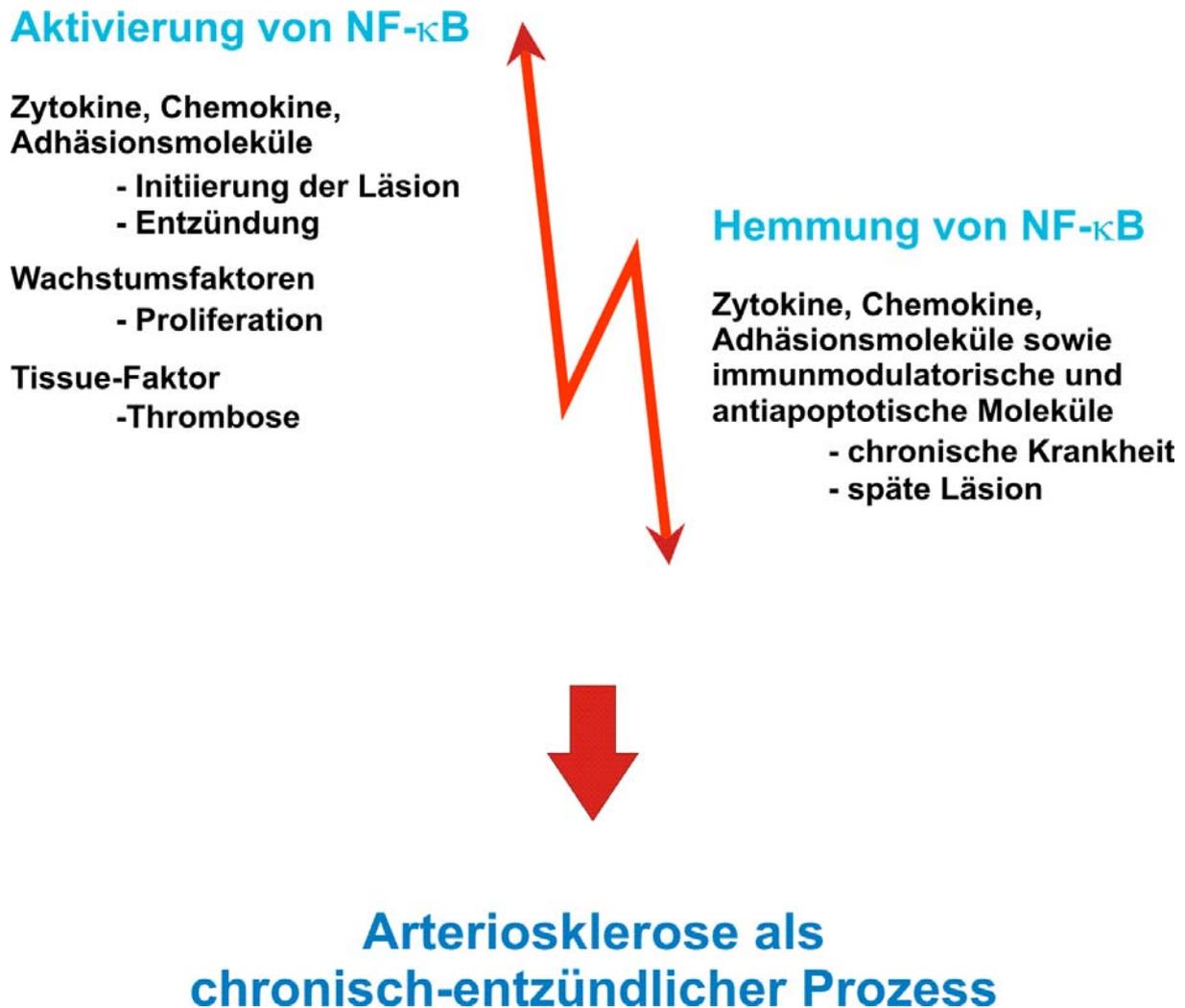
Wachstumsfaktoren
- Proliferation

Tissue-Faktor
- Thrombose

Hemmung von NF- κ B

Zytokine, Chemokine,
Adhäsionsmoleküle sowie
immunmodulatorische und
antiapoptotische Moleküle

- chronische Krankheit
- späte Läsion



Arteriosklerose als chronisch-entzündlicher Prozess

Abbildung 33: Dysregulation von NF- κ B bei Arteriosklerose. Eine Aktivierung von NF- κ B führt zu einer gesteigerten Produktion von Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen, Wachstumsfaktoren und Tissue-Faktor. Dies hat möglicherweise eine Initiierung der arteriosklerotischen Läsion bzw. eine Förderung von Proliferationsvorgängen und die Entstehung thrombotischer Komplikationen zur Folge. Andererseits kann eine Hemmung des NF- κ B-Systems zu einer Beeinträchtigung der immunologischen Antwort, zur Störung von Reparaturmechanismen sowie zur Förderung apoptotischer Vorgänge führen und damit zur Entwicklung einer fortgeschrittenen Läsion beitragen.

5. Zusammenfassung

NF- κ B/Rel-Transkriptionsfaktoren spielen sowohl bei immunologischen und entzündlichen Prozessen als auch bei Proliferation und Apoptose eine zentrale Rolle. Es wird angenommen, dass eine Dysregulation des NF- κ B-Systems auch bei der Entstehung von Arteriosklerose eine wichtige Bedeutung besitzt. Neuere Studien geben Hinweise auf eine Produktion von Ozon durch Antigen-Antikörper-Komplexe als Teil der Immunabwehr des menschlichen Körpers. Außerdem liegen Daten vor, die für das Vorkommen von Ozon in arteriosklerotischem Gewebe sprechen.

In dieser Arbeit sollten die Modifikationen von Low density-Lipoprotein (LDL) charakterisiert werden, die bei einer Reaktion mit Ozon entstehen. Im Zentrum des vorgestellten Projekts stand die Untersuchung der modulatorischen Effekte von ozoniertem LDL (ozLDL) auf die durch LPS (bakterielles Lipopolysaccharid) sowie durch das Zytokin TNF induzierte NF- κ B-assoziierte Signalübertragung/Transkription in monozytären Zellen.

Im ersten Teil der Arbeit wurde ozLDL erstmals hergestellt und charakterisiert. Es konnte dargestellt werden, dass sich das mit der hier beschriebenen Ozonierungsmethode erhaltene ozLDL deutlich von dem schon relativ gut erforschten oxidierten LDL (oxLDL) unterscheidet. So zeigten TBARS-Untersuchungen der Experimente eine starke Oxidation, die zu einer deutlich niedrigeren Cholesterinkonzentration in ozLDL führte im Vergleich zu LDL bzw. oxLDL (Cholesterinoxidase-Methode). Zusätzlich demonstrierte die massenspektrometrische Untersuchung von ozLDL das Verschwinden des Cholesterinpeaks und die Bildung eines neuen Produkts. Letztere Ergebnisse verdeutlichen, dass bei der Ozonierung von LDL ein Secosterol, namentlich das 3,5-Dioxo-5,6-secocholestan-6-al (Ketoatheronal A), entsteht. Weiterhin wurden im Rahmen von Vorversuchen die idealen Bedingungen für die weiteren Experimente ausgearbeitet.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluss von ozLDL auf das NF- κ B-System eingehend untersucht. Die Vorinkubation mit ozLDL führte zu einer dosisabhängigen Hemmung der LPS-vermittelten Aktivierung von NF- κ B in verschiedenen Zelltypen, die mit Arteriosklerose assoziiert sind. Eine Inhibierung der NF- κ B-Aktivierung konnte sowohl in monozytären Zellen als auch Endothelzellen dargestellt werden. Durch verschiedene Kontrollexperimente konnte gezeigt werden, dass die oben genannte Hemmung nicht auf einem Effekt von gelöstem Ozon oder Lipoprotein allein beruht. Verschiedene Experimente demonstrierten

außerdem, dass die Inhibierung der NF- κ B-Stimulierbarkeit durch LPS nicht durch einen toxischen Effekt hervorgerufen wird. Durch Langzeitexperimente konnte auch die Reversibilität des Effekts demonstriert werden. Die dargestellten Ergebnisse zeigen außerdem, dass reaktive Sauerstoffspezies nicht für den Hemmeffekt verantwortlich sind, da keine Zunahme der Radikale in ozLDL-vorinkubierten Proben stattfand. Außerdem konnte keine direkte Korrelation der TBARS („thiobarbituric acid reactive substances“-)Werte mit den beobachteten Effekten von ozLDL auf die Zellen festgestellt werden. Da ozLDL die NF- κ B-Aktivierung nur dann inhibierte, wenn LPS als Stimulus verwendet wurde, wohingegen sich auf den TNF-induzierten Signalweg kein Einfluss zeigte, postuliert die vorliegende Arbeit, dass ozLDL selektiv die LPS-vermittelte Signalübertragung hemmt. Die funktionelle Relevanz der Hemmung wurde auf NF- κ B-Zielgen- und auf Transkriptionsebene demonstriert. Eine Präinkubation mit ozLDL inhibierte außerdem die LPS-vermittelte Proteolyse des NF- κ B-Inhibitors I κ B α sowie die Kinaseaktivität des I κ B-Kinase (IKK)-Komplexes. Weiterhin zeigten Untersuchungen von IRAK-1 (IL1-Rezeptor-assoziierte Kinase 1) ebenfalls eine Hemmung der LPS-induzierten Phosphorylierung und der anschließenden Degradierung des Proteins. Zusätzlich konnte demonstriert werden, dass eine mögliche direkte Wechselwirkung von ozLDL mit LPS bzw. eine Modifikation des LPS-Bindungsverhaltens an die Zelloberfläche nicht für die beobachteten Wirkungen auf den NF- κ B-Signalweg verantwortlich sind. Unsere Experimente lassen den Schluss zu, dass der hemmende Effekt von ozLDL auf die LPS-vermittelte Signalübertragung auf Ebene des IRAK-1-Proteins oder oberhalb aber unterhalb der Zellbindungsebene stattfindet.

Im letzten Teil der Arbeit wurden die Effekte von durch Ozon modifiziertem Cholesterin (ozChol) und einzelnen Produkten der Ozonierung von Cholesterin untersucht. Eine Vorbehandlung der Zellen mit ozChol führte zu einer Hemmung der LPS-vermittelten Aktivierung von NF- κ B. Diese Inhibierung konnte auch mit 5 α ,6 α -Cholesterinepoxid und mit 3- β -Hydroxy-5-oxo-5,6-secocholestan-6-al dargestellt werden. Somit wurden Ozonierungsprodukte von Cholesterin, die so genannten Secosterole, als aktive Komponenten von ozLDL identifiziert, die für die Inhibierung der LPS-induzierten Signalübertragung verantwortlich sind.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass eine Hemmung von Mechanismen der angeborenen Immunität durch ozLDL und ozChol nicht nur für die Entwicklung von Arteriosklerose sondern auch für die Entstehung anderer entzündlicher und maligner Krankheiten von entscheidender Bedeutung sein könnte. Die in der vorliegenden Arbeit

hergestellten und charakterisierten Substanzen liefern möglicherweise neue Ansatzpunkte für die Entwicklung neuer therapeutischer und diagnostischer Strategien.

6. Literaturverzeichnis

1. Nordheim, A., ed. 1998. *Genregulation bei Eukaryonten*. Seyffert W., Gassen H.G., Hess O., Jäckle H., Fischback K.F., Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm.
2. Knippers, R., ed. 1997. *RNA-Polymerasen und die Grundlagen der Transkription von eukaryonten Genen*. Knippers R., Stuttgart, New York.
3. Knippers, R., ed. 1997. *Regulation proteincodierender Gene*. Knippers R., Stuttgart, New York.
4. Baeuerle, P. A. and Baltimore, D. 1996. NF-kappa B: ten years after. *Cell* 87:13-20.
5. Baeuerle, P. A. and Henkel, T. 1994. Function and activation of NF-kappa B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 12:141-179.
6. Brand, K., Page, S., Walli, A. K., Neumeier, D. and Baeuerle, P. A. 1997. Role of nuclear factor-kappa B in atherogenesis. *Exp Physiol* 82:297-304.
7. Ghosh, S. and Karin, M. 2002. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell* 109 Suppl:S81-96.
8. Ghosh, S., May, M. J. and Kopp, E. B. 1998. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16:225-260.
9. Karin, M. and Lin, A. 2002. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 3:221-227.
10. Wulczyn, F. G., Krappmann, D. and Scheidereit, C. 1996. The NF-kappa B/Rel and I kappa B gene families: mediators of immune response and inflammation. *J Mol Med* 74:749-769.
11. Yamamoto, Y. and Gaynor, R. B. 2001. Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *J Clin Invest* 107:135-142.
12. Baldwin, A. S. 2001. Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF-kappaB. *J Clin Invest* 107:241-246.
13. Baldwin, A. S., Jr. 1996. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 14:649-683.
14. Barnes, P. J. and Karin, M. 1997. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 336:1066-1071.
15. Baumgartner, B., Weber, M., Quirling, M., Fischer, C., Page, S., Adam, M., Von Schilling, C., Waterhouse, C., Schmid, C., Neumeier, D. and Brand, K. 2002.

- Increased IkappaB kinase activity is associated with activated NF-kappaB in acute myeloid blasts. *Leukemia* 16:2062-2071.
16. Brand, K., Page, S., Rogler, G., Bartsch, A., Brandl, R., Knuechel, R., Page, M., Kaltschmidt, C., Baeuerle, P. A. and Neumeier, D. 1996. Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *J Clin Invest* 97:1715-1722.
 17. Gilmore, T. D., Koedood, M., Piffat, K. A. and White, D. W. 1996. Rel/NF-kappaB/IkappaB proteins and cancer. *Oncogene* 13:1367-1378.
 18. Tak, P. P. and Firestein, G. S. 2001. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest* 107:7-11.
 19. Grilli, M., Chiu, J. J. and Lenardo, M. J. 1993. NF-kappa B and Rel: participants in a multiform transcriptional regulatory system. *Int Rev Cytol* 143:1-62.
 20. May, M. J. and Ghosh, S. 1997. Rel/NF-kappa B and I kappa B proteins: an overview. *Semin Cancer Biol* 8:63-73.
 21. Siebenlist, U., Franzoso, G. and Brown, K. 1994. Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol* 10:405-455.
 22. Phelps, C. B., Sengchanthalangsy, L. L., Huxford, T. and Ghosh, G. 2000. Mechanism of I kappa B alpha binding to NF-kappa B dimers. *J Biol Chem* 275:29840-29846.
 23. Thanos, D. and Maniatis, T. 1995. NF-kappa B: a lesson in family values. *Cell* 80:529-532.
 24. Thompson, J. E., Phillips, R. J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Ghosh, S. 1995. I kappa B-beta regulates the persistent response in a biphasic activation of NF-kappa B. *Cell* 80:573-582.
 25. Whiteside, S. T., Epinat, J. C., Rice, N. R. and Israel, A. 1997. I kappa B epsilon, a novel member of the I kappa B family, controls RelA and cRel NF-kappa B activity. *Embo J* 16:1413-1426.
 26. Baud, V. and Karin, M. 2001. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol* 11:372-377.
 27. Brand, K., Eisele, T., Kreusel, U., Page, M., Page, S., Haas, M., Gerling, A., Kaltschmidt, C., Neumann, F. J., Mackman, N., Baeurele, P. A., Walli, A. K. and Neumeier, D. 1997. Dysregulation of monocytic nuclear factor-kappa B by oxidized low-density lipoprotein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17:1901-1909.
 28. Pahl, H. L. 1999. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18:6853-6866.

29. Israel, A. 2000. The IKK complex: an integrator of all signals that activate NF-kappaB? *Trends Cell Biol* 10:129-133.
30. Karin, M. and Ben-Neriah, Y. 2000. Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* 18:621-663.
31. Scheidereit, C. 1998. Signal transduction. Docking IkappaB kinases. *Nature* 395:225-226.
32. Woronicz, J. D., Gao, X., Cao, Z., Rothe, M. and Goeddel, D. V. 1997. IkappaB kinase-beta: NF-kappaB activation and complex formation with IkappaB kinase-alpha and NIK. *Science* 278:866-869.
33. DiDonato, J. A., Hayakawa, M., Rothwarf, D. M., Zandi, E. and Karin, M. 1997. A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature* 388:548-554.
34. Mercurio, F., Murray, B. W., Shevchenko, A., Bennett, B. L., Young, D. B., Li, J. W., Pascual, G., Motiwala, A., Zhu, H., Mann, M. and Manning, A. M. 1999. IkappaB kinase (IKK)-associated protein 1, a common component of the heterogeneous IKK complex. *Mol Cell Biol* 19:1526-1538.
35. Mercurio, F., Zhu, H., Murray, B. W., Shevchenko, A., Bennett, B. L., Li, J., Young, D. B., Barbosa, M., Mann, M., Manning, A. and Rao, A. 1997. IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation. *Science* 278:860-866.
36. Regnier, C. H., Song, H. Y., Gao, X., Goeddel, D. V., Cao, Z. and Rothe, M. 1997. Identification and characterization of an IkappaB kinase. *Cell* 90:373-383.
37. Yamaoka, S., Courtois, G., Bessia, C., Whiteside, S. T., Weil, R., Agou, F., Kirk, H. E., Kay, R. J. and Israel, A. 1998. Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation. *Cell* 93:1231-1240.
38. Zandi, E., Rothwarf, D. M., Delhase, M., Hayakawa, M. and Karin, M. 1997. The IkappaB kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKKalpha and IKKbeta, necessary for IkappaB phosphorylation and NF-kappaB activation. *Cell* 91:243-252.
39. Israel, A. 2003. Signal transduction: A regulator branches out. *Nature* 423:596-597.
40. DiDonato, J., Mercurio, F., Rosette, C., Wu-Li, J., Suyang, H., Ghosh, S. and Karin, M. 1996. Mapping of the inducible IkappaB phosphorylation sites that signal its ubiquitination and degradation. *Mol Cell Biol* 16:1295-1304.

41. Fischer, C., Page, S., Weber, M., Eisele, T., Neumeier, D. and Brand, K. 1999. Differential effects of lipopolysaccharide and tumor necrosis factor on monocytic I κ B kinase signalsome activation and I κ B proteolysis. *J Biol Chem* 274:24625-24632.
42. Chen, Z., Hagler, J., Palombella, V. J., Melandri, F., Scherer, D., Ballard, D. and Maniatis, T. 1995. Signal-induced site-specific phosphorylation targets I kappa B alpha to the ubiquitin-proteasome pathway. *Genes Dev* 9:1586-1597.
43. Scherer, D. C., Brockman, J. A., Chen, Z., Maniatis, T. and Ballard, D. W. 1995. Signal-induced degradation of I kappa B alpha requires site-specific ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11259-11263.
44. Hilt, W. and Wolf, D. H. 1996. Proteasomes: destruction as a programme. *Trends Biochem Sci* 21:96-102.
45. Schmidt, M., Schmidtke, G. and Kloetzel, P. M. 1997. Structure and structure formation of the 20S proteasome. *Mol Biol Rep* 24:103-112.
46. Traenckner, E. B., Wilk, S. and Baeuerle, P. A. 1994. A proteasome inhibitor prevents activation of NF-kappa B and stabilizes a newly phosphorylated form of I kappa B-alpha that is still bound to NF-kappa B. *Embo J* 13:5433-5441.
47. Raetz, C. R. H. and Whitfield, C. 2002. Lipopolysaccharide Endotoxins. *Annu. Rev. Biochem.*:635-700.
48. Palsson-McDermott, E. M. and O'Neill, L. A. 2004. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology* 113:153-162.
49. Fitzgerald, K. A., Rowe, D. C. and Golenbock, D. T. 2004. Endotoxin recognition and signal transduction by the TLR4/MD2-complex. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 6:1361-1367.
50. Akira, S. and Takeda, K. 2004. Toll-like receptor signalling. *Nature reviews* 4:499-511.
51. Janssens, S. and Beyaert, R. 2003. Functional diversity and regulation of different interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family members. *Mol Cell* 11:293-302.
52. Li, L., Cousart, S., Hu, J. and McCall, C. E. 2000. Characterization of interleukin-1 receptor-associated kinase in normal and endotoxin-tolerant cells. *J Biol Chem* 275:23340-23345.
53. Balkwill, F. and Mantovani, A. 2001. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357:539-545.

54. Hotchkiss, R. S. and Karl, I. E. 2003. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 348:138-150.
55. Zhang, S. Q., Kovalenko, A., Cantarella, G. and Wallach, D. 2000. Recruitment of the IKK signalosome to the p55 TNF receptor: RIP and A20 bind to NEMO (IKK γ) upon receptor stimulation. *Immunity* 12:301-311.
56. Yang, J., Lin, Y., Guo, Z., Cheng, J., Huang, J., Deng, L., Liao, W., Chen, Z., Liu, Z. and Su, B. 2001. The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF-kappaB activation. *Nat Immunol* 2:620-624.
57. Chen, G., Cao, P. and Goeddel, D. V. 2002. TNF-induced recruitment and activation of the IKK complex require Cdc37 and Hsp90. *Mol Cell* 9:401-410.
58. Kronke, M. 1999. Involvement of sphingomyelinases in TNF signaling pathways. *Chemistry and physics of lipids* 102:157-166.
59. Rath, P. C. and Aggarwal, B. B. 1999. TNF-induced signaling in apoptosis. *Journal of clinical immunology* 19:350-364.
60. Barath, P., Fishbein, M. C., Cao, J., Berenson, J., Helfant, R. H. and Forrester, J. S. 1990. Tumor necrosis factor gene expression in human vascular intimal smooth muscle cells detected by in situ hybridization. *Am J Pathol* 137:503-509.
61. Berliner, J. A., Navab, M., Fogelman, A. M., Frank, J. S., Demer, L. L., Edwards, P. A., Watson, A. D. and Lusis, A. J. 1995. Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics. *Circulation* 91:2488-2496.
62. Bourcier, T., Sukhova, G. and Libby, P. 1997. The nuclear factor kappa-B signaling pathway participates in dysregulation of vascular smooth muscle cells in vitro and in human atherosclerosis. *J Biol Chem* 272:15817-15824.
63. Collins, T. and Cybulsky, M. I. 2001. NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J Clin Invest* 107:255-264.
64. Gawaz, M., Neumann, F. J., Dickfeld, T., Koch, W., Laugwitz, K. L., Adelsberger, H., Langenbrink, K., Page, S., Neumeier, D., Schomig, A. and Brand, K. 1998. Activated platelets induce monocyte chemotactic protein-1 secretion and surface expression of intercellular adhesion molecule-1 on endothelial cells. *Circulation* 98:1164-1171.
65. Gawaz, M., Page, S., Massberg, S., Nothdurfter, C., Weber, M., Fisher, C., Ungerer, M. and Brand, K. 2002. Transient platelet interaction induces MCP-1 production by endothelial cells via I kappa B kinase complex activation. *Thromb Haemost* 88:307-314.

66. Libby, P. 2000. Coronary artery injury and the biology of atherosclerosis: inflammation, thrombosis, and stabilization. *Am J Cardiol* 86:3J-8J; discussion 8J-9J.
67. Witztum, J. L. and Steinberg, D. 1991. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest* 88:1785-1792.
68. Mayo, M. W. and Baldwin, A. S. 2000. The transcription factor NF-kappaB: control of oncogenesis and cancer therapy resistance. *Biochim Biophys Acta* 1470:M55-62.
69. Barkett, M. and Gilmore, T. D. 1999. Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18:6910-6924.
70. Baichwal, V. R. and Baeuerle, P. A. 1997. Activate NF-kappa B or die? *Curr Biol* 7:R94-96.
71. Riedel, E., ed. 1994. *Die Chalkogene*, Berlin, New York.
72. Restaino, L., Frampton, E. W., Hemphill, J. B. and Palnikar, P. 1995. Efficacy of ozonated water against various food-related microorganisms. *Appl Environ Microbiol* 61:3471-3475.
73. Unal, R., Kim, J. G. and Yousef, A. E. 2001. Inactivation of Escherichia coli O157:H7, Listeria monocytogenes, and Lactobacillus leichmannii by combinations of ozone and pulsed electric field. *J Food Prot* 64:777-782.
74. Chang, C. N., Ma, Y. S. and Zing, F. F. 2002. Reducing the formation of disinfection by-products by pre-ozonation. *Chemosphere* 46:21-30.
75. Tanner, B. D., Kuwahara, S., Gerba, C. P. and Reynolds, K. A. 2004. Evaluation of electrochemically generated ozone for the disinfection of water and wastewater. *Water Sci Technol* 50:19-25.
76. Paraskeva, P. and Graham, N. J. 2002. Ozonation of municipal wastewater effluents. *Water Environ Res* 74:569-581.
77. Wentworth, P., Jr., McDunn, J. E., Wentworth, A. D., Takeuchi, C., Nieva, J., Jones, T., Bautista, C., Ruedi, J. M., Gutierrez, A., Janda, K. D., Babior, B. M., Eschenmoser, A. and Lerner, R. A. 2002. Evidence for antibody-catalyzed ozone formation in bacterial killing and inflammation. *Science* 298:2195-2199.
78. Wentworth, P., Jr., Nieva, J., Takeuchi, C., Galve, R., Wentworth, A. D., Dilley, R. B., DeLaria, G. A., Saven, A., Babior, B. M., Janda, K. D., Eschenmoser, A. and Lerner, R. A. 2003. Evidence for ozone formation in human atherosclerotic arteries. *Science* 302:1053-1056.
79. Haffajee, A. D. and Socransky, S. S. 1994. Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontol* 2000 5:78-111.

80. Bocci, V. A. 2006. Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Archives of medical research* 37:425-435.
81. Lerner, R. A. and Eschenmoser, A. 2003. Ozone in biology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:3013-3015.
82. Nichols, B. G., Woods, J. S., Luchtel, D. L., Corral, J. and Koenig, J. Q. 2001. Effects of ozone exposure on nuclear factor-kappaB activation and tumor necrosis factor-alpha expression in human nasal epithelial cells. *Toxicol Sci* 60:356-362.
83. Haddad, E. B., Salmon, M., Koto, H., Barnes, P. J., Adcock, I. and Chung, K. F. 1996. Ozone induction of cytokine-induced neutrophil chemoattractant (CINC) and nuclear factor-kappa b in rat lung: inhibition by corticosteroids. *FEBS Lett* 379:265-268.
84. Laskin, D. L., Fakhrzadeh, L., Heck, D. E., Gerecke, D. and Laskin, J. D. 2002. Upregulation of phosphoinositide 3-kinase and protein kinase B in alveolar macrophages following ozone inhalation. Role of NF-kappaB and STAT-1 in ozone-induced nitric oxide production and toxicity. *Mol Cell Biochem* 234-235:91-98.
85. Arsalane, K., Gosset, P., Vanhee, D., Voisin, C., Hamid, Q., Tonnel, A. B. and Wallaert, B. 1995. Ozone stimulates synthesis of inflammatory cytokines by alveolar macrophages in vitro. *Am J Respir Cell Mol Biol* 13:60-68.
86. Becker, S., Jordan, R. L., Orlando, G. S. and Koren, H. S. 1989. In vitro ozone exposure inhibits mitogen-induced lymphocyte proliferation and IL-2 production. *J Toxicol Environ Health* 26:469-483.
87. Zhao, Q., Simpson, L. G., Driscoll, K. E. and Leikauf, G. D. 1998. Chemokine regulation of ozone-induced neutrophil and monocyte inflammation. *Am J Physiol* 274:L39-46.
88. Jaspers, I., Flescher, E. and Chen, L. C. 1997. Ozone-induced IL-8 expression and transcription factor binding in respiratory epithelial cells. *Am J Physiol* 272:L504-511.
89. Gohil, K., Cross, C. E. and Last, J. A. 2003. Ozone-induced disruptions of lung transcriptomes. *Biochem Biophys Res Commun* 305:719-728.
90. Wentworth, P., Jr., Wentworth, A. D., Zhu, X., Wilson, I. A., Janda, K. D., Eschenmoser, A. and Lerner, R. A. 2003. Evidence for the production of trioxxygen species during antibody-catalyzed chemical modification of antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:1490-1493.
91. Ross, R. 1999. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115-126.
92. Collins, T. 1993. Endothelial nuclear factor-kappa B and the initiation of the atherosclerotic lesion. *Lab Invest* 68:499-508.

93. Steinberg, D. 1997. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem* 272:20963-20966.
94. Steinberg, D. 1993. Modified forms of low-density lipoprotein and atherosclerosis. *J Intern Med* 233:227-232.
95. Steinberg, D. 1993. Oxidative Modification of LDL in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Am J Geriatr Cardiol* 2:38-41.
96. Steinberg, D. 1995. Role of oxidized LDL and antioxidants in atherosclerosis. *Adv Exp Med Biol* 369:39-48.
97. Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T. E., Khoo, J. C. and Witztum, J. L. 1989. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 320:915-924.
98. Li, A. C. and Glass, C. K. 2002. The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nat Med* 8:1235-1242.
99. Glass, C. K. and Witztum, J. L. 2001. Atherosclerosis. the road ahead. *Cell* 104:503-516.
100. Yla-Herttuala, S. 1998. Is oxidized low-density lipoprotein present in vivo? *Curr Opin Lipidol* 9:337-344.
101. Page, S., Fischer, C., Baumgartner, B., Haas, M., Kreusel, U., Loidl, G., Hayn, M., Ziegler-Heitbrock, H. W., Neumeier, D. and Brand, K. 1999. 4-Hydroxynonenal prevents NF-kappaB activation and tumor necrosis factor expression by inhibiting IkappaB phosphorylation and subsequent proteolysis. *J Biol Chem* 274:11611-11618.
102. Kaluzny, M. A., Duncan, L. A., Merritt, M. V. and Epps, D. E. 1985. Rapid separation of lipid classes in high yield and purity using bonded phase columns. *Journal of lipid research* 26:135-140.
103. Sevanian, A., Hodis, H. N., Hwang, J., McLeod, L. L. and Peterson, H. 1995. Characterization of endothelial cell injury by cholesterol oxidation products found in oxidized LDL. *Journal of lipid research* 36:1971-1986.
104. Mackman, N., Brand, K. and Edgington, T. S. 1991. Lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the human tissue factor gene in THP-1 monocytic cells requires both activator protein 1 and nuclear factor kappa B binding sites. *J Exp Med* 174:1517-1526.
105. Stein, B. and Baldwin, A. S., Jr. 1993. Distinct mechanisms for regulation of the interleukin-8 gene involve synergism and cooperativity between C/EBP and NF-kappa B. *Mol Cell Biol* 13:7191-7198.

106. Capell, W. H., Zambon, A., Austin, M. A., Brunzell, J. D. and Hokanson, J. E. 1996. Compositional differences of LDL particles in normal subjects with LDL subclass phenotype A and LDL subclass phenotype B. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 16:1040-1046.
107. Dahle, L. K., Hill, E. G. and Holman, R. T. 1962. The thiobarbituric acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters. *Archives of biochemistry and biophysics* 98:253-261.
108. Gumulka, J. and Smith, L. L. 1983. Ozonization of Cholesterol. *J Am Chem Soc* 105:1972-1979.
109. Takeuchi, C., Galve, R., Nieva, J., Witter, D. P., Wentworth, A. D., Troseth, R. P., Lerner, R. A. and Wentworth, P., Jr. 2006. Proatherogenic effects of the cholesterol ozonolysis products, atheronal-A and atheronal-B. *Biochemistry* 45:7162-7170.
110. Marx, J. 2003. Medicine. Ozone may be secret ingredient in plaques' inflammatory stew. *Science* 302:965.
111. Cataldo, F. 2003. On the action of ozone on proteins. *Polymer Degradation and Stability* 82:105.
112. Huth, K. C., Saugel, B., Jakob, F. M., Cappello, C., Quirling, M., Paschos, E., Ern, K., Hickel, R. and Brand, K. 2007. Effect of aqueous ozone on the NF-kappaB system. *J Dent Res* 86:451-456.
113. Yamaguchi, Y., Kagota, S., Kunitomo, M. and Haginaka, J. 1998. Evidence of modified lipoprotein in the plasma of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits by anion-exchange high-performance liquid chromatographic assay. *Atherosclerosis* 139:323-331.
114. Berlett, B. S. and Stadtman, E. R. 1997. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 272:20313-20316.
115. Hamilton, T. A., Major, J. A., Armstrong, D. and Tebo, J. M. 1998. Oxidized LDL modulates activation of NFkappaB in mononuclear phagocytes by altering the degradation of IkappaBs. *J Leukoc Biol* 64:667-674.
116. Victor, V. M., Rocha, M. and De la Fuente, M. 2004. Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis. *International immunopharmacology* 4:327-347.
117. Ryan, K. A., Smith, M. F., Jr., Sanders, M. K. and Ernst, P. B. 2004. Reactive oxygen and nitrogen species differentially regulate Toll-like receptor 4-mediated activation of NF-kappa B and interleukin-8 expression. *Infection and immunity* 72:2123-2130.

118. Michiels, C., Minet, E., Mottet, D. and Raes, M. 2002. Regulation of gene expression by oxygen: NF-kappaB and HIF-1, two extremes. *Free radical biology & medicine* 33:1231-1242.
119. Parhami, F., Fang, Z. T., Fogelman, A. M., Andalibi, A., Territo, M. C. and Berliner, J. A. 1993. Minimally modified low density lipoprotein-induced inflammatory responses in endothelial cells are mediated by cyclic adenosine monophosphate. *J Clin Invest* 92:471-478.
120. Peng, H. B., Rajavashisth, T. B., Libby, P. and Liao, J. K. 1995. Nitric oxide inhibits macrophage-colony stimulating factor gene transcription in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 270:17050-17055.
121. Rajavashisth, T. B., Yamada, H. and Mishra, N. K. 1995. Transcriptional activation of the macrophage-colony stimulating factor gene by minimally modified LDL. Involvement of nuclear factor-kappa B. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15:1591-1598.
122. Ares, M. P., Kallin, B., Eriksson, P. and Nilsson, J. 1995. Oxidized LDL induces transcription factor activator protein-1 but inhibits activation of nuclear factor-kappa B in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15:1584-1590.
123. Ohlsson, B. G., Englund, M. C., Karlsson, A. L., Knutsen, E., Erixon, C., Skribeck, H., Liu, Y., Bondjers, G. and Wiklund, O. 1996. Oxidized low density lipoprotein inhibits lipopolysaccharide-induced binding of nuclear factor-kappaB to DNA and the subsequent expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta in macrophages. *J Clin Invest* 98:78-89.
124. Schackelford, R. E., Misra, U. K., Florine-Casteel, K., Thai, S. F., Pizzo, S. V. and Adams, D. O. 1995. Oxidized low density lipoprotein suppresses activation of NF kappa B in macrophages via a pertussis toxin-sensitive signaling mechanism. *J Biol Chem* 270:3475-3478.
125. Bochkov, V. N., Kadl, A., Huber, J., Gruber, F., Binder, B. R. and Leitinger, N. 2002. Protective role of phospholipid oxidation products in endotoxin-induced tissue damage. *Nature* 419:77-81.
126. Walton, K. A., Cole, A. L., Yeh, M., Subbanagounder, G., Krutzik, S. R., Modlin, R. L., Lucas, R. M., Nakai, J., Smart, E. J., Vora, D. K. and Berliner, J. A. 2003. Specific phospholipid oxidation products inhibit ligand activation of toll-like receptors 4 and 2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:1197-1203.

127. Chen, G. and Goeddel, D. V. 2002. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 296:1634-1635.
128. Mackman, N. 2003. How do oxidized phospholipids inhibit LPS signaling? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:1133-1136.
129. Brown, A. J., Dusso, A. and Slatopolsky, E. 1999. Vitamin D. *Am J Physiol* 277:F157-175.
130. Dusso, A. S., Brown, A. J. and Slatopolsky, E. 2005. Vitamin D. *American journal of physiology* 289:F8-28.
131. Equils, O., Naiki, Y., Shapiro, A. M., Michelsen, K., Lu, D., Adams, J. and Jordan, S. 2006. 1,25-Dihydroxyvitamin D inhibits lipopolysaccharide-induced immune activation in human endothelial cells. *Clinical and experimental immunology* 143:58-64.
132. Boyan, B. D., Sylvia, V. L., Dean, D. D., Del Toro, F. and Schwartz, Z. 2002. Differential regulation of growth plate chondrocytes by 1 α ,25-(OH)₂D₃ and 24R,25-(OH)₂D₃ involves cell-maturation-specific membrane-receptor-activated phospholipid metabolism. *Crit Rev Oral Biol Med* 13:143-154.
133. Cuschieri, J., Umanskiy, K. and Solomkin, J. 2004. PKC-zeta is essential for endotoxin-induced macrophage activation. *The Journal of surgical research* 121:76-83.
134. Vollhardt, K. P. C., ed. 1990. *Die Reaktionen der Alkene*, Weinheim.
135. Soriano, N. U., Jr., Migo, V. P. and Matsumura, M. 2003. Functional group analysis during ozonation of sunflower oil methyl esters by FT-IR and NMR. *Chemistry and physics of lipids* 126:133-140.
136. Martinez, R. I. 1982. The mechanism of O₃-aldehyde reactions. *International Journal of Chemical Kinetics* 14:237-249.
137. Walters, W. L. 1975. Oxidation of secondary alcohols with ozone. *Journal of Organic Chemistry* 41:889-891.
138. Wachtel, E., Bach, D., Epanand, R. F., Tishbee, A. and Epanand, R. M. 2006. A product of ozonolysis of cholesterol alters the biophysical properties of phosphatidylethanolamine membranes. *Biochemistry* 45:1345-1351.
139. Frostegard, J. 2005. Atherosclerosis in Patients With Autoimmune Disorders. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*.
140. Frostegard, J. 2005. SLE, atherosclerosis and cardiovascular disease. *J Intern Med* 257:485-495.

7. Anhang

7.1. Abkürzungen

4-HNE	4-Hydroxynonenal
α -EChol	5 α ,6 α -Cholesterinepoxid
Abb.	Abbildung
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid
Ak	Antikörper
amu	atomic mass unit
AP-1	activator protein-1
APCI	atmospheric pressure chemical ionization
API	atmospheric pressure ionization
aPKC	atypische Proteinkinase C
ARD	ankyrin repeat domain
Atheronal A	3 β -Hydroxy-5-oxo-5,6-secocholestan-6-al
AthA	3 β -Hydroxy-5-oxo-5,6-secocholestan-6-al
ATP	Adenosintriphosphat
Bid	BH3 interacting domain death agonist
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
Cdc37	cell division cycle 37
C/EBP β	CCAAT/enhancer-binding protein β
Chol	Cholesterin
CHX	Cycloheximid
Ci	Curie
cpm	Counts per minute
CTP	Cytidintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
d	Tag
DCFH-DA	2',7'-Dichlorfluoresceindiacetat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DD	Death domain
DEAE	Diethylaminoethyl

d.h.	das heißt
dl	Deziliter
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EC	HUVEC-Zellen
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ELAM	endothelial-leucocyte adhesion molecule
ERK	extracellular signal-regulated kinase
FADD	Fas-associated death domain protein
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
G/M-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
ΔH	Enthalpieänderung
HDL	High density lipoprotein
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HLH	Helix-loop-helix
Hsp90	Hitzeschockprotein 90
HSV	Herpes simplex virus
IAP	inhibitors of apoptosis proteins
ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1
Ig	Immunglobulin
Ig κ	Immunglobulin κ -leichte Kette
I κ B	inhibitor of κ B
IKK	I κ B-Kinase

IKKAP 1	IKK-associated protein 1
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
IRAK	IL1-Rezeptor-assoziierten Kinasen
KA	Kinaseassay
Kap.	Kapitel
KD	Kinasedomäne
kJ	Kilojoule
Ko	Kontrolle
JNK	c-Jun N-terminal kinase
λ	Wellenlänge
L	Liter
LBP	LPS-binding protein
LC/MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie- Kopplung
LDL	Low density lipoprotein
Lp	Lipoprotein
LPS	Lipopolysaccharid
Luc	Luziferase
LZ	Leucin Zipper
μ A	Mikroampere
μ Ci	Mikrocurie
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	micromolar
M	molar
M^+	Molekül-Ion
Ma	Makrophagen
(m)Ak	monoklonaler Antikörper
Mal	MyD88 adapter-like
MAP	mitogen-activated protein
MAP	mitogen-activated protein kinase
MCP1	monocyte chemotactic protein 1
MD2	myeloid differentiation protein 2

MEKK3	mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinase 3
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
mmol	Millimol
MM-LDL	minimally modified LDL
Mo	Monozyten
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
MW	Mittelwert
MyD88	myeloid differentiation factor 88
m/z	Masse/Ladung-Verhältnis
n	Anzahl
NF- κ B	Nuclearfaktor-kappa B
ng	Nanogramm
NLS	nuclear localization sequence
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
Nr.	Nummer
NRD	NF- κ B/Rel/dorsal
NEMO	NF- κ B essential modulator
OD	optische Dichte
oxLDL	oxidiertes LDL
ozChol	ozoniertes Cholesterin
ozLDL	ozoniertes LDL
ozPBS	ozoniertes PBS
-P	phosphoryliert
pAk	polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PEST	proline-, glutamic acid-, serine- and threonine rich region
pg	Picogramm
PKC ζ	Proteinkinase C ζ

pm	picometer
pM	picomolar
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Präp.	ozLDL-Präparation
RHD	Rel-Homologie-Domäne
RIP1	Receptor-interacting protein 1
RL	Renilla-Luziferase
RLA	relative Luziferase-Aktivität
RLU	Relative light units
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive oxygen species
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung
Sdp.	Siedepunkt
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
sec	Sekunde
Ser	Serin
Smp.	Schmelzpunkt
Sp-1	Transkriptionsfaktor Sp-1
SRD	signal receiving domain
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TAB2	TAK1 binding protein 2
TAK1	transforming growth factor- β -activated kinase
TBARS	thiobarbituric acid reactive substances
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TFII	Transkriptionsfaktoren der RNA-Polymerase II
TICAM1	TIR-domain-containing adapter molecule 1
TIR	toll-like receptor/IL1R
TIRAP	TIR-domain-containing adapter protein
TIRP	TIR-containing protein
TLR4	toll-like receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TNF-R1/2	TNF-Rezeptor 1/2

TRADD	TNF-R1-associated death domain
TRAF	TNF receptor-associated factor
TRAM	TRIF-related adapter molecule
TRIF	TIR-domain-containing adapter inducing interferon β
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	units
u.a.	unter anderem
UTP	Uridintriphosphat
UV	ultraviolett
V	Volt
VCAM1	Vascular cell adhesion molecule 1
VDR	Vitamin D-Rezeptor
z.B.	zum Beispiel

7.2. Anorganische Verbindungen

CaCl_2	Calciumchlorid
CO_2	Kohlenstoffdioxid
F_2	Fluormolekül
H^+	Wasserstoff-Ion
HCl	Salzsäure
H_2O	Wasser
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
H_4XeO_6	Perxenonsäure
KCl	Kaliumchlorid
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
KrF_6	Kryptonhexafluorid
MgCl_2	Magnesiumchlorid
NaCl	Natriumchlorid
Na_2HPO_4	Dinatriumhydrogenphosphat
Na_3VO_4	Natriumorthovanadat
NO	Stickstoffmonoxid
O	Sauerstoffatom

O_2	Sauerstoffmolekül
O_3	Ozon
$S_2O_8^{2-}$	Peroxodisulfat

7.3. Publikationen

1. Huth, K.C., Saugel, B., Jakob, F.M., Cappello, C., Quirling, M., Paschos, E., Hickel, R. und Brand, K. (2007). Effect of aqueous ozone on the NF- κ B-system. *J. Dent. Res.* 86(5): 451-6.
2. Cappello, C., Saugel, B., Huth, K.C., Zwergal, A., Krautkrämer, M., Furman, C., Rouis, M., Neumeier, D. und Brand, K. (2007). Ozonized low density lipoprotein (ozLDL) inhibits NF- κ B- and IRAK-1-associated signaling. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27: 226-32.
3. Huth, K.C., Jakob, F.M., Saugel, B., Cappello, C., Paschos, E., Hollweck, R., Hickel, R. und Brand, K. (2006). Effect of ozone on oral cells compared to established antimicrobials. *Eur. J. Oral. Sci.*, 114(5): 435-40.

7.4. Kongressbeiträge

- 1a. Cappello, C., Zwergal, Haas, S., A., Kandemir, J.D., Wehmeier, M., Schwettmann, L., Page, S. und Brand, K. (2008). C/EBP β sustains constitutive NF- κ B activity – evidence for involvement of I κ B- α (Vortrag). 5. Jahrestagung der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL), Mannheim. *Abstract Book*.
- 1b. Cappello, C., Zwergal, Haas, S., A., Kandemir, J.D., Wehmeier, M., Schwettmann, L., Page, S. und Brand, K. (2008). C/EBP β sustains constitutive NF- κ B activity – evidence for involvement of I κ B- α (Vortrag). 5. Jahrestagung der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL), Mannheim. *Clin. Chem. Lab. Med.* 46: A155.
- 2a. Haas, S., Cappello, C., Zwergal, A., Kandemir, J.D., Wehmeier, M., Schwettmann, L., Page, S. und Brand, K. (2008). Steuerung der konstitutiven NF- κ B-Aktivität durch C/EBP β – I κ B- α als Effektormolekül. (Vortrag). Hj.-Staudinger-Symposium der DGKL, Bad Staffelstein. *Abstract book*.
- 2b. Haas, S., Cappello, C., Zwergal, A., Kandemir, J.D., Wehmeier, M., Schwettmann, L., Page, S. und Brand, K. (2008). Steuerung der konstitutiven NF- κ B-Aktivität durch

- C/EBP β – I κ B- α als Effektormolekül. (Vortrag). Hj.-Staudinger-Symposium der DGKL, Bad Staffelstein. *Klin. Chem. Mitt.* 39(1+2): 30-1.
- 3a. Cappello, C., Saugel, B., Huth, K.C., Zwergal, A., Krautkrämer, M., Furman, C., Rouis, M., Neumeier, D. und Brand, K. (2006). Ozonized low density lipoprotein (ozLDL) inhibits NF- κ B and IRAK-1-associated signaling (Poster). XIV International Symposium on Atherosclerosis, Rom (Italien). *Abstract book*.
- 3b. Cappello, C., Saugel, B., Huth, K.C., Zwergal, A., Krautkrämer, M., Furman, C., Rouis, M., Neumeier, D. und Brand, K. (2006). Ozonized low density lipoprotein (ozLDL) inhibits NF- κ B and IRAK-1-associated signaling. *Atherosclerosis Supplements*, 7(3): 526.
- 4a. Cappello, C., Saugel, B., Huth, K.C., Zwergal, A., Krautkrämer, M., Furman, C., Rouis, M., Neumeier, D. und Brand, K. (2006). Ozonized low density lipoprotein (ozLDL) inhibits NF- κ B and IRAK-1-associated signaling (Vortrag). Hj.-Staudinger-Symposium der DGKL, Bad Staffelstein. *Abstract book*.
- 4b. Cappello, C., Saugel, B., Huth, K.C., Zwergal, A., Krautkrämer, M., Furman, C., Rouis, M., Neumeier, D. und Brand, K. (2006). Ozonized low density lipoprotein (ozLDL) inhibits NF- κ B and IRAK-1-associated signaling (Vortrag). Hj.-Staudinger-Symposium der DGKL, Bad Staffelstein. *Klin. Chem. Mitt.* 37(3): 44.
5. Huth, K.C., Quirling, M., Saugel, B., Cappello, C., Kamereck, K., Jakob, F.M., Meyer, S., Lenzke, S., Bolz, D., Hickel, R. und Brand, K. (2006). Wirksamkeit von Ozon gegen oralpathogene Mikroorganismen und Abklärung einer möglichen Toxizität auf ortsständige orale Zellen (Poster). 5. Berichtskolloquium FöFoLe.
- 6a. Cappello, C., Zwergal, A., Quirling, M., Saugel, B., Huth, K.C., Sydlik, C., Poli, V., Neumeier, D., Ziegler-Heitbrock, H.W.L. und Brand, K. (2005). Essential role of CEBPbeta in TNF tolerance: blockade of NF-kappa B p65 phosphorylation (Poster). 2. Jahrestagung der Deutschen Vereinten Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin (DGKL), Jena. *Abstract Book*.
- 6b. Cappello, C., Zwergal, A., Quirling, M., Saugel, B., Huth, K.C., Sydlik, C., Poli, V., Neumeier, D., Ziegler-Heitbrock, H.W.L. und Brand, K. (2005). Essential role of CEBPbeta in TNF tolerance: blockade of NF-kappa B p65 phosphorylation. *Clin. Chem. Lab. Med.* 43: A45-6.

7.5. Lebenslauf

1 Persönliche Angaben

Name: Christian Cappello
Geboren am: 6. Februar 1978 in Bozen/Italien
Familienstand: ledig
Adresse: Steimbker Hof 17, 30625 Hannover

Schulbildung

1983-1985 Grundschule „Madre Bakhita“ in Schio (VI), Italien
1985-1988 Grundschule „G. Marconi“ in Schio
1988-1991 Mittelschule „P. Maraschin“ in Schio
1991-1996 Gymnasium (Liceo scientifico statale „N. Tron“) in Schio
1996 Abitur (Diploma di maturità)

Universitätsausbildung

1996-2003 Studium der Chemie an der Ludwig-Maximilians-Universität (LMU) München. Nebenfach: Patentrecht
09/2002-05/2003 Diplomarbeit „Darstellung von *syn-Cyclopentan-1,2,3-triol*“ am Institut für Anorganische Chemie, LMU München (Prof. Dr. Peter Klüfers)
05/2003 Abschluss: Diplom-Chemiker
09/2004-12/2006 Doktorand am Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie, Technische Universität München (Prof. Dr. Korbinian Brand)
Seit 01/2007 Doktorand am Institut für Klinische Chemie, Medizinische Hochschule Hannover (Prof. Dr. Korbinian Brand)

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde durch das Institut für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Technischen Universität München und durch das Institut für Klinische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover in der molekularbiologischen Forschungsgruppe von Herrn Prof. Dr. Korbinian Brand ermöglicht. An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dieter Neumeier, dem Direktor des Instituts in München, sowie bei Herrn Prof. Dr. Korbinian Brand, dem Leiter der Arbeitsgruppe und Direktor des Instituts in Hannover, für die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen und für die freundliche Unterstützung bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Korbinian Brand für das große Vertrauen und die Geduld, die er mir stets entgegenbrachte und für die neuen Möglichkeiten und Perspektiven im akademischen, beruflichen Leben, die er mir eröffnete. Besonders lernte ich seine professionelle und freundschaftliche Arbeitsweise mit zahlreichen, oft sehr langen, aber immer kreativen Besprechungen zu schätzen, bei der trotz vieler Überstunden immer Platz für Spaß blieb.

Desweiteren möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern von Herrn Prof. Dr. Korbinian Brand bedanken, die mir geduldig bei der Einarbeitung in die verwendeten Labortechniken und bei der Bewältigung aller Sorgen und Nöte zur Seite standen. Mein besonderer Dank gilt dabei Frau Dr. Martina Quirling, ganz einfach der besten Arbeitskollegin, die man sich vorstellen kann. Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dr. Sharon Page bedanken für ihre fachliche und sprachliche Kompetenz, die sie mit mir immer freundlich und kollegial teilte. Frau Martina Krautkrämer und Herrn Andreas Ertl danke ich für die stets hilfsbereite und technisch perfekte Unterstützung bei der Durchführung der Experimente. Auch Herrn Dr. Bernd Saugel möchte ich danken für die vielen fachlichen und nichtfachlichen Diskussionen und für die heitere gemeinsame Zusammenarbeit. Darüberhinaus gilt ein herzliches Dankeschön für die schönen Stunden allen, die im Labor meinen Gesang ertragen mussten und den „Zahnis“, insbesondere PD Dr. Karin Huth und Dr. Michael Jakob.

Nicht zuletzt danke ich allen Mitarbeitern des Instituts für Klinische Chemie und Pathobiochemie der Technischen Universität München für ihre Unterstützung und denen des Instituts für Klinische Chemie der Medizinischen Hochschule Hannover für die offene und herzliche Aufnahme im Norden.

Ich möchte mich natürlich bei all meinen Freunden und Studienkollegen für den fachlichen aber vor allem moralischen Beistand bedanken. Für das schöne Gefühl, in schwierigen Zeiten nicht alleine zu sein, bedanke ich mich insbesondere bei Ale, Kerstin, Stance, Joe, dem Bomber, dem Kaiser, bei Peter und seiner Familie sowie bei Franzi. An dieser Stelle möchte ich nicht meinen lieben WG vergessen, der immer für anregende Gespräche, Humor und Entspannung gesorgt hat.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, die es mir überhaupt ermöglicht haben, meinen bisherigen Werdegang sorglos und in Selbstständigkeit zu gestalten. Meiner Mutter gebührt ein besonderer Dank, da sie in den letzten Jahren stets bei all meinen Bemühungen hinter mir stand.