

Klaus Martin Wagner  
Dr. med.

## **MnSOD und p53 – Bedeutung für die durch oxidierte Low Density Lipoproteine induzierte Apoptose von Makrophagen**

Geboren am: 04.08.1973 in Stuttgart  
Reifeprüfung am 21.05.1992 in Stuttgart  
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1994 bis SS 2004  
Physikum am 18.09.1996 an der Universität Heidelberg  
Klinisches Studium in Heidelberg  
Praktisches Jahr in Schwäbisch Hall  
Staatsexamen am 09.11.2004 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Anatomie und Zellbiologie  
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. sc. hum. Ralf Kinscherf

Die zytotoxische Wirkung von oxidiertem LDL (oxLDL) auf Makrophagen wurde von verschiedenen Autoren bereits mehrfach beschrieben. Kaum bekannt war jedoch der molekulare Mechanismus, der zum Zelltod der Makrophagen führt. Die vorliegende Dissertationsschrift weist auf einen Zusammenhang zwischen oxLDL, oxidativem Stress und der Apoptose von Makrophagen *in vitro* und in humanen arteriosklerotischen Läsionen hin. Dabei werden Schritte der intrazellulären Signaltransduktion dargestellt, über die oxLDL durch mitochondrialen oxidativen Stress zu einer Apoptose von Humanmakrophagen führt. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen lassen eine pathophysiologische Bedeutung der Befunde auch für humane arteriosklerotische Läsionen *in vivo* vermuten.

In immunhistochemischen Untersuchungen an arteriosklerotischen Läsionen aus der Arteria carotis communis und der Aorta ascendens des Menschen waren Mac-1-, MnSOD-, p53- und C-jun/AP-1-IR in Makrophagen kolokalisiert. Aufgrund signifikant positiver Korrelationen dieser Parameter sowie der Anzahl TUNEL-positiver Zellen in Regressionsanalysen vermuteten wir einen kausalen Zusammenhang zwischen der Induktion der MnSOD bzw. dem Tumorsuppressorprotein p53 und einer durch oxidativen Stress induzierten Apoptose in Makrophagen der humanen arteriosklerotischen Gefäßwand.

An einem *in vitro*-Modell mit kultivierten Humanmakrophagen untersuchten wir die durch oxLDL in Makrophagen initiierte Signaltransduktion, die zur Entstehung von oxidativem Stress und zur Apoptose dieser Zellen führt. Die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe konnten erstmals zeigen, dass oxLDL im Unterschied zu nativem LDL zu einer Steigerung der SMase-Aktivität und zu einer Zunahme der intrazellulären Ceramid-Konzentration in Humanmakrophagen führt. Sowohl oxLDL als auch Ceramid sowie TNF $\alpha$ , das die intrazelluläre Ceramid-Akkumulation ebenfalls stimuliert, führten zu einer gesteigerten Apoptoserate von kultivierten Makrophagen.

Die Steigerung der Apoptoserate in Humanmakrophagen nach Inkubation mit oxLDL bzw. Ceramid und TNF $\alpha$  wurde begleitet von einer Induktion der MnSOD-Expression (in immunzytologischen Untersuchungen fanden wir MnSOD in den Mitochondrien lokalisiert), während die Expression anderer Antioxidantien wie Cu/ZnSOD oder Katalase unverändert blieb. Unsere Experimente konnten überdies erstmals zeigen, dass H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Produkt der von MnSOD katalysierten Reaktion ebenfalls zu einer Induktion der MnSOD im Sinne einer konzentrationsabhängigen, autokatalytischen Amplifikation führte. Gleichzeitig steigerte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> die Apoptoserate von kultivierten Humanmakrophagen. Wir schlossen aus unseren

Ergebnissen und Befunden anderer Arbeitsgruppen, dass die Zytotoxizität von oxLDL und dessen Mediatoren in Verbindung mit einer übermäßigen Stimulation mitochondrialer Prozesse steht. Dabei führt die durch oxLDL initiierte Signaltransduktion über die intrazelluläre Akkumulation von Ceramid zu einer Induktion der MnSOD-Expression. Es resultiert eine erhöhte Produktion von ROS, insbesondere von  $H_2O_2$ . Diese ROS stellen eine wesentliche Ursache für die Induktion der Apoptose bei Humanmakrophagen dar, was auch für die Prozesse bei der Atherogenese *in vivo* von Bedeutung sein könnte.

Im Zusammenhang mit oxLDL-induzierter Apoptose und der Entstehung von ROS untersuchten wir bei kultivierten Humanmakrophagen auch das Phosphoprotein *p53*, für das bereits eine Verbindung mit der durch ROS induzierten Apoptose beschrieben wurde. Demnach ist das Ausmaß eines intrazellulären oxidativen Stresses für die Induktion von *p53* und Apoptose verantwortlich. Unsere Ergebnisse zeigten erstmals, dass auch in der durch oxLDL initiierten Signaltransduktion der Apoptose die *p53* Expression gemeinsam mit einer signifikant erhöhten Apoptoserate in Makrophagen induziert wurde.

Wir folgerten aus diesen Untersuchungen, dass sowohl MnSOD als auch *p53* an der Induktion der Apoptose in Humanmakrophagen durch oxLDL bzw. dessen Mediatoren (z.B. Ceramid) beteiligt sind und dass die Expression von MnSOD und *p53* über ähnliche Mechanismen reguliert wird. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnten wir durch Vorinkubation von Makrophagen mit MnSOD AS-ODN eine durch oxLDL bzw. seine Mediatoren induzierte Zunahme der MnSOD-Expression auf RNA- und Protein-Ebene vermindern und die oxLDL-induzierte Apoptoserate signifikant senken. Eine Vorinkubation von Humanmakrophagen mit *p53* AS-ODN führte vergleichbar zu einer verminderten Expression von *p53* und ebenfalls zu einer signifikant verminderten Apoptoserate. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass oxLDL (und seine Mediatoren) nur dann zur Apoptose führen, wenn sowohl MnSOD und *p53*-induziert sind.

Um den von uns postulierten Kausalzusammenhang zwischen oxidativem Stress und der durch oxLDL initiierten Apoptose von Makrophagen unter Beteiligung einer übermäßigen Stimulation mitochondrialer Prozesse zu überprüfen, untersuchten wir in diesem Zusammenhang die Bedeutung weiterer antioxidativer Schutzmechanismen. Die intrazelluläre Konzentration des mitochondrialen  $H_2O_2$ -Scavengers GSH wurde durch oxLDL signifikant vermindert. Gleichzeitig nahm die Konzentration von  $H_2O_2$  signifikant zu, was auf einen durch oxLDL initiierten oxidativen Stress in den Mitochondrien hindeuten könnte. Eine Vorbehandlung der Zellen mit dem Antioxidans NAC, das als GSH-Vorstufe wirken kann und mit  $H_2O_2$ , jedoch nicht mit  $O_2^-$  reagiert, hemmte die oxLDL induzierte i) Verminderung der GSH-Konzentration und ii) Zunahme der Apoptoserate. Wir folgerten aus diesen Ergebnissen, dass die Apoptose von Makrophagen maßgeblich durch die intrazelluläre Konzentration von GSH beeinflusst werden kann. Aufgrund dieser Ergebnisse und neuerer Befunde unserer und kooperierender Arbeitsgruppen erscheint uns eine Therapie mit NAC bei Patienten mit Lipidstoffwechselstörungen und mit oxidativem Stress assoziierten Krankheitsbildern zur Normalisierung des erniedrigten Redoxstatus im Plasma und im System mononukleärer Zellen überprüfenswert.