

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Leibnitz-Institut für Arterioskleroseforschung
Direktor: Prof. Dr. Monika Stoll

**Regulation plaquestabilisierender
Eigenschaften humaner Makrophagen**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Alexander Patrick Nosseir

aus Remscheid

2011

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

Dekan: Prof. Dr. med. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Paul Cullen

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Stefan Lorkowski

Tag der mündlichen Prüfung: 27.08.2011

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Leibnitz-Institut für Arterioskleroseforschung
Direktor: Prof. Dr. Monika Stoll
Referent: Prof. Dr. Paul Cullen
Koreferent: Prof. Dr. Stefan Lorkowski

Zusammenfassung

Regulation plaquestabilisierender Eigenschaften humaner Makrophagen

Nosseir, Alexander Patrick

Makrophagen spielen eine wichtige Rolle in der Atherogenese und zeigen abhängig von ihrer Aktivierung pro- oder anti-atherogene Wirkung. Kürzlich wurde gezeigt, dass Makrophagen in Abhängigkeit von ihrer Aktivierung nicht nur Proteasen sondern auch Typ VI Kollagen synthetisieren und sezernieren. Die Produktion von Typ VI Kollagen könnte ein Marker für einen unzureichend untersuchten, gewebestabilisierend wirkenden Aktivierungszustand von Makrophagen sein. Da eine solche Aktivierung zur Vermeidung von infarktauslösenden Plaquerupturen beitragen könnte, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden, wie die Sekretion von Typ VI Kollagen in Makrophagen reguliert wird.

Der Transkriptionsfaktor PPAR γ hat eine Schlüsselfunktion im Lipid- und Glukosestoffwechsel und ist ein Regulator der Atherogenese und Aktivierung von Makrophagen. Es wurde daher der Einfluss von natürlichen und synthetischen PPAR γ -Liganden (15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J₂ und Troglitazon) und des natürlichen RXR-Liganden 9-cis-Retinsäure auf die Produktion von Typ VI Kollagen in THP-1-Makrophagen untersucht. Durch Einsatz des PPAR γ -Antagonisten GW9662 sollte die PPAR γ -Abhängigkeit dieser Regulation nachgewiesen werden. Es konnte mittels Echtzeit-RT-PCR und Western-Blot gezeigt werden, dass Expression und Sekretion von Typ VI Kollagen sowohl durch den natürlichen als auch den synthetischen PPAR γ -Liganden sowie den natürlichen RXR-Liganden konzentrationsabhängig vermindert werden und dies vermutlich PPAR γ -abhängig erfolgt. Durch Einsatz von Inhibitoren der Transkription und Translation (Actinomycin D und Cycloheximid) konnte auf die Beteiligung von weiteren regulatorisch wirkenden Proteinen geschlossen werden.

PPAR γ ist an der alternativen Aktivierung von Makrophagen beteiligt. Da eine alternative Aktivierung durch Interleukin 4 und 13 die Sekretion von Typ VI Kollagen erhöht, wurde dies auch für Liganden von PPAR γ erwartet. Welche Bedeutung die durch PPAR γ hervorgerufene unerwartete Herabregulation für die Funktion von Makrophagen und die Stabilität atherosklerotischer Plaques hat, muss in weiterführenden Versuchen geklärt werden.

Tag der mündlichen Prüfung: 27.08.2011

EIDESSTATLICHE ERKLÄRUNG

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

Regulation plaquestabilisierender Eigenschaften humaner Makrophagen

im Leibniz-Institut für Arterioskleroseforschung unter Anleitung von Prof. Dr. Stefan Lorkowski:

1. selbstständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeit angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Münster, den 01.09.2011

Alexander Nosseir

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Die Arterie.....	1
1.1.1	Bauplan und Funktion	1
1.2	Die Arteriosklerose	3
1.2.1	Risikofaktoren	4
1.2.2	Pathogenese der Atherosklerose.....	5
1.2.3	Folgen der Atherosklerose.....	9
1.3	Lipoproteine.....	11
1.3.1	LDL	12
1.3.2	HDL.....	12
1.4	Makrophagen.....	13
1.4.1	Funktion der Makrophagen	14
1.4.2	Die klassische Aktivierung.....	15
1.4.3	Die alternative Aktivierung.....	16
1.4.4	Die Deaktivierung.....	17
1.5	Kollagene	17
1.5.1	Struktur und Funktion.....	17
1.5.2	Die Biosynthese der Kollagene	18
1.5.3	Die Bedeutung der Kollagene für die Atherosklerose.....	19
1.5.4	Kollagen VI	20
1.6	Peroxisome proliferator-activated receptors	21
2	ZIELSETZUNG	25
3	MATERIAL UND METHODEN.....	27
3.1	Material	27
3.2	Zellkultur.....	31
3.2.1	Kultivierungsbedingungen	31
3.2.2	Bestimmung der Zellzahl.....	31
3.2.3	THP-1-Zellen.....	31
3.2.4	Inkubationsversuche	33
3.3	Molekularbiologische Arbeitsmethoden.....	34
3.3.1	Isolierung von Gesamt-RNA	34
3.3.2	Fotometrische Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen.....	35
3.3.3	Agarosegelelektrophorese	35
3.3.4	cDNA-Synthese	36
3.3.5	Echtzeit-RT-PCR.....	37
3.3.6	DNA-Sequenzanalyse.....	38
3.4	Biochemische Arbeitsmethoden	40
3.4.1	Aufarbeitung inkubierter THP-1-Makrophagen.....	40
3.4.2	SDS-PAGE	41
3.4.3	Western-Blot.....	43
3.4.4	Immundetektion.....	45
4	ERGEBNISSE.....	47
4.1	Regulation der Expression der COL6A3-mRNA durch 15-Deoxy-$\Delta^{12,14}$- Prostaglandin J₂.....	47
4.2	Regulation der Sekretion von Typ VI Kollagen durch 15-Deoxy-$\Delta^{12,14}$- Prostaglandin J₂.....	52

4.3	Regulation der Sekretion von Typ VI Kollagen durch Prostaglandin D₂	53
4.4	Die Regulation der Sekretion von Kollagen Typ VI durch Troglitazon	54
4.5	Regulation der Sekretion von Typ VI Kollagen durch 9cRA	56
4.6	Regulation der Sekretion von Kollagen Typ VI durch Aktivierung des PPARγ/RXR-Heterodimers	57
4.6.1	Wirkung der Kombination von 15dPGJ ₂ und 9cRA auf die Sekretion von Typ VI Kollagen	58
4.6.2	Wirkung der Kombination von Troglitazon und 9cRA auf die Sekretion von Typ VI Kollagen	59
4.6.3	Wirkung des PPAR γ -Antagonisten GW9662 auf die Sekretion von Typ VI Kollagen	61
4.7	Regulation der Sekretion von Typ VI Kollagen durch Inhibitoren der Transkription und Translation	63
4.7.1	Actinomycin	64
4.7.2	Cycloheximid	66
5	DISKUSSION	69
5.1	Makrophagen in der Atherogenese	69
5.2	Typ VI Kollagen wird von Makrophagen sezerniert	72
5.3	Die Bedeutung von PPARγ in der Atherogenese	74
5.4	Die Regulation der Sekretion von Typ VI Kollagen durch PPARγ-Agonisten	76
5.4.1	15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J ₂	76
5.4.2	Troglitazon	79
5.4.3	9-cis-Retinsäure	80
5.5	Ausblick	80
6	REFERENZEN	82
7	LEBENS LAUF	87
8	DANKSAGUNG	88

Abkürzungsverzeichnis

ABCA	ATP-binding cassette transporter A
ACAT	Acyl-CoA-Cholesterin-Acyltransferase
APS	Ammoniumpersulfat
bFGF	basic fibroblast growth factor
β-ME	β-Mercaptoethanol
cDNA	complementary DNA
9c-RA	9-cis-Retinsäure
CLA	conjugated linoleic acid
COL6A1	Kollagen Typ VI, α1-Kette
COL6A2	Kollagen Typ VI, α2-Kette
COL6A3	Kollagen Typ VI, α3-Kette
CPT-1	carnitine palmitoyltransferase 1
dsDNA	Doppelstrang Desoxyribonukleinsäure
ECM	extracellular matrix
ERK	extracellular signal regulated kinase
GlyLDL	glycated LDL
GM-CSF	granulocyte-macrophage stimulating factor
HDL	high density lipoproteins
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
IDL	intermediate density lipoproteins
INF γ	Interferon- γ
IP-10	interferon-inducible protein 10
I-TAC	interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant
JNK	c-Jun N-terminal kinase
LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase
LDL	low-density lipoproteins
LPL	Lipoproteinlipase
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	mitogen activated protein kinase

MCP-1	monocyte chemotactic protein-1
M-CSF	monocyte colony stimulating factor
MHC	major histocompatibility complex
MIG	monokine induced by interferon- γ
MMP	Matrixmetalloproteinase
NCoR	nuclear-receptor co-repressor
NF κ B	nuclear factor κ B
NO	nitric oxyde
NOS	nitric oxyde synthase
OxLDL	oxidized LDL
PAF	platelet-activating factor
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	platelet-derived growth factor
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PPAR	peroxisome proliferator-activated factor
PPRE	PPAR response elements
rER	raues Endoplasmatisches Retikulum
RNA	Ribonukleinsäure
RXR	retinoid X receptor
SR-A	Scavenger-Rezeptor-A
SR-B1	Scavenger-Rezeptor-B1
SDS-PAGE	Sodium dodecyl polyacrylamide gel electrophoresis
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGF- β	transforming growth factor β
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteases
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor α
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	vascular endothelial growth factor
VLA-4	very late antigen-4
VLDL	very low density lipoproteins

1 Einleitung

1.1 Die Arterie

Die Arterien des Körpers gehören zum Hochdrucksystem des Kreislaufs, welcher für den Transport von Nährstoffen und Blutgasen unabdingbar ist. Abgesehen von ihrer Funktion als blutleitende Gefäße vom Herzen in die Peripherie, weisen Arterien abhängig von ihrer Lokalisation spezifische Eigenschaften auf. Somit enthält die Aorta beispielsweise einen höheren Gehalt an elastischen Fasern, um durch ihre sogenannte Windkesselfunktion den Strom- und Druckpuls, der durch den linken Herzventrikel entsteht, abzufangen. In distaler Richtung nimmt der Anteil an kollagenen Fasern und glatten Muskelzellen im Gefäßbaum zu. Den Organarterien folgen die Arteriolen, die einerseits am Stoffaustausch beteiligt sind, v. a. aber durch ihren Besatz an glatten Muskelzellen entscheidend den peripheren Widerstand beeinflussen und somit essentiell für die Blutdruckregulation sind. Allen arteriellen Gefäßen ist ein einheitlicher Wandaufbau gemein.

1.1.1 Bauplan und Funktion

1.1.1.1 Die Tunica intima

Die innerste Schicht der Gefäßwand, die in Richtung Gefäßlumen liegt und somit Kontakt mit dem Blut hat, ist die Tunica intima. Die Intima besteht aus Endothelzellen und subendothelialen Fasern, die in Längsrichtung ausgerichtet sind. Diese Schicht wirkt somit den mechanischen Schubkräften, die der Blutfluss auf die Gefäßinnenwand ausübt, entgegen. Das Endothel besitzt durch seine selektive Permeabilität die Möglichkeit, den Stoffaustausch zwischen Blut und Interstitium zu kontrollieren. Gleichzeitig produzieren die Endothelzellen Substanzen, die eine Wirkung auf die regionale Durchblutung haben. Über die glatten Muskelzellen beeinflussen die Wirkstoffe des Endothels den Gefäßtonus. Vasodilatatorisch wirken beispielsweise Stickstoffmonoxid, Prostacyclin, als Metabolit der Arachidonsäure, oder der „Endothelium-derived hyperpolarizing factor“ (EDHF). Letzteres stellt keine chemische Verbindung dar, sondern ist eher als eine Kaskade zellulärer Reaktionen zu verstehen,

deren Ergebnis die Vasodilatation ist. Eine Vasokonstriktion bewirkt hauptsächlich das unter anderem vom Endothel gebildete Endothelin, das eine proliferationsfördernde Wirkung auf z. B. glatte Muskelzellen besitzt. Aber auch Substanzen, die antithrombogen wirken, wie z. B. Heparin, Prostacyclin und Stickstoffmonoxid werden von den Endothelzellen produziert.

Rezeptoren auf der Zelloberfläche der Endothelzellen, beispielsweise Selektine und Integrine, dienen als Adhäsionsmoleküle für Leukozyten. Solche Moleküle spielen bei Entzündungsreaktionen eine entscheidende Rolle. Über die Induktion des „Leukozytenrollens“ und der späteren Adhäsion und Diapedese ist das Endothel maßgebend für die Leukozytenrekrutierung und somit auch ein wichtiger Faktor für die Pathogenese der Atherosklerose.

Die Membrana elastica interna, eine flächenhafte Verdichtung der längs verlaufenden elastischen Fasern, trennt die Tunica Intima von der Tunica Media.

1.1.1.2 Die Tunica media

Die Tunica media ist die dickste Schicht der Arterienwand und weitaus prominenter, als dies in der Venenwand der Fall ist. Der Grund hierfür liegt in der Funktion der Arterien, die im Vergleich zu den Venen größeren Dehnungskräften ausgesetzt sind. Folglich besteht die Media aus ringförmig angeordneten glatten Muskelzellen, sowie elastischen als auch kollagenen Fasern.

Auf der anderen Seite ermöglichen die glatten Muskelzellen durch entsprechende Kontraktionen eine Veränderung des Gefäßlumens. Neben den bereits o.g. parakrinen Regulationsmechanismen, die das Endothel auf die glatte Gefäßmuskulatur hat, gibt es die Regulation über Gefäßnerven. Neurone des Sympathikus bewirken dabei durch Noradrenalin eine Vasokonstriktion. Spezielle Chemo- und Dehnungsrezeptoren befinden sich in den Glomerula aortica und carotica in den Carotiden. Vasodilatation und -konstriktion werden in diesem Fall über den Blutdruck bzw. die Sauerstoffkonzentration des Blutes reguliert.

Zwischen der Tunica Media und der Tunica Externa liegt die Membrana elastica externa, die vornehmlich aus elastischem Bindegewebe besteht.

1.1.1.3 Die Tunica externa (Tunica adventitia)

Die Adventitia ist aus glatten Muskelzellen sowie längs ausgerichteten elastischen und kollagenen Fasern aufgebaut. Die Adventitia hilft bei der Kompensation von Längsdehnungen des Gefäßes mit und ist entscheidend für den Einbau des Gefäßes in das umliegende Gewebe. Als Außenschicht beherbergt die Tunica adventitia die Vasa vasorum als auch die Nervi vasorum.

1.2 Die Arteriosklerose

Der Begriff „Arteriosklerose“ leitet sich von den griechischen Wörtern „athere“ (für Haferschleim) und „scleros“ (für hart) ab und wird im Deutschen meist synonym zum Begriff „Atherosklerose“ verwendet. Tatsächlich handelt es sich bei dem Begriff „Arteriosklerose“ um einen Überbegriff für Arterienerkrankungen, bei denen es zu einer Wandverdickung kommt, während „Atherosklerose“ Umbauprozesse beschreibt, bei denen es zur Lipideinlagerung und Bildung fibröser Plaques kommt (9). Es handelt sich dabei um eine chronische und zugleich proliferative Erkrankung der mittleren und großen arteriellen Gefäße. Auslöser dieser Umbauprozesse, von denen vor allen Dingen die Tunica intima der Gefäßwand betroffen ist, sind Endothelschäden aufgrund von mechanischer, chemischer oder immunologischer Einwirkung. Nach neuerer Erkenntnis spielt ebenso eine Dysfunktion des Endothels eine Rolle (16). Die Atherosklerose zeigt sich durch eine subendotheliale Ansammlung von Fett, sowie die Einwanderung von T-Lymphozyten und Monozyten, die sich zu Makrophagen ausdifferenzieren und in Schaumzellen umwandeln. Glatte Muskelzellen aus der Tunica media wandern in die Intima ein, proliferieren und sorgen für die de-novo-Synthese von Molekülen der extrazellulären Matrix (engl. „extracellular matrix“ (ECM)). Die Entwicklung dauert in der Regel mehrere Jahrzehnte und beginnt mit der diffusen Endothelschädigung. Das Resultat ist eine komplizierte Plaque, welche aus einem nekrotischen Kern besteht, umgeben von Makrophagen, T-Lymphozyten und der fibrösen Kappe aus glatten Muskelzellen und ECM-Molekülen. Die Entwicklung der Atherosklerose wird nachfolgend genauer geschildert.

Obwohl bereits altägyptische Mumien Hinweise auf das Vorhandensein dieser Gefäßerkrankung liefern, handelt es sich dabei besonders um eine Erkrankung in den Wohlstandsgesellschaften der westlichen Industrienationen. Der langsame Rückgang der Mortalität in den letzten Jahren ist vermutlich auf die verbesserten Therapiemöglichkeiten der Folgeerkrankungen zurückzuführen. Dennoch führen Herzinfarkt und Schlaganfall nach wie vor die Statistik der Todesursachen an.

1.2.1 Risikofaktoren

Die genauen Gründe für die Entstehung der Atherosklerose sind bisher im Detail nicht verstanden. Die Manifestation der Gefäßerkrankung kann im Alter, aber auch schon in jungen Jahren erfolgen. Ebenso unsicher lässt sich auf das sichere Auftreten der Folgeerkrankungen schließen. Bisher hat sich die 1973 von Ross und Glomset aufgestellte „response to injury“-Hypothese durchgesetzt. Nach dieser Hypothese wird eine Dysfunktion des Endothels vorausgesetzt, die mechanischen, chemischen oder immunologischen Ursprungs ist. In diesem Zusammenhang sind einige Faktoren in großen epidemiologischen Studien (PROCAM, Framingham) als unabhängige Risikofaktoren einer koronaren Herzkrankheit ermittelt worden. Hierzu gehören Hypertonie, Hyperlipidämie, Diabetes mellitus, Nikotin- und Alkoholabusus, Stress, Alter, männliches Geschlecht, Sozial- als auch Familienanamnese. Im Folgenden sollen diese kurz erörtert werden. Die Hypertonie kann durch die kontinuierlich hohen Blutdrücke zu einem mechanischen Endothelschaden führen. Häufig ist der Bluthochdruck nicht auf einen Ursprung (z. B. Adipositas) zurückzuführen, so dass von einem primären Hypertonus gesprochen wird. Die Adipositas ist allerdings ein häufiges Bild, das sich auf die Lebensgewohnheiten zurückführen lässt. Neben der meist einhergehenden Hypertonie ist das weitere Problem die Hyperlipidämie. Nicht jede Hyperlipidämie ist jedoch auf fehlerhafte Lebensweisen zurückzuführen, sondern auch angeborene Stoffwechselkrankheiten können eine Ursache sein. Solche können z. B. einen Mangel an LDL-Rezeptoren an den Leberzellen darstellen oder einen HDL-Mangel, so dass der reverse Cholesterintransport nicht oder nur eingeschränkt möglich ist. Die unterbleibende Metabolisierung überschüssigen Cholesterins in der Leber führt zur Hypercholesterinämie, die bereits in jungen Jahren zu schweren

Gefäßveränderungen führen kann. Diabetes mellitus, v. a. der insulinunabhängige Typ II Diabetes, führt zu Schäden aufgrund von Autoglykosylierungen von Proteinen, die ihrerseits Auslöser von Endothelschäden sein können. Die generelle schädigende Wirkung des Rauchens wird bei der Atherogenese durch die Bildung von Toxinen erklärt, welche zu Endothelschäden führen. Mit zunehmendem Alter werden Gefäßwandläsionen und Lipideinlagerungen häufiger beobachtet und das Risiko eines Herzinfarkts oder Schlaganfalls steigt. Ebenso sind Männer statistisch häufiger und früher von atherosklerotischen Veränderungen betroffen und sterben häufiger an den Folgeerkrankungen als Frauen, was möglicherweise hormonelle Ursachen hat (1).

Zahlreiche Risikofaktoren für die Entstehung der Atherosklerose sind beeinflussbare Größen des Lebensstils und somit veränderbare Faktoren. Nichtsdestotrotz ist zu berücksichtigen, dass widrige Umstände, wie z. B. niedrige soziale Schichtung, Depressionen und Stress ebenfalls als Risikofaktoren wirken und somit eine Entstehung der Atherosklerose begünstigen.

1.2.2 Pathogenese der Atherosklerose

1.2.2.1 Die initiale Phase

Die Ursache der Atherosklerose ist, wie oben bereits erwähnt, eine Schädigung oder Dysfunktion des Endothels. Diese führt zu einer eingeschränkten Barrierefunktion und somit zu einem Verlust der selektiven Permeabilität. Aufgrund der erhöhten Durchlässigkeit wird es Lipoproteinen mit geringer Dichte (engl. „low-density-lipoproteins“ (LDL)) möglich, aus dem Blut in das subendotheliale Gewebe zu gelangen und dort an Proteoglykanen der ECM zu akkumulieren. In dieser Phase führen Abbauprodukte der Zellen der Gefäßwand, hauptsächlich Radikale, aber auch verschiedene Peroxidasen, zur Oxidation der an Proteoglykanen assoziierten LDL und zur Entstehung von oxidierten und möglicherweise auch enzymatisch veränderten LDL. Die Akkumulation dieser modifizierten LDL und der damit einhergehende Entzündungsprozess können das Endothel zur verstärkten Expression von Oberflächenmolekülen und chemotaktischen Substanzen anregen. Solche

Oberflächenmoleküle sind hauptsächlich Adhäsionsrezeptoren für Leukozyten, welche die Adhäsion und Diapedese induzieren (12).

1.2.2.2 Die Leukozytenrekrutierung

Die Leukozytenrekrutierung leitet den nächsten Schritt in der Atherogenese ein. Dabei vermitteln Selektine der Endothelzellen das sogenannte „Rolling“ (Leukozytenrollen), das der festen Adhäsion am Endothel vorausgeht. Für die Adhäsion der Leukozyten spielen in der Atherogenese die Adhäsionsrezeptoren „vascular cell adhesion molecule-1“ (VCAM-1) und „intracellular cell adhesion molecule-1“ (ICAM-1) (12) eine entscheidende Rolle. Die dazu entsprechenden Liganden auf der Leukozytenmembran sind VLA-4 und β_2 -Integrin. Monozyten und T-Lymphozyten, welche an inflammatorischen Reaktionen beteiligte Zellspezies darstellen, treten durch die Endothelschicht hindurch und wandern in das darunter liegende Gewebe ein. Zytokine aus den Endothelzellen verstärken diesen Prozess. Eine wichtige Rolle spielt dabei das „Chemokin macrophage chemoattractant protein-1“ (MCP-1), welches neben der Adhäsion auch die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen im subendothelialen Bindegewebe fördert. MCP-1 hat einen chemotaktischen Effekt auf Monozyten und wird bei Inflammationsprozessen vermehrt von Endothelzellen produziert. Auch in arteriosklerotischen Läsionen wird MCP-1 vermehrt gebildet (16). Ebenso wichtig für die Differenzierung und die Proliferation von Monozyten ist der ebenfalls vom Endothel exprimierte Faktor „monocyte colony stimulating factor“ (M-CSF) (12). Zusätzlich werden in Atheromen eine Reihe weiterer Zytokine exprimiert, die eine selektiv chemotaktische Wirkung auf Monozyten haben und daher deren subendotheliale Akkumulation verstärken. Dazu zählen „interferon-inducible protein-10“ (IP-10), „interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant“ (I-TAC) und „monokine induced by interferon- γ “ (MIG).

1.2.2.3 Die Schaumzellgenese

Myeloperoxidasen, Sphingomyelinasen und Lipasen aus dem Endothel und den Makrophagen führen zu einer enzymatischen Veränderung der LDL. Die Aufnahme der

oxidierten LDL in die Makrophagen ist im Vergleich zum unmodifizierten LDL vereinfacht, allerdings ist der Abbau erschwert (1). Haben die Zellen eine gewisse Menge an Cholesterin aufgenommen, erfolgt eine transkriptionale Downregulation der LDL-Rezeptoren (12). Stattdessen werden in hohem Maße Scavenger-Rezeptoren (SR) exprimiert. Diese erhöhte Produktion von Scavenger-Rezeptoren wird vermittelt durch PPAR γ , TNF- α und INF- γ aus T-Lymphozyten. Die Scavenger-Rezeptoren unterliegen keinem negativen Feedback Mechanismus mehr, wodurch eine exzessive Lipidaufnahme begünstigt wird und die Schaumzellformation resultiert.

Freies Cholesterin ist zytotoxisch und Makrophagen können auf hohe intrazelluläre Cholesterinkonzentrationen auf zwei Arten reagieren. Zum einen werden Cholesterol und Cholesterylester in zytosolischen Lipidtröpfchen gespeichert. Zum anderen haben Makrophagen über das von ihnen produzierte Apolipoprotein E die Möglichkeit, Cholesterin an HDL abzugeben. HDL ist das Lipoprotein, das für den reversen Cholesterintransport verantwortlich ist und daher der Atherogenese entgegenwirkt. Aufgrund der fehlenden, negativen Rückkopplung bei der Aufnahme modifizierter LDL, kann bei hohen LDL-Serumspiegeln der intrazelluläre Cholesteringehalt dennoch toxische Konzentrationen erreichen. Die Folge ist ein apoptotisches oder nekrotisches Sterben der Schaumzellen sowie die damit verbundene Anhäufung von Lipiden und zellulärem Debris im extrazellulären Bereich subendothelialer Gewebe.

Die Akkumulation der Schaumzellen in der Intima wird bereits in frühen Stadien der Atherosklerose makroskopisch als helle, weißlich-gelbe Lipidflecken sichtbar. Diese sogenannten Fettstreifen (engl. „fatty streaks“) sind ein frühes Zeichen der Atherosklerose und stellen eine vermutlich noch reversible Veränderung der Gefäßwand dar.

1.2.2.4 Entstehung von Atheromen und Bildung einer komplexen Plaque

Interferon- γ (INF- γ), ein Zytokin aus T-Lymphozyten und Makrophagen, das u. a. eine wichtige Rolle bei Entzündungsprozessen spielt, sowie Wachstumsfaktoren wie der von Makrophagen freigesetzte „platelet-derived growth factor“ (PDGF), führen zur Einwanderung glatter Muskelzellen aus der Media in die Intima und zu deren

Proliferation. Die Expression und Sekretion dieser Entzündungs- und Wachstumsfaktoren ist während der Atherogenese gesteigert. Bis zur Entstehung einer fibrösen Plaque vergehen Jahre und es geschieht wahrscheinlich nicht kontinuierlich, sondern in Episoden, wobei Replikation und Apoptose glatter Muskelzellen in ständiger Konkurrenz zueinander stehen.

Besonders die glatten Muskelzellen produzieren extrazelluläre Matrixmoleküle in der arteriosklerotischen Plaque. Die hauptsächlichen ECM-Moleküle der Plaque sind Kollagen Typ I, III, V und VI, Versican, Biglycan, Aggrecan und Decorin. Stimulatoren für die exzessive Produktion von ECM sind wiederum das PDGF und auch der „transforming growth factor- β 1“ (TGF- β 1). Beides sind Zytokine, die von unterschiedlichen Zellspezies produziert werden und in arteriosklerotischen Läsionen zu finden sind (12). Die Produktion der ECM durch die glatten Muskelzellen der Intima trägt vermutlich zur Plaquestabilität bei.

Einen weiteren Schritt in der Formation einer komplizierten Plaque stellt die Plaquevaskularisierung dar. Das Plaquewachstum kann in diesem Fall mit dem Wachstum maligner Tumoren verglichen werden, da die Neogefäße eine zusätzliche Versorgung der durch atherosklerotische Ablagerungen beeinträchtigten Gefäße gewährleisten. Die Gesamtoberfläche des Gefäßes, die für die Leukozytenrekrutierung zur Verfügung steht, steigt an. Des Weiteren steigt die Affinität der Leukozyten zur Adhäsion und Diapedese. Dies kann durch eine vermehrte Expression von Adhäsionsrezeptoren – Selektine, VCAM-1 und ICAM-1 – auf dem Endothel der Mikrogefäße im Vergleich zu den Makrogefäßen erklärt werden. Begünstigt wird die Vaskularisierung durch Angiogenese-Faktoren wie den „basic fibroblast growth factor“ (bFGF) und den „vascular endothelial growth factor“ (VEGF), welche im Atherom vermehrt produziert werden. Eine weitere Eigenschaft der Neogefäße ist ihre hohe Brüchigkeit, was häufig zu deren Rupturen führt. Vermutlich ist die erhöhte Rupturgefahr auf Veränderungen der Gefäßwand zurückzuführen, wie z. B. eine defekte Basalmembran oder defekte Perizyten (Myofibroblasten der Kapillarwand), ähnlich wie bei einer diabetischen Retinopathie.

Eine Hauptkomplikation fortgeschrittener Plaques ist, neben der Gefäßverengung und der damit verbundenen ischämischen Schädigung nachfolgender Organe, eine Ruptur

der Plaque. Bevor sich die Plaque prominent über die Intimaoberfläche erhebt, wächst die Läsion zunächst nach innen in das umliegende Gewebe hinein und weitet sich erst später in das Gefäßlumen aus. Im Zentrum fortgeschrittener Plaques befindet sich ein nekrotischer Kern, der sich aus apoptotischen und nekrotischen Zellresten, freien Lipiden (hauptsächlich Cholesterin und Cholesterinester) sowie einigen Schaumzellen zusammensetzt. Überdeckt ist dieser Kern von der fibrösen Kappe, die typischerweise aus dichtem Gewebe extrazellulärer Matrix besteht, ebenso wie glatten Muskelzellen und vereinzelt Leukozyten. Der Randbereich wird auch „Plaqueschulter“ genannt und ist zellreich. Neben glatten Muskelzellen finden sich hier vor allem Makrophagen und T-Lymphozyten.

Die Stabilität der Plaque hängt nun direkt von der Stabilität bzw. der Qualität der fibrösen Kappe ab. Das aus den T-Zellen ausgeschüttete $\text{INF-}\gamma$ führt zu einer Senkung der ECM-Produktion durch die glatten Muskelzellen, welche die Hauptproduktionsstätten für ECM-Moleküle in der Plaque darstellen. Gleichzeitig kommt es zu einer Matrixdegradation durch unterschiedliche, von Makrophagen in Atheromen sezernierte Proteasen. Solche den Umbau der fibrösen Kappe regulierenden Enzyme sind Matrix-Metalloproteinasen wie Kollagenasen und Gelatinasen als auch Cathepsine. Neben dem Verlust an ECM durch erniedrigte Neusynthese und aktiven Abbau spielt auch eine Reduktion der glatten Muskelzellen eine Rolle für die Destabilisierung einer Plaque. Im Zuge der in der Plaque stattfindenden Entzündungsreaktion, kann durch T-Zell-Rezeptoren oder durch T-Zell assoziierte Mediatoren eine Apoptose in glatten Muskelzellen ausgelöst werden. Auch die Akkumulation von fettbeladenen Makrophagen und freiem Cholesterin bzw. Cholesterinestern in der Plaque erhöhen die Gefahr einer Ruptur. Die Akkumulation erfolgt häufig in der Schulterregion fortgeschrittener Plaques, daher rupturiert die Plaque oftmals in dieser „Plaqueschulter“. Ebenso kann es zu Erosionen von Gefäßen kommen.

1.2.3 Folgen der Atherosklerose

Die Folgen der Atherosklerose sind abhängig von der Lokalisation der Läsion und können von chronischen Leiden bis hin zu akut lebensgefährlichen Notfällen reichen.

Alle Komplikationen stellen ischämische Reaktionen von Geweben mit entsprechenden Endorganschäden dar.

Kardiovaskuläre Komplikationen sind sicherlich die prominentesten Erkrankungen, die mit der Atherosklerose verknüpft sind. Die Verengung eines oder mehrerer Koronargefäße führt zur typischen Angina-pectoris-Symptomatik. Die Patienten beschreiben dabei einen drückenden Schmerz im Brustkorb („Gürtel um die Brust“) mit möglicher Ausstrahlung in den linken Arm, Schulter oder Unterkiefer, sowie Atemnot. Häufig tritt dies in Kombination mit Schwindelgefühlen auf. Sofern die beschriebene Symptomatik nicht auftritt, wird eine Verengung des Koronargefäßes um mehr als 70% dennoch durch eine Stentimplantation behandelt. Im Gegensatz dazu kann die Ruptur einer Plaque mit folgender Thrombosierung oder aber die Ruptur eines Neogefäßes mit Einblutung in die Gefäßwand und akuter Gefäßverengung zum akuten Myokardinfarkt durch den Verschluss eines blutstromabwärts gelegenen Koronargefäßes führen.

Gefäßveränderungen im Bereich der Gehirnarterien führen zu transitorischen ischämischen Attacken (TIA) oder zum akuten Schlaganfall. Je nachdem welcher Bereich des Gehirns von dem ischämiebedingten Zelluntergang betroffen ist, folgen Ausfälle der von den jeweiligen Hirnregionen gesteuerten Körperfunktionen.

Die Atherosklerose peripherer Gefäße manifestiert sich meistens in den unteren Extremitäten als pAVK (periphere arterielle Verschlusskrankheit). Die Symptomatik umfasst v. a. das belastungsabhängige „Schaufensterphänomen“, die Claudicatio intermittens. Im Zweifelsfall kann diese Erkrankung bis hin zum Gangrän fortschreiten.

Neben diesen drei Krankheitsbildern, die Folge der Ischämie sind, kann es gerade in den großen Arterien, besonders in der Aorta, auch zur Bildung von Aneurysmen durch die Atherosklerose kommen. Obwohl die Atherosklerose eine Läsion der Intima darstellt, kann es dennoch zur Schwächung bis hin zur Atrophie der Media kommen. Es kommt zur Aussackung der gesamten Gefäßwand und somit zur Bildung eines echten Aneurysmas, das wiederum eigene Risiken durch Einblutungen oder Ruptur der Gefäßwand birgt.

1.3 Lipoproteine

Lipide und Lipoproteine sind ausschlaggebend an der Atherogenese beteiligt. Lipoproteine spielen für die Entstehung der Atherosklerose eine wichtige Rolle, denn ein gestörter Lipoproteinstoffwechsel geht oftmals mit einer Atherosklerose einher.

Lipoproteine erfüllen im Organismus die Funktion von Transportvehikeln für Lipide. Lipide besitzen hydrophobe Eigenschaften, welche sie wasserunlöslich machen und somit ihre Lösung im Blut nicht möglich ist. Die Unterscheidung der Lipoproteine liegt sowohl in ihren unterschiedlichen Dichteverhältnissen als auch im unterschiedlichen Gehalt von Fett und Proteinen. Der Dichte nach sortiert, beginnend mit der geringsten Dichte, gibt es folgende Lipoproteine: Chylomikronen, VLDL, IDL, LDL und HDL. Chylomikronen transportieren die mit der Nahrung aufgenommenen Lipide zu den extrahepatischen Geweben. Sie entstehen in den Mukosazellen des Duodenum und sind reich an Triglyceriden. Die Triglyceride werden am Zielgewebe von der Lipoproteinlipase abgebaut und an Fett- oder Muskelgewebe abgegeben. Zurück bleiben cholesterinreiche Reste der Chylomikronen, die sogenannten Remnants. Diese werden von der Leber aufgenommen. Die Leber scheidet das aufgenommene Cholesterin zum Teil über die Galle aus. Ein anderer Teil wird für den Umbau der Remnants zu VLDL verwendet. VLDL sind mit endogen synthetisierten Triglyceriden beladen und transportieren diese von der Leber zu extrahepatischen Geweben. Dort werden die Triglyceride wiederum abgebaut und verwertet, so dass als Abbauprodukt der VLDL die triglyceridärmeren IDL entstehen. IDL gelangen zurück zur Leber oder werden im Blut zu LDL abgebaut. LDL transportieren hauptsächlich Cholesterin und Cholesterinester. Das Cholesterin wird unter normalen Umständen für den Membranaufbau der Zellen verwendet. Die Cholesterinzufuhr durch LDL und die endogene Synthese der Zellen sind dabei exakt aufeinander abgestimmt. Unter gestörten Verhältnissen kann es jedoch zur massiven Einlagerung von Cholesterin in die Gefäßwand kommen. HDL ist hingegen das Lipoprotein, das umgangssprachlich „gutes Cholesterin“ transportiert. Gemeint ist damit der reverse Cholesterintransport von Cholesterin aus extrahepatischen Geweben zur Leber, an der die Ausscheidung des überschüssigen Cholesterins durch die Galle erfolgen kann. Lipoproteine bestehen u. a. aus Apolipoproteinen, die verschiedene Funktionen als Liganden erfüllen. So gibt es

beispielsweise Apolipoproteine, die eine hohe Affinität und Spezifität für die Bindung an Rezeptoren für die Aufnahme der Lipoproteine und deren Metabolisierung in extrahepatischen und hepatischen Geweben besitzen. Andere wiederum sind Aktivatoren der Lipoproteinlipase, welche in die Zellmembran extrahepatischer Gewebe eingebaut ist und sich auch am Endothel befindet (13). Da LDL und HDL eine wichtige Rolle in der Atherogenese spielen, soll nachfolgend auf die beiden Lipoproteine genauer eingegangen werden.

1.3.1 LDL

LDL enthält die Apolipoproteine B100 und E. Beide Apolipoproteine vermitteln die Bindung von LDL an den LDL-Rezeptor, der in der Zellmembran hepatischer und extrahepatischer Zellen verankert ist. Bei der Bindung der Apolipoproteine an den LDL-Rezeptor kommt es zur endozytotischen Aufnahme des LDL-Partikels samt Rezeptor. Die LDL-Rezeptoren werden recycelt und zurück an die Zelloberfläche transportiert. Intrazellulär verschmilzt das Vesikel danach mit Lysosomen. Das Cholesterin wird in den Lysosomen von der lysosomalen sauren Lipase hydrolysiert und freies Cholesterin führt am endoplasmatischen Retikulum zur Hemmung der endogenen Cholesterin-Biosynthese. Die Aktivierung der „Acyl-Cholesterin-CoA-Acytransferase“ (ACAT) führt zur Veresterung des Cholesterins mit freien Fettsäuren, die zum Teil aus dem LDL stammen. Die entstehenden Cholesterinester werden zusammen mit Triglyzeriden in cytosolischen Lipidtropfen gespeichert.

1.3.2 HDL

HDL wird zum einen in der Leber synthetisiert. Zum anderen entsteht HDL auch durch die Interaktion mit Chylomikronen-Remnants oder VLDL im Blut. Dabei handelt es sich um den Austausch von Apolipoproteinen wie z. B. Apolipoprotein C und E, die HDL von den Chylomikronen aufnimmt. Mithilfe ihres Apolipoproteins A bindet HDL das Enzym „Lecithin-Cholesterin-Acytransferase“ (LCAT). LCAT katalysiert die Reaktion von Cholesterin und Phosphatidylcholin zu Cholesterinestern und Lysophosphatidylcholin. Phosphatidylcholin gehört zur Gruppe der Phosphoglyceride,

die einerseits im HDL vorhanden sind, andererseits, genau wie das Cholesterin und Shingolipide, Bestandteil der Lipiddoppelschicht der Zellmembranen sind. Das Lysophosphatidylcholin diffundiert aufgrund seiner guten Wasserlöslichkeit ab und die Cholesterinester akkumulieren im Bereich des apolaren Kerns der HDL-Partikel. Somit entsteht an der Oberfläche Raum für Cholesterin, das aus den Zellen extrahepatischer Gewebe aufgenommen werden kann. In der Leber erfolgen die Aufnahme der HDL mit Hilfe der hepatischen Scavenger-Rezeptoren (SR-B1/CD36) sowie die Ausscheidung des Cholesterins über die Galle.

Hohe HDL-Spiegel im Blut haben eine hohe Relevanz, da sie der Entstehung von Atherosklerose vorbeugen können. Die protektive Wirkung der HDL kann dabei auf folgende Mechanismen zurückgeführt werden. Die wichtigste Funktion der HDL liegt im reversen Cholesterin-Transport. HDL besitzt außerdem Kontrollfunktionen in Bezug auf Zellproliferation und Migration von Endothelzellen und trägt somit zur Regeneration von beispielsweise geschädigtem Endothel bei. Es wirkt inhibitorisch auf die apoptotische Wirkung von oxidierten LDL-Partikeln, wobei der genaue Mechanismus der Inhibition nach wie vor unklar ist. Gleichzeitig reguliert HDL die sekretorischen Funktionen des Endothels. Über die Induktion der Prostacyclin- und NO-Synthese aus Endothelzellen kommt es zur Vasodilatation. Prostacyclin ist ein Arachidonsäurederivat, das durch die Cyclooxygenase gebildet wird. HDL versorgt das Endothel mit Arachidonsäure und induziert gleichzeitig die Cyclooxygenase-2, ebenso wie die NO-Synthase. Der dritte Mechanismus, über den sich die atheroprotektive Wirkung von HDL erklären lässt, ist die Inhibition inflammatorischer Prozesse. HDL inhibiert die Monozytenadhäsion auf zwei Ebenen. Zum einen wird die Wechselwirkung der Monozyten mit der Endotheloberfläche verhindert, zum anderen führt es zur Verringerung der Rezeptorexpression, wie VCAM-1, ICAM-1 und E-Selektin in aktivierten Endothelzellen (23).

1.4 Makrophagen

Im Jahre 1882 entdeckte der russische Zoologe und Bakteriologe Metschnikow die zur Phagozytose fähigen Makrophagen. Der Begriff der Phagozytose kommt aus dem Griechischen und setzt sich aus den Wörtern „phagon“ (bedeutet „essen“) und „kytos“

(bedeutet „einhöhlen“) zusammen. Im Knochenmark entstehen aus Vorläuferzellen die Monozyten, welche zwei bis drei Tage im Blut zirkulieren, um dann in Gewebe einzuwandern und sich dort zu Makrophagen auszudifferenzieren. Je nach Gewebe, in das die Makrophagen einwandern, weisen sie recht unterschiedliche Eigenschaften auf und werden dementsprechend unterschiedlich benannt. So heißen beispielsweise die Makrophagen in der Leber Kupffer-Zellen, im ZNS Mikroglia und im Chorion der Plazenta Hofbauer-Zellen (2).

1.4.1 Funktion der Makrophagen

Makrophagen sind amöboid bewegliche „Fresszellen“, die sowohl zum angeborenen als auch erworbenen Immunsystem gehören. Ihre Funktion liegt in der Phagozytose von mikrobiellen Eindringlingen als auch apoptotischer Zellreste oder neoplastischer Zellen. Somit gehören sie zur primären Abwehrreihe des Körpers und stehen in engem Kontakt mit den T-Helferzellen und T-Killerzellen. Mithilfe der Antigenpräsentation durch Makrophagen ist es T- und B-Lymphozyten möglich, eine adäquate Immunreaktion gegen Eindringlinge einzuleiten.

Die Fähigkeit zwischen körperfremden und körpereigenen Komponenten zu unterscheiden ist dabei eine entscheidende Eigenschaft. Aktiviert werden die Makrophagen durch unterschiedliche lösliche Faktoren und Zelloberflächen bzw. Rezeptoren. Der potenteste Aktivator ist das immunmodulierende $\text{INF-}\gamma$, das aus CD4-positiven T-Helferzellen und CD8-positiven T-Zellen stammt. Weitere Faktoren sind Lipopolysaccharide aus Bakterien, Prostaglandine und Leukotriene. Der Aktivierungsweg über Zelloberflächenrezeptoren läuft hauptsächlich über die Fc-Rezeptoren und die sogenannten „toll-like“-Rezeptoren, der mittels Signaltransduktion zur Bildung antimikrobieller Proteine führt.

Des Weiteren beeinflussen Makrophagen die Immunreaktion über die Sekretion zahlreicher Proteine und Zytokine:

- Proinflammatorische Interleukine (IL-1 und IL-8 sowie $\text{TNF-}\alpha$ und MCP-1),
- auf T-Zellen chemotaktisch wirkende Interleukine (IL-1, IL-12, IL-18 und IL-23),

- Zytokine mit autokrinem Feedback (z. B. IL-1, IL-12, IL-18, TNF, INF- α/β sowie die Faktoren M-CSF und GM-CSF),
- IL-10 und TGF- β wirken dämpfend auf die inflammatorische Reaktion,
- Komponenten des Komplementsystems,
- Zahlreiche Proteasen (z. B. Matrix-Metalloproteinasen) und auch
- Proteine der extrazellulären Matrix.

Die Sekretion und Produktion kann wiederum, abhängig vom Aktivierungszustand der Makrophagen, gesteigert oder gedämpft sein. In Bezug darauf wurden drei Aktivierungsmöglichkeiten von Makrophagen beobachtet, die auch für die Atherogenese relevant sind.

1.4.2 Die klassische Aktivierung

Der klassische Aktivierungsweg wird bei der primären Immunreaktion eingeschlagen und spielt somit eine wichtige Rolle für die Infektabwehr des Körpers. Infolge einer Antigenexposition kommt es zur Sekretion aktivierender Immunmodulatoren durch aktivierte TH1-Helferzellen und Natürliche Killerzellen (NK). Zu diesen Zytokinen gehören insbesondere INF- γ und zudem IL-1, IL-6, IL-12, IL-18 sowie TNF- α . Auch bakterielle Lipopolysaccharide zählen zu den Faktoren der klassischen Aktivierung.

Zirkulierende Monozyten im Blut wandern unter dem Einfluss der erwähnten Modulatoren mit dem Ziel in das entzündete Gewebe ein, den entzündlichen Herd auszuschalten. Im entsprechenden Gewebe erfolgt jedoch zunächst die Ausdifferenzierung von Monozyten zu adhärenen Makrophagen. Charakteristisch für die klassische Aktivierung ist nun, dass die Makrophagen überwiegend degradierende und lytische Auswirkungen besitzen. Zum Schutze des Organismus sezernieren sie proinflammatorische Zytokine (siehe Kapitel 1.4.1), welche zur Aktivierung weiterer Monozyten führen, aber auch die Kommunikation zu B- und T-Lymphozyten vermitteln. Im Sinne der Infektabwehr stehen im Mittelpunkt der Makrophagenreaktion die Phagozytose, Apoptoseauslösung als auch die Expression zahlreicher Proteasen. Bakterien können auf diese Weise effektiv zerstört werden. Auch bei der Beseitigung von Tumorzellen spielen Makrophagen eine wichtige Rolle. Stark geschädigte oder

veränderte körpereigene Zellen werden in die Apoptose geführt, um nicht selbst zum schädigenden Faktor zu werden (5).

Neben dem proinflammatorischen ist bei den Makrophagen ein antiinflammatorischer Phänotyp bekannt. Die Umaktivierung des pro- in den antiinflammatorischen Zustand ist möglich (z. B. nach der Phagozytose apoptotischer Zellreste).

1.4.3 Die alternative Aktivierung

Die alternative Aktivierung führt zu einem antiinflammatorischen Phänotyp. TH2-Zellen sezernieren IL-4 und IL-13, für die alternative Aktivierung verantwortliche Interleukine. Im Gegensatz zur klassischen Aktivierung hat dieser Weg einen eher mitogenen Effekt. Es kommt zur Hochregulation des Mannose-Rezeptors, der die Phagozytose mikrobieller Organismen unterstützt, sowie des MHC-II-Komplexes, welcher extrazellulär aufgenommene und fragmentierte Antigene auf der Zelloberfläche präsentiert. Im Vordergrund steht jedoch die Synthese und Sekretion antiinflammatorischer Zytokine: Von alternativ aktivierten Makrophagen produziert TGF- β 1 und PDGF vermitteln einen schwachen proliferativen Effekt, während VEGF, bFGF und TNF- α die Angiogenese induzieren. Makrophagen selbst sind ebenfalls in der Lage IL-4 und TGF- β 1 zu sezernieren. Dadurch wird vor allem die Synthese extrazellulärer Matrixproteine durch umliegende Glatte Muskelzellen stimuliert. Die Sekretion von ECM-Proteinen wie Kollagen Typ VI und VIII erfolgt in alternativ aktivierten Makrophagen verstärkt (37).

Während einer Entzündungsreaktion wäre es für den Heilungsprozess wenig zuträglich, wenn ausschließlich proinflammatorische Wirkungen dominieren würden. Der Degradation des Gewebes muss mit einem Wiederaufbau entgegengewirkt werden. Somit ist für die erfolgreiche Beseitigung einer Entzündungsreaktion ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen alternativ und klassisch aktivierten Makrophagen erforderlich.

1.4.4 Die Deaktivierung

IL-10 und TGF- β 1 sind Zytokine, die eine Deaktivierung von Makrophagen einleiten. Die Sekretion erfolgt durch T-Helferzellen (5).

1.5 Kollagene

Kollagen ist das quantitativ häufigste Protein im menschlichen Organismus. Es gehört zu den Bestandteilen der extrazellulären Matrix und hat somit zur Hauptaufgabe, die Integrität von Organen und Geweben zu gewährleisten. Zudem vermitteln unterschiedliche Kollagentypen die Adhäsion und Migration von Zellen als auch Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte. Zurzeit sind 40 Kollagenketten sequenziert worden, die zu bisher 27 bekannten und verschiedenen tripelhelicalen Kollagenmolekülen assemblieren können (14).

1.5.1 Struktur und Funktion

Kollagene besitzen eine tripelhelicale Struktur, die sich aus drei α -Ketten zusammensetzt. Diese α -Ketten können entweder identisch sein (Homotrimer) oder unterschiedlich (Heterotrimer). Grundsätzlich werden Kollagene in verschiedene strukturelle Gruppen aufgeteilt:

1. fibrilläre Kollagene (z. B. Typ I, II, III, V und XI)
2. nicht-fibrilläre Kollagene (z. B. Typ IV, VIII und X)
3. FACIT (fibril-associated collagens with interrupted triplehelices) (z. B. Typ IX und XII).

Fibrilläre Kollagene sind die typischen Kollagene von Bindegewebe, Haut, Knochen, Knorpel und Sehnen. Sie bilden feste Fasern aus, denn ihre Aufgabe besteht darin, der Druck- und Zugbelastung auf das jeweilige Gewebe standzuhalten.

Die nicht-fibrillären Kollagene bilden unterschiedlich lange Tripelhelices und werden durch nicht-tripelhelicale sowie nicht-kollagene Segmente unterbrochen. Diese Moleküle zeichnen sich durch eine hohe Flexibilität aus. Der Hauptvertreter, Typ IV, ist

beispielsweise Bestandteil der Basalmembran und bildet dort ein flächiges Netzwerk aus.

Bei den FACITs handelt es sich um Moleküle, die häufig mit anderen Kollagenfibrillen assoziiert sind und somit für die Verknüpfungen der Kollagene innerhalb der ECM entscheidend sind.

Allen Kollagenen ist gemein, dass sich die Aminosäuresequenz Gly-X-Y ständig wiederholt. Abhängig vom Kollagentyp geschieht dies in unterschiedlicher Häufigkeit. Die kleinste Aminosäure Glycin ist entscheidend, damit sich eine Tripelhelix ausbilden kann. In der Position X befindet sich die Aminosäure Prolin und in Position Y findet sich häufig Hydroxyprolin. Hydroxyprolin kommt eine besondere Bedeutung für die Stabilität des Moleküls zu, da die Hydroxylgruppen Wasserstoffbrücken bilden, die der Kollagentripelhelix Stabilität verleihen. In manchen Kollagenen ist Hydroxyprolin teilweise durch Hydroxylysin ersetzt. Hydroxylysin nimmt eine wichtige Funktion bei der Quervernetzung von Kollagenen ein und ist für die Bildung von Kollagen-Polypeptidketten essentiell.

1.5.2 Die Biosynthese der Kollagene

Die Biosynthese der Kollagene kann in einen intrazellulären Abschnitt und einen extrazellulären Abschnitt geteilt werden. Der Produktionsort sind zunächst die Membranen des rauen Endoplasmatischen Retikulums (rER). Im Lumen des rER erfolgt die Hydroxylierung des Prolins. Diese Reaktion ist abhängig von der Prolyl- bzw. Lysyl-Hydrolase sowie von Ascorbinsäure (Vitamin C). Ascorbinsäure ist essentiell für die Faltung des entstehenden Prokollagens. Jede Kette besitzt einen Kern, der später an der Ausbildung der Tripelhelix beteiligt ist, sowie ein Propeptid in N- als auch C-terminaler Position. Es bilden sich inter- als auch intramolekulare Disulfidbrücken aus und die C-terminalen Enden dreier Ketten lagern sich aneinander. Durch die Anlagerung dreier Kollagenketten kommt es zum Schließen der Tripelhelix in N-terminaler Richtung. Über den Golgi-Apparat werden die Prokollagene in Vakuolen zur Plasmamembran transportiert. Es folgt der extrazelluläre Teil der Biosynthese.

Mit Hilfe der Enzyme Aminopropeptidase und Carboxypropeptidase werden in Einbuchtungen der Plasmamembran die C- und N-Propeptide abgespalten. Fibrilläre Kollagene lagern sich nun zu langen Fibrillen aneinander und werden über die Hydroxylysine quervernetzt.

1.5.3 Die Bedeutung der Kollagene für die Atherosklerose

Die Gefäßwand beinhaltet Kollagene in großen Mengen. Mindestens 13 der 27 bekannten Kollagentypen sind für die Integrität und Elastizität von Arterien wichtig. Etwa 60% der in der Gefäßwand vorkommenden Kollagene sind fibrillär. Die häufigsten Vertreter sind Typ I und Typ III. Typ I Kollagen ist maßgeblich an der Reißfestigkeit der Gefäßwand beteiligt, während Typ III Kollagen eher für die Elastizität von Bedeutung ist. Bei der Atherosklerose ist demnach das Verhältnis zugunsten Typ I Kollagen verschoben, so dass die Arterie an Elastizität verliert. Gleichzeitig besitzt Typ I Kollagen eine stimulierende Wirkung auf glatte Muskelzellen und Makrophagen. Während Monozyten durch Typ I Kollagen zur Ausdifferenzierung in adhärenente Makrophagen stimuliert werden, wird bei glatten Muskelzellen die Umwandlung des kontraktilen in den synthetischen Phänotyp gefördert. Dieser Phänotyp zeichnet sich im Vergleich zum kontraktilen Phänotyp in der Media durch gesteigerte Migration und Proteinbiosynthese von ECM-Molekülen aus. Gleichzeitig bewirkt der adhäsive Effekt des Typ I Kollagens die Einlagerung von LDL in der Gefäßwand bei einer endothelialen Dysfunktion (27).

Nicht-fibrilläre Kollagene besitzen ebenso einen Effekt auf die Atherosklerose. Die Kollagentypen IV und XVIII kommen in der Basalmembran vor, die der Endothelschicht zugrunde liegt und die glatten Muskelzellen der Media fixiert. Eine Degradation der Basalmembran, hervorgerufen durch zahlreiche Proteasen aus Makrophagen, fördert die Migration von glatten Muskelzellen aus der Media in subendotheliale Bereiche.

Kollagen VI wirkt ebenfalls adhäsiv und vermittelt Interaktionen zwischen Zellen und Matrix. Es bindet beispielsweise an den von-Willebrand-Faktor der Thrombozyten und könnte somit eine Rolle bei der Thrombosierung atherosklerotischer Plaques spielen.

Auch antiapoptotische Effekte von Typ VI Kollagen wurden berichtet (8;31). Typ VIII Kollagen beeinflusst die Angiogenese und Endotheldifferenzierung, wirkt aber vor allen Dingen stabilisierend auf Gewebe. Somit könnte Kollagen VIII fibröse Plaques stabilisieren (46).

Die Funktion und Wirkung der Kollagene ist äußerst komplex und zeigt sowohl antiatherogene also auch proatherogene Eigenschaften.

1.5.4 Kollagen VI

Typ VI Kollagen ist ein Heterotrimer aus drei unterschiedlichen Polypeptidketten, $\alpha 1(\text{VI})$, $\alpha 2(\text{VI})$ und $\alpha 3(\text{VI})$. Es gehört zu den nicht-fibrillären Kollagenen und weist eine Multidomänenstruktur auf, mit kurzen tripelhelicalen Abschnitten (37).

Die Form einer Typ-VI-Kollagen-Kette erinnert an eine Hantel. Ein tripelhelicales Mittelstück wird von zwei globulären Domänen eingeschlossen. Intrazellulär erfolgt die Assemblierung dieser Monomere zu Dimeren und diese dann zu Tetrameren, während extrazellulär die Polymerisierung der Tetramere erfolgt. Das Resultat ist ein perlenkettenartiges Polymer.

Typ VI Kollagen dient besonders der Stabilisierung von Geweben und ist an Prozessen der Wundheilung beteiligt. Zudem bietet es einen Schutz vor Apoptose. Die wichtigsten Eigenschaften sollen an dieser Stelle kurz aufgelistet werden:

- Antiapoptotische Wirkung (8;31),
- Förderung von Migration und Adhäsion (37) und
- Verankerung von Zell- und Matrixbestandteilen (37).

Es ist bekannt, dass Mutationen in den Typ VI Kollagen kodierenden Genen erbliche Defekte hervorrufen können, wie z. B. die mild verlaufende Bethlem-Myopathie und das Ullrich-Syndrom, eine Muskeldystrophie, die mit teigiger Haut einhergeht.

Typ VI Kollagen wird aktiv von glatten Muskelzellen, Fibroblasten aber auch von Makrophagen sezerniert, nicht jedoch von Monozyten.

1.6 Peroxysome proliferator-activated receptors

„Peroxysome proliferator-activated receptors“ (PPARs) sind Transkriptionsfaktoren, welche die Genexpression von Lipid- und Glukosemetabolismus regulierenden Genen steuern und Einfluss auf Entzündungsreaktionen und Immunantwort haben.

Unter den PPARs sind drei Formen bekannt, die eine ca. 60%ige Homologie in ihren DNA bindenden Domänen besitzen: PPAR α , PPAR β/δ und PPAR γ .

PPARs bilden nach Bindung entsprechender Liganden Heterodimere mit dem „retinoid X receptor“ (RXR). Das Dimer bindet im Zellkern an die Promotorregion der entsprechenden Gene, welche „PPAR response elements“ (PPRE) genannt werden (20).

PPARs kommen sowohl in Monozyten und Makrophagen, als auch im Endothel vor. Die Hauptaufgaben liegen hier in der Repression unterschiedlicher Entzündungsmediatoren, thrombogener Faktoren sowie der Regulation von Lipid- und Glukosemetabolismus. Einige wichtige Funktionen der PPARs in der Atherogenese sind wie folgt (4):

- PPARs reduzieren die Expression der Oberflächenrezeptoren ICAM-1 und VCAM-1 und damit die Leukozytenrekrutierung.
- PPAR γ reduziert die Expression des Chemokin-Rezeptors CCR2, der Rezeptor für MCP-1, wodurch die MCP-1- abhängige Leukozytenrekrutierung vermindert wird.
- Die Matrixdegradation wird aufgrund einer PPAR α - und PPAR γ -abhängigen Senkung der MMP9-Sekretion gesenkt.
- PPAR γ senkt die Produktion von Osteopontin, ein die Kalzifizierung atherosklerotischer Plaques förderndes Protein.
- PPAR γ reduziert die Aufnahme modifizierter LDL durch Makrophagen aufgrund einer posttranskriptionalen Reduktion des Scavenger-Rezeptors A (SR-A).
- PPAR α steigert über die Induktion der „Carnitine Palmitoyltransferase-1“ (CPT-1) die β -Oxidation. Dadurch werden Fettsäuren metabolisiert und stehen nicht mehr als Substrat für die Cholesterol-Acyltransferase-1 zur Verfügung. Dies führt zur verminderten Bildung von Cholesterinestern und zur Anreicherung von

freiem Cholesterin, das über den Scavenger-Rezeptor BI an HDL abgegeben werden kann.

- PPAR α führt zur Senkung der Expression des „platelet-activating factor“ (PAF)-Rezeptors.
- PPAR α und PPAR γ reduzieren die Aufnahme von glyLDL (glycated LDL) und Triglyceriden durch Makrophagen über die Reduktion der Lipoproteinlipase sowie des apoB48-Rezeptors für oxLDL. Die Expression der Lipoproteinlipase wird zwar von PPARs induziert, allerdings werden die Sekretion des Enzyms sowie seine Aktivität gesenkt.

Die Bedeutung von PPAR β/δ ist weniger gut bekannt. Zum Teil wurden widersprüchliche Beobachtungen im Vergleich zu den Effekten der anderen Mitglieder der PPAR-Familie gemacht. Beispielsweise induziert PPAR β/δ die Rezeptoren SR-A und CD36, zwei an der Aufnahme von oxidierten LDLs beteiligte Rezeptoren. Damit weist PPAR β/δ eine eher atherogene Wirkung auf. PPAR α und PPAR γ wird hingegen ein eher protektiver Effekt bezüglich der Atherogenese zugesprochen. Alle PPARs sind durch bestimmte Fettsäuren und deren Metabolite aktivierbar (20).

Die Wirkung der PPARs wird durch drei Mechanismen vermittelt: Transrepression, Transaktivierung und die ligandenunabhängige Repression (29).

Transrepression bezeichnet den Mechanismus der Interaktion eines PPAR-Proteins mit anderen Transkriptionsfaktoren. Dieser Mechanismus führt zu einer Repression. Beispielsweise kommt es zu einer ligandenabhängigen Antagonisierung von „nuclear factor κ B“ (NF κ B), ein wichtiger Mediator inflammatorischer Reaktionen, und darüber zu einer antiinflammatorischen Wirkung. Der genaue Mechanismus der Transrepression ist noch nicht verstanden, aber es existieren Modelle als Erklärungsansatz. Im Falle von PPAR γ wird vermutet, dass während der Anwesenheit von PPAR γ -Liganden, die Expression von NF κ B verhindert wird und dadurch eine Entzündungsreaktion, die z. B. durch LPS induzierbar ist, blockiert wird. PPAR γ verhindert dabei die sogenannte „Clearance“ von NCoR-Korepressor-Komplexen. Diese blockieren normalerweise an Promotoren der Gene, die für die entzündliche Reaktion verantwortlich sind, die Transkription derselben.

Bei der Transaktivierung kommt es zur ligandenabhängigen Bindung eines PPAR-Proteins an PPREs. Die Bindung von Koaktivatoren führt zur Modifizierung der Chromatinstruktur und zur Katalyse der Bindung der Transkriptionselemente an den Promotor.

Die ligandenunabhängige Repression bezeichnet eine Bindung von PPAR an PPREs, ohne die Anwesenheit eines Liganden. Dies bewirkt die Rekrutierung von Korepressoren, wodurch eine aktive Repression der entsprechenden Gene bewirkt wird. Durch diesen Mechanismus wird gewährleistet, dass es während der Abwesenheit eines bestimmten Liganden zu keinerlei Genexpression kommt.

PPAR γ ist Mitglied der PPAR-Familie und steuert die Expression von Genen mittels Transrepression (4), Transaktivierung und ligandenunabhängiger Repression. PPAR γ wird in der Gefäßwand von Makrophagen, T-Zellen, Endothelzellen und glatten Muskelzellen exprimiert.

Im Folgenden werden die wichtigsten Effekte von PPAR γ aufgelistet:

- PPAR γ inhibiert die Expression des SR-B1, wodurch die Aufnahme von oxLDL gesenkt wird. Paradoxerweise induziert PPAR γ aber auch die Expression von CD36, einem Rezeptor, der die Aufnahme von oxLDL bewirkt (4).
- Die Expression des apoB48-Rezeptors wird gesenkt, so dass es zur Senkung der Triglyceridaufnahme kommt.
- Die LPL interagiert mit Matrixproteinen, so dass es einerseits zur Spaltung der glyLDL-Partikel kommt, andererseits eine erhöhte Aufnahme eingeleitet wird (50). Trotz einer Induktion der LPL-Expression auf transkriptionaler Ebene, kommt es paradoxerweise zu einer gesenkten LPL-Sekretion und verminderten LPL-Enzymaktivität. Die Aufnahme von glyLDL wird daher gesenkt (7).
- Durch die Induktion von ABCA1 wird der aktive Cholesterinefflux gefördert. Zusammen mit dem Apolipoprotein AI kommt es extrazellulär zur Bildung eines HDL-Vorläufers.
- Die Expression von CLA-1/SR-B1 wird aktiviert und es kommt zu weiterem Cholesterinefflux und HDL-Formation.

- Die Expression matrixdegradierender Proteasen (z. B. MMP9) wird über eine Blockade des „mitogen activated protein kinase“(MAPK)-Signalweges gesenkt (21).
- PPAR γ senkt die Expression zahlreicher inflammatorischer Gene, wie z. B. NOS, TNF- α , IL-6, IL-1 β und IL-12.
- Es kommt zur Inhibition der INF- γ abhängigen Chemotaxis und somit zur Minderung der Leukozytenrekrutierung.
- Die Expression von VCAM-1 und ICAM-1 wird gesenkt. Die Folge ist eine verminderte Leukozytenrekrutierung (20).
- PPAR γ reduziert die Angiogenese. Auf diese Weise wird die Versorgung der Plaque durch Neogefäße und die damit einhergehende verminderte Leukozytenrekrutierung eingedämmt. Andererseits kann dies auch negative Folgen haben, da eine Neovaskularisierung schlecht durchbluteter Myokardareale verhindert wird (28).
- Die Migration glatter Muskelzellen wird durch PPAR γ reduziert.

PPAR γ wird von Fettsäuren induziert und aktiviert. Es gibt allerdings noch eine Reihe weiterer Aktivatoren. Ein natürlicher Ligand von PPAR γ ist das 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J₂ (15dPGJ₂), das jedoch auch PPAR γ -unabhängige Wirkungen entfalten kann. Prostaglandine sind Arachidonsäurederivate, die im Organismus Einfluss auf entzündliche Prozesse, Fieberentstehung und Allergien haben und auch Gefäß- und Bronchialmuskeltonus regulieren. Glitazone, z. B. Troglitazon, das aufgrund seiner Hepatotoxizität vom Markt genommen wurde, oder Rosiglitazon, sind synthetische Liganden. Ihre Indikation besteht bei Diabetes mellitus Typ II. Durch die Glitazone erfolgt eine verbesserte Insulinwirkung an Muskulatur, Leber und Fettgewebe, indem die Insulinresistenz durch PPAR γ vermindert wird.

2 Zielsetzung

Prinzipiell ist die Atherosklerose eine ubiquitäre Erkrankung. Im Alter entwickelt jeder Mensch, wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß, atherosklerotische Plaques. Die entscheidenden Fragen sind jedoch, wie stark diese Plaques ausgeprägt sind und welche Komplikationen mit der Atherosklerose einhergehen. Manche Menschen entwickeln nach kurzer Risikofaktorexposition eine symptomatische Atherosklerose und andere entwickeln, obwohl sie lange Zeit mit einer Vielzahl von Risikofaktoren leben, keine manifesten Beschwerden und Komplikationen. Ebenso gibt es Plaques, die Jahrzehnte symptomlos persistieren und solche, die bereits in relativ jungen Lebensjahren rupturieren.

Es gibt verschiedene Einflüsse, die auf die Atherogenese protektiv als auch fördernd wirken. Kollagene werden als Strukturproteine der Arterienwand vornehmlich von Fibroblasten und glatten Muskelzellen, aber auch in gewissem Maße von Makrophagen synthetisiert. Kollagene gehören zu den Proteinen der extrazellulären Matrix der fibrösen Kappe und spielen somit eine entscheidende Rolle für die Stabilität einer atherosklerotischen Plaque. Bestimmte Aktivierungstypen von Makrophagen sezernieren verstärkt Kollagene, andere verstärkt Proteasen, die degradierend auf die extrazelluläre Matrix der Plaque und somit destabilisierend auf die Plaque wirken.

Der Aktivierungszustand von Makrophagen wird durch unterschiedliche Mediatoren und Zytokine moduliert.

PPAR γ ist ein Transkriptionsfaktor des Glukose- und Lipidmetabolismus, der unter anderem durch seine Beteiligung an der Lipidakkumulation und Schaumzellgenese auf den Verlauf der Atherosklerose einwirkt. PPAR γ ist darüber hinaus auch ein Modulator der Makrophagenaktivierung. Dies hat medizinisch hohe Relevanz, da die Induktion eines stabilisierend wirkenden Phänotyps einen möglichen Ansatzpunkt für neue therapeutische Methoden zur Vermeidung von Herzinfarkt und Schlaganfällen darstellen kann.

Ziel dieser Arbeit war es, die Sekretion von Kollagen Typ VI durch Makrophagen zu untersuchen. Dieser Kollagentyp zeichnet sich besonders durch seine stark adhäsiven Eigenschaften aus, welche stabilisierend innerhalb der Plaque wirken können. Im Detail

sollte gezeigt werden, inwiefern die Sekretion von Typ VI Kollagen durch Liganden von PPAR γ moduliert wird und wie der zugrundeliegende Wirkmechanismus aussieht. Diesbezüglich wurden ausdifferenzierte Makrophagen mit PPAR γ -aktivierenden Stoffen, Inhibitoren des PPAR γ /RXR-Signalweges sowie Transkriptions- und Translationshemmern inkubiert und die Sekretion von Typ VI Kollagen wurde untersucht.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Chemikalien:

40% (w/v) Acrylamid/N,N-Methylenbisacrylamid-Lösung (37,5:1)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose für DNA/RNA-Elektrophorese	Carl Roth GmbH
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH
Aqua ad injectabilia	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
DNA-Größenstandard:	
GeneRuler™ 1 kb Plus DNA-Ladder	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot
EDTA (Titrplex)	Carl Roth
Essigsäure (Eisessig)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethidiumbromidlösung 1% (w/v)	Carl Roth GmbH
Flüssigstickstoff	L'Air Liquide, Champigny sur Marne, Frankreich
L-Glutamin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Glyzin	Carl Roth GmbH
Kaliumhydroxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Milchpulver	Carl Roth GmbH
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Methanol	Carl Roth GmbH
Methylenblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethyldiamin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Tris-HCl	Carl Roth GmbH

Tween®-20
Xylencyanol FF

Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Sigma-Aldrich Chemie GmbH

Zellkultur:

Acetylsalicylsäure
Actinomycin
Aminosäuren, nichtessentiell, 100 nM
Ascorbinsäure

Cycloheximide
Dimethylsulfoxid (DMSO)
Einwegspritzen
Fötale Kälberserum
GW 9662
Ibuprofen
Nimesulide
Penicillin-Streptomycin-Glutamin-Lösung
Petrischalen, 150 x 20 mm
15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ prostaglandin J₂
RPMI-1640
Schraubdeckelgefäße (15ml, 50ml)
6-well-Kulturplatten
Zählkammer, Neubauer

Zellkulturflaschen, 25 cm², 75 cm², 150 cm²

Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Invitrogen GmbH
Krüger GmbH & Co, Bergisch-
Gladbach
Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Sigma-Aldrich Chemie GmbH
B. Braun Melsungen AG
PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Invitrogen GmbH
Biochrom KG, Berlin
Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Greiner GmbH, Frickenhausen
Biochrom KG, Berlin
VWR International GmbH,
Darmstadt
Biochrom KG

Sonstige Materialien:

Diamantmesser
Einweghandschuhe Hygoclean

CL-XPosure™ Clear Blue X-Ray Film

Diatome, Biel, Schweiz
Sawazki Medikalprodukte,
Mönchengladbach
Thermo Scientific (Perbio), Bonn

Hypercassette™	Amersham Bioscience GmbH, Freiburg
Immobilon-P (PVDF) Transfer Membran	Millipore GmbH, Schwalbach
Buffer M-MuLV RT	Fermentas
RevertAid™ MuLV RT	Fermentas
Oligonukleotide	Invitrogen GmbH
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ -Primer	Fermentas
Pipettenspitzen (10µl)	Kisker GmbH, Steinfurt
Pipettenspitzen (200µl)	Starlab GmbH, Ahrensburg
Pipettenspitzen (300µl, 1000µl)	Sarstedt AG, Nümbrecht
QuantiTect SYBR®-Green PCR Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Reaktionsgefäße (200µl, 500µl, 1,5ml, 2ml)	Eppendorf AG, Hamburg
RiboLock® RNase Inhibitor	Fermentas GmbH
RNase freies DNase-Kit (Cat.-#: 79254)	Qiagen GmbH
Rneasy Mini Kit	Qiagen GmbH
Supra® Einmal-Kanülen mit Lanzettenschliff	Erhardt-Söhne GmbH, Geislingen
Super Signal™ West Femto Max. Sensitivity Substrate	Thermo Scientific (Perbio)
UVvette®	Eppendorf AG
Whatman-Papiere (GB004)	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
Zentrifugenröhrchen	Beckman GmbH, Krefeld

Antikörper:

Anti-Kollagen Typ VI	Millipore GmbH
Anti- α -Tubulin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Anti-Maus-IgG	DakoCytomation AG, Hamburg
Anti-Kaninchen-IgG	DakoCytomation AG

Geräte:

ABI Prism 7900 HT Cycler	Applied Biosystems GmbH, Darmstadt
Brutschrank	Heraeus Instruments GmbH, Düsseldorf

Gelelektrophoresekammern	G&P Kunststoffe, Kassel
Thermomixer Comfort	Eppendorf AG
Heraeus Labofuge 400e	Heraeus Instruments GmbH, Düsseldorf
Hybridisierungsöfen	Fa. Binder, Tuttlingen
Masterflex® LIS™ Pumpe Modell 7518-10	Cole-Parmer Instrument Company, Vernon, Hills, IL
Mini Protean III, Blot Cell	Bio-Rad GmbH
Optimax Typ TR	MS Laborgeräte, Wiesloch
Pipetten Reference (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf AG
Pipetten E-Line 1-Kanal (10 µl, 120 µl)	Eppendorf AG
Pipetten E-Line 8-Kanal (10 µl, 120 µl, 300 µl 1000 µl)	Eppendorf AG
Rocking Platform	VWR, Langenfeld
Spannungsgeber Bio-Rad PowerPac 300	Bio-Rad GmbH
Spektrophotometer Uvikon 922	Bio-Tek Kontron GmbH, Bad Friedrichshall
Sterilwerkbank Heraeus LaminAir®HB 2448	Heraeus Instruments GmbH, Düsseldorf
Stickstofftank L'Air Liquide Modell GT 140	L'Air Liquide
Ultraschallbad Sonorex RK 100H	Bandelin Electronics, Berlin
Vortex Genie 2	VWR
Wasserbad	GFL, Hannover
Zentrifuge Labofuge GL	Heraeus Instruments GmbH
Zentrifuge 5417 R	Eppendorf AG
Mini Spin Plus Zentrifuge	Eppendorf AG
Thermocycler Mastercycler EpGradient S	Eppendorf AG

3.2 Zellkultur

3.2.1 Kultivierungsbedingungen

Die Arbeit mit eukaryotischen Zellen, d. h. Kultivierung und Ausdifferenzierung, fand unter Sterilwerkbänken statt. Die Zellkulturen wurden unter sterilen Bedingungen im Brutschrank kultiviert, bei wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit 5% (v/v) Kohlendioxidgehalt und bei 37°C. Diesbezüglich wurden auch alle im Zusammenhang mit den Zellen benötigten Medien vor Gebrauch auf 37°C erwärmt.

3.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Zelldichte für das Passagieren der Zellen wurde mit Hilfe einer Neubauer-Kammer bestimmt.

3.2.3 THP-1-Zellen

3.2.3.1 Auftauen von THP-1-Zellen

Die in Flüssigstickstoff eingefrorenen Zellen wurden bei 37°C aufgetaut. Anschließend wurden die THP-1-Zellen in 25 cm² pipettiert und in 5 ml komplettiertem RPMI-Medium (siehe Abschnitt 3.2.4.3) bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Am Folgetag wurde das Medium gewechselt, um mögliche DMSO-Reste aus dem Einfriermedium zu entfernen.

3.2.3.2 Einfrieren von THP-1-Zellen

Einfriermedium:

RPMI-1640	500 ml
Fötale Kälberserum	10% (v/v)
Penicillin	100 Units/ml
Streptomycin	100 µg/ml
L-Glutamin	2 mM
Dimethylsulfoxid	10 % (v/v)

Nach der Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen mit der entsprechenden Menge an Medium resuspendiert, so dass eine Zelldichte von 1×10^6 /ml eingestellt werden konnte. Jeweils 1 ml dieser Suspension wurde in kleine Gewebekulturröhrchen pipettiert und in Papiertücher eingewickelt, um eine langsame Abkühlung zu gewährleisten. Über Nacht wurden die Zellen im -80°C -Gefrierschrank eingefroren, um sie am nächsten Tag in die dauerhafte Lagerung in Flüssigstickstoff zu überführen.

3.2.3.3 Kultivierung von THP-1-Zellen

THP-1-Zellen sind Suspensionszellen in monozytärem Zustand. Für die Kultivierung dieser eukaryotischen Zellen wurde folgendes Medium verwendet:

Komplettiertes RPMI-1640:

RPMI-1640	500ml
Fötale Kälberserum	10% (v/v)
Penicillin	100 Units/ml
Streptomycin	100 $\mu\text{g/ml}$

Die Zellen wurden während des Wachstums in regelmäßigen Abständen lichtmikroskopisch kontrolliert. Nach der Resuspension in komplettiertem RPMI-Medium, wurden die Zellen mit der Neubauer-Kammer gezählt, um die Zelldichte nahe ihres Optimums von $0,5 - 1 \times 10^6$ Zellen/ml Medium zu halten. Die THP-1-Zellen wurden hierzu fünf Minuten mit $2000 \times g$ bei 20°C zentrifugiert und anschließend in neue Kulturflaschen verteilt. Die Kultivierung fand im Brutschrank bei 37°C und 5% (v/v) Kohlendioxid statt. Die Zellteilung und das Auffrischen des Mediums wurden alle zwei Tage wiederholt.

3.2.3.4 Aussaat und Ausdifferenzierung

Nach der Zellzahlbestimmung mit der Neubauer-Kammer wurden die THP-1-Zellen zu einer Zelldichte von $6,6 \times 10^6$ /ml (für 25 cm^2 -Kulturflaschen) bzw. 3×10^6 /ml (für 6-well-Platten) in betreffender Menge Medium aufgenommen. Jeweils 500 μl dieser Zellsuspension wurden dann auf 5 ml Medium ausgesät, so dass sich in der 25 cm^2 -Kulturflasche etwa $3,3 \times 10^6$ Zellen befanden bzw. $1,5 \times 10^6$ je Vertiefung einer 6-Well-

Platte. Als Differenzierungsmedium wurde komplettiertes RPMI-Medium mit 100 ng/ml PMA und 50 μ M β -Mercaptoethanol verwendet. Die Ausdifferenzierung erfolgte über eine Dauer von vier Tagen bei 37°C und 5% (v/v) Kohlendioxid.

3.2.4 Inkubationsversuche

Die Inkubationsversuche wurden mit vier Tage ausdifferenzierten THP-1-Makrophagen durchgeführt. Das Medium setzte sich wie folgt zusammen:

Beladungsmedium:

RPMI-1640 Medium

Streptomycin/Penicillin	100 Units/ml
PMA	100 ng/ml
β -ME	250 μ M
Ascorbinsäure	50 μ g/ml

Die Beladung der Zellen mit den Substanzen erfolgte bei den Konzentrationsversuchen für 24 Stunden. Als Kontrollen dienten Zellen, die nur in Gegenwart von Ascorbinsäure, welche die Zellen für die Kollagensynthese benötigen, kultiviert wurden. Die Zellen wurden mit den folgenden Substanzen in entsprechenden Konzentrationen inkubiert:

Substanz:

Konzentrationen:

15dPGJ ₂	1 μ M, 2 μ M, 5 μ M, 7,5 μ M, 10 μ M
PGD ₂	5 μ M, 7,5 μ M, 10 μ M, 15 μ M
9-cis-Retinsäure	2 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 15 μ M, 25 μ M, 50 μ M
Troglitazon	1 μ M, 2 μ M, 5 μ M, 7,5 μ M, 10 μ M, 25 μ M
Actinomycin	0,01 μ g/ml, 0,05 μ g/ml, 0,1 μ g/ml, 0,2 μ g/ml, 0,5 μ g/ml, 1 μ g/ml, 2 μ g/ml, 10 μ g/ml
Cycloheximid	0,5 μ g/ml, 1 μ g/ml, 5 μ g/ml, 10 μ g/ml, 20 μ g/ml
GW 9662	0,5 μ M, 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 20 μ M

3.3 Molekularbiologische Arbeitsmethoden

3.3.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Gesamt-RNA wurde mit dem RNeasy Mini Kit isoliert, wobei das Herstellerprotokoll leicht modifiziert wurde. Das Kit ermöglicht, Nukleinsäuren mit mehr als 200 bp unter bestimmten Pufferbedingungen, nämlich hohen Salzgehalten, an eine Silikamembran selektiv zu binden. In Puffern mit niedrigen Salzgehalten können diese dann wieder eluiert werden.

Zur Gewinnung der RNA wurde zunächst das Medium der THP-1-Zellen abgesaugt und die Zellen zweimal bei Raumtemperatur mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine dreiminütige Inkubation mit dem Lysepuffer RLT. Für 25 cm²-Kulturfläschchen wurden dabei 700 µl RLT-Puffer verwendet, die mit 7 µl β-Mercaptoethanol versetzt waren. Nach der Inkubation wurden die Zellen vom Boden der Kulturflasche abgekratzt und in Reaktionsgefäße überführt. Die Zellysate wurden zunächst bei -80°C eingefroren.

Zum Auftauen wurden die Proben 10 min bei 37°C inkubiert, so dass alle Pufferbestandteile gelöst wurden. Zum Scheren und Homogenisieren genomischer DNA, wurden die Lysate 10 bis 15 Mal durch eine 20G-Nadel in eine 2-5 ml Spritze aufgezogen. Anschließend wurde die gleiche Menge an 70%igen Ethanol hinzugegeben. Durch diese Zugabe von Ethanol wird die Affinität der RNA-Moleküle zur Silikamembran der Isolierungssäulen gesteigert.

Die Aliquots wurden sukzessiv und vollständig auf die Isolierungssäulen des Kits gegeben und 15s bei 10000 × g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen.

Zur Reinigung der gebundenen Nukleinsäuren wurden 700 µl des Puffers RW1 verwendet, der in zwei Schritten à 350µl durchzentrifugiert wurde. Zwischen diesen beiden Schritten wurde ein DNA-Verdau auf der Säule mit einer RNase-freien DNase vorgenommen. Je Säule wurden 10µl der DNase-Lösung mit 70µl RDD-Puffer verdünnt, direkt auf die Säulemembran gegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgten zwei weitere Waschschrte mit jeweils 500 µl RPE-Puffer, der zuvor laut Herstellerinformation mit der vierfachen Menge Ethanol verdünnt wurde.

Schließlich erfolgte eine Zentrifugation für 2 min bei $10000 \times g$, um letzte Ethanolreste zu entfernen.

Abschließend kamen die Säulen in ein RNase-freies 1,5 ml-Reaktionsgefäß. Die Elution der RNA erfolgte dreimal mit jeweils 30 μ l RNase-freiem Wasser, wobei nach einer jeweils einminütigen Inkubation eine einminütige Zentrifugation bei $10000 \times g$ erfolgte.

3.3.2 Fotometrische Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte fotometrisch in wässriger Lösung in einer Kunststoffküvette. Folgende Formel lag als Berechnungsvorlage zugrunde:

$$\text{RNA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}] = \frac{A_{260\text{nm}} \cdot \text{Verdünnungsfaktor} \cdot \text{XNA-Faktor}}{1000}$$

mit dem XNA-Faktor für:	ssDNA	37,0
	dsDNA	50,0
	RNA	40,0

Der Quotient $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ ergab die Reinheit der Nukleinsäuren und lag bei den verwendeten Proben zwischen 1,8 und 2,0.

3.3.3 Agarosegelelektrophorese

Mit der TAE-Agarosegelelektrophorese wurde die Qualität der isolierten Nukleinsäuren überprüft (25;43). Es besteht eine lineare Beziehung zwischen dem Logarithmus der Gelkonzentration und der elektrophoretischen Mobilität der DNA. In höher konzentrierten Gelen werden dementsprechend kleine DNA-Fragmente besser aufgetrennt als große Fragmente. Zur Kontrolle der Gesamt-RNA wurde ein 0,8%iges Agarosegel gewählt.

Die Agarose wurde laut Tabelle 1 in 1x TAE-Puffer in einer Mikrowelle geschmolzen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2 µl einer 1%igen (w/v) Ethidiumbromidlösung (17). Das Aushärten erfolgte in einem Gelschlitten mit entsprechendem Probenkamm.

Tabelle 1: Konzentrationen von Agarosegelen mit jeweiligen Trennbereichen (19).

Größe der Nukleinsäuren	Menge der verwendeten Agarose
5-60 kp	0,3 % (w/v)
1-20 kp	0,6 % (w/v)
0,8-10 kp	0,7 % (w/v)
0,5-7 kp	0,9 % (w/v)
0,4-6 kp	1,2 % (w/v)
0,2-3 kp	1,5 % (w/v)
0,1-2 kp	2,0 % (w/v)

Es wurden jeweils 0,5 µg einer jeden Probe mit 5x Nukleinsäure-Farbstoff versetzt und mit Aqua ad injectabilia auf ein gut zu handelndes Volumen (ca. 10µl aufgefüllt und auf Eis verwahrt. Die Elektrophorese fand in 1x TAE-Puffer mit etwa 10 V/cm in einer horizontalen Gelelektrophoresekammer statt. Die Nukleinsäurequalität wurde anschließend bei 312 nm im UV-Licht dokumentiert.

50x TAE-Puffer:

Tris-HCl	2M
Eisessig	5,71 % (v/v)
EDTA	50 mM
DEPC	0,05 % (v/v)
	pH 8,3

5x Nukleinsäure-Farbstoff:

Glyzerin	50 % (w/v)
SDS	0,1 % (w/v)
Bromphenolblau	0,05 % (w/v)
Xylencyanol FF	0,05 % (w/v)
Aqua bidest.	DEPC

3.3.4 cDNA-Synthese

In 200 µl-PCR-Reaktionsgefäßen wurden 1 µl Oligo(dT)₁₂₋₁₈-Primer (500ng) und 5 µg Gesamt-RNA mit Aqua ad inj. ad 12,5µl vorgelegt. Nach der Denaturierung (10 min bei 70°C) wurden die Proben für fünf Minuten bei 37°C inkubiert. Alle Inkubationen

erfolgen in einem Thermo-Cycler. Den Samples wurde unmittelbar 7,5µl des vorbereiteten Reaktionsmixes bestehend aus 4µl 5x First-Strand-Puffer, 1mM of each dNTP 20 U RNase-Inhibitor und 200 U M-MuLV-Reverse-Transkriptase zugegeben. Die Reverse Transkription der RNA zur cDNA erfolgte bei 42°C für 60 Minuten und anschließend zehn Minuten bei 70°C zur Inaktivierung der Enzyme. Hiernach wurde der Reaktionsansatz mit 180µl Aqua ad inj. auf insgesamt 200µl zur Herstellung der Gebrauchskonzentration verdünnt. Die Aliquots wurden bis zu deren weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

3.3.5 Echtzeit-RT-PCR

Tabelle 2: Kollagen-Primer für die RT-PCR-Assays.

Kollagen	GenBank- Nummer	Forward Primer	Reverse Primer
Collagen 6A1	NM_001848	GACCTCGGACCTGTTGGGTAC	TACCCCATCTCCCCCTTCAC
Collagen 6A2	NM_058174	CTGCGACAAGCCACAGCAG	GGGCACACGATCTGAGGGT
Collagen 6A3	NM_001848	GAGCAGCTTGACAACATTGCC	GCCAGAGCACTTGCAGG

Tabelle 3: Primer für die Housekeeping-Gene für die RT-PCR-Assays.

Gen	GenBank- Nummer	Forward Primer	Reverse Primer
SRP 14	NM_003134	AGCACTGTGGTGAGCTCCAAG	TCAGCCCATCCATGTTAGCTCTA
GAPDH	NM_002046	CAACAGCGACACCCACTCCT	CACCCTGTTGCTGTAGCCAAA

Durch die Echtzeit-RT-PCR wird die quantitative Erfassung der PCR-Produkte während der PCR möglich. Einerseits kann die Quantifizierung als 5'-Nukleaseassay erfolgen (15), indem die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase zur Entstehung eines Signals genutzt wird. Auf der anderen Seite besteht ebenso die Möglichkeit, die Quantifizierung mit Hilfe von Farbstoffen durchzuführen, die an die DNA-Doppelstränge binden. Als solcher Farbstoff ist SYBR® Green I gut geeignet. Aufgrund seiner hohen Spezifität und Sensitivität für dsDNA ist dieser Farbstoff besser geeignet als beispielsweise Ethidiumbromid. SYBR® Green I ist nicht sequenzspezifisch und wirkt nicht auf die Kinetik der PCR, so dass es gut zur Quantifizierung genutzt werden

kann. Die Bindung an die DNA führt zu einer erhöhten Fluoreszenz im Vergleich zum ungebundenen Farbstoff.

Die Synthese von cDNA erfolgte entsprechend Kapitel 3.3.4 Die Durchführung der Echtzeit-RT-PCR fand auf dem ABI Prism 7900 HT Cycler statt. Die Proben wurden in Duplikaten angesetzt und gemessen, jeweils für die Housekeeping-Gene (SRP14 und GAPDH) und das entsprechende Kandidatengen (COL6A1, COL6A2 und COL6A3). In den Tabellen 2 und 3 sind jeweils die Primer für Kollagen VI als auch für die Housekeeping-Gene aufgeführt. Gleichzeitig wurden PCR-Negativkontrollen ohne cDNA mitgeführt. Die PCR-Proben wurden anschließend in 3%igen (w/v) Agarosegelen und mithilfe der Schmelzkurven auf Nebenprodukte kontrolliert. Zur Auswertung wurde die Sequence Detection System-Software Version 2.2.2 genutzt.

SYBR®-Green-RT-PCR-Mix:

2x SYBR®-Green-RT-PCR-Mastermix	5µl
Primer-Mix (jew. 5µM)	0,4 µl
Template (25ng/µl)	2,5 µl
Aqua ad injectabilia	ad 10 µl

SYBR®-Green-RT-PCR-Profil:

Vorabdenaturierung	95°C	15 min
40 Zyklen:		
Denaturierung	95°C	15 s
Annealing/Extension	60°C	60 s
Anschließend Schmelzpunktanalyse zwischen 60°C und 95°C		

3.3.6 DNA-Sequenzanalyse

Der Sequenzierung der PCR-Produkte liegt die zyklische Sequenzierung zugrunde (33;34). Bei der zyklischen Sequenzierung erfolgt die Amplifikation des Templates mit nur einem Primer, so dass es zu einer linearen Vervielfältigung der Template-DNA kommt, nicht zu einer exponentiellen wie bei der PCR der Fall. Genutzt wird die Methode des Kettenabbruchs mit Didesoxynukleotiden, wie auch bei der

herkömmlichen Sanger-Sequenzierung (33;34). Einziger Unterschied ist, dass vier unterschiedlich markierte Didesoxynukleotide verwendet werden und die vier entsprechenden Reaktionen in einem Ansatz stattfinden. Für die Reaktionen wurde das Big Dye v3.2 Sequencing Kit verwendet. Die Aufreinigung der PCR-Produkte wurde zuvor mit dem MinElute Kit nach Herstellerangaben durchgeführt. Folgende Ansätze wurden benutzt:

Prämix:

Bestandteil des Big Dye v3.1 Sequencing Kit

Sequenziermix-DNA:

DNA	0,1 ng/bp
Primer (2,4µM)	1,0 µl
5x Sequenzierpuffer	3,0µl
Prämix	1,5 µl
HPLC-Wasser	ad 15 µl

Die Sequenzierreaktionen wurden mit nachfolgenden Parametern durchgeführt:

Standardsequenzierungsprofil:

Vorabdenaturierung	96°C	4 min
35 Zyklen:		
Denaturierung	96°C	20 s
Annealing	50°C	10 s
Extension	60°C	2 min
Probenkühlung	4°C	

Die Elution der Sequenzierproben erfolgte im Anschluss zur Aufreinigung nach Herstellerangaben über Sephadex™ G50 Superfine in einer MultiScreen® HV-Platte durch Zentrifugieren bei 2500 × g bei Raumtemperatur.

10 x TTE-Puffer:

Tris-HCl	0,5 M
EDTA	12,5 mM
TAPS	2 M

Ladepuffer :

EDTA	25 mM, pH 8,0
8%ige (w/v)	
Dextranblau	100 µl
Formamid	900 µl

4,25 % (w/v) Sequenziergel :

40 % (w/v) Page Plus	5,3 ml
Harnstoff	18 g
10 x TTE	6 ml
HPLC-Wasser	21,5 ml
TEMED	20 µl
10 % APS (w/v)	300 µl

Die Proben wurden nach der Elution im Vakuum eingeengt, in 4 µl Ladepuffer gelöst und 2 min bei 90°C denaturiert. Entsprechend dem Wasserladeprotokoll der Firma Applied Biosystems wurden 0,5 µl der Proben auf ein 4,25 % (w/v) Sequenziergel aufgetragen. Die Proben wurden im unteren Reservoir mit 1x TTE-Puffer und im oberen Reservoir mit 2x TTE-Puffer in der Elektrophorese getrennt. Dies erfolgte bei 50 W, 3000 V und 30 mA für 18 Stunden bei 45°C. Ein im Gerät integrierter Fluoreszenzdetektor diente zur Detektion. Die Auswertung erfolgte mit der Software 377-96 DNA Sequencer Data Collection v2.5, Auto Assembler v2.1 und Sequencing Analyser v3.2.

3.4 Biochemische Arbeitsmethoden

3.4.1 Aufarbeitung inkubierter THP-1-Makrophagen

Die Beladung der Makrophagen bei den Inkubationsversuchen wurde in Kapitel 3.2.5 beschrieben. Nach der Inkubationszeit von 24 Stunden konnten die Zellen für die nachfolgende Proteintrennung in der SDS-PAGE aufgearbeitet werden. Aus jedem Versuchsansatz wurden hierfür ca. 150-200 µl Medium abpipettiert und anschließend zentrifugiert, um Zelltrümmer etc. aus den Proben zu entfernen. Das restliche Medium

wurde abgesaugt und die Zellen 2x mit PBS gewaschen. Von den zentrifugierten Proben wurden 3x 30 µl Aliquots abpipettiert und mit jeweils 10 µl 4fach-SDS-Proben-Puffer versetzt. Vor dem Einfrieren bzw. vor dem Auftragen auf das Polyacrylamid-Gel wurden die Proben 5 min lang auf 99°C erhitzt, so dass die Denaturierung des zu untersuchenden Kollagen Typ VI in seine einzelnen Ketten gewährleistet werden konnte. Die Lagerung erfolgte bei -20°C, wobei die Proben vor dem Auftragen auf das Gel erneut 5 min auf 99°C erhitzt werden mussten.

Die Zellkulturen wurden letztlich mit jeweils 200 µl HIDE-Lyse-Puffer pro 25 cm² Kulturflasche bzw. pro well einer 6-well-Platte behandelt und für 20 min im Kühlschrank gelagert. Anschließend wurden die Zellen zusammengekratzt und in kleine Eppendorfgefäße pipettiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand abpipettiert und eingefroren. In diesem Schritt wurde das Housekeeping-Protein Tubulin isoliert, das letztlich die Kontrolle für das untersuchte Kollagen Typ VI bei der Proteindetektion darstellt.

4x SDS-Probenpuffer (nach Laemmli)		HIDE-Lyse-Puffer	
Tris	200 mM	50 mM Tris-HCl, pH 8,0	10 ml
SDS	10 %	0,5 % Nonidet P40	1 ml
Glyzerin	33 %	250 mM NaCl	50 ml
β-Mercaptoethanol	16 %	5 mM EDTA	2 ml
Bromphenolblau	0,1 %	50 mM NaF	20 ml
		0,5 mM Na ₃ VO ₄	1 ml
		2 Complete-Tabletten ad	
		200 ml Aqua dest.	

3.4.2 SDS-PAGE

1970 modifizierte Laemmli eine Methode zur Auftrennung von Proteinen, die SDS-PAGE (sodium dodecyl polyacrylamide gel electrophoresis). Die SDS-PAGE ermöglicht eine Proteinauftrennung nach ihrer Größe. Die Proteine werden aufgeköcht sowie mit SDS behandelt, wodurch 2,0 % (w/v) eine Denaturierung erfolgt und eine *random-coil*-Konformation entsteht. Das β-Mercaptoethanol aus dem Puffer sorgt für die Reduktion der Disulfidbrücken. Nach der fünfminütigen Erhitzung auf 99°C wurden

die Proben auf das Polyacrylamide-Gel aufgetragen werden. Das SDS interagiert mit den Proteinen über hydrophobe Wechselwirkungen und löst die dreidimensionale Struktur der Proteine auf. Gleichzeitig erhalten die Proteine eine negative Ladung. Im SDS-haltigen Polyacrylamide-Gel werden die Proteine somit der Größe nach getrennt und nicht entsprechend ihrer natürlichen Ladung.

3.4.2.1 Gelvorbereitung

Nachfolgend ist das Rezept für die zugrunde liegenden Gelzusammensetzungen aufgeführt. Zur Detektion von Kollagen Typ VI wurde 7%ige Gele verwendet, während die Elektrophorese von Tubulin mit 12%igen Gelen erfolgte.

Tabelle 4: Gelrezepturen für die SDS-PAGE. Die angegebenen Mengen sind für zwei Minigele ausreichend.

Substanz	Trenngel				Sammelgel
	7 %	10 %	12,5 %	15 %	4 %
40 % (w/v) Acrylamid/Bis-Lösung	1,75 ml	2.5 ml	3,13 ml	3,75 ml	625 µl
1 M Tris pH 8,8 (Trenngelpuffer)	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	-
1 M Tris pH 6,8 (Sammelgelpuffer)	-	-	-	-	1,25 ml
Aqua dest.	5,6 ml	4,8 ml	4,2 ml	3,6 ml	3,02 ml
10 % (w/v) SDS-Lösung	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	50 µl
10 % (w/v) APS-Lösung	90 µl	90 µl	90 µl	90 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

Das Format der Gele wurde wie folgt gewählt: 8,0 x 7,3 cm; Dicke: 1 mm. Zunächst wurde das Trenngel gemischt, wobei APS und TEMED zuletzt hinzu gegeben wurden. Da das Gel unmittelbar nach Zugabe von TEMED zu polymerisieren beginnt, sollte dieses auch erst kurz vor dem Gießen zugegeben werden. Das Gel wurde zwischen die zuvor mit Ethanol gründlich gereinigten Glasplatten des Mini Protean III-Systems gegossen. Es erwies sich als sinnvoll, das Trenngel bis 2 cm unter die Oberkante der vorderen Glasplatte zu gießen und mit Aqua dest. aufzufüllen, um eine gerade Gelkante

zu erhalten und zu gewährleisten, dass evt. entstandene Luftblasen entweichen können. Nach etwa 30 min war das Trenngel polymerisiert und das Wasser konnte aus der Gelkammer abgegossen werden. Es folgte das Gießen des Sammelgels, das bis unter die Oberkante der Glasplatten gegossen wurde. Der Probenkamm wurde bis zu einer Tiefe von 1,1 cm eingesetzt. Nach ca. 30-45 min konnte der Kamm gerade nach oben herausgezogen werden und Gelreste auf der hinteren Glasplatte unter fließendem Wasser entfernt werden.

3.4.2.2 Elektrophorese

Die ausgehärteten Gele wurden in die Elektrophoresekammer des Bio-Rad Systems eingesetzt, welche dann mit SDS-PAGE-Laufpuffer gefüllt wurde. Der innere Bereich der Elektrophoresekammer wurde komplett gefüllt, während der äußere Bereich zu etwa einem Viertel gefüllt wurde. Als Proteinstandard wurde für Kollagen Typ VI der Fermentas Page Ruler Plus #SM1819 verwendet, für Tubulin VI der Fermentas Page Ruler #SM0671. Die Proben wurden wie beschrieben vorbereitet (s. Kapitel 3.4.1.). 30 µl der Probe wurden mithilfe einer Mikroliterspritze direkt in die Taschen des Gels eingetragen. Bei Tubulin-Proben wurden jeweils 15 µl aufgetragen. Vom Proteinstandard wurden immer 10 µl auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte üblicherweise bei 140 V für 90 min bei Raumtemperatur.

5x SDS-PAGE-Laufpuffer:

Tris-HCl	15 g/l
Glycin	72 g/l
SDS	5 g/l
→ pH 8,3	

3.4.3 Western-Blot

Nach der Elektrophorese wurden die Gele vorsichtig von den Glasplatten der Elektrophoresevorrichtung entfernt und mit destilliertem Wasser abgespült. Anschließend wurden sie für 10-15 min im Transferpuffer geschwenkt, um das SDS weitestgehend zu entfernen. Der Transferpuffer wurde für jeden Blot frisch angefertigt.

Zunächst wurde eine kleine Plastikwanne mit dem Transferpuffer gefüllt und für jedes Gel eine Lochplatte, mit der schwarzen Seite nach unten, in die Wanne gelegt. Pro Gel wurden jeweils zwei Blotschwämme und zwei Whatmanpapiere im Transferpuffer getränkt. Eine auf die Größe der Gele zugeschnittene PVDF-Membran wurde in Methanol aktiviert, um sie benetzbar zu machen, und anschließend im Transferpuffer abgespült. Auf die Lochplatte wurde dann zunächst ein Blotschwamm, gefolgt von einem Whatman-Papier, gelegt. Um bei jedem Blot dasselbe Verfahrensschema zu wahren, wurde das Gel in der Form auf das Whatman-Papier gelegt, dass sich der Proteinstandard links befand. Die aktivierte und gespülte PVDF-Membran wurde dann auf das Gel gelegt und als Markierung an der rechten oberen Ecke eingeschnitten. Dies ermöglichte immer die Lokalisation der Position von Proben und Standard, als auch die Lokalisation der proteintragenden Seite der Membran. Dementsprechend befand sich auf der proteintragenden Seite nach dem Transfer der Standard immer rechts auf der Membran und die abgeschnittene Ecke oben links. Um ein blasenfreies Aufliegen der PVDF-Membran auf dem Gel zu gewährleisten wurde mit Transferpuffer nachgespült, um letzte Luftblasen aus dem Zwischenraum zu entfernen. Auf die Membran legte man dann ein weiteres Whatman-Papier und einen weiteren Blotschwamm, die beide zuvor in Transferpuffer getränkt wurden. Der transparente Teil der Lochplatte konnte nun übergeklappt werden und mit der schwarzen Lochplatte zu einem „Sandwich“ verschlossen werden. Jeweils zwei Sandwiches fanden in einem Blotrahmen Platz. Der Blotrahmen wurde gemeinsam mit einem Kühlblock in die Blotapparatur eingespannt. Zusätzlich wurde ein Rührfischchen in die Kammer gelegt und anschließend wurde die Kammer, samt Blotrahmen, Kühlblock und Rührfischchen, komplett mit Transferpuffer aufgefüllt. Der Transfer erfolgte auf einem Magnetrührer für 960 min bei 40 V im Kühlraum bei 4°C oder bei 100 V für 1 Stunde bei Raumtemperatur.

Transferpuffer:

Glycin	11,52 g
Tris	2,42 g
Methanol	140 ml
ad 800 ml mit Aqua dest.	

3.4.4 Immundetektion

Die Blotvorrichtung wurde nach dem Blot abgebaut und die PVDF-Membran mit der Proteinseite, die dem Gel auflag, nach oben in Methanol getränkt. Dies geschah, um die Proteine auf der Membran zu fixieren. Auf einem Whatman-Papier wurde die Membran getrocknet und konnte dann mit einem weichen Bleistift beschriftet werden. Zum Blocken wurde die trockene Membran wieder durch Methanol benetzbar gemacht, in PBS gewaschen und in 5%iger Milch eine Stunde bei Raumtemperatur auf einem Schwenktisch oder alternativ über Nacht bei 4°C geblockt. Die restliche Milch wurde 1:10 mit PBS verdünnt. Zur Herstellung des Waschpuffers wurde 5%ige Milchlösung mit dem halben Volumen in µl Tween®20 versetzt. Beispielsweise wurden zu 400 ml der 0,5%igen Milchlösung 200 µl Tween®20 gegeben. Der Primärantikörper wurde entsprechend der nachfolgenden Tabelle mit 5%iger Milch (ohne Tween) verdünnt.

Tabelle 5: Verwendete Antikörperverdünnungen.

Antikörper	Verdünnung	Herkunft
Primär-AK		
Antikollagen-Typ-VI → Anti-Rabbit	1:2500	Maus
Antitubulin-VI → Anti-Mouse	1:1000	Kaninchen
Sekundär-AK		
Rabbit-HRP für Kollagen Typ VI	1:100000	Maus
Mouse-HRP für Tubulin V	1:5000	Kaninchen

Vor der Inkubation mit dem Primärantikörper wurden Milchreste kurz mit PBS abgewaschen. Bei der Detektion von Kollagen Typ VI wurde die Membran eine Stunde auf einem Schwenktisch bei Raumtemperatur hybridisiert. Die Inkubation mit Tubulinantikörpern erfolgte in einem Hybridisierungsofen für eine Stunde bei 37°C, wobei 1 ml der Antikörperlösung auf die Membran geträufelt und mit einer Paraffinmembran überdeckt wurde. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgten drei Waschungen für jeweils 10 min mit Waschpuffer, welcher nie direkt auf die Membran gegossen wurde. Nach dem Waschen erfolgte die Inkubation mit den entsprechenden

Sekundärantikörpern für eine Stunde gemäß der in Tabelle 5 angegebenen Verdünnung. Nach der Hybridisierung mit Maus-Antikörpern wurde dreimal, bei Kaninchen-Antikörpern viermal für jeweils 10 Minuten gewaschen. Für die Detektion wurde die Membran mit der Unterseite auf eine Frischhaltefolie gelegt und mit dem Detektionssubstrat beträufelt. Hierfür wurden 1000 µl einer 1:1 Mischung der beiden Bestandteile des Super-Signal-West-Femto Substrates auf die Membran getropft (ca. 10µl/cm²), die mit der Lösung drei min inkubiert wurde. Sollte Tubulin detektiert werden, wurde ECL als Substrat gewählt, wobei das Verhältnis von Reagenz A zu Reagenz B des Lumigen PS-3 detection Reagent 1000 µl : 25 µl betrug. Die Membran wurde 3 min mit der Lösung inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Substrat von der Membran abgetropft und mit einem frischen Stück Frischhaltefolie überdeckt. Die so laminierte Membran wurde in eine Filmkassette geklebt und unmittelbar mittels Röntgenfilmen detektiert. Erfahrungsgemäß dauerte die Belichtung zwischen 30 s und 2 min. Bei sehr schwachen Signalen wurde der Film über Nacht aufgelegt. Nach der Entwicklung wurde die Position des Films sowie der Proteinstandard mit einem wasserfesten Stift auf dem Film markiert, um eine Zuordnung der Banden zu ermöglichen.

4 Ergebnisse

Makrophagen spielen in der Atherogenese eine wichtige Rolle. Neben ihrer Neigung durch unkontrollierte Aufnahme modifizierter LDL zu Schaumzellen zu transformieren und so zur Entstehung von Lipidablagerungen in der Arterienwand beizutragen, wirken sie abhängig vom Aktivierungszustand inflammatorisch oder antiinflammatorisch. Der alternative Aktivierungstyp der Makrophagen stellt den antiinflammatorischen Phänotyp dar, welcher sich durch proliferative Effekte, wie z. B. die Sekretion von proliferativ wirkenden und die Produktion von ECM stimulierenden Zytokinen, auszeichnet. Kürzliche Arbeiten haben gezeigt, dass Makrophagen – insbesondere unter Bedingungen der alternativen Aktivierung und der Deaktivierung – Typ VI Kollagen vermehrt sezernieren (3). Es sollte daher im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden, wie die Expression von Typ VI Kollagen in Makrophagen durch andere Modulatoren der Makrophagenaktivierung reguliert wird. Als Zellkulturmodell dienten humane THP-1-Makrophagen, die zuvor durch eine 96stündige Inkubation mit Phorbolestern von Monozyten zu Makrophagen differenziert wurden. Die Wirkung der verwendeten Substanzen wurde entweder auf RNA-Ebene mittels Echtzeit-RT-PCR oder auf Ebene der Proteinsekretion mittels Western-Blot untersucht.

4.1 Regulation der Expression der COL6A3-mRNA durch 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J₂

15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J₂ (15dPGJ₂) ist ein Gewebshormon, welches im Körper direkt aus freier Arachidonsäure oder aus der aus den Lysophospholipiden freigesetzten Arachidonsäure synthetisiert wird. Hierbei ist die Cyclooxygenase das entscheidende Enzym für die Synthese der Vorstufe Prostaglandin D₂, welches nicht enzymatisch zu 15dPGJ₂ dehydriert wird. Eine wichtige Rolle spielt 15dPGJ₂ bei Allergien, der Regulation von entzündlichen Prozessen sowie der Temperaturregulation bei Fieber. 15dPGJ₂ ist ein endogener, natürlicher Ligand von PPAR γ und aktiviert dementsprechend gemeinsam mit 9-*cis*-Retinsäure (9cRA) das PPAR γ /RXR-Heterodimer. Neben der PPAR γ -abhängigen Wirkung, kann 15dPGJ₂ auch PPAR γ -unabhängige Wirkungen entfalten. Dies erfolgt beispielsweise durch aktivierende aber

auch inhibierende Einflüsse auf MAPK, die im Zusammenhang mit oxidativem Stress stehen, wie z. B. ERK oder p38 oder der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS = „*reactive oxygen species*“) (10;38). Ein weiteres Beispiel für eine PPAR γ -unabhängige Wirkung ist die Inhibition des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NF κ B und der damit in Verbindung stehenden Signaltransduktionskaskade (10;44). Die genauen Mechanismen sowie die genaue Unterscheidung zu PPAR γ -abhängigen Prozessen ist allerdings noch wenig verstanden.

Für die Analyse der mRNA-Expression wurden THP-1-Zellen in 25 cm²-Flaschen wie in Kapitel 3.2.3.4 erläutert ausdifferenziert und für 24 h mit den in Abbildung 1 angegebenen Konzentrationen an 15dPGJ2 inkubiert. Anschließend erfolgte die Aufarbeitung wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben. Die Expression der Typ VI Kollagen- α 3 (COL6A3)- und RPL37A-mRNA (*Housekeeping-Gen*) wurde mittels Echtzeit-RT-PCR analysiert (vgl. Kapitel 3.3.5). Obwohl Kollagen Typ VI aus drei unterschiedlichen mRNAs gebildet wird, wurde der Fokus bei den Untersuchungen besonders auf die COL6A3-mRNA gesetzt, da die α 3-Kette limitierend für die Bildung des Typ VI Kollagen-Heterotrimers ist. 15dPGJ2 senkte die Expression von COL6A3 signifikant und konzentrationsabhängig (Abbildung 1).

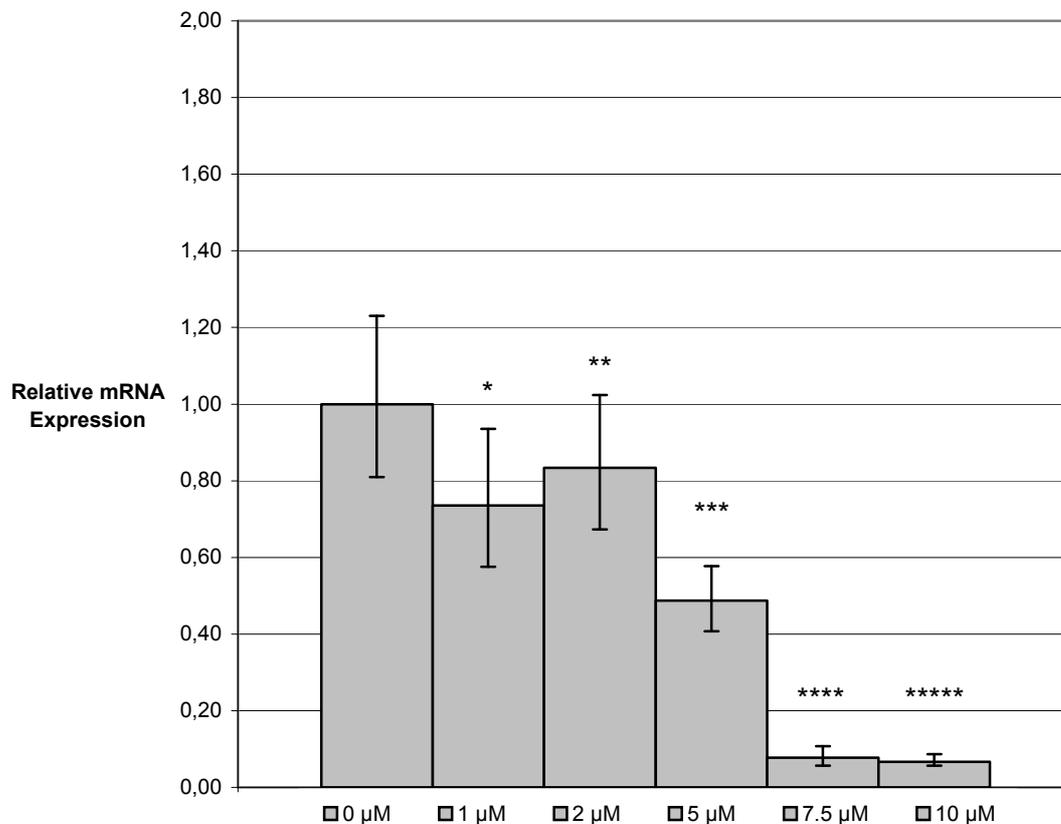


Abbildung 1: Analyse der Expression der COL6A3-mRNA in Abhängigkeit von der 15dPGJ2-Konzentration mittels Echtzeit-PCR. Es waren signifikante Veränderungen zu beobachten (relative Änderungen von 0,7 bei 1 μM, 0,8 bei 2 μM, 0,5 bei 5 μM, 0,1 bei 7,5 μM und 0,1 bei 10 μM). *, $p < 0,05$; **, $p < 0,2$; ***, $p < 0,01$; ****, $p < 0,01$; ***** , $p < 0,0$. Die Expression der COL6A3-mRNA wurde mittels der Expression des *Housekeeping*-Gens RPL37A normiert.

Wie in Abb.1 dargestellt, zeigte die Analyse der mRNA-Synthese von COL6A3 eine verminderte Expression mit steigender Konzentration an 15dPGJ2. Während auf der Abszisse die jeweiligen 15dPGJ2-Konzentrationen aufgetragen sind, zeigt die Ordinate die relativen mRNA-Level an. Die Kontrolle mit einer Konzentration von 0 μM 15dPGJ2 wurde als Bezugswert verwendet und auf den Wert 1,0 gesetzt. Bereits bei den Anfangskonzentrationen von 1 μM und 2 μM sanken die COL6A3-mRNA-Spiegel auf relative Werte von etwa 0,8. 5μM 15dPGJ2 bewirkten eine Erniedrigung der COL6A3-mRNA-Expression auf einen relativen Wert von 0,5. Bei den verwendeten Höchstkonzentrationen 7,5 μM und 10 μM 15dPGJ2 konnte eine noch stärkere

Reduktion der COL6A3-mRNA-Synthese festgestellt werden. Die COL6A3-mRNA-Expression sank bei diesen Konzentrationen auf relative Werte von 0,08 und 0,07. Als Kontrolle wurde die Expression des *Houskeeping*-Gens RPL37A analysiert (Abbildung 2). Die Expression der RPL37A-mRNA zeigte keine signifikanten Veränderungen unter dem Einfluss von 15dPGJ2 (1,2 bei 1 μ M, 1,1 bei 2 und 5 μ M, 1,0 für 7,5 μ M und 0,8 für 10 μ M 15dPGJ2).

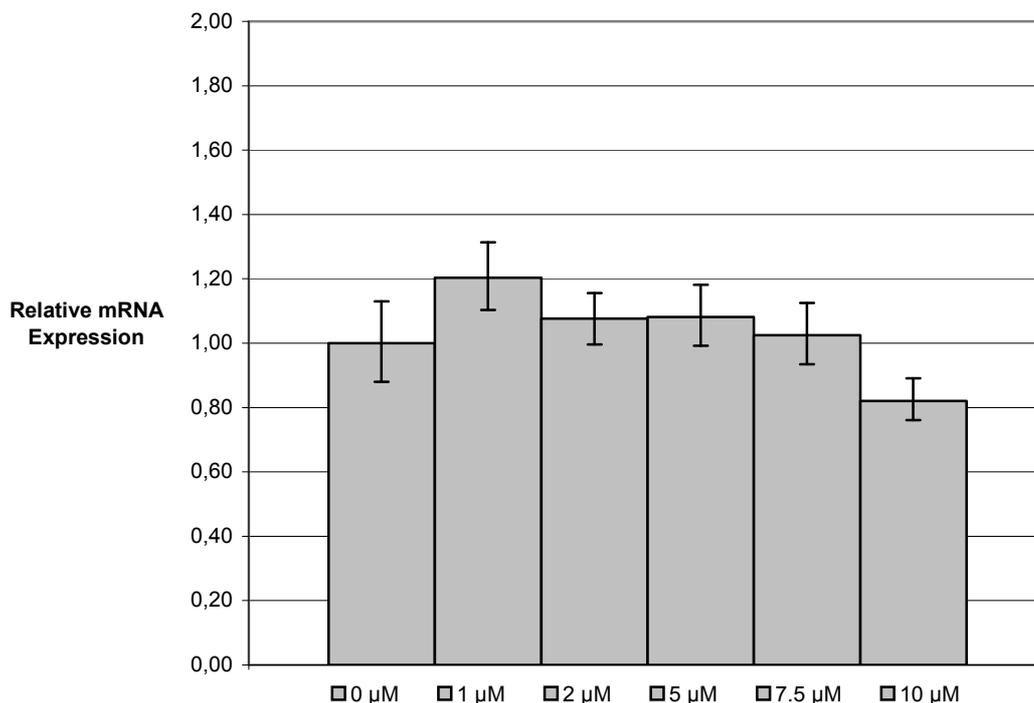


Abbildung 2: Nachweis der Expression der RPL37A-mRNA in THP-1-Makrophagen in Abhängigkeit von der eingesetzten 15dPGJ2-Konzentration. Die Analyse der Expression ergab keine signifikanten Veränderungen (relative Änderungen von 1,2 bei 1 μ M, 1,1 bei 2 μ M, 1,1 bei 5 μ M, 1,0 bei 7,5 μ M und 0,8 bei 10 μ M).

Da das Typ VI-Kollagen von drei verschiedenen Genen exprimiert wird, wurde auch der Einfluss von 15dPGJ2 auf die Expression der COL6A1- und der COL6A2-mRNA in THP-1-Makrophagen untersucht. Die Abbildungen 3 und 4 zeigen die auf die Expression der auf RPL37A-mRNA normierten mRNA-Expression der α 1-Kette (COL6A1) und α 2-Kette (COL6A2) von Typ VI Kollagen. Die Expression der RPL37A-mRNA ist wie zuvor erwähnt in Abbildung 2 dargestellt.

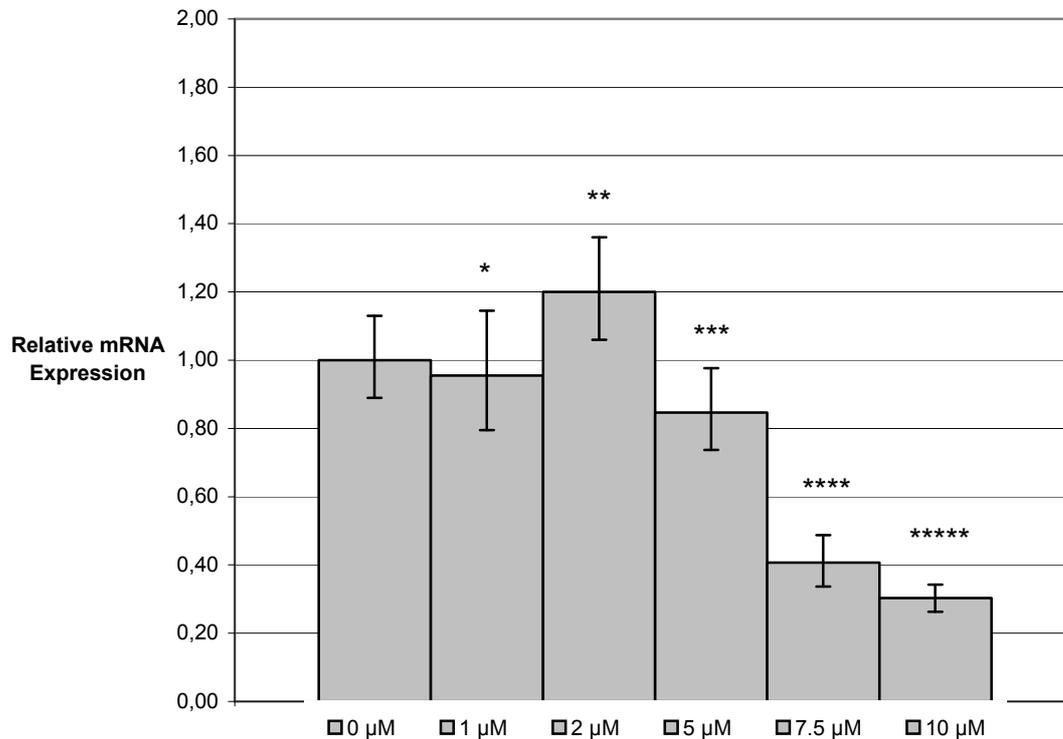


Abbildung 3: Einfluss von 15dPGJ2 auf die Expression der COL6A1-mRNA. Die Expression von COL6A1 wurde auf die Expression von RPL37A normiert. Die Expression wies signifikante Veränderungen auf (relative Änderungen von 0,9 bei 1 µM, 1,2 bei 2 µM, 0,9 bei 5 µM, 0,4 bei 7,5 µM und 0,3 bei 10 µM). *, $p < 0,8$; **, $p < 0,02$; ***, $p < 0,2$; ****, $p < 0,004$; *****, $p < 0,001$.

Die Expression von COL6A1 zeigte ebenfalls eine signifikante Reduktion mit steigender 15dPGJ2-Konzentration. Bei einer Konzentration von 7,5 µM sank die Expression auf 41 %. Die Höchstkonzentration von 10 µM bewirkte eine Reduktion der COL6A1-mRNA Expression auf etwa 30%. Die Analyse der $\alpha 2$ -Kette des Typ VI Kollagens ergab keine signifikante Änderung der mRNA-Expression. Die $\alpha 3$ -Kette stellt die für die Proteinheterotrimerbildung limitierende Kette dar. Da es zu signifikanten Veränderungen der COL6A1- und COL6A3-mRNA-Synthese kam, ist vermutlich als Folge auch die Entstehung des Typ VI-Kollagenproteins signifikant reduziert (s. Kapitel 4.2).

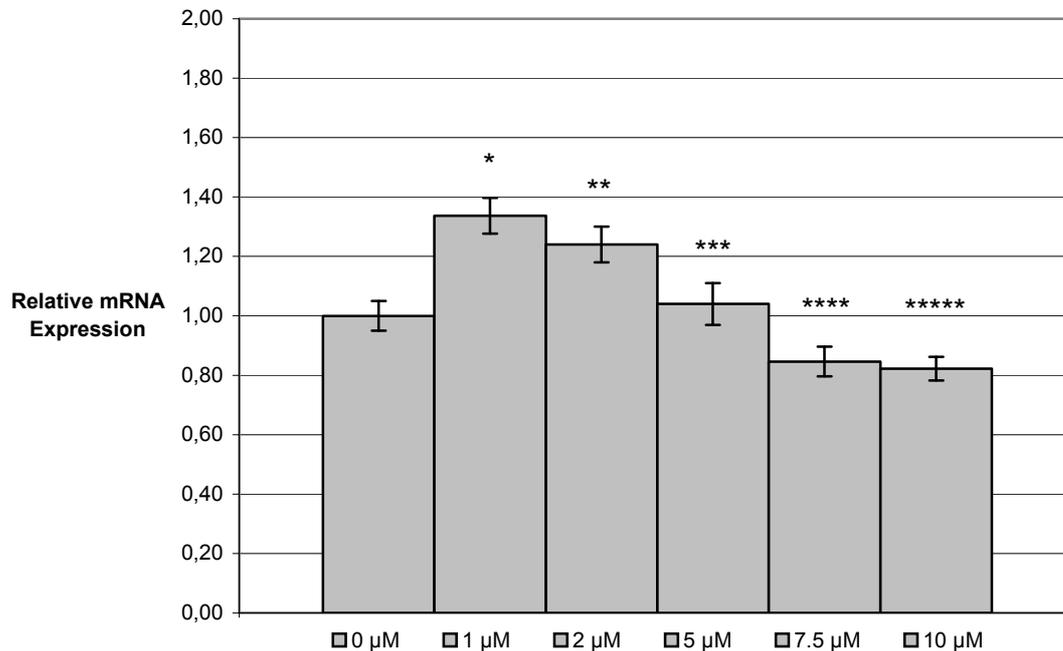


Abbildung 4: Analyse der Expression von COL6A2-mRNA in Abhängigkeit von der 15dPGJ2-Konzentration im Kulturüberstand. Die Expression ergab keine signifikanten Veränderungen (relative Änderungen von 1,3 bei 1 µM, 1,2 bei 2 µM, 1,0 bei 5 µM, 0,9 bei 7,5 µM und 0,8 bei 10 µM). *, $p < 0,002$; **, $p < 0,03$; ***, $p < 0,6$; ****, $p < 0,07$; *****, $p < 0,02$.

4.2 Regulation der Sekretion von Typ VI Kollagen durch 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J₂

Zur Analyse des Einflusses von 15dPGJ2 auf die Sekretion von Typ VI Kollagen mittels Western-Blot wurden THP-1-Monozyten für vier Tage bei 37°C auf 6well-Platten ausdifferenziert (siehe Kapitel 3.2.3.4). Anschließend erfolgte die Inkubation der THP-1-Makrophagen mit verschiedenen Konzentrationen an 15dPGJ2 für 24 Stunden. Die Aufarbeitung der Proben und die Analyse von Typ VI Kollagen im Kulturüberstand mittels Western-Blot erfolgten wie in Kapitel 3.4 beschrieben. Abbildung 5 zeigt den Einfluss von 15dPGJ2 auf die $\alpha 3$ -Kette des Typ VI Kollagens sowie auf das Referenzprotein $\alpha 1$ -Tubulin nach 24stündiger Inkubation. $\alpha 1$ -Tubulin diente als Lade- und Vitalitätskontrolle.

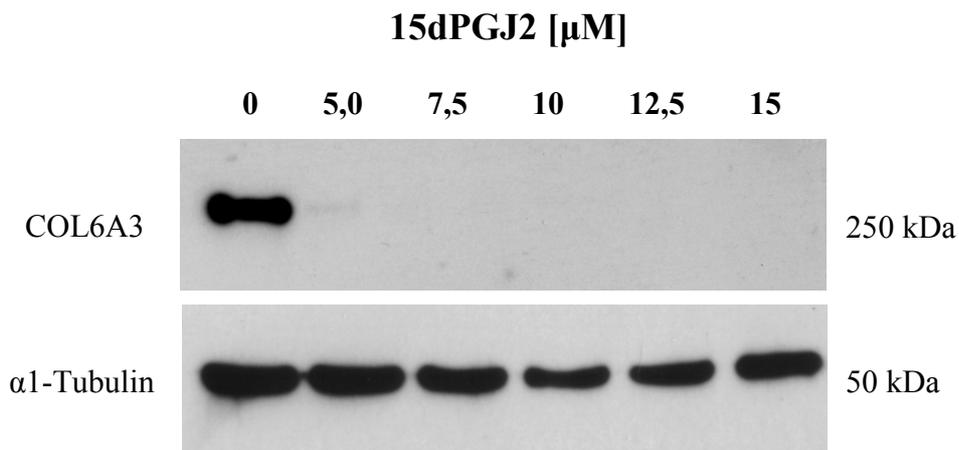


Abbildung 5: Western-Blot-Analyse von Typ VI Kollagen in den Zellkulturüberständen und α 1-Tubulin in den entsprechenden Zelllysaten von THP-1-Makrophagen unter dem Einfluss von 15dPGJ2. Da der anti-Typ VI Kollagen-Antikörper nahezu ausschließlich die α 3-Kette von Typ VI Kollagen detektiert, konnten die α 1- und α 2-Kette nicht detektiert werden.

Wie in Abbildung 5 gezeigt ist, senkt 15dPGJ2 die sezernierte Menge an Typ VI Kollagen, während die Expression von α 1-Tubulin in den Zellen weitgehend unverändert bleibt. Die Makrophagen reagieren bereits bei der niedrigsten Konzentration von 5 μ M. Im Vergleich zur Kontrolle, bei der die sezernierte Menge an Typ VI Kollagen durch eine deutliche Bande im Western Blot zu erkennen ist, ist sie bei 5 μ M in diesem Blot nicht mehr detektierbar. Eine Bande kann im Blot nur erahnt werden. Der entsprechende Blot des *Housekeeping*-Gens α 1-Tubulin zeigt bei höheren Konzentrationen einen geringen Rückgang im α 1-Tubulin-Gehalt. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass 15dPGJ2 die Zellen ab Konzentrationen von 10 μ M nachhaltig schädigen kann und zur Apoptose der Zellen führt.

4.3 Regulation der Sekretion von Typ VI Kollagen durch Prostaglandin D₂

Prostaglandin D₂ (PGD₂) ist eine Vorstufe, aus der nach nicht enzymatischen Dehydratationen in Makrophagen 15dPGJ2 entsteht. Daher sollte PGD₂ ähnliche Effekte auf die Sekretion von Typ VI Kollagen haben wie 15dPGJ2. Die Proben der mit

verschiedenen Konzentrationen PGD2 für 24 Stunden inkubierten Makrophagen wurden wie oben beschrieben aufgearbeitet und analysiert. Ähnlich wie 15dPGJ2 reguliert auch PGD2 die in den Zellkulturüberstand der Makrophagen sezernierte Menge an Typ VI Kollagen herab (Abbildung 6). Allerdings fällt die Regulation nicht so stark wie beim 15dPGJ2 ab. Die Western-Blot-Analyse des α 1-Tubulins zeigt nur eine geringe Erniedrigung, so dass eine zytotoxische Wirkung des PGD2 weitgehend ausgeschlossen werden kann.

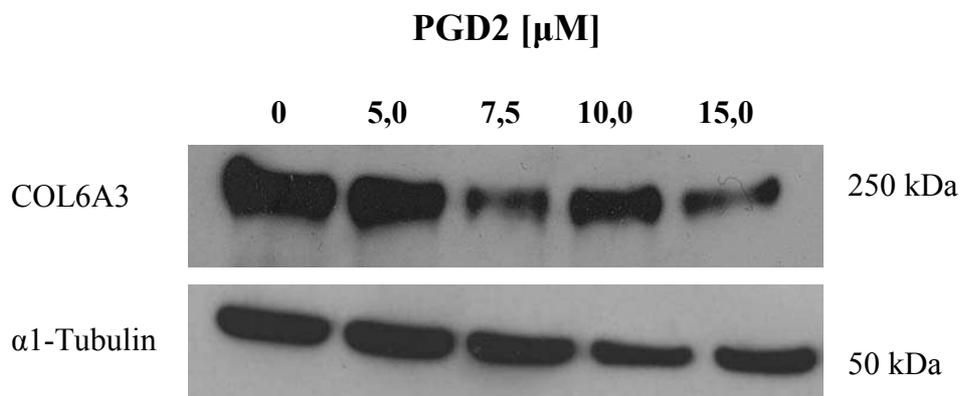


Abbildung 6: Western-Blot-Analyse von Typ VI Kollagen in den Zellkulturüberständen von THP-1-Makrophagen und α 1-Tubulin in den entsprechenden Zelllysaten unter dem Einfluss von PGD2.

4.4 Die Regulation der Sekretion von Kollagen Typ VI durch Troglitazon

Glitazone sind synthetische Liganden des nukleären Rezeptors PPAR γ und kommen in der Medizin bei der Behandlung von Diabetes mellitus Typ II zum Einsatz. Ihre Wirkung besteht in der Verbesserung der Insulinwirkung an Muskulatur, Leber und Fettgewebe (s. Kapitel 1.6.2). Das in den Versuchsreihen verwendete Troglitazon wurde aufgrund seiner Hepatotoxizität für den pharmakologischen Gebrauch vom Markt genommen.

Die Analyse der Regulation von Typ VI Kollagen durch Troglitazon erfolgte mittels Western-Blot aus dem Zellkulturüberstand von ausdifferenzierten und für 24 h mit

verschiedenen Konzentrationen an Troglitazon inkubierten THP-1-Makrophagen (s. Kapitel 3.4.3, 3.2.3.4 und 3.4). Abbildung 7 zeigt den Einfluss von Troglitazon in den entsprechenden Konzentrationen auf die Sekretion der $\alpha 3$ -Kette des Kollagen Typ VI sowie auf das Referenzprotein $\alpha 1$ -Tubulin im Zelllysat.

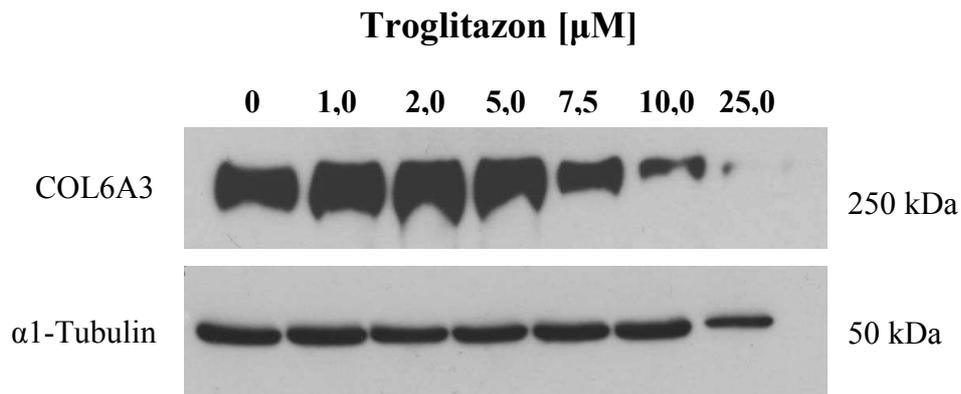


Abbildung 7: Western-Blot-Analyse von Typ VI Kollagen in den Zellkulturüberständen von THP-1-Makrophagen und $\alpha 1$ -Tubulin in den entsprechenden Zelllysaten unter dem Einfluss von Troglitazon.

Troglitazon senkt die Sekretion von Kollagen Typ VI konzentrationsabhängig. Die Wirkung zeigt sich erst bei den höheren Konzentrationen der Versuchsreihe. Die Konzentrationen 1, 2 und 5 μM zeigen zunächst einen unerwarteten leichten Anstieg in der Bandenintensität im Vergleich zur Kontrollbande. Der Einfluss von 7,5 μM Troglitazon zeigt jedoch eine deutliche Reduktion der Typ VI Kollagen-Sekretion im Vergleich zur Kontrolle. Die Banden bei den hohen Konzentration 10 und 25 μM sind noch deutlich geringer als die der Kontrolle. Im Vergleich dazu zeigt die Western-Blot-Analyse von $\alpha 1$ -Tubulin nur bei der höchsten Konzentration an Troglitazon eine Erniedrigung. Es ist möglich, dass Troglitazon bei hohen Konzentrationen toxische Wirkung auf die Zellen hat.

4.5 Regulation der Sekretion von Typ VI Kollagen durch 9cRA

9cRA ist ein Metabolit des Vitamin A-Stoffwechsels, welches im Organismus unterschiedliche Wirkungen erfüllt, beispielsweise wurden Effekte von 9cRA in Bezug auf das Auge und die Entwicklung des ZNS (39) beschrieben oder in Bezug auf die Induktion von Cyclooxygenase und somit die Prostaglandin- und Thromboxan-Synthese (41). 9cRA stellt einen Liganden des RXR (49) dar und wirkt daher agonistisch auf die Bildung des PPAR γ /RXR-Heterodimers. Es aktiviert somit durch dieses Heterodimer die Genexpressionsregulation. Dementsprechend ist zu erwarten, dass die Effekte, die bei den PPAR γ -Agonisten zu beobachten sind, auch beim Liganden des Heterodimerisierungspartners RXR zu beobachten sind. Eine Kombination von 15dPGJ2 und 9cRA sollte die Effekte verstärken (s. Kapitel 4.6.1).

Aus diesem Grund wurde die Wirkung von 9cRA auf die Sekretion von Typ VI Kollagen durch Makrophagen mittels Western-Blot untersucht. Die THP1-Monozyten wurden gemäß Kapitel 3.2.3.4 für vier Tage bei 37°C ausdifferenziert. Die Inkubation der Makrophagen erfolgte für 24 Stunden mit den in Abb. 7 aufgeführten Konzentrationen. Anschließend erfolgte die Aufarbeitung der Zellen sowie die Analyse des Typ VI Kollagens aus dem Kulturüberstand wie in Kapitel 3.4.3 beschrieben.

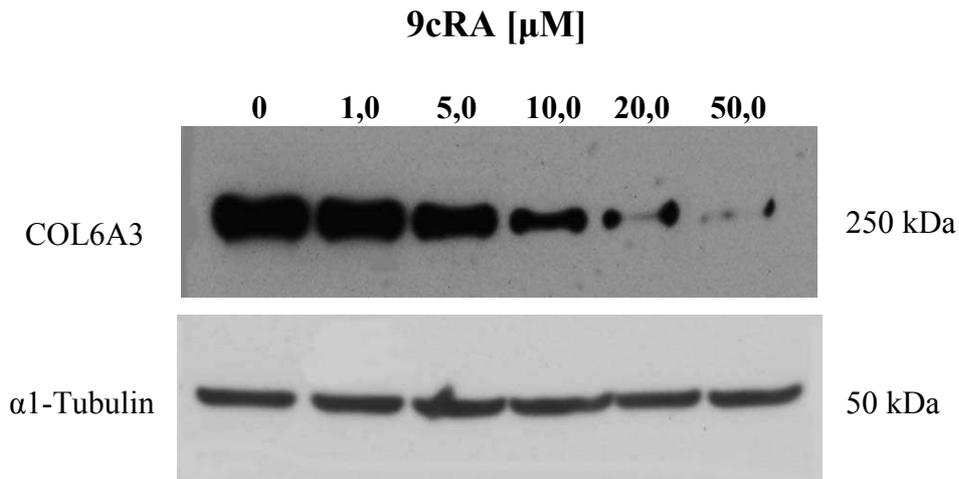


Abbildung 8: Western-Blot-Analyse von Typ VI Kollagen in den Zellkulturüberständen von THP-1-Makrophagen und α 1-Tubulin in den entsprechenden Zelllysaten unter dem Einfluss von 9cRA.

Die deutliche konzentrationsabhängige Regulation der Sekretion von Typ VI Kollagen durch 9cRA kann anhand von Abb. 8 nachvollzogen werden. Bei den Anfangskonzentrationen 1 und 5 μ M lässt sich bereits eine leichte Abnahme der Sekretion erkennen. Ab einer Konzentration von 10 μ M ist eine deutliche Senkung der Sekretion zu verzeichnen. Bei 20 und 50 μ M sind im Western-Blot nur noch schwache Banden erkennbar. Die Sekretion von α 1-Tubulin unterliegt keiner Regulation durch 9cRA, wie in Abb.8 zu sehen ist. Die Banden zeigen im Vergleich zur Kontrollbande keine Veränderungen.

4.6 Regulation der Sekretion von Kollagen Typ VI durch Aktivierung des PPAR γ /RXR-Heterodimers

Um Aufschluss über die genauen Mechanismen der Regulation der Sekretion von Typ VI Kollagen zu erhalten, wurden Versuche mit verschiedenen Konzentrationen der kombinierten Substanzen durchgeführt. Dies geschah vor allen Dingen, um die Abhängigkeit der Regulation von PPAR γ zu demonstrieren. Wie bereits in den vorangegangenen Kapiteln erwähnt wurde, führt der Einsatz von PPAR γ -Agonisten als auch von RXR-Agonisten zu einer Reduktion der Sekretion von Typ VI Kollagen. Bei den eingesetzten PPAR γ -Agonisten handelt es sich um die bereits beschriebenen

Substanzen 15dPGJ2 und Troglitazon. Das 15dPGJ2 stellt den natürlichen Agonisten für PPAR γ dar, während das Troglitazon ein synthetisch hergestellter Agonist ist. Als Agonist für RXR, welcher nach Aktivierung durch seinen Liganden ein Heterodimer mit PPAR γ bildet (siehe Kapitel 1.6.1), wurde 9cRA eingesetzt. Durch die gleichzeitige Inkubation mit dem PPAR γ - und dem RXR-Agonisten sollte herausgefunden werden, ob sie die beobachteten Wirkungen der Einzelsubstanzen verstärken. Dies deutete daraufhin, dass die regulatorische Wirkung der drei Substanzen durch den PPAR/RXR-Regulationsweg vermittelt wird.

4.6.1 Wirkung der Kombination von 15dPGJ2 und 9cRA auf die Sekretion von Typ VI Kollagen

Die Analyse des Einflusses der Substanzkombination erfolgte mittels Western-Blot aus dem Zellkulturüberstand von inkubierten THP-1-Makrophagen (s. Kapitel 3.4.3, 3.2.3.4 und 3.4). In Abbildung 9 sind der Einfluss der Kombination von 15dPGJ2 und 9cRA auf die Sekretion von Typ VI Kollagen sowie das nicht beeinflusste Referenzprotein α 1-Tubulin abgebildet.

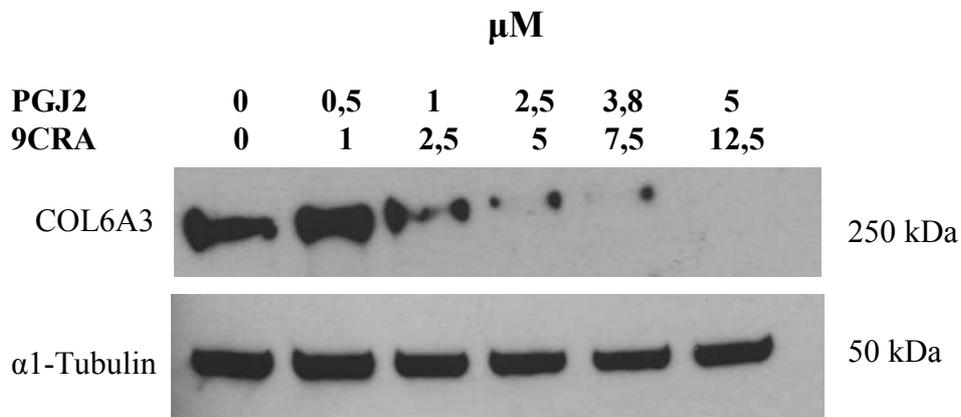


Abbildung 9: Western-Blot-Analyse von Typ VI Kollagen in den Zellkulturüberständen von THP-1-Makrophagen und α 1-Tubulin in den entsprechenden Zelllysaten unter dem Einfluss von 15dPGJ2 und 15dPGJ2 in Kombination mit 9cRA.

Aufgrund der starken Regulation durch 15dPGJ2 (s. Abbildung 5) und einer zu erwartenden höheren Zytotoxizität der kombinierten Substanzen im Vergleich zur

Einzelsubstanzinkubation wurden die Konzentrationen für den Kombinationsversuch niedriger gewählt. Die erste Konzentrationskombination zeigt keine oder zumindest nur eine sehr geringe Regulation im Vergleich zur Kontrollbande. Bei Inkubation mit 1 μM 15dPGJ2 und 2,5 μM 9cRA ist jedoch bereits eine deutlichere Abnahme der Bandenintensität verglichen mit der Kontrollbande zu sehen. Ab den Konzentrationen von 2,5 μM 15dPGJ2 und 5 μM 9cRA ist eine nahezu vollständige Inhibierung der Sekretion zu verzeichnen. 9cRA zeigt im Konzentrationsversuch ab einer Konzentration von 5 μM eine deutliche Regulation im Vergleich zur Kontrollbande (s. Abbildung 7). Diese fällt allerdings nicht so deutlich aus, wie es in Kombination mit 2,5 μM 15dPGJ2 der Fall ist. Bei Inkubation mit 3,8 μM 15dPGJ2 und 7,5 μM 9cRA ist ebenfalls nahezu keine Bande mehr zu erkennen, während bei den Höchstkonzentrationen von 5 μM 15dPGJ mit 12,5 μM 9cRA keine Bande mehr zu erkennen ist. Die Sekretion ist massiv reduziert. Die Banden des Referenzproteins α 1-Tubulin zeigen sich hingegen unverändert. Eine Veränderung des Sekretionsverhaltens aufgrund toxischer Wirkung der Wirkstoffkombination kann somit ausgeschlossen werden.

4.6.2 Wirkung der Kombination von Troglitazon und 9cRA auf die Sekretion von Typ VI Kollagen

Die Analyse der Beeinflussung der Sekretion von Kollagen Typ VI durch die Kombination von Troglitazon und 9cRA erfolgte ebenfalls mittels Western-Blot aus dem Zellkulturüberstand von inkubierten THP-1-Makrophagen (s. Kapitel 3.4.3, 3.2.3.4 und 3.4 bzgl. der Versuchsbedingungen und Probenaufarbeitung). Abbildung 10 zeigt die Ergebnisse.

Die beiden niedrigsten Konzentrationskombinationen zeigen keine bzw. nur geringe Veränderungen des Bandenmusters verglichen mit der Kontrollbande. Die Kombination ab der Konzentration von 2,5 μM Troglitazon in Kombination mit 5 μM 9cRA ist jedoch eine nahezu vollständig unterbundene Sekretion der α 3-Kette von Typ VI Kollagen im Western-Blot zu erkennen. Verglichen zu den Konzentrationsreihen der reinen Substanzen fällt wiederum auf, dass 9cRA bei einer Konzentration von 5 μM eine reduzierte Sekretion aufweist, allerdings in einem geringeren Maße, wie es in der Kombination mit Troglitazon der Fall ist (s. Abbildung 7). Bei den höheren

Konzentrationskombinationen von Troglitazon mit 9cRA ist die Inhibierung der Sekretion von Typ VI Kollagen vollständig.

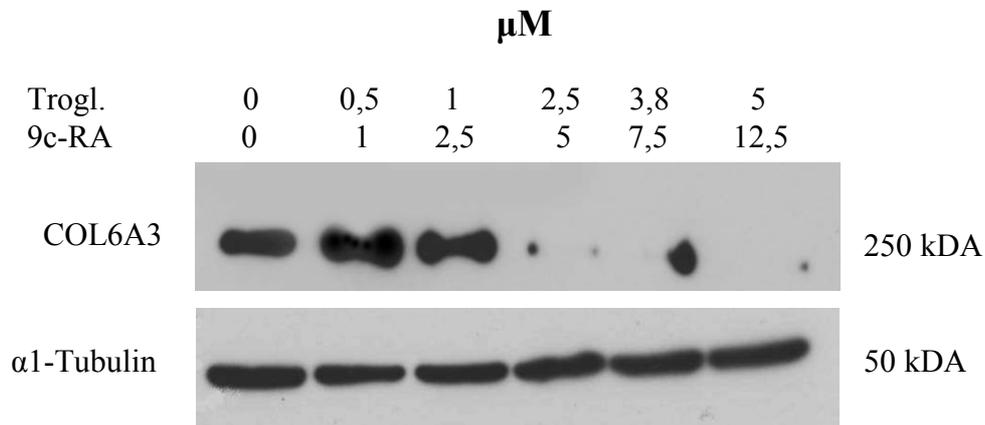


Abbildung 10: Western-Blot-Analyse von Typ VI Kollagen in den Zellkulturüberständen von THP-1-Makrophagen und α 1-Tubulin in den entsprechenden Zelllysaten unter dem Einfluss von Troglitazon und Troglitazon in Kombination mit 9cRA.

Troglitazon zeigt bei Inkubation als Reinsubstanz kaum Auswirkungen auf die Sekretion von Typ VI Kollagen bei den Konzentrationen 2 μM und 5 μM im Vergleich zur Kontrolle (s. Abbildung 8). Abbildung 10 zeigt hingegen, dass 2,5 μM Troglitazon in Kombination mit 5 μM 9cRA ausreichen, um die Sekretion deutlich zu reduzieren. Auch bei höheren Konzentrationen der beiden Agonisten in Kombination konnte kein sezerniertes Typ VI Kollagen im Kulturüberstand nachgewiesen werden. Die deutlich sichtbaren Flecken in Höhe der Bande der α 3-Kette von Typ VI Kollagen bei der Konzentrationskombination von Troglitazon und 9cRA mit 3,8 μM und 7,5 μM scheinen Artefakte zu sein. Auch in diesem Versuch ist die zytotoxische Konzentrationsgrenze nicht überschritten worden. Die Banden der Western-Blot-Analyse für α 1-Tubulin zeigen keine konzentrationsabhängigen Veränderungen.

4.6.3 Wirkung des PPAR γ -Antagonisten GW9662 auf die Sekretion von Typ VI Kollagen

Um sicherzustellen, dass es sich bei den beobachteten um PPAR γ -abhängige Effekte handelt, sollten Wettbewerbsversuche mit dem PPAR γ -Antagonisten GW9662 durchgeführt werden. Im Falle einer PPAR γ -abhängigen Regulation der Sekretion von Typ VI Kollagen sollte die beobachtete Reduktion durch den Inhibitor aufgehoben werden.

Bei der Substanz GW9662 handelt es sich um einen Inhibitor des PPAR γ /RXR-Heterodimers, der irreversibel an PPAR bindet und die weitere Bindung von Liganden verhindert. Somit kommt es nicht zur Aktivierung und Bindung des Heterodimers an die Promotorregion der entsprechenden Zielgene (s. Kapitel 1.6.1), so dass die Aktivierung der Genexpression durch PPAR γ /RXR ausbleibt. Sollte der beobachtete Effekt von 15dPGJ2 und Troglitazon auf die Sekretion von Typ VI Kollagen durch PPAR γ vermittelt werden, wäre dementsprechend eine Aufhebung der bisher beobachteten Effekte zu erwarten. Abbildung 11 zeigt zunächst die Ergebnisse der Inkubation mit der Reinsubstanz. Dies stellt einen wichtigen Vorversuch dar, da möglicherweise GW9662 an sich bereits einen toxischen Effekt auf die Zellen haben könnte und darüber auf die Regulation der Sekretion von Typ VI Kollagen wirken könnte.

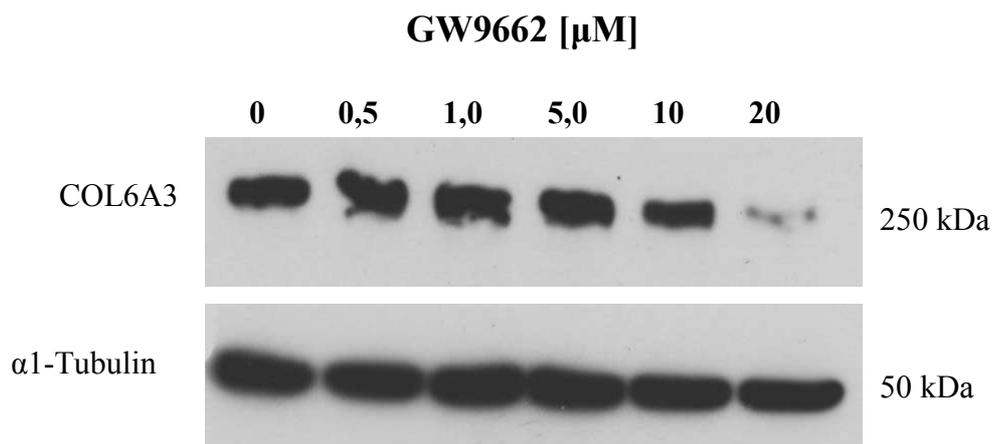


Abbildung 11: Western-Blot-Analyse von Typ VI Kollagen in den Zellkulturüberständen von THP-1-Makrophagen und α 1-Tubulin in den entsprechenden Zelllysaten unter dem Einfluss von GW9662.

Wie in Abbildung 11 dargestellt besitzt der PPAR γ -Antagonist GW9662 unerwarteterweise in höheren Konzentrationen einen inhibierenden Einfluss auf die Sekretion von Typ VI Kollagen. Die Inkubation der THP-1-Makrophagen mit 0,5 μ M, 1 μ M und 5 μ M hatte keinen Effekt. Ab einer Konzentration von 10 μ M lässt sich eine Reduktion der Bandenintensität erkennen, während 20 μ M GW9662 zu einer deutlichen Abnahme der Sekretion führen. Die Tatsache, dass GW9662 in höherer Konzentration die Sekretion des Typ VI Kollagens beeinflusst, wirkt sich auf die Wahl der Konzentration im Kombinationsversuch aus. Der α 1-Tubulin-Blot gibt wiederum keinen Anhalt dafür, dass die Regulation mit zytotoxischen Effekten begründet werden könnte, da selbst die Banden bei 10 μ M und 20 μ M keine deutliche Verschmälerung aufweisen. Da die Western-Blot-Analyse eine klare Regulation von GW9662 ab 10 μ M herausgestellt hat, wurde für weiterführende Versuche die höchste Konzentration von GW9662 ausgewählt, bei der noch keine Regulation zu erkennen war. Dies ist gemäß Abbildung 11 bei 5 μ M der Fall.

Erwartungsgemäß sollte GW9662 die Effekte von 15dPGJ2 inhibieren, so dass es zu keiner Reduktion der Kollagen Typ VI Sekretion kommt. Abbildung 12 zeigt hingegen, dass dies nicht der Fall ist. Darüber hinaus wurde in einigen Versuchen, wie beispielsweise in dem in Abbildung 12 dargestellten, eine deutliche Reduktion der Sekretion von Typ VI Kollagen durch GW9662 bei Inkubation der THP-1-Makrophagen mit 5 μ M gefunden. Aufgrund dieses Befundes verliert der Versuch seine Aussagekraft, da bei gleichzeitiger Einwirkung auf die Regulation, die inhibierende Wirkung des GW9662 auf die Effekte des 15dPGJ2 nicht mehr beurteilt werden kann. Wie der regulierende Einfluss des GW9662 auf die Sekretion von Typ VI Kollagen zustande kommt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Von Prof. Lorkowski durchgeführte weiterführende Arbeiten deuten darauf hin, dass dieser Effekt, nicht durch eine zytotoxische Wirkung der in dieser Studie eingesetzten relativ hohen Konzentrationen an GW9662 hervorgerufen werden und nicht auf die Sekretion von Typ VI Kollagen beschränkt sind. So zeigen vorläufige Versuche, dass GW9662 sogar stimulierend auf die Expression einiger ausgesuchter Gene in THP-1-Makrophagen wirken kann. Der zugrundeliegende Mechanismus ist jedoch völlig ungeklärt (persönliche Mitteilungen von Prof. Lorkowski).

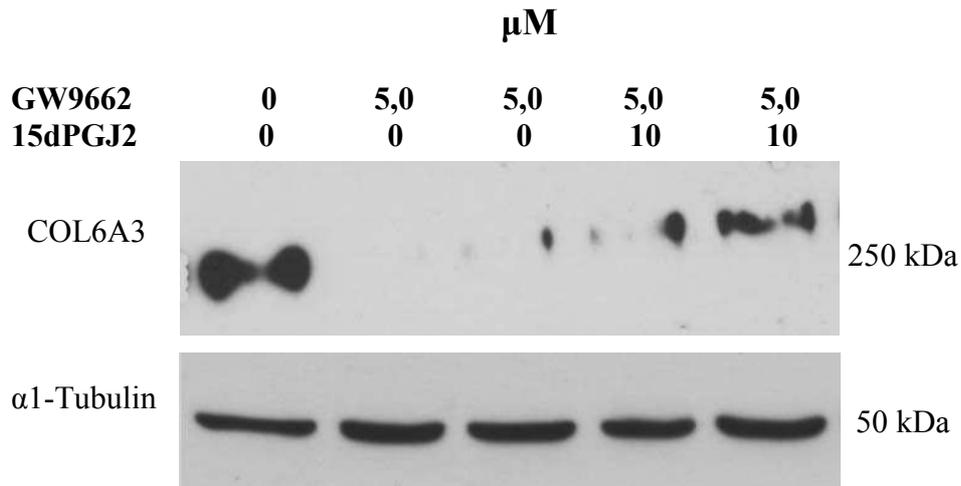


Abbildung 12: Western-Blot-Analyse von Typ VI Kollagen in den Zellkulturüberständen von THP-1-Makrophagen und α 1-Tubulin in den entsprechenden Zelllysaten unter dem Einfluss von 15dPGJ2 und 15dPGJ2 in Kombination mit GW9662.

4.7 Regulation der Sekretion von Typ VI Kollagen durch Inhibitoren der Transkription und Translation

Die folgenden Versuche mit den Substanzen Actinomycin D und Cycloheximid wurden durchgeführt, um die molekularen Mechanismen der Regulation der Typ VI Kollagen Expression durch das PPAR γ /RXR-Heterodimer bzw. durch 15dPGJ2 genauer zu durchleuchten. Gemäß der Annahme, dass die Regulation der COL6A3-Expression von weiteren regulatorisch wirksamen Proteinen abhängig ist, würde die gleichzeitige Inkubation von Actinomycin D und Cycloheximid den Effekt von 15dPGJ2 auf die Expression von COL6A3 aufheben. Die durch 15dPGJ2 induzierte Proteinbiosynthese solcher möglicher Proteine wäre bei Verwendung der oben genannten Substanzen gehemmt, so dass diese ihre regulatorische Wirkung nicht entfalten könnten. Sollte 15dPGJ2 hingegen eine direkte Wirkung auf die COL6A3-Expression ausüben, wäre der Effekt im Western-Blot nicht zu hemmen, da es unabhängig von weiteren Proteinen und somit von der Proteinbiosynthese wäre.

4.7.1 Actinomycin

Actinomycin ist ein Chromopeptid, welches mit DNA interkaliert und somit Replikation und Transkription verhindert (11). In der Medizin werden Actinomycine als antibiotische Chemotherapeutika verwendet, welche bei einigen Tumorarten zum Einsatz kommen.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Wirkung von Actinomycin D auf die Sekretion von Typ VI Kollagen als Reinsubstanz getestet. Dies ist erforderlich, um nicht nur eine mögliche Toxizität der Substanz und regulierende Einflüsse auf die Sekretion auszuschließen, sondern hilft auch bei der Entscheidung, welche Konzentrationen für die Kombinationsversuche mit 15dPGJ2 verwendet werden sollten. Die Ergebnisse wurden mittels Western-Blot-Analysen der Zellkulturüberstände und Lysate von mit Actinomycin D inkubierten THP-1-Makrophagen erhoben. Abbildung 13 zeigt einen exemplarischen Blot des Konzentrationsversuchs mit Actinomycin D.

Nennenswerte Effekte von Actinomycin D auf die Sekretion des Kollagen Typ VI im verwendeten Konzentrationsspektrum konnten in den Vorversuchen nicht beobachtet werden. Bei der offensichtlich verdichteten Bande bei 0,5 μM Actinomycin D handelt es sich wahrscheinlich um ein Artefakt apparativen Ursprungs. Eine Induktion der Sekretion durch 0,5 μM Actinomycin D konnte nicht reproduziert werden. Eine Abnahme der sezernierten Typ VI Kollagen-Menge war in der Regel mit Konzentrationen von 5 μM und darüber (nicht gezeigt) zu verzeichnen.

Die Western-Blot-Analyse des Referenzproteins $\alpha 1$ -Tubulin zeigt verglichen mit der Kontrollbande ebenfalls keine Veränderung in der Bandenintensität (Abbildung 13)

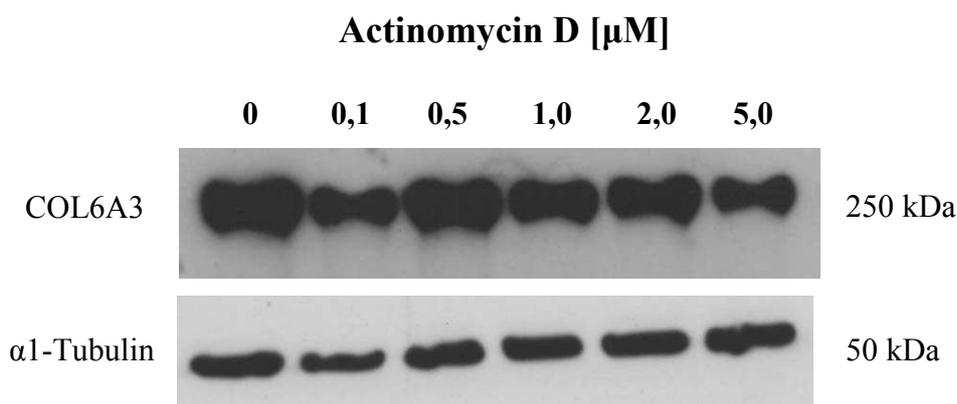


Abbildung 13: Western-Blot-Analyse von Typ VI Kollagen in den Zellkulturüberständen von THP-1-Makrophagen und α 1-Tubulin in den entsprechenden Zellysaten unter dem Einfluss von Actinomycin D.

Actinomycin D nimmt dementsprechend bis zu Konzentrationen von 2 μM weder Einfluss auf die Sekretion von Typ VI Kollagen, noch wirkte es in dem verwendeten Konzentrationspektrum toxisch auf die Zellen. Da es sich bei Actinomycin D um ein Zytostatikum handelt, ist es jedoch verwunderlich, dass die Substanz überhaupt keine Wirkung auf die Proteinmengen zeigte. Tatsächlich konnte bei Verwendung von Actinomycin D in Konzentrationen oberhalb von 15 μM die zytotoxische Wirkung nachvollzogen werden, die sich entsprechend der Konzentration mit einer Abnahme der Intensität der Banden sowohl im Fall von Typ VI Kollagen als auch bei α 1-Tubulin äußerte. Da für den Kombinationsversuch mit 15dPGJ2 weder eine zu starke, toxisch wirkende Konzentration, noch eine zu geringe Konzentration sinnig wäre, wurden weitere Versuche letztlich mit 1,0 μM Actinomycin in Kombination mit 10 μM 15dPGJ2 durchgeführt (Abbildung 14).

Die in Abbildung 14 gezeigten Western-Blot-Analysen lassen die Vermutung zu, dass Actinomycin D als Inhibitor der Transkription möglicherweise die Wirkung von 15dPGJ2 hemmt. Die Banden der Zellkulturüberstände der mit 1 μM Actinomycin inkubierten Makrophagen zeigen keine verringerte Bandenintensität im Vergleich zur Kontrollbande. Dieser Reinversuch diente dem direkten Vergleich eines Effektes von Actinomycin D mit der Kombination von Actinomycin D mit 15dPGJ2. Die Analyse der Zellkulturüberstände, die in Kombination von Actinomycin D mit 10 μM 15dPGJ2 inkubiert wurden, zeigt ebenfalls keine Veränderung im Bandenmuster, verglichen mit

der Kontrollbande. 15dPGJ2 im Reinversuch verursacht bei einer Konzentration von 10 μM eine stark reduzierte Kollagensekretion (s. Abbildung 5). Da die Effekte von 15dPGJ2 offenbar durch Actinomycin D inhibiert werden, kann vermutet werden, dass bei der Regulation der Expression von COL6A3 durch 15dPGJ2 zunächst ein weiteres regulatorsich eingreifendes Protein gebildet werden muss. Die Western-Blot-Analyse des $\alpha 1$ -Tubulins zeigt keine Veränderungen im Bandenmuster; die Zellen scheinen im Versuch demnach keinen Schaden genommen zu haben.

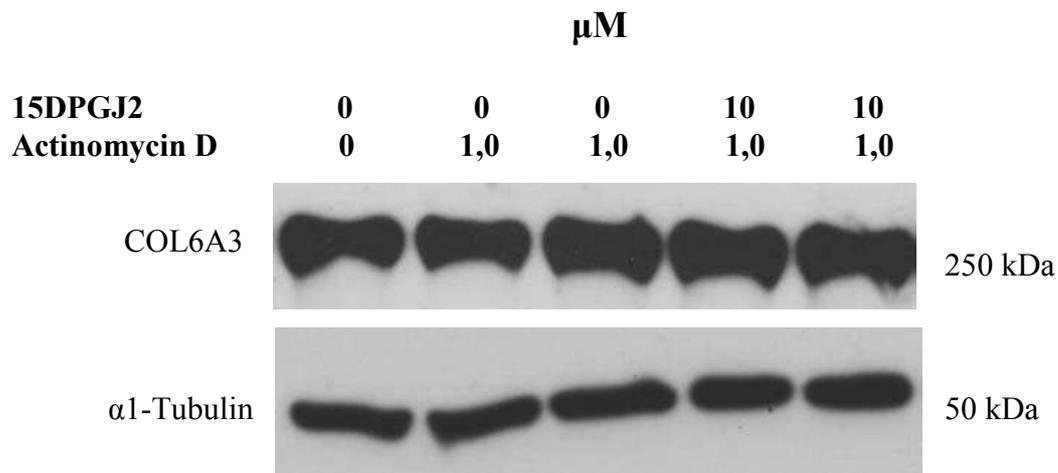


Abbildung 14: Western-Blot-Analyse von Typ VI Kollagen in den Zellkulturüberständen von THP-1-Makrophagen und $\alpha 1$ -Tubulin in den entsprechenden Zelllysaten.

4.7.2 Cycloheximid

Cycloheximid ist eine antibiotisch wirkende Substanz, welche die Proteinbiosynthese pro- und eukaryotischer Zellen hemmt (36). Während Actinomycin D Auswirkungen auf die Transkription und darüber auch auf die Translation hat, unterbindet Cycloheximid die Translation ohne die Transkription zu beeinflussen.

Zunächst wurde die Wirkung von Cycloheximid als reine Substanz getestet. Die konzentrationsabhängige Wirkung von Cycloheximid wurde mittels Western-Blot-Analysen von Zellkulturüberständen und Zelllysaten von THP-1-Makrophagen nach 24 stündiger Inkubation mit unterschiedlichen Konzentrationen an Cycloheximid ermittelt (s. Abbildung).

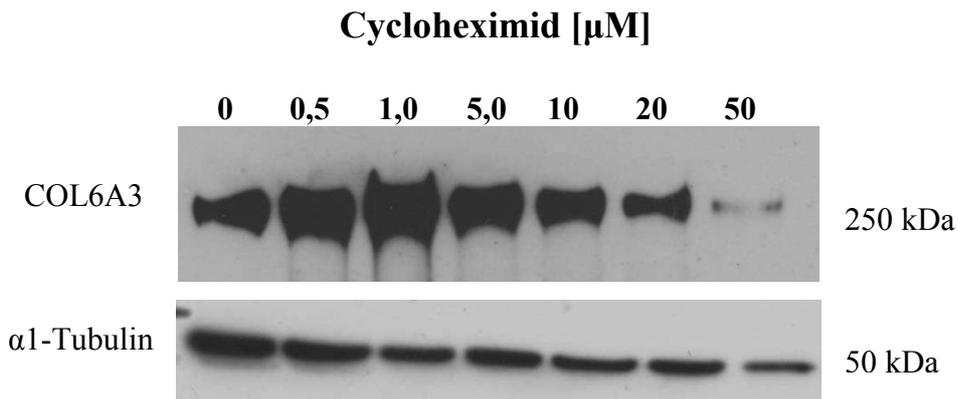


Abbildung 15: Western-Blot-Analyse von Typ VI Kollagen in den Zellkulturüberständen von THP-1-Makrophagen und α 1-Tubulin in den entsprechenden Zelllysaten unter dem Einfluss von Cycloheximid.

Die Banden der Kulturüberstände von Makrophagen, die mit Konzentrationen von 0,5 μM , 1 μM und 5 μM behandelt wurden, weisen eine klare Verdichtung im Vergleich zur Kontrollbande auf. Diese Induktion der Sekretion von Typ VI Kollagen durch Cycloheximid konnte häufiger beobachten. Allerdings blieb unklar, ob es sich um eine tatsächliche Regulation oder ein apparatives Problem handelte. Dennoch zeigt Abbildung 15 deutlich, dass Cycloheximid in höheren Konzentrationen hemmend auf die Sekretion von Typ VI Kollagen wirkt. Bei Konzentrationen von 20 μM und 50 μM senkt Cycloheximid die Sekretion von Typ VI Kollagen. Die Western-Blot-Analyse des Referenzproteins α 1-Tubulin ergab ebenfalls eine konzentrationsabhängige Abnahme der Proteinmenge im Zelllysate. Besonders in Bereichen der Konzentrationen 10 μM , 20 μM und 50 μM ist eine klar verminderte Intensität der Banden im Vergleich zur Kontrollbande zu verzeichnen. Dieses Ergebnis passt mit der starken Zytotoxizität und Hemmwirkung des Cycloheximids überein. Allerdings scheint der hemmende Effekt von Cycloheximid im Fall von Typ VI Kollagen etwas größer als bei α 1-Tubulin zu sein. Es war daher bereits vor dem Kombinationsversuch mit 15dPGJ2 klar, dass dieser vermutlich keine verwertbaren Ergebnisse liefern würde, da einerseits das Ergebnis durch die regulierenden Effekte des Cycloheximids und andererseits auch durch die zytotoxischen Eigenschaften verfälscht wird.

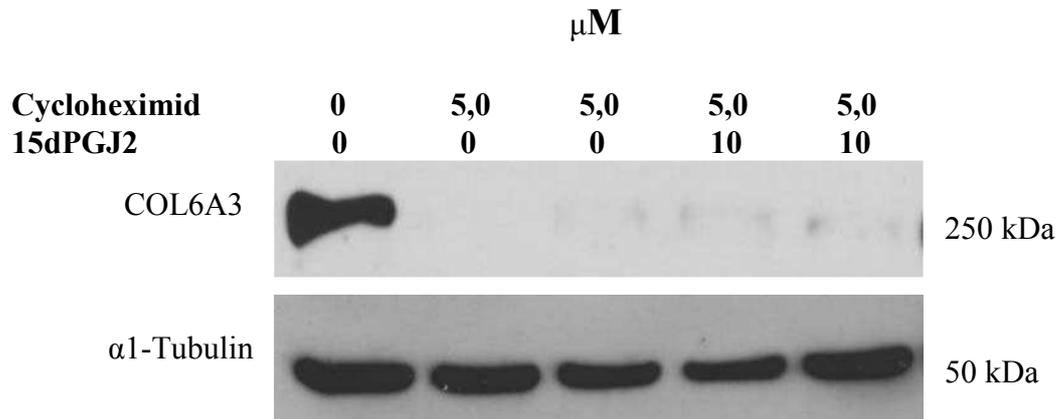


Abbildung 16: Western-Blot-Analyse von Typ VI Kollagen in den Zellkulturüberständen von THP-1-Makrophagen und α 1-Tubulin in den entsprechenden Zelllysaten unter dem Einfluss von 15dPGJ2 und 15dPGJ2 in Kombination mit Cycloheximid.

Die Ergebnisse in Abbildung 16 bestätigen die Vermutung, die aus dem zuvor durchgeführten Vorversuch mit Cycloheximid gezogen wurde. Cycloheximid selbst besitzt regulierende Eigenschaften, so dass die Regulation durch 15dPGJ2 dadurch nicht inhibiert wurde. In der in Abbildung 16 gezeigten Western-Blot-Analyse ist die Regulation sogar so stark, dass bei der verwendeten Konzentration von 5 μM Cycloheximid keine Bande mehr zu sehen ist. Die Banden der analysierten Zellkulturüberstände, bei denen zuvor mit Cycloheximid und 15dPGJ2 inkubiert worden ist, weisen noch schwache Banden auf. Der α 1-Tubulin-Blot weist keine auffälligen Veränderungen der Bandenintensität auf, so dass eine starke zytotoxische Wirkung bei 5 μM Cycloheximid in diesem Versuch ausgeschlossen werden konnte.

5 Diskussion

5.1 Makrophagen in der Atherogenese

Wie in Kapitel 1.2.2. beschrieben wurde, spielen Makrophagen eine wichtige Rolle in der Atherogenese. Bereits in der initialen Phase wandern Monozyten in die Intima ein und tragen zur Entstehung des Atheroms bei. Mithilfe des LDL-Rezeptors sind sie in der Lage, LDL zu phagozytieren und lysosomal abzubauen. In Anwesenheit großer Mengen LDL entstehen gewebeschädigende, modifizierte (oxidierte und/oder enzymatisch veränderte) LDL, die zur Hochregulation der Scavenger-Rezeptoren führen. Im Gegensatz zum LDL-Rezeptor unterliegen diese Rezeptoren keinem negativen Feedback-Mechanismus. Die Übersättigung der Makrophagen mit Cholesterin durch die unkontrollierte Aufnahme chemisch oder enzymatisch modifizierter LDL führt zur Bildung von Schaumzellen. Das Absterben der Schaumzellen durch Nekrose und Apoptose trägt zur Bildung des nekrotischen Kerns der Plaque bei, dessen Größe, neben der Destabilisierung der fibrösen Kappe, verantwortlich für das Risiko einer Ruptur ist.

Ein gestörtes Verhältnis von klassisch und alternativ aktivierten bzw. deaktivierten Makrophagen ist ein weiterer Aspekt, der auf die Stabilität einer fibrösen Plaque einwirken kann. Der klassisch aktivierte Zustand führt vermutlich zu einer ausgeprägten Atherosklerose und trägt möglicherweise verstärkt zur Gewebedestabilisierung bei. Die durch Makrophagen ausgelöste Apoptose führt zu einer Verminderung der Anzahl glatter Muskelzellen, die den Hauptanteil der in der fibrösen Kappe vorhandenen ECM-Moleküle sezernieren. Gleichzeitig führt die verstärkte Sekretion von Proteasen, wie Kollagenase, Gelatinase und Cathepsinen zum Abbau der ECM und zur Ausdünnung der fibrösen Kappe. Dies erhöht das Risiko einer Ruptur zusätzlich. Makrophagen tragen jedoch auch zur Plaquestabilität bei, indem sie durch die Sekretion verschiedener Faktoren (z. B. TGF β 1) die Produktion von Proteinen der ECM in umliegenden glatten Muskelzellen stimulieren. Ob Makrophagen eher eine proatherogene oder antiatherogene Wirkung haben, hängt demnach vom Aktivierungszustand der Zellen ab. Bisher wird Makrophagen jedoch eine mehr proatherogene Rolle in der Atherogenese

zugeschrieben. Es ist aber durchaus vorstellbar, dass der alternativ aktivierte oder der deaktiverte Zustand eine mehr stabilisierende Auswirkung auf die Plaque hat.

In inflammatorischen Geweben wurde die Anwesenheit von Makrophagen mit unterschiedlichen Aktivierungszuständen beschrieben (6). Es wird vermutet, dass ein ausgeglichenes Verhältnis der klassisch- und alternativ aktivierten Makrophagen entscheidend für eine gelungene Wundheilung ist (5). Wie in Kapitel 1.4.2 beschrieben wurde, steht der klassisch aktivierte Makrophage im Wesentlichen zur Infektabwehr sowie zur Beseitigung veränderter oder lädierter Zellen zur Verfügung. Er wird benötigt, um entzündetes oder infiziertes Gewebe von den schädigenden Komponenten zu befreien. Abgesehen von Bakterien, die beseitigt werden müssen, wandert eine Vielzahl von Zellen in entzündetes Gewebe ein, wie zum Beispiel T-Zellen, natürliche Killerzellen, Helferzellen, Granulozyten sowie Lymphozyten. Um der unkontrollierten und gewebschädigenden Nekrose vorzubeugen und eine Wundheilung überhaupt zu ermöglichen, müssen diese Zellen ab einem gewissen Altersstadium kontrolliert in die Apoptose geführt werden. Ebenso müssen die durch die Entzündung oder Infektion geschädigten Zellen des betroffenen Organs entsorgt werden. Im Falle des Gefäßsystems handelt es sich bei diesen organspezifischen Zellen insbesondere um glatte Muskelzellen (3). Durch das vermehrte Auslösen einer Apoptose der glatten Muskelzellen kann es zu einem Ungleichgewicht zwischen Matrixsynthese durch glatte Muskelzellen und Degradation extrazellulärer Matrix durch Makrophagen kommen. Dies führt zu einer Destabilisierung der atherosklerotischen Plaque bis möglicherweise hin zur Ruptur. Der alternativ aktivierte Makrophage hingegen wirkt eher gewebestabilisierend (s. Kapitel 1.4.3.). Die Sekretion extrazellulärer Matrixproteine sowie die Proliferation von glatten Muskelzellen in der Plaque wird durch Makrophagen dieses Aktivierungszustandes gefördert (5;30). In entzündetem Gewebe und Wundheilungsprozessen wirkt dieser Aktivierungszustand demnach vornehmlich auf den Wiederaufbau des Gewebes und nicht degradierend.

Klassisch aktivierte Makrophagen können eine Transformation zum antiinflammatorischen Zustand vollziehen. Diese Transformation wird im Wesentlichen durch die Phagozytose apoptotischer Zellen hervorgerufen. Die Phagozytose apoptotischer Zellen stellt einen wichtigen Faktor der Wundheilung dar, da dadurch die sekundäre Nekrose und somit ein weiterer gewebschädlicher Faktor verhindert wird.

Während die Phagozytose opsonierter Partikel eine proinflammatorische Reaktion der Makrophagen auslöst, ruft die Phagozytose apoptotischer Zellen eine antiinflammatorische Reaktion hervor (5). Der hier beschriebene transformierte Aktivierungszustand der Makrophagen ist nicht identisch mit dem alternativ aktivierten Makrophagen, allerdings besteht eine große Ähnlichkeit. Durch die Produktion von TGF- β 1 und IL-10 (siehe dazu auch Kapitel 1.4.3 und 1.4.4) induziert er die Gewebeproliferation sowie die Deaktivierung weiterer Makrophagen. Auch umgekehrt können alternativ aktivierte Makrophagen zu klassisch aktivierten Makrophagen transformiert werden (45).

Die genauen Mechanismen der klassischen und alternativen Aktivierung sowie der Transformation sind noch nicht im Detail verstanden. Ebenso sind die genauen Funktionen der unterschiedlichen Aktivierungszustände von Makrophagen nur oberflächlich untersucht. Hierin liegt sicherlich ein zukunftssträchtiger Ansatzpunkt für therapeutische Interventionen und die damit zusammenhängende Forschung. Eine therapeutische Intervention basiert beispielsweise auf der Überlegung, wie die Aktivierung von Makrophagen medikamentös gesteuert werden kann. Die Möglichkeit, Einfluss auf den jeweiligen Aktivierungszustand der Makrophagen zu nehmen oder die Transformation gezielt einzuleiten, könnte entsprechende Konsequenzen für die Atherogenese und für die Plaquestabilität haben. Einer Plaqueruptur könnte durch Induktion des antiinflammatorischen, gewebeaufbauenden Zustandes entgegengewirkt werden, wenn auch das damit verbundene Plaquewachstum aufgrund der gesteigerten Fibrose die Gefahr größerer Plaques birgt. Vom klassisch aktivierten Makrophagen ist bereits bekannt, dass er insbesondere degradierende Auswirkungen mit sich bringt. Jedoch birgt auch der antiinflammatorische, gewebeaufbauende Zustand der Makrophagen weitere mögliche Risiken. Die Sekretion der proliferativ wirkenden Zytokine, wie z. B. TGF- β 1, kann zu einer Hyperzellularität mit Überschuss an extrazellulärer Matrix sowie einem Mangel an inflammatorisch aktiven Zellen führen. Beispielsweise wurde beschrieben, dass eine Überexpression von TGF- β 1 in der Lunge zur unkontrollierten Fibrose führt (5;18). Der Einsatz von Glucocorticoiden, die als Entzündungshemmer eingesetzt werden und die alternative Aktivierung begünstigen, geht oft mit einer überschießenden Vernarbung und Fibrose des entsprechenden

Gewebes einher (5). Auch in chronisch entzündlichen Leiden wie z. B. chronischen Arthritiden wurde die Beteiligung alternativ aktivierter Makrophagen beschrieben (42).

Neben der Idee, die Aktivierung der Makrophagen modulieren zu können, wäre eine weitere Möglichkeit der therapeutischen Intervention, die Modulation und Induktion auf der Ebene der Sekretion einzelner Proteine; eine Option, die jedoch schwierig umzusetzen ist. Von Interesse könnten hierbei beispielsweise ausgesuchte Kollagene sein, die sich durch ihre adhäsiven matrixaufbauenden Eigenschaften sowie Zell-Matrix-Interaktion auszeichnen (s. dazu auch Kapitel 1.5.3). Besonders hervorzuheben ist in diesem Zusammenhang Typ VI Kollagen, das im Rahmen dieser Arbeit als Sekretionsprodukt der Makrophagen untersucht worden ist.

5.2 Typ VI Kollagen wird von Makrophagen sezerniert

Kollagene gehören zu den am häufigsten vorkommenden Proteinen im menschlichen Organismus. Sie gehören zu den Proteinen der extrazellulären Matrix und besitzen, neben der Gewährleistung der Integrität von Geweben, viele unterschiedliche Wirkungen auf verschiedene Zellen (s. Kapitel 1.5). Beispiele hierfür sind Einflüsse der Kollagene auf die Migration von Zellen, Zell-Matrix-Kontakte, Zell-Zell-Kontakte.

Das für diese Arbeit relevante Kollagen ist das Typ VI Kollagen (s. Kapitel 1.5.4). Typ VI Kollagen wird in Makrophagen de novo synthetisiert und aktiv sezerniert (37). Für die Versuche sind in der vorliegenden Arbeit THP-1-Makrophagen als Modellsystem verwendet worden, welche nach viertägiger Ausdifferenzierung mit den entsprechenden Stoffen inkubiert wurden (siehe Kapitel 3.2). Mittels Western-Blot-Analyse wurde neben der Expression der drei einzelnen für Typ VI Kollagen kodierenden mRNAs vor allem die Sekretion von Typ VI Kollagen aus den Zellkulturüberständen der THP-1-Makrophagen ermittelt (s. Kapitel 3.4).

Typ VI Kollagen zeichnet sich vor allen Dingen durch drei Eigenschaften aus. Zum einen wird Typ VI Kollagen eine antiapoptotische Wirkung zugesprochen (8;31). Zum anderen hat Typ VI Kollagen Einfluss auf die Migration und Adhäsion von Zellen, wie z. B. Makrophagen und Monozyten (37). Zudem spielt es eine Rolle in der Verankerung von zellulären Strukturen durch Zell-Matrix- und Zell-Zell-Interaktionen.

Typ VI Kollagen kann vermutlich als Marker für einen antiinflammatorischen, gewebestabilisierenden Makrophagenphänotypen angesehen werden. Schnoor et al. zeigten beispielsweise, dass die Sekretion von Typ VI Kollagen in alternativ aktivierten sowie vor allem in deaktivierten Makrophagen gesteigert ist (37). Im Vergleich dazu ist sie in klassisch aktivierten Makrophagen gesenkt. So konnte in vitro durch Inkubation von Makrophagen mit TGF- β 1 und IL-10 die Sekretion von Typ VI Kollagen erhöht werden. TGF- β 1 als auch IL-10 gelten als deaktivierend auf Makrophagen wirkende Zytokine (siehe Kapitel 1.4.4). Ebenso führten die Interleukine der alternativen Aktivierung, IL-4 und IL-13 (siehe Kapitel 1.4.3), in Inkubationsversuchen zu einer erhöhten Sekretion von Typ VI Kollagen durch Makrophagen.

Des Weiteren zeigte sich, dass von Makrophagen sezerniertes Typ VI Kollagen nicht in seiner üblichen perlenkettenartigen Form (siehe Kapitel 1.5.4) aufgebaut war, sondern vermutlich ungeordnet gebunden an die Zelloberfläche der Makrophagen vorkommt (37). Ein Mangel an Enzymen, die für den Aufbau des Typ VI Kollagen notwendig sind, oder eine proteolytische Degradation der sich in der extrazellulären Matrix befindlichen Moleküle, kann mutmaßlich als Ursache dafür ausgeschlossen werden. Welche Bedeutung diese Beobachtung in vivo hat ist bisher nicht bekannt. Dennoch wäre es als Merkmal eines gewebestabilisierenden Aktivierungszustandes der Makrophagen denkbar. Ebenso ist die Hypothese, Typ VI Kollagen habe adhäsive Eigenschaften und würde von Makrophagen zur Adhäsion genutzt, mit den beschriebenen Beobachtungen in Einklang zu bringen. Es ist denkbar, dass Makrophagen das an ihre Zelloberfläche gebundene Typ VI Kollagen zur eigenen Verankerung im Gewebe nutzen. Zusätzlich wird Typ VI Kollagen von Fibroblasten und glatten Muskelzellen sezerniert. Dieses, in seiner eigentlichen, perlenkettenartigen Form vorkommende Typ VI Kollagen (s. Kapitel 1.5.4), wirkt stabilisierend auf die extrazelluläre Matrix und nimmt Einfluss auf sonstige Zell-Zell- sowie Zell-Matrix-Kontakte, was beispielsweise einer Ruptur eines atherosklerotischen Plaque entgegenwirken könnte.

Neben seinem Einfluss auf die Adhäsion, wirkt Typ VI Kollagen auf die Migration von Zellen. Beispielsweise steigert es die Adhäsion von Monozyten (37), welche in das entzündete Gewebe einwandern und sich dann möglicherweise leichter zu Makrophagen

differenzieren können. Somit ist eine weitere Rekrutierung von Makrophagen gewährleistet.

Die Sekretion von Typ VI Kollagen durch Makrophagen bietet evt. eine Möglichkeit der therapeutischen Intervention und Behandlung der Atherosklerose. Der Wissensstand bezüglich der Modulation der Kollagensekretion sowie der Rolle des von Makrophagen produzierten Typ VI Kollagens in der atherosklerotischen Plaque ist dafür allerdings noch zu gering. Eine denkbare medikamentöse Beeinflussung der Kollagensekretion durch Makrophagen und somit therapeutische Nutzung steht als Option folglich momentan noch in weiter Ferne. Ob Makrophagen das Typ VI Kollagen in vivo so exprimieren und regulieren wie in vitro, ist ebenfalls nicht bekannt. Entsprechende Versuche sind schwierig, da die meisten der bisher untersuchten makrophagenhaltigen Gewebe per se große Mengen an Typ VI Kollagen enthalten, so dass nicht eruiert werden kann, ob auch das von den Makrophagen stammende Typ VI Kollagen im Gewebe integriert wird (unveröffentlichte Ergebnisse; persönliche Mitteilung von Prof. Dr. Stefan Lorkowski). Weitere Nachforschungen müssen darüber Aufschluss bringen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Fokus auf den Transkriptionsfaktor PPAR γ gelegt, der als negativer Regulator der Makrophagenaktivierung im Zusammenhang mit der Regulation der Typ VI Kollagen Sekretion durch Makrophagen stehen könnte.

5.3 Die Bedeutung von PPAR γ in der Atherogenese

Die PPARs sind Transkriptionsfaktoren, die vor allem den Glukose- und Lipidmetabolismus regulieren und Einfluss auf inflammatorische Reaktionen haben. Es handelt sich dabei um Transkriptionsfaktoren, die sich im Zellkern befinden und mit einem weiteren Kernfaktor, dem RXR, nach Bindung entsprechender Liganden, ein Heterodimer bilden (s. Kapitel 1.6). Dieses Dimer bindet an entsprechende Promotorregionen einzelner Gene und reguliert die Expression des betreffenden Gens.

Im Rahmen dieser Arbeit ist der Fokus auf PPAR γ gelegt worden, wobei nähere Informationen in Kapitel 1.6 gegeben wurden. PPAR γ scheint einen positiven Effekt auf die Atherogenese auszuüben, da es vor allen Dingen in die Expression proinflammatorischer Gene eingreift sowie die Lipidakkumulation vermindert (s. Kapitel 1.6). Die Verringerung chemotaktisch wirksamer, proinflammatorischer

Substanzen, wie z. B. TNF- α oder INF- γ , aber auch von Oberflächenrezeptoren wie ICAM-1 und VCAM-1, führt zu einer Minderung der Leukozytenrekrutierung, die einen der initialen Schritte der Atherogenese darstellt. Die Inhibition der SR-A- und apoB48-Rezeptor-Expression, sowie die Aktivitätssenkung der LPL reduzieren die Aufnahme von oxLDL und die Akkumulation von Triglyceriden. Gleichzeitig wird über die Induktion von ABCA1 und CLA-1/SR-B1 der aktive Cholesterinefflux, der initiale Schritt des reversen Cholesterintransports, durch PPAR-Liganden gefördert (s. Kapitel 1.6.2). Da die Lipidakkumulation während der Schaumzellgenese einen frühen Schritt in der Atherogenese darstellt (s. Kapitel 1.2.2.3), wird die Progression der Lipidakkumulation durch Liganden von PPAR γ vermutlich vermindert.

Aller Wahrscheinlichkeit nach wird die Bildung von Schaumzellen auch über den Phosphorylierungsgrad von PPAR γ moduliert (47). Die Phosphorylierung von PPAR γ wird durch oxLDL induziert und über MAPK vermittelt. Eine Erhöhung der oxLDL-Konzentration führt daher zu einer Erhöhung der MAPK-Aktivität. Beispiele für solche Kinasen sind die JNK, ERK1/2 und p38, wobei JNK vornehmlich an der PPAR γ -Phosphorylierung beteiligt ist, nicht aber die Kinasen ERK1/2 oder p38 (47). In nicht-phosphoryliertem Zustand senkt PPAR γ die oxLDL-abhängige Schaumzellgenese. Die Phosphorylierung von PPAR γ verhindert jedoch seine ligandenabhängigen als auch ligandenunabhängigen Effekte auf die Transkriptionsaktivität und vermindert so die eigentlich positiven Eigenschaften von PPAR γ hinsichtlich der Atherogenese (47). Beispielsweise wurde gezeigt, dass eine Aktivierung von PPAR γ durch 15dPGJ2, Troglitazon und oxLDL jeweils zu einer Erhöhung der ABCA1-Konzentration führt (20;47), wobei hohe oxLDL-Konzentrationen zu einer geringen Erhöhung der ABCA1-Konzentration führen (47). Dies kann dadurch erklärt werden, dass die PPAR γ -Liganden 15dPGJ2 und Troglitazon zu keiner Induktion der Phosphorylierung von PPAR γ führen, aber erhöhte oxLDL-Konzentrationen eine vermehrte Phosphorylierung von PPAR γ bewirken (47).

Ferner reguliert PPAR γ den Aktivierungszustand von Makrophagen (s. Kapitel 1.4.2 und 1.4.3). PPAR γ wird auch durch IL-4 induziert und fördert die Reifung alternativ aktivierter Makrophagen. Viele von IL-4 abhängige antiinflammatorische Effekte werden durch PPAR γ reguliert. Ein Beispiel hierfür ist die Beteiligung von PPAR γ an der IL-4-abhängigen Steigerung der β -Oxidation. Der oxidative, aerobe Metabolismus

ist in alternativ aktivierten Makrophagen ausgeprägt (24). In Experimenten mit PPAR γ -defizienten Makrophagen wurde gezeigt, dass es zu einer um 70% verringerten β -Oxidationsrate kommt. Die Induktion der Arginase-1, das den letzten Schritt bei der Entstehung des Harnstoffs im Harnstoffzyklus katalysiert und ein Marker für die alternative Aktivierung ist, wird in den PPAR γ -defizienten Makrophagen ebenfalls vermindert produziert (24). Zudem wurde festgestellt, dass PPAR γ -defiziente Mäuse anfälliger für Fettleibigkeit und Insulin-Resistenz sind. Diese Tiere besitzen somit ein erhöhtes Risiko ein metabolisches Syndrom sowie eine Atherosklerose zu entwickeln (24).

5.4 Die Regulation der Sekretion von Typ VI Kollagen durch PPAR γ -Agonisten

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Sekretion von Typ VI Kollagen durch ausdifferenzierte THP-1-Makrophagen wahrscheinlich infolge einer PPAR γ -Aktivierung inhibiert wird. Die THP-1-Makrophagen wurden diesbezüglich mit entsprechenden natürlichen und synthetischen Liganden des PPAR γ /RXR-Heterodimers beladen (s. Kapitel 3.2). Anschließend erfolgte die Ermittlung des Gehalts an Typ VI Kollagen in den Zellkulturüberständen mittels Western-Blot (s. Kapitel 3.4). Bei den zur Inkubation der Makrophagen verwendeten Substanzen handelte es sich in erster Linie um PPAR γ -Liganden oder Liganden des RXR.

5.4.1 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J₂

15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J₂ ist ein natürlicher Ligand von PPAR γ und besitzt eine aktivierende Wirkung auf PPAR γ bzw. das PPAR γ /RXR-Heterodimer. Es handelt sich um ein Arachidonsäure-Metabolit, der als Gewebshormon in erster Linie mit inflammatorischen Prozessen in Verbindung gebracht wurde (s. Kapitel 1.6 und 4.1).

Ausgangspunkt für die Untersuchung war die Frage, ob die Wirkung von 15dPGJ₂ auf die Expression von Typ VI Kollagen über PPAR γ vermittelt wird oder davon unabhängig erfolgt. Entsprechende Daten aus der RT-PCR sowie der Western-Blot-Analyse finden sich in Kapitel 4.1 und 4.2. Die Expression aller drei Typ VI Kollagen-

mRNAs (COL6A1, COL6A2 und COL6A3) wurde in Abhängigkeit von der 15dPGJ2-Konzentration verringert. Dabei ist die Regulation im Fall der COL6A3-mRNA, welche die für die Typ VI-Kollagen-Proteinsynthese limitierende $\alpha 3(\text{VI})$ -Kette kodiert, am deutlichsten. Auch die Western-Blot-Analyse zeigte eine klare konzentrationsabhängige Verringerung der Sekretion von Typ VI Kollagen bereits bei der geringsten eingesetzten Konzentration von 5 μM , bei der im Western-Blot bereits keine Bande mehr zu erkennen war.

15dPGJ2 könnte demnach auf einem PPAR γ -abhängigen Weg die Expression als auch die Sekretion von Typ VI Kollagen regulieren. Allerdings wurden auch zahlreiche von PPAR γ -unabhängige Effekte von 15dPGJ2 identifiziert. Daher lag die Frage nahe, inwiefern die Effekte von 15dPGJ2 auf die Regulation von Expression und Sekretion des Typ VI Kollagen möglicherweise PPAR γ -unabhängig sind. Um die Abhängigkeit der beobachteten Wirkungen vom PPAR γ -Signalweg zu überprüfen, wurde der Einfluss des PPAR γ -Antagonisten GW9662, der durch kovalente Bindung PPAR γ irreversibel blockiert (s. Kapitel 4.6.3), Actinomycin D, einem Inhibitor der Transkription (s. Kapitel 4.7.1) und Cycloheximid, einem Inhibitor der Translation (s. Kapitel 4.7.2) auf die Sekretion von Typ VI Kollagen in An- und Abwesenheit von 15dPGJ2 untersucht.

Im Falle einer PPAR γ -abhängigen Regulation der Expression und Sekretion von Typ VI Kollagen sollte die Wirkung von 15dPGJ2 durch die oben genannten Inhibitoren antagonisiert werden. Hätte 15dPGJ2 auch PPAR γ -unabhängige Wirkung auf die Sekretion und Expression von Typ VI Kollagen, wäre trotz Einsatz der Inhibitoren durchaus weiterhin eine Verminderung der mRNA-Expression sowie der Sekretion möglich. Kombinationsversuche von 15dPGJ2 mit GW9662 deuten jedoch darauf hin, dass es sich um einen PPAR γ -abhängigen Weg handelt. In Abbildung 12 (Kapitel 4.6.3) zeigt der Western-Blot eine zumindest leicht verdichtete Bande in den analysierten Zellkulturüberständen nach Inkubation mit 15dPGJ2 in Kombination mit GW9662 im Vergleich zu 15dPGJ2 allein.

Abbildung 14 (Kapitel 4.7.1) lässt auf eine deutliche Antagonisierung der 15dPGJ2-Effekte durch Actinomycin D aufgrund einer Hemmung der Transkription schließen. Die Banden der Kombinationsversuche von 15dPGJ2 und Actinomycin D sind nahezu von der gleichen Dichte wie die Banden der Proben, die mit 15dPGJ2 allein inkubiert wurden. Dies deutet darauf hin, dass die Effekte des 15dPGJ2 von weiteren

regulatorisch wirksamen Proteinen abhängig sind, da die Hemmung ihrer Transkription die Wirkung von 15dPGJ2 aufhebt.

Abbildung 15 (Kapitel 4.7.2) lässt eine Regulation der Sekretion von Typ VI Kollagen durch Cycloheximid vermuten, wobei der Mechanismus dieses Effekts unklar ist. GW9662 wies bei höheren Konzentrationen ebenfalls einen inhibierenden Einfluss auf die Sekretion des Typ VI Kollagens auf (Kapitel 4.6.3; Abb.11). Es ist denkbar, dass aufgrund der hohen proteolytischen Aktivität der Makrophagen sezerniertes Typ VI Kollagen sehr schnell abgebaut wird. Da durch die Cycloheximid-vermittelte generelle Hemmung der Proteinsynthese kein Typ VI Kollagen mehr nachgebildet werden kann, wird es möglicherweise einfach schnell und vollständig durch die proteolytische Spaltung aus dem Kulturüberstand entfernt. Dennoch sollte eine Prüfung hinsichtlich der Zytotoxizität der verwendeten Konzentrationen der Wirkstoffe durchgeführt werden. Bezüglich des GW9662 sprechen Arbeiten von Prof. Lorkowski gegen eine zytotoxische Wirkung, da GW9662 in einigen Versuchen sogar stimulierenden Einfluss auf die Expression bestimmter Gene von THP-1-Makrophagen aufwies und keine Auswirkungen auf Apoptose und Nekrose in dem verwendeten Modellsystem hatte (unveröffentlichte Ergebnisse; persönliche Mitteilung). Abbildung 15 (Kapitel 4.7.2) lässt die Vermutung zu, dass die verminderte Sekretionsrate zumindest teilweise mit einem vermehrten Zelltod zusammenhängt, welcher mit der Cycloheximid-Konzentration assoziiert ist, da selbst die Banden des Referenzproteins α 1-Tubulin eine konzentrationsabhängig verminderte Intensität aufweisen.

Einen weiteren Hinweis für die PPAR γ -Abhängigkeit der Signalkaskade boten die Kombinationsversuche mit anderen Agonisten. Troglitazon ist ein synthetischer Agonist von PPAR γ , während 9-cis-Retinsäure ein Ligand von RXR ist. Die Vermutung, dass Troglitazon allein sowie eine kombinierte Inkubation der Makrophagen mit 15dPGJ2 und einem RXR-Agonisten ebenso wie die Kombination von Troglitazon mit einem RXR-Liganden zu einer verstärkten Regulation der Expression und Sekretion von Typ VI Kollagen führen muss, konnte bestätigt werden. Das Ergebnis der Kombination von 15dPGJ2 mit dem RXR-Liganden 9cRA zeigt Abbildung 9 (Kapitel 4.6.1.1). Die Regulation der Sekretion von Typ VI Kollagen fand in Kombination der Substanzen bei einer geringeren Konzentration statt als bei den entsprechenden Versuchen mit den Reinsubstanzen. Der gleiche Effekt wurde bei Kombination von Troglitazon, dem

synthetischen PPAR γ -Liganden, mit 9c-RA beobachtet (vgl. Abbildung 10 in Kapitel 4.6.1.2). Auch in dem Fall führt die Kombination des PPAR γ -Liganden Troglitazon mit dem RXR-Liganden 9c-RA zu einer Regulation, und zwar bei geringeren Konzentrationen als bei den entsprechenden Versuchen mit den Reinsubstanzen nötig waren. Die hier beobachtete Verstärkung der Regulation durch die kombinierte Aktivierung des PPAR γ /RXR-Heterodimers ist ein klarer Hinweis auf eine zumindest teilweise PPAR γ -Abhängigkeit des Regulationsweges.

5.4.2 Troglitazon

Troglitazon gehört zur Gruppe der Glitazone, welche als Insulinsensitizer bekannt sind und auch Thiazolidindione genannt werden. Ihr Einsatzspektrum in der Medizin umfasst die orale Therapie des Diabetes mellitus Typ II. Glitazone führen zu einer verbesserten Insulinwirkung an Muskel-, Fett- und Lebergewebe. Im therapeutischen Einsatz werden derzeit Rosiglitazon sowie Pioglitazon verwendet. Aufgrund der Nebenwirkungen bei langfristiger Gabe von Rosiglitazon (22) wurde kürzlich der Empfehlung der Europäischen Arzneimittelagentur (EMA) gefolgt, so dass es zu einem Verbot der Verwendung als Therapeutikum in Deutschland durch das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) gekommen ist. Troglitazon erhielt aufgrund einer nachgewiesenen starken Lebertoxizität keine Marktzulassung (32;48), wird jedoch in der Forschung weltweit bis heute für in vitro-Versuche eingesetzt (4;20;29;47).

Troglitazon, als auch die übrigen Glitazone, sind synthetische und spezifische PPAR γ -Liganden (35). Beschrieben wurde Troglitazon bisher überwiegend im Zusammenhang mit Diabetes mellitus Typ II (26), Fettleibigkeit sowie dem Lipidmetabolismus. Dennoch spielen Glitazone als PPAR γ -Agonisten auch bei den anderen Wirkgebieten von PPAR γ eine Rolle. Beispielsweise ist beschrieben worden, dass eine PPAR γ -Aktivierung durch Rosiglitazon positive Effekte auf inflammatorische Prozesse ausübt. Zu diesen Effekten gehörte z. B. die Reduktion der matrixdegradierenden Protease MMP-9 (s. Kapitel 1.6.2) sowie des TNF- α , ein proinflammatorisches Interleukin (21). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde Troglitazon zur Inkubation der Zellen benutzt. Troglitazon rief eine Regulation der Sekretion von Typ VI Kollagen durch THP-1-Makrophagen hervor (vgl. Abbildung 8 in Kapitel 4.5). Die Kombination des

PPAR γ -Agonisten Troglitazon mit dem RXR-Agonisten 9c-RA führte zu potenzierten inhibitorischen Effekten auf die Sekretion von Typ VI Kollagen (s. Abbildung 10, Kapitel 4.6.1.2). Die Befunde mit Troglitazon als spezifischer PPAR γ -Agonist zeigen, dass die Regulation von Typ VI Kollagen in Makrophagen zumindest teilweise durch eine PPAR γ -Aktivierung hervorgerufen wird.

5.4.3 9-cis-Retinsäure

9-cis-Retinsäure ist ein RXR-Ligand (s. Kapitel 1.6.1). PPAR γ bildet mit RXR ein Heterodimer und bindet an die sogenannten PPREs. Diese Bindung an entsprechende Elemente in den Promotoren einiger Gene beeinflusst ihre Expression (41;49). 9-cis-Retinsäure ist ein Vitamin-A-Derivat, was im Organismus für das Auge relevant ist (39). Die Aktivierung des RXR durch 9cRA führt zu einer Regulation der Sekretion von Typ VI Kollagen, in einer Form, in der es auch bei Aktivierung von PPAR γ zu beobachten war. Abbildung 7 (s. Kapitel 4.4) zeigt die Inhibition der Kollagensekretion abhängig von der Konzentration an 9cRA. Mit steigender Konzentration sinkt der Gehalt an Typ VI Kollagen, der mittels Western-Blot-Analyse aus den Zellkulturüberständen der Makrophagen ermittelt wurde. Offensichtlich führt eine Aktivierung des RXR zu ähnlichen Effekten wie PPAR γ -Liganden. Dies unterstützt die Hypothese, dass die Expression von Typ VI Kollagen durch PPAR γ vermittelt wird.

5.5 Ausblick

PPAR γ -Liganden werden antiinflammatorische und antiatherogene Wirkungen zugesprochen (4). Ferner nehmen sie eine entscheidende Rolle in der Regulation der Aktivierung von Makrophagen ein (24). Insgesamt gesehen ist die Rolle von PPAR γ in der Atherogenese und bezüglich des Aktivierungszustandes von Makrophagen noch nicht in ausreichendem Umfang verstanden und aufgeklärt. Das Wirkspektrum von PPAR γ scheint noch größer und differenzierter zu sein als angenommen wurde. Ein Beispiel für solche differenzierten Wirkmechanismen ist, dass PPAR γ die Differenzierung von Adipozyten fördert und damit eine Fettleibigkeit begünstigen würde. Die Förderung der Differenzierung von Adipozyten sowie die Aufnahme und Speicherung freier Fettsäuren betrifft aber überwiegend subkutanes Fettgewebe,

weniger das organumgebende Bauchfett bzw. den Fettgehalt in Organen und im Blut (40).

Unerwartet erscheinen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass PPAR γ -Agonisten konzentrationsabhängig zu einer Inhibition der Sekretion und auch der Expression von Typ VI Kollagen führen. Typ VI Kollagen dient als Marker für eine besondere, bisher nicht näher untersuchte Art der Aktivierung von Makrophagen (37). Nach der bisherigen Datenlage war eine Induktion der Sekretion von Typ VI Kollagen zu erwarten, da es während der antiinflammatorisch geprägten alternativen Aktivierung von Makrophagen, die unter anderem durch PPAR γ moduliert wird, induziert wird. Warum in der vorliegenden Arbeit gegenteilige Beobachtungen gemacht wurden, kann zum derzeitigen Zeitpunkt nicht ausreichend begründet werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte die Bedeutung von PPAR γ für die Regulation der Expression und Sekretion von Typ VI Kollagen in Makrophagen teilweise entschlüsselt werden. In Kapitel 5.3 wurde die Regulation von PPAR γ über dessen Phosphorylierung durch die MAP-Kinasen JNK, ERK1/2 und p38 diskutiert. Es liegt die Vermutung nahe, dass 15dPGJ2 hinsichtlich der regulatorischen Wirkung auf Typ VI Kollagen neben der PPAR γ -Aktivierung und auch durch Induktion von oxidativem Stress in der Zelle wirkt. Diesbezüglich müssen weitere Versuche angeschlossen werden, um diesen Wirkmechanismen zu untersuchen. Erste unveröffentlichte Ergebnisse deuten jedoch auf eine Beteiligung von oxidativem Stress hin (persönliche Mitteilungen von Prof. Dr. Stefan Lorkowski). Auch der Wirkmechanismus der RXR-Liganden ist noch nicht eindeutig geklärt. So können natürliche RXR-Liganden wie 9cRA in Zellen ebenfalls oxidativen Stress auslösen, so dass, ähnlich wie im Fall von 15dPGJ2, ein Teil der Wirkung von 9cRA auf diesen PPAR γ -unabhängigen Mechanismus zurückgeführt werden könnte. Weiterführende Versuche sind in diesem Zusammenhang notwendig, um den tatsächlichen Regulationsmechanismus aufzuklären.

Abschließend lässt sich sagen, dass die Bedeutung der Produktion von Typ VI Kollagen durch Makrophagen und die zugrunde liegenden Regulationsmechanismen weiterhin weitgehend unklar sind. Weiterführende Versuche sind daher für ein besseres Verständnis dieser beiden Punkte notwendig.

6 Referenzen

- (1) Böcker, Denk, Heitz. 20.2 Arteriosklerose - Atherosklerose. Pathologie. 2004.
- (2) Bogdan C. Macrophages. ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES 2006 April.
- (3) Boyle JJ, Bowyer DE, Weissberg PL, Bennett MR. Human blood-derived macrophages induce apoptosis in human plaque-derived vascular smooth muscle cells by Fas-ligand/Fas interactions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001 September;21(9):1402-7.
- (4) Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors: new targets for the pharmacological modulation of macrophage gene expression and function. *Curr Opin Lipidol* 2003 October;14(5):459-68.
- (5) Duffield JS. The inflammatory macrophage: a story of Jekyll and Hyde. *Clin Sci (Lond)* 2003 January;104(1):27-38.
- (6) Duffield JS, Forbes SJ, Constandinou CM, Clay S, Partolina M, Vuthoori S, Wu S, Lang R, Iredale JP. Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair. *J Clin Invest* 2005 January;115(1):56-65.
- (7) Gbaguidi FG, Chinetti G, Milosavljevic D, Teissier E, Chapman J, Olivecrona G, Fruchart JC, Griglio S, Fruchart-Najib J, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) agonists decrease lipoprotein lipase secretion and glycated LDL uptake by human macrophages. *FEBS Lett* 2002 February 13;512(1-3):85-90.
- (8) Howell SJ, Doane KJ. Type VI collagen increases cell survival and prevents anti-beta 1 integrin-mediated apoptosis. *Exp Cell Res* 1998 May 25;241(1):230-41.
- (9) Kai Kopfleisch. Unterscheidung Arteriosklerose - Atherosklerose. Diplomarbeit. 2010.
- (10) Kang DS, Kwon CH, Park JY, Kim JH, Woo JS, Jung JS, Kim YK. 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 induces renal epithelial cell death through NF-kappaB-dependent and MAPK-independent mechanism. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006 November 1;216(3):426-35.
- (11) Kang HJ, Park HJ. Novel molecular mechanism for actinomycin D activity as an oncogenic promoter G-quadruplex binder. *Biochemistry* 2009 August 11;48(31):7392-8.
- (12) Libby P. Vascular biology of atherosclerosis: overview and state of the art. *Am J Cardiol* 2003 February 6;91(3A):3A-6A.

- (13) Löffler G, Petrides PE, Heinrich P.C. 18. Biochemie und Pathobiochemie. 2007. p. 572-80.
- (14) Löffler G, Petrides PE, Heinrich P.C. 24.2 Kollagene. Biochemie und Pathobiochemie. 2007.
- (15) Lorkowski S, Cullen P. Real-time reverse transcription polymerase chain reaction. Analysing gene expression. A handbook of methods: Possibilities and pitfalls. Wiley-VCH; 2002. p. 345-58.
- (16) Lorkowski S, Cullen P. Atherosclerosis: Pathogenesis, Clinical Features and Treatment. ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES 2007.
- (17) Lunn G, Sansone EB. Ethidium bromide: destruction and decontamination of solutions. Anal Biochem 1987 May 1;162(2):453-8.
- (18) Lopher ML, Jr., Gallatin WM. Regulation of fibrosis by the immune system. Adv Immunol 2006;89:245-88.
- (19) Maniatis T, Fritsch EF. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York; 1989.
- (20) Marx N, Duez H, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors and atherogenesis: regulators of gene expression in vascular cells. Circ Res 2004 May 14;94(9):1168-78.
- (21) Marx N, Froehlich J, Siam L, Ittner J, Wierse G, Schmidt A, Scharnagl H, Hombach V, Koenig W. Antidiabetic PPAR gamma-activator rosiglitazone reduces MMP-9 serum levels in type 2 diabetic patients with coronary artery disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2003 February 1;23(2):283-8.
- (22) Nissen SE, Wolski K. Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. N Engl J Med 2007 June 14;356(24):2457-71.
- (23) Norata GD, Catapano AL. Molecular mechanisms responsible for the antiinflammatory and protective effect of HDL on the endothelium. Vasc Health Risk Manag 2005;1(2):119-29.
- (24) Odegaard JI, Ricardo-Gonzalez RR, Goforth MH, Morel CR, Subramanian V, Mukundan L, Red EA, Vats D, Brombacher F, Ferrante AW, Chawla A. Macrophage-specific PPARgamma controls alternative activation and improves insulin resistance. Nature 2007 June 28;447(7148):1116-20.
- (25) Ogden RC, Adams DA. Electrophoresis in agarose and acrylamide gels. Methods Enzymol 1987;152:61-87.
- (26) Olefsky JM. Treatment of insulin resistance with peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. J Clin Invest 2000 August;106(4):467-72.

- (27) Orr AW, Lee MY, Lemmon JA, Yurdagul A, Jr., Gomez MF, Bortz PD, Wamhoff BR. Molecular mechanisms of collagen isotype-specific modulation of smooth muscle cell phenotype. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009 February;29(2):225-31.
- (28) Panigrahy D, Singer S, Shen LQ, Butterfield CE, Freedman DA, Chen EJ, Moses MA, Kilroy S, Duensing S, Fletcher C, Fletcher JA, Hlatky L, Hahnfeldt P, Folkman J, Kaipainen A. PPARgamma ligands inhibit primary tumor growth and metastasis by inhibiting angiogenesis. *J Clin Invest* 2002 October;110(7):923-32.
- (29) Ricote M, Glass CK. PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochim Biophys Acta* 2007 August;1771(8):926-35.
- (30) Ross R, Masuda J, Raines EW, Gown AM, Katsuda S, Sasahara M, Malden LT, Masuko H, Sato H. Localization of PDGF-B protein in macrophages in all phases of atherogenesis. *Science* 1990 May 25;248(4958):1009-12.
- (31) Ruhl M, Sahin E, Johannsen M, Somasundaram R, Manski D, Riecken EO, Schuppan D. Soluble collagen VI drives serum-starved fibroblasts through S phase and prevents apoptosis via down-regulation of Bax. *J Biol Chem* 1999 November 26;274(48):34361-8.
- (32) Saha S, New LS, Ho HK, Chui WK, Chan EC. Investigation of the role of the thiazolidinedione ring of troglitazone in inducing hepatotoxicity. *Toxicol Lett* 2010 February 1;192(2):141-9.
- (33) Sanger F, Coulson AR, Barrell BG, Smith AJ, Roe BA. Cloning in single-stranded bacteriophage as an aid to rapid DNA sequencing. *J Mol Biol* 1980 October 25;143(2):161-78.
- (34) Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977. *Biotechnology* 1992;24:104-8.
- (35) Schmidt MV, Brune B, von KA. The Nuclear Hormone Receptor PPARgamma as a Therapeutic Target in Major Diseases. *ScientificWorldJournal* 2010;10:2181-97.
- (36) Schneider-Poetsch T, Ju J, Eyler DE, Dang Y, Bhat S, Merrick WC, Green R, Shen B, Liu JO. Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. *Nat Chem Biol* 2010 March;6(3):209-17.
- (37) Schnoor M, Cullen P, Lorkowski J, Stolle K, Robenek H, Troyer D, Rauterberg J, Lorkowski S. Production of type VI collagen by human macrophages: a new dimension in macrophage functional heterogeneity. *J Immunol* 2008 April 15;180(8):5707-19.
- (38) Shin SW, Seo CY, Han H, Han JY, Jeong JS, Kwak JY, Park JI. 15d-PGJ2 induces apoptosis by reactive oxygen species-mediated inactivation of Akt in

leukemia and colorectal cancer cells and shows in vivo antitumor activity. *Clin Cancer Res* 2009 September 1;15(17):5414-25.

- (39) Soderpalm AK, Karlsson J, Caffè AR, vanVeen T. 9-cis-retinoic acid in combination with retinal pigment epithelium induces apoptosis in cultured retinal explants only during early postnatal development. *Brain Res Dev Brain Res* 1999 December 10;118(1-2):169-76.
- (40) Staels B, Fruchart JC. Therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Diabetes* 2005 August;54(8):2460-70.
- (41) Tsukamoto H, Hishinuma T, Tayama R, Narahara K, Suzuki N, Tomioka Y, Goto J. The induction of prostaglandin E synthase and upregulation of cyclooxygenase-2 by 9-cis retinoic acid. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2004 October;74(1-4):61-74.
- (42) Vandooren B, Noordenbos T, Ambarus C, Krausz S, Cantaert T, Yeremenko N, Boumans M, Lutter R, Tak PP, Baeten D. Absence of a classically activated macrophage cytokine signature in peripheral spondylarthritis, including psoriatic arthritis. *Arthritis Rheum* 2009 April;60(4):966-75.
- (43) Voytas D. Agarose gel electrophoresis. In: *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, New York; 1988.
- (44) Vunta H, Davis F, Palempalli UD, Bhat D, Arner RJ, Thompson JT, Peterson DG, Reddy CC, Prabhu KS. The anti-inflammatory effects of selenium are mediated through 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 in macrophages. *J Biol Chem* 2007 June 22;282(25):17964-73.
- (45) Watkins SK, Egilmez NK, Suttles J, Stout RD. IL-12 rapidly alters the functional profile of tumor-associated and tumor-infiltrating macrophages in vitro and in vivo. *J Immunol* 2007 February 1;178(3):1357-62.
- (46) Weitkamp B, Cullen P, Plenz G, Robenek H, Rauterberg J. Human macrophages synthesize type VIII collagen in vitro and in the atherosclerotic plaque. *FASEB J* 1999 August;13(11):1445-57.
- (47) Yin R, Dong YG, Li HL. PPARgamma phosphorylation mediated by JNK MAPK: a potential role in macrophage-derived foam cell formation. *Acta Pharmacol Sin* 2006 September;27(9):1146-52.
- (48) Yokoi T. Troglitazone. *Handb Exp Pharmacol* 2010;(196):419-35.
- (49) Zapata-Gonzalez F, Rueda F, Petriz J, Domingo P, Villarroya F, de MA, Domingo JC. 9-cis-Retinoic acid (9cRA), a retinoid X receptor (RXR) ligand, exerts immunosuppressive effects on dendritic cells by RXR-dependent activation: inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor gamma blocks some of the 9cRA activities, and precludes them to mature phenotype development. *J Immunol* 2007 May 15;178(10):6130-9.

- (50) Zimmermann R, Panzenbock U, Wintersperger A, Levak-Frank S, Graier W, Glatter O, Fritz G, Kostner GM, Zechner R. Lipoprotein lipase mediates the uptake of glycated LDL in fibroblasts, endothelial cells, and macrophages. *Diabetes* 2001 July;50(7):1643-53.

7 Lebenslauf

8 Danksagung

- Mein besonderer Dank gilt Prof. Stefan Lorkowski für die Bereitstellung des Themas, die warmherzige Aufnahme in die Arbeitsgruppe und die hervorragende Betreuung. Sein breites Wissen und seine ständige Diskussionsbereitschaft halfen mir maßgeblich bei der Vorbereitung und Durchführung der Versuche. Ebenso das permanente Gegenlesen während des Verfassens meiner Dissertation war essentiell für ein gutes Gelingen. Ich habe nicht nur viel über die Grundlagen der Arterioskleroseforschung gelernt, sondern bekam auch einen tiefen Einblick in wissenschaftliches Arbeiten und Forschen.
- Ich danke Thomas Böking und Dr. Julia Lorkowski für die warmherzige Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und die praktische Hilfestellung in allen Belangen des Laboralltags. Ich erinnere mich gerne an die vielen lustigen und freundschaftlichen Stunden während des gemeinsamen Arbeitens.
- Ein herzlicher Dank geht auch an Prof. Dr. Paul Cullen für seine Bereitschaft, diese Arbeit zu betreuen und die hilfreiche Diskussion beim Verfassen dieser Schrift.
- Meinen guten Freunden Stefan Schmale und Sascha Trudrung möchte ich für das Korrekturlesen dieser Dissertation herzlich danken. Ihnen und vielen weiteren meiner guten Freunde danke ich für tatkräftige und konsequente Unterstützung sowie für körperlichen und seelischen Ausgleich während meiner gesamten Promotionszeit aber auch während des Medizinstudiums.
- Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester für die Ermöglichung meines Studiums und meiner sonstigen Pläne sowie für die permanente Unterstützung