

*Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin D*

Direktor: Professor Dr. med. Hermann Pavenstädt

*Untersuchungen zur Regulation der Apoptose in humanen
Monozyten durch Statine und Immunsuppressiva*

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des

doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät

der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von:

Abendroth, Martin

aus Haltern am See

2008

Gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-Universität

Dekan: Univ.-Professor Dr. med. Volker Arolt

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Martin Steinmetz

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Detlef Lang

Tag der mündlichen Prüfung: 05.02.2008

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin D
- Direktor: Professor Dr. med. Hermann Pavenstädt -
Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Martin Steinmetz
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Detlef Lang

Zusammenfassung

Untersuchungen zur Regulation der Apoptose in humanen
Monozyten durch Statine und Immunsuppressiva

Martin Abendroth

Neben der Cholesterinsenkung besitzen Statine ein breites Spektrum zusätzlicher Wirkungen. Mit einem Teil dieser Wirkungen hat sich unsere Forschungsgruppe im Rahmen dieser Untersuchungen beschäftigt.

Wir konnten zeigen, dass Simvastatin [1µM] nach 72h bei humanen Monozyten gesunder Probanden eine mittels CD 14 / Annexin V und PI nachweisbare Apoptose auslöst. Der ursächliche Signalweg konnte nicht eindeutig geklärt werden, jedoch konnten wir zeigen, dass sehr wichtige Transduktionswege, wie Caspase-3, CD95, BCL-2 und XIAP unbeeinflusst blieben.

LPS als Wandbestandteil einiger Bakterien kann allein – trotz anti-apoptotischem Effekt unter Serumentzug – ebenfalls eine Apoptose (bereits nach 24h) triggern. Diese scheint jedoch - im Gegensatz zu Simvastatin - Caspase-3 vermittelt zu sein. Bei gleichzeitiger Stimulation mit Simvastatin und LPS tritt erst nach 72h ein additiver Effekt auf die Apoptoserate auf.

Die ebenfalls untersuchten Immunsuppressiva Rapamycin, Cyclosporin A, MMF und FK 506 scheinen hingegen keinen Einfluss auf die Apoptoserate zu haben. Rapamycin allerdings zeigte im Gegensatz zu den anderen Immunsuppressiva Veränderungen der Caspase-3-Expression. Spezifische Wechselwirkungen von einzelnen Immunsuppressiva mit Statinen können ein verändertes Überleben von Monozyten verursachen und so zu einem besseren Langzeitüberleben von Organtransplantaten beitragen. Dieses sollte bei der Therapie berücksichtigt werden und muss im Detail in weiteren Studien untersucht werden.

Tag der mündlichen Prüfung: 05.02.2008

Meiner Mutter

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	4
II.	Einleitung	7
III.	Physiologische Grundlagen	10
	Monozyten	10
	Phagozytose	10
	Apoptose	11
	Materialien und Methoden	15
	Medien, Salz- und sonstige Lösungen	15
	Chemikalien und Reagenzien	16
	Antikörper / Primer	17
	Primäre Antikörper	17
	Sekundäre Antikörper	18
	Primer	18
	Diverse Materialien	18
	Geräte / Software	19
	Stimulantien	20
	Lösung der Substanzen	20
	Immunsuppressiva	21
	Substanzen zur Klärung der Signalwege	22
	Monozytengewinnung	23
	Durchflusszytometrie	25
	Zellvorbereitung für die Durchflusszytometrie	26
	Färbung der Zellen	27
	Western Blot	33
	Zellvorbereitung	33
	Lysierung der Zellen	34
	Proteinmessung	34
	Probenvorbereitung	35
	Gelelektrophorese	35
	Blotten	36
	Proteinnachweis	36
	Polymerasekettenreaktion	37
	Zellvorbereitung	37
	RNS-Präparation	37
	Reverse Transkription	38

RNS-Amplifikation mittels PCR	39
Auftrennung mittels Agarose-Gel	40
Vorbereitung der amplifizierten mRNA und Auftrennung.....	40
Auswertung	40
Verwendete Primer	41
Statistische Auswertung.....	41
IV. Ergebnisse.....	42
Apoptose.....	42
Apoptoseinduktion durch Simvastatin	42
Signalweg der Apoptoseinduktion durch Simvastatin.....	43
Andere Statine und ihr Einfluss auf die Apoptose	45
Apoptoseinduktion durch Simvastatin im in-vitro-Modell der bakteriellen Sepsis	46
Signalweg der Apoptoseinduktion durch Simvastatin im in-vitro-Modell der bakteriellen Sepsis	48
Apoptoseinduktion durch Immunsuppressiva allein oder in Kombination?	50
Wirkung von Immunsuppressiva allein oder in Kombination auf verschiedene Signalkaskaden der Apoptose	50
Beeinflussung der zellulären Reaktion auf LPS	52
Beeinflussung der zellulären Stressantwort	54
Hämoxygenase-1 (HO-1)	54
Beeinflussung der Blutgerinnung	55
Beeinflussung der Proteinkinase C und Auswirkungen auf verschiedene Signaltransduktionswege	56
V. Diskussion	59
Apoptose: Beeinflussung durch Simvastatin, Immunsuppressiva und LPS ..	59
Ursache: mögliche Signalwege der Apoptose und anderer klinischer Effekte	63
Caspase-3	63
Fas/CD95	65
Bcl-2	66
XIAP	67
HO-1	69
Tissue Factor	69
TLR-4	71

Klinische Bedeutung	72
Transplantatfunktion.....	72
Arteriosklerose	74
Maligne Neoplasien.....	75
VI. Abbildungs-, Tabellen- und Abkürzungsverzeichnis	77
Abkürzungen.....	77
Abbildungen.....	78
Tabellen	78
Graphen / Diagramme	79
VII. Danksagung	80
VIII. Lebenslauf	81
IX. Literaturverzeichnis.....	82

II. Einleitung

Quasi jedes Lebewesen besitzt ein Immunsystem als Schutz vor Infektionen. Bei Menschen ist dieses in die unspezifische, angeborene Immunabwehr und in die spezifische Immunabwehr aufgeteilt. Im Rahmen der angeborenen Immunabwehr können Antigene und verschiedenste Erreger ohne vorherige Antigen-Antikörper-Reaktion erkannt und vernichtet werden.

Einer der zentralen Bestandteile dieses Systems sind die Monozyten. Sie, und ihre differenzierte Form, die Makrophagen, sind, zur Phagozytose befähigt, an einer Großzahl immunologischer Vorgänge beteiligt.

Sie spielen nicht nur eine Rolle bei Abwehr von Krankheitserregern, sondern haben auch wesentlichen Einfluss auf „moderne“ Gesellschaftserkrankungen. Die sog. „western style“ Diät, fettreich und ballaststoffarm, geht häufig mit Übergewicht und erhöhten Blutfettwerten einher. Folge sind Arteriosklerose und Diabetes mellitus Typ 2. Gerade bei der Entstehung der Arteriosklerose spielen Monozyten schon frühzeitig eine Schlüsselrolle (98;105). Vermittelt durch den Scavenger-Rezeptor phagozytieren sie LDL, vergrößern sich zu Schaumzellen (39;54) und verkleinern somit durch ihre Adhärenz am Gefäßendothel und prothrombotische Aktivierung das Lumen, mit der langfristigen Folge z.B. einer pAVK. Dort verbleiben sie und werden schließlich reendothelialisiert, d.h. von Gefäßendothel und einer dünnen Bindegewebsschicht überwachsen. Diese „Kappe“ ist jedoch auch zugleich die Schwachstelle der Plaque. Sie ist in ihrer Gesamtheit keine feste, stabile Einheit sondern weist eine rege Stoffwechselaktivität auf und unterzieht sich weiterhin kontinuierlichen Umbaumaßnahmen (73). Ein Großteil der koronaren Gefäßverschlüsse beruht z.B. auf einer Ruptur jener bindegewebigen Deckschicht mit anschließender Bildung eines Thrombus.

Mit der Entwicklung der Statine stehen hochpotente Modulatoren für diese Prozesse zur Verfügung. Als Inhibitoren der intrazellulären Cholesterinsynthese ermöglichen sie es uns, die LDL-Werte effektiv zu senken und bewirken weiterhin durch ihre positiven Auswirkungen auf die Zahl der

Entzündungszellen eine Stabilisierung der Plaque (74). Statine sind daher in der Lage das Arterioskleroserisiko wirkungsvoll zu reduzieren und werden dementsprechend häufig verordnet.

„Schon jetzt sind Cholesterin-Synthese-Hemmer, auch Statine genannt, die kommerziell erfolgreichste Wirkstoffklasse aller Zeiten. Als weltweit erstes Präparat nahm Pfizers Marktführer Sortis im letzten Jahr die Zehn-Milliarden-Dollar-Hürde - das Fünffache des Umsatzes, den der Konzern mit seinem Potenzmittel Viagra schafft. Platz zwei der Medikamenten-Hitliste hält Merck mit dem Konkurrenzprodukt Zocor, ebenfalls ein Cholesterinsenker. Alle Statine zusammen generieren weltweit einen jährlichen Umsatz von 26 Milliarden Dollar. „ (Entnommen aus Spiegel Online, Ausgabe vom 25.10.2004, Autorin Birgit Will)

Obiger Artikel und die mit Statinen erzielten Umsätze (Simvastatin und Omeprazol sind z.B. die umsatzstärksten Medikamente der Firma Stada) sprechen eine klare Sprache. Immer mehr Menschen erhalten von ihrem behandelnden Arzt einen HMG-CoA-Reduktase-Hemmer, auch wegen der multiplen positiven Wirkungen dieser Substanzklasse, die nicht allein auf der Senkung des Serum-Cholesterins beruhen.

Für die Entwicklung der modernen Transplantationsmedizin, an der Christiaan Barnard mit der ersten erfolgreich durchgeführten Herztransplantation am 2. Dezember 1967 führend beteiligt war, ist eine Unterdrückung des Immunsystems erforderlich. Eigentlich dazu geschaffen, den Körper vor Infektionen und Fremdkörpern zu schützen, muss die Immunantwort unterdrückt werden um das Überleben des Transplantates zu ermöglichen. Es folgte eine rasante Entwicklung immer neuer Immunsuppressiva. Angefangen bei unspezifischen Medikamenten wie Cortison und Azathioprin, gipfelte die Entwicklung in den letzten Jahren in immer spezifischeren Wirkstoffen, die mit einer besseren Wirksamkeit und einem günstigeren Nebenwirkungsprofil aufwarten. Von Calcineurin-Inhibitoren, über Neuentwicklungen wie FTY720, bis hin zu Hybrid-Antikörpern wie dem Anti-T-Lymphozyten-Globulin steht der Medizin heute eine breite Palette an hervorragenden Präparaten zur Verfügung. Ihre primäre Wirkung entfalten sie zumeist dadurch, dass sie auf das Gefüge

zwischen T- und B-Lymphozyten einwirken und somit die Abstoßung unterdrücken. Zusätzliche Wirkmechanismen sind jedoch nicht auszuschließen.

Sehr früh wurde erkannt, dass Patienten nach Nierentransplantation – im Vergleich zur Normalbevölkerung - ein vierfach erhöhtes Risiko für ein nicht-tödliches kardiovaskuläres Ereignis haben (55). Ebenso konnte im Rahmen der Langzeitabstoßung bei Herztransplantierten gezeigt werden, dass es zu einer konzentrischen Intima-Proliferation kommt (61). Hierbei spielen immunologische aber auch nichtimmunologische Prozesse eine Rolle.

Ausgehend von diesen vaskulären Veränderungen wird die Frage aufgeworfen, inwiefern Statine, entwickelt um erhöhte LDL-Werte zu behandeln, Einfluss auf diese Prozesse nehmen können. Stellte man doch fest, dass Statine weit mehr als eine LDL-Senkung zu bewirken vermögen und sie sogar Einfluss auf das Immunsystem zu nehmen scheinen (17). *Erl et al.* zeigten weiterhin, dass Statine die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen hemmen und stattdessen eine Apoptose induzieren können (33). Über eine Reduktion der Tissue Factor-Produktion können Statine *in vitro* sogar Einfluss auf die Blutgerinnung nehmen (35).

Unabhängig von den sich überschneidenden Wirkungen beider Medikamentengruppen, stellt man im klinischen Alltag häufig fest, dass organtransplantierte Patienten mit einem Statin behandelt werden müssen. D.h. beide Medikamente werden zeitgleich eingesetzt und können somit ein breites Spektrum an Neben- und Wechselwirkungen entwickeln.

Ziel dieser Arbeit war es, die potentiellen Wirkungen von Statinen auf humane Monozyten, als wesentliche immunologische Effektorzellen, zu charakterisieren. Außerdem wurde auch die Kombination beider Stoffgruppen, wie sie im klinischen Alltag routinemäßig vorkommt, untersucht, um die dabei entstehenden Wechselwirkungen auf Monozyten *in-vitro* aufzuzuzeigen.

III. Physiologische Grundlagen

Monozyten

Monozyten sind Teil des Monozyten-Makrophagen-Systems (MMS) in dem alle von Monozyten abstammenden phagozytierenden Zellen zusammengefasst werden. Somit fasst das MMS die Zellen der unspezifischen, angeborenen Immunabwehr zusammen.

Ihren Ursprung haben die Zellen des MMS im Knochenmark, von wo aus sie als periphere Blutmonozyten sowie als spezialisierte (d.h. Gewebe-spezifische Unterformen) und nicht-spezialisierte Makrophagen hervorgehen.

Monozyten gehören mit ihrer durchschnittlichen Größe von 12-15 µm zu den größten mononukleären Zellen, die im Blutkreislauf zu finden sind. Mit ca. 100-1000 Monozyten/µl stellen sie zwischen 2% und 6% der Leukozytenfraktion dar. Mikroskopisch sind ihre zahlreichen Organellen des basophilen Zytoplasmas als Equivalent ihrer produktiven Leistung, sowie zahlreiche Mitochondrien und ein ausgeprägter Golgi-Apparat auffällig.

Im Gewebe differenzieren Monozyten größtenteils zu Makrophagen. Diese sind mit einer Durchschnittsgröße von 12-30 µm einiges größer als periphere Blutmonozyten.

Phagozytose

Zu den physiologischen Hauptaufgaben der Monozyten/Makrophagen gehört die Phagozytose von Zell-Detritus und Noxen. Diese entstehen im Rahmen von Entzündungen aber auch Apoptose (68). Phagozytose wird über ein breites Spektrum von Rezeptoren vermittelt – z.B. Scavenger-Rezeptoren, LDL-Rezeptor SR-A, Vitronektin CD36 und LPS-Rezeptor CD14, um nur einige zu nennen. Hinzu kommen noch Fc-Rezeptoren (Ligand: Antikörper-besetzte Partikel) und die Rezeptoren CR1-CR4 (Ligand: Faktoren des Komplementsystems), die besonders bei der Immunantwort eine Rolle spielen. Durch die „Zwischenschaltung“ von Antikörpern bzw. Komplementsystem

stellen verschiedenste Antigene einen einheitlichen Phagozytose-Reiz für Monozyten dar, so dass keine Spezialisierung seitens der Makrophagen auf bestimmte Antigene erforderlich ist.

Nach der Phagozytose findet ein intrazellulärer Abbau statt, an dem verschiedene Mechanismen beteiligt sind: saurer pH-Wert, Bildung von Superoxid O_2^- , Wasserstoffperoxid H_2O_2 , Stickstoffmonoxid NO, Defensine und kationische Proteine (antimikrobielle Peptide), Lysozym und Kompetitoren (z.B. Eisen-bindendes Laktoferrin).

Handelt es sich bei dem phagozytierten Partikel um einen Infektionserreger, so werden anschließend einzelne Fragmente davon per MHC-II präsentiert.

Gerade bei der Entsorgung apoptotischer Zellen erfüllt das MMS eine wichtige Rolle. Zum einen wird durch die zügige Phagozytose ein Freiwerden proinflammatorischer Zytokine effektiv verhindert, zum anderen werden inhibitorische Zytokine wie TGF- β 1, IL-10 und PGE₂ sezerniert, wodurch auf lokaler Ebene eine weitere Entzündungsreaktion unterdrückt wird.

Um eine wirkungsvolle Kontrolle der Phagozytose zu gewährleisten, bedient sich der Körper einiger Regelmechanismen. Für INF- γ und IL-4 konnten hemmende, für TNF- α eskalierende und für IL-10, in Abhängigkeit von Zelltyp und Milieu, pro- und anti-phagozytotische Effekte gezeigt werden. Primär hat Phagozytose keinen Einfluss auf eine mögliche Selbsttötung des Phagozyten. Es konnte aber gezeigt werden, dass die Phagozytose bestimmter Zellen pro- oder anti-apoptotische Wirkungen hat. So konnte bereits in der Vergangenheit durch unsere Forschungsgruppe gezeigt werden, dass die Phagozytose von Thrombozyten durch Monozyten die durch Serum-Entzug ausgelöste Apoptose der Monozyten wirkungsvoll unterdrückt (66).

Apoptose

Apoptose stellt einen autoregulierten, aktiven Prozess des Zell-Selbstmordes dar. Dieser kann durch externe Signale über Rezeptor-Ligandeninteraktion

induziert werden. Äußerlich gekennzeichnet ist der programmierte Zelltod durch das Fehlen von Entzündungszeichen, da er auf einem genetisch bedingten Programm, welches durch natürliche oder artifizielle (z.B. Medikamente) Trigger ausgelöst werden kann, beruht. Der Vorgang des Zellsterbens muß nicht durch eine von außen stammende Schädigung verursacht sein, sondern kann durch extrazelluläre Mediatoren intrazelluläre Signalwege aktivieren, die zum Zelltod führen. Dies kann beispielsweise auch die Reduktion von Nährstoffen im Kulturmedium sein.

Die Apoptose stellt hierbei eine der grundlegenden Voraussetzungen zur aktiven Entwicklung, Organisation und Umstrukturierung von Geweben und vielzelligen Lebewesen dar (52;78;106). Sie ermöglicht es dem Organismus spezifisch auf die Zellanzahl und –zusammensetzung, sowie auf die Eliminierung geschädigter oder nicht mehr benötigter Zellen Einfluss zu nehmen. Sei es im Rahmen einer Gewebeinvolution oder als Folge einer Infektion oder Zellentartung (104;120).

Verstand man früher unter Zelltod immer sofort Nekrose (78), musste man später jedoch erkennen, dass es eine zweite Form von Zelltod gibt, die äußerlich mit der oft durch Noxen ausgelösten Nekrose nichts gemeinsam hat. Nekrotische Zellen sind durch eine initiale Zellschwellung gekennzeichnet, beruhend auf einer erhöhten Membranpermeabilität. Dies führt zur Zerstörung von Organellen, zur Karyolyse und letztendlich zum Platzen der Zelle. Da der gesamte Vorgang eher ungeordnet abläuft, werden im Rahmen des Zellunterganges Enzyme und Zytokine freigesetzt. Ein Teil der Enzyme befindet sich bereits in der aktiven Form (vor allem Proteasen und Hydrolasen) und schädigt die umliegenden Zellen. Dies bedeutet, dass die Nekrose, im Gegensatz zur Apoptose, nicht auf eine einzelne Zelle beschränkt ist, sondern auch immer eine Schädigung umliegender Zellen beinhaltet. Ausgelöst durch den gehäuften Zelluntergang und die Freisetzung von pro-inflammatorischen Botenstoffen kommt es zu einer Entzündung des Gewebes mit daraus resultierender Gewebeschädigung, die nicht immer in den Status einer Restitutio ad integrum zurückgeführt werden kann.

	Apoptose	Nekrose
Auslöser	Endogene Signalkaskade (z.B. Caspasen), ggf. durch extrazellulären Trigger ausgelöst	Exogene Ursachen, z.B. hohe Temperaturen (Verbrennungen) oder toxische Substanzen (z.B. Alkohol), Verlust des Transmembranionengradienten, zellulärer Stoffwechsellkollaps
Zellmorphologie		
Zellkern	Chromatinkondensation	Chromatinklumpung
Zytoplasma	intakt	degeneriert
Zellmembran	„apoptotic bodies“ Zelle nicht mit PI anfärbbar	Verlust der Integrität Zelle mit PI anfärbbar
Organelle	intakt	degeneriert
Zellvolumen	Schrumpfung	Anschwellung
Freisetzung	Nein	Ja, von Zytokinen und Enzymen
Gewebe	Einzelzellen	Zellverbände
Folge	Keine Schädigung	Entzündung

Vollkommen anders sieht jedoch die Zellmorphologie apoptotischer Zellen aus. Bei erhaltener Zellintegrität findet eine Zellschrumpfung statt. Im Kern ist eine Chromatinkondensation mit anschließender Kernfragmentation zu beobachten, so dass abschließend apoptotische Körperchen sichtbar werden. Die darauf folgende Phagozytose verhindert fast vollständig die Freisetzung intrazellulärer Bestandteile. Da diese als pro-inflammatorische Trigger dienen würden, kommt es folglich aufgrund des fehlenden Stimulus, nicht zu einer entzündlichen Reaktion. Somit wird das umliegende Gewebe geschont und eine Gewebsschädigung vermieden.

Im Wechselspiel mit der Mitose ermöglicht es uns die Apoptose das körpereigene Gleichgewicht aus Zellbildung und Zelltod zu bewahren. Ohne sie wäre keine physiologische Entwicklung möglich. Weder Embryonalentwicklung, Wachstum und Pubertät noch Immunsystem könnten ohne den Regelkreis der Apoptose in sinnvolle Bahnen gelenkt werden, wodurch die menschliche Existenz (und damit auch die aller mehrzelligen Organismen) unmöglich würde. Ein gutes Beispiel hierfür sind sicherlich all jene Erkrankungen, die auf einer gestörten Regulation der Apoptose beruhen. So treten beispielsweise beim

systemischen Lupus erythematodes gehäuft Apoptosen bei T-Lymphozyten auf, was wiederum zu verstärkter Aktivität der B-Lymphozyten führt (65).

Trotz der sicherlich weit reichenden Forschungen konnten viele Aspekte der Apoptose noch nicht ausreichend geklärt werden. Hier besteht daher für die Forschung noch Handlungsbedarf, bietet die Apoptoseforschung doch ein großes Potential zur Lösung vieler medizinischer Probleme. Ein breites Spektrum an Erkrankungen könnte durch die gezielte Auslösung oder auch Verhinderung der Apoptose-Kaskade behandelt werden. Zu nennen seien hier nur einige, wie z.B. maligne Neoplasien, Alterungsprozesse, degenerative Hirnerkrankungen (z.B. Parkinson), Autoimmunerkrankungen oder andere Immunstörungen.

Festzuhalten ist daher, dass die Apoptoseforschung als fächerübergreifender Forschungsschwerpunkt der Medizin in den kommenden Jahren für therapeutische Ansätze wesentliche Impulse liefern wird.

Materialien und Methoden

Medien, Salz- und sonstige Lösungen

Bezeichnung	Hersteller
Aqua bidest	Apotheke Uni Münster
FACS Flow	Becton Dickinson
FACS-Puffer 500 ml PBS + 250 mg NaAcid 250 µl FCS	Merck
Fetales Kälber-Serum (FCS)	Biochrom
L-Glutamin	Invitrogen
Lymphozytenseparationsmedium	PAA Laboratories GmbH
Medium 0% 500 ml RPMI 1640 5 ml Penicillin 5 ml Streptomycin 5 ml L-Glutamin 5 ml Hapes-Buffer 1,7 ml Mercapotethanol	PAA Laboratories GmbH
Medium 0,2% 500 ml RPMI 1640 1 ml FCS 5 ml Penicillin 5 ml Streptomycin 5 ml L-Glutamin 5 ml Hapes-Buffer 1,7 ml Mercapotethanol	
Medium 5% 500 ml RPMI 1640 25 ml FCS 5 ml Penicillin 5 ml Streptomycin 5 ml L-Glutamin 5 ml Hapes-Buffer 1,7 ml Mercapotethanol	
PBS 10x	PAA Laboratories GmbH
Penicillin 50 U/ml	Biochrom
Percoll	Amsterdam Biosciences
Phosphate Buffered Saline (1x) with Calcium and Magnesium (PBS+)	PAA Laboratories GmbH
Phosphate Buffered Saline (1x) without Calcium and Magnesium (PBS-)	PAA Laboratories GmbH
RNAse free water	Qiagen

RPMI 1640 (1x) glutaminfrei
Streptomycin 50µg/ml

PAA Laboratories GmbH
Biochrom

Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Agarose	Peq-Lab
Annexin-V-FITC	BD Pharmingen
Bromphenolblau	Sigma
Cyclosporin A	Sigma
DNase I stock solution DNase Aqua dest	Qiagen-Kit
dNTPs	Sigma
Ethanol	Apotheke Uni Münster
HCl	Apotheke Uni Münster
Hemin Chloride / Hämin	Sigma
Hepes-Buffer	Biochrom
LPS E. coli	Sigma
Lysepuffer Triton X 100 0,5%ig 1,542 g/10 ml DTT 0,0136 g/10 ml Natriumacetat pH 5,2	Merck Sigma Sigma
Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Sigma
MMF	Roche Bioscience
NaAcid	Merck
NaOH	Bernd Kraft
NuPage Bis-Tris Gel	Novex
NuPage LDS Saper Buffer (4x)	Novex
NuPage MOPS SDS Running Buffer (20x)	Novex
Paraformaldehyd-Puffer PBS+ 4% Paraphormaldehyd pH 7,4	Sigma
PCR Puffer 10x	Invitrogen
Propidiumiodid	Sigma
Rapamycin	Sigma
Reverse Transkriptase (50 U/µl)	StrataScript
Running-Buffer 25 ml NuPage Transfer-Puffer 20fach 475 ml Aqua dest	Novex
RW1-Buffer	Qiagen

Saponin-Puffer PBS+ 2% Hepes-Buffer 1% Rinderalbumin (BSA) 0,1% Saponin pH 7,4	Merck Sigma
Simvastatin	Calbiochem
Tacrolimus (FK 506)	Sigma
TAE-Puffer 9,3 g EDTA 121 g TRIS 28,6 ml Eisessig Aqua dest ad 500 ml	Sigma Sigma Merck
Taq-Polymerase [5U / μ l]	Invitrogen
TBS (1x) / Casein-Blockingreagenz	BioRad
Transfer-Puffer 10 ml NuPage Transfer-Puffer 20fach 190 ml Aqua dest	Novex
Tris-Puffer 7,9 g Trizma Hydrochlorid 2,9 g NaCl 5,1 g MgCl ₂ ad 500 ml mit Aqua dest pH 8.0	Sigma Merck Merck
TTBS-Puffer 8 g Trizma-Hydrochlorid 8,8 g NaCl 1 ml 0,1 Vol% Tween 1000 ml Aqua dest 1 M NaOH ad pH 7,4	Sigma Merck Merck

Antikörper / Primer

PRIMÄRE ANTIKÖRPER

Gerichtet gegen	Ursprung	Farbstoff	Hersteller
Annexin V	Rekombinant	FITC	BD Pharmingen
Bcl-2	Maus, monoklonal	FITC	BD Pharmingen
Caspase-3	Kaninchen, polyklonal	PE	BD Pharmingen
CD14	Maus, monoklonal	PE	Becton Dickinson

CD95	Maus, monoklonal	FITC	BD Pharmingen
Heme-Oxygenase-1	Maus, monoklonal	---	Stress Gen
Tissue factor	Maus, monoklonal	FITC	America diagnostica
TLR4	Maus, monoklonal	FITC	BD Pharmingen

SEKUNDÄRE ANTIKÖRPER

Gerichtet gegen	Ursprung	Farbstoff	Hersteller
Anti-Maus	Kaninchen	FITC	Dakopatts

PRIMER

Spezifisch für	Hersteller
XIAP	Becton Dickinson

Diverse Materialien

Bezeichnung	Hersteller
ELISA-Platte 96 Wells	Greiner Labortechnik
Eppendorf Tubes 1,5 ml	Eppendorf
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson
Filterpapier	Schleicher & Schuell
Leucosep-Röhrchen	Greiner Labortechnik
Percoll Zentrifugenröhrchen	Greiner Labortechnik
PVDF-Membran	Roche Diagnostics
Zellkulturplatte – 24 Wells	Greiner Labortechnik
Zentrifugenröhrchen mit Polyestermembran	Greiner Labortechnik
Zentrifugenröhrchen ohne Polyestermembran	Greiner Labortechnik

Geräte / Software

Bezeichnung	Hersteller
Blot Modul	Novex
Brutschrank Heraeus electronic (37°C, 5% CO ₂ , 95% Außenluft)	Heraeus
Combi-Clicker	Sarstaedt
Durchflusscytometer FACScan + Software Lysis II & Cell Quest	Becton Dickinson
Elektrophoresekammer A 4581	Biometra
ELISA-Reader Spectra	TECAN
Eppendorf-Pipetten	Sarstedt
Exel ®	Microsoft Corporation
Gefrierschrank Öko Arctis -20°C	AEG
Gefrierschrank VIP series MDS-U70V	Sanyo
Hamilton-Spritze 25µl	Hamilton
Heizblock Dri Block DB 2A	Techne
Kühlschrank 4°C + Gefrierfach -18°C	Bosch
Mikroskop Televal 31	Zeiss
Neubauer Zählkammer	Hecht
PCR-Elektrophoresekammer	Biometra
pH-Meter CG 840	Schott
Pipetus-akku	Hirschmann
RNA/DNA Calculator (Gene Quant II)	Pharmacic Biotech
Lumi Imager (Westernblot und PCR-Auswertung)	Roche
Rührfisch MR 2002	Heidolph
Rüttler IKA VIBRAX-VXR	Janke&Kunkel IKA-Werk
Software für Proteinbestimmung Western Blot	Pharmacic Biotech
Spannungsgerät Power Pack P 25	Biometra
Thermoblock TB1	Biometra
UV-Schirm Quick Store	Rothaar & Schroeder
Volt-Ampere-Meter	Biometra
Werkbank, Laminaer HA 2472 GS	Heraeus
WinMDI 2.8	Joseph Trotter
Zentrifuge Biofuge 28RS (Zentrifugation 4°C)	Heraeus Sepatech
Zentrifuge TJ-6	Beckmann

Stimulantien

3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-Coenzym A-Reduktase Inhibitoren (HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren = Statine)

Alle Statine greifen in die Cholesterinbiosynthese ein, indem sie den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt von HMG-CoA zu Mevalonat kompetitiv hemmen. Die heute als Typ I bezeichneten Statine (Lovastatin, Simvastatin, Pravastatin) haben neben dem HMG-Modul einen starren hydrophoben Anteil (siehe Abbildung). Die vollsynthetischen Inhibitoren (Atorvastatin, Fluvastatin, Rosuvastatin), auch als Typ II bezeichnet, haben längere Seitenketten, die mehr oder weniger hydrophob sind.

Statine hemmen die Cholesterinbiosynthese intrazellulär auf einer frühen Stufe, der Umwandlung von HMG-CoA zu Mevalonat. Der dadurch induzierte Mangel an intrazellulärem Cholesterin führt zu einer gesteigerten Transkription des LDL-Rezeptor-Gens. Die Zahl der LDL-Rezeptoren auf der Zelloberfläche nimmt zu. Die Zellen decken ihren Cholesterinbedarf durch gesteigerte Aufnahme von LDL-Cholesterin aus dem Plasma, woraus ein Sinken des LDL-Plasmaspiegels resultiert.

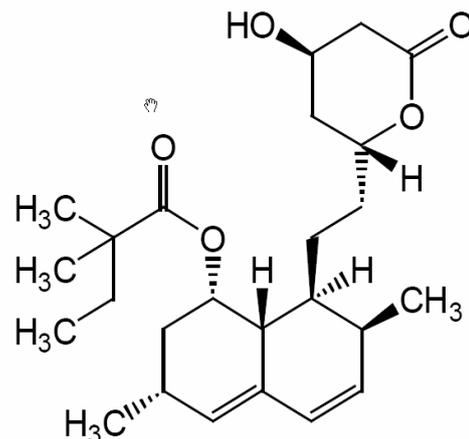


Abbildung 1: Strukturformel Simvastatin

Lösung der Substanzen

Alle verwendeten Stoffe wurden – mit Ausnahme des Simvastatins – zu Beginn gemäß der Herstellerangaben gelöst, aliquotiert, eingefroren und bei Verwendung wieder aufgetaut. Simvastatin hingegen wurde laut Herstellerangaben in 1ml Ethanol + 0,8 ml 1 M NaOH gelöst, zu je 50 µl aliquotiert und bei -83°C eingefroren. Vor der Verwendung wurde das Simvastatin durch titrierende Zugabe von 1 M HCl in einen neutralen pH-Wert-

Bereich gebracht und entsprechend der gewünschten Konzentration mit einer Lösung aus Ethanol und 1 M NaOH (Verhältnis 1:0,8) verdünnt.

IMMUNSUPPRESSIVA

Cyclosporin A

Das wasserunlösliche cyclische Peptid wird vom Pilz *Polypocladium inflatum* gebildet. Es hemmt mit hoher Selektivität die Bildung von Lymphokinen, die bei der Aktivierung von T-Lymphozyten induziert werden. Dazu gehört Interleukin-2, so dass die Expansion antigenspezifischer T-Lymphozyten unterbleibt.

Cyclosporin A bindet an einen cytosolischen Rezeptor (Cyclophilin = Enzym Prolin-cis/trans-Isomerase). Hierdurch wird die Proteinphosphatase Calcineurin blockiert, wodurch die Aktivierung und Translokation in den Kern einiger Transkriptionsfaktoren wie NFAT oder NF- κ B gehemmt wird.

FK 506 (Tacrolimus)

Tacrolimus gehört chemisch zu den Makroliden. Wie Cyclosporin A bindet es an einen zytosolischen Rezeptor, das „FK binding protein-12“ (FKBP-12). Dadurch kommt es, wie auch beim Cyclosporin A, zu einer Inhibition von Calcineurin (daher auch Gruppe der Calcineurin-Inhibitoren) wodurch die Umwandlung des spezifischen Transkriptionsfaktors NFAT-P zu NFAT (nukleärer Faktor aktivierter T-Lymphozyten) unterbunden wird.

Der dem Cyclosporin A ähnliche Wirkungsmechanismus beruht auf einer Hemmung der Aktivierung vor allem von T-Lymphozyten und somit der zellulären Immunreaktion.

Mycophenolatmofetil (MMF)

MMF ist ein „Prodrug“, dessen aktiver Metabolit die Mycophenolsäure ist. Diese ist ein Gärungsprodukt verschiedener Pilzarten der Gattung *Penicillium*.

Mycophenolsäure hemmt die Inosinmonophosphat-Dehydrogenase, ein Schlüsselenzym bei der De-novo-Synthese von Purinen, auf die vor allem T- und B-Lymphozyten angewiesen sind.

Sirolimus (Rapamycin)

Sirolimus wurde aus *Streptomyces hygroscopicus* isoliert und weist eine große strukturelle Ähnlichkeit zu Tacrolimus auf. Nach Bindung an seinen cytosolischen Rezeptor FKBP-12 wirkt es jedoch nicht als Calcineurininhibitor, sondern inhibiert stattdessen die multifunktionelle Serin-/Threonin-Kinase mTOR (mammalian target of rapamycin). Dadurch wird im Weiteren die für die Zellproliferation notwendige Aktivierung der S6-Kinase unterbunden.

SUBSTANZEN ZUR KLÄRUNG DER SIGNALWEGE

Calphostin

Calphostin gehört zur Gruppe der Proteinkinase C-Inhibitoren (PKC-Inhibitoren) (62). Gewonnen wird es aus dem Pilz *Cladsporium cladosporides* und ist somit mikrobiellen Ursprungs (107).

Die PKC ist Teil der Signalkaskade: Aktivierung der Phospholipase C > Aufspaltung von Phosphatidylinositolbisphosphat zu Inositol-Trisphosphat (setzt Ca^{2+} frei) und Diacylglycerol (aktiviert zusammen mit dem freigesetzten Calcium die Proteinkinase C) (11).

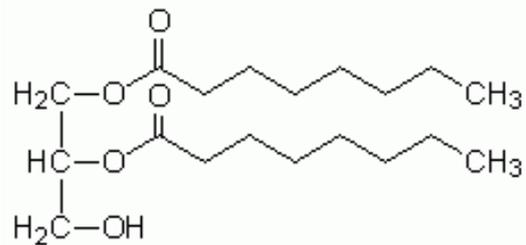
Aufgabe der PKC ist die Übertragung von Phosphat auf Serin- oder Threoningruppen, wodurch sie steuernden Einfluss auf nachgeordnete Enzyme oder Faktoren besitzt. So ist die PKC z.B. maßgeblich an der Signaltransduktion am $\alpha 1$ -Rezeptor beteiligt.

Wichtige durch die PKC modifizierte Proteine sind die sog. MARCKS (myristiliertes Alanin-reiches C-Kinase Substrat), die an wichtigen physiologischen Vorgängen wie Zellbewegung, Sekretion, Membrantransport und Regulation des Zellzyklus beteiligt sind (76).

Interessant ist in diesem Zusammenhang auch der regulierende Einfluss der PKC auf die Tissue-factor-Expression (26;110).

1,2-Dioctanoyl-sn-glycerol (DOG)

1,2-Dioctanoyl-sn-glycerol ist ein zellwandgängiges Analogon des PKC-aktivierenden second messenger DAG (Diacylglycerin).



👁️ Abbildung 2: Strukturformel 1,2-Dioctanoyl-sn-glycerol

Hämin (Teichmanns Kristalle)

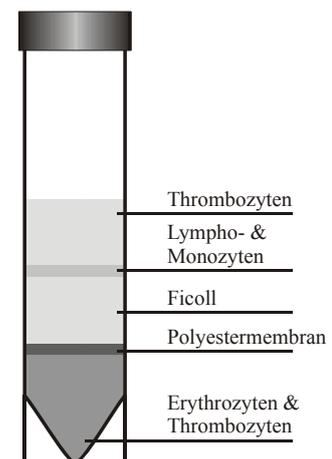
Hämin ist die Bezeichnung für Chlorhämatin (aus Protoporphyrin IX, Eisen-III u. Chlor), gebildet durch Oxidation von Häm (z.B. bei Hämoglobinumsetzung mit kochsalzgesättigtem Eisessig als Hämin- oder Teichmann-Kristalle). Hämine werden in Alkalien zu Hämatin, mit organischen Basen zu Hämi- bzw. Hämochromen (2).

In vivo erfolgt der Abbau von Hämin durch die sog. Häm-Oxygenasen, z.B. HO-1 (4;51).

Monozytengewinnung

Die Monozyten stammen aus den Vollblutspenden gesunder Spender des DRK Blutspendedienstes Münster. Im Rahmen der Aufbereitung am Folgetag werden Monozyten, Lymphozyten usw. als so genannter Buffy Coat ausgesondert.

20 ml des Buffy Coats werden zunächst auf 50 ml mit PBS- verdünnt und dann 10 Minuten bei 250g und Bremse hoch herunterzentrifugiert (Zentrifuge immer TJ6, wenn nicht anders angegeben). Das Plasma wird abgesaugt, das Pellet wird mit PBS- auf 50 ml



👁️ Abbildung 3: Phasen nach der Zentrifugation über einer Polyestermembran. Lympho- und Monozyten befinden sich in der Interphase

resuspendiert. 25 ml dieser Suspension werden über den Filter eines mit 15 ml Lymphozytenseparationsmedium (Ficoll) gefüllten Leucosept-Röhrchens geschichtet. Nach erneuter Zentrifugation (250g, 20 Minuten, Bremse aus) wird die Interphase abgesaugt (siehe „Lympho- und Monozyten“ Abbildung oben), mit PBS+ auf 50ml resuspendiert und erneut zentrifugiert (250 g, 10 Minuten, Bremse hoch).

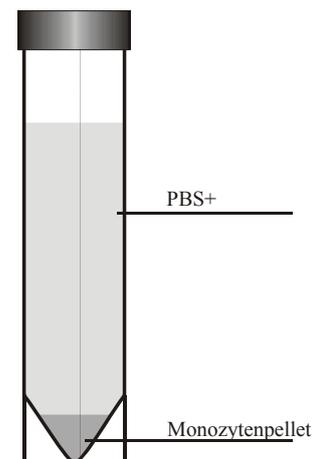
Für die weitere Zellseparation werden zunächst zwei weitere Lösungen vorbereitet:

Lösung A) 36 ml Percoll + 4 ml PBS10x

Lösung B) 19,3 ml Medium 0% + 25,7 ml Lösung A

Das nach der Zentrifugation entstehende Pellet wird mit Lösung B auf 40 ml aufgefüllt. Je Buffy Coat werden acht Percoll Zentrifugenröhrchen mit 2 ml PBS+ gefüllt. Mithilfe von Pasteur Pipetten werden 5ml der Zellsuspension

unter das PBS+ gegeben. Darunter wird wiederum 1 ml der Lösung A geschichtet. Nach erneuter Zentrifugation (Biofuge, 4°C, 1000g, 30 Minuten, Brake low) werden die entstandenen Interphasen abgesaugt, gesammelt und mit PBS+ auf 50 ml resuspendiert. Um die Zellzahl bestimmen zu können, werden 50 µl der Zelllösung + 450 µl PBS+ vermischt und in einer Zählkammer unter dem Mikroskop gezählt. Die 50 ml Zellsuspension werden erneut zentrifugiert. Abschließend wird das Zellpellet (siehe Abbildung rechts) mit soviel Medium 0% resuspendiert, dass eine Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml entsteht. Jeweils 1 ml/Well der Zelllösung wird 1h im Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit kommt es zur



👁️ Abbildung 4: Gut sichtbares Monozytenpellet nach erfolgreicher Separation und erneuter Zentrifugation

Adhäsion der Monozyten am Kunststoff. Im darauf folgenden Waschvorgang mit 750µl PBS+ je Well werden die Lymphozyten ausgewaschen. Zum Schluss wird das Nährmedium incl. eventueller Zusätze zugegeben und die Zellen werden erneut im Brutschrank inkubiert.

Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie werden in Lösung gebrachte Zellen einzeln mit Lasern bestimmter Wellenlänge bestrahlt. Durch entsprechende Detektoren kann dadurch die Größe der Zellen (sog. Forward Scatter, FCS) und die Granulierung des Zellinneren (sog. Side Scatter, SCS) bestimmt werden. Durch Darstellung dieser beiden Werte in einem Dot Plot können gesunde und apoptotische Monozyten und Lymphozyten voneinander unterschieden werden (siehe nebenstehende Abbildung).

Zusätzlich können durch Einsatz verschiedener Farbstoffe (z.B. Propidiumiodid) bzw. farblich markierter Antikörper gezielt einzelne oberflächlich oder intrazellulär gelegene Moleküle (Proteine oder DNS) markiert werden. Nach Anregung der Farbstoffe durch Licht spezifischer Wellenlänge (FITC Emissionsmaximum 519nm, PE Emissionsmaximum 578nm) kann anhand der Fluoreszenzintensität und Darstellung dieser in

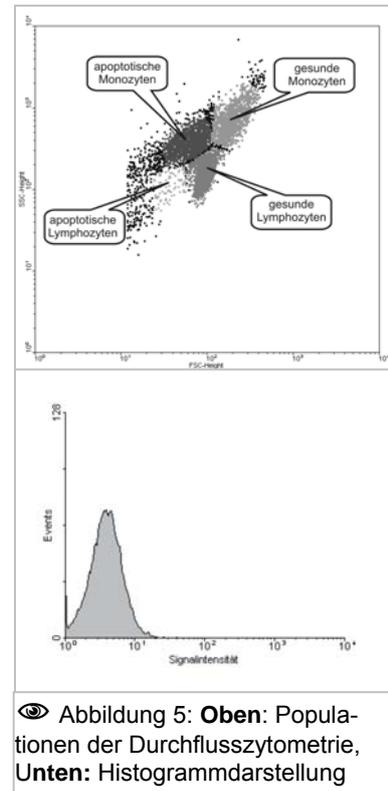


Abbildung 5: **Oben:** Populationen der Durchflusszytometrie, **Unten:** Histogrammdarstellung

in einem Histogramm die relative Menge der markierten Moleküle bestimmt werden. Wenn die Probe mit zwei verschiedenen Antikörpern/Farbstoffen gefärbt wird, können die Emissionswerte der Farbstoffe in einem Dot Plot gegeneinander aufgetragen werden.

Durch so genanntes „gaten“ innerhalb des Dot Plots, der SSC gegen FSC aufträgt, kann eine bestimmte Population (z.B. nur gesunde Monozyten) ausgewählt werden, so dass die Daten der weiteren Auswertung ausschließlich auf den Messwerten dieser bestimmten Population beruhen.

Die Messungen erfolgten mithilfe eines FACScan. Die Auswertung der Messdaten wurde mit der Software CellQuest, Lysis II, WinMDI 2.8 und Exel vorgenommen.

ZELLVORBEREITUNG FÜR DIE DURCHFLUSSZYTOMETRIE

Nach der Inkubationszeit (je nach Versuch 4-72h) wurde das Medium der Zellkulturplatten verworfen. Anschließend wurde in jedes Well 1 ml PBS-gegeben und die Zellen wurden für ca. 20 Minuten auf Eis gestellt. Die Zellen wurden nun mit einer Pipette in FACS-Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation (250g, 3 Minuten, Bremse hoch) der Röhrchen wurde das Zellpellet mit 1ml FACS-Puffer resuspendiert und anschließend erneut zentrifugiert (250g, drei Minuten, Bremse hoch). Nachdem der Überstand verworfen wurde, folgte bei Färbung intrazellulärer Moleküle zunächst eine Fixierung der Zellen mit 120 µl 4%igem Paraphormaldehyd für 15 Minuten bei 4°C und Lichtausschluss sowie anschließender Zugabe von 1ml FACS-Puffer je Röhrchen und wiederum Zentrifugation (250g, 3 Minuten, Bremse hoch).

Zur Anfärbung intrazellulärer Moleküle wurde der Antikörper/Farbstoff (je nach Typ ca. 4 µl/FACS-Röhrchen) in 100 µl/FACS-Röhrchen Saponin-Puffer (erhöht die Durchlässigkeit der Zellmembran für den Farbstoff (97)) verdünnt und für 25 Minuten bei 4°C und Lichtausschluss auf die Zellen gegeben.

Um Oberflächenmarker zu färben, wurde der Antikörper/Farbstoff in FACS-Puffer verdünnt und ebenfalls für 25 Minuten bei 4°C und Lichtausschluss auf die Zellen gegeben.

Da nicht alle Antikörper mit einem Farbstoff markiert waren (z.B. HO-1), wurden diese in einem zweiten Färbeschritt selbst mit einem fluoreszierenden Antikörper markiert. Hierbei kamen z.B. Maus anti-Kaninchen Antikörper zum Einsatz.

Eine Verfälschung der Messwerte durch überschüssigen Farbstoff wurde dadurch reduziert, dass dieser durch Waschen mit 1ml FACS-Puffer je Röhrchen entfernt wurde. Nach erneuter Zentrifugation (250g, 3 Minuten, Bremse hoch) wurde das Zellpellet in 0,5 ml FACS-Puffer resuspendiert und war nun bereit für die Untersuchung per Durchflusszytometrie.

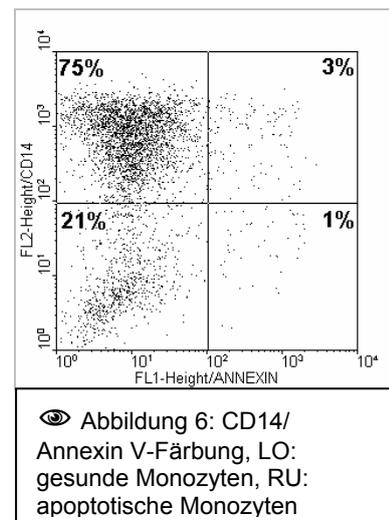
FÄRBUNG DER ZELLEN

Da bei vitalen Monozyten die Barriere-Funktion der Zellmembran intakt ist, können normalerweise keine intrazellulären Antigene angefärbt werden. Um dennoch eine Anfärbung zu ermöglichen, werden die Zellen mit Saponin behandelt, welches reversibel an Membrancholesterin bindet und somit die Membran für Farbstoffe durchlässig macht (97). Um die Darstellung der nachfolgend genannten Färbungen übersichtlicher zu gestalten, wurde auf eine Unterteilung zwischen permeabilisierten und nicht-permeabilisierten Zellen verzichtet. Stattdessen wird bei der jeweiligen Färbung angegeben, ob eine Behandlung mit Saponin (permeabilisiert, Anfärbung intrazellulärer Marker) stattgefunden hat oder nicht (nicht permeabilisiert, Anfärbung von Oberflächenmarkern).

CD14 / Annexin V (nicht permeabilisiert)

Die Apoptose ist gekennzeichnet durch eine Reihe intrazellulärer Veränderungen, die mittels der Durchflusszytometrie nachgewiesen werden können. Das anionische Phospholipid Phosphatidylserin (PS) befindet sich normalerweise auf der Innenseite der Zellmembran (84). Noch bevor DNS-Strangbrüche oder Änderungen der Zellmorphologie sichtbar werden, kommt es bei apoptotischen Zellen Protein-Kinase-C-vermittelt zu einer Umlagerung des PS auf die Außenseite der Membran (36). In vitro erkennen Phagozyten PS-positive Zellen über spezifische Rezeptoren und entfernen diese.

Im Rahmen der Durchflusszytometrie ist es nun möglich mittels Ca^{2+} -abhängiger Bindung an FITC-gekoppeltes Annexin V PS quantitativ nachzuweisen (63;112). Da jedoch nekrotische Zellen innerhalb kurzer Zeit ihre



Membranintegrität verlieren, wird die Zellmembran u.a. auch für Annexin V durchlässig, so dass dieses nun auch intrazellulär gelegenes PS anfärbt.

Um dennoch zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen unterscheiden zu können, ist daher eine zweite Färbung mit einem Vitalfarbstoff (wie z.B. PI) notwendig. CD14 ist ein membranständiger LPS-Rezeptor, der auf myelomonocytierten Zellen exprimiert wird (118). Wie in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte (49), weisen apoptotische Monozyten deutlich geringere CD14-Level auf als gesunde Monozyten. Somit lässt sich sagen, dass vitale Zellen Annexin V-*negativ* und CD-14-*positiv* wohingegen apoptotische Zellen Annexin V-*positiv* und CD14-*negativ* sind.

CD95-Färbung (nicht permeabilisiert)

CD95 (Fas) gehört zur Gruppe der sog. „death receptors“ (93). Nach Aktivierung kommt es zu einer Zusammenlagerung der Rezeptoren und zur Bildung von „deathinducing signaling complex“ (DISC). Der weitere Verlauf ist jedoch von der Zelle abhängig, die den CD95 Rezeptor trägt. Hierbei sind zwei verschiedene Typen (Typ I und II) zu unterscheiden (102). Bei den Zellen vom Typ I (z.B. SKW 6.4 und H9) kommt es zu einer Rekrutierung großer Mengen an pro-Caspase-8 an den DISC, wodurch diese in ihre aktive Form überführt wird (83).

In den Zellen vom Typ II (z.B. Jurkat und CEM) kommt es hingegen zu einer Umwandlung von Bid zu t-Bid wodurch das Mitochondrium sein Transmembranpotential verliert. Durch die daraus resultierende Freisetzung von Cytochrom C kommt es wiederum zu einer Aktivierung von Caspase-9 (44;44) (siehe hierzu auch BCL-2 Seite 31)

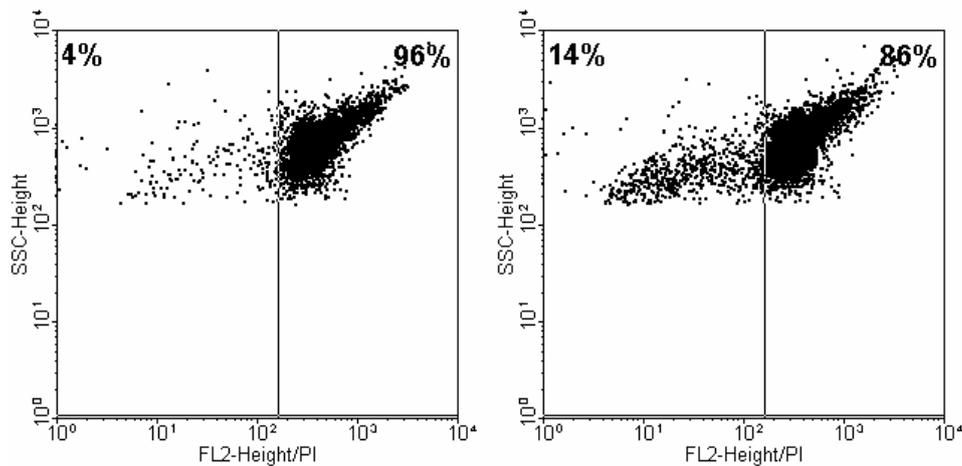
Quantifiziert wurde die CD95-Expression durch eine Anfärbung mit FITC-markiertem Maus-anti-CD95-Antikörper.

Propidium Iodid-Färbung (PI) (permeabilisiert und nicht permeabilisiert)

Propidium Iodid färbt DNS. PI ist bei gesunden Zellen nicht in der Lage die Zellmembran zu durchdringen. D.h., dass gesunde Zellen, deren Zellmembran intakt ist, kaum durch PI gefärbt werden. Wie bereits oben beschrieben, verlieren jedoch nekrotische Zellen ihre Membranintegrität, so dass PI bei diesen Zellen ins Innere gelangen und die DNS färben kann (24;90). Bei nicht permeabilisierten Zellen ist PI somit ein Nekrosemarker.

Nach vorheriger Behandlung mit z.B. Saponin gelangt PI hingegen auch bei gesunden oder apoptotischen Zellen ins Zellinnere. Mit fortschreitender Apoptose kommt es jedoch zu einer Verringerung des Kerninhaltes wodurch die Anfärbbarkeit abnimmt. D.h., dass apoptotische Zellen ein geringeres PI-Signal haben als gesunde Zellen.

Um das Verständnis für die PI-Färbung und ihre Ergebnisse zu verbessern, hier ein beispielhaftes Messergebnis. Im linken Teil der Abbildung (siehe folgende Seite) sieht man einen Dot Plot, bei dem die Granulierung der Zellen (der SSC-Height) gegen die Anfärbung mit PI aufgezeigt ist. Die Zellpopulation rechts oben besteht somit aus Zellen die PI positiv und stark granuliert sind. Der Marker / Trennstrich wurde so gewählt, dass er genau an diese Population grenzt. In der Abbildung sind daher nur 4% der Zellen schwach PI gefärbt. In der zweiten Abbildung (bzw. rechter Teil) sieht man, dass die Population links des Markers größer, die rechts davon kleiner geworden ist. D.h., es sind mehr Zellen schlecht mit PI angefärbt worden. Eine Abnahme der Anfärbbarkeit spricht für eine Zunahme der Apoptose.



👁️ Abbildung 7: Nachweis von Apoptose mittels PI-Färbung bei permeabilisierten Zellen. Links: 5% FCS, rechts 5% FCS + Simvastatin [1 μ M]
 Klar erkennbar ist die Abnahme der PI-positiven Zellen rechts des Markers unter Simvastatin [1 μ M] = Zunahme der Apoptose

Tissue Factor (TF) (permeabilisiert und nicht permeabilisiert)

TF ist ein membrangebundenes Glykoprotein. In vitro spielt es eine wichtige Rolle im extrinsischen System der Blutgerinnung. Durch seine Rezeptor- und Co-Faktor-Funktion für aktivierten Faktor VII (VIIa) ist es der primäre zelluläre Initiator der Gerinnungs-Kaskade. Normalerweise ist TF nicht präsent auf intravaskulären Zellen. Durch spezifische Entzündungsmediatoren oder auch durch LPS (70;114) kann TF jedoch auf zirkulierenden Monozyten induziert werden (31). Des weiteren konnte TF und TF-mRNS in Schaumzell-Makrophagen humaner atherosklerotischer Plaques nachgewiesen werden (116).

Der Nachweis von TF erfolgt mittels FITC markiertem Maus-anti-TF-Antikörper.

Toll-like receptor (nicht permeabilisiert)

Toll ist ein Drosophila-Gen, das essentiell ist für die Ontogenese und den Schutz vor Infektionen. Einige analoge Proteine konnten in Vertebraten nachgewiesen werden, wo sie als Toll-like receptor bezeichnet werden.

Als Teil der angeborenen Immunantwort erkennt die Familie der Toll-like Rezeptoren eindringende Pathogene (7;53). Die meisten TLR tun dies durch

Bindung an spezielle Pathogen-assoziierte Moleküle. Hierdurch kommt es zur Translokation des nukleären Transkriptionsfaktors NF- κ B (siehe nebenstehende Abbildung) wodurch wiederum vermehrt inflammatorische Zytokine gebildet werden (86).

TLR4 ist ein spezifischer Rezeptor für LPS (Lipopolysaccharid gram-negativer bakterieller Zellwände) (3;7;53).

Verschiedene Forschergruppen haben mittlerweile zeigen können, dass eine Stimulation mit LPS die TLR4 Expression in murinen Makrophagen (6;91) bzw. in humanen Monozyten beeinflusst (18;101;113). So zeigten *Moreno et al.*, dass die Stimulation mit LPS die TLR4 Expression auf der Membran humaner Monozyten reduziert (86).

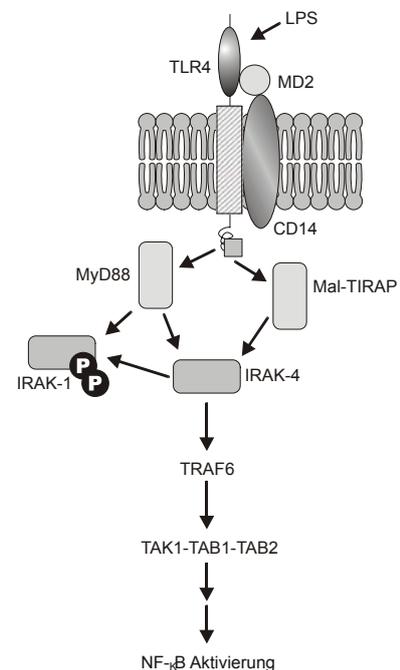


Abbildung 8:
Signalkaskade TLR4

BCL-2 (permeabilisiert)

Die große Familie der BCL-2 Proteine kann grundsätzlich in zwei Gruppen unterteilt werden. Zum einen die anti-apoptotischen Proteine, zu denen das BCL-2 und das BCL-xL gehören, zum anderen die pro-apoptotischen Proteine, zu denen BAK und BAX gehören (43).

BAK und BAX sind beide in der Lage als Folge diverser pro-apoptotischer Reize eine Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran einzuleiten, was schließlich in der Apoptose der entsprechenden Zelle endet. Es konnte gezeigt werden, dass Zellen, denen das Gen für BAK und BAX fehlt, resistent gegen verschiedenste pro-apoptotische Reize sind (115;122).

Auf der anderen Seite kann jedoch eine Überexpression von BCL-2 oder BCL-xL die via BAK oder BAX ablaufende Permeabilisierung der mitochondrialen Membran blockieren (44). Es scheint dabei so, dass BCL-2 die Oligomerisation von BAK und BAX unterbindet und somit eine Barriere für die Apoptose-Initiierung bildet.

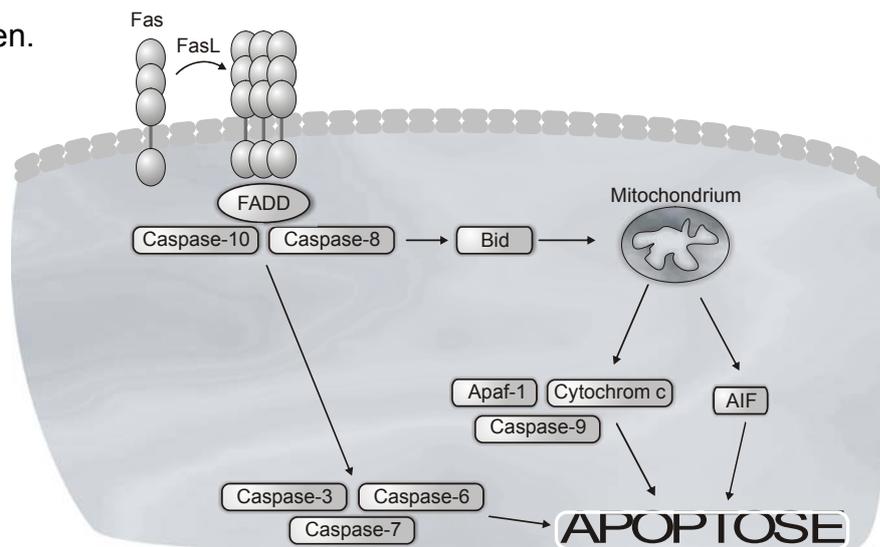
Der Nachweis von BCL-2 erfolgt mittels FITC-markiertem Maus-anti-BCL-2-Antikörper.

Caspase-3 (permeabilisiert)

Die große Familie der Caspasen (Cysteine requiring aspartat protease) ist ein wichtiger Teil der Apoptose-Signalkaskade. Die Abbildung unten zeigt schematisch den Signalweg auf. Nach der Aktivierung durch seinen Liganden bindet Fas (CD95) mittels Interaktionen der „death domains“ an FADD (15;21;59). Über eine Interaktion ihrer „death effector domains“ bindet FADD an Caspase-8 (14;89). Durch die Umwandlung von Bid zu t-Bid kann Caspase-8 im Mitochondrium eine Freisetzung von Cytochrom C ins Zytoplasma bewirken (72;77). Cytochrom C wiederum interagiert mit Apaf-1 und Caspase-9 und führt somit zu einer Aktivierung von Caspase-9, welche daraufhin weitere down-stream Caspasen aktiviert und somit ebenfalls zur Apoptose führt.

Caspase-10 interagiert aller Wahrscheinlichkeit nach ebenfalls mit FADD und aktiviert down-stream weitere Caspasen.

Da Caspase-3 zu den Effektorcaspasen der Apoptose-Kaskade gehört, bietet ein Nachweis mittels PE-markierter Rabbit-anti-Caspase-3-Antikörper die Möglichkeit, unabhängig vom Auslöser, eine Aktivierung der Apoptose-Kaskade nachzuweisen.



👁️ Abbildung 9: Signalkaskade der Caspase-vermittelten Apoptose
AIF = Apoptosis inducing factor; führt unabhängig von Caspasen zu DNS-Schäden und somit zur Apoptose

Hämoxygenase-1 (HO1) (permeabilisiert)

Häm, als integraler Hämoglobinbestandteil, beeinflusst ein breites Spektrum zellulärer Prozesse auf Ebene der Transkription und Translation, stabilisiert Proteine, reguliert ihren intrazellulären Transport und nimmt Einfluss auf die Zelldifferenzierung. In Leber- und diversen anderen Körperzellen (u.a. auch Monozyten) sind Häme ein Bestandteil der Cytochrome.

Im oxidativen Abbau von Häm zu Bilirubin, Kohlenstoffmonoxid und Eisen ist die Hämoxygenase verantwortlich für den ersten, geschwindigkeitsbestimmenden Schritt (108). Man findet Hämoxygenasen in Ratten, Kaninchen, sämtlichen menschlichen Geweben sowie Bakterien und Pflanzen (38;96;117). Die spezielle Form HO-1 kommt hauptsächlich in Leber und Milz vor, ist aber auch in anderen Geweben nachweisbar (108;109). Durch ihr breites Vorkommen und die starke anti-oxidative Wirkung scheint die HO-1 eine zentrale Rolle in der zellulären Stressantwort zu besitzen, was durch ihre zytoprotektiven Wirkungen, ihr anti-inflammatorisches und anti-apoptotisches Potential unterstrichen wird.

Ein Nachweis von HO-1 ist durch die Markierung mit einem ungefärbten Maus-anti-HO-1-Antikörper möglich. Nach einem Waschschrift mit FACS-Puffer erfolgt eine zweite Färbung mit einem FITC-markierten anti-Maus-Antikörper.

Western Blot

ZELLVORBEREITUNG

Wie auch für die Durchflusszytometrie wurden die Zellen auf 24 Well-Platten inkubiert. Um eine ausreichende Proteinmenge für den Western Blot zu erhalten, wurden hierbei jedoch sechs Wells je Versuchsansatz benötigt. Nach der Inkubation laut Versuchsprotokoll (bezüglich Inkubationszeit, Zusätze, usw.) wurden die Monozyten auf die gleiche Art und Weise wie bei der Durchflusszytometrie geerntet (siehe Seite 26) und zentrifugiert (250 g, 10 Minuten, Bremse hoch). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde mit 1 ml PBS- resuspendiert und in ein Eppendorf Tube überführt. Dieses wurde

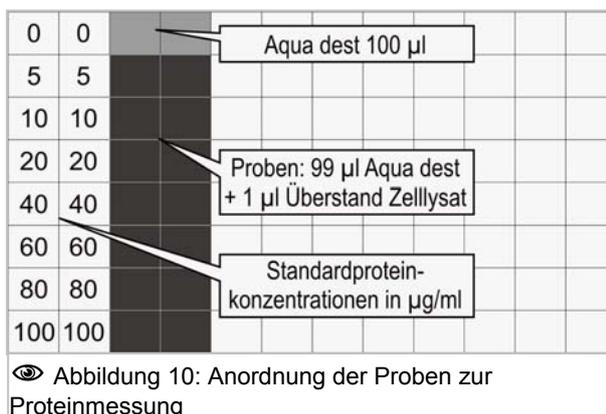
erneut zentrifugiert (250 g, 5 Minuten). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet bis zur weiteren Verwendung bei -83°C gelagert.

LYSIERUNG DER ZELLEN

Je nach Pelletgröße wurden 60 - 200 µl Lysepuffer auf das aufgetaute Pellet gegeben und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Proteine von den restlichen Zellbestandteilen zu trennen, wurde die Lösung zentrifugiert (30 Minuten bei 4°C, Acceleration und Deceleration auf Maximum). Nach der Zentrifugation befanden sich die Proteine im Lysat wogegen sich die Zellbestandteile als Pellet absetzten. Das Lysat wurde abgenommen und die Zellreste wurden verworfen.

PROTEINMESSUNG

Die Bestimmung der Proteinmenge erfolgte nach einem standardisierten Protokoll. In die 96 Well-Platte wurden in die ersten beiden Spalten je 100 µl der Proteinstandards in aufsteigender Konzentration gegeben (0, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 µg/ml). Die



Nullwertprobe (100 µl Aqua dest) wurde in die Wells rechts oben neben dem Proteinstandard gegeben.

Für die Proteinproben wurden je Ansatz zunächst 2x 99 µl Aqua dest vorgelegt. Anschließend wurde 1 µl der Proteinprobe dazugegeben. Durch diese Doppelmessung und anschließende Mittelwertbildung wurde die Genauigkeit der späteren Messwerte erhöht.

In alle gefüllten Wells wurden zum Abschluss zusätzlich jeweils 100 µl Bio-Rad gegeben, so dass sich jetzt in jedem Well 200 µl befanden.

Messung und Auswertung erfolgten dann computergestützt mittels Photometer. Da nicht alle Proben die gleiche Proteinmenge enthielten, wurden die

gemessenen Werte gegeneinander verrechnet, so dass sich später in jeder Elektrophoresekammer die gleiche Menge an Proteinen befand.

PROBENVORBEREITUNG

Zunächst wurde der Thermoblock auf 95°C vorgeheizt. Je Versuchsansatz wurden 4 µl des LDS Sample Buffer in einen Eppendorf Cup gegeben. Dazu wurde dann die ausgerechnete Menge an Proteinlösung gegeben sowie genügend Aqua dest um eine Gesamtmenge von 20 µl zu erreichen. Anschließend erfolgte eine Erhitzung im Thermoblock für 5 Minuten. Dies diente dazu um eine Verbindung des Proteins mit dem Sample Buffer zu erreichen. Danach wurde durch kurzfristiges Zentrifugieren (10.000 g, 30 Sekunden) eventuelles Kondenswasser beseitigt.

GELELEKTROPHORESE

Sowohl Gelelektrophorese als auch das Blotting wurden in ein und demselben Blot-Modul durchgeführt. Dieses wurde nach Herstellerangaben zusammengebaut.

Das Gel wurde zunächst mit Aqua dest abgespült, dann in die Kammer eingesetzt und die Kammer mit Running Buffer gefüllt. Nach Entfernung des Kammes wurden die Taschen des Gels mit Puffer durchgespült um restliche Konservierungsflüssigkeit zu entfernen. Die Proben (10 µl des Standards, 20 µl der Proben) wurden mithilfe einer Hamilton-Spritze in die Taschen des Gels eingefüllt.

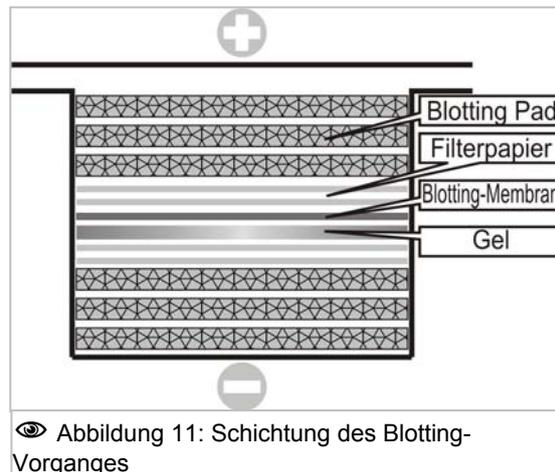
Es wurde eine Spannung von ca. 100 Volt für 50 Minuten angelegt. Während des Elektrophoresevorganges wurde regelmäßig die Laufgeschwindigkeit des Markers kontrolliert, sowie darauf geachtet, dass die Proben gleichmäßig wandern.

Das Prinzip der Elektrophorese beruht darauf, dass die Proteine gemäß ihrer Ladung und Größe im elektrischen Feld wandern. Das Gel stellt hierbei einen Widerstand dar, der die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine beeinflusst. Je größer ein Molekül ist, desto langsamer wandert es entlang des elektrischen

Feldes. Um später eine quantitative Auswertung zu ermöglichen, wurde zusätzlich zu den Proben der Versuchsansätze ein sog. Massenstandard dazugegeben. Dieser enthielt Proteine definierter Größe anhand derer die Größe der zu untersuchenden Proteine bestimmt werden konnte.

BLOTTEN

Bereits während des Elektrophoresevorganges wurden die Vorbereitungen für das Blotting getroffen. Hierzu wurde die PVDF-Membran für ~1 Minute in Methanol getränkt. Anschließend wurde sie mit Aqua dest gewaschen und bis zur weiteren Verwendung in Transfer Buffer gelagert, wobei darauf geachtet



wurde, dass die Membran stets vollständig von Flüssigkeit bedeckt war um ein Austrocknen zu verhindern. Zusätzlich wurden die benötigten Blotting Pads ebenfalls mit Transfer Buffer getränkt.

Nach Abschluss der Elektrophorese wurde das Gel vorsichtig aus seiner Kunststoffummantelung entfernt, an den Rändern begradigt und nach dem in der Abbildung gezeigten Schema in die Blottingkammer gelegt.

Die innere Kammer wurde nun mit Transferpuffer gefüllt. Der Blottingvorgang wurde für 120 Minuten bei 35 mVolt durchgeführt bzw. bei 20 mVolt über Nacht.

PROTEINNACHWEIS

Nach abgeschlossenem Blotting wurde die Membran dreimal je drei Minuten mit TTBS-Puffer gewaschen. Um eine unspezifische Bindung des Antikörpers zu verhindern, wurde die Membran mit einem Blockingreagenz behandelt.

Vor der weiteren Verarbeitung wurde der abgestandene TTBS-Puffer entfernt und die Membran erneut für einige Minuten in frischem Puffer gewaschen.

Der Färbevorgang gliedert sich in zwei Abschnitte. Zunächst erfolgt eine Markierung für zwei Stunden mit einem ungefärbten Antikörper. Danach wurde die Membran drei- bis viermal für ~4 Minuten mit TTBS-Puffer gewaschen.

Anschließend erfolgte die ebenfalls zwei Stunden dauernde Markierung mit einem sekundären Peroxidase-markierten Antikörper.

Später wurden je Ansatz 15 µl Peroxid- und Luminollösung zusammengegeben und für 20 Minuten unter Lichtausschluss gelagert.

Nachdem die Färbung mit dem zweiten Antikörper abgeschlossen war, wurde die Membran, wie oben erwähnt, nochmals gewaschen.

Zur Darstellung der markierten Proteine mittels Chemilumineszenz wurde die Membran zunächst auf handelsübliche Frischhaltefolie gelegt und die Luminol-/Peroxid-Lösung wurde darauf verteilt. Diese bindet an den sekundären Antikörper und erzeugt somit im Bereich der Bindung (also dort, wo die Banden sind) eine quantifizierbare, mit der vorhandenen Proteinmenge korrelierende Chemilumineszenz. Diese wurde mittels ROCHE Lumi-Imager erfasst und in relative Proteinmengen umgerechnet.

Polymerasekettenreaktion

ZELLVORBEREITUNG

Wie bereits für die Durchflusszytometrie als auch für den Western Blot wurden die Zellen für die PCR auf 24 Well-Platten inkubiert. Das Ernten der Zellen erfolgte wie bei der Durchflusszytometrie (Seite 26).

RNS-PRÄPARATION

Der gesamte Vorgang der RNS-Präparation erfolgte mittels Qiagen-PCR-Kit. In diesem sind neben den verwendeten Puffern auch farblich sortierte Eppendorf-Cups enthalten, auf die im Folgenden verwiesen wird.

Das Pellet wurde mit 600 µl RLT Buffer und 6 µl β-Mercaptoethanol resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension auf das Sieb eines violetten Eppis gegeben und zentrifugiert (13.000 rpm, 2 Minuten) Der violette

Einsatz wurde verworfen und zum Auffang 600 µl Ethanol 70% gegeben. Von dieser Lösung wurden 600 µl auf das Sieb eines rosa Eppis gegeben und zentrifugiert (10.000 rpm, 15 Sekunden) Die abzentrifugierte Lösung wurde verworfen und es wurden erneut 600 µl der Lösung auf das Sieb gegeben und zentrifugiert. Die abzentrifugierte Lösung wurde erneut verworfen. Auf den Filter wurden nun 350 µl RW1-Buffer pipettiert und anschließend erneut zentrifugiert (10.000 rpm, 15 Sekunden) Die abzentrifugierte Lösung wurde wiederum verworfen. Je Ansatz wurden 10 µl DNase I stock solution mit 70 µl RDD-Buffer gemischt. Diese Lösung wurde dann auf den Filter pipettiert. Die Ansätze wurden für 15 Minuten bei 37°C im Heizblock inkubiert. Anschließend wurden die Filter in neue Eppendorf Cups gesetzt. Auf die Filter wurden nun erneut 350 µl RW1 Buffer gegeben. Nach Zentrifugation ist der Inhalt des Eppendorf Cup verworfen worden. Nach Zugabe von 500 µl RPE-Buffer wurde erneut zentrifugiert (13.000 rpm, 2 Minuten) und die Lösung wiederum verworfen. Nun wurde nochmals zentrifugiert um den Filter zu trocknen. Die abzentrifugierte Flüssigkeit wurde verworfen.

Da im anschließenden Schritt die RNS aus dem Filter gelöst werden sollte, wurden die Filter in neue Eppendorf Cups gestellt. Auf den Filter wurden nun 35 µl RNase free water pipettiert. Nach Zentrifugation (10.000 rpm, 1 Minute) wurden nochmals 35 µl RNase free water auf den Filter gegeben und zentrifugiert. Die RNS befand sich nun im abzentrifugierten Wasser. Bis zur Weiterverarbeitung wurde die RNS bei -83°C weggefroren.

REVERSE TRANSKRIPTION

Zunächst wurde die eingefrorene RNS aufgetaut. Dann wurde der sog. Mastermix hergestellt. Dieser setzte sich zusammen aus:

1 µl 10x StrataScript Buffer (=RT-Puffer)

1 µl dNTPs [10mM]

0,50 µl pd (N) 6 [100 µM]

je Ansatz sog. „RT+ - Ansatz“. In einem zweiten Eppendorf Cup wurde nochmals die gleiche Menge Mastermix vorbereitet, der sog. „RT- - Ansatz“. Dieser diente später zur Negativkontrolle. In den RT+ - Ansatz wurden nun je Ansatz 0,5 µl Reverse Transkriptase gegeben. In den RT- - Ansatz wurden hingegen 0,5 µl Aqua dest gegeben.

Für jede zu untersuchende Probe wurde nun jeweils zwei PCR Eppendorf Cups (für den RT+ und den RT- - Ansatz) vorbereitet. In die Eppendorf Cups für den RT+ -Ansatz wurden je 3 µl des RT+ -Mastermix gegeben, in die RT- Eppendorf Cups 3 µl des RT- -Mastermix.

Anschließend Inkubation bei 37°C für 60 Minuten.

RNS-AMPLIFIKATION MITTELS PCR

Zunächst wurde der PCR-Mastermix hergestellt. Dieser setzte sich zusammen aus (je Ansatz):

2µl PCR Puffer 10x

2 µl Primer Up [10 µM] - je nach zu untersuchendem Genabschnitt

2 µl Primer Down [10 µM] - je nach zu untersuchendem Genabschnitt

0,8 µl MgCl [10 mM]

0,4 µl dNTPs [10 mM]

12,7 µl Aqua bidest.

0,1 µl Taq-Polymerase [5 U/µl]

Je Ansatz wurden nun 40 µl des PCR-Mastermix in ein neues PCR Eppendorf Cup pipettiert. Zusätzlich wurden 10 µl des cDNS-Template aus dem RT-Schritt dazugegeben. Die restliche cDNS konnte nun zur späteren Verwertung weggefroren werden. Nach Erhitzen auf 90°C zur Denaturierung von Proteinen wurden die PCR Cups in den PCR-Cycler gegeben, wo sie mehrmals folgendes Programm durchliefen: Erhitzung auf 90°C zur Denaturierung der DNS und Aufspaltung des Doppelstranges – Reduzierung der Temperatur auf die für den jeweiligen Primer passende Annealing-Temperatur – Amplifizierung der DNS

durch die Taq-Polymerase nach erneutem Erhitzen auf 70°C. Im Anschluss daran Abzentrifugation und Lagerung bei -83°C bis zur weiteren Verwendung.

AUFTRENNUNG MITTELS AGAROSE-GEL

Herstellung des Gels

Bevor die amplifizierte cDNS mittels Elektrophorese aufgetrennt werden konnte, musste zunächst das Agarose-Gel hergestellt werden. Dazu wurden 1,5 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer(1x) aufgelöst. Die Lösung wurde anschließend in der Mikrowelle kurz bis zum Siedepunkt erhitzt. Nach Zugabe von 10 µl Ethidium-Bromid [1 mg/ml] wurde die Flüssigkeit in die Gelkammer gegossen und der Kamm, der die Aussparungen für die späteren Gel-Kammern bildet, eingesetzt. Um später eine gleichmäßige Elektrophorese zu gewährleisten, wurden eventuelle Luftblasen mit einer Pipette entfernt. Mit sinkender Temperatur gewann das Gel an Festigkeit, so dass, nachdem es ca. Zimmertemperatur erreicht hatte, der Kamm entfernt werden konnte.

VORBEREITUNG DER AMPLIFIZIERTEN MRNS UND AUFTRENNUNG

Von der zuvor amplifizierten cDNS wurden 22,5 µl entnommen und mit 2,5 µl Bromphenolblau vermischt. Bromphenolblau dient bei der späteren Auftrennung als Marker, der, aufgrund seiner geringen Größe, schneller als die cDNS durch das Gel läuft.

Nach Überführung der DNS in das vom TAE-Puffer umgebene Gel, wurde eine 45minütige Spannung von 100V angelegt. Als Marker für den erfolgreichen Elektrophorese-Vorgang dient die Bromphenolbande, die aufgrund ihrer geringen Größe der eigentlichen DNS voranläuft.

AUSWERTUNG

Um das an die DNS gebundene Ethidium-Bromid sichtbar zu machen, wurde das Gel anschließend mit UV-Licht beleuchtet. Die dadurch sichtbar werdenden Banden wurden per Digitalkamera fotografiert und konnten anschließend digital

im PC ausgewertet werden. Die Software erkennt automatisch (oder nach manueller Eingabe) die Banden des Gels und kann deren Dichte (bzw. den Intensitätsgrad) erfassen, miteinander vergleichen und in Zahlenwerte umrechnen, die später miteinander verglichen werden konnten. Je stärker die Bande, desto größer die Zahl, desto mehr cDNS war in der Probe enthalten.

VERWENDETE PRIMER

XIAP

XIAP ist Teil der IAP (inhibitor of apoptosis) Familie, eine Gruppe von anti-apoptotischen Proteinen, die den programmierten Zelltod regulieren. Die Proteine werden als XIAP, cIAP1, cIAP2, NIAP, Survivin und BRUCE bezeichnet (9;29;48;75;99), wobei XIAP den potentesten Inhibitor darstellt (27). Die verfügbaren Forschungsergebnisse gehen davon aus, dass die anti-apoptotische Wirkung auf einer direkten Hemmung von Caspasen beruht (27;100). So haben Studien gezeigt, dass XIAP, cIAP1 and cIAP2 Caspase-9 hemmen und dadurch auch die proteolytische Aktivierung von Caspase-3, -6 und -7 (100). Eine Beeinflussung der Caspase-8-induzierten Aktivierung der Procaspase-3 scheint es laut Literatur nicht zu geben (28).

Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mithilfe der Software Exel (Microsoft) durchgeführt. Angewandt wurden: Mittelwert, Student's t-Test sowie Standardabweichung. Als Signifikanzgrenze wurde ein Wert von $p < 0,05$ festgelegt. Ein * innerhalb einer Grafik weist auf ein signifikantes Ergebnis hin.

IV. Ergebnisse

Da bereits *Mangan* und *Wahl* 1991 gezeigt haben, dass Serum-Entzug Apoptose auslöst (79;80), wurden alle Versuche - soweit nicht anders angegeben - mit 5%igem FCS-Anteil im Medium durchgeführt.

Apoptose

APOPTOSEINDUKTION DURCH SIMVASTATIN

Wie bereits unter Material und Methoden ausführlich erklärt, wurden folgende Marker als Apoptosenachweis verwendet:

- CD14 / Annexin V
- Propidium Iodid (permeabilisiert)

Um den zeitlichen Verlauf der Stimulations-Effekte beurteilen zu können, wurden die obigen Marker nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten gemessen (Übersicht siehe Abbildung nächste Seite).

Zunächst ging es im Versuchsansatz darum nachzuweisen, dass Simvastatin, so wie vermutet, bei Monozyten eine Apoptose auslöst. Eine Messung CD14 / Annexin V markierter Zellen war ein geeigneter Marker. Weder 24h noch 48h Stimulation mit Simvastatin [1µM] zeigten einen pro-apoptotischen Effekt. Erst nach 72h stieg der Prozentsatz der apoptotischen Zellen um zehn Prozentpunkte ($p < 0,05$). Dies zeigte, dass Simvastatin, wenn auch relativ spät, zu einer verstärkten Apoptose in Monozyten führt.

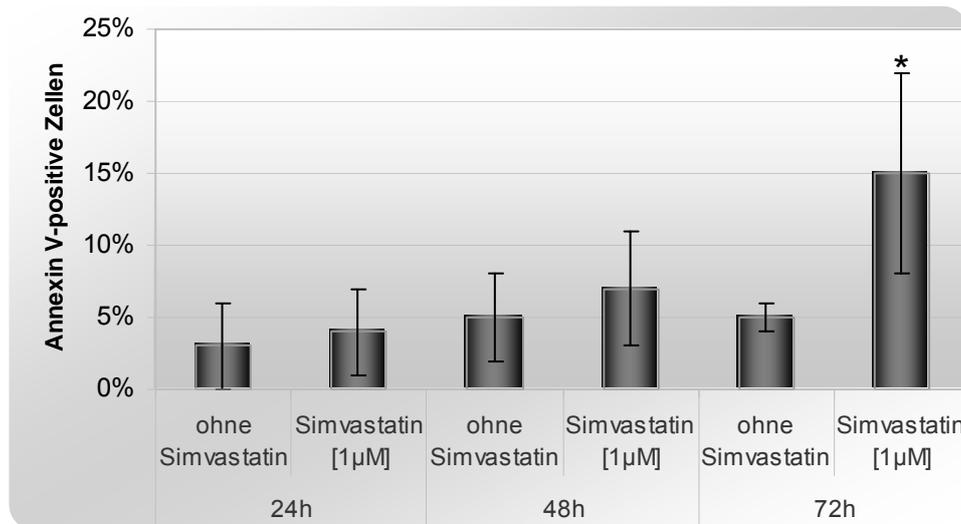


Diagramm 1: Zunahme des prozentualen Anteils der Annexin V-positiven Zellen bei Inkubation über 24, 48 und 72 Stunden

Zur Verifizierung der Ergebnisse wurden weitere Messungen mit permeabilisierten, Propidiumiodid gefärbten Zellen angeschlossen.

Hierbei trat ebenfalls erst nach 72h ein signifikanter Anstieg um zwölf Prozentpunkte auf ($p < 0,05$).

CD 14 / Annexin V als auch PI sprechen für eine - wenn auch relativ späte - Apoptoseinduktion durch Simvastatin.

Durch die obigen Ergebnisse in der Hypothese bestärkt, galt zu klären, welchem Signalweg die Apoptoseinduktion folgt.

SIGNALWEG DER APOPTOSEINDUKTION DURCH SIMVASTATIN

Als Bestandteil der gemeinsamen Endstrecke verschiedenster Apoptose-Mechanismen (TNF, Fas, usw.) gehört Caspase-3 zu den wesentlichen Effektorcaspasen. Daher ermöglicht eine Messung ihrer Expression die Wirkung einer Vielzahl an unterschiedlichen Apoptose-Induktoren zu erfassen.

Cheng et al. (20) zeigten 2003, dass Simvastatin in glatten Gefäßmuskelzellen von Ratten eine Apoptose auslöst, die Caspase-3 vermittelt ist. Daher lag die Vermutung nahe, dass die Simvastatin-induzierte Apoptose bei Monozyten dem gleichen Signalweg folgt.

Im Allgemeinen reagiert Caspase-3 schon nach kurzer Inkubationszeit auf etwaige Apoptose-Trigger, weshalb wir die ersten Messungen bereits nach 4h durchführten.

Nach 4h Inkubation zeigte sich unter Simvastatin [1 μ M] zwar eine leicht ansteigende Caspase-3-Expression (siehe Abbildung unten), diese war jedoch nicht signifikant. Hingegen zeigten Messungen nach 24stündiger Simvastatin-Stimulation eine Reduktion (im Mittel zwei Prozentpunkte im Vergleich zum Basalwert) der Caspase-3-Expression ($p < 0,05$, $n=11$).

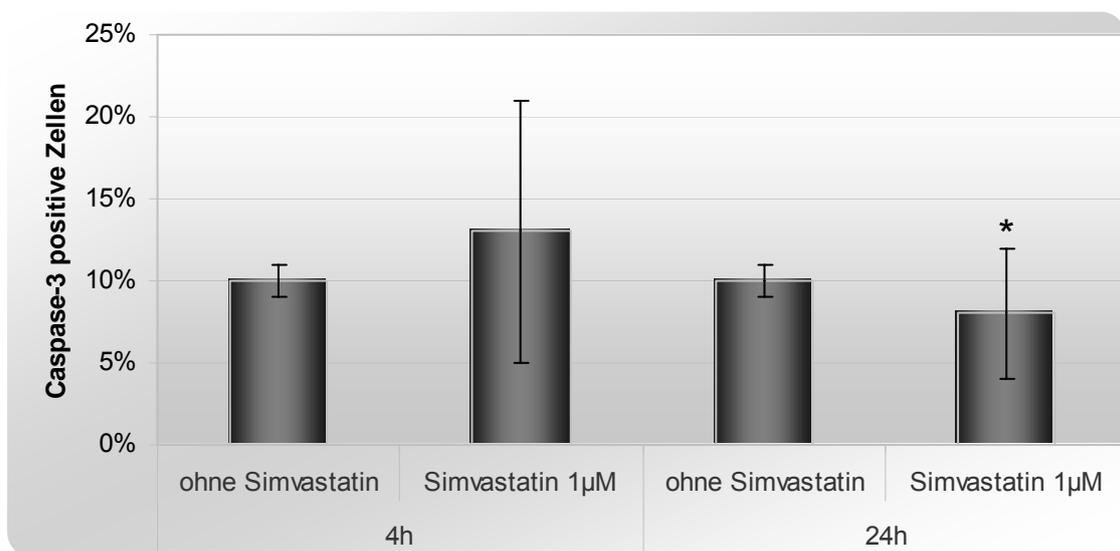


Diagramm 2: Zu-/Abnahme der Caspase-3 positiven Zellen nach 4- und 24stündiger Inkubation unter Simvastatin [1 μ M]

Aufgrund dieser Ergebnisse konnten wir die Caspasenkaskade als Effektormechanismus der Apoptose nicht eindeutig sichern.

Da neben den Caspasen auch andere - über abweichende Mechanismen ablaufende - Signalwege möglich sind, entschlossen wir uns zur Untersuchung des wesentlichen Todesrezeptors CD95.

Am Startpunkt einer Signalkaskade stehend, ist davon auszugehen, dass es bereits frühzeitig zu einer Veränderung der CD95-Expression kommen würde, sollte diese durch Simvastatin beeinflusst werden. Bei einer Versuchsanzahl von $n=5$ zeigte sich nach 4h jedoch weder eine signifikante Veränderung, noch

war ein Trend für einen Anstieg zu erkennen. Somit konnte auch für CD95 nicht gezeigt werden, dass hierüber ein wesentlicher Mechanismus zur Apoptoseinduktion durch Simvastatin vermittelt wird.

Da in den bisherigen Versuchen noch nicht gezeigt werden konnte, über welchen Mechanismus Simvastatin eine Apoptose bei Monozyten auslöst, war zu klären, ob Simvastatin evtl. keinen stimulierenden Effekt auf pro-apoptotische Mechanismen hat, sondern stattdessen evtl. eine inhibierende Wirkung auf anti-apoptotische Signalwege haben könnte.

BCL-2 liegt „außerhalb“ der Caspase-Kaskade und bot sich daher zur Klärung dieser Frage an.

Ähnlich dem CD95 gingen wir davon aus, dass eine BCL-2-Downregulation eher in den frühen Phasen der Simvastatin-Stimulation stattfinden würde. Messungen nach 4h Inkubation konnten die These von der Reduktion antiapoptotischer Signalwege nicht bestätigen, kam es doch nur zu einem geringen, nicht signifikanten Abfall der BCL-2-Expression.

Zusätzlich zu BCL-2 wurden Bestimmungen des XIAP, dem potentesten Inhibitor der Familie der IAP (inhibitor of apoptosis), durchgeführt. Die Messungen erfolgten jedoch nicht mittels Durchflusszytometrie sondern stattdessen mittels PCR:

Entgegen der BCL-2-Werte zeigte sich jedoch, dass eine Stimulation mit Simvastatin [1 μ M] zu keiner signifikanten Veränderung der XIAP-Expression führte. Es kam lediglich zu einer Reduktion um 2% im Vergleich zur nicht-stimulierten Probe mit 5% FCS.

ANDERE STATINE UND IHR EINFLUSS AUF DIE APOPTOSE

Um die Übertragbarkeit der bisherigen Ergebnisse auf andere Statine zu klären, wurde ebenfalls die Wirkung von Pravastatin auf Monozyten untersucht. Der Einsatz verschiedener Konzentrationen (0,1 μ M/ml, 1 μ M/ml, 10 μ M/ml) zeigte nach 48h keine pro-apoptotische Wirkung in den einzelnen Versuchen.

APOPTOSEINDUKTION DURCH SIMVASTATIN IM IN-VITRO-MODELL DER BAKTERIELLEN SEPSIS

Wie bereits in der Einleitung angedeutet, beschäftigt sich diese Versuchsreihe v.a. mit den Wechselwirkungen verschiedener Medikamente bei transplantierten Patienten. Da diese durch ihre Immunsuppression bedingt, ein höheres Risiko einer schweren bakteriellen Infektion mit evtl. daraus resultierender bakterieller Sepsis besitzen, lag die Frage auf der Hand, ob, und ggf. welche besonderen Interaktionen beim Einsatz von Statinen im Rahmen der bakteriellen Sepsis auftreten.

Morrison et al sowie *Bone* haben zeigen können, dass Makrophagen im Rahmen des septischen Schocks (und somit unter dem Einfluss von LPS) durchaus schädliche Effekte auf das Gleichgewicht des Immunsystems haben können (87), (16).

Für uns war es daher interessant herauszufinden, inwiefern eine Kombination aus Simvastatin und LPS – als in-vitro-Komponente der bakteriellen Sepsis – Einfluss auf die Apoptose von Monozyten nimmt.

Ähnlich der Ansätze der alleinigen Inkubation mit Simvastatin, haben wir auch hier zunächst getestet, ob LPS allein oder in Kombination mit Simvastatin eine Apoptose auslöst.

Erstaunlicherweise stellte sich heraus, dass eine alleinige Stimulation mit LPS [1µg/ml] ohne sonstige pro-apoptotische Faktoren in unserem Fall in einer signifikant erhöhten Apoptoserate resultierte. Gemessen wurden mit Anti-CD14 / Annexin V markierte Zellen. Nach 24h plus sechs Prozentpunkte ($p < 0,01$), nach 48h plus zwei Prozentpunkte und nach 72h plus drei Prozentpunkte ($p < 0,05$).

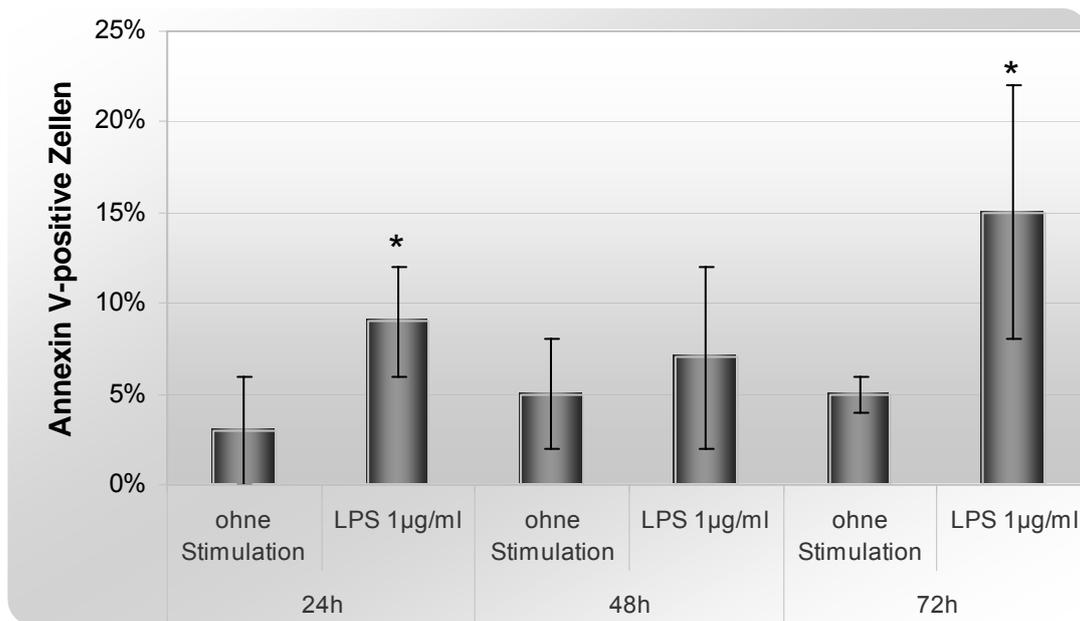


Diagramm 3: Zunahme der apoptotischen (Annexin V-positiven) Zellen unter Stimulation mit LPS 1µg/ml

Bei kombinierter Stimulation mit Simvastatin [1µM] und LPS [1µg/ml] zeigten sich nach 24h keine Effekte. Die Apoptoserate entsprach der bei alleiniger LPS-Stimulation. Nach 48h stieg die Zahl der apoptotischen Zellen um zwei Prozentpunkte im Vergleich zur Inkubation mit Simvastatin oder LPS allein. Eine dreitägige Kultivierung mit beiden Stoffen löste einen Apoptoseanstieg von + 18 Prozentpunkten (zur basalen Apoptose) bzw. von + acht Prozentpunkten zur Simvastatin-ausgelösten Apoptose aus ($p < 0,05$).

Dies zeigt, dass erst nach einer relativ langen Zeitspanne von immerhin 72h eine additive Wirkung beider Stimuli auftritt.

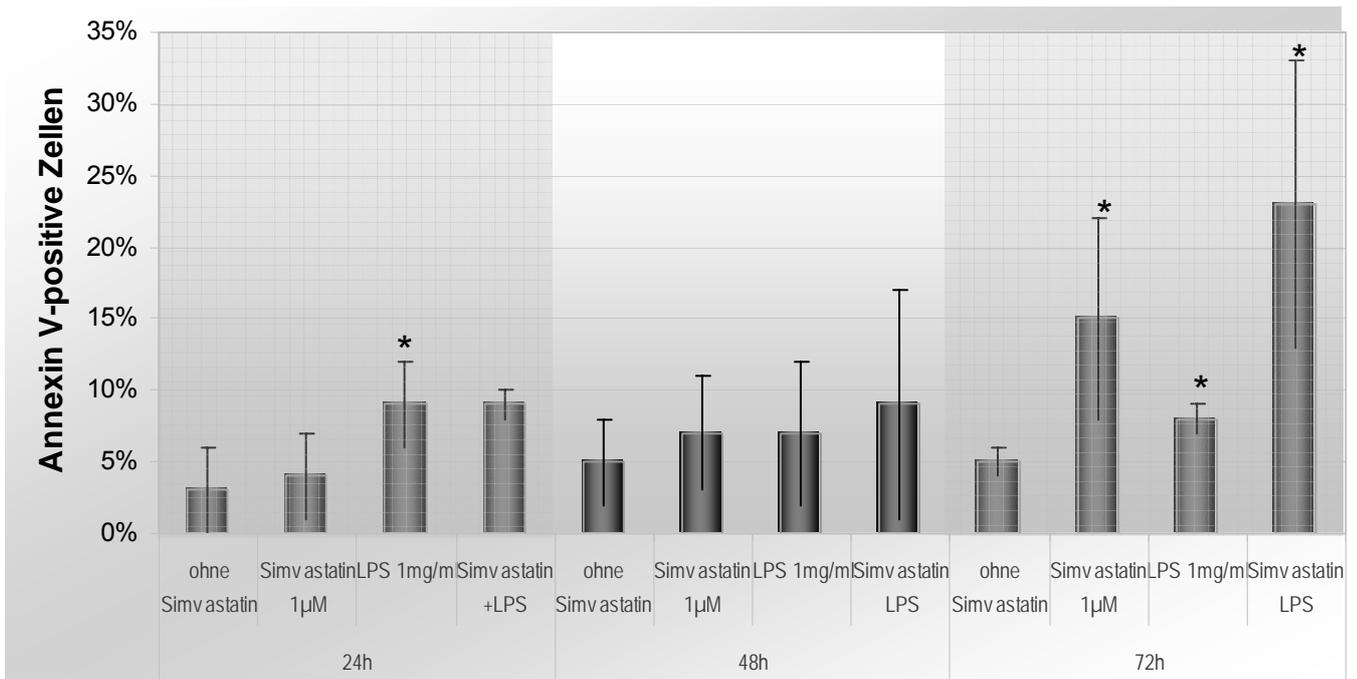


Diagramm 4: Wirkung von LPS, Simvastatin und LPS+Simvastatin auf die Apoptoserate. Auffällig ist, dass sich die Apoptoserate der Zweierkombination beider Stoffe erst nach 72h deutlich von den Apoptoseraten der Einzelstoffe abhebt.

Abschließend wurden weiterhin Messungen mit permeabilisierten PI-gefärbten Zellen durchgeführt. Relativ spät - erst nach 72h - wurden signifikante Veränderungen sichtbar. Simvastatin + LPS verursachten einen Anstieg der apoptotischen Zellen um 13 Prozentpunkte ($p < 0,02$) (nicht gezeigt).

SIGNALWEG DER APOPTOSEINDUKTION DURCH SIMVASTATIN IM IN-VITRO-MODELL DER BAKTERIELLEN SEPSIS

Selbstverständlich wurde auch der Einfluss von LPS auf die Expression von Caspase-3 bestimmt. Entsprechend der physiologischen Abläufe innerhalb der Zelle, sind Veränderungen des intrazellulären Markers Caspase-3 eher zu erwarten gewesen als z.B. die des Oberflächenmarkers CD 14.

Bei alleiniger Inkubation mit LPS kam es nach 4h Inkubationszeit zu einem Anstieg um sechs Prozentpunkte ($p < 0,01$). Die gleichzeitige Stimulation mit LPS und Simvastatin erbrachte - wie bei CD 14 / Annexin V - keinen signifikanten additiven Effekt. Mit einem Anstieg um sieben Prozentpunkte im Vergleich zur Basalrate blieb der pro-apoptotische Effekt nahezu unverändert.

Wartete man einige Stunden länger (8h), so konnte zu diesem Zeitpunkt sowohl für LPS als auch LPS+Simvastatin ein weiterer Anstieg der Caspase-3 nachgewiesen werden (+ 17 bzw. 16 Prozentpunkte). Mit Fortschreiten des Apoptose-Prozesses ließ die Caspase-3-Bildung - wie zu erwarten - wieder nach (siehe Diagramm). LPS allein führte zu einem Anstieg der Caspase-3 um fünf Prozentpunkte, in Kombination mit Simvastatin um vier Prozentpunkte. Beide Werte jedoch nicht signifikant.

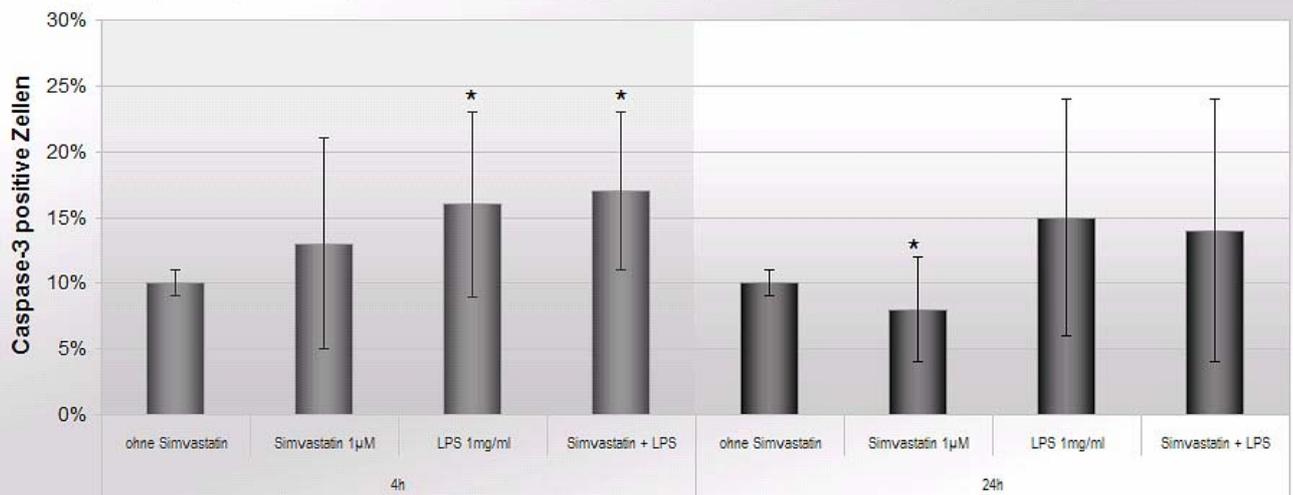


Diagramm 5: Caspase-3-Expression nach 4 und 24h unter Stimulation mit Simvastatin, LPS und LPS+Simvastatin. Nach 4h kein additiver Effekt beider Stimulanzen erkennbar.

		Simvastatin	LPS	Simvastatin + LPS
4h	Casp3	+3%	+6% *	+7% *
	BCL-2	-2%	-2%	-3%
24h	CD14	+1%	+6% *	+6%
	PI	+8%		
	Casp3	-2% *	+5%	+4%
	CD95	+3%	+2%	+1%
48h	CD14	+2%	+2%	+4%
72h	CD14	+10% *	+3% *	+18% *
	PI	+12% *	+4%	+13% *

Veränderungen im Vergleich zur Basalrate,
bei CD14 und PI jeweils Zunahme der apoptotischen Zellen
leeres Feld = nicht gemessen, * signifikant

Auf mRNS-Ebene konnte, obwohl bisher bekannt war, dass LPS einen gewissen Apoptoseschutz bietet, unter alleiniger LPS-Stimulation nur ein

leichtes (nicht signifikantes) Absinken von XIAP festgestellt werden. Die Kombination aus LPS und Simvastatin führte jedoch mit -11% zu einer deutlichen Reduktion ($p < 0,01$).

APOPTOSEINDUKTION DURCH IMMUNSUPPRESSIVA ALLEIN ODER IN KOMBINATION?

Nachdem zuvor die in-vitro Wirkung von LPS und Simvastatin auf humane Monozyten untersucht wurde, haben wir uns dem Bereich der Immunsuppressiva zugewandt. Diese finden - neben der Transplantationsmedizin - in der modernen Medizin Verwendung in den verschiedensten Bereichen, z.B. der Behandlung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen und Hauterkrankungen. Durch die häufige Kombinationstherapie mit Statinen wurden beide Substanzgruppen ebenfalls kombiniert eingesetzt um die Auswirkungen auf Monozyten zu ermitteln. Die mittlere Inkubationszeit betrug 48h, die Untersuchung erfolgte mittels FACS-Analyse auf CD 14 und Annexin V.

Untersucht wurden Rapamycin, Cyclosporin A, MMF sowie FK 506.

Keines der Immunsuppressiva löste bei alleinigem Einsatz eine signifikante Veränderung der Apoptoserate aus. Auch in Kombination mit Simvastatin blieben die gemessenen Werte unverändert.

WIRKUNG VON IMMUNSUPPRESSIVA ALLEIN ODER IN KOMBINATION AUF VERSCHIEDENE SIGNALKASKADEN DER APOPTOSE

Entsprechend der bisherigen Ansätze wurde die Auswirkungen von Rapamycin auf Caspase-3 und CD95 - Marker der Signaltransduktion im Rahmen der Apoptose - erfasst. Nicht signifikante Ergebnisse werden nicht genannt.

Bei Messung der Caspase-3 zeigten sich bereits nach kurzer Zeit (4h), dass Rapamycin zu einer Abnahme der Caspase-3-Expression um vier Prozentpunkte ($p < 0,05$) führt.

Passend zu den Ergebnissen der CD 14 / Annexin V Messungen scheint Rapamycin nach 4h einen (wenn auch geringen) anti-apoptotischen Effekt zu

besitzen. In Kombination mit DOG wäre evtl. eine verstärkte Reduktion der apoptotischen Zellen zu erwarten gewesen, da DOG allein bereits einen proliferationsfördernden Effekt auf bestimmte Mauszellen besitzt (95).

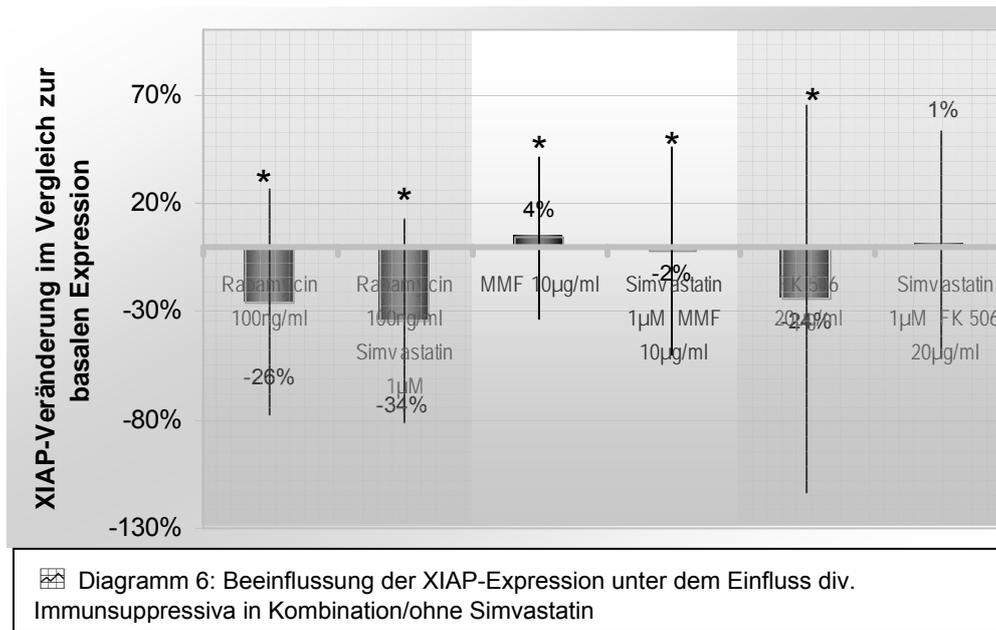
Findet eine Zellkultivierung über einen Zeitraum von 24h statt, so kommt es bei keinem der genannten Immunsuppressiva zu signifikanten Veränderungen.

Zusätzlich durchgeführte Messungen von CD 95 nach 4h Stimulation erbrachten bis auf einen Anstieg von vier Prozentpunkten unter Rapamycin [100 ng/ml] keine nennenswerten Veränderungen.

Die gemessenen Werte decken sich weitestgehend mit den CD 14 / Annexin V Messungen. Die eingesetzten Immunsuppressiva bewirken weder eine direkte Apoptose noch eine Veränderung der o.g. pro-apoptotischen Signalwege. Einzige Ausnahme stellt hier Rapamycin und die Abnahme der Caspase-3-Expression um vier Prozentpunkte ($p < 0,05$) dar.

Wie bereits zuvor, wurde auch hier der Einfluss auf XIAP (Inhibitor anti-apoptotischer Proteine) gemessen. Bei Stimulation mit Rapamycin [100 ng/ml] kam es zu einem schlagartigen Abfall der XIAP-mRNS-Menge (minus 26%, $p < 0,001$), bei zusätzlicher Simvastatin-Stimulation sogar -34% ($p < 0,001$). Eine Inkubation mit FK 506 zeigte bei einer Reduktion von -24% ($p < 0,05$) ähnliche Ergebnisse. Diese Wirkung scheint jedoch durch Simvastatin fast vollständig antagonisierbar zu sein (zur Verdeutlichung siehe Abbildung). In Kombination beider Stoffe sank der XIAP-Wert nur noch um 1% ($p < 0,05$).

XIAP relativ unbeeinflusst ließ die Anwendung von MMF. Es zeigte sich ein Anstieg von 4% ($p < 0,05$), der bei zusätzlichem Simvastatin in ein Absinken um 2% ($p < 0,05$) umschlug.



Beeinflussung der zellulären Reaktion auf LPS

Bereits weiter oben wurde die Beeinflussung der Apoptose durch Simvastatin im Modell der bakteriellen Sepsis sowie die Immunsuppressiva-Effekte auf die Apoptose bzw. die pro-apoptotischen Signalkaskaden besprochen.

Hierbei ergab sich die Frage, inwieweit die getesteten Medikamente/Stimulantien neben der immunsuppressiven Wirkung, die sie teilweise innehaben, evtl. direkte Auswirkung auf die Erkennung bakterieller Toxine (hier LPS) haben.

Das Drosophila-Gen Toll - dort essentiell für den Schutz vor Infektionen - konnte auch als sog. Toll-like Rezeptoren in Vertebraten nachgewiesen werden, wo sie als Rezeptoren für das bakterielle LPS fungieren (siehe Toll-like receptor (nicht permeabilisiert), Seite 30).

Eine Aktivierung der TLR fördert die Bildung inflammatorischer Zytokine und triggert somit eine Entzündungsreaktion.

Die Messungen zur Bestimmung der TLR4-Expression erfolgten allesamt nach 4h Inkubationszeit.

Nach 4h unter Stimulation mit LPS [1 µg/ml] kam es zu keiner Veränderung der TLR4-Werte. In Kombination mit Simvastatin [1 µM] zeigte sich hingegen eine signifikante ($p < 0,01$) TLR4-Abnahme um zwei Prozentpunkte. Unter Simvastatin allein gab es wiederum nur einen minimal positiven Trend, der aber nicht signifikant war.

Eine Inkubation mit Rapamycin [100 ng/ml] führte zu leicht erhöhten TLR4-Werten von plus zwei Prozentpunkten ($p < 0,05$). Bei gleichzeitiger Stimulation mit Simvastatin stiegen die Messwerte um drei Prozentpunkte im Vergleich zur basalen Expression ($p < 0,05$). Bei Stimulation mit Cyclosporin A [1 µg/ml] verstärkte sich dieser positive Trend auf plus vier Prozentpunkte, verfehlte aber knapp die Signifikanzgrenze. Zusätzliches Simvastatin führte im Vergleich zur Basalrate immer noch zu zwei Prozentpunkten Anstieg.

FK 506 [20 µg/ml] bewirkt einen signifikanten Anstieg der TLR4-Werte um plus sechs Prozentpunkte ($p < 0,05$), in Kombination mit Simvastatin immerhin noch plus drei Prozentpunkte.

Unter MMF blieb die TLR4-Expression unverändert, zusammen mit Simvastatin gab es einen Anstieg von drei Prozentpunkten.

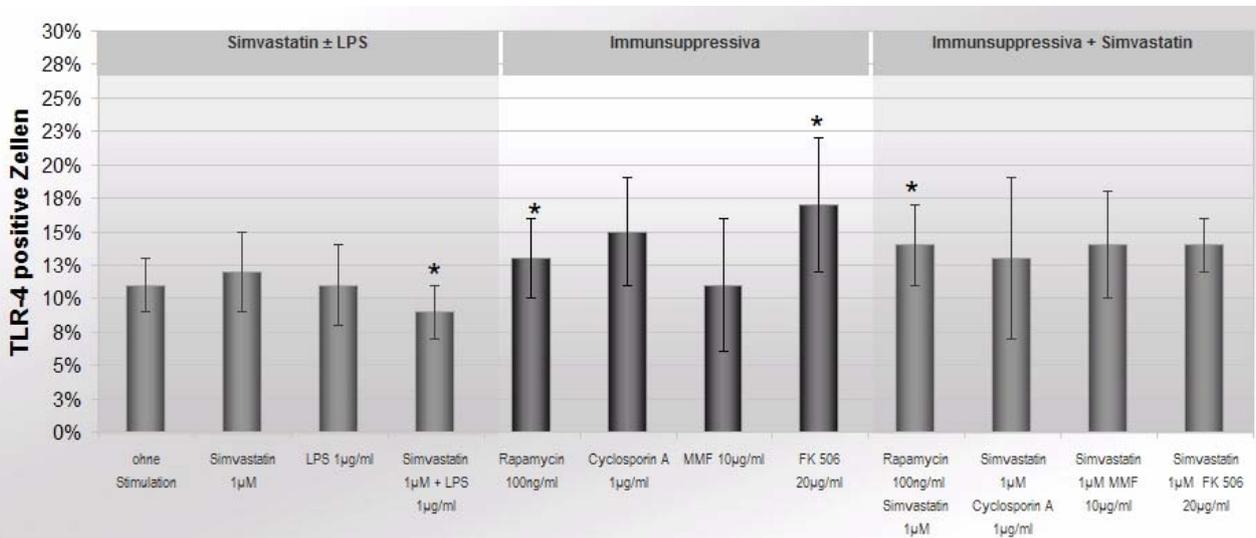


Diagramm 7: LPS-Rezeptor TLR4 nach 4h Inkubation unter dem Einfluss verschiedener Immunsuppressiva und LPS, jeweils in oder ohne Kombination mit Simvastatin

Beeinflussung der zellulären Stressantwort

Wie bereits zuvor in unserer Forschungsgruppe gezeigt werden konnte, resultiert eine Stimulation von Monozyten mit Hämin [2,5 µM] - dem Substrat der Hämoxigenase - in einer Reduktion der Apoptose (67).

HÄMOXYGENASE-1 (HO-1)

Als nahezu ubiquitär vorkommendes Enzym der zellulären Stressantwort und bekanntermaßen apoptoseblockierendem Hitze-Schock-Protein lag es nahe zu überprüfen, ob es zu einer Beeinflussung der Expression durch Simvastatin kommt. Die HO-1-Expression blieb bei 24stündiger Inkubation im Vergleich zur Basalexpression unverändert (nicht signifikant). Auch eine Stimulation mit LPS [1 µg/ml] bzw. LPS + Simvastatin scheint die HO-1-Expression nicht zu beeinflussen.

Da Simvastatin allein keinen Einfluss auf die HO-1-Expression besitzt, ist davon auszugehen, dass bei Kombination mit Hämin der HO-1-Anstieg um neun Prozentpunkte ($p < 0,05$) allein auf das Hämin zurückzuführen ist, allzumal dieser Anstieg dem Wert der alleinigen Stimulation mit Hämin entspricht.

Unter Verwendung von Cyclosporin A [1 µg/ml] und Rapamycin [100 ng/ml] kam es zu einer Reduktion der HO-1 um drei bzw. acht Prozentpunkte. Beide Ergebnisse sind jedoch nicht signifikant.

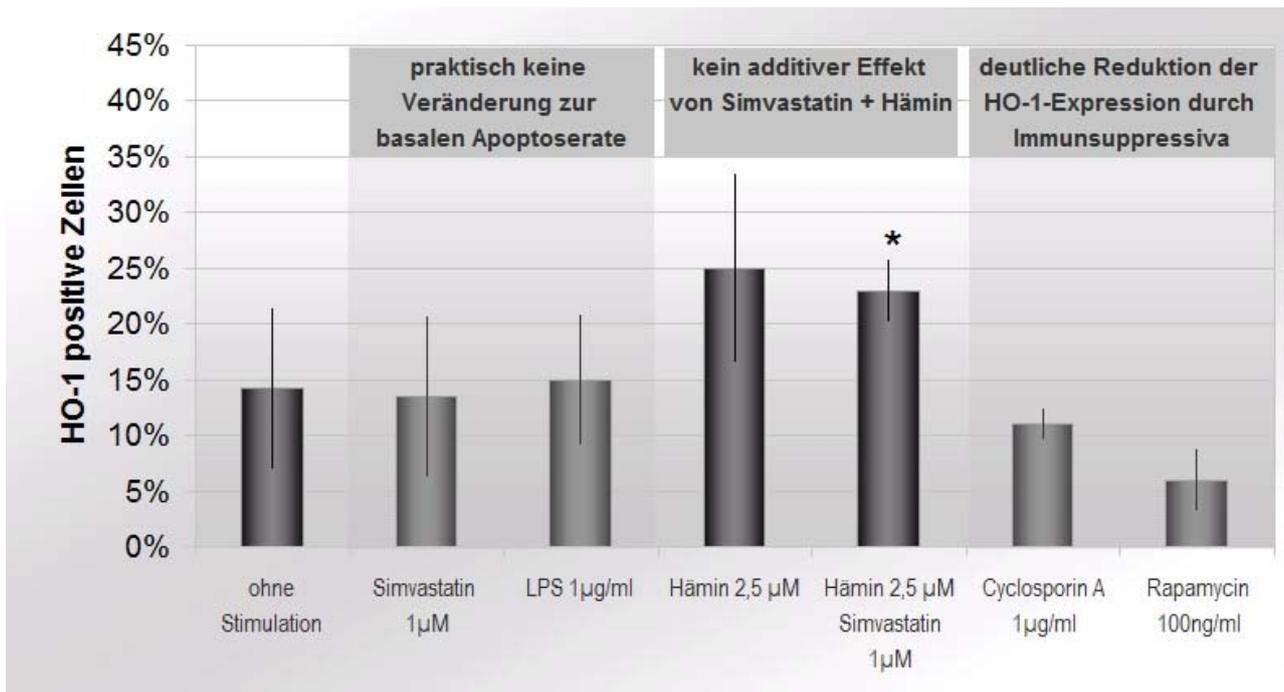


Diagramm 8: Beeinflussung der HO-1-Expression durch Simvastatin, LPS, Hämin, Cyclosporin und Rapamycin, 24h Inkubationszeit

Beeinflussung der Blutgerinnung

Haslinger et al. konnten zeigen, dass Simvastatin bei humanen peritonealen Mesothelzellen die Bildung von Tissue Factor - dem primären zellulären Initiator der Gerinnungs-Kaskade - unterdrücken kann (47). In diesem Zusammenhang war daher zu klären, ob dieses Phänomen ebenfalls bei humanen Monozyten auftritt und - falls ja - in wieweit es durch andere Stimulantien beeinflusst werden kann.

Nach 4h Inkubationszeit kam es bei alleiniger Stimulation mit Simvastatin [1µM] zu keiner signifikanten Veränderung. LPS allein führte, wie auch von Ferro et al. beschrieben (35), zu einem Anstieg der TF-Expression um 5 Prozentpunkte ($p < 0,01$). Die Kombination aus LPS und Simvastatin führte nach 4 und 8h nicht zu einem Abfall der TF-Expression sondern zu einem Anstieg (im Vergleich zum Basalwert) von sechs Prozentpunkten ($p < 0,05$).

Schließlich zeigte sich nach 24h Stimulation wiederum ein ähnlicher Effekt. Durch Stimulation mit LPS stieg TF um 27 Prozentpunkte ($p < 0,001$, $n = 8$).

Und auch hier führte die Co-Inkubation mit Simvastatin nicht zu einem Abfallen der TF-Werte ($p < 0,001$).

Betrachtet man die zeitliche Entwicklung der TF-Expression, so zeigte sich, dass mit zunehmender Inkubationsdauer die TF-Expression bei LPS-Stimulation und auch bei kombinierter Stimulation mit Simvastatin stieg.

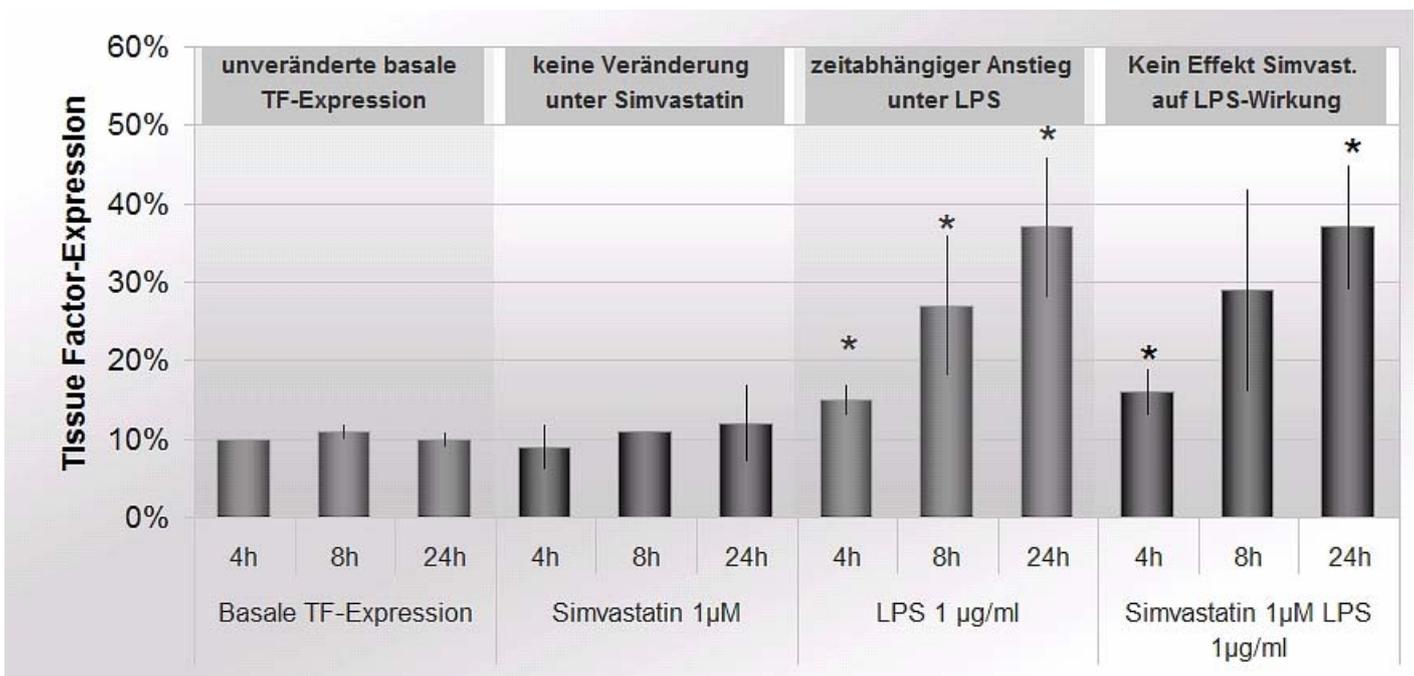


Diagramm 9: Einfluss von Simvastatin, LPS und Simvastatin+LPS auf die TF-Expression nach 4h (n=4), 8h (n=2) und 24h (n=8), sichtbar kein Effekt des Simvastatins

Beeinflussung der Proteinkinase C und Auswirkungen auf verschiedene Signaltransduktionswege

Untersucht wurden die Effekte von Simvastatin, Rapamycin und LPS jeweils in Kombination mit dem PKC-Inhibitor Calphostin bzw. dem PKC-Aktivator DOG. Gemessener Marker war Caspase-3.

Bereits zu Beginn der Untersuchungen zeigten die Versuche, dass trotz eindeutiger Apoptoseinduktion Simvastatin keine Veränderungen der Caspase-3 Expression (nach 4h) bewirkt. Eine Aktivierung der PKC durch DOG [1µM] scheint - trotz einer Reduktion der Caspase-3 um fünf Prozentpunkte (im Vergleich zu Simvastatin) bzw. zwei Prozentpunkte (im Vergleich zur basalen

Caspase-3-Expression) - keinen Einfluss zu haben. Zu einem massiven Anstieg der Caspase-3 (100% aller Zellen exprimierten Caspase-3) führt hingegen eine gleichzeitige Stimulation mit dem PKC-Inaktivator Calphostin [1µM] ($p < 0,01$) (siehe untenstehendes Diagramm).

Ähnliche Werte zeigten sich in Kombination mit Rapamycin. Rapamycin allein führt zu einer Verringerung der Caspase-3 (s.o.). Diese wurde durch DOG nicht beeinflusst. Calphostin hingegen führt auch hier wieder zu einem maximalen Anstieg der Caspase in 100% aller Zellen.

Dieser Verlauf ist ebenso für LPS reproduzierbar. LPS führt zu einer - trotz bekanntem anti-apoptotischen Effekt (49) - erhöhten Caspase-3. Unter Kombination mit DOG fällt sie auf den Basalwert ab, mit Calphostin ausgeprägter Anstieg auf 100%.

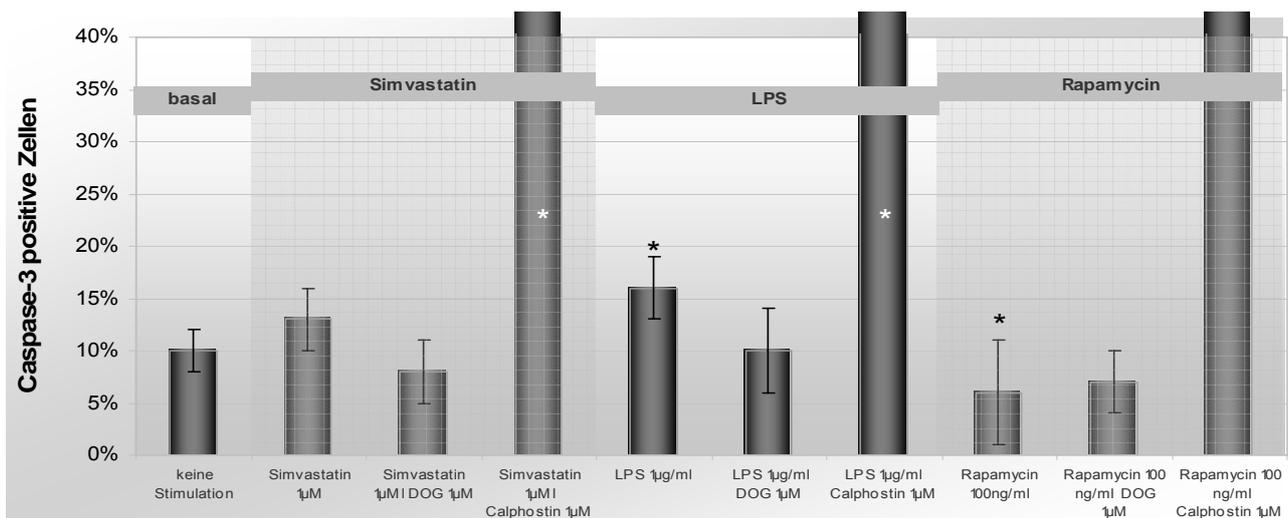


Diagramm 10: Caspae-3 nach 4h Inkubation mit Simvastatin, LPS und Rapamycin, jeweils in Kombination mit DOG und Calphostin.

Betrachtet man die obigen Ergebnisse, so induzierte die PKC-Inhibition durch Calphostin allein - unabhängig von den hier getesteten Stoffen - eine verstärkte Caspase-3-Expression.

Darüber hinaus war zu zeigen, ob und, falls ja, wie PKC-Inhibitoren/Aktivatoren die XIAP-Expression beeinflussen. Zu diesem Zweck erfolgten

Versuchsansätze mit Simvastatin und Rapamycin jeweils in Kombination mit DOG und Calphostin. Während Simvastatin allein praktisch keine Auswirkungen hatte, führte es in Kombination sowohl mit DOG als auch mit Calphostin zu einem Anstieg um 17% bzw. 20%.

Rapamycin allein reduzierte XIAP um 26% ($p < 0,001$), in Kombination mit DOG nahezu unveränderte Reduktion um 24% ($p < 0,01$). Durch Calphostin ließ sich die Reduktion durch Rapamycin nahezu vollständig antagonisieren (Anstieg um zwei Prozent, $p < 0,05$).

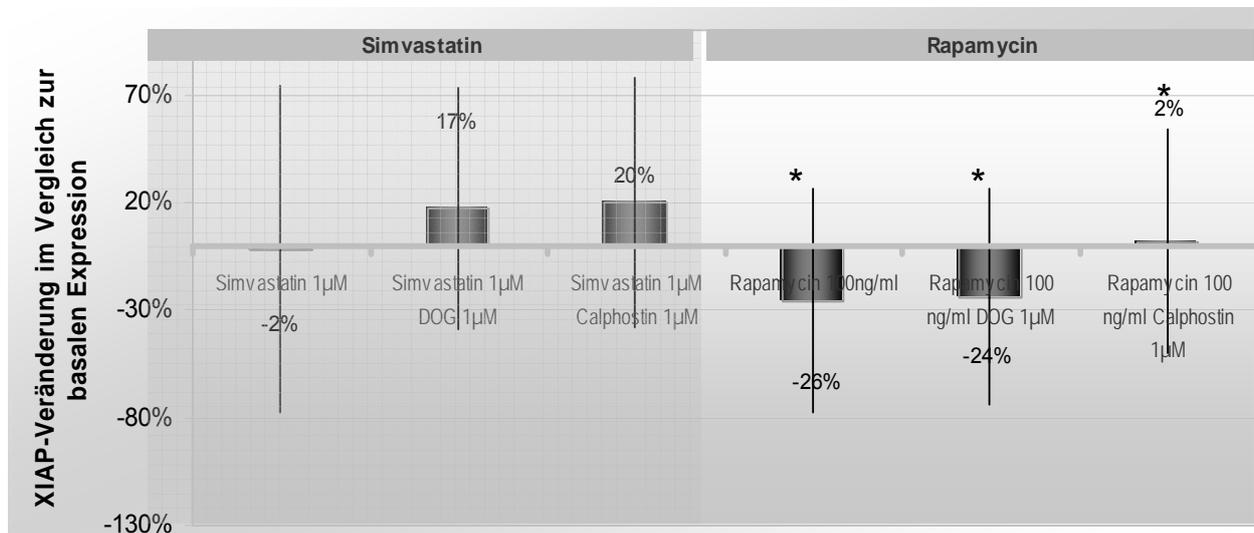


Diagramm 11: Einfluss von Simvastatin und Rapamycin auf die XIAP-Expression und Beeinflussung durch DOG und Calphostin

V. Diskussion

Apoptose: Beeinflussung durch Simvastatin, Immunsuppressiva und LPS

Simvastatin

Es ist bereits seit längerem bekannt, dass Statine ein breites Spektrum an zusätzlichen Wirkungen besitzen. Diese beruhen zum Teil auf ihrer eigentlichen Funktionsweise, der Blockade der HMG-CoA-Reduktase, zum anderen sind sie aber auch teilweise unabhängig von diesem Mechanismus. Es gab z.B. Untersuchungen zur Endothelin-1-Synthese und deren Beeinflussung durch Simvastatin. Hierbei zeigte sich, dass Simvastatin und Atorvastatin die Expression der pre-pro-Endothelin-1-mRNS zeit- und konzentrationsabhängig hemmen (50). Im Rahmen der weiteren Forschungen fand man jedoch heraus, dass diese Hemmung nicht durch die Gabe von Cholesterin - dem Endpunkt dieses Stoffwechselweges - sondern nur durch Mevalonat, dessen direkte Produktion durch Statine gehemmt wird, aufgehoben wird (17). Dies spricht eindeutig dafür, dass in diesem Fall die Statinwirkung auf einer Beeinflussung des Mevalonatstoffwechsels beruht. Auch andere Studien berichten davon, dass einige Statine Zell- und Gewebeveränderungen auslösen können, unabhängig davon, dass das Plasma-Cholesterin gesenkt wird (1;10;81).

Da im Rahmen dieser Versuchsreihen keine Antagonisierungsversuche durchgeführt worden sind, kann nicht abschließend geklärt werden, ob die beobachteten Effekte auf einer intrazellulären Reduktion des Cholesterins beruhen, oder aber über andere Stoffwechselwege vermittelt werden.

Eine der grundlegenden Fragen, die im Rahmen dieser Arbeit geklärt werden sollten, war die Frage, ob Simvastatin und Immunsuppressiva bei humanen Monozyten eine Apoptose auslösen? Die Beantwortung dieser Frage hat wesentliche Bedeutung in der Transplantationsmedizin, da eine Beeinflussung

des Monozytenüberlebens zur Arteriosklerose und Abstoßung nach Transplantation beitragen kann.

Erl et al. konnte bereits 2003 zeigen, dass alle lipophilen Statine für glatte Gefäßmuskelzellen einen pro-apoptotischen Reiz darstellen (33). Unter Stimulation mit Lovastatin 20µM für 24h kam es zu einem Anstieg der Annexin V-positiven Zellen um den Faktor 2,5, d.h. dass die Stimulation eine Apoptose ausgelöst hat. Betrachtet man parallel dazu unsere Ergebnisse, so sind sie von der Grundaussage her gleich: Simvastatin löst eine Apoptose aus. Wie auch bei *Erl*, war eine Zeitabhängigkeit zu erkennen: Ein signifikanter Apoptoseanstieg wurde erst nach 72h deutlich. Weitere, mit PI durchgeführte Messungen konnten die Tatsache, dass Simvastatin eine Apoptose auslöst, untermauern. Bereits innerhalb der ersten 24h war, ähnlich der CD 14 / Annexin V-Messung, ein deutlicher pro-apoptotischer Trend zu erkennen. Nach weiteren 48h (= 72h) schließlich wurde die Signifikanzgrenze überschritten.

Obwohl die Ergebnisse von *Erl et al.* eine ähnliche Aussage tätigten, stellt sich dennoch die Frage, wodurch der immense Zeitunterschied von immerhin 48h zu erklären ist. Dies kann sicherlich daran liegen, dass *Erl* primär mit Lovastatin gearbeitet hat (obwohl er seine Ergebnisse für alle lipophilen Statine verallgemeinert) und, dass er höhere Dosen eingesetzt hat. Die unterschiedliche Wirksamkeit zwischen Lovastatin und Simvastatin bleibt hierbei ebenfalls unberücksichtigt. Vergleicht man die Wirksamkeit anhand der LDL-Reduktion in vivo, so ist Simvastatin doppelt bis viermal so effektiv wie Lovastatin.

Lovastatin		Simvastatin	
Dosis	LDL-Reduktion	Dosis	LDL-Reduktion
10mg/Tag	21%	5mg/Tag	26%
20mg/Tag	27%	10mg/Tag	30%
40mg/Tag	31%	20mg/Tag	38%
40mg zweimal täglich	42%	40mg/Tag	41%
		80mg/Tag	47%

Quelle: www.drugdigest.org - Express Scripts, Inc. (ESI)

Sicher ist, dass nicht alle Ergebnisse uneingeschränkt für alle Statine gelten. Eine Versuchsreihe mit Pravastatin zeigte, dass Konzentrationen von 0,1 µM/ml bis hin zu 10 µM/ml keine pro-apoptische Wirkung entfalten.

Immunsuppressiva

Häufig müssen Statine gleichzeitig mit Immunsuppressiva eingesetzt werden. *Tse et al.* zeigte im Jahr 2004 in einer single center Studie aus China, dass gerade im ersten Jahr nach Transplantation der LDL-Spiegel häufig ansteigt (111). *Fellstrom et al.* konnten im gleichen Jahr zeigen, dass die Behandlung von Patienten nach Nierentransplantation mit Fluvastatin die LDL effektiv senken konnte, jedoch kein Einfluss auf den Transplantatverlust oder die Verdopplung des Kreatinin-Spiegels hatte (34).

Grundsätzlich sind bei jeder Kombinationstherapie mit verschiedenen Medikamenten Wechselwirkungen zu erwarten. Da obige Studien einen eindeutigen Benefit der Statinbehandlung nach Transplantation zeigten, sollten Mechanismen dieser Effekte geklärt und die Wechselwirkungen im Bezug auf Monozyten untersucht werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigten, dass die verwendeten Immunsuppressiva weder allein, noch in Kombination mit Simvastatin einen signifikanten Einfluss auf die per CD 14/ Annexin V gemessene Apoptoserate von Monozyten haben.

LPS

1997 wurde von *Heidenreich et al* gezeigt, dass die LPS-Stimulation bei humanen Monozyten durch Aktivierung einen Schutz vor Apoptose bewirken kann (49). LPS reagiert hierbei mit dem oberflächlichen LPS-Rezeptor CD14, der unabdingbar ist für die Aktivierung von Monozyten (118;121).

Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden verschiedene Stimulationsprotokolle verwendet um herauszufinden, ob LPS unter anderem die Simvastatin-vermittelten Wirkungen antagonisieren kann.

Die durchgeführten Kontrollversuche mit alleiniger LPS-Stimulation zeigten nach 24h und 72h in der CD14 / Annexin V Färbung leicht gestiegene Apoptoseraten. Eine zweite Färbung mit permeabilisiertem PI wies nach 72h ebenfalls alle Zeichen einer vermehrten Apoptose auf.

Dieser pro-apoptische Effekt ist bereits von anderen Zelltypen bekannt. In einer Veröffentlichung aus dem Jahre 2000 zeigten *Xaus et al.*, dass LPS bei murinen, aus dem Knochenmark separierten Makrophagen eine zeit- und dosisabhängige Apoptose auslöst (119). Das Maximum wurde hierbei schon nach 3h erreicht. In vivo Studien an Mäusen konnten einen ähnlichen Effekt für Fibroblasten nachweisen (8). *Alikhani et al.* injizierten Mäusen gereinigtes LPS und wiesen mittels Microarray-Analysen nach, dass die mRNA für Apoptose-induzierende Liganden um 130% bis 250% stieg. Ebenso stieg die Expression von TNF-Rezeptoren um 139 bis 460%.

Der gleichzeitige Einsatz von Simvastatin und LPS konnte die unter Simvastatin beobachtete Apoptose sogar noch deutlich verstärken. Eine CD14/Annexin V-Messung nach 72h zeigte eine im Vergleich zu Simvastatin um acht Prozentpunkte angestiegene Apoptose.

Insgesamt betrachtet, zeigen die Versuche, dass LPS auch auf Monozyten eine pro-apoptotische Wirkung besitzen kann, welche durch eine Kombination mit Simvastatin deutlich verstärkt wird. Hier könnten neue therapeutische Optionen für Statine liegen, die die inflammatorische Wirksamkeit von Monozyten modulieren, wie dies auch schon für RAW-Makrophagen gezeigt werden konnte (58).

Simvastatin induces caspase-independent apoptosis in LPS-activated RAW264.7 macrophage cells.

Macrophages participate in several inflammatory pathologies such as sepsis and arthritis. We examined the effect of simvastatin on the LPS-induced proinflammatory macrophage RAW264.7 cells. Co-treatment of LPS and a non-toxic dose of simvastatin induced cell death in RAW264.7

cells. The cell death was accompanied by disruption of mitochondrial membrane potential (MMP), genomic DNA fragmentation, and caspase-3 activation. Surprisingly, despite caspase-dependent apoptotic cascade being completely blocked by Z-VAD-fmk, a pan-caspase inhibitor, the cell death was only partially repressed. In the presence of Z-VAD-fmk, DNA fragmentation was blocked, but DNA condensation, disruption of MMP, and nuclear translocation of apoptosis inducing factor were obvious. The cell death by simvastatin and LPS was effectively decreased by both the FPP and GGPP treatments as well as mevalonate. Our findings indicate that simvastatin triggers the cell death of LPS-treated RAW264.7 cells through both caspase-dependent and -independent apoptotic pathways, suggesting a novel mechanism of statins for the severe inflammatory disease therapy.

Kim YC et al.

Biochem Biophys Res Commun. 2006 Jan 20;339(3):1007-14. Epub 2005 Nov 28.

Paumelle et al. konnten die Bedeutung der Wechselwirkung von Simvastatin und PKC zeigen. Dessen Untersuchungen beschäftigten sich mit den Auswirkungen von LPS und Simvastatin auf die Proteinkinase C (13). Sie konnten zeigen, dass LPS PKC α in Makrophagen induziert und dass die Induktion durch Simvastatin gehemmt wird.

Ursache: mögliche Signalwege der Apoptose und anderer klinischer Effekte

Ausführlich wurden die möglichen Signalwege der verschiedenen Simvastatin- und Immunsuppressiva-Effekte charakterisiert. Zunächst ist zu besprechen, wie, d.h. über welchen Signalweg, Simvastatin bzw. die Immunsuppressiva möglicherweise eine Apoptose ausgelöst haben.

CASPASE-3

Erl et al. konnte zeigen, dass alle lipophilen Statine pro-apoptotisch auf glatte Gefäßmuskelzellen wirken.

Zur Klärung des Signalweges maß *Erl* unter anderem Caspase-3. Hierbei war bereits nach 6h Inkubationszeit bei Media-SMCs ein Anstieg der Caspase-3 zu registrieren. Weitere Untersuchungen nach 12 und 24h zeigten noch höhere

Caspase-3-Werte. Diese Ergebnisse an glatten Gefäßmuskelzellen sind in Monozyten nicht zu reproduzieren. Obwohl nach 4h ein leichter, nicht signifikanter Anstieg erkennbar war, ist nicht davon auszugehen, dass die Simvastatin-induzierte Apoptose bei Monozyten Caspase-3-vermittelt ist.

Zu ähnlichen Ergebnissen gelangte auch *Cheng et al.* in seinen Studien (20). *Cheng* untersuchte die Wirkung von Simvastatin auf peritoneale Makrophagen der Maus. Unter einer Dosis von 10 µM beobachtete er nach 48h lichtmikroskopische Veränderungen, die einer Apoptose entsprechen und stellte eine verstärkte PS-Verlagerung auf die Zelloberfläche fest. PS ist die Bindungsstelle des Apoptosemarkers Annexin V, dessen Bindung an PS für eine Apoptose spricht. Um festzustellen, ob die beobachtete Apoptose Caspase-vermittelt ist, erfolgte der Einsatz des allgemeinen Caspase-Inhibitors Z-VAD-Fmk. Hierunter blieb die zuvor beobachtete DNS-Fragmentation aus, jedoch kam es weiterhin zur PS-Externalisierung. Auch *Cheng* schloss daher darauf, dass „caspase inhibition and inhibition of DNA fragmentation do not alter the overall fate of death in simvastatin-treated cells“.

Untersucht man den Einfluss der Immunsuppressiva, so zeigte eine Messung der Caspase-3 nur bei Stimulation mit Rapamycin einen leichten Abfall, was sogar für einen anti-apoptotischen Effekt sprechen würde. Andere Immunsuppressiva wiesen hingegen keinen Effekt auf. Die unter Rapamycin beobachteten Veränderungen waren vollkommen unabhängig von einer zusätzlichen Simvastatin-Stimulation.

Betrachtet man die Ergebnisse der Caspase-3 Messungen mit der Frage, welche Bedeutung die PKC für ihre Induktion hat, so bewirkte Calphostin allein, unabhängig von den hier getesteten Stoffen, eine vermehrte Caspase-3 Expression.

Diese Daten decken sich mit den Befunden von *Lewis et al.*, der für Colo 205 Zellen ähnliche Effekte gezeigt hat (71). *Lewis* setzte den PKC-Inhibitor Chelerythrine C1 ein und beobachtete einen zwischenzeitlichen (Maximum nach 1h, Minimum nach 8h) Anstieg der Caspase-3.

Fas/CD95

Nach der Feststellung, dass die Simvastatin-induzierte Apoptose in Monozyten nicht wesentlich Caspase-3-vermittelt ist, galt es andere Signalwege zu untersuchen.

Zunächst wurde CD95 untersucht. CD95 (Fas) gilt als *der* Hauptrezeptor zur Vermittlung von Apoptose. Ausgelöst wird diese durch Bindung des spezifischen Liganden FasL. *Kiener et al.* zeigten, dass Monozyten grundsätzlich, auch ohne Stimulation, Fas auf ihrer Oberfläche exprimieren (57). Physiologisch übernimmt Fas mehrere Aufgaben. So geht *Kiener* davon aus, dass der von *Mangan* beschriebene Effekt, dass Serumentzug bei Monozyten zur Apoptose führt (79;80), durch eine auto- oder parakrine Stimulation des CD95-Rezeptors ausgelöst wird.

Knapp et al. (60) benutzten für ihre Forschungen, wie zuvor auch *Erl*, glatte Gefäßmuskelzellen. Erste Beobachtungen ließen vermuten, dass SMC durch die Präinkubation mit Statinen für die pro-apoptischen Effekte einiger Zytokine sensibilisiert werden. Zur Gruppe der untersuchten Zytokine gehörte unter anderem auch der Fas-Ligand FasL. Nach Vorbehandlung mit Statinen für 24h und anschließende 24stündige Inkubation mit FasL und anderen Zytokinen wurde durchflusszytometrisch PI gemessen sowie ein TUNEL-Assay durchgeführt. Nach Behandlung mit Simvastatin [3 µM] und darauf folgender Zugabe von sFasL (rekombinanter, löslicher FasL) konnte eine Verneunfachung der TUNEL-positiven Zellen festgestellt werden. Messungen mittels PI-Färbung (permeabilisiert mit Natrium-Citrat) unterstrichen dieses Ergebnis, da sie zeigten, dass unter Simvastatin [2 µM] die Menge der PI-negativen (und damit apoptotischen) Zellen um 16% anstieg.

Fasst man diese Ergebnisse zusammen, so kann man sagen, dass Simvastatin das Ansprechen der SMC auf den pro-apoptotischen Liganden FasL und eine darauf folgende Apoptose verstärkt.

Kombiniert man nun die Ergebnisse von *Knapp* und *Kiener* so ließe sich evtl. vermuten, dass Simvastatin bei den von uns untersuchten Monozyten eine evtl. latent vorhandene auto-/parakrine Fas-Stimulation verstärkt und somit Urheber der gezeigten Apoptose sein könnte.

Da eine Verstärkung der Fas-Wirkung gezeigt werden konnte, betrachteten *Knapp et al.* auch die Expression des FasL-Rezeptors (Fas, CD95) mittels FACS-Untersuchung. Ihre Versuche machten jedoch deutlich, dass es unter Statin-Wirkung zu keiner erhöhten CD95-Externalisierung kam.

Zu einem ähnlichen Schluss führten auch die hier durchgeführten FACS-Messungen. Nach 4h Inkubation mit Simvastatin [1µM] war kein Anstieg des CD95-Rezeptors auf der Zelloberfläche feststellbar. Somit konnte nicht gezeigt werden, dass Simvastatin eine Induktion von CD95 auslöst und dadurch zu einer vermehrten Apoptose beiträgt.

BCL-2

Während FAS/CD95 eine pro-apoptotische Kaskade auslöst, bewirkt Bcl-2 das Gegenteil. Als anti-apoptotisches Protein schützt es Zellen vor dem programmierten Zelltod. Es war daher durchaus denkbar, dass Simvastatin zu einer Reduktion des anti-apoptotischen Bcl-2 führt und auf diesem Wege einen Zelltod triggert.

Blanco-Colio et al. beschäftigten sich in diesem Zusammenhang ebenfalls mit der Auswirkung von Simvastatin auf die Bcl-2-Expression (12), forschten aber auch, wie die Gruppen zuvor, an VSMC. Es gelang der Forschungsgruppe per Western blot nachzuweisen, dass Simvastatin in einer Dosis von 100 µM nach 24h Inkubationszeit eine teilweise, nach 48h eine vollständige Unterdrückung der Bcl-2-Expression auslöste. Durch zusätzliche Versuche mit geringeren

Dosen von 1 und 10 μM konnte auch eine Dosisabhängigkeit herausgearbeitet werden.

Im weiteren Verlauf der Studien wurde auch eine Bestimmung der Caspase-9-Expression vorgenommen. *Blanco-Colio* stellte fest, dass es zu einem Anstieg an Caspase-9 kam, Caspase-8 jedoch unverändert blieb. Eine Unterbrechung der Caspase-Kaskade mit dem auch von *Cheng* (siehe oben) verwendeten ZVAD-fmk konnte die Reduktion des Bcl-2 nicht verhindern, wohl aber die Auslösung einer Apoptose unterdrücken. Dies ist recht interessant, da *Cheng*, dessen Ergebnisse ein Jahr später veröffentlicht wurden, diesem Ergebnis widerspricht und davon ausgeht, dass die Hemmung der Caspase-Kaskade keinen Einfluss auf die Simvastatin-ausgelöste Apoptose hat.

Sieht man in diesem Kontext die durchgeführten Bcl-2-Messungen und lässt die Diskussion über die Rolle der Caspasen außen vor, so war festzustellen, dass nach 4h Inkubationszeit, also weit vor den Messungen von *Blanco-Colio*, noch keine signifikante Herab-Regulation festzustellen war. Daher verstärken sich die Hinweise, dass die Apoptose-Triggerung bei Monozyten durch ein Absinken der Bcl-2-Expression vermittelt sein könnte. Die Unterschiede könnten nur durch die Differenz der Inkubationszeiten erklärbar sein, aber auch durch zellspezifische Mechanismen der VSMC bzw. Monozyten verursacht worden sein. Für die Zukunft müssen daher Ansätze über längere Zeiträume untersucht werden um in diesem Bereich abschließend Klarheit schaffen zu können.

XIAP

Unter der Vielzahl anti-apoptotischer Proteine hat neben der Familie der Bcl-2 auch die Familie der IAP, und im Speziellen das Protein XIAP, wesentliche Bedeutung. Ermutigt durch die interessanten Ergebnisse aus dem Bereich der Familie Bcl-2 kamen Versuchsansätze zum Einsatz, die eventuelle Ähnlichkeiten zwischen Bcl-2 und XIAP aufzeigen sollten. Hierzu wurde das Verfahren der semiquantitativen RT-PCR angewandt.

XIAP ist in seiner anti-apoptotischen Funktion sehr potent, wie dies in einer Studie aus dem Jahr 2000 von *Datta et al.* deutlich wird. Hier wurde die Wirkung von XIAP in U-937 (menschliche myeloide Leukämiezellen) untersucht (25). Durch Elektroporation wurde ein XIAP-haltiges Plasmid in die Zellen eingeschleust und damit eine konstante Überexpression von XIAP erzielt.

ARA-C, ionisierender Strahlung, TNF oder anti-Fas-Antikörpern führten in den XIAP überexprimierenden Zellen nur zu deutlich geringeren Apoptoseraten. Obwohl die Cytochrom-C Freisetzung, die normalerweise durch ARA-C ausgelöst wird, nicht bzw. kaum abgeschwächt wurde, bestand ein Nekroseschutz, der auf der Unterdrückung der Caspase-9-Aktivierung beruhte.

Bei humanen Monozyten scheint es so zu sein, dass die Stimulation mit Simvastatin [1 µM] keinen nennenswerten Einfluss auf XIAP ausübt. Die marginale und nicht signifikante Veränderung der XIAP-Expression lässt darauf schließen, dass Simvastatin in diesem Falle nicht über eine Reduktion der XIAP-Expression pro-apoptotisch wirkt. Andererseits legt es aber auch die Vermutung nahe, dass es durch die Reizung und Apoptose-Auslösung mit Simvastatin nicht zu einer zellulären Gegenregulation über den XIAP-Pathway kommt.

Versuche, ähnlich denen von *Datta*, könnten in Zukunft zeigen, ob XIAP bei Überexpression in der Lage ist, eine Simvastatin-ausgelöste Apoptose abzuschwächen oder sogar evtl. komplett zu unterdrücken.

Wirft man nun noch einen kurzen Blick auf die Auswirkungen nach Immunsuppressiva-Stimulation, so zeigte sich, dass Rapamycin allein und zusammen mit Simvastatin einen deutlichen Einbruch der Expression bewirken konnte. Weniger XIAP bedeutet geringere Inhibition anti-apoptotischer Proteine und somit anti-apoptotische Wirkung. Da aber keine verringerte Apoptoserate feststellbar war, kann evtl. davon ausgegangen werden, dass Rapamycin zwar via XIAP anti-apoptotisch bei Monozyten wirkt, dies aber auf die „normale“, basale Apoptoserate bei 5% FCS keinen Einfluss hat, oder es sich um gegenregulatorische Phänomene handelt.

HO-1

In der Vergangenheit sind bereits Veröffentlichungen erschienen, die sich mit den Auswirkungen von Statinen auf die HO-1-Expression befassen haben. *Lee et al.* zeigten z.B., dass es durch Simvastatin zu einer vermehrten Expression von HO-1 in VSMCs der Aorta des Menschen und der Maus kommt (69). *Grosser et al.* konnten den gleichen Effekt bei Endothelzellen der menschlichen Nabelvene nachweisen (45).

Unsere Forschungen konnten keinen ähnlichen Effekt aufzeigen und lassen daher darauf schließen, dass Simvastatin im Rahmen der Apoptose zumindest keinen durch HO-1 beantworteten Zellstress in Monozyten auslöst.

Eine Stimulation mit Hämin [2,5µM] führte zu einem ausgeprägten HO-1 Anstieg von neun Prozentpunkten. Dieser blieb bei Kombination mit Simvastatin unverändert.

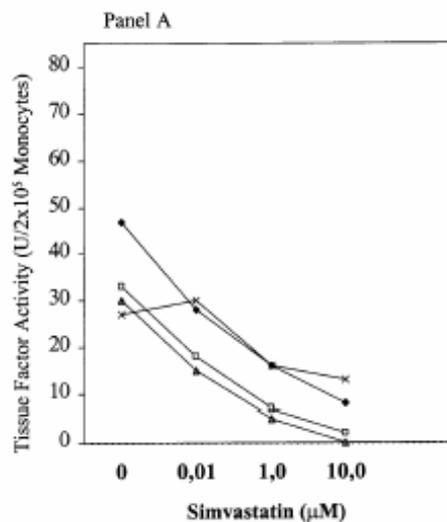
TISSUE FACTOR

TF ist *der* Initiator der Gerinnungskaskade (s.o.) und wird durch die verschiedensten Gewebe freigesetzt. Nach einer Gefäßverletzung bindet Faktor VII (FVII) an durch extravaskuläre Zellen (Adventitia von Arterien und Venen) gebildetes TF und bildet den TF/FVIIa-Komplex. Dieser wiederum aktiviert Faktor X und IV wodurch es - über weitere Zwischenschritte - zur Bildung eines Thrombus kommt.

Zur Rolle des TF bei Arteriosklerose konnte gezeigt werden, dass TF reichlich in Makrophagen und glatten Muskelzellen der Gefäße innerhalb des arteriosklerotischen Plaques gebildet wird (116), und dass die Menge des exprimierten TF mit der Progression der arteriosklerotischen Läsion zunimmt. Studien an Mäusen konnten zeigen, dass niedrige TF-Werte z.B. vor Thrombose schützen.

Die Menge des durch Monozyten exprimierten TF ist bei gesunden Probanden ausgesprochen geringen. Nur CD14 positive Monozyten bilden TF und diese machen gerade mal 1,5% der zirkulierenden Monozyten aus (32).

Ferro et al. zeigten bereits im Jahr 2000, dass Simvastatin die LPS-induzierte TF-Expression in humanen Monozyten reduzieren kann (35). *Ferro* inkubierte die Zellen drei Stunden lang mit Simvastatin und gab anschließend für weitere sechs Stunden LPS dazu. Seine Ergebnisse zeigten (siehe Abbildung), dass die Reduktion der TF-Expression abhängig von der Simvastatin-Dosierung ist.



👁️ *Abbildung 12: Ferro et al.*: TF-Aktivität bei LPS-stimulierten [4 µg/ml] Monozyten, die 3h mit und ohne Simvastatin präinkubiert wurden. Die Zellen stammten von gesunden Probanden. n = 4

Ferro praktizierte hierfür eine sequenzförmige Stimulation, während wir durchweg eine gleichzeitige Inkubation mit Simvastatin und LPS durchgeführt haben. Nach einer dreistündigen Inkubation mit Simvastatin wurde von *Ferro* erst anschließend LPS zugegeben. *Ferros* Ergebnisse beruhen daher wohl auf einer primären Wirkung des Simvastatins. Bei unserer Methode kam es zu einer direkten, gleichzeitigen Wechselwirkung beider Stimulantien, so dass Simvastatin keinen reduzierenden Effekt mehr auf die LPS-induzierte TF-Expression ausüben konnte.

Unabhängig von *Ferros* Ergebnissen gibt es noch weitere Untersuchungen (allerdings bei Makrophagen), die Hinweise darauf zeigen, dass Simvastatin zu einer Reduktion des TF-Levels führen kann (19). Wahrscheinlich sind die unterschiedlichen Stimulationsprotokolle Ursache, so wie die unterschiedlichen Konzentrationen von LPS - wir verwendeten LPS [1 µg/ml] - wogegen *Ferro* immerhin die vierfache Dosis einsetzte. Bezieht man die unter (19) genannten Ergebnisse von *Bruni et al.* mit ein, so gilt auch zu bedenken, dass andere Zelllinien eingesetzt wurden.

TLR-4

TLR-4 und Statine haben beide Einfluss auf arteriosklerotische Gefäßveränderungen. Eine Veröffentlichung aus dem Jahr 2005 konnte z.B. zeigen, dass Personen mit einem TLR-4 Polymorphismus nach einer Nierentransplantation ein geringeres Risiko für akute Abstoßung und arteriosklerotische Veränderungen haben (30).

Geht man von der physiologischen Funktion des TLR-4 aus, so wäre sicherlich mit einer vermehrten Expression unter LPS-Stimulation zu rechnen gewesen. Diese Vermutung wurde in den Versuchen jedoch nicht bestätigt.

Betrachtet man nun entsprechende Publikationen zu diesem Thema, so stößt man auf folgende Ergebnisse:

Moreno et al. konnten im Rahmen ihrer Veröffentlichung zeigen, dass - im Gegensatz zu unseren Ergebnissen - bei Monozyten nach 4h Stimulation mit LPS die TLR-4-Expression signifikant abnimmt und für 12h reduziert bleibt (86). Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Forschungsgruppe aus Pamplona neben anderen LPS-Konzentrationen in den Nährmedien (10 ng/ml oder 100 ng/ml - im Gegensatz zu 1 µg/ml in unseren Versuchen) auch andere Verfahren der Zellkultur verwendet hat.

Mirlashari et al. zeigten im Gegensatz dazu völlig andere Forschungsergebnisse (85). Laut *Mirlashari* kommt es im Zeitraum zwischen 1 und 4h nach Stimulation mit LPS (von *Neisseria meningitidis*) zum einem

signifikanten Anstieg der TLR-4-Expression bei humanen Monozyten, die in Vollblut stimuliert wurden.

Mirlashari verweist in seiner Publikation ebenfalls auf die widersprüchliche Datenlage zur TLR-4-Expression und zitiert hierbei Arbeiten von *Bosisio, Muzio* und *Visintin* (18;88;113), die seine Aussagen untermauern. Durch die Tatsache, dass unsere Messungen unter LPS-Stimulation weder einen Anstieg noch einen Abfall aufweisen, müssen wir davon ausgehen, dass in unserem speziellen Fall keine Beeinflussung stattfindet.

Klinische Bedeutung

Die Tatsache, dass Simvastatin eine Apoptose humaner Monozyten auslöst, wirft natürlich die Frage auf, welche Bedeutung dies für die Klinik hat. Sei es nun für den Schutz der Transplantatfunktion, die Ausbildung von Arteriosklerose oder aber auch eine ggf. notwendige Anpassung der weiteren Medikation.

Darüber hinaus besitzen Patienten nach Organtransplantationen - bedingt durch die immunsuppressive Therapie - ein erhöhtes Risiko für Infektionen und maligne Neoplasien. Welche Auswirkungen hat eine Statintherapie auf dieses Risiko? Alles in allem Fragen, die alle der über 4000 jährlich in Deutschland transplantierten Patienten betreffen.

TRANSPLANTATFUNKTION

Die langfristige Prognose eines Transplantats hängt von verschiedenen Faktoren ab. Abgesehen von der HLA-Kompatibilität und der immunsuppressiven Therapie spielt die Ischämiezeit eine wichtige Rolle. Grundsätzlich gilt natürlich, je kürzer, desto besser. Dass sich eine kurze Ischämiezeit positiv auf das Langzeitüberleben auswirkt, sieht man zum Beispiel bei Nierentransplantationen nach Lebendspende. Da sich die Ischämiezeit jedoch aufgrund organisatorischer Faktoren nicht beliebig reduzieren lässt, sind Möglichkeiten gefragt, die Prognose trotz längerer Perioden ohne Organperfusion zu verbessern.

In einem 2003 erschienenen Artikel beschreiben *Matsuyama et al.* die Auswirkungen der Tissue Factor Expression auf die Ischämie-Toleranzzeit von Rattennieren (82). Die japanische Gruppe konnte zeigen, dass durch eine selektive Blockade der TF-Expression (durch ein antisense Oligodeoxynucleotid) das „Outcome“ nach einer warmen Ischämie von 90 Minuten drastisch verbessert wurde. In der Kontrollgruppe überlebte keine der Ratten den dritten Tag, wogegen in der behandelten Gruppe 12 von 20 Tieren länger als bis Tag vier lebten. Histologische Untersuchungen zeigten, dass in den Bereichen, in denen TF verringert exprimiert wurde gleichzeitig auch das Ausmaß der Nekrosen abgenommen hat.

Daraus lässt sich schlussfolgern, dass eine erhöhte Tissue Factor-Expression mit einem verschlechterten Transplantatüberleben einhergeht.

Da unter Simvastatin allein kein Anstieg des TF zu beobachten war, ist davon auszugehen, dass eine Statintherapie des Spenders sich in diesem Zusammenhang nicht negativ auf das Transplantat auswirkt. Anders ist es jedoch bei einem gleichzeitigen bakteriellen Infekt. Eine vermehrte Freisetzung von LPS könnte, zumindest theoretisch, zu einem Anstieg der TF-Expression beim Spender führen und somit die oben beschriebenen Auswirkungen auf das Transplantat haben. Inwieweit sich dieser Sachverhalt letztendlich durch klinische Auswirkungen äußert, ist schwierig auch nur annähernd abzuschätzen. Nichts desto trotz wäre es sicherlich von Interesse weitere Studien zu dieser Fragestellung zu unternehmen.

Die Auswirkungen einer Transplantation auf Blutfette und der Einsatz von Statinen wurden bereits häufig in verschiedenen Studien untersucht. *Tse et al.* konnte zeigen, dass LDL nach Transplantationen ansteigt (111): *Fellstrom* zeigte, dass z.B. Fluvastatin keinen Einfluss auf den Transplantatverlust hat (34). *Katznelson* wiederum konnte darlegen, dass die Behandlung mit Cholesterinsenken zu einer Reduktion der chronischen Abstoßung führt (56).

Drei wesentliche Abstoßungsreaktionen sind beschrieben.

1. **Hyperakute Rejektion:** Sie tritt innerhalb weniger Minuten nach Transplantation auf. Ursache sind präformierte humorale Antikörper. Zumeist muss noch während der eigentlichen Transplantation das Transplantat wieder entfernt werden. Morphologisch zeigt sich eine Schwellung und Zyanose des Transplantats, verbunden mit einer Leuko- und Monozyteninfiltration.
2. **Akute Rejektion:** Auftreten zumeist innerhalb der ersten zwei bis sechs Wochen als Ausdruck einer zellulären Immunreaktion.
3. **Chronische Rejektion:** Wird durch zelluläre und humorale Faktoren vermittelt. Auftreten nach Monaten bis Jahren. Eine therapeutische Beeinflussung ist nur in geringem Maße möglich.

Monozyten sind am Vorgang der Abstoßung wesentlich beteiligt. Verschiedene Cytokine führen als Zeichen der Abstoßung zu einer Rekrutierung der Monozyten in das Transplantatorgan (40;41;92). Somit ist es auch nicht verwunderlich, dass die Menge der Monozyten im Transplantat bei akuter Abstoßung massiv zunimmt (42).

Setzt man dies in Korrelation mit unseren Ergebnissen, wäre durchaus denkbar, dass die Simvastatin-induzierte Apoptose einer der protektiven Faktoren der Statinbehandlung nach Transplantation darstellt und somit eine Prognoseverbesserung bewirken kann.

Interessanterweise konnte für niereninsuffiziente Patienten (nicht transplantiert) gezeigt werden, dass Statine in der Lage sind die GFR zu erhalten und eine Proteinurie zu reduzieren (5;37). Hier ist also von einem eigenen nephroprotektiven Effekt auszugehen.

ARTERIOSKLEROSE

Bereits in der Einleitung ist auf die besondere Bedeutung der Statine für die Arteriosklerose eingegangen worden. Die untersuchten Monozyten haben auch hierbei eine der Schlüsselrollen inne (98;105), sind sie es doch, die durch

Umwandlung zu Schaumzellen, Adhärenz am Gefäßendothel und Ausbildung einer Plaque zu einer Lumenverkleinerung führen. Die Ruptur einer solchen Plaque ist eine der häufigsten Ursachen der koronaren Gefäßverschlüsse.

Die Statine vermögen hier auf zweierlei Weise zu helfen. Zunächst wird durch die Reduktion der Blutfette die Bildung neuer Plaques effektiv vermindert, zum anderen reduzieren sie die Zahl der Entzündungszellen und führen so einer Stabilisierung der Plaques (74).

Sicherlich, man kann davon ausgehen, dass eine erhöhte Apoptose derjenigen Zellen, die zu einer Bildung von Plaques führen, positive Auswirkungen auf die Bildung neuer Plaques hat. Andererseits gibt es aber Ergebnisse der Medizinischen Hochschule Hannover, die wiederum die These aufstellen, dass die *Reduktion* der Apoptose von Makrophagen maßgeblich zur Plaquestabilität beiträgt und somit ein anzustrebendes Ziel bei Arteriosklerose sei (46). Geht man dann von einer lokalen (innerhalb der arteriosklerotischen Läsion) Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen aus, so würden unsere Ergebnisse bedeuten, dass der Anteil der Makrophagen innerhalb der Läsion abnehmen könnte. Offensichtlich ist es von Bedeutung, zu welchem Zeitpunkt das Überleben der Monozyten verändert wird.

MALIGNNE NEOPLASIEN

Einige Studien haben sich mittlerweile mit dem klinischen Effekt der Statintherapie auf das Auftreten verschiedenster Karzinome beschäftigt. Auch wenn hier nicht direkt die Apoptoseinduktion bei Monozyten als kausale Ursache anzusehen ist, so unterstreicht es dennoch die immunmodulatorische und antiinflammatorische Komponente der Statine.

Poynter et al. konnten in einer case-control-Studie mit fast 4000 Teilnehmern zeigen, dass eine Statintherapie über mindestens fünf Jahre das relative Risiko für ein kolorektales Karzinom auf die Hälfte reduziert (94). Auch nach einer Berücksichtigung von weiteren Faktoren (z.B. Einnahme von NSAID,

körperliche Aktivität und familiäres Risiko) konnte eine 47%ige Reduktion des Risikos nachgewiesen werden.

Zu einem gegenteiligen Ergebnis kommt jedoch eine aktuelle Studie aus dem Jahr 2007. *Coogan et al.* nehmen in ihrer Studie direkten Bezug auf die Forschung von *Poynter*, kommen jedoch zu dem Schluss, dass die Einnahme von Statinen nicht zu einer Risikoreduktion für colorektale Karzinome führt (23). In einer weiteren aktuellen Studie untersucht *Coogan* mittels Fragebögen bei Karzinompatienten die Auswirkungen von Statinen. Hierbei kommt er sogar zu dem Schluss, dass Statine weder positive noch negative Einflüsse auf das Auftreten verschiedenster häufiger Karzinome (z.B. Brust, Prostata, Lunge, Blase, Pankreas) haben (22).

Ähnliche Ergebnisse stellen *Setoguchi et al.* auch in einem zu Beginn 2007 in *Circulation* erschienenen Artikel vor (103). Beruhend auf einem umfangreichen Kollektiv älterer Patienten, die mit Statinen behandelt wurden, kommen sie zu dem Schluss, dass die Inzidenzraten für colorektale Karzinome, sowie Lungen- und Brustkrebs denen der Normalbevölkerung entsprechen.

Auch wenn in neuen klinischen Studien die positiven Effekte der Statintherapie nicht bestätigt werden konnten, so ist doch festzuhalten, dass keine der Studien ein erhöhtes Risiko für Karzinome im praktischen Alltag feststellen konnte.

Obwohl die zitierten Studien eine klare Sprache in Bezug auf die präventive Wirkung von Statinen sprechen, scheint die endgültige Bedeutung der Statine noch nicht geklärt zu sein. Zumindest für bestimmte Brustkrebs-Zelllinien konnte eine türkische Forschungsgruppe proapoptotische Effekte nachweisen und stellte die These auf, dass sich Statine eventuell als neuer therapeutischer Ansatz für die Behandlung von Karzinomen eignen, die sich als resistent gegenüber den bisher eingesetzten Medikamenten erwiesen (64).

VI. Abbildungs-, Tabellen- und Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen

Abkürzung	Erklärung
Caspasen	Cysteine requiring aspartat protease
CD	Cluster of Differentiation
cDNS	Komplementäre DNS
DISC	Deathinducing signaling complex
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DOG	1,2-Dioctanoyl-sn-glycerol
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FADD	Fas-associated death domain-containing protein
FasL	Fas-Ligand
FITC	Fluoreszein-Isothiozyanat
FKBP	FK binding protein
FSC	Forward Scatter
g	Erdbeschleunigung, Gramm
h	Stunde(n)
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl-Coenzym A
HO	Hämoxygenase
IAP	Inhibitor of apoptosis
LDL	low density lipoproteins
LO	Links oben
MARCKS	Myristilliertes Alanin-reiches C-Kinase Substrat
MMF	Mycophenolatmofetil
MMS	Monozyten-Makrophagen-System
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NFAT	Nukleärer Faktor aktivierter T-Lymphozyten
NF- κ B	Nuclear factor κ B
PAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
PKC	Proteinkinase C
PS	Phosphatidylserin
RNA / RNS	Ribonucleinacid /-säure
RT	Reverse Transkriptase
RU	Rechts unten
sFasL	Rekombinanter „soluble human Fas-ligand“
SMC	Smooth muscle cells
SSC	Side Scatter
TF	Tissue Factor
TLR	Toll-like Receptor
TPA	12-O-tetradecanoyl phorbol 13-acetate

Abkürzung	Erklärung
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan
VSMC	Vascular smooth muscle cell
	Abbildung
	Tabelle / Diagramm

Abbildungen

Nr	Titel / Beschreibung	Seite
1	Strukturformel Simvastatin	20
2	Strukturformel DOG	23
3	Phasen nach Zentrifugation über einer Polyestermembran	23
4	Monozytenpellet	24
5	Populationen der Durchflusszytometrie	25
6	CD14 / Annexin V-Färbung	27
7	Nachweis von Apoptose mittels PI-Färbung	30
8	Signalkaskade TLR4	31
9	Signalkaskade der Caspase-vermittelten Apoptose	32
10	Anordnung der Proben zur Proteinmessung beim Western Blot	34
11	Schichtung des Blotting-Vorganges	36
12	<i>Ferro et al</i> TF Aktivität bei LPS-stimulierten Monozyten	70

Tabellen

Titel / Beschreibung	Seite
Vergleich Apoptose - Nekrose	13
Medien, Salz- und sonstige Lösungen	15
Chemikalien und Reagenzien	16
Primäre Antikörper	17
Sekundäre Antikörper	18
Primer	18
Diverse Materialien	18
Geräte / Software	19
Zusammenfassung der Wirkung von Simvastatin+LPS auf verschiedene Marker	49
Vergleich der LDL-Senkung durch Lovastatin und Simvastatin	60
Abkürzungen	77
Abbildungen	78
Graphen und Diagramme	79

Graphen / Diagramme

Nr	Titel / Beschreibung	Seite
1	Zunahme der Annexin-V-positiven Zellen nach 24, 48 und 72h	44
2	Zu-/Abnahme der Caspase-3 nach 4 und 24h	45
3	Zu-/Abnahme apoptotischer Zellen unter LPS	48
4	Auswirkungen von Simvastatin+ LPS auf Annexin V	49
5	Caspase-3 nach 4 und 24h unter Simvastatin+LPS	50
6	XIAP-Expression unter Immunsuppressiva+Simvastatin	53
7	TLR4 unter dem Einfluss von Immunsuppressiva, LPS und Simvastatin	54
8	Einfluss verschiedener Stimulantien auf die HO-1 Expression	56
9	Einfluss von Simvastatin + LPS auf die TF-Expression	57
10	Einfluss von DOG + Calphostin auf die Caspase-3 Expression unter verschiedenen Stimulantien	58
11	XIAP-Expression unter Simvastatin+Rapamycin sowie Beeinflussung durch DOG und Calphostin	59

VII. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt zu aller erst meiner Familie, der ich die Möglichkeit des Studiums verdanke und die mich zu jeder Zeit unterstützt und ermutigt hat. Hier vor allem meiner Mutter, der ich mein Interesse an der Nephrologie verdanke.

Weiterhin möchte ich natürlich meinem Betreuer und Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Detlef Lang danken, der mir überhaupt die experimentelle Forschung ermöglichte und mir stets bei Fragen und Problemen hilfreich zur Seite stand.

Danken möchte ich auch Katrin Beul, von der ich viele der verwendeten Techniken lernen durfte.

Zu guter Letzt möchte ich noch der Medizinischen Klinik und Poliklinik D unter Herrn Professor Dr. med. Hermann Pavenstädt danken, deren Räumlichkeiten und Material ich nutzen durfte.

IX. Literaturverzeichnis

- (1) Influence of pravastatin and plasma lipids on clinical events in the West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS). *Circulation* 1998 April 21;97(15):1440-5.
- (2) Hämine. Roche Lexikon Medizin, 5. Auflage. 2003.
- (3) Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000 September 17;406(6797):782-7.
- (4) Agarwal A, Nick HS. Renal response to tissue injury: lessons from heme oxygenase-1 GeneAblation and expression. *J Am Soc Nephrol* 2000 May;11(5):965-73.
- (5) Agarwal R. Effects of statins on renal function. *Am J Cardiol* 2006 March 1;97(5):748-55.
- (6) Akashi S, Shimazu R, Ogata H, Nagai Y, Takeda K, Kimoto M, Miyake K. Cutting edge: cell surface expression and lipopolysaccharide signaling via the toll-like receptor 4-MD-2 complex on mouse peritoneal macrophages. *J Immunol* 2000 May 1;164(7):3471-5.
- (7) Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2001 September;2(8):675-80.
- (8) Alikhani M, Alikhani Z, He H, Liu R, Popek BI, Graves DT. Lipopolysaccharides indirectly stimulate apoptosis and global induction of apoptotic genes in fibroblasts. *J Biol Chem* 2003 December 26;278(52):52901-8.
- (9) Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med* 1997 August;3(8):917-21.
- (10) Bellosto S, Bernini F, Ferri N, Quarato P, Canavesi M, Arnaboldi L, Fumagalli R, Paoletti R, Corsini A. Direct vascular effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Atherosclerosis* 1998 April;137 Suppl:S101-S109.
- (11) Berridge MJ. Phosphoinositides and cell signaling. Fidia Research Foundation Neuroscience Award Lectures 6 1992;5-45.
- (12) Blanco-Colio LM, Villa A, Ortego M, Hernandez-Presa MA, Pascual A, Plaza JJ, Egido J. 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, induce apoptosis of vascular smooth muscle cells by downregulation of Bcl-2 expression and Rho A prenylation. *Atherosclerosis* 2002 March;161(1):17-26.
- (13) Blanquart C, Mansouri R, Paumelle R, Fruchart JC, Staels B, Glineur C. The protein kinase C signaling pathway regulates a molecular switch between transactivation and transrepression activity of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *Mol Endocrinol* 2004 August;18(8):1906-18.
- (14) Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 1996 July 14;85(6):803-15.

- (15) Boldin MP, Varfolomeev EE, Pancer Z, Mett IL, Camonis JH, Wallach D. A novel protein that interacts with the death domain of Fas/APO1 contains a sequence motif related to the death domain. *J Biol Chem* 1995 May 7;270(14):7795-8.
- (16) Bone RC. Sepsis, the sepsis syndrome, multi-organ failure: a plea for comparable definitions. *Ann Intern Med* 1991 February 15;114(4):332-3.
- (17) Bonetti PO, Lerman LO, Napoli C, Lerman A. Statin effects beyond lipid lowering--are they clinically relevant? *Eur Heart J* 2003 February;24(3):225-48.
- (18) Bosisio D, Polentarutti N, Sironi M, Bernasconi S, Miyake K, Webb GR, Martin MU, Mantovani A, Muzio M. Stimulation of toll-like receptor 4 expression in human mononuclear phagocytes by interferon-gamma: a molecular basis for priming and synergism with bacterial lipopolysaccharide. *Blood* 2002 June 1;99(9):3427-31.
- (19) Bruni F, Puccetti L, Pasqui AL, Pastorelli M, Bova G, Cercignani M, Palazzuoli A, Leo A, Auteri A. Different effect induced by treatment with several statins on monocyte tissue factor expression in hypercholesterolemic subjects. *Clin Exp Med* 2003 May;3(1):45-53.
- (20) Cheng G, Shan J, Xu G, Huang J, Ma J, Ying S, Zhu L. Apoptosis induced by simvastatin in rat vascular smooth muscle cell through Ca²⁺-calpain and caspase-3 dependent pathway. *Pharmacol Res* 2003 December;48(6):571-8.
- (21) Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 1995 June 19;81(4):505-12.
- (22) Coogan PF, Rosenberg L, Strom BL. Statin Use and the Risk of 10 Cancers. *Epidemiology* 2007 January 15.
- (23) Coogan PF, Smith J, Rosenberg L. Statin use and risk of colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2007 January 3;99(1):32-40.
- (24) Darzynkiewicz Z, Juan G, Li X, Gorczyca W, Murakami T, Traganos F. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry* 1997 January 1;27(1):1-20.
- (25) Datta R, Oki E, Endo K, Biedermann V, Ren J, Kufe D. XIAP regulates DNA damage-induced apoptosis downstream of caspase-9 cleavage. *J Biol Chem* 2000 October 13;275(41):31733-8.
- (26) Dean DF, Bochsler PN, Carroll RC, Olchowy TW, Neilsen NR, Slauson DO. Signaling pathways for tissue factor expression in lipopolysaccharide-stimulated bovine alveolar macrophages. *Am J Vet Res* 1998 April;59(4):445-51.
- (27) Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, Van AT, Zhou Q, Srinivasula SM, Alnemri ES, Salvesen GS, Reed JC. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J* 1998 April 15;17(8):2215-23.
- (28) Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 1997 July 17;388(6639):300-4.
- (29) Duckett CS, Nava VE, Gedrich RW, Clem RJ, Van Dongen JL, Gilfillan MC, Shiels H, Hardwick JM, Thompson CB. A conserved family of cellular genes related to the

- baculovirus iap gene and encoding apoptosis inhibitors. *EMBO J* 1996 June 3;15(11):2685-94.
- (30) Ducloux D, Deschamps M, Yannaraki M, Ferrand C, Bamoulid J, Saas P, Kazory A, Chalopin JM, Tiberghien P. Relevance of Toll-like receptor-4 polymorphisms in renal transplantation. *Kidney Int* 2005 June;67(6):2454-61.
- (31) Edgington TS, Mackman N, Brand K, Ruf W. The structural biology of expression and function of tissue factor. *Thromb Haemost* 1991 August 12;66(1):67-79.
- (32) Egorina EM, Sovershaev MA, Bjorkoy G, Gruber FX, Olsen JO, Parhami-Seren B, Mann KG, Osterud B. Intracellular and surface distribution of monocyte tissue factor: application to intersubject variability. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005 July;25(7):1493-8.
- (33) Erl W, Hristov M, Neureuter M, Yan ZQ, Hansson GK, Weber PC. HMG-CoA reductase inhibitors induce apoptosis in neointima-derived vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 2003 August;169(2):251-8.
- (34) Fellstrom B, Holdaas H, Jardine AG, Holme I, Nyberg G, Fauchald P, Gronhagen-Riska C, Madsen S, Neumayer HH, Cole E, Maes B, Ambuhl P, Olsson AG, Hartmann A, Logan JO, Pedersen TR. Effect of fluvastatin on renal end points in the Assessment of Lescol in Renal Transplant (ALERT) trial. *Kidney Int* 2004 October;66(4):1549-55.
- (35) Ferro D, Basili S, Alessandri C, Cara D, Violi F. Inhibition of tissue-factor-mediated thrombin generation by simvastatin. *Atherosclerosis* 2000 March;149(1):111-6.
- (36) Frasch SC, Henson PM, Kailey JM, Richter DA, Janes MS, Fadok VA, Bratton DL. Regulation of phospholipid scramblase activity during apoptosis and cell activation by protein kinase Cdelta. *J Biol Chem* 2000 July 28;275(30):23065-73.
- (37) Fried LF, Orchard TJ, Kasiske BL. Effect of lipid reduction on the progression of renal disease: a meta-analysis. *Kidney Int* 2001 January;59(1):260-9.
- (38) Galbraith R. Heme oxygenase: who needs it? *Proc Soc Exp Biol Med* 1999 December;222(3):299-305.
- (39) Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979 January;76(1):333-7.
- (40) Grandaliano G, Gesualdo L, Ranieri E, Monno R, Stallone G, Schena FP. Monocyte chemotactic peptide-1 expression and monocyte infiltration in acute renal transplant rejection. *Transplantation* 1997 February 15;63(3):414-20.
- (41) Grau V, Gemsa D, Steiniger B, Garn H. Chemokine expression during acute rejection of rat kidneys. *Scand J Immunol* 2000 May;51(5):435-40.
- (42) Grau V, Stehling O, Garn H, Steiniger B. Accumulating monocytes in the vasculature of rat renal allografts: phenotype, cytokine, inducible nitric oxide synthase, and tissue factor mRNA expression. *Transplantation* 2001 January 15;71(1):37-46.
- (43) Gross A, McDonnell JM, Korsmeyer SJ. BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 1999 August 1;13(15):1899-911.

- (44) Gross A, Yin XM, Wang K, Wei MC, Jockel J, Milliman C, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Korsmeyer SJ. Caspase cleaved BID targets mitochondria and is required for cytochrome c release, while BCL-XL prevents this release but not tumor necrosis factor-R1/Fas death. *J Biol Chem* 1999 February 8;274(2):1156-63.
- (45) Grosser N, Hemmerle A, Berndt G, Erdmann K, Hinkelmann U, Schurger S, Wijayanti N, Immenschuh S, Schroder H. The antioxidant defense protein heme oxygenase 1 is a novel target for statins in endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 2004 December 15;37(12):2064-71.
- (46) Hartung D, Sarai M, Petrov A, Kolodgie F, Narula N, Verjans J, Virmani R, Reutelingsperger C, Hofstra L, Narula J. Resolution of apoptosis in atherosclerotic plaque by dietary modification and statin therapy. *J Nucl Med* 2005 December;46(12):2051-6.
- (47) Haslinger B, Kleemann R, Toet KH, Kooistra T. Simvastatin suppresses tissue factor expression and increases fibrinolytic activity in tumor necrosis factor-alpha-activated human peritoneal mesothelial cells. *Kidney Int* 2003 June;63(6):2065-74.
- (48) Hauser HP, Bardroff M, Pyrowolakis G, Jentsch S. A giant ubiquitin-conjugating enzyme related to IAP apoptosis inhibitors. *J Cell Biol* 1998 June 15;141(6):1415-22.
- (49) Heidenreich S, Schmidt M, August C, Cullen P, Rademaekers A, Pauels HG. Regulation of human monocyte apoptosis by the CD14 molecule. *J Immunol* 1997 October 1;159(7):3178-88.
- (50) Hernandez-Perera O, Perez-Sala D, Navarro-Antolin J, Sanchez-Pascuala R, Hernandez G, Diaz C, Lamas S. Effects of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, on the expression of endothelin-1 and endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 1998 June 15;101(12):2711-9.
- (51) Inguaggiato P, Gonzalez-Michaca L, Croatt AJ, Haggard JJ, Alam J, Nath KA. Cellular overexpression of heme oxygenase-1 up-regulates p21 and confers resistance to apoptosis. *Kidney Int* 2001 December;60(6):2181-91.
- (52) Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development. *Cell* 1997 February 7;88(3):347-54.
- (53) Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;20:197-216.
- (54) Jessup W, Wilson P, Gaus K, Kritharides L. Oxidized lipoproteins and macrophages. *Vascul Pharmacol* 2002 April;38(4):239-48.
- (55) Kasiske BL. Risk factors for accelerated atherosclerosis in renal transplant recipients. *Am J Med* 1988 June;84(6):985-92.
- (56) Katznelson S, Kobashigawa JA. Dual roles of HMG-CoA reductase inhibitors in solid organ transplantation: lipid lowering and immunosuppression. *Kidney Int Suppl* 1995 December;52:S112-S115.
- (57) Kiener PA, Davis PM, Starling GC, Mehlin C, Klebanoff SJ, Ledbetter JA, Liles WC. Differential induction of apoptosis by Fas-Fas ligand interactions in human monocytes and macrophages. *J Exp Med* 1997 April 21;185(8):1511-6.

- (58) Kim YC, Song SB, Lee MH, Kang KI, Lee H, Paik SG, Kim KE, Kim YS. Simvastatin induces caspase-independent apoptosis in LPS-activated RAW264.7 macrophage cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006 January 20;339(3):1007-14.
- (59) Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, Peter ME. Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 1995 December 15;14(22):5579-88.
- (60) Knapp AC, Huang J, Starling G, Kiener PA. Inhibitors of HMG-CoA reductase sensitize human smooth muscle cells to Fas-ligand and cytokine-induced cell death. *Atherosclerosis* 2000 September;152(1):217-27.
- (61) Kobashigawa JA. Statins in solid organ transplantation: is there an immunosuppressive effect? *Am J Transplant* 2004 July;4(7):1013-8.
- (62) Kobayashi E, Nakano H, Morimoto M, Tamaoki T. Calphostin C (UCN-1028C), a novel microbial compound, is a highly potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* 1989 March 15;159(2):548-53.
- (63) Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 1994 September 1;84(5):1415-20.
- (64) Koyuturk M, Ersoz M, Altioek N. Simvastatin induces apoptosis in human breast cancer cells: p53 and estrogen receptor independent pathway requiring signalling through JNK. *Cancer Lett* 2006 November 22.
- (65) Kyttaris VC, Juang YT, Tsokos GC. Immune cells and cytokines in systemic lupus erythematosus: an update. *Curr Opin Rheumatol* 2005 September;17(5):518-22.
- (66) Lang D, Dohle F, Terstesse M, Bangen P, August C, Pauels HG, Heidenreich S. Down-regulation of monocyte apoptosis by phagocytosis of platelets: involvement of a caspase-9, caspase-3, and heat shock protein 70-dependent pathway. *J Immunol* 2002 June 15;168(12):6152-8.
- (67) Lang D, Reuter S, Buzescu T, August C, Heidenreich S. Heme-induced heme oxygenase-1 (HO-1) in human monocytes inhibits apoptosis despite caspase-3 up-regulation. *Int Immunol* 2004 December 20.
- (68) Lauber K, Blumenthal SG, Waibel M, Wesselborg S. Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. *Mol Cell* 2004 May 7;14(3):277-87.
- (69) Lee TS, Chang CC, Zhu Y, Shyy JY. Simvastatin induces heme oxygenase-1: a novel mechanism of vessel protection. *Circulation* 2004 September 7;110(10):1296-302.
- (70) Levi M, ten CH, Bauer KA, van der PT, Edgington TS, Buller HR, van Deventer SJ, Hack CE, ten Cate JW, Rosenberg RD. Inhibition of endotoxin-induced activation of coagulation and fibrinolysis by pentoxifylline or by a monoclonal anti-tissue factor antibody in chimpanzees. *J Clin Invest* 1994 February;93(1):114-20.
- (71) Lewis AE, Wong BC, Langman MJ, Eggo MC. Protein kinase C inhibition induces DNA fragmentation in COLO 205 cells which is blocked by cysteine protease inhibition but not mediated through caspase-3. *Exp Cell Res* 2003 September 10;289(1):1-10.

- (72) Li H, Zhu H, Xu CJ, Yuan J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998 September 21;94(4):491-501.
- (73) Libby P. Molecular Bases of the Acute Coronary Syndromes. *Circulation* 1995 June 1;91(11):2844-50.
- (74) Libby P. Current Concepts of the Pathogenesis of the Acute Coronary Syndromes. *Circulation* 2001 July 17;104(3):365-72.
- (75) Liston P, Roy N, Tamai K, Lefebvre C, Baird S, Cherton-Horvat G, Farahani R, McLean M, Ikeda JE, MacKenzie A, Korneluk RG. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature* 1996 January 25;379(6563):349-53.
- (76) Livneh E, Fishman DD. Linking protein kinase C to cell-cycle control. *Eur J Biochem* 1997 August 15;248(1):1-9.
- (77) Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* 1998 September 21;94(4):481-90.
- (78) Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 1995 January;146(1):3-15.
- (79) Mangan DF, Wahl SM. Differential regulation of human monocyte programmed cell death (apoptosis) by chemotactic factors and pro-inflammatory cytokines. *J Immunol* 1991 December 15;147(10):3408-12.
- (80) Mangan DF, Welch GR, Wahl SM. Lipopolysaccharide, tumor necrosis factor-alpha, and IL-1 beta prevent programmed cell death (apoptosis) in human peripheral blood monocytes. *J Immunol* 1991 April 1;146(5):1541-6.
- (81) Massy ZA, Keane WF, Kasiske BL. Inhibition of the mevalonate pathway: benefits beyond cholesterol reduction? *Lancet* 1996 January 13;347(8994):102-3.
- (82) Matsuyama M, Yoshimura R, Akioka K, Okamoto M, Ushigome H, Kadotani Y, Nakatani T, Yoshimura N. Tissue factor antisense oligonucleotides prevent renal ischemia-reperfusion injury. *Transplantation* 2003 September 15;76(5):786-91.
- (83) Medema JP, Scaffidi C, Kischkel FC, Shevchenko A, Mann M, Krammer PH, Peter ME. FLICE is activated by association with the CD95 death-inducing signaling complex (DISC). *EMBO J* 1997 June 15;16(10):2794-804.
- (84) Meszaros AJ, Reichner JS, Albina JE. Macrophage-induced neutrophil apoptosis. *J Immunol* 2000 July 1;165(1):435-41.
- (85) Mirlashari MR, Lyberg T. Expression and involvement of Toll-like receptors (TLR)2, TLR4, and CD14 in monocyte TNF-alpha production induced by lipopolysaccharides from *Neisseria meningitidis*. *Med Sci Monit* 2003 August;9(8):BR316-BR324.
- (86) Moreno C, Merino J, Vazquez B, Ramirez N, Echeverria A, Pastor F, Sanchez-Ibarrola A. Anti-inflammatory cytokines induce lipopolysaccharide tolerance in human monocytes without modifying toll-like receptor 4 membrane expression. *Scand J Immunol* 2004 July;59(6):553-8.

- (87) Morrison DC, Ryan JL. Endotoxins and disease mechanisms. *Annu Rev Med* 1987;38:417-32.
- (88) Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, van't VC, Penton-Rol G, Ruco LP, Allavena P, Mantovani A. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol* 2000 June 1;164(11):5998-6004.
- (89) Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, O'Rourke K, Shevchenko A, Ni J, Scaffidi C, Bretz JD, Zhang M, Gentz R, Mann M, Krammer PH, Peter ME, Dixit VM. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 1996 July 14;85(6):817-27.
- (90) Nath KA, Haggard JJ, Croatt AJ, Grande JP, Poss KD, Alam J. The indispensability of heme oxygenase-1 in protecting against acute heme protein-induced toxicity in vivo. *Am J Pathol* 2000 May;156(5):1527-35.
- (91) Nomura F, Akashi S, Sakao Y, Sato S, Kawai T, Matsumoto M, Nakanishi K, Kimoto M, Miyake K, Takeda K, Akira S. Cutting edge: endotoxin tolerance in mouse peritoneal macrophages correlates with down-regulation of surface toll-like receptor 4 expression. *J Immunol* 2000 May 1;164(7):3476-9.
- (92) Pattison J, Nelson PJ, Huie P, von L, I, Farshid G, Sibley RK, Krensky AM. RANTES chemokine expression in cell-mediated transplant rejection of the kidney. *Lancet* 1994 January 22;343(8891):209-11.
- (93) Peter ME, Scaffidi C, Medema JP, Kischkel F, Krammer PH. The death receptors. *Results Probl Cell Differ* 1999;23:25-63.
- (94) Poynter JN, Gruber SB, Higgins PD, Almog R, Bonner JD, Rennert HS, Low M, Greenson JK, Rennert G. Statins and the risk of colorectal cancer. *N Engl J Med* 2005 May 26;352(21):2184-92.
- (95) Quinlan LR, Faherty S, Kane MT. Phospholipase C and protein kinase C involvement in mouse embryonic stem-cell proliferation and apoptosis. *Reproduction* 2003 July;126(1):121-31.
- (96) Rhie G, Beale SI. Regulation of heme oxygenase activity in *Cyanidium caldarium* by light, glucose, and phycobilin precursors. *J Biol Chem* 1994 April 1;269(13):9620-6.
- (97) Rigg KM, Shenton BK, Murray IA, Givan AL, Taylor RM, Lennard TW. A flow cytometric technique for simultaneous analysis of human mononuclear cell surface antigens and DNA. *J Immunol Methods* 1989 October 24;123(2):177-84.
- (98) Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993 April 29;362(6423):801-9.
- (99) Rothe M, Pan MG, Henzel WJ, Ayres TM, Goeddel DV. The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* 1995 December 29;83(7):1243-52.
- (100) Roy N, Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases. *EMBO J* 1997 December 1;16(23):6914-25.

- (101) Sabroe I, Jones EC, Usher LR, Whyte MK, Dower SK. Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in human peripheral blood granulocytes: a critical role for monocytes in leukocyte lipopolysaccharide responses. *J Immunol* 2002 June 1;168(9):4701-10.
- (102) Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, Debatin KM, Krammer PH, Peter ME. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 1998 April 16;17(6):1675-87.
- (103) Setoguchi S, Glynn RJ, Avorn J, Mogun H, Schneeweiss S. Statins and the risk of lung, breast, and colorectal cancer in the elderly. *Circulation* 2007 January 2;115(1):27-33.
- (104) Shub DA. Bacterial viruses. Bacterial altruism? *Curr Biol* 1994 June 1;4(6):555-6.
- (105) Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989 April 6;320(14):915-24.
- (106) Strasser A. Dr. Josef Steiner Cancer Research Prize Lecture: the role of physiological cell death in neoplastic transformation and in anti-cancer therapy. *Int J Cancer* 1999 May 17;81(4):505-11.
- (107) Tamaoki T, Nakano H. Potent and specific inhibitors of protein kinase C of microbial origin. *Biotechnology (N Y)* 1990 August;8(8):732-5.
- (108) Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1968 November;61(2):748-55.
- (109) Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *J Biol Chem* 1969 December 10;244(23):6388-94.
- (110) Trushin SA, Pennington KN, geciras-Schimmich A, Paya CV. Protein kinase C and calcineurin synergize to activate I κ B kinase and NF- κ B in T lymphocytes. *J Biol Chem* 1999 August 13;274(33):22923-31.
- (111) Tse KC, Lam MF, Yip PS, Li FK, Lai KN, Chan TM. A long-term study on hyperlipidemia in stable renal transplant recipients. *Clin Transplant* 2004 June;18(3):274-80.
- (112) Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 1995 July 17;184(1):39-51.
- (113) Visintin A, Mazzoni A, Spitzer JH, Wyllie DH, Dower SK, Segal DM. Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J Immunol* 2001 February 1;166(1):249-55.
- (114) Warr TA, Rao LV, Rapaport SI. Disseminated intravascular coagulation in rabbits induced by administration of endotoxin or tissue factor: effect of anti-tissue factor antibodies and measurement of plasma extrinsic pathway inhibitor activity. *Blood* 1990 May 1;75(7):1481-9.
- (115) Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Proapoptotic BAX and BAK: a

requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 2001 May 27;292(5517):727-30.

- (116) Wilcox JN, Smith KM, Schwartz SM, Gordon D. Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989 May;86(8):2839-43.
- (117) Wilks A, Schmitt MP. Expression and characterization of a heme oxygenase (Hmu O) from *Corynebacterium diphtheriae*. Iron acquisition requires oxidative cleavage of the heme macrocycle. *J Biol Chem* 1998 January 9;273(2):837-41.
- (118) Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990 September 21;249(4975):1431-3.
- (119) Xaus J, Comalada M, Valledor AF, Lloberas J, Lopez-Soriano F, Argiles JM, Bogdan C, Celada A. LPS induces apoptosis in macrophages mostly through the autocrine production of TNF-alpha. *Blood* 2000 June 15;95(12):3823-31.
- (120) Yarmolinsky MB. Programmed cell death in bacterial populations. *Science* 1995 February 10;267(5199):836-7.
- (121) Ziegler-Heitbrock HW, Ulevitch RJ. CD14: cell surface receptor and differentiation marker. *Immunol Today* 1993 March;14(3):121-5.
- (122) Zong WX, Lindsten T, Ross AJ, MacGregor GR, Thompson CB. BH3-only proteins that bind pro-survival Bcl-2 family members fail to induce apoptosis in the absence of Bax and Bak. *Genes Dev* 2001 July 15;15(12):1481-6.