

Aus dem
Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. P.C. Weber

**Wirkungsweise enzymatisch-modifizierten LDLs bei der Expression des Scavenger-
Rezeptors CD36 in monozytären Zelllinien**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Kristina Jostarndt

aus

Marburg

2004

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

1. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. N. Hrboticky

2. Berichterstatter: Prof. Dr. A. K. Walli

Mitberichtersteller: Prof. Dr. D. Jüngst

Priv. Doz. Dr. M. Kretzler

Mitbetreuung durch die
promovierten Mitarbeiter:

Dr. rer. nat. Jiri Neuzil

Dekan:

Prof. Dr. med. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 15.01.2004

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis:

Abkürzungsverzeichnis	4
I Einleitung	5
II Stand der Forschung	6
1. Metabolismus der Lipoproteine	6
1.1 Aufbau und Interkonversion der Lipoproteine.....	6
1.2 LDL-Rezeptor vermittelte Endozytose.....	8
2. Scavenger-Rezeptoren	9
2.1 Scavenger-Rezeptoren der Klasse A Typ I und II.....	9
2.2 Scavenger-Rezeptoren der Klasse B.....	10
2.2.1 SR-B1 und CLA-1.....	10
2.2.2 CD36.....	11
2.2.2.1. Aufbau und Lokalisation.....	11
2.2.2.2 Liganden.....	12
2.2.2.3 Regulation.....	12
2.2.2.4 Funktionen.....	14
2.2.2.4.1 Bedeutung in der Arteriosklerose und Plättchenfunktion.....	14
2.2.2.4.2 Bedeutung im Lipoprotein- und Fettsäurestoffwechsel.....	15
2.2.2.4.3 Bedeutung von CD36 in der Phagozytose apoptotischer Zellen.....	15
3. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma (PPAR γ)	16
3.1 Struktur.....	16
3.2 Ligandenspektrum.....	16
3.3 PPAR γ Aktivierung und Transaktivierung.....	17
3.4 Expression und Funktion.....	20
3.4.1 Einfluss von PPAR γ auf Adipogenese und Lipidmetabolismus.....	20
3.4.2 Bedeutung von PPAR γ in der Arteriosklerose und in Entzündungsprozessen.....	20
4. Oxidierung und Modifizierung von LDL und seine Bedeutung in der Atherosklerose	22
5. Sekretorische Phospholipase A₂	24
5.1 Allgemeines.....	24
5.2 Mögliche Bedeutung der sekretorischen PLA ₂ in der Atherogenese.....	26
6. 15-Lipoxygenase	27
6.1 Allgemeines.....	27
6.2 Bedeutung der 15-Lipoxygenase in der Atherogenese.....	28
6.2.1 Proatherogene Eigenschaften.....	28
6.2.2 Antiatherogene Eigenschaften.....	29
III Fragestellung	30
IV Material	32
1. Geräte.....	32
2. Chemikalien.....	33
3. Puffer und Lösungen.....	33

3.1 LDL-Isolierung und Färbung	33
3.2 CD36 / CD14 -Färbung	34
3.3 Lösungen für Kernlysate	34
3.4 Lösungen für Western Blot Screening	35
3.5 Puffer für MM6 – Medium	36
3.6 Zellkulturmedien	36
V Methode	37
1. Zellkultur	37
1.1 Zellen und Passage	37
1.2 Differenzierung von Makrophagen aus embryonalen Stammzellen	38
1.3 Isolierung und Kultivierung humaner Blutmonozyten	39
1.4 Herstellung des autologen Serums	40
2. Isolierung von Lipoproteinen	40
2.1 Methodik nach Sattler:	41
2.2 Methodik nach Havel:	41
3. Lipoprotein-Modifizierung	42
3.1 enzymatische Modifizierung	42
3.2 Oxidierung mit CuCl ₂	42
4. Markierung von LDL mit DiI (1,1 Dioctadecyl-3,3,3,3-tetramethylindocarbocyanine perchlorate).....	43
5. Lipoprotein-Agarose-Gel-Elektrophorese	43
6. Analyse von Oberflächenrezeptoren	44
6.1 FACS-Analyse der CD36 Expression	44
6.2 CD14 Expression	44
6.3 Analyse der CD36 Expression mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie.....	45
7. Messung der PPARγ Expression.....	45
7.1 FACS-Analyse der Gesamtexpression	45
7.2 Nachweis der PPAR γ -Translokation mittels Fluoreszenzmikroskopie	45
7.3 Untersuchung der PPAR γ -Expression mittels Western-Blotting	46
7.3.1 Extraktion der Kernproteine.....	46
7.3.2 Western Blotting	46
8. Apoptose Bestimmung	47
9. Analyse zur Aufnahme modifizierter Lipoproteine	48
10. Elektrophoresis-mobility gel-shift-assay	48
VI Ergebnisse	49
1. Die enzymatische Behandlung von LDL mit 15-Lipoxygenase und sekretorischer Phospholipase A₂ führt über Entstehung spezifischer Oxidierungsprodukte zu minimal modifizierten Lipoproteinen.....	49
1.1 sPLA ₂ und 15-Lipoxygenase führen zur Bildung von 13s-HODEs in LDL	49
1.2 Enzymatisch modifiziertes LDL als Vertreter minimal modifizierter Lipoproteine	50
2. Einfluß enzymatisch modifizierten LDLs auf die CD36 Expression in Abhängigkeit von der basalen CD36 Expression.....	51
2.1 Enzymatisch modifiziertes LDL stimuliert die Hochregulation von CD36 in Mono Mac 6 Zellen (MM6)51	
2.2 Enzymatisch modifiziertes LDL hat keinen Einfluß auf CD36 in THP1 Zellen und isolierte humane Blutmonozyten.....	54

3. Humane rekombinante sPLA₂ und 15-Lipoxygenase aus Kaninchen Retikulozyten sind ebenfalls Induktoren der CD36 Expression.....	56
4. Freie, aber nicht veresterte HODEs führen zur CD36 Hochregulierung.....	57
5. Undifferenzierte Monozyten nehmen enzymatisch-modifiziertes LDL über den LDL-Rezeptor auf.....	58
6. Die Hemmung der lysosomalen Enzyme bewirkt eine Abnahme der CD36 Expression	61
7. Enzymatisch mod. LDL induziert Apoptose in MM6 Zellen, die unabhängig von der CD36-Hochregulierung ist.....	63
8. Enzymatisch modifiziertes LDL induziert die Reifung der Monozyten.....	65
9. Enzymatisch mod. LDL induziert die CD36-Expression durch Interaktion mit PPAR γ	66
9.1 Enz. LDL führt nicht zu einer Translokation von PPAR γ	66
9.2 PPAR γ ist in verschiedenen unstimulierten Zelllinien bereits ausschließlich im Kern lokalisiert.....	67
9.3 Enz.LDL induziert die CD36 Expression durch die Bindung von PPAR γ an PPRE.	68
9.4 PPAR γ -/- Makrophagen können CD36 nicht hochregulieren	69
 VII Diskussion.....	 70
1. 15-LOX und sPLA ₂ – Bedeutung in der Atherosklerose.....	70
2. Freisetzung von HODEs bei der Modifizierung des LDLs.....	70
3. Einfluß von enz.LDL auf die CD36 Expression.....	71
4. Die Aufnahme von enz.LDL über den LDL-Rezeptor.....	73
5. Die Wirkung von 15-LOX LDL und sPLA ₂ LDL auf die CD36 Expression.....	74
6. CD36 Expression, Differenzierung und Apoptose, drei unabhängige Ereignisse.....	75
7. Die CD36 Expression und der Zusammenhang mit PPAR γ	76
8. Zusammenfassung.....	78
 Literaturverzeichnis:.....	 83

Abkürzungsverzeichnis

15dPgJ ₂	15-Deoxy-Prostaglandin J ₂
15-LOX	15-Lipoxidase
15-LOX LDL	LDL mit 15-Lipoxidase aus Sojabohne 12 h modifiziert
AK	Antikörper
Apo	Apolipoprotein
CD	Cluster of Differentiation
CHE	Cholesterinester
C-terminal	Carboxy-terminal (COOH-Gruppe am Ende einer Aminosäurekette)
enz.LDL	enzymatisch modifiziertes LDL (LDL + sPLA ₂ + 15-LOX, 12 h modifiziert)
HODE	Hydroxyoktadeca-dienoicacid
IF	Interferon
IL	Interleukin
LDL	Low Density Lipoprotein
MM6 Zellen	MonoMac 6 Zellen (Monozyten/Makrophagen)
MM6sr Zellen	MonoMac 6 Zellen mit Scavenger Rezeptoren
mmLDL	minimal modifiziertes LDL
N-Terminal	Amino-terminal (NH ₃ -Gruppe am Anfang einer Aminosäurekette)
ox.LDL	oxidiertes LDL
ox ₃ LDL /ox ₂₀ LDL	LDL 3 h bzw. 20 h mit Kupfer oxidiert
PPAR γ	Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma
PPRE	PPAR γ -Response-Elements
RXR-Rezeptor	Retinoid-Rezeptor
senz.LDL	LDL modifiziert mit 15-LOX und sPLA ₂ aus Säugetieren
sPLA ₂ LDL	LDL mit sekretorischer Phospholipase A ₂ aus Meerschweinchenpankreas modifiziert
sPLA ₂	sekretorische Phospholipase A ₂
SR-Rezeptor	Scavenger-Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor

I Einleitung

Arteriosklerose ist eine multifaktorielle Erkrankung, bei der die Hypercholesterinämie eine wichtige ätiologische Rolle spielt. Ein erhöhter LDL-Plasmaspiegel führt makroskopisch zu einer verstärkten Ablagerung von Cholesterin im subendothelialen Bereich der Gefäßwand, wo es modifiziert und dann von Makrophagen aufgenommen wird. Die initiale Manifestation der arteriosklerotischen Plaques ist eine intimale Ansammlung von lipidspeichernden Makrophagen und Gefäßmuskelzellen. Aus diesen entwickeln sich bei anhaltender Hypercholesterinämie Atherome mit zentraler Nekrose und Cholesterinkristallen, die umgeben sind von proliferierenden Intimamyozyten und kollagenen Fasern. Schließlich können Ulzeration und Thrombosierung zu einem akuten Gefäßverschluß führen.

Auf biochemischer Ebene lautet die Hypothese, dass natives LDL über Bindung von ApoB-100 an die extrazelluläre Matrix der Gefäße im subendothelialen Raum akkumuliert, durch zelluläre und extrazelluläre Prozesse zunächst nur minimal oxidiert wird und dadurch chemotaktisch und differenzierend auf Monozyten wirkt, sowie gleichzeitig den Austritt eingewandelter Monozyten hemmt^{117, 122, 123}. Zelluläre Reaktionen von Monozyten/Makrophagen führen zu weiterer Oxidierung des LDLs mit der Konsequenz, dass u.a. auch das Apo B-100 stärker negativ geladen wird und somit das gesamte LDL-Partikel von Scavenger-Rezeptoren erkannt und internalisiert wird¹⁵¹. Die ungehemmte Akkumulation der Lipide führt zur Entstehung von Schaumzellen, die nekrotisch werden und Entzündungsreaktionen auslösen.

II Stand der Forschung

1. Metabolismus der Lipoproteine

Die im Blutplasma zirkulierenden Lipide werden aufgrund ihrer Hydrophobie an Trägerproteine (Apoproteine) gebunden. Diese Lipoproteine lassen sich infolge jeweils unterschiedlicher prozentualer Zusammensetzung des Eiweiß- und Lipidanteils in verschiedene Dichteklassen einteilen, von denen jede eine spezifische Funktion und Metabolisierung aufweist.

1.1 Aufbau und Interkonversion der Lipoproteine

Die *Chylomikronen* werden von den Mukosazellen des Intestinaltraktes synthetisiert und dienen dem Transport der mit der Nahrung aufgenommenen Triglyzeride ins Blut. Sie setzen sich zusammen aus resorbierten Triglyceriden, Cholesterinestern und den Apoproteinen B-48, C und E. Das Apolipoprotein CII ist Kofaktor der Lipoproteinlipase (LPL), die in den Endothelien der Kapillaren des extrahepatischen Gewebes lokalisiert ist und die Spaltung von Fettsäuren aus Triglyceriden katalysiert. Die aus den Chylomikronen entstehenden Remnants werden über Apo E - bindende Rezeptoren der Leber aufgenommen. Diese ist auch Synthesort der *Prä-β-Lipoproteine* (*Very Low-Density Lipoprotein = VLDL*), welche die Apoproteine E, CII und B100 enthalten und endogene Triglyzeride aus der Leber in die Peripherie transportieren. Über endothelständige Lipoproteinlipasen versorgen diese das Gewebe mit Fettsäuren. Die über die LPL entstehenden Intermediate-Density Lipoprotein (IDL) -Partikel (Apo E, B 100) werden durch Verlust von Apo E zu den *β - Lipoproteinen* (*Low-Density Lipoprotein = LDL*), die sich zu 40 % aus Cholesterinestern und zu jeweils 20 % aus Phospholipiden bzw Proteinen (Apoprotein B-100) zusammensetzen. 75 % der zirkulierenden LDL werden über den LDL-Rezeptor der Leber von den Hepatozyten endozytiert und zu 25 % über periphere LDL-Rezeptoren. Außerdem bindet LDL in modifizierter Form auch an sogenannte Scavenger-Rezeptoren der Makrophagen. Die letzteren Rezeptoren werden unter II.2 ausführlicher beschrieben. Das ApoB-100 des LDLs besitzt zudem eine Bindestelle für Glycosaminoglykane, was eine Retention der Lipoproteine in der Gefäßintima bewirkt und eine Erklärung dafür ist, dass die Konzentration des LDLs auch in der Intima gesunder Gefäße deutlich höher ist als im Plasma¹⁵¹.

Die *α - Lipoproteine*, *High-Density Lipoproteine (HDL)*, werden sowohl in der Leber als auch im Intestinaltrakt in Form von Vorstufen gebildet, außerdem entstehen sie beim Abbau der Chylomikronen. Durch ihren Gehalt an Apoprotein A-I können sie die von der Leber synthe-

tisierte und sezernierte Lecithin–Cholesterin–Acyltransferase binden, welche bewirkt, dass aufgenommenes Cholesterin verestert wird. Dieses wandert in den apolaren Kern, so dass auf der Oberfläche der Partikel neues Cholesterin eingelagert werden kann. Das Apoprotein A-I ist ebenfalls Ligand HDL–bindender Rezeptoren auf Hepatozyten und Makrophagen ¹³⁸. Über die HDL-Rezeptoren der Leberzellen können diese Cholesterin aufnehmen. Als ein möglicher Rezeptor zur Aufnahme des Cholesterins aus HDL wurde der Scavenger-Rezeptor B1 (SR-B1) beschrieben (vgl. II.2.2.1). Umgekehrt wird bei Anhäufung von Cholesterin in Makrophagen dieses an HDL abgegeben, wie an Peritonealmakrophagen aus Mäusen nachgewiesen wurde ¹³⁷.

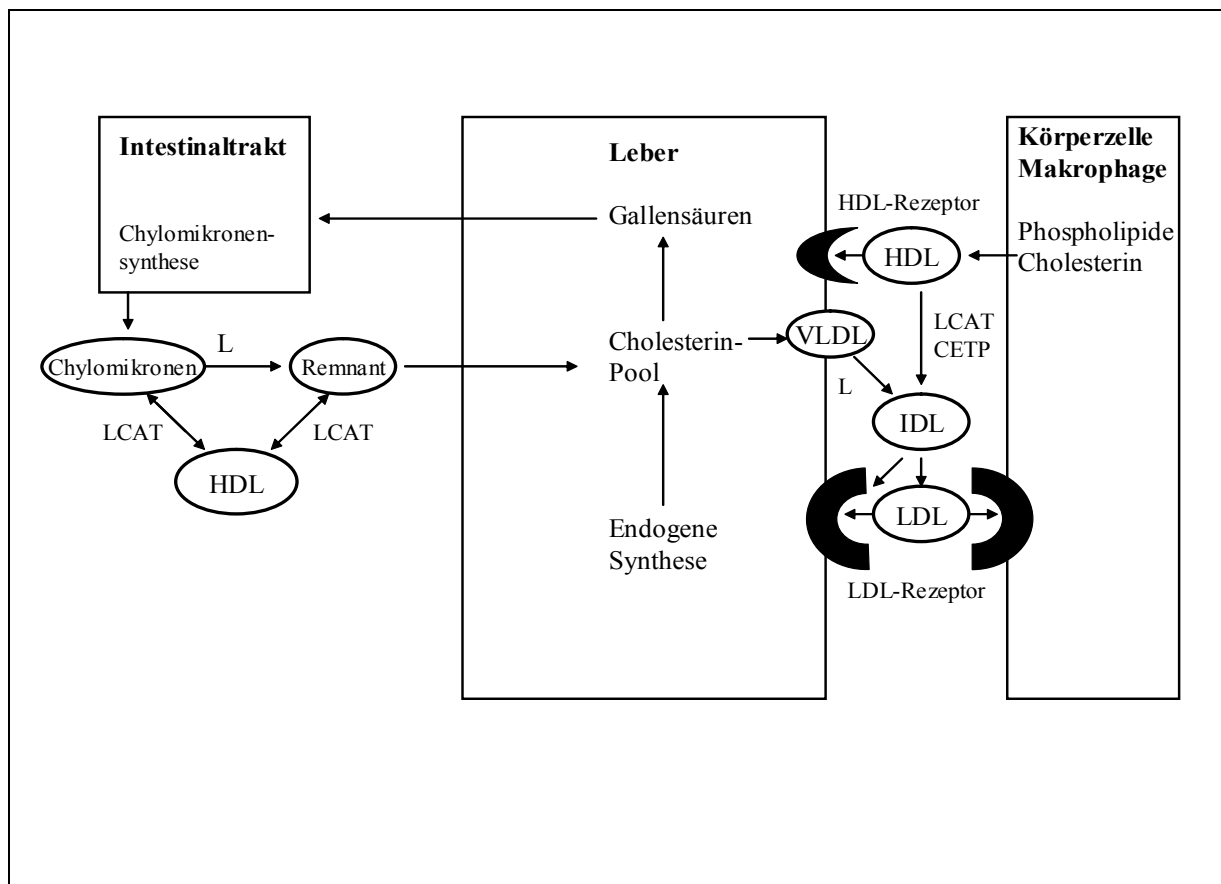


Abb. II. 1: Interkonversion der Lipoproteine (Lohr M., Bös B.: Pathobiochemie, Pathophysiologie, Thieme Verlag, 1998); Abkürzungen: LCAT= Lecitin-Cholesterin-Acetyltransferase, CETP = Cholesterinester-Transferprotein, L= Lipoproteinlipase

1.2 LDL-Rezeptor vermittelte Endozytose

Die Struktur des LDL-Rezeptors wurde erstmals von Brown und Goldstein (1986) beschrieben. Demnach stellt dieser ein Protein aus 839 Aminosäuren dar, das in fünf Domänen eingeteilt wird, die auch als strukturelle Einheiten aufgrund der Intron-Exon-Struktur im LDL-Rezeptorgen erkennbar sind. Das an der Zelloberfläche gelegene N-terminale Ende enthält die Bindestelle für die LDL-Apoproteine B und E. Da Apo E auf Chylomikronen-Remnants und IDL-Partikeln zu finden ist, wurde auch für diese Lipoproteine eine Aufnahme durch den Rezeptor diskutiert^{161, 139}. Die Bindung des Lipoproteins an den Rezeptor erfolgt durch elektrostatische Wechselwirkungen zwischen Arginin- und Lysin-reichen Teilen des Apoproteins und negativ geladenen Cystinresten an der Bindungsdomäne des Rezeptors⁷⁸. Da der zytoplasmatische Teil des Rezeptors in Wechselwirkung mit Klathrin steht, sammeln sich die Rezeptoren in sogenannten Coated-pits und sind in dieser Form funktionsfähig.

Bindet ein LDL Partikel an den Rezeptor, löst sich die Klathrinschicht und die Rezeptoren samt LDL werden endozytiert. Durch Protonenpumpen in der Membran der Endosomen sinkt der pH-Wert auf 5, so dass sich der Rezeptor von dem Liganden trennt und mittels Transportvesikel wieder an die Zelloberfläche befördert wird. Das Endosom fusioniert mit Lysosomen deren Hydrolasen die Lipoproteine abbauen⁵⁹. Das freie Cholesterin wird ins Zytoplasma abgegeben und dort durch das Enzym Acyl-CoA-Acyltransferase verestert und gespeichert⁵⁹. Steigt der intrazelluläre Cholesterinspiegel an, wird die Aktivität der Hydroxy-methyl-glutaryl-CoEnzymA-Reduktase (HMG-CoA-Reduktase) supprimiert und dadurch die endogene Cholesterinsynthese gedrosselt¹⁶, gleichzeitig hemmt freies Cholesterin in der Zelle die Bildung von LDL-Rezeptoren, wodurch die Aufnahme weitere LDL-Partikel verhindert wird⁶⁰. Der LDL-Rezeptor, der zum größten Teil in den Leberzellen vorhanden ist, wurde deswegen als einer der Hauptfaktoren der LDL-Clearance verantwortlich gemacht.

Bestimmte Fettsäuren, die in LDL enthalten sind (physiologisch wichtig v.a. Arachidonsäure als Vorläufer der Prostaglandine und Leukotriene) und nicht de novo synthetisiert werden können, gelangen über den LDL-Rezeptor in die Zelle. Habenicht et al. zeigten, dass Fibroblasten von Individuen mit homozygoter Hypercholesterinämie, denen der LDL-Rezeptor fehlt, nicht in der Lage waren, aus Cholesterin-veresterten Arachidonsäuren Prostaglandine zu bilden, während bei freien Arachidonsäurederivaten die Synthese nicht beeinträchtigt war. Außerdem konnte durch Zugabe von Chloroquin, das die lysosomalen Enzyme hemmt, ebenfalls die Synthese blockiert werden. Beide Beobachtungen demonstrieren eine mögliche Abhängigkeit der Prostaglandin-Synthese vom LDL-Rezeptor⁶⁶. Es wurde ge-

zeigt, dass es außerdem einen LDL-Rezeptor-unabhängigen Weg der selektiven Aufnahme von Cholesterinestern in Hepatozyten wie z.B. Hep G2 Zellen gibt ¹³⁰, bei der die Aufnahme von Cholesterinestern (CHE) unbeeinflusst bleibt von der Cholesterinkonzentration der Zelle. Man vermutete deswegen, dass die selektive CHE-Aufnahme eine basale Cholesterinversorgung der Zellen bei herunter-regulierten LDL-Rezeptoren darstellt ²³. Spezielle Rezeptoren, die für die selektive Aufnahme der Cholesterinester verantwortlich scheinen, wären CD36 oder CLA-1 ²³.

2. Scavenger-Rezeptoren

Scavenger-Rezeptoren wurden erstmals von Goldstein und Brown als Rezeptoren modifizierter Lipoproteine beschrieben, die zu einer schnellen und unkontrollierten Aufnahme des modifizierten LDLs in Makrophagen und somit zu einer starken Anhäufung von Cholesterin in diesen Zellen führten ⁶¹. Typisches Merkmal der Scavenger-Rezeptoren ist die Fähigkeit, mehrere strukturell unterschiedliche Liganden zu binden, weshalb sie auch als Multiligand-rezeptoren bezeichnet werden ⁹⁰. Im Gegensatz zu dem nativen LDL-Rezeptor wird ihre Aktivität nicht durch ansteigende Cholesterinspiegel gehemmt. Entsprechend der Struktur werden die Subtypen in verschiedene Klassen eingeteilt.

2.1 Scavenger-Rezeptoren der Klasse A Typ I und II

Das Gen für diesen Subtyp ist auf Chromosom 8 lokalisiert und die beiden Formen dieses Rezeptors entstehen durch alternatives Splicing der mRNA ¹⁰³. Exprimiert wird dieser Rezeptor vor allem von Makrophagen, Kupffer-Zellen, Endothelzellen der Lebersinusoide und extrahepatischer Gefäße ^{110, 30, 74} sowie in starkem Maße auf Schaumzellen ^{110, 34, 103} und glatten Muskelzellen der arteriosklerotischen Plaques ¹⁰¹. Da sie kaum in zirkulierenden Monozyten zu finden sind, vermutet man, dass die Expression stark vom Differenzierungsgrad der Monozyten zu Makrophagen abhängt. Es wurde gezeigt, dass viele Faktoren, wie macrophage-colony-stimulating-factor (M-CSF) ³³ und in vitro verwendeter Phorbol-ester ¹⁵⁸ als Induktoren der Differenzierung die Expression des SR-A steigern. Ferner wurde die Stimulierung der Expression durch eigene Liganden wie modifiziertes und stark oxidiertes LDL beschrieben ^{70, 168} sowie die Hochregulierung des Rezeptors in Kupffer-Zellen durch Gram-pos. Bakterien ⁷¹. Je nach Ligand und Lokalisation werden ihnen verschiedene Funktionen zugesprochen. Auf Makrophagen spielen SR-A eine wesentliche Rolle in der Pathogenese der Arteriosklerose ¹⁴⁸. Sie binden modifiziertes und oxidiertes LDL, was das umliegende Gewebe unter physiologi-

schen Bedingungen schützt. Bei Hypercholesterinämie kann dies aber zu einer Überladung der Zelle führen und damit zur Schaumzellbildung⁹¹. Ferner wurde gezeigt, dass der SR-A die Adhäsion von Zellen des retikulohistozytären Systems an unterschiedliche Gewebebestandteile (Kollagen, Amyloid) vermittelt^{50, 40, 41}. Diese Beobachtungen könnten in vivo Bedeutung haben für die Rekrutierung von Zellen in verschiedenen Geweben, z.B. im Rahmen inflammatorischer Prozesse oder bei der Arteriosklerose¹⁴⁹. Die SR-A auf Kupffer-Zellen der Leber werden in Zusammenhang gebracht mit der Abwehr von im Blut zirkulierenden Mikroorganismen, da sie Bestandteile Gram-neg. (LPS)^{68, 69} wie auch Gram-pos. (Lipoteichonsäure)^{39, 62} Bakterien binden und somit der Immunantwort (Zytokinproduktion u.a.) entziehen, was sich protektiv gegenüber eines SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrom) auswirken könnte⁷¹.

Eine Abräumfunktion besitzen die Rezeptoren auch im Rahmen geschädigter und apoptotischer Zellen¹³⁵. Erklärt wird diese Hypothese durch eine Ähnlichkeit im Aufbau von Zellmembranen und Lipoproteinen: Durch Oxidierung von Lipoproteinen entstehen neue Epitope, welche Epitopen von apoptotischen Zellen gleichen und somit die Phagozytose einleiten. Von Bedeutung sind hierbei vor allem die Anhäufung von Phosphatidylserin, das durch Schädigung der Membran von der zytosolischen Seite nach außen exponiert wird^{43, 28}. Es wurde gezeigt, dass apoptotische Zellen in Gegenwart von oxidiertem LDL vermindert gebunden wurden¹³⁵.

2.2 Scavenger-Rezeptoren der Klasse B

2.2.1 SR-B1 und CLA-1

Der SR-B1 wurde erstmals in CHO-Zellen (Chinese hamster ovary cells) beschrieben². Der Rezeptor besteht aus 509 Aminosäuren, deren Sequenz zu 30 % identisch ist mit der von CD 36². Das humane Homolog, CLA-1, wird kodiert von zwei Formen von mRNA, dessen lange Form für ein aus 509 Aminosäuren langes Protein kodiert, das zu 81 % die gleiche Frequenz hat wie der SR-B1¹⁰⁸. Exprimiert werden SR-B1 und CLA-1 vor allem im steroidbildenden Parenchym der Nebenniere und Gonaden, die einen hohen Bedarf an Cholesterin besitzen und ferner zu geringerem Anteil in Leber und Lunge^{2, 1, 108, 98}. Das Ligandenspektrum beider Rezeptoren beinhaltet u.a. modifiziertes wie natives LDL sowie HDL¹. In vivo Studien haben gezeigt, dass der SR-B1 eine selektive Aufnahme von Cholesterinestern aus HDL vermittelt^{1, 147}. Die Hauptfunktion ist die Versorgung der genannten Gewebe mit Cholesterin. Die Expression wird gesteuert über den Cholesterinbedarf der Zelle¹⁶⁰ und über Adrenocorticotropes

Hormon (ACTH) in der Nebenniere ¹²⁹. Eine Ausnahme bilden die Makrophagen, deren Scavenger-Rezeptoren-B1 Zellcholesterin auf HDL-Partikel übertragen und somit den Cholesterinefflux aus der Zellwand begünstigen ¹³⁷.

2.2.2. CD36

2.2.2.1. Aufbau und Lokalisation

CD36 (Cluster of Differentiation) ist ein hydrophobes Glycoprotein der Zellmembran. Es zeichnet sich durch zwei transmembranöse Domänen an den beiden Enden des Moleküls aus, denen jeweils eine kurze C-terminale bzw. N-terminale zytoplasmatische Domäne folgt. Verbunden sind die transmembranösen Anteile durch eine extrazelluläre, stark Stickstoffglykolisierte Schleife ⁶⁴ (siehe Abb.II.2). Der hohe Grad an Glykolisierung scheint dem Protein eine extreme Resistenz gegenüber Proteolyse zu verleihen ⁶⁵.

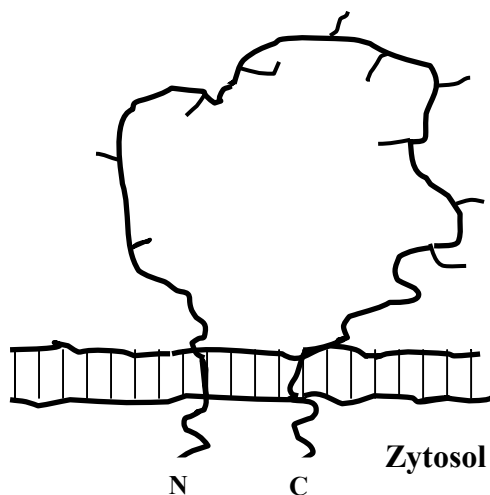


Abb. II. 2: Struktur des CD36 Moleküls: Es zeichnet sich durch zwei transmembranöse Domänen an den beiden Enden des Moleküls aus, denen jeweils eine kurze C-terminale bzw. N-terminale zytoplasmatische Domäne folgt. Verbunden sind die transmembranösen Anteile durch eine extrazelluläre stark N-glykolisierte Schleife ⁶⁴.

Je nach Expressionsort besitzt der Rezeptor leichte Unterschiede in der Molekülmasse, die vermutlich auf Zelltyp – spezifischen Glykolisierungsmuster beruhen ¹⁶⁴. So ist z.B. das Glykoprotein auf Plättchen und monozytären Zellen 88 kD groß, auf Epithelzellen nur 85 kD. Das Gen für CD36 hat eine Größe von 32 Kb und liegt auf Chromosom 7 (q 11.2) ⁴.

CD36 wird nahezu ubiquitär exprimiert. Vor allem auf Zellen der myeloischen Reihe wie Monozyten / Makrophagen, Thrombozyten und unreifen Erythroblasten ⁸⁶. Ferner ist CD36 auf mikrovaskulären Endothelzellen, Adipozyten, Pigmentepithel der Retina ¹²⁵ und in der

Leber auf Kupffer-Zellen und Endothelien der Sinusoide ¹⁰² lokalisiert. Kürzlich wurde er auch in glatten Muskelzellen der Aorta entdeckt ¹⁰⁴.

2.2.2.2 Liganden

Das Ligandenspektrum ist entsprechend der anderen Scavenger - Rezeptoren breit gefächert und weist auf Multifunktionalität des Rezeptors hin.

CD36 bindet HDL, LDL, VLDL ¹⁷, modifiziertes LDL (stark- und minimal oxidiertes LDL ⁴²), anionische Phospholipide und apoptotische Zellen. Erweitert wird das Spektrum durch die Fähigkeit, freie Fettsäuren, Thrombospondin und Kollagen zu binden. Die Interaktion zwischen CD36 und oxidierten Lipoproteinen erfolgt über oxidierte Phospholipide, die an Apolipoprotein B gebunden sind, dabei werden sowohl der Protein- als auch der Lipidanteil als gemeinsames Epitop erkannt ^{56, 15}. Es wird aber auch beschrieben, dass nur der Lipidanteil des oxidierten LDLs gebunden wird, ¹⁵⁰ im Gegensatz zu den SR der Klasse A1, die das oxidierte LDL über den Proteinanteil binden ⁴⁷. Welche Wechselwirkungen genau stattfinden, ist noch nicht genau bekannt ⁵¹.

2.2.2.3 Regulation

Die vielen Funktionen und Expressionsorte von CD36 haben auch eine Vielzahl von regulierenden Faktoren zur Folge. Einer der wesentlichen Mechanismen der Regulation wird als PPAR γ -abhängig beschrieben. Es wurde gezeigt, dass PPAR γ -Liganden, wie Bestandteile oxidierten LDLs, eine Hochregulierung von CD36 in humanen Monozyten und THP1 Zellen bewirken und damit die eigene Aufnahme induzieren können ^{109, 154}. Feng et al. beobachteten eine Hemmung der Expression durch Proteinkinase C – Inhibitoren und vermuteten, dass eine initiale Aktivierung der Proteinkinase C und folglich von PPAR γ durch oxidiertes LDL notwendig sei ⁴⁷. Zudem wurde gezeigt, dass die CD36 Expression in Monozyten durch Zytokine wie M-CSF (Macrophage-Colonial Stimulating Factor) und Interleukin-4 ¹⁶⁵ sowie durch Adhäsion an TNF-aktivierte Endothelien ⁷⁵ verstärkt wurde und durch Behandlung mit LPS oder Corticosteroide reduziert ¹⁶⁵. Das IL-4 wird von T-Helferzellen produziert und aktiviert die 12/15-Lipoxidase, die aus ungesättigten Fettsäuren, v.a. Arachidonsäure und Linolsäure, PPAR γ - Liganden bereitstellt über die dann die CD36-Expression verstärkt wird ³⁷.

Verschiedene Fettsäuren wurden auf die Expression von CD36 getestet und es konnte nachgewiesen werden, dass n-3 Fettsäuren, wie sie in Fischöl vorhanden sind, eine signifikante

Reduktion der CD36 Expression auf Protein- und mRNA Ebene erzielen, während n-6 Fettsäure (Arachidonsäure und Linolsäure) eher zu einem Anstieg führten ¹²⁰.

Durch α -Tocopherol ließ sich über Reduktion der Promotoraktivität die CD36 mRNA sowie das Protein in glatten Muskelzellen herunterregulieren und folglich auch die Aufnahme oxidierten LDLs hemmen, was einen der protektiven Effekte von Vitamin E erklären könnte ¹²⁶. Ebenfalls hemmende Wirkung zeigte Interferon- γ ¹¹¹. Huh et al. beobachteten, dass die Differenzierung von humanen Blutmonozyten zu Makrophagen in vitro mit einer verstärkten CD36 Expression und mRNA Synthese einhergeht, die am dritten und viertem Tag in Kultur einen Höhepunkt erreicht und dann wieder abfällt ⁷⁶ im Gegensatz zu den SR der Klasse A, deren Expression mit zunehmender Reifung nicht absinkt ⁵⁵.

Eine Übersicht über die regulierenden Faktoren gibt die folgende Tabelle.

Expressionsort	CD-36 Expression	
	↑	↓
Monozyten	M-CSF	Lipopolysaccharide
	Interleukin-4	Kortikosteroide
	Adhäsion an TNF α aktiviertes Endothel	
	n-6 Fettsäuren	n-3 Fettsäuren
	Differenzierung	
glatte Muskelzellen		α Tocopherol Interferon γ

Tab. II. 1: Regulatoren der CD36 Expression

2.2.2.4 Funktionen

2.2.2.4.1 Bedeutung in der Arteriosklerose und Plättchenfunktion

Eine Bedeutung wird dem Rezeptor in der Entwicklung von Schaumzellen zugeschrieben. CD36 wurde als Scavenger-Rezeptor auf Makrophagen beschrieben, der in der Lage war, oxidiertes LDL zu binden⁴². CD36 cDNA-transfizierte Zellen konnten oxidiertes LDL binden und aufnehmen und diese Aufnahme wurde durch Antikörper gegen CD36 zu 50 % blockiert¹¹⁴. Eine Untersuchung von Makrophagen, die aus Personen mit mangelhafter Bildung von CD36 isoliert wurden, ergab eine um 40 % reduzierte Aufnahme oxidierten LDL's im Vergleich zur Kontrollgruppe¹⁴⁴. Die ox.LDL – bindende Domäne auf dem Protein ist nach aktuellem Stand im N-terminalen Drittel des Moleküls lokalisiert, in einem möglichen Bereich zwischen Aminosäure 28 und 93, was mit Hilfe von rekombinanten bakteriellen Gluthation S-Transferase/CD36 Fusionsproteinen ermittelt wurde⁵¹. Da der CD36 Rezeptor auch auf humanen glatten Muskelzellen der Aorta gefunden wurde¹⁰⁴, wird vermutet, dass sich glatte Muskelzellen ebenfalls zu Schaumzellen entwickeln können.

Ein Zusammenspiel zwischen CD36 und SR-A in der Freisetzung von H₂O₂ aus Monozyten/Makrophagen wurde von Maxeiner et al.¹⁰⁵ diskutiert. Demnach stellt an subendotheliale Matrix gebundenes oxidiertes LDL einen starken Stimulus für die H₂O₂ Sekretion dar, indem der SR-A auf den Makrophagen deren Adhäsion an die extrazelluläre Matrix vermittelt, während CD36 die Sekretion von H₂O₂ auslöst. Da gelöstes oxidiertes LDL und gelöster monoklonaler Antikörper gegen CD36 diesen Effekt nicht auslösten wurde postuliert, dass eine Kreuzvernetzung zwischen den CD36 Rezeptoren untereinander und / oder mit den SR-A durch oxidiertes LDL notwendig sei, dieses also möglichst in hoher Dichte vorhanden sein müsste¹⁰⁵.

Auf Thrombozyten exprimiert, soll CD36 die Adhäsion an Kollagen in der Gefäßwand und damit ihre Aktivierung einleiten³⁸. Thrombospondin, ebenfalls ein Bestandteil der extrazellulären Matrix ist auch in der Lage, über CD36 Thrombozyten zu binden. Eine besondere Eigenschaft von CD36 liegt darin, seine Affinität für Thrombospondin bzw. Kollagen zu modulieren: Phosphorylierung von CD36 führt zu einer verstärkten Affinität zu Kollagen, während bei Dephosphorylierung CD36 vermehrt Thrombospondin bindet³². Kontrolliert wird der Prozeß durch Ektophosphatasen, die während der Plättchenaktivierung freigesetzt werden³².

2.2.2.4.2 Bedeutung im Lipoprotein- und Fettsäurestoffwechsel

CD36 wurde als eines der Proteine identifiziert, die in der Lage sind, freie Fettsäuren in die Zelle zu transferieren und damit die Aufnahme von langkettigen Fettsäuren in Adipozyten, Dünndarm, Herz- und Skelettmuskel zu gewährleisten. Febbraio et al. untersuchten Adipozyten aus CD36 -/- Mäusen und beobachteten eine signifikante Abnahme des Transportes langkettiger Fettsäuren mit einem konsequenten Anstieg von Nüchtern-Cholesterin, nichtveresterten freien Fettsäuren sowie Triacylglyceriden (hauptsächlich innerhalb der VLDL-Fraktion) im Plasma. Diese Tatsachen weisen auf eine wichtige Rolle des Proteins in Lipoprotein- und Fettsäurestoffwechsels hin ⁴⁶. Die Expression von CD36 als Fettsäuretranslokase (FAT/CD36) in Skelett- und Herzmuskel dient der Energieversorgung dieser Gewebe durch freie Fettsäuren, besonders in den Muskelfasern die hauptsächlich auf aerobe Energiegewinnung angewiesen sind. So konnte gezeigt werden, dass eine chronische Muskelkontraktion zu einer Überexpression von FAT/CD 36 und damit zu einer verstärkten Aufnahme von freien Fettsäuren führte ¹².

2.2.2.4.3 Bedeutung von CD36 in der Phagozytose apoptotischer Zellen

Eine wichtige Funktion des Rezeptors wurde auch in der Beseitigung apoptotischer Zellen beschrieben. Makrophagen scheinen verschiedene Mechanismen entwickelt zu haben, um apoptotische Zellen zu erkennen und zu phagozytieren. Von Bedeutung sind dabei der Vitronectin Rezeptor ($\alpha\beta$ Integrin), Scavenger-Rezeptoren und die Erkennung von Phosphatidylserin auf apoptotischen Zellen durch Phosphatidylserinrezeptoren (beta2-glycoprotein I). Unstimulierte Makrophagen phagozytieren apoptotische Zellen über das $\alpha\beta$ Integrinsystem, das mit CD36 assoziiert ist. Dieser Komplex bindet Thrombospondin, das wiederum an Liganden apoptotischer Zellen bindet ^{136, 44}. Werden humane Makrophagen stimuliert, verlieren sie diese Fähigkeit, sind dann aber in der Lage, Phosphatidylserin zu erkennen. Bei beiden Prozessen scheint CD36 als Kofaktor involviert zu sein, da die Aufnahme apoptotischer Zellen durch anti-CD36 Antikörper zu 25 – 40 % bzw. 40 – 55 % blockiert wurde ⁴⁴.

Wie bei den Scavenger-Rezeptoren der Klasse A, wurden auch bei dem CD36 Rezeptor Zusammenhänge zwischen der Erkennung von Phosphatidylserin und der Phagozytose oxidierter LDL beschrieben.

Bei den auf der Oberfläche von Lipoproteinen vorkommenden Lipiden, handelt es zum großen Teil um Phosphatidylcholine, deren oxidierte Formen für die Bindung an CD36 mitver-

antwortlich scheinen ¹⁵⁰. Die Autoren postulierten eine biochemische Mimikry zwischen oxidierten Phospholipiden und Phosphatidylserinen der apoptotischen Zellen.

3. Peroxisome Proliferator–Activated Receptor gamma (PPAR γ)

3.1 Struktur

PPAR γ gehört zu einer Subklasse von Kernrezeptoren, die sich aus drei Isotypen des Rezeptors zusammensetzt: PPAR α , PPAR γ und PPAR β/δ . Obwohl alle Isotypen von unterschiedlichen Genen kodiert werden, besitzen sie eine ähnliche Proteinstruktur. PPAR γ , der sich wiederum in zwei Isoformen (PPAR γ 1 und 2) unterteilen lässt, besteht aus verschiedenen Domänen, die alle auf Chromosom 3 in der Position 3p25 kodiert sind ⁶³. Die Gene umfassen 100 kb und die Isoformen unterscheiden sich in ihrem NH₂-terminalen Ende als Konsequenz unterschiedlicher Spaltung der mRNA und Aktivierung verschiedener Promotoren ^{9, 45, 170}. Im Gegensatz zu PPAR γ 1 besitzt PPAR γ 2 ein um 28 Aminosäuren erweitertes N-terminales Ende. Die N-terminale **A/B Domäne** besitzt eine ligandunabhängige Aktivierungsfunktion, die durch Insulin reguliert werden kann ¹⁶². Dieser Bereich hat bei der Isoform PPAR γ 2 ein zehnfach stärkeres Aktivierungspotential als bei PPAR γ 1 ¹⁶². Die **C-Domäne** ist gleich die DNA-Bindungsdomäne, deren Struktur von zwei Zinkfingern gebildet wird, die an sechs Zielnukleotide der DNA binden. Es folgt die **D-Region**, an die Koaktivatoren binden und die carboxyterminale **E/F Domäne** (Ligand-bindende Domäne = LBD) mit der Ligand-abhängigen Aktivierungsregion AF2 ¹³¹. Die Ligand-bindende Domäne ist gefaltet aus drei Lagen von α -Helices. Ist an den Retinoid-X-Rezeptor (RXR, s.u.) kein Ligand gebunden, verändert die AF2-Region ihre Tertiärstruktur, sodass sich die AF2-Domäne von der LBD abkoppelt. Umgekehrt führt eine Ligandbindung an RXR zu einer Umgestaltung der AF2-Helix und die AF2-Region nähert sich wieder der LBD, sie bildet dann mit ihren hydrophoben Resten einen Teil der LBD ¹¹⁵.

3.2 Ligandenspektrum

Bisher sind nur wenige natürliche Liganden beschrieben, die an PPAR γ binden und ihn aktivieren. Dazu zählen Derivate der Arachidonsäure, wie das Eicosanoid 15 – Deoxy - $\Delta^{12,14}$ prostaglandin J₂ ^{49, 87} und die sogenannten H(P)ETEs (15-Hydroxy(peroxy)eicosatetraenoic acid), sowie die aus der Linolsäure entstehende Fettsäure 9-/13- HODE (Hydroxyoctadecadienoic-acid) ¹⁰⁹. Kürzlich wurde ein weiterer endogener, agonistischer Ligand mit hoher Af-

finität identifiziert, der zur Gruppe der Alkylphosphatidylcholone der LDL gehört und durch Behandlung mit Phospholipase A₁ freigesetzt wird³¹. Dieser war in der Lage, durch PPAR γ -Aktivierung u.a. die CD36 – Expression zu verstärken und dadurch die eigene Aufnahme zu induzieren³¹. Es wurde erstmals gezeigt, dass ein intaktes oxidiertes Phospholipid direkt an PPAR γ bindet, nachdem es mittels einer Flippase (TTA) durch die Zellmembran transportiert wurde³¹. Weiterhin wurden eine Reihe synthetische Liganden beschrieben, die der Gruppe der Antidiabetika angehören und eine hohe Affinität zu PPAR γ besitzen; es handelt es sich dabei um Troglitazon, Pioglitazon und Rosiglitazon¹⁰⁰. Auch Nichtsteroidale Antiphlogistika, wie Indomethacin und Ibuprofen wurden als Liganden von PPAR γ erkannt⁹⁹.

3.3 PPAR γ Aktivierung und Transaktivierung

Der **ligandabhängige** Weg der Aktivierung erfolgt durch die Bindung eines Liganden an PPAR γ oder den RXR-Rezeptor (Retinoid-Rezeptor), mit dem PPAR γ ein Heterodimer bildet, d.h. beide Rezeptoren können die Transkriptionsaktivität regulieren, indem sie mit dem eigenen Liganden interagieren. Werden beide Partner durch einen Liganden aktiviert, führt dies zu einem additiven Effekt. Es wurde gezeigt, dass der endogene RXR-Ligand 9-cis-Retinolsäure PPRE-regulierte Gene in einem PPAR:RXR abhängigen Mechanismus aktivieren konnte⁸⁸. Gleiches gilt auch für die PPAR Zielgene L-FABP (liver fatty acid binding protein) und Apo AII, die ebenfalls auf Aktivierung durch 9-cis-Retinolsäure vermehrt exprimiert werden^{121, 159}. Wird PPAR γ nicht durch einen Liganden aktiviert, liegt er als PPAR:RXR/Korepressor-Komplex vor, der die Bindung an PPAR-Response-Elements (PPRE) verhindert. Bindet ein Ligand, dissoziiert der Korepressor von dem Komplex ab und PPAR:RXR bindet an PPRE, was eine Veränderung der Chromatinstruktur zur Folge hat. Der an die DNA gebundene PPAR:RXR-Komplex führt zu einer Bindung des Koaktivator-Acetyltransferase-Komplexes, der durch Acetylierung von Histonzweigen in der Promotorregion eine zu transkriptierende Struktur herstellt. Mittels zusätzlicher Transkriptionsfaktoren und des RNA-Polymerase II Komplexes wird die Transkription der Zielgene eingeleitet³⁶ (siehe Abb. II. 3).

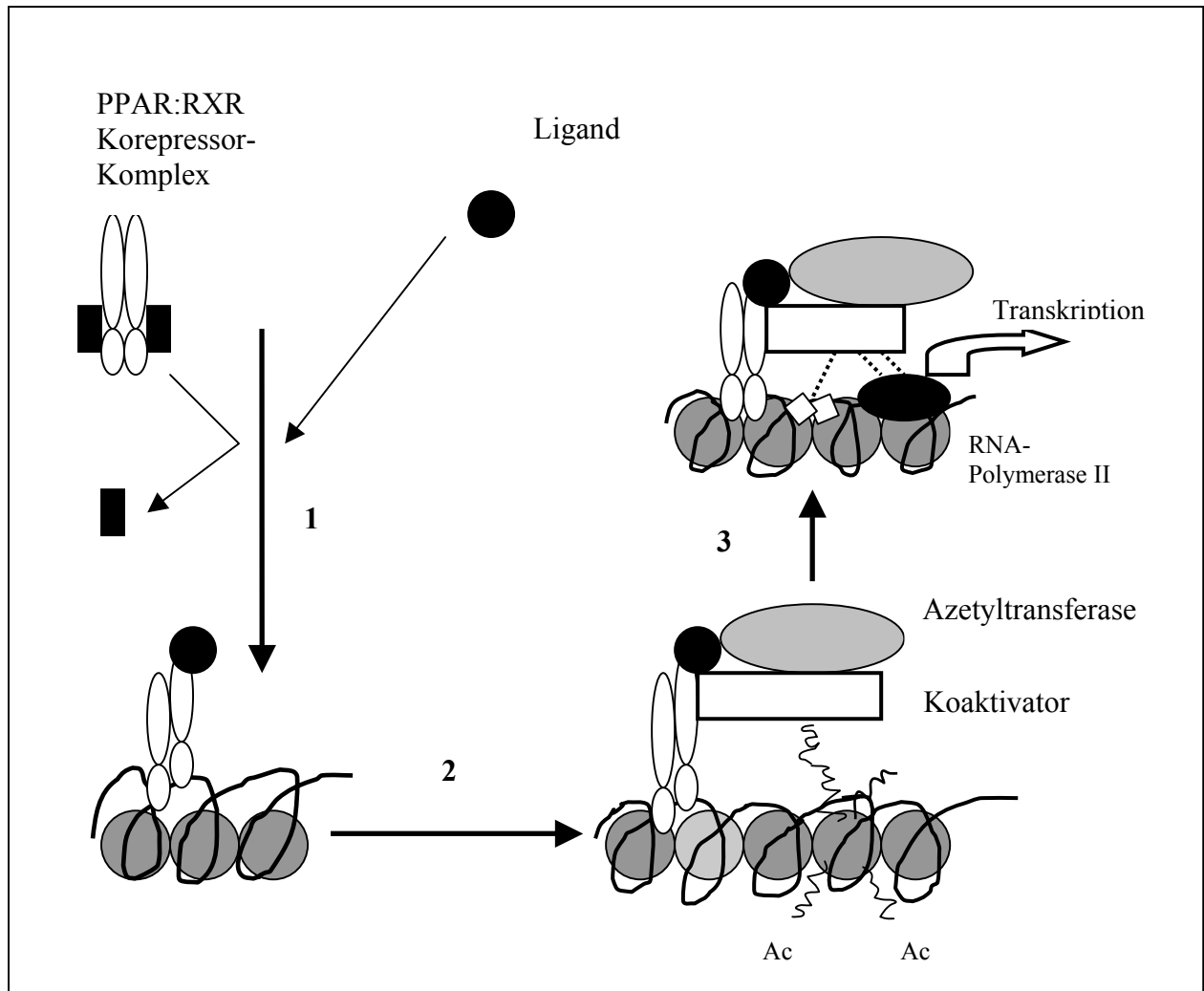


Abb. II.3: Wird PPAR γ nicht durch einen Liganden aktiviert, liegt er als PPAR:RXR/Korepressor-Komplex vor, der die Bindung an PPAR-Response-Elements (PPRE) verhindert. Bindet ein Ligand, dissoziiert der Korepressor von dem Komplex ab und PPAR:RXR bindet an PPRE, was eine Veränderung der Chromatinstruktur zur Folge hat. Der an die DNA gebundene PPAR:RXR-Komplex führt zur einer Bindung des Koaktivator-Acetyltransferase-Komplexes, der durch Acetylierung von Histonzweigen in der Promotorregion eine zu transkriptierende Struktur herstellt. Mittels zusätzlicher Transkriptionsfaktoren und des RNA-Polymerase II Komplexes wird die Transkription der Zielgene eingeleitet³⁶.

Je nach Ligand kommt es dabei zu ligandspezifischen Strukturveränderungen von PPAR γ , was zur Rekrutierung jeweils unterschiedlicher Koaktivatoren der Transkription führt. Diese Koaktivatoren führen zu einer Strukturveränderung der AF2-Helix, welche für eine effektive Transkription notwendig ist⁵⁸. Die Koaktivatoren, wie z.B. SRC-1, besitzen das LXXLL Motif (L = Leuzin, X = beliebige Aminosäure). Die Leuzin-Reste binden dabei eng an die hydrophobe LBD von PPAR γ ¹¹⁵. Während PgJ₂ und Troglitazon beide zu einer Transaktivierung führten, wurde für PgJ₂ eine Interaktion mit SRC-1 und TIF2 nachgewiesen, die bei Behandlung mit Troglitazon nicht gezeigt werden konnte. Man vermutet deshalb die Interaktion mit anderen Koaktivatoren⁸⁹. Obwohl 9-HODE als endogener Ligand und Aktivator von

PPAR γ identifiziert wurde, konnte in dieser Untersuchungsreihe mit COS-1 Zellen weder eine Koaktivator-Interaktion noch eine signifikante Translokation von PPAR γ nachgewiesen werden⁸⁹.

Hauser et al. zeigten, dass Liganden auch die Degradierung von PPAR γ durch Proteasen induzieren⁷². Ähnlich anderer Proteine, die durch Ubiquitierung dem proteasomalem Abbau zugeführt werden, konnte auch für PPAR γ die Bindung von Ubiquitin an Lysinreste durch funktionell hintereinandergeschaltete Enzyme nachgewiesen werden. Die genaue Verknüpfung von Ligandbindung und Degradierung ist noch nicht genau geklärt. Eine Punktmutation im Genabschnitt für AF2 blockiert die Degradierung, ebenso ein Korepressorprotein (RIP 140), das an AF2 bindet⁷².

Der zweite Mechanismus der Aktivierung ist **ligandunabhängig** und konnte erstmals für die Aktivierung von PPAR α durch Insulin beschrieben werden. Insulin führt dabei zu einer Phosphorylierung von zwei Mikrotubuli-assoziierten Protein- (MAP) Kinase Bindestellen, die an Position 12 und 21 in der A/B Domäne von humanen PPAR α identifiziert wurden⁸⁴. Zhang et al. demonstrierten einen synergistischen Effekt zwischen Insulinbehandlung und ligandabhängiger Aktivierung von PPAR γ , gemessen an der Expression des Zielgens aP2 in Chinese hamster ovary cells. Da dieser Effekt durch Zugabe von MAP-Kinase-Inhibitoren gehemmt wurde, bezog man den Insulineffekt auf die Phosphorylierung von PPAR γ , welche durch Zugabe aufgereinigter MAP-Kinase beobachtet wurde¹⁶⁹. Einen gegenteiligen Effekt besaßen EGF (epidermal growth factor) und PDGF (platelet derived growth factor), welche die Transkriptionsaktivität von PPAR γ durch Phosphorylierung mittels MAP-Kinase verringerten^{18, 73}. Eine MAP-Kinase Bindungsdomäne wurde am Serin 82 in der N-terminalen Domäne von PPAR γ 1 identifiziert, die der Position Serin 112 in PPAR γ 2 entsprach^{18, 73}. Der mutierte PPAR γ 2 (Serin an Position 112 durch Aspergin ersetzt) zeigte eine abgeschwächte Ligandaffinität und Einbeziehung von Kofaktoren. Demnach hat der Phosphorylierungsstatus von Serin 112 im N-terminalen Bereich Einfluß auf die Konformation des nichtgebundenen Rezeptors und kann dadurch die Affinität von PPAR γ zu seinen Liganden beeinflussen¹⁴³. Die Tatsache, dass die Phosphorylierung zu einer Aktivierung oder Hemmung von PPAR γ führen kann, ist abhängig von der Natur des Stimulus, der jeweils unterschiedliche Kinase – Mechanismen benutzt⁵⁴.

3.4 Expression und Funktion

3.4.1 Einfluss von PPAR γ auf Adipogenese und Lipidmetabolismus

Die Expression von PPAR γ ist zum größten Teil auf das Fettgewebe beschränkt¹⁵³ und hat Bedeutung bei der Induktion der Adipogenese in Präadipozyten. Während die preadipozytäre Zelllinie (3T3-L1, 3T3-F442A) nur Spuren von PPAR γ enthält, wurde die Expression im Laufe der Differenzierung deutlich stärker^{152, 153}. Ein Beweis war ferner die starke Expressierung von PPAR γ in NIH-3T3 Fibroblasten, die sich unter Einfluß verschiedener Aktivatoren wie z.B. Linolsäure in Adipozyten differenzierten und Fett einlagerten¹⁵³. Der Effekt auf die Adipogenese und den Lipidmetabolismus in der Fettzelle kommt durch die PPAR-regulierte Expressierung verschiedener Gene zustande, die für Enzyme des Fettstoffwechsels kodieren. Dies gilt für das *Fettsäure-Transportprotein (FAT und FATP)*, das die Aufnahme langkettiger Fettsäuren in den Adipozyt erleichtert, wie dies auch in Hepatozyten und Enterozyten der Fall ist¹⁰⁷. Die von den Adipozyten sezernierte *Lipoproteinlipase* spaltet freie Fettsäuren aus Triglyceriden der Lipoproteine und versorgt so die Fettzellen mit Fettsäuren, die an *Fettsäurebindende Proteine (aP2)* auf den Adipozyten binden. Durch die *Acyl-CoA-Synthetase* werden die Fettsäuren sofort verestert und damit am Austritt gehindert. Die Gene für die genannten Enzyme / Proteine stehen allesamt unter dem Einfluss von PPAR-Aktivatoren³⁶.

3.4.2 Bedeutung von PPAR γ in der Arteriosklerose und in Entzündungsprozessen

Da PPAR γ auch in geringerem Maße in Zellen gefunden wurde, die im Zusammenhang mit der Entstehung der Arteriosklerose stehen wie Makrophagen, Epithelzellen und glatten Muskelzellen, wurden mögliche Funktionen in diesem Bereich untersucht. Eine starke Expression wurde vor allem in Schaumzellen arteriosklerotischer Plaques beschrieben und diese konnte durch Wachstumsfaktoren, wie M-CSF und GM-CSF sowie durch oxidiertes LDL induziert werden¹²⁷. Nagy und Tontonoz et al. erkannten erstmals, dass zwei wesentliche Komponenten des oxidierten LDLs, 13- und 9-HODE, endogene Liganden und Aktivatoren von PPAR γ in humanen Monozyten und THP1 Zellen sind. Diese sind in der Lage, über Hochregulierung von CD36 die Aufnahme oxidiertes LDL zu induzieren^{109, 154}. Als in der Promoterregion von CD36 eine Bindestelle für PPAR:RXR entdeckt wurde, konnte erstmals das CD36-Gen als ein weiterer Angriffspunkt des Kernrezeptors beschrieben werden⁵. Es wird diskutiert, dass die Enzyme, die auch die Adipozytenreifung beeinflussen, ebenfalls im Lipidmetabolismus der Makrophagen eine Rolle spielen und zur Entstehung von Schaumzellen führen könnten. Das Adipozyt-Lipid-bindende Protein (ALBP / aP2 s.o.) wurde als Zielgen von PPAR γ identi-

ziert und man beobachtete eine starke Expression in Makrophagen atherosklerotischer Plaques. Die Expression konnte durch PPAR γ Liganden, wie 9- und 13-HODE in THP-1 Zellen induziert werden ⁵². Es wurde ebenfalls untersucht, welche physiologischen Funktionen PPAR γ in Makrophagen haben könnte: da PPAR γ in unreifen Monozyten nicht exprimiert wird, die Expression im Laufe der Monozytendifferenzierung aber stark zunimmt und Ligan-daktivierungen zu Differenzierungsmerkmalen führen (oxidativer Burst, Oberflächenrezeptoren CD14 und CD18), wurde angenommen, dass PPAR γ eine wichtige Rolle im Rahmen der Monozytenreifung besitzt ^{109, 127}. Kürzlich wurde allerdings demonstriert, dass PPAR γ bei der in vitro Differenzierung von PPAR γ - defizienten embryonalen Stammzellen zu Makrophagen nicht essentiell war. Es entstanden aus dieser Zellreihe Makrophagen, die morphologisch und funktionell keine Unterschiede zu den Wildtyp-Zellen zeigten ^{24, 106}.

Weiter wurde beschrieben, dass eine PPAR γ -Aktivierung in differenzierten Makrophagen die Apoptose einleitet. Wurden die Zellen zusätzlich mit TNF α und IFN γ aktiviert, verstärkte sich der Effekt ²⁶. Da die Induktion der Apoptose schon bei geringer Konzentration des PPAR-Aktivators eintrat, die Induktion von CD36 und die Schaumzellbildung aber erst bei sehr viel höheren Konzentrationen, ergab sich die Idee, dass PPAR γ -Aktivatoren eine Doppelrolle spielen: in niedriger Konzentration führen sie zur Apoptose und verhindern somit die Schaumzellbildung, in hoher Dosierung bewirken sie über eine CD36-Stimulierung die Schaumzellbildung in den Zellen, die von der Apoptose verschont blieben ²⁶. Die Apoptose wird vermutlich dadurch induziert, dass PPAR γ die Transkriptionsaktivität von p65/RelA hemmt, einer Schlüsselkomponente im antiapoptotischen NF κ B Signalweg. TNF α und IFN γ könnten dabei zu einer Phosphorylierung von PPAR γ führen, die dessen Aktivität so moduliert, dass p65/RelA funktionell gehemmt wird ²⁶.

Die Behandlung von Monozyten und Makrophagen mit hohen Konzentrationen an PPAR γ -Agonisten führte zu einer reduzierten Sekretion proinflammatorischer Zytokine ¹⁴⁶. Zum Beispiel bewirkten 15d-PgJ₂ und Thiazolidinderivate eine Sekretionshemmung von TNF α , IL-1 β und IL-6 ^{rev. 82}. Außerdem wurde beobachtet, dass mit 15d-PgJ₂ behandelte Peritonealmakrophagen morphologische Kennzeichen entwickelten, wie sie für ruhende, inaktive Zellen typisch sind ¹²⁸. Zum Beispiel wurde die IFN- γ abhängige Induktion der Stickstoffmonooxidase (iNOS) dosisabhängig auf mRNA Ebene gehemmt. Auch die Bildung des SR-A und der Gelatinase B, eine Matrix-Metalloproteinase, die durch IL-1 und TNF α induziert wird und die Degradierung der extrazellulären Matrix einleitet, konnte durch PgJ₂ auf mRNA Basis nahezu vollständig blockiert werden ¹²⁸. Erklärt wird diese Tatsache dadurch, dass PgJ₂ die Promoter-

regionen dieser Enzyme und Rezeptoren stilllegt, indem es durch PPAR γ -Aktivierung die für die Regulierung wichtigen Transkriptionsfaktoren AP-1, STAT und NF- κ B verbraucht ¹²⁷. Eine aktuelle Studie zeigt, dass das antiinflammatorische Enzym Katalase, verantwortlich für die Spaltung von H₂O₂, ebenfalls über PPREs durch PPAR γ reguliert wird. Man entdeckte das PPRE im Katalase-Promotor der Ratte und PPAR γ -Aktivatoren führten zu einem Anstieg der Katalase mRNA Aktivität ⁵⁷.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass PPAR γ in der Pathogenese der Arteriosklerose kontroverse Rollen spielt. Zum einen wirkt er durch Förderung der Schaumzellbildung destruktiv, zum anderen durch seine antiinflammatorische Wirkung und Hemmung der Gelatinase B, die als mitverantwortlich für die Plaqueruptur gilt, protektiv gegenüber Atherosklerose.

4. Oxidierung und Modifizierung von LDL und seine Bedeutung in der Atherosklerose

Für die in vivo Oxidierung der Lipoproteine werden Endothelzellen, glatte Muskelzellen, Makrophagen und neutrophile Granulozyten ¹⁰ verantwortlich gemacht. In vitro können Fe²⁺ sowie Cu²⁺ die Oxidierung katalysieren. Eine Oxidierung durch Metallionen in vivo wird ebenfalls diskutiert. Zum Beispiel könnte es im Rahmen eines Zellunterganges bei fortgeschrittenem Stadium zur Freisetzung von Metallionen kommen, die dann extrazellulär die Lipoproteine oxidieren ¹⁰. Der Übertritt von nativen LDL in den subintimalen Bereich und die Oxidierung sind Ausgangspunkt zur Entstehung der arteriosklerotischen Plaques. Außer der Bedeutung bei der Entstehung von Schaumzellen, besitzt das oxidierte LDL auch eine Reihe weiterer atherogener Eigenschaften:

- Direkte chemotaktische Wirkung auf zirkulierende Monozyten **(A)** bei Mobilitätshemmung der Makrophagen vor Ort (v.a. durch minimal modifiziertes LDL) ^{123, 122} **(B)**.
- Stimulierung der Endothelzellen zur Produktion von monocyte chemotactic peptide (MCP-1) und macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), damit Rekrutierung von Monozyten und Differenzierung in Makrophagen ¹¹⁷ **(C)**.
- Aktivierung von Makrophagen zur Bildung von Entzündungsmediatoren (IL-1 und TNF α) **(D)** und damit Hochregulierung von E-Selektinen und ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1) auf Endothelzellen, die ebenfalls Lymphozyten und Monozyten erkennen und binden.
- Zytotoxischer Effekt auf Makrophagen, glatte Muskelzellen und Endothelzellen ²⁰ **(E)**.
- Induzierung von Autoantikörpern gegen oxidiertes LDL ⁵³ und damit Auslösung einer Entzündungsreaktion.

- Induktion der Interleukin-1⁹³ und PDGF- Sekretion¹³² aus Makrophagen und damit Proliferation glatter Muskelzellen^{93, 132} (F).
- Hemmung der Vasomotorik durch verminderte NO⁻ Bildung⁸⁰.
- Behinderung des reversen Cholesterintransportes durch verminderte Abgabe von Membrancholesterin an HDL⁹².

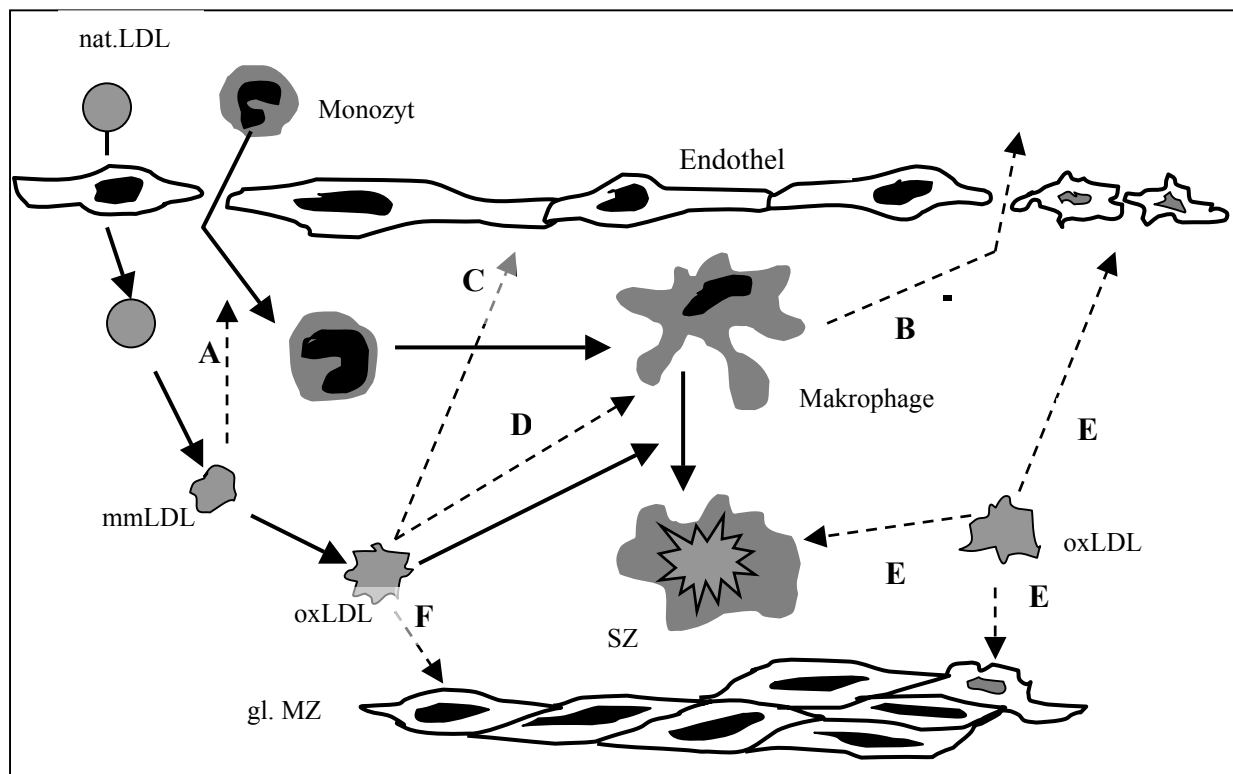


Abb. II. 4: Rolle von oxidiertem LDL in der Atherosklerose; mod. nach Diaz et al., The New England Journal of Medicine 7: 408-416 (1997); nat.LDL = natives LDL, mmLDL = minimal modifiziertes LDL, oxLDL = oxidiertes LDL, SZ = Schaumzelle, gl.MZ = glatte Muskelzellen, gestrichelte Pfeile mit Großbuchstaben siehe Text.

Der genaue Mechanismus der Modifizierung ist noch nicht eindeutig geklärt. Es wird vermutet, dass Enzyme, wie NADPH-Oxidase, Superoxiddismutase und Stickstoffmonooxidase (im Rahmen des „oxidativen bursts“) mit Hilfe von molekularem Sauerstoff *freie Sauerstoffradikale, Peroxide* sowie *reaktive Stickstoffmediatoren* bilden, die Lipoproteine oxidieren. Das Kupfer-haltige Akut-Phase-Protein, *Coeruloplasmin*, das von aktivierten Makrophagen als Antwort auf IFN- γ sezerniert wird, ist in der Lage, mit Hilfe von O₂ LDL zu oxidieren, ähnlich der in vitro Oxidierung durch Cu²⁺²⁷. Die *Myeloperoxidase* ist ein Enzym, das von aktivierten Makrophagen und Neutrophilen Granulozyten ebenfalls im Rahmen des „oxidativen burst“ aktiviert wird und die Bildung hypochloriger Säure (HOCl) katalysiert; diese führt zu einer Chlorierung und Oxidierung sowohl des Lipid- als auch des Proteinanteils im LDL und

zu einer Aggregation der Lipoproteine²⁷. Dieses Enzym bindet auch direkt an ApoB von LDL und oxidiert es¹⁹.

Ebenfalls Bedeutung hat die *15-Lipoxygenase*, die bestimmte Fettsäuren im LDL zu Hydroperoxiden oxidiert und die *sekretorische Phospholipase A₂*, die LDL-assoziierte Phospholipide hydrolysiert. Beide Enzyme werden unter Punkt II.5 und II.6 näher erläutert. Wichtig ist auch die nicht-oxidative Modifizierung durch Komplexbildung mit anderen Makromolekülen. Bei Patienten mit Diabetes mellitus geht der Apo-B-Anteil mit Glukose eine nichtenzymatische Konjugation ein. Glykiertes LDL wird von Makrophagen schneller aufgenommen und nur schlecht vom LDL-Rezeptor erkannt, was die Verweildauer im Plasma und die Wahrscheinlichkeit der Oxidierung erhöht. Eine Unterform von LDL, das so genannte small-dense LDL, wie es vor allem beim Diabetes mellitus vorkommt, scheint besonders anfällig für die Oxidierung zu sein²¹, wahrscheinlich durch den hohen Gehalt an Triglyceriden und ungesättigten Fettsäuren, als primärer Angriffspunkt der Oxidierung¹⁵⁵.

Die verschiedenen Oxidationsmöglichkeiten zeigen, dass es sich um ein breites Spektrum oxidierter Lipoproteine handelt, die sich strukturell stark unterscheiden. Dabei kann der Vorgang der Oxidation als Kontinuum mit unterschiedlichen Oxidationsstadien betrachtet werden.

5. Sekretorische Phospholipase A₂

5.1 Allgemeines

PLA₂ umfasst eine Gruppe lipolytischer Enzyme, die Membranphospholipide am C-Atom 2 des Glycerins hydrolysieren und freie Fettsäuren, vor allem Arachidonsäure, freisetzen³⁵. Arachidonsäure und ihre Metabolite fungieren als intra- und interzelluläre Messenger. Darüber hinaus werden durch die Spaltung anderer Membranlipide auch die entzündlichen Lipidmediatoren Lyso-PAF und PAF (Plättchen-aktivierender-Faktor) gebildet.

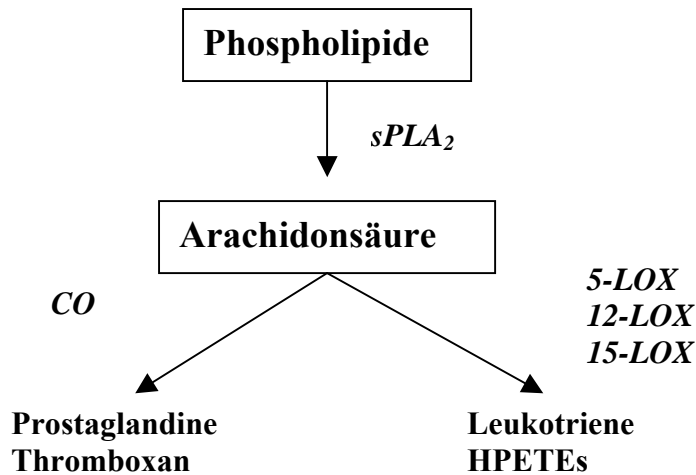


Abb. II. 5: Freisetzung und Metabolismus von Arachidonsäure; CO = Cyclooxygenase, LOX = Lipoxidase, HPETE = Hydroperoxiderivate

Die PLA₂-Enzyme werden ubiquitär exprimiert. Dabei handelt es sich um eine sehr heterogene Enzymfamilie, die nach ihrem Molekulargewicht in zwei Klassen eingeteilt wird. Die Klasse der PLA₂ mit niedrigem Molekulargewicht (14 kD) bezeichnet man als sekretorische PLA₂ und diejenigen mit einem Molekulargewicht von 60-110 kD als cytosolische PLA₂. Beide Klassen werden wiederum in verschiedene Untergruppen unterteilt.

Die hochmolekulare *cytoplasmatische PLA₂* (cPLA₂) zeigt eine Selektivität für Arachidonsäuresubstrate und wird durch Ca²⁺ in submikromolaren Konzentrationen aktiviert und reguliert. Eine Erhöhung des intrazellulären Calciums führt dabei zu einer Translokation des Enzyms vom Zytosol zur Zellmembran. Auf diese Weise wird vorübergehend eine physiologische Eicosanoidsynthese vermittelt.

Die *sekretorische PLA₂* (sPLA₂) kommt in löslicher Form am Ort der Entzündung vor und spielt eine Rolle in der Auslösung und Unterhaltung von entzündlichen Prozessen. Stimulierende Faktoren sind besonders IL-1,-6 und TNFα, die eine sPLA₂-Expression in glatten Muskelzellen^{97, 112} und humanen hepatozytären Zelllinien²⁹ vermitteln. Da sie aber auch in gesunden Geweben gefunden wird, wird vermutet, dass sie eine Funktion in der Phospholipid-Erneuerung¹⁴ und bei der Reparatur Lipid-Peroxid-geschädigter Membranen besitzt⁹⁶. Das Enzym ist ein basisches Protein mit sieben Disulfid-Brücken, das an extrazelluläre SO₄-GAG (Glykoaminoglykane) bindet. Im Gegensatz zur cPLA₂ ist es nicht selektiv für die Art der Fettsäure am C-Atom 2 des Glycerins.

5.2 Mögliche Bedeutung der sekretorischen PLA₂ in der Atherogenese

Sekretorische PLA₂ ist sowohl in gesunden wie auch in atherosklerotisch veränderten Arterien gefunden worden ⁷⁷. In nicht-atherosklerotischen Gefäßen war die Expression am stärksten assoziiert mit α -Aktin-positiven glatten Muskelzellen in der Media, während die Intima frei von sPLA₂ war. Im Gegensatz dazu zeigten Plaques sowohl in der Media als auch in der Intima eine Proliferation glatter Muskelzellen, die von sPLA₂-Expression begleitet wurde. Laut immunhistochemischer Studien sind glatte Muskelzellen die Hauptquelle der sekretorischen PLA₂ ¹⁶⁴.

Ferner erkannte man eine Kolo-kalisation mit CD68-pos. Schaumzellen, sowie ein extrazelluläres Vorkommen von sPLA₂ in atherosklerotischen Herden ⁷⁷. Es wird vermutet, dass auch hierbei Cytokine die Bildung und Freisetzung der sekretorischen Phospholipase induzieren. Auch minimal modifiziertes LDL (oxidiert mit Kupfer 2h) ist als Stimulus für die Expression von sPLA₂ in Makrophagen identifiziert worden. Natives- und stark oxidierte Lipoproteine waren dazu nicht in der Lage ³. Die PLA₂-Sekretion der in der Intima lokalisierten Makrophagen scheint eine spezielle Antwort auf Exposition gegenüber minimalmodifizierten LDLs während des frühen Stadiums der Arteriosklerose zu sein, um die Beseitigung des LDL zu erleichtern, da durch sPLA₂ modifiziertes LDL stärker durch Scavenger-Rezeptoren aufgenommen wird ³.

Die proatherogene Eigenschaften liegen

1. in der Freisetzung von freien Fettsäuren und Lysophospholipiden aus Lipoproteinen mit proinflammatorischer und chemotaktischer Wirkung auf Monozyten ¹⁶⁵.
2. in der Modifizierung des LDLs zu einer Form, in der es verstärkt von Makrophagen aufgenommen wird ⁶, möglicherweise vermittelt durch eine Kolo-kalisation von sPLA₂ und LDL an SO₄-GAG ⁷⁷.

6. 15-Lipoxidase

6.1 Allgemeines

Lipoxidasen (LOX) sind eine heterogene Gruppe von Enzymen, welche mehrfach-ungesättigte Fettsäuren in ihre entsprechenden Hydroperoxidderivate nach vlg. Schema oxidieren:

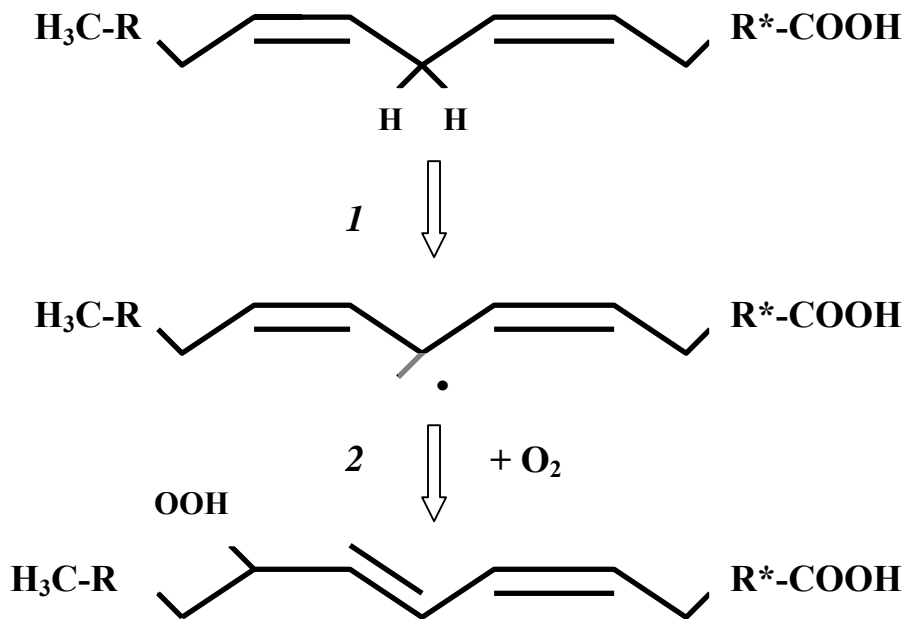


Abb. II. 6: Reaktionsgleichung der Lipoxidase; Kühn und Chan, *Current Opinion in Lipidology* 8: 111-117 (1997); 1. Schritt: Die 15-LOX entzieht dem C-Atom das Wasserstoffatom. Das ungepaarte Elektron des C-Atoms führt zu einer Verschiebung der Doppelbindung zu diesem C-Atom. Dadurch kann das freiwerdende Elektron des anderen C-Atoms Sauerstoff binden, welcher wiederum das abgespaltene H-Atom aufnimmt.

Die verschiedenen Isoformen (5-, 12-, 15-LOX) werden definiert nach der Spezifität, Arachidonsäure zu oxidieren. Eine wichtige Rolle spielt dabei wahrscheinlich die Größe der Substrat-bindenden Domäne^{13, 140}. 15-LOX und 12-LOX (in Leukozyten) sind in der Lage, neben freien Fettsäuren auch Lipid-Protein-Komplexe wie Biomembranen und Lipoproteine zu oxidieren⁹⁵.

In Säugetieren wird die 15-LOX in hohem Maße von Retikulozyten, Eosinophilen, respiratorischem Epithel, Makrophagen und Mastzellen exprimiert. Periphere Blutmonozyten und normales Endothel zeigen keine Expression, diese kann aber durch IL-4 und IL-13 induziert werden. Die physiologische Funktion besteht u.a. in der Bildung von Leukotrienen aus Arachidonsäure, bekannt als Mediatoren bei Entzündungsreaktionen und Anaphylaxie. Ferner ist

sie involviert in den Abbau von Zellorganellen der Retikulozyten und somit in der Reifung der roten Blutzellen¹²⁴.

6.2 Bedeutung der 15-Lipoxidase in der Atherogenese

15-LOX wurde in arteriosklerotischen Läsionen in Form von mRNA und Protein¹⁶⁷ und indirekt anhand spezifischer 15-LOX-Produkte nachgewiesen. Transferierte man das 15-LOX-Gen in die A.Iliaca von Kaninchen, kam es zum Auftreten oxidierter Lipoproteine¹⁶⁶. Da 15-LOX in normalen Gefäßwänden nicht gefunden wird, vermutet man eine Enzyminduktion durch ansteigende Cholesterinspiegel. Dies konnte an Kaninchen nachgewiesen werden⁷. Ferner beobachtete man das Auftreten LOX - spezifischer Produkte in Korrelation mit steigender Lipidablagerung⁹⁴.

6.2.1 Proatherogene Eigenschaften

15-LOX und 12-LOX sind in der Lage, LDL in eine proatherogene Form zu modifizieren⁴⁸. Das hauptsächliche Produkt sind Cholesterolester-Hydroperoxide, veresterte HODEs, die aus der Linolsäure hervorgehen. Das sogenannte minimal-modifizierte LDL ist stärker anfällig für weitere Oxidierung z.B. durch Kupfer und führt so zur Aufnahme durch Makrophagen. Außerdem wurde gezeigt, dass dieses LDL die Chemotaxis und Adhäsion von Monozyten an das Endothel stimulierte^{145, 122, 123}. Auf die Frage, wie genau das intrazelluläre Enzym die Oxidierung des LDLs bewirkt, wurden bisher verschiedene Theorien aufgestellt:

1. LOX führt zu einer Oxidierung von Membranlipiden; die oxidierten Phospholipide treten dann in Kontakt mit LDL-Partikeln. Unterstützt wird diese Theorie durch die Beobachtungen, dass die Induktion der 15-Lipoxidase eine Koinkidenz mit Lipoxidase-Produkten in den Membranlipiden der Monozyten zeigte¹¹⁷.
2. Membrangebundene Phospholipid-Hydroperoxide führen zur Bildung von Radikalen, die damit die nicht-enzymatische Oxidierung von LDL einleiten²².
3. LDL tritt in engen Kontakt mit der Membran, sodass das Enzym direkt an den Lipoproteinpartikeln wirkt. Dabei scheint das in LDL vorhandene α -Tocopherol eine Rolle zu spielen¹⁵⁷. Nach diesem Modell führt die initiale Reaktion von LOX mit freien Fettsäuren des LDLs zu stereospezifischen Hydroperoxiden (13-S-HODE). Als Nebenprodukt entstehen Fettsäureradikale, die sofort durch α -Tocopherol unter der Bildung von α -Tocopherol-Radikalen (α -TO^{*}) neutralisiert werden. Diese Radikale, die in LOX-

oxidiertem LDL nachgewiesen wurden, leiten dann die Peroxidierung von veresterten Lipiden des LDL-Partikels ein, wobei α -TOH regeneriert wird und die weitere Oxidierung unterhält¹⁵⁷. Die Bildung *veresterter* Hydroperoxide wäre also Enzym – unabhängig und angewiesen auf α -Tocopherol.

6.2.2 Antiatherogene Eigenschaften

15-LOX, die von Makrophagen exprimiert wird, könnte im initialen Stadium der Arteriosklerose antiatherosklerotisch wirken, indem es die zelluläre Kapazität zum Abbau von LDL erhöht. Der erste metabolische Schritt ist die Hydrolyse von Cholesterolestern, die bei deren Oxidierung erleichtert wird⁹⁵. Durch den verstärkten intrazellulären Metabolismus von LDL wird der Schaumzellbildung initial entgegengewirkt⁹⁵.

13-HODE, das hauptsächliche Enzymprodukt bei der Metabolisierung der Linolsäure, zeigt eine Reihe schützender Eigenschaften: Es stimuliert die vaskuläre Prostacyclin-Synthese¹⁴² und hemmt die Thromboxan-Bildung in den Blutplättchen¹⁴¹. HPETEs (15-Hydroxyperoxyeicosatetraenoic acid), die ebenfalls von 15-LOX gebildet werden, hemmen die durch TNF α induzierte prokoagulierende Aktivität der Endothelzellen und wirken somit antithrombogen⁸.

III Fragestellung

Die Fragestellung basiert auf zwei zentralen Erkenntnissen der Forschung:

1) In atherosklerotischen Plaques wurden zwei Enzyme nachgewiesen, die im Zusammenhang mit der Modifizierung von nativem LDL mehrfach beschrieben wurden. Die **sekretorische Phospholipase A₂**⁷⁷, in Plaques vor allem sezerniert von glatten Muskelzellen und Makrophagen, hydrolysiert veresterte Lipide unter Bildung freier Fettsäuren^{35, 67}. Die **15-Lipoxidase**^{94, 166, 167} wird von Makrophagen und als Antwort auf IL-4 von Monozyten und Endothel in atherosklerotischen Plaques gebildet. Sie oxidiert mehrfach ungesättigte Fettsäuren in deren Hydroperoxidderivate. Von Bedeutung in dieser Arbeit ist die Bildung von Hydroxyoktadeca-dienoic-acid (= HODE) aus Linolsäure, welche eine der Hauptfettsäuren von Phospholipiden und Cholesterinestern des LDLs darstellt.

2) **HODEs** sind in freier Form als Aktivatoren von **PPAR γ** (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) bekannt, einem Kernrezeptor der u.a. die Transkription des Scavenger-Rezeptors **CD36** induziert¹⁰⁹, welcher für 50 % der Aufnahme oxidierten LDLs in Makrophagen verantwortlich scheint¹¹⁴ und somit die Transformation in Schaumzellen unterstützt.

In dieser Arbeit sollte überprüft werden, ob die beiden Enzyme als funktionelle Einheit in der Lage sind, natives LDL spezifisch zu modifizieren, so dass es in monozytären Zelllinien die Expression von CD36 induzieren kann. Die Hypothese war, dass durch die sekretorische Phospholipase A₂ in LDL Linolsäure freigesetzt wird, die in freier Form leichter zugänglich ist für die Oxidierung durch 15-Lipoxidase zu HODE, die dann über eine Aktivierung von PPAR γ die CD36 Expression induziert. Die Modifizierung des LDLs mit den Enzymen einzeln sollte demnach in der CD36 Expression weniger effektiv sein, da freie HODEs nur in Kombination von Hydrolyse und Oxidation entstehen sollten. Die meisten Studien zur Untersuchung der Schaumzellbildung wurden in vitro mit Kupfer-oxidiertem LDL durchgeführt, das in vivo aufgrund der starken Oxidierung durch ein Metall eher unphysiologisch scheint, oder sich zumindest wegen der Oxidationsstärke nur auf ein fortgeschrittenes Stadium der Plaqueentstehung beziehen kann. Hier sollte ein Modell aufgestellt werden, wie natives LDL im initialen Stadium so verändert werden kann, dass es nur geringfügige Modifizierungen

zeigt, laut Literatur demnach als minimal modifiziert gilt, und dennoch Wegweiser zur Entstehung von Schaumzellen sein könnte, also auch in vivo Gültigkeit besäße.

Abbildung 1 veranschaulicht die genannten Überlegungen anhand einer Skizze.

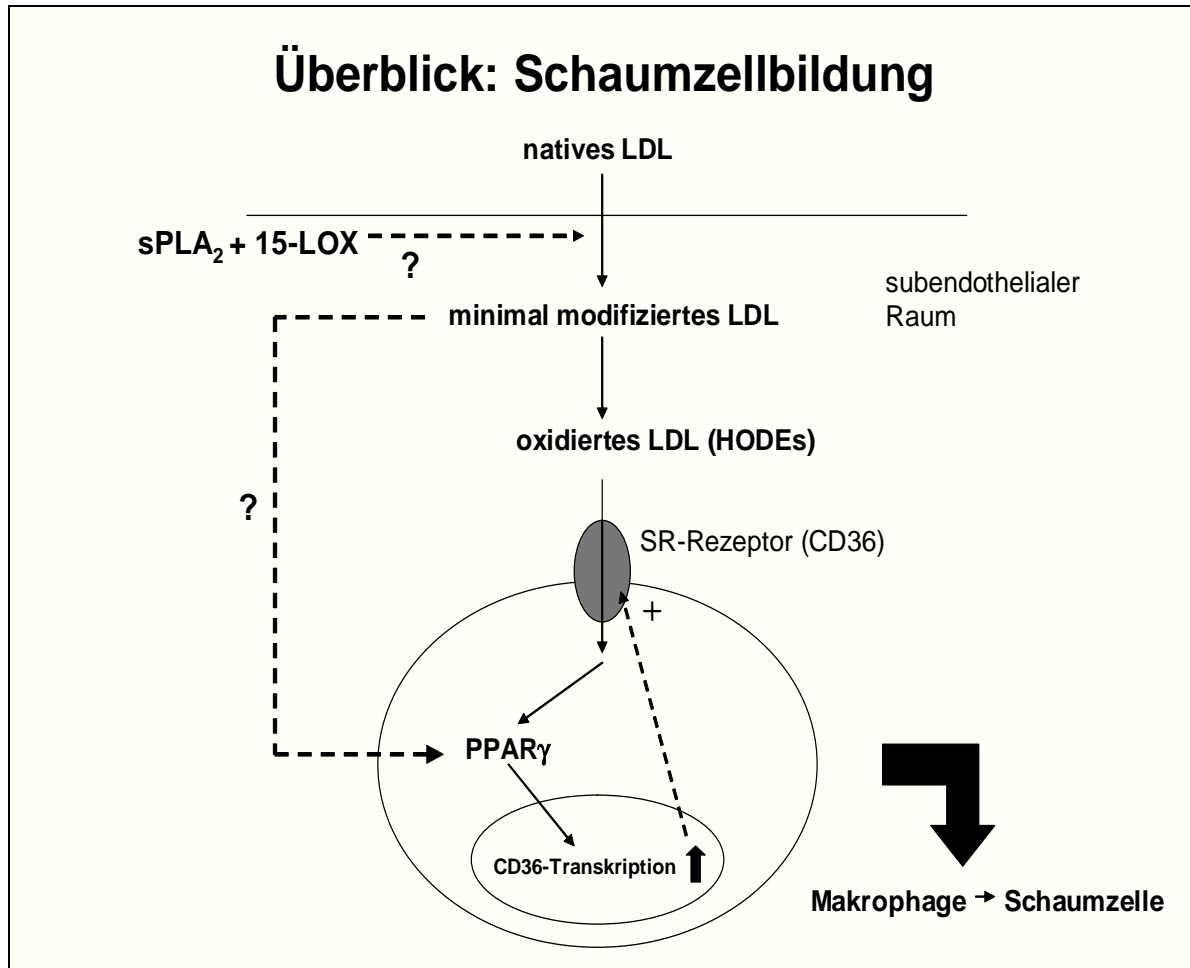


Abb. III. 1: Modell zur Entstehung von Schaumzellen: Natives LDL tritt in den Subendothelialen Bereich der Gefäßwand über. Dort unterliegt es einer zunehmenden Oxidierung, sodass es über Scavenger-Rezeptoren in die Makrophagen aufgenommen wird. Die im oxidierten LDL enthaltenen HODEs aktivieren PPAR γ , der dann im Kern die CD36 Transkription stimuliert. Die zunehmende Zahl von Scavenger-Rezeptoren an der Oberfläche bewirkt eine unkontrollierte Aufnahme von LDL mit der Umwandlung zu Schaumzellen als Folge. Können die sPLA₂ und 15-LOX die Modifizierung von LDL-Partikeln durch Bildung von HODEs initial beeinflussen? Kann dieses modifizierte LDL über Aktivierung von PPAR γ die CD36-Expression induzieren?

IV Material

1. Geräte

Centriflo Membrane Cones:	Amicon, Beverly, USA
Dialyseschläuche:	Medicell Int., London, GB
Durchflußzytometer:	Becton Dickinson, Heidelberg, BRD
Elektrophoresegel (für Lipoproteine):	Helena Laboratories, GB
Elektrophorese-Kammer:	Biochemica, Bearmomt, Texas
Fluoreszenzmikroskop	Leica
Kulturflaschen:	Nunc International, Dänemark
Kulturschalen:	Falcon, Lincoln Parc, USA
Lichtmikroskop, Olympus IX 50-S8F2:	Olympus, München, BRD
MACS Separation Columns:	Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA
OptiSeal centrifuge tubes:	Beckman, München, BRD
PD-10 Columns:	Pharmacia, Freiburg, BRD
pH – Meter: 765 Calimatic mit Meßkette SE 103:	Krück, Berlin, BRD
Perfusorspritzen:	Braun, Melsungen, BRD
Petrischalen:	Greiner Labortechnik, Frickenhausen, BRD
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, BRD
Reaktionsgefäße: 0,2 ml; 1,5 ml; 2 ml: 15 ml; 50 ml:	Eppendorf, Hamburg, BRD Falcon, Lincoln Parc, NJ, USA
Schneidegerät:	Beckman, München, BRD
Spectrophotometer Uvicon 922:	Kontron Instr., München, BRD
Stericult 200 Inkubator:	Forma Scientific, Marietta, USA
Sterilbank BSB 4A:	Gelaire, Meckenheim, BRD
Sterilfilter:	Minisart, Sartorius, Göttingen, BRD
Trockenschrank:	Bender & Hobein, München, BRD
Waage:	Sartorius, Göttingen, BRD
Zentrifugen: MR 18 22:	Jouan, Unterhaching, BRD
Omnifuge 20 RS:	Heraeus, München, BRD
NeoLab 16/18:	Hermle Labortechnik, Wehingen, BRD
Ultrazentrifuge L7-55:	Beckman, München, BRD
Ultrazentrifuge Optima TLX:	Beckman, München, BRD

2. Chemikalien

Aceton:	Merck, Darmstadt, BRD
Ammoniumchlorid:	Sigma, Deisenhofen, BRD
Ammonium-Persulfat:	Bio-Rad, München, BRD
Ascorbinsäure:	Sigma; Deisenhofen, BRD
Calciumchlorid:	Merck, Darmstadt, BRD
Citrat:	Sigma, Deisenhofen, BRD
Dextran:	Pharmacia, Freiburg, BRD
DMSO:	Sigma, Deisenhofen, BRD
Chloroform p.A.:	Merck, Darmstadt, BRD
EDTA:	Sigma, Deisenhofen, BRD
Ethanol:	Merck, Darmstadt, BRD
Ethylendinitilotetraessigsäure:	Merck, Darmstadt, BRD
Heparin:	Braun; Melsungen, BRD
Kaliumbromid:	Sigma, Deisenhofen, BRD
Kupferchlorid:	Merck, Darmstadt, BRD
Kupfersulfat:	Merck, Darmstadt, BRD
Magnesiumchlorid:	Merck, Darmstadt, BRD
Methanol:	Merck, Darmstadt, BRD
N-Tetramethylethyldiamin:	Bio-Rad, München, BRD
Paraformaldehyd:	Sigma, Deisenhofen, BRD

Antikörper, Enzyme und HODEs sind im Text näher erleutert.

3. Puffer und Lösungen

3.1 LDL-Isolierung und Färbung

H₂O – Cocktail (pH 7,4):

Na₂EDTA: 0,4 g/L

NaN₃: 0,13 g/L

Thiomersal: 0,1 g/L

Chloramphenicol: 0,08 g/L

Gentamycinsulfat: 0,08 g/L

Benzamid: 0,121 g/L

Glutathion: 0,2 g/L

Dialysepuffer (pH 7,4):

NaCl: 150 mM

EDTA: 0,24 mM

Chloramphenicol: 0,005 %

EDT-freier PB S- Puffer (pH 7,4):

NaH₂PO₄: 0,262 g / L

Na₂HPO₄: 1,44 g / L

NaCl: 8,766 g / L

Barbital-Natriumbarbital-Puffer (pH 8,4 – 8,8):

Natriumacid: 0,1 %

Thiomersal: 0,1 %

Lipoproteinfarbstoff:

Fettrot 7B 0,1 % in 1000 ml 95 %igem Methanol

3.2 CD36 / CD14 -Färbung

Hanks' Balanced Salt Solution (10fach) 25 ml:

+ MgCl 1 m M

+ CaCl 1 m M

+ Heps-Puffer 10 m M

auf 250 ml mit aqua dest. auffüllen

3.3 Lösungen für Kernlysate

Hypotone Pufferlösung:

MgCl₂ 1,5 mM

KCl 10 mM

PMSF (Phenylmethylsulfonyl-Fluorid) 1 mM

DTT (Dithiothreitol) 1 mM

Hepes (pH 7,3) 10 mM
Protease-Inhibitor-Mix
⇒ mit dest. Wasser auf 10 ml auffüllen

Lyse-Puffer:
s. Hypotone Pufferlösung +
0,4 % Nonidet P-40
Protease-Inhibitor-Mix
⇒ mit dest. Wasser auf 10 ml auffüllen

KCl-Puffer (0,02 M / 0,6 M):
Hepes (pH 7,3) 20 mM
Glycerol 22 %
MgCl₂ 1,5 mM
EDTA 0,2 mM
KCl 0,02 M / 0,6 M
Protease-Inhibitor-Mix
⇒ mit dest. Wasser auf 10 ml auffüllen

Protease-Inhibitor-Mix:
Leupeptin 15 µg/ml, Aprotinin 15 µg/ml, DTT 1 mM, EDTA (pH 8) 0,2 mM

3.4 Lösungen für Western Blot Screening

Proben-Puffer: 200 µl 5 x Proben-Puffer + 800 µl Aqua dest. + 1 µg/ml Leupeptin + 15 µg/ml Aprotinin

Lower Gel (10%): lower Tris 2,5 ml, Wasser 4,10 ml, Acrylamid 3,34 ml, Amonium-Persulfat (APS) 10% 62,5 µl, N-Tetramethylethyendiamin (TEMED) 3,75 µl

Stacking Gel (3%): Upper Tris 1,25 ml, Wasser 3,25 ml, Acrylamid 0,5 ml, TEMED 5 µl;
APS 10% 30 µl

Laufpuffer: 80 ml Laufpuffer (10 x) + 800 ml Aqua dest.

Transferpuffer: Tris 3,03 g, Glycin 14,4 g, Wasser 800 ml, Methanol 200 ml

TBS: Tris 1M 10 ml, NaCl 5 M 33 ml

TBS/Milch: 100 ml TBS, 5 g Milchpulver (=5%)

TBS / Tween: 10 ml 1M Tris (pH 10,88), 33 ml 5 M NaCl, 1000 ml Wasser

⇒ mit Tween (0,1 %) versetzen

3.5 Puffer für MM6 – Medium

Puck A: (pH 6,0)

NaCl 137 mM

KCl 5,36 mM

NaHCO₃ 4,17 mM

Glukose 5,05 Mm

Puck B:

NaHCO₃ 7,5 %

3.6 Zellkulturmedien

Die **THP 1- und MM6 Zellen** wurden in RPMI–1640 Medium (Sigma) mit 10 % FCS kultiviert. Da die MM6 Zellen höhere Ansprüche für ein optimales Wachstum besitzen, wurden dem Medium weitere Bestandteile zugefügt:

Penicillin / Streptomycin (200 µg/ml; Sigma), nicht–essentielle Aminosäuren (1x, Sigma), Insulin (9 µg/ml), Oxalacetat (1 Mm, Sigma) und Pyruvat (1Mm, Sigma). Insulin wurde vor Zugabe in 5 Teilen Puck A–Puffer und 6 Teilen Puck B–Puffer gelöst. Mittels Ultrafiltration (Gambro U 2000 Ultrafilter) wurde dem Medium LPS entzogen und das Medium sterilfiltriert.

Als Medium für die **Monozytenpräparation** wurde RPMI – Medium verwendet, dem 2 % Penicillin / Streptomycin beigelegt sind (= Monozyten – Medium A): Um die humanen **Monozyten in Kultur** zu halten, wurde dieses Medium mit autologem Serum im Verhältnis 20 : 80 supplementiert (= Monozyten – Medium B).

Für die **Stammzell-Differenzierung** wurde im Stadium des Wachstums Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM-ES) verwendet, dem 15 % FCS, Monothioglycerol $1,5 \times 10^{-4}$ M und LIF (Leukämie inhibierender Faktor, Maus rekombinant) 10 ng/ml beigelegt wurden. Während der Bildung embryonaler Körper wurden die Zellen mit Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) in Kultur gehalten, das ebenfalls durch 15 % FCS und Monothioglycerol in den oben genannten Konzentrationen ergänzt wurde, jedoch kein LIF enthielt. Gewaschen wurden die Zellen mit IMDM-FCS (5%). Zur Einleitung der Differenzierung aus den embryonalen Körpern in Makrophagen diente Makrophagen-Medium I (IMDM+ Monothioglycerol $1,5 \times 10^{-4}$ M = 80 %; FCS 10 %, L929 conditioned Medium 10% und Interleukin-3 1 ng/ml Maus rekombinant). Zur Erhaltung und Proliferation der Makrophagen wurde Makrophagen-Medium II eingesetzt, welches kein IL-3 besitzt, ansonsten aber identisch ist mit Makrophagen-Medium I.

V Methode

1. Zellkultur

1.1 Zellen und Passage

Bei der **THP-1 Zelllinie** handelt es sich um Tumorzellen, die Monoblasten in einer frühen Entwicklungsstufe der monozytären Differenzierung repräsentieren. Die **Mono Mac (Monozyten / Makrophagen) 6 Zellen** wurden erstmals von Dr. Ziegler-Heitbrock aus einem Patienten mit Leukämie (1988) isoliert und als Modell für reife Blutmonozyten etabliert. Die innerhalb der Zelllinie vorkommende Heterogenität bezüglich des Differenzierungsgrades geht einher mit einer unterschiedlich starken Expression noch nicht identifizierter Scavenger-Rezeptoren in verschiedenen Subkulturen und somit in der Fähigkeit, atherogenes LDL aufzunehmen (Scheithe et al. 1994). Demnach werden die Zellen eingeteilt in Mono Mac 6 mit und ohne Scavenger-Rezeptoren.

THP1- und Mono Mac 6 Zellen wurden im Abstand von 3 bis 4 Tagen passagiert. Dabei wurde die Hälfte des Mediumüberstandes entfernt, die Zellen im restlichen Medium resuspendiert, gezählt und mit frischem Medium (siehe IV.3.6) auf 0,2 Mio Zellen / ml eingestellt. Die Mono Mac 6 Zellen wuchsen in 24-well-Plastikkulturplatten und die THP1 Zellen in 260 ml Kulturflaschen. Beide Zelllinien wurden in einem Inkubator bei 37°C, 90 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂ kultiviert.

PPAR γ -/- Stammzellen (Klon AC5) stammen aus der inneren Schicht einer Blastozyste von weiblichen PPAR γ +/- (heterozygot) Mäusen, die zuvor mit männlichen PPAR γ +/- gekreuzt wurden. Die Zellen wurden 4 Tage nach der Befruchtung aus dem Uterus der Mäuse entnommen. Als Kontrolle wurden ebenfalls **PPAR γ +/+ (Klon J1)** isoliert. Die Gewinnung der Stammzellen erfolgte am Howard Hughes Medical Institute in Kalifornien, USA. Die aus den Stammzellen differenzierten Makrophagen (siehe V.1.2) wurden in Makrophagen Medium II kultiviert und alle 2-3 Tage passagiert. Um die Adhärenz der reifen Makrophagen zu lösen, wurden die Zellen vor Passage mit 1,5 ml Trypsin 3 min behandelt und dann 3,5 ml IMDN-FCS zugefügt, um das für die Zellen toxische Trypsin zu neutralisieren. Die Makrophagen wurden mit Makrophagen Medium II auf 1×10^6 /ml eingestellt²⁴.

1.2 Differenzierung von Makrophagen aus embryonalen Stammzellen

Die embryonalen Stammzellen wurden nach der Methode von M. Evans²⁴ differenziert.

Wachstum und Erhaltung der Stammzellen:

Die Stammzellen wuchsen auf einer Schicht embryonaler Mäusefibroblasten (sog. Fütterzellen) in DMEM-ES Medium, das 10 ng/ml rekomb. LIF (= Leukämie inhibierender Faktor) enthält, um eine vorzeitige Differenzierung zu verhindern. Die Stammzellen wurden alle 2 Tage passagiert. Um Zellaggregate zu lösen, wurden die Zellen zuvor mit Trypsin behandelt. Dies war wichtig, da starke Zellvernetzungen eine vorzeitige spontane Differenzierung zur Folge haben können.

Präparierung der Stammzellen für die in vitro Differenzierung:

Vor Beginn der Differenzierung wurden die Stammzellen (SZ) von den Fibroblasten getrennt, da diese die Bildung embryonaler Körper beeinflussen. Dazu wurden beide Zellarten trypsinisiert, zentrifugiert und mit DMEM-ES Medium auf eine Konzentration von 1×10^6 /ml eingestellt und anschließend auf 6-well Kulturplatten aufgeteilt. Während der Inkubation bei 37° C für 2 h adhärten die Fibroblasten an der Kulturplatte. Die nicht-adhären Zellen wurden in eine mit Gelatine-Lsg. bestrichene Kulturplatte übertragen. In diesem Stadium konnten bei Fehlen von Fütterzellen SZ-Populationen eingefroren werden. Weder SZ noch die Fütterzellen sollten länger als 2-3 Wochen in Kultur gehalten werden.

Gewinnung embryonaler Körper:

Ein bis zwei Tage vor der Entstehung embryonaler Körper wurden die SZ mit IMDM-ES (IMDM-Medium plus 10 ng/ml LIF) Medium kultiviert und nach 2 Tagen mit IMDM-FCS gewaschen. Um embryonale Körper zu erhalten, müssen die SZ in Abwesenheit von LIF kultiviert werden und unter Bedingungen, die keine Anheftung an die Kulturschale erlauben. Zu diesem Zweck wurde IMDM-Medium 0,9 % Methylzellulose zugesetzt. Nach 7 Tagen erfolgte eine Dissoziation der embryonalen Körper (EK) durch Trypsin.

Differenzierung in Makrophagen:

Die EK wurden durch Zentrifugation gesammelt, einmal mit IMDM-FCS gewaschen und mit Makrophagen Medium I auf 1×10^6 /ml eingestellt und 48 h inkubiert. Diesem Medium war IL-3 (1ng/ml) zugesetzt, ein hämatopoetisches Zytokin, das die Differenzierung zu Makrophagen induziert. Das enthaltene L929-Zell-Medium (10%) diene als Quelle von M-CSF zur Proliferation der Makrophagen (zuvor Wachstum von L929 Zellen, die M-CSF überexprimierten). Makrophagen-Vorläuferzellen erscheinen als nicht-adhärenente Zellen und konnten mittels Zentrifugierung gesammelt werden. Die Zellen wurden in Makrophagen Medium II resuspendiert und kultiviert. Innerhalb von 2 bis 3 Tagen wachsen sie und adhäreren an der Oberfläche. Sie wurden dann wie unter V.1.1 beschrieben in Kultur gehalten.

1.3 Isolierung und Kultivierung humaner Blutmonozyten

Es wurden 5 ml Natrium-Citrat und 5 ml 5 %ige Dextranlösung in eine Perfusorspritze steril aufgezogen und zur Blutentnahme (50 ml) vorgelegt. Die Spritze wurde für ca. 30 min bei Raumtemperatur senkrecht auf ihren Stempel aufgestellt damit sich die Erythrozyten und Thrombozyten absetzen konnten, während die mononukleären Zellen im Plasma gelöst blieben. Die folgenden Schritte wurden auf Eis und unter sterilen Bedingungen durchgeführt. 15 ml eiskalte Ficoll Lösung (Dichte 1,077) wurden mit dem Plasma überschichtet und 20 min bei 4 °C und 2000 U/min ohne Abbremsen zentrifugiert. Die PBMCs trennten sich als weiße Schicht zwischen Plasma und Erythrozyten, wurden mit einer 15 ml Pipette entnommen und in 45 ml Monozyten-Medium A (siehe IV.3.6), dem 5 mM EDTA beigefügt sind, aufgenommen. Nach Zentrifugierung (1500 U/min, 10 min, 4°C, Bremse = 9) und Entfernung des Überstandes wurde die Zellen nochmals in 45 ml Monozyten-Medium A + 5 mM EDTA resuspendiert und gezählt.

Anschließend erfolgte die Trennung der Monozyten von den anderen weißen Blutzellen mit Hilfe von Anti-CD14 Antikörpern, die mit Magneteilchen gekoppelt sind (Miltenyi Biotech):

Dazu wurden ca. 50 Mio Zellen mit 400 µl PBS und 100µl der CD14-Magnetkugelchen-Lösung vermischt und für 15 min bei 6 - 12°C inkubiert. Die Antikörper binden an die für Monozyten spezifischen CD14 Oberflächenantigene und markieren diese, sodass die Zellen mit Hilfe einer MiniMACS Trennungssäule isoliert werden konnten. Dazu wurde die Säule an einem Magneten befestigt, welcher die mit den Magneteilchen gebundenen Zellen magnetisch fixierte.

Die Zellsuspension wurde auf die Säule aufgetragen und die nicht markierten Zellen durch dreimaliges Spülen mit je 500µl PBS + 5mM EDTA + 0.5 % BSA ausgespült. Die Säule wurde von dem Magneten entfernt und die gebundenen Monozyten mit einem Plunger aus der Säule freigesetzt und in 1 ml PBS aufgefangen. 4 ml Monozyten Medium A wurden hinzugefügt, die Zellen gezählt, abzentrifugiert und auf 0.5 Mio/ml mit Monozyten Medium B eingestellt.

Für Mikroskopie-Versuche wurden die Monozyten auf Deckgläschen (je 200µl) in 8 Well-Kulturplatten aufgetragen und 2 Stunden im Brutschrank inkubiert, um die Monozyten adhären zu lassen. Die Wells wurden dann mit 2 ml Monozyten-Medium B aufgefüllt.

Für Durchflußzytometrie Versuche wurden die Zellen direkt auf 8 Well Platten aufgetragen und bei Versuchsbeginn mit einem Zellschaber abgetragen.

1.4 Herstellung des autologen Serums

Während der Monozyten Isolierung wurde auf folgendem Weg autologes Serum hergestellt: Es wurde Blut in Serumröhrchen abgenommen und dieses bei Raumtemperatur 30-40 min. belassen. Anschließend wurde das Serum bei 2500 U/min, 4°C, 20 min abzentrifugiert, aufgenommen nochmals zentrifugiert und direkt ins Medium A im Verhältnis 1 : 4 sterilfiltriert.

2. Isolierung von Lipoproteinen

Lipoproteine wurden mit zwei verschiedenen Methoden gewonnen. Die Methode nach *Sattler* hat den Vorteil, dass das LDL *schnell* und damit *oft* isoliert werden kann. Deshalb wurde nach diesem Prinzip das LDL präpariert, welches anschließend enzymatisch modifiziert wurde. Die Methode nach *Havel* erbringt eine weit *höhere Proteinkonzentration* pro ml LDL, welche dieses resistenter gegen Autooxidierung und damit länger verwendbar macht, bei ebenfalls sehr viel *mehr Volumenausbeute*. Ein Teil dieses LDLs wurde deshalb als natives zurückbehalten und der andere Teil für die Oxidierung mit CuCl₂ herangezogen.

2.1 Methodik nach Sattler:

Das LDL stammte von gesunden, nüchternen Spendern. Dabei wurde Blut entnommen und als Antikoagulanzen Heparin zugefügt (2 ml/50 ml Blut). Mittels Zentrifugation bei 4°C, 2000 U/min für 30 min wurde das Plasma isoliert und mit Kalium-Bromid auf eine Dichte von 0,5 mg KBr/ml Plasma eingestellt. Die Auftrennung der Lipoproteine erfolgte durch Ultrazentrifugation in einer Beckmann Ultrazentrifuge (Rotor: TLA-100.4) für 2 h bei 100.000 U/min und 15°C. Als Vorbereitung wurden 3.3 ml PBS in jeweils ein Optiseal Zentrifugationsröhrchen überführt und dann vorsichtig 1,7 ml des Plasmas hinzugefügt, so dass unten die Plasmaschicht und sich darüber das PBS befand.

Die LDL Fraktion stellte sich nach Zentrifugation als orange-gelbe Bande in der Mitte zwischen VLDL und HDL dar und wurde mit einer 2 ml Spritze aspiriert. Die Überführung des LDLs in ein Falcon Reaktionsröhrchen wurde mit Vorsicht durchgeführt, um die Lipoproteine vor mechanischer Schädigung zu schützen. Mit Hilfe von PD-10 Filtersäulen (Pharmacia) wurde anschließend dem LDL das Kalium-Bromid entzogen. Dabei wurden je Säule 2.5 ml LDL gereinigt und mit 3.5 ml PBS ausgespült und aufgefangen.

Die Proteinkonzentration wurde nach dem Lowry-Verfahren ermittelt und in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 660 nm gemessen. Das LDL wurde anschließend sterifiltriert und bis zur Behandlung bei 4°C kühl gehalten.

2.2 Methodik nach Havel:

Humanblut wurde mit 1 mg/ml EDTA versetzt und bei 2700 U/min, 4°C für 30 min zentrifugiert. Das Plasma wurde gesammelt und zur Stabilisierung der Präparation wurden NaN₃ (0,05 %), Gentamycin (0,008 %), Thiomersal (0,01 %) und Pefabloc (1 mM) zugefügt. Durch Zugabe einer NaBr-Lösung (Dichte: 1,386 g/ml) und H₂O Cocktail (siehe IV.3.1) wurde die Plasmadichte auf 1,019 g/ml eingestellt. Pro Zentrifugenröhrchen wurden 22 ml von dem Plasma überführt und dieses mit 11 ml der NaBr-Lösung (1,019 g/ml) überschichtet. Die Röhrchen wurden mit einem LötKolben verschlossen und 20 h in einer Beckman Ultrazentrifuge (Rotor: Ti 50.2) zentrifugiert (20°C, 100.000 g). Das VLDL, welches oben flottierte, wurde mit einem Schneidegerät entfernt. Die Lipoproteine HDL und LDL befanden sich in der unteren Schicht und wurden vorsichtig gemischt. Die Plasmalipoproteinmischung wurde mit NaBr-Lösung (Dichte 1,386 g/ml) und H₂O Cocktail auf eine Dichte von 1,063 g/ml eingestellt und nach Überschichtung mit NaBr-Lösung (1,063 g/ml) erneut für 22 h, bei 4° C

und 40.000 U/min zentrifugiert. Das LDL, welches sich jetzt oberhalb der NaBr-Schicht befand, wurde gesammelt und zur Aufreinigung wiederum mit NaBr-Lösung (1,063 g/ml) versetzt und nach dem gleichen Schema zentrifugiert. Die so gewonnene LDL Fraktion wurde in einen Dialyseschlauch dreimal gegen mit 5 Liter Stickstoff gesättigten Dialysepuffer (IV.3.1) bei 4°C über 24 h dialysiert. Auf diese Weise wurde die Salzkonzentration auf einen physiologischen Wert eingestellt. Die Proteinkonzentration wurde nach dem Lowry-Verfahren ermittelt, das LDL sterilfiltriert und bei 4° C aufbewahrt.

3. Lipoprotein-Modifizierung

3.1 enzymatische Modifizierung

Entsprechend der Proteinkonzentration wurden die Enzyme Lipoxidase Typ V, isoliert aus der Soyabohne (Sigma, Aktivität 1000.000 Units / mg Protein) bzw. aus Kaninchen Retikulozyten und sekretorische Phospholipase A₂ aus Meerschweinchen-Pankreas (Sigma, Aktivität 16000 Units / mg Protein) bzw. human-rekombinante sPhospholipase A₂ hinzugefügt. Dazu wurde die Lipoxidase auf eine Endkonzentration von 0,15 mg/ml LDL (LDL-Konzentration: 3,6 mg/ml) und die Phospholipase auf eine Konzentration 63 µg/ml LDL eingestellt. Das LDL wurde in einem 15 ml Falcon Reagenzröhrchen 12 h bei 37°C inkubiert. Die Reisolierung wurde nach dem oben angeführten Verfahren von Sattler et al durchgeführt.

3.2 Oxidierung mit CuCl₂

Zur Entfernung des in der Lipoprotein-Präparation vorhandenen EDTAs (Methode nach Havel) wurden PD-10 Filtersäulen verwendet, die zuvor mit 25 ml EDTA-freiem PBS Puffer (IV.3.1) gewaschen wurden. Pro Säule wurden dann 2,5 ml LDL aufgetragen, das anschließend mit 3,5 ml EDTA-freiem PBS aus der Säule entfernt und aufgefangen wurde.

Das EDTA - freie LDL wurde mit Sauerstoff angereichertem PBS auf eine Konzentration von 0,2 mg/ml eingestellt und mit 5 µM CuCl₂ 3 bzw. 20 h im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Oxidierung durch einen Überschuß an EDTA (Endkonzentration = 0,24 mM) gestoppt. Das oxidierte LDL wurde mit Dialysepuffer durch Membranfiltration mittels Centriflo Kegel dreimal gewaschen und aufkonzentriert (1000g, 4°C, 20 min). Nach der Proteinbestimmung wurde das LDL sterilfiltriert und bei 4°C aufbewahrt.

4. Markierung von LDL mit DiI (1,1 Dioctadecyl-3,3,3,3-tetramethylindocarbocyanine perchlorate)

Das LDL wurde mit PBS auf eine Konzentration von 1,5 mg Protein / ml mit einem Gesamtvolumen von 2 ml verdünnt und mit 6 ml Lipoprotein-defizientem Serum (LPDS) gemischt. Als Oxidationsschutz wurden 12 µl einer 100mM Ascorbinsäure – Lösung und 8µl 10 mM EDTA (beide in a.q.) zugefügt. Das Gemisch wurde sterilfiltriert und 150 µl DiI Lösung (Stammlösung: 6 mg/ml) dazugegeben. Um eine Autooxidierung durch Sauerstoff zu minimieren, wurde die Mischung mit Stickstoff beschichtet und lichtgeschützt für 8 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das markierte LDL nach der Sattler-Methode (V.2.1) reisolliert, aufkonzentriert und sterilfiltriert. Nach Bestimmung des Proteingehaltes wurde es unter Lichtabschirmung und bei 4°C aufbewahrt.

5. Lipoprotein-Agarose-Gel-Elektrophorese

Das Ausmaß der LDL–Oxidierung wurde mittels Agarose–Gel–Elektrophorese (Helena Laboratories) bestimmt. Theoretisch gesehen beruht die Methode auf der Tatsache, dass bei Oxidierung des LDLs mehrfach ungesättigte Fettsäuren durch Peroxidation gespalten werden, sodass Aldehyde entstehen, die kovalent an positiv geladene freie Aminogruppen z.B. von Lysin des Apoproteins B binden, wodurch die Elektronegativität der LDL-Partikel zunimmt. Dies äußert sich in einer erhöhten elektrophoretischen Mobilität ¹⁵¹.

Auf ein TITAN Lipoprotein-Gel wurden je 2 µl der verschiedenen Lipoproteine mit Hilfe einer Schablone aufgetragen. Um eine Diffusion in das Agarosegel zu gewährleisten, wurde nach dem Auftragen der letzten Probe 7 Minuten gewartet und dann das Gel in die Trennkammer gelegt, die zuvor mit 30 ml Titan Barbitol-Puffer (IV.3.1) aufgefüllt wurde. Bei 80 Volt wanderten die Proteine je nach Grad der Oxidierung für 45 min im elektrischen Feld. Nach Trocknen des Gels bei 60°C wurden die Banden mit einer Färbelösung bestehend aus 25 ml Lipoproteinfarbstoff (IV.3.1) und 5 ml dest. Wasser (für jedes Gel frisch hergestellt) 2 min gefärbt und dann mit 70 %igem Methanol die überschüssige Farbe ausgewaschen.

Die Mobilität der Proben wurde mit frischem Plasma verglichen. Je stärker die Lipoproteine oxidiert waren, desto höher war die elektrische Mobilität.

6. Analyse von Oberflächenrezeptoren

6.1 FACS-Analyse der CD36 Expression

Bei dieser Versuchsdurchführung ist es wichtig, die Zellen stets bei 4°C zu behandeln, um eine Internalisierung des Oberflächenrezeptors zu vermeiden.

Pro Zellbehandlung wurden ca. 1 Mio Zellen in den Versuch aufgenommen. Zunächst wurde das alte Medium abzentrifugiert (800 U/min, 5 min, 4°C) und die Zellen einmal mit 1 ml 0,5 % BSA (Sigma) in HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution, IV.3.1) gewaschen. Um unspezifische Bindungen an die Fc-Rezeptoren zu unterdrücken, wurden die Zellen anschließend mit 500 µl 5 % Humanserum (Sigma) in HBSS für 30 min inkubiert. Dieses wurde dann abzentrifugiert, die Zellen in 400 µl HBSS+ 0,5 % BSA aufgenommen und auf 96 Well-Platten mit je 200 µl = 0,5 Mio Zellen / Well übertragen. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert (1200 U/min, 5 min, 4°C) und als primäres monoklonales Maus-IgG der FA6-152 Klon (Immuno-tech) gegen humanes CD36 (Endkonzentration von 2,5 µg/ml, in HBSS + 0,5 % BSA) aufgetragen: Der unspezifische Isotyp Maus-IgG MOPC-21 (Sigma; Endkonz. 2,5µg/ml) wurde ebenfalls gelöst in HBSS + 0,5 % BSA und die Zellen 30 min bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit HBSS + 0,5 % BSA gewaschen. Zur Quantifizierung der Bindung des primären Antikörpers, wurden die Zellen mit FITC-markiertem Ziege Anti-Maus-Antikörper (Dako; Endkonzentration: 2,0 µg/ml) im Dunkeln bei 4°C für 30 min inkubiert, erneut zweimal gewaschen und in 200 - 400 µl 2 % PFA (Paraformaldehyd) in PBS fixiert. Die Fluoreszenz von je 10.000 Zellen wurde im Durchflußzytometer gemessen und dabei tote Zellen sowie Zellfragmente durch Life – gating im Forward/Sidewayscluster nach Granularität und Größe ausgegrenzt.

6.2 CD14 Expression

Die CD14 Expression auf den stimulierten Zellen wurde nach drei Tagen Inkubierung gemessen. Die Vorgehensweise entspricht der von CD36.

Als Antikörper wurden benutzt:

Primärantikörper: monoklonales anti-CD14 IgG = My 4 (Coulter Clone); Isotyp = Ms IgG 2b (Coulter Clone); beide in einer Konzentration von 1 µg/ml.

Die Antikörper sind direkt FITC markiert, sodass die Inkubierung mit dem zweiten Antikörper wie oben angeführt, entfiel.

6.3 Analyse der CD36 Expression mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie

Die Vorgehensweise entspricht weitestgehend der Analyse der PPAR γ Translokation (siehe V.7.2). Die Versuche wurden jedoch auf Eis durchgeführt und die Zellyse mit Methanol-Aceton entfiel. Als primärer Antikörper gegen CD36 auf Mauszellen diente Kaninchen anti-Maus IgG (H-300; Santa Cruz), gefolgt von FITC- markiertem IgG (Dako).

7. Messung der PPAR γ Expression

7.1 FACS-Analyse der Gesamtexpression

Sämtliche Schritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Es wurden 1 Mio. Zellen in Falcon Röhrchen übertragen, das Medium abzentrifugiert (800 U/min, 20°C, 5 min) und die Zellsuspension einmal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine Fixierung der Zellen mit 1 ml 2 % PFA (Paraformaldehyd) für 30 min. Die Zellsuspension wurde dann zweimal mit PBS gewaschen und die Membranen mit 1 ml von eiskaltem Aceton / Methanol (1:1) für 2 min permeabilisiert, um eine Diffusion der Antikörper in das Zellinnere zu gewährleisten. Nach gründlichem Waschen erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungen des primären AK mit 10 % Humanserum (Sigma) in PBS. Der Versuch wurde anschließend entsprechend den unter V.6.1 ausführlich erläuterten Schritten fortgeführt. Primäre Antikörper sind polyklonaler Maus anti-PPAR γ IgG (E-8; Santa Cruz) bzw der Isotyp Maus IgG₁ (MOPC-21; Sigma). Beide Antikörper wurden mit 1,5 % Humanserum in PBS auf eine Konzentration von 0,2 μ g/ml eingestellt und die Zellen 30 min inkubiert. Als zweiter Antikörper ist hierbei ebenfalls FITC-markierter Ziege anti-Maus Antikörper (siehe V.6.1) verwendet worden.

Die Expression wurde wie bei den anderen Rezeptoren mittels Durchflußzytometrie analysiert.

7.2 Nachweis der PPAR γ -Translokation mittels Fluoreszenzmikroskopie

Die Zellen wurden mit PBS auf 2 Mio/ml eingestellt. Es wurden je 100 μ l Zellsuspension pro Behandlung auf Objektgläser zentrifugiert (3 min, 300 U/min) und das Pellet mit einem wasserabweisenden Fettstift umrandet. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 15 min mit 2 % PFA in PBS fixiert. Die Permeabilisierung erfolgte ebenfalls mit Methanol / Aceton (1:1) für 2 min, das durch Waschen mit PBS entfernt wurde. Die unspezifischen Bindungen wurden mit 5 % Humanserum in PBS für 30 min blockiert. Die verwendeten Antikörper und deren Verdünnung entsprechen der FACS – Messung (V.7.1). Es wurden

je 100 µl Antikörperverdünnung zu den Zellpellets gegeben und diese für 1 h inkubiert. Überschüssiger Antikörper wurde durch zweimaliges Waschen entfernt und die Fc-Rezeptoren erneut 10 min mit 5 % Humanserum in PBS blockiert. Die Inkubation des zweiten Antikörpers erfolgte für 45 min. Zuletzt wurde die Zellen 10 min mit 4 % PFA in PBS nachfixiert und an der Luft angetrocknet. Als Einbettmedium diente Moviol. Die Zellen wurden dann unter einem Fluoreszenzmikroskop (Leica) betrachtet und fotografiert (Software SPOT32).

7.3 Untersuchung der PPAR γ -Expression mittels Western-Blotting

7.3.1 Extraktion der Kernproteine

Um die Expression von PPAR γ im Kern getrennt vom Zytoplasma zu analysieren, müssen zunächst die Kerne aus den Zellen isoliert werden. Die Kernextraktion wurde nach der Methode von Alksnis durchgeführt, die 10 Mio. Zellen pro Behandlung erforderte. Zunächst wurden die Zellen bei 4°C zentrifugiert, einmal mit 1 ml PBS gewaschen (2000g, 1min, 4°C) und in 100 µl einer hypotonen Pufferlösung (IV.3.3) resuspendiert, um die Membranen durch den ansteigenden intrazellulären Druck zu destabilisieren. Nach Zentrifugation (5000 g, 1 min, 4°C), wurde durch Suspendierung in 300 µl Lyse-Puffer (IV.3.3) für 10 min eine Zellyse erreicht und durch erneutes Zentrifugieren bei 8000 g für 1 min konnten die Kerne vom Zytosol, das sich im Überstand befand, getrennt werden. Die Zellkernpellets wurden anschließend einmal mit 1 ml eines Kalium-Chlorid-Puffers (20 mmol/L) (IV.3.3) gewaschen und dieser für 15 min belassen, damit das im Puffer befindliche Glycerol in die Pellets eindringen und diese auf die gleiche Dichte wie die des Puffers einstellen konnte. Die Suspension wurde zentrifugiert (s.o), die Kerne in 42 µl des 0,02 molaren KCL-Puffers resuspendiert und 39 µl eines 0,6 M KCl-Puffer zugefügt. Die Suspension wurde sofort mittels Vortexer gemischt und die Kerne durch 30 min Inkubation lysiert. Nach Zentrifugation bei 8000 g für 15 min befanden sich die Kernproteine im Überstand, welcher in ein vorgekühltes Mikrozentrifugenröhrchen überführt und mit 300 mmol/L KCl 40fach verdünnt wurde. Die Proteinkonzentration wurde durch Spektrophotometrie ermittelt.

7.3.2 Western Blotting

Die Western Blot Analysen wurden nach Standardprotokollen durchgeführt. Dazu wurden 1 Mio Zellen / ml Medium bzw. die Kernproteine einmal mit PBS gewaschen (Zentrifugation 5 min, 1200 rpm, Raumtemperatur) und 100 µl Proben-Puffer zugegeben (auf Eis). Die Proben einschließlich Standard wurden für 5 min auf 98° C erhitzt und auf Eis abgekühlt. Die Proben

wurden auf Polyacrylamidgele aufgetragen und die Proteine mit Hilfe eines Lauf-Puffers (IV.3.4) mittels Elektrophorese aufgeteilt (200 Volt, 60 min). Anschließend erfolgte der Elektro-Transfer der aufgeteilten Proteine auf Nitrozellulose Membranen. Dazu wurde das Gel aus der Kammer entfernt, vom Stacking-Gel getrennt und nach folgendem Prinzip in eine mit Transferpuffer (IV.3.4) gefüllte Schale überführt: Kathode - Schwamm – Filterpapier – Gel – Membran – Filterpapier – Schwamm - Anode. Der Transfer wurde auf einem Magnetrührer (100 V, 0,18-0,25 Amper, 1h) im Kühlschrank durchgeführt. Die Membran wurde entnommen und mit der Proteinseite nach oben in eine 10 cm Petrischale gelegt. Zum Blockieren unspezifischer Bindestellen wurden 10 ml Milch zugegeben, die Petrischale mit Folie abgedeckt und die Membran unter Schütteln 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran 5 min mit 15 ml TBS/Tween gewaschen. Die Antikörper wurden in 5 % BSA, 1 x TBS, 0,1 % Tween (alternativ zu BSA auch Milch verwendbar) gelöst (Verdünnung 1:1000). Verwendet wurden als prim. AK gegen PPAR γ E-8 (Santa Cruz) und gegen p65 Kaninchen IgG C-20 (Santa Cruz) beide in einer Konz. von 1,5 μ g/ml. Die Membranen wurden über Nacht bei 4° C inkubiert (unter Schütteln). Anschließend wurden die Membranen 3 x 5 min mit 15 ml TBS/Tween gewaschen. Als 2. Antikörper dienten horseradish-peroxidase (HRP)-konjugiertes Anti-mouse Ig (Amersham Bioscience) in derselben Verdünnung wie der 1. Antikörper und die Membranen wurden 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschen mit TBS/Tween (s.o) wurde die Membran mit 4 ml Expositionslösung (Super Signal® West Pico Chemiluminescent substrate, Pierce) für 2 min inkubiert. In einer Dunkelkammer wurde die Membran mit der Proteinseite nach unten auf Frischhaltefolie gegeben (dabei Luftblasen und Flüssigkeit entfernen) und mit der anderen Seite auf eine Entwicklerplatte geklebt. Nach Einlegen eines Filmes wurde die Membran 10 min exponiert, der Film 2 min im Entwicklerbad gebaded, mit Wasser gewaschen und 2 min fixiert. Zuletzt erneut mit Wasser gewaschen und getrocknet.

8. Apoptose Bestimmung

Der Nachweis apoptotischer Zellen beruht auf der Bindung von Annexin V an Phosphatidylserin, das während des Apoptoseprozesses von den Zellen externalisiert wird.

Das Medium der zu untersuchenden Zellen wurde abzentrifugiert (5 min, 100 U/min), die Zellen einmal mit 1 ml PBS gewaschen und 15 min mit Annexin-FITC-Antikörper (Becton Dickinson, 2 μ l / Behandlung) sowie Annexin Bindungspuffer (10x, Phar Mingen) bei 4°C im

Dunkeln inkubiert. Der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen wurde mittels Durchflußzytometrie ermittelt.

9. Analyse zur Aufnahme modifizierter Lipoproteine

Für den Versuch benötigte man 0,4 Mio. Zellen / 200µl pro Well. Dazu wurden die Zellen gezählt und die benötigte Menge in ein 15 ml Falcon Röhrchen überführt und abzentrifugiert. (800 U/min, 20°C, 5 min). Der Mediumüberstand wurde entfernt und die Zellen mit RPMI Medium + 0,5 % BSA (steril) gewaschen. Nach wiederholter Zentrifugation wurden die Zellen mit dem obengenannten Medium auf 2 Mio / ml eingestellt und von der Suspension je 200µl / Well (0,2 Mio.) in eine 96-Well-Platte übertragen. Um zu gewährleisten, dass alle Zellen mit der Behandlung in Kontakt kommen, wurden Well-Platten mit flachem Boden verwendet. Zunächst wurden die spezifischen Bindungsstellen auf den Zellen durch einen 50fachen Überschuß (500 µg/ml) an entsprechend unmarkiertem LDL blockiert (Ausnahme: Kontrollansatz und Zellen, die dem Nachweis der Gesamtaufnahme dienen). Nach 15 min Inkubation folgte die Zugabe der markierten Lipoproteine (10 µg/ml) für 2 h bei 37°C im Inkubator. Nach dieser Zeit wurden die Zellen in 96-Well-Platten mit rundem Boden übertragen, abzentrifugiert (1200 U/min., 20 °C, 5 min) und viermal mit PBS + 0,5 % BSA gewaschen. Nach Fixierung mit 400 µl 0,2 % PFA in PBS und Überführung in FACS-Röhrchen erfolgte die Messung am Durchflußzytometer.

10. Elektrophoresis-mobility gel-shift-assay

Das Verfahren beruht auf dem Prinzip, dass proteingebundene DNA langsamer im elektrischen Feld wandert als freie DNA. Pro Behandlung wurden von 2×10^7 Zellen in dem unter V.7.3.1 beschriebenen Verfahren die Kernproteine isoliert und in diesen mittels EMSA die Bindung von PPAR γ an PPREs des CD36 Gens analysiert. Die Versuche wurden am Institut für Molekulargenetik in Prag durchgeführt. Die Oligonukleotide beinhalteten die PPRE-Sequenz AG GTC AAA GGT CA (Santa Cruz) und wurden mit radioaktiv-markiertem ^{32}P -ATP (Amersham International) gekoppelt. Das Verfahren wurde wie beschrieben ⁷⁹ durchgeführt. Dazu wurden 10 µl der Kernproteine 20 min mit den radioaktiven Oligonucleotiden bei Raumtemperatur inkubiert. Auf einem Polyacrylamid-Gel wurden die Kern-Proteine bei 150 V, 2 h, bei 4 °C aufgetrennt und das an PPRE gebundenen PPAR γ stellte sich durch radioktive Strahlung dar.

VI Ergebnisse

1. Die enzymatische Behandlung von LDL mit 15-Lipoxidase und sekretorischer Phospholipase A₂ führt über Entstehung spezifischer Oxidierungsprodukte zu minimal modifizierten Lipoproteinen

1.1 sPLA₂ und 15-Lipoxidase führen zur Bildung von 13s-HODEs in LDL

LDL wurde 12 h inkubiert mit sPLA₂ und 15-LOX zusammen bzw. jeweils getrennt sowie mit Kupferchlorid für 3 h bzw. 20 h wie in der Methodik beschrieben. Kontrolle und modifiziertes LDL wurden mittels HPLC auf das Vorhandensein von HODEs und HETEs analysiert. Zur Erfassung des freien und veresterten Anteils an Fettsäuren wurden die Proben geteilt und die Fettsäuren vor Hydrolyse (Erfassung der freien Fettsäuren = FS) bzw. nach Hydrolyse der Lipoproteine (freie und veresterte HODEs = Gesamtkonzentration) extrahiert. Die freien Fettsäuren im enz.LDL wurden anschließend durch Sequenz-Chromatographie auf die verschiedenen Isomere hin untersucht. (Die Analyse erfolgte im Institut für Biochemie an der Humboldt - Universität Berlin unter Leitung von Prof. Kühn). Die Ergebnisse sind in folgenden Tabellen und Graphiken zusammengefasst.

LDL-Behandlung	HODE + HETE (µg/mg)	
	nach Hydrolyse	vor Hydrolyse
Natives LDL	0,9 ± 0,9	unter der Nachweisgrenze
LDL + Cu (3h)	11,9 ± 3,1 ?	unter der Nachweisgrenze
LDL + Cu (20h)	2,3 ± 0,5	unter der Nachweisgrenze
LDL + 15-LOX	13,3 ± 0,7 ?	unter der Nachweisgrenze
LDL + sPLA ₂	2,1 ± 0,9	unter der Nachweisgrenze
LDL + sPLA ₂ + 15-LOX	7,8 ± 1,8	1,9 ± 0,7 (siehe Tab. VI.2)

Tab. VI.1.: Bildung von freien Hydroxyfettsäuren bei unterschiedlichen LDL-Modifizierungen (n = 5). Kontrolle und modifiziertes LDL wurden mittels HPLC auf das Vorhandensein von HODEs und HETEs analysiert. Zur Erfassung des freien und veresterten Anteils an Fettsäuren wurden die Proben geteilt und die Fettsäuren vor Hydrolyse (Erfassung der freien Fettsäuren = FS) bzw. nach Hydrolyse der Lipoproteine (freie und veresterte HODEs = Gesamtkonzentration) extrahiert.

Produkt	Anteil der Gesamtmenge in %
12-HETE	1,6 ± 1,1
15-HETE	3,4 ± 1,4
5-HETE	0,3 ± 0,3
13-HODE (Z,E)	51,0 ± 7,2 (1:9)
13-HODE (E,E)	8,8 ± 3,6
9-HODE (E,Z)	17,1 ± 1,1 (1:5)
9-HODE (E,E)	6,9 ± 5,1

Tab. VI.2: Isomerenbildung der OH-Fettsäuren bei Behandlung mit sPLA2 und 15-LOX (n = 3). Die Werte in Klammern geben das R / S Verhältnis an.

1.2 Enzymatisch modifiziertes LDL als Vertreter minimal modifizierter Lipoproteine

Der Oxidierungsgrad der Lipoproteine wurde mit Hilfe von Agarosegel-Elektrophorese durch Bestimmung der relativen elektrophoretischen Mobilität (REM) bestimmt.

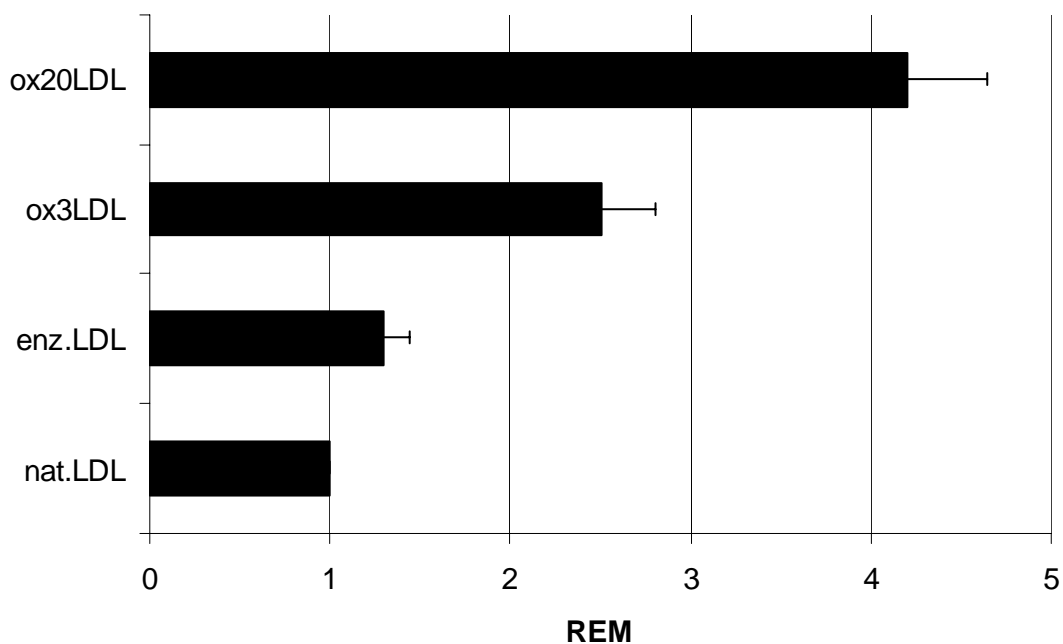


Abb. VI.1.: Relative elektrische Mobilität modifizierter Lipoproteine als Quantifizierung des Oxidierungsgrades. Die Lipoproteine wurden auf ein Agarose-Gel aufgetragen und wanderten je nach Grad der Oxidierung unterschiedlich im elektrischen Feld (n = 5).

Ergebnis:

Der Literatur nach führt die Behandlung von LDL mit Lipase zu einer Hydrolyse von Esterbindungen und damit zur Freisetzung vielfach ungesättigter Fettsäuren, welche ein bevorzugtes Substrat der 15-Lipoxidase darstellen und zwar in nicht-veresterter Form stärker als an Cholesterin gebunden ¹¹³.

In der Versuchsreihe konnte gezeigt werden, dass nur die kombinierte Behandlung mit sPLA₂ und 15-LOX zur Entstehung *freier* HODEs / HETEs führte. Dabei unerwartet war der hohe Anteil veresterter HODEs / HETEs in ox₃LDL und 15-LOX LDL.

Die Untersuchung der Stereo- und Strukturisomere dieser freien Fettsäuren ergab als Hauptprodukt 13-HODE = 13-Hydroxyoctadeca-9Z,11E-dienoicacid (Strukturformel siehe Abb. VII.1) (Z,E = Zis-, Trans-Stellung der Doppelbindung) mit einer S / R Konfiguration im Verhältnis 9:1. Dies deutet auf eine Reaktionsspezifität und somit auf einen enzymatisch bedingten Vorgang hin. Diese Daten in Kombination mit der geringen elektrophoretischen Mobilität des enzymatisch modifizierten LDLs demonstrieren einen schwachen Oxidierungsgrad bei gleichzeitig hoher Spezifität der Oxidierung im Gegensatz zur unspezifischen Oxidierung durch Kupfer.

2. Einfluß enzymatisch modifizierten LDLs auf die CD36 Expression in Abhängigkeit von der basalen CD36 Expression

2.1 Enzymatisch modifiziertes LDL stimuliert die Hochregulation von CD36 in Mono Mac 6 Zellen (MM6)

a) Es wurde gezeigt, dass oxidiertes LDL über Hochregulierung von CD36, seine eigene Aufnahme induzieren kann und dass dafür HODEs verantwortlich sind. Da unserer Theorie nach durch kombinierte enzymatische Behandlung ebenfalls HODEs freigesetzt werden und zwar im höheren Maße als durch Kupfer, müsste es in den enz.LDL-stimulierten Zellen zu einer starken CD36-Expression kommen.

MM6 Zellen ohne und mit Scavenger-Rezeptoren (MM6/MM6sr) wurden ein bis drei Tage mit **nativem (=nat.LDL)**, **enzymatisch- (sPLA₂ + 15-LOX = enz.LDL)** und **Kupfer-oxidiertem LDL (3h, 20h = ox₃ bzw. 20LDL)**, jeweils 50 µg/ml entsprechend ¹⁰⁹, stimuliert und die CD36 Expression per Durchflußzytometrie gemessen.

Anmerkung: **Kontrolle** bedeutet Autofluoreszenz der unbehandelten Zellen.

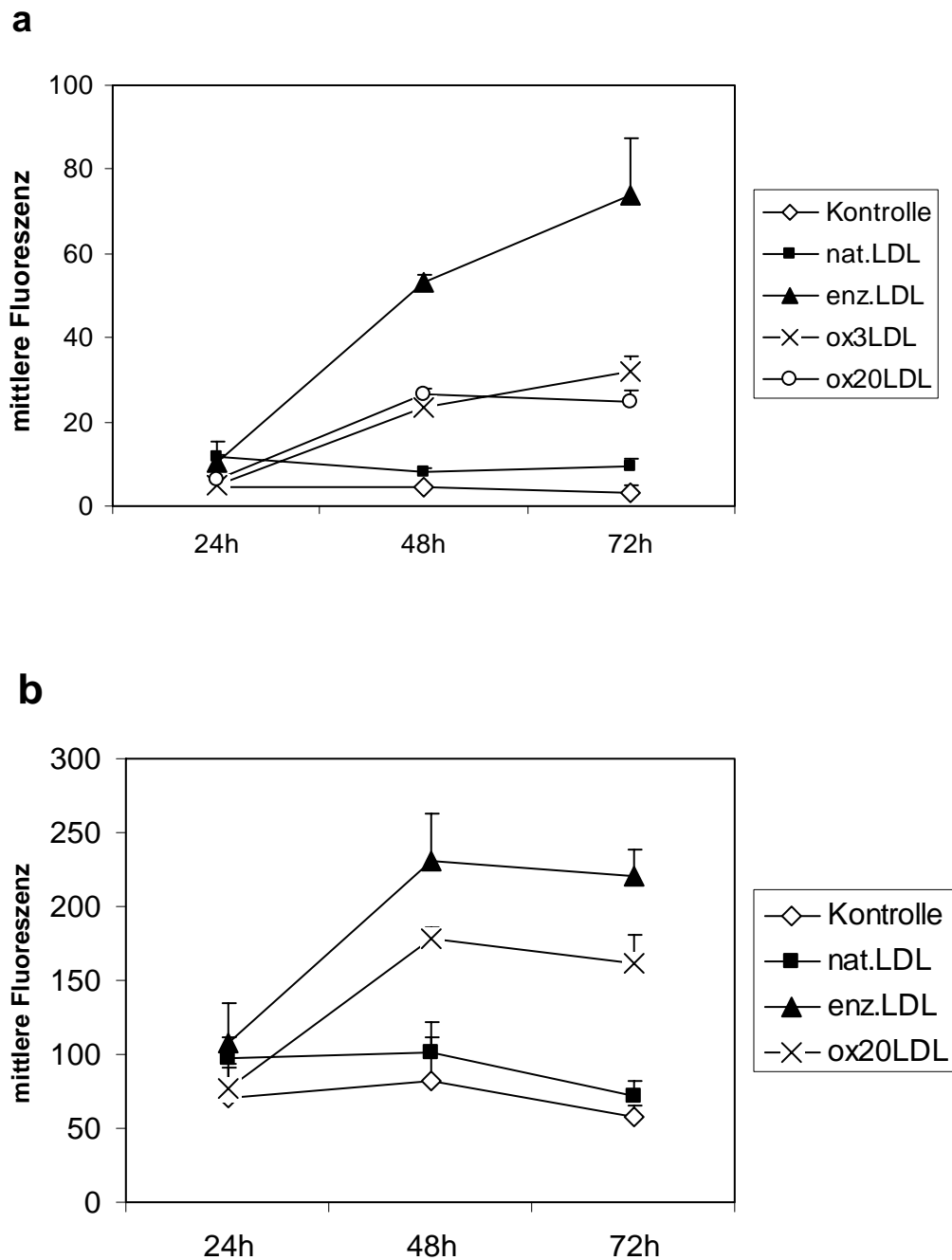


Abb. VI.2.1: CD36 Expression in MM6 Zellen nach 24h, 48h und 72h Inkubation: MM6 Zellen ohne **(a)** und mit Scavenger-Rezeptoren (MM6sr) **(b)** wurden ein bis drei Tage mit nativem (= nat.LDL), enzymatisch- (sPLA2 + 15-LOX = enz.LDL) und Kupfer-oxidiertem LDL (3 h, 20 h = ox₃ bzw. 20LDL), jeweils 50 µg/ml entsprechend ¹⁰⁹, stimuliert und die CD36 Expression per Durchflußzytometrie gemessen (n = 3). **Statistik: MM6 Zellen:** t -Test: enz.LDL gegenüber Kontrolle nach 48 h: p = 0,00078; t -Test enz.LDL gegenüber ox₃LDL in MM6 nach 72 h: p = 0,032. **MM6sr Zellen:** t -Test: enz.LDL gegenüber Kontrolle nach 48 h: p = 0,00037.

b) Da die Analyse des 15-LOX LDLs einen hohen Anteil veresterter HODEs zeigte (Tab. VI.1), sollte überprüft werden, ob die veresterten Fettsäuren ebenfalls CD36 hochregulieren, was wir nicht erwarteten, da nur freie HODEs Liganden von PPAR γ sein dürften.

Dazu wurde neben den oben beschriebenen Behandlungen zusätzlich der Effekt von **sPLA₂-mod. LDL (=sPLA₂ LDL)** und **15-LOX- mod. LDL (=15-LOX LDL)**, je 50 μ g/ml, sowie 13-HODE (15 μ M; Cayman Chemical Company) nach drei Tagen Inkubation in MM6 Zellen untersucht.

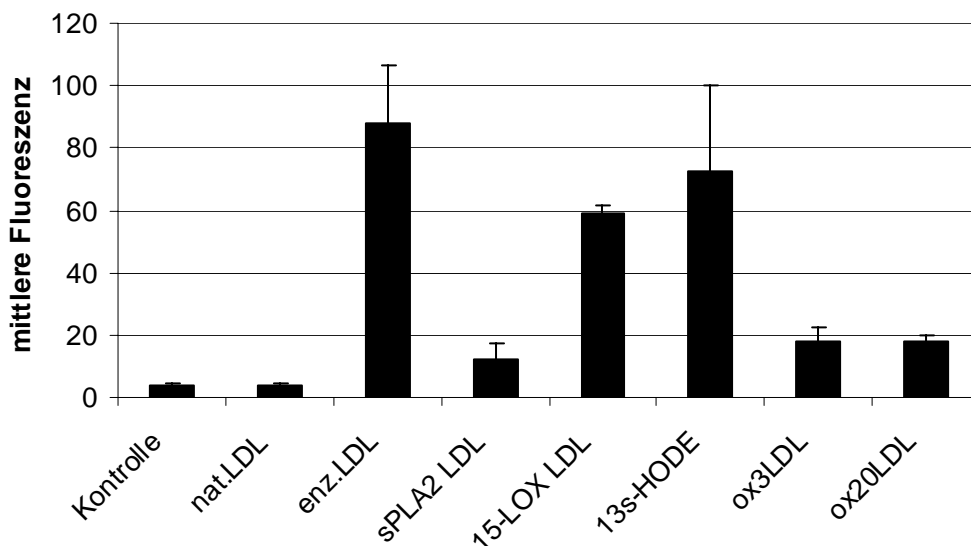


Abb. VI.2.2: CD36 Expression in MM6 Zellen nach Inkubation mit sPLA₂- und 15-LOX – modifiziertem LDL: Die Zellen wurden mit den oben genannten modifizierten Lipoproteinen (50 μ g/ml) und 13s-HODE (15 μ M) für 72 h inkubiert (n = 4).

Ergebnis:

Die Abbildungen bestätigen die oben beschriebene Vermutung: In den gezeigten Zelllinien wurde die stärkste Expression in den enz.LDL behandelten Zellen gesehen mit einem Maximum am 3. Tag in den MM6 bzw. am 2. Tag in den MM6sr Zellen. Ebenfalls starke Expression zeigten die Zellen, die mit HODE direkt inkubiert wurden. sPLA₂ allein hatte kaum Einfluß auf die CD36-Expression. Der geringe Anstieg könnte auf einer während der LDL-Modifizierung vorkommenden spontanen Autooxidierung von veresterten Fettsäuren beruhen, die sekundär von der sPLA₂ hydrolysiert werden und an den Zellen wirken. Da 15-LOX LDL entgegen der Erwartung eine relativ starke Hochregulierung bewirkt, vermuteten wir, dass die

oxidierten veresterten Fettsäuren von zelleigenen Lipasen abgespalten werden. Da es viele verschiedene Subtypen dieses Enzymes gibt, war dieser Vermutung schwer nachzugehen und Versuche, durch Blockierung der Zelllipase auch die CD36 Expression zu supprimieren, schlugen fehl.

2.2 Enzymatisch modifiziertes LDL hat keinen Einfluß auf CD36 in THP1 Zellen und isolierte humane Blutmonozyten

a) THP1 Zellen wurden 3 Tage entsprechend den MM6 Zellen behandelt und die CD36 Expression mittels Durchflußzytometrie ermittelt.

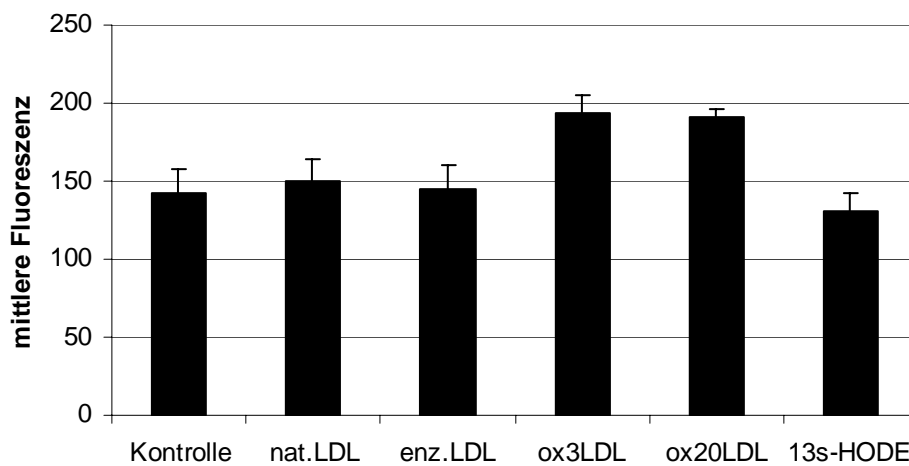


Abb VI.2.3: CD36 Expression in THP1 Zellen nach 72 h: THP1 Zellen wurden mit modifiziertem LDL (50µg/ml) und 13s-HODE (15µM) behandelt und 72 h kultiviert (n = 3).

b) Isolierte humane Blutmonozyten wurden mit enz.LDL und ox₂₀LDL wie bereits beschrieben stimuliert und die CD36 Expression nach 24 h und 48 h gemessen.

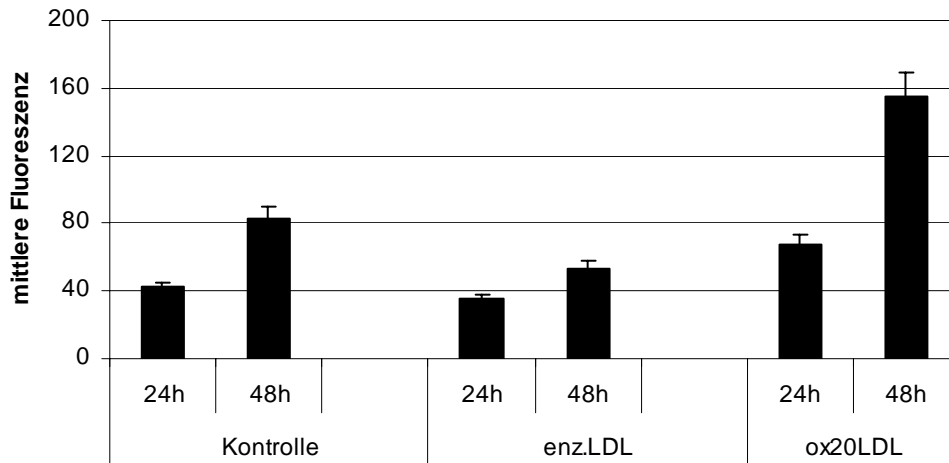


Abb. VI.2.4: CD36 Expression in humanen Blutmonozyten: humane Blutmonozyten wurden direkt nach Isolierung mit enz.LDL und ox₂₀LDL (je 50µg/ml) behandelt und die CD36 Expression nach 24 h und 48 h bestimmt (n = 3).

Ergebnis:

Wie aus den Daten hervorgeht, zeigt sich ein Zusammenhang zwischen CD36-Induktion durch enzymatisch-modifiziertes LDL und basaler CD36-Expression. In den MM6 Zellen, die keine basale Expression zeigen, war die Induktion am stärksten ausgeprägt (ca. 80 fach gegenüber Kontrolle), während THP1 Zellen mit hohem basalen CD36 nicht auf enz.LDL reagierten. Die MM6sr Zellen nahmen diesbezüglich eine Mittelstellung ein. Umgekehrt war oxidiertes LDL in den THP 1 Zellen ein potenter CD36-Induktor während die Reaktion in den MM6 Zellen ohne basale CD36-Expression schwach war. Dieses Verhältnis soll anhand des folgenden Diagrammes zusammengefasst veranschaulicht werden.

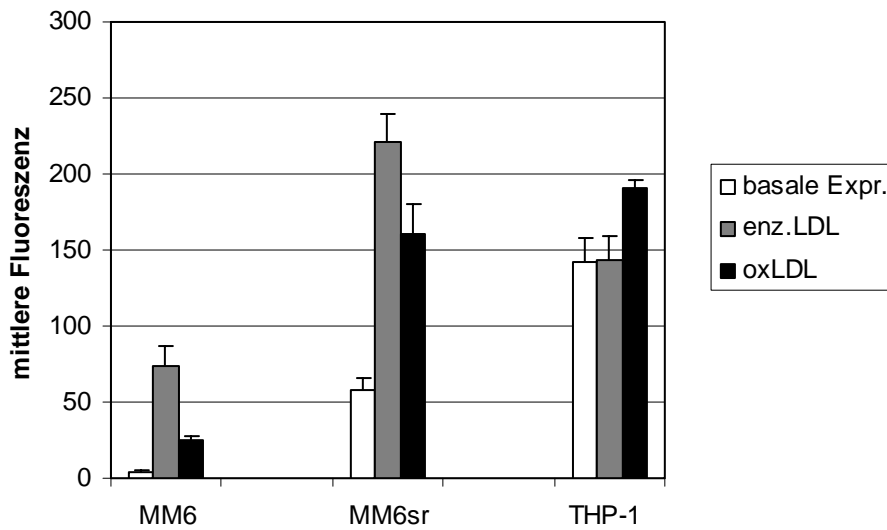


Abb. VI.2.5: Basale CD36 Expression im Verhältnis zur induzierten CD36 Expression durch enz.- und ox.LDL nach 72 h (n = 3).

Die isolierten humanen Blutmonozyten, deren basale CD36 Expression im frisch isolierten Zustand derjenigen der MM6sr Zellen entspricht, zeigten in Kultur (bereits nach 24 h) eine schnelle Ausdifferenzierung in Makrophagen (erkennbar anhand der Formveränderung), die mit steigender CD36 Expression einherging. Das Problem bestand möglicherweise in einer Überschneidung der Differenzierung (steigender basaler Expression) und möglicher Reaktion der Zellen auf das enzymatisch modifizierte LDL.

3. Humane rekombinante sPLA₂ und 15-Lipoxygenase aus Kaninchen Retikulozyten sind ebenfalls Induktoren der CD36 Expression.

Da die Versuche mit 15-Lipoxygenase (15-LOX) aus der Sojabohne durchgeführt wurden, sollte getestet werden, ob auch die von Säugetieren abstammende 15-LOX bzw. humane sPLA₂, also unter physiologischen Bedingungen, gleiche Ergebnisse liefern. Verwendet wurden humane rekombinante sPLA₂ (erhalten von Dr. Berit Johansen, Universität von Trondheim, Norwegen) und aus Kaninchen-Retikulozyten isolierte 15-LOX (bereitgestellt von Prof. Kühn, Humboldt-Universität, Berlin).

LDL wurde unter den gleichen Bedingungen wie zuvor mit den **Säuger-Enzymen modifiziert** (=senz.LDL) und MM6 Zellen mit 50 µg/ml 72 h inkubiert. Zum Vergleich wurde dieser Vorgang mit den herkömmlichen Enzymen parallel durchgeführt.

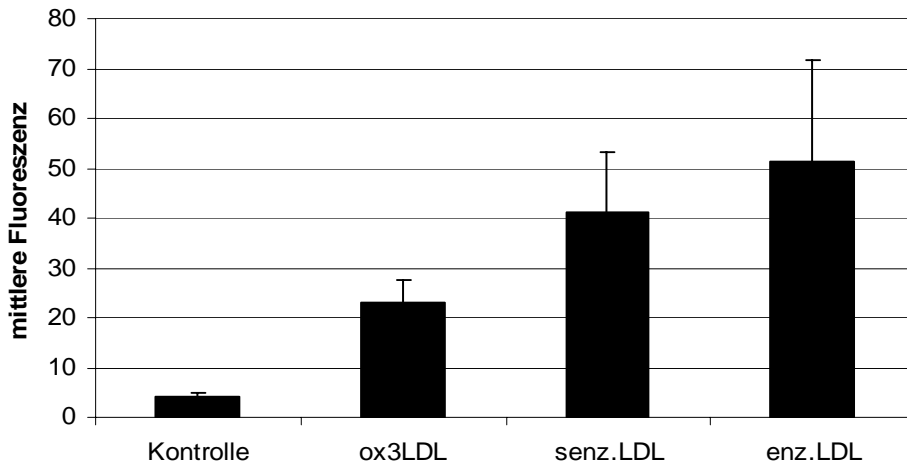


Abb. VI.3.1: CD36 Expression in MM6 Zellen nach 72 h Inkubation: MM6 Zellen wurden mit den modifizierten Lipoproteinen (50µg/ml) für 72 h behandelt; senz.LDL = LDL modifiziert mit humaner rekombinanter sPLA₂ und 15-Lipoxidase aus Kaninchen Retikulozyten (n = 3).

Ergebnis:

LDL modifiziert mit Säuger-Enzymen führt in MM6 Zellen ebenfalls zu einer Zunahme der CD36 Expression, die zwar geringer ausfällt im Vergleich zu den bisher benutzten Enzymen, aber stärker ist als die durch ox.LDL induzierte Expression.

4. Freie, aber nicht veresterte HODEs führen zur CD36 Hochregulierung

Da das LDL, welches mit sPLA₂ und 15-LOX zusammen inkubiert wurde, effizienter war in der Hochregulierung von CD36, als jenes, welches allein mit 15-LOX behandelt wurde, lässt vermuten, dass die Überlegenheit von enz.LDL auf dem Vorhandensein freier HODEs beruht. Dazu wurde der Effekt freier HODEs und Cholesterin-veresterter HODEs (CHE-HODE) direkt verglichen. Die HODEs wurde in einer Konzentration von 15µM auf MM6 Zellen gegeben und die CD36 Expression nach 72 h gemessen.

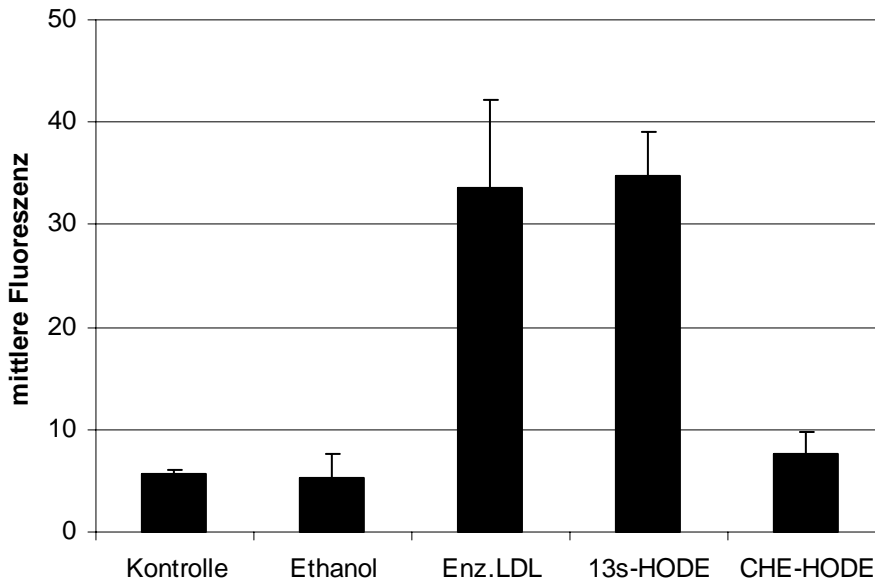


Abb. VI.4.: CD36 Expression in MM6 Zellen nach Behandlung mit freien und veresterten HODEs (CHE-HODEs) nach 72 h (n = 4).

Ergebnis:

Wie in der Abbildung gezeigt, waren die mit Cholesterin veresterten HODEs (CHE-HODE) im Gegensatz zu den freien HODEs nicht in der Lage, CD36 zu induzieren. Das lässt die Vermutung zu, dass die Überlegenheit des mit beiden Enzymen modifizierten LDLs auf dem Vorhandensein von *freien* oxidierten ungesättigten Fettsäuren in den Lipoproteinen beruht. Jedoch müssten auch CHE-HODEs durch zelleigene Lipasen gespalten werden und dann einen Effekt zeigen (gemäß der Überlegung von VI.2.2).

5. Undifferenzierte Monozyten nehmen enzymatisch-modifiziertes LDL über den LDL-Rezeptor auf

Da enz.LDL in unreifen Monozyten ohne jegliche CD36 Basisexpression zu einer Induktion von CD36 führte, stellte sich die Frage, ob die Modifizierung durch die Enzyme noch eine Aufnahme über den LDL-Rezeptor zuließ. Zu diesem Zweck wurden MM6 und MM6sr Zellen (bis auf die Kontrolle und die Zellen für die Bestimmung der absoluten Aufnahme) mit 500 µg/ml unmarkiertem mod. LDL für 15 min. vorinkubiert (Blockierung der spezif. Bindestellen) und anschließend mit 10 µg/ml DiI (1,1 Dioctadecyl-3,3,3,3-tetramethylindocarbocyanine perchlorat)-markiertem enz.LDL und ox. (3h und 20h) LDL für

2h inkubiert (siehe Methodik), wodurch die Quantifizierung der Aufnahme mittels Durchflußzytometrie erfolgen konnte..

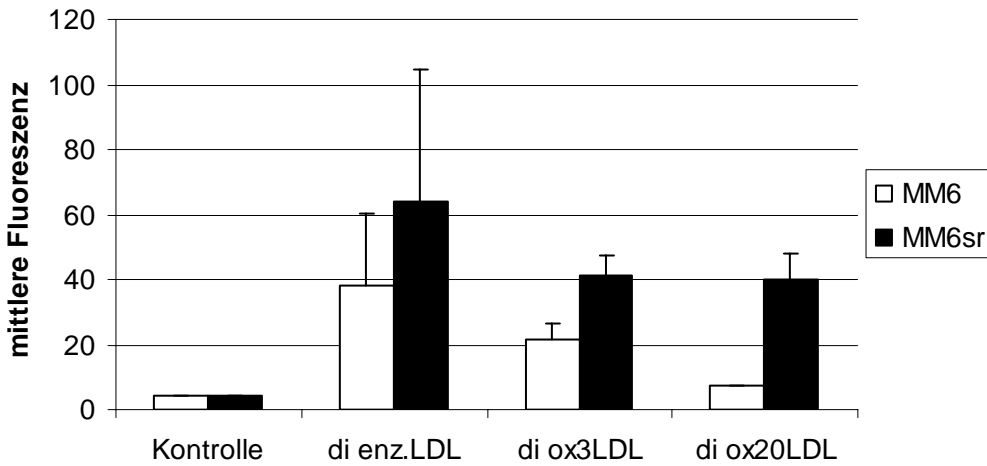
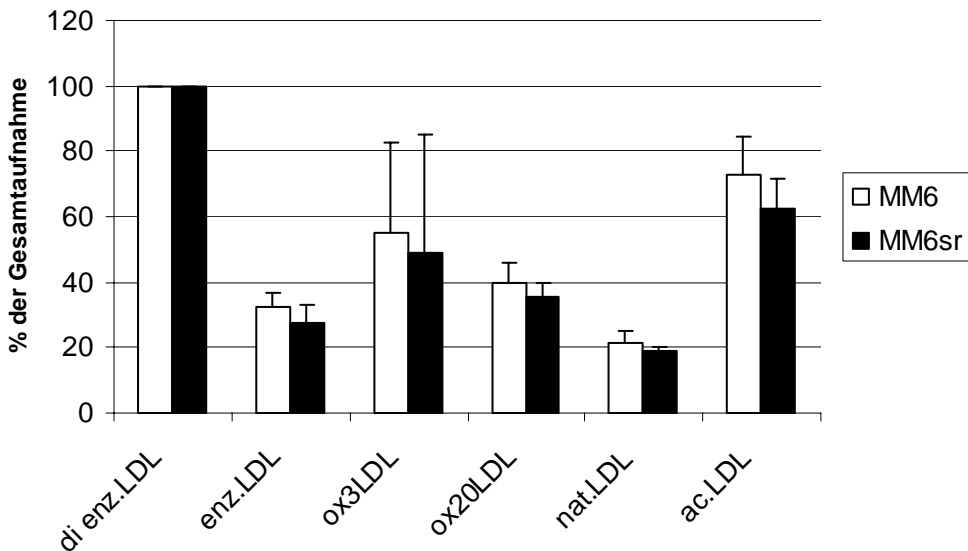
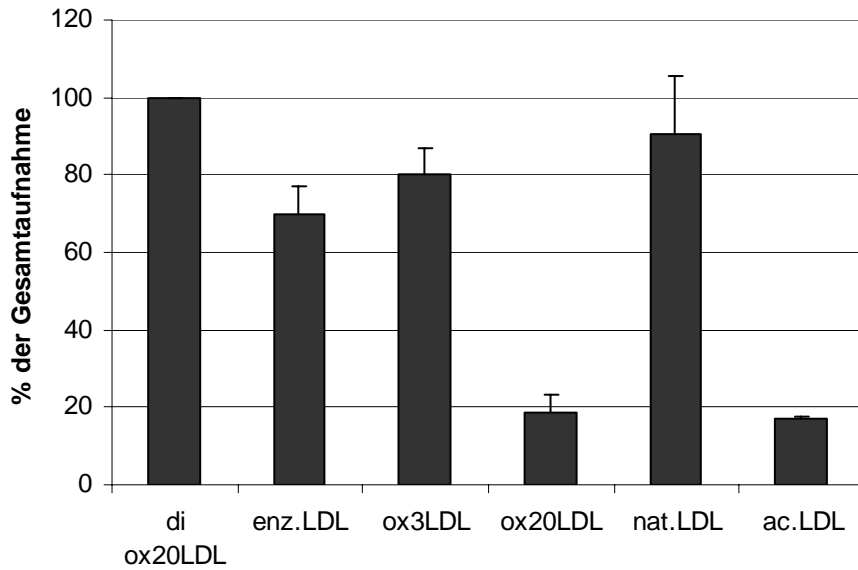


Abb. VI.5.a: Gesamtaufnahme DiI-markierten modifizierten LDLs (10µg/ml) in MM6 Zellen mit und ohne Scavenger-Rezeptoren nach 2 h Inkubation (n = 3), Kontrolle = Autofluoreszenz un behandelter Zellen (n = 3).



b: Prozentuale Hemmung der Aufnahme DiI-markierten enz.LDLs in MM6 Zellen nach Vorinkubierung mit 500 µg/ml unmarkierten LDLs (n = 3).



c: Prozentuale Hemmung der Aufnahme DiI-markierten ox₂₀LDLs durch Vorinkubierung mit 500 µg/ml unmarkierten LDLs in MM6sr Zellen (n = 3).

Ergebnis:

Die Diagramme zeigen, dass enz.LDL und ox₃LDL von den MM6 Zellen aufgenommen wird und die Aufnahme zum großen Teil über den LDL-Rezeptor erfolgen könnte (Hemmung durch unmarkiertes natives LDL, für ox₃LDL hier nicht dargestellt). Die Aufnahme enzymatisch-modifizierten LDLs ist dabei ca. doppelt so stark wie die des 3 h oxidierten LDLs und wird am effektivsten durch natives LDL gehemmt. Acetyliertes LDL, als klassischer Ligand des Scavenger-Rezeptors-A hat im Vergleich nur einen schwachen Einfluß auf die Aufnahme. Weiterhin wird deutlich, dass ox₂₀LDL kaum in MM6-Zellen eindringen kann, gut vereinbar mit dem Fehlen von Scavenger-Rezeptoren (SR-Rezeptor). Nicht nachvollziehbar bleibt die starke Hemmung der DiI-markierten enz.LDL Aufnahme in den MM6 Zellen ohne Scavenger-Rezeptoren durch stark oxidiertes (ox₂₀LDL).

Mit Zunahme der Scavenger-Rezeptoren auf der Oberfläche (demonstriert anhand der MM6sr Zellen), werden die Zellen effizienter auch in der Aufnahme stark oxidierten LDLs. Diese kann jedoch im Gegensatz zu minimal modifizierten Lipoproteinen nicht durch natives LDL blockiert werden, dafür allerdings durch stark oxidiertes und acetyliertes LDL. Das lässt vermuten, dass stark oxidiertes LDL fast ausschließlich über SR-Rezeptoren in die Zelle gelangt und aufgrund der starken strukturellen Veränderung nicht mehr von LDL-Rezeptoren erkannt wird.

6. Die Hemmung der lysosomalen Enzyme bewirkt eine Abnahme der CD36 Expression

Da enz.LDL und demnach wahrscheinlich auch 15-LOX LDL zum großen Teil über den LDL-Rezeptor aufgenommen wird, müsste es nach Einschleusen in die Zelle dem lysosomalen Abbau unterliegen, was zur Freisetzung der HODEs führen könnte. Dies wäre auch eine weitere Erklärung für die CD36 Induktion durch 15-LOX. Durch Hemmung der lysosomalen Hydrolyse müsste demnach die CD36-Induktion geringer ausfallen. Um dies zu überprüfen, wurde zunächst versucht, die lysosomalen Enzyme durch 60 μM Chloroquin zu hemmen, welches als Inhibitor in der Literatur beschrieben wurde ⁶⁶. Die Behandlung mit Chloroquin war für sämtliche Zellen letal, da es ebenfalls die komplette RNA-Synthese hemmt, und ist nur geeignet zur Untersuchung von Prozessen, die keine RNA-Synthese involvieren (Habenicht et al. untersuchten die Freisetzung von Arachidonsäure aus LDL während des lysosomalen Abbaus ⁶⁶). Als weitere Möglichkeit ist der Einsatz von NH_3Cl beschrieben, das in einer Konzentration von 15 mmol den sauren pH in den Lysosomen leicht anhebt und damit die Enzymwirkung hemmen sollte.

MM6 Zellen wurden mit und ohne Zugabe von 15 mM NH_3Cl für drei Tage mit 15-LOX LDL, enz.LDL (beides je 50 $\mu\text{g/ml}$), $\text{P}_\text{g}\text{J}_2$ (3 μM) und 13-HODE (15 μM) stimuliert und die CD36-Expression durch FACS-Analyse ermittelt.

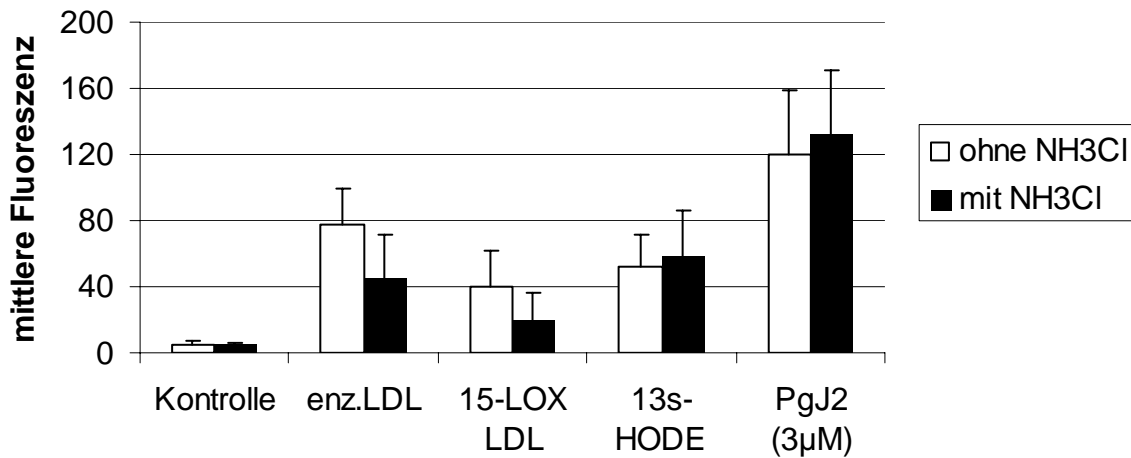


Abb. VI.6.: CD36 Expression in MM6 Zellen mit und ohne Zugabe von 15 mmol NH_3Cl zu den Behandlungen ($n = 3$); **Statistik:** t – Test: enz.LDL + NH_3Cl gegenüber enz.LDL ohne NH_3Cl : $p = 0,012$; 15-LOX LDL + NH_3Cl gegenüber 15-LOX LDL ohne NH_3Cl : $p = 0,005$

Ergebnis:

Die CD36-Expression war unter Zugabe von 15 mM NH_3Cl in den 15-LOX LDL- und enz.LDL - behandelten Zellen deutlich supprimiert, während die Behandlung mit 13-HODE und PgJ_2 in beiden Ansätzen annähernd gleiche Ergebnisse zeigten. Das Ergebnis lässt vermuten, dass enz.LDL und 15-LOX LDL u.a. durch den LDL-Rez. in die Zelle gelangt, wo durch lysosomale Hydrolyse die Fettsäuren freigesetzt werden. Freie HODEs und PgJ_2 könnten die Zellmembran auf anderem Weg passieren (z.B. per Diffusion) und sind deshalb nicht durch NH_3Cl in ihrer Wirkung blockiert. Insgesamt ist das Ergebnis sicherlich als sehr kritisch zu betrachten, da eine spezifische Wirkung des NH_3Cl nicht gesichert ist. Es könnte allerdings eine Erklärung dafür liefern, warum Cholesterin-veresterte HODEs (siehe Abb. VI.4.1) im Gegensatz zu 15-LOX LDL keinen Effekt auf die CD36-Expression zeigen, da diese nicht durch den LDL-Rezeptor aufgenommen werden und möglicherweise aufgrund ihres höheren Molekulargewichtes im Vergleich zu freien HODEs verlangsamt die Membran passieren. 15-LOX LDL dagegen wird vom LDL-Rezeptor erkannt.

7. Enzymatisch mod. LDL induziert Apoptose in MM6 Zellen, die unabhängig von der CD36-Hochregulierung ist.

Es ist bekannt, dass Bestandteile oxidierten LDLs, wie Lysophosphatidylcholin (LPC) oder 25-Hydroxycholesterol in Endothelzellen, Makrophagen und glatten Muskelzellen, wahrscheinlich über Aktivierung der Caspase-3¹³⁴, Apoptose induzieren. Rusinol et al. diskutierten, dass die Apoptoseeinleitung von der Expression bestimmter Rezeptoren (v.a. CD36) abhängt, die ox.LDL binden, aufnehmen und somit auch dessen toxische Bestandteile in die Zelle einschleusen¹³³. Sie erkannten, dass in CD36-transfizierten CHO-Zellen ox.LDL zum Zelltod führte.

In unserer Untersuchungsreihe sollte überprüft werden, ob enz.LDL ebenfalls Apoptose auslösen kann und wenn dies der Fall ist, ob die CD36-Expression in Abhängigkeit zu diesem Prozeß steht.

a) Zu diesem Zweck wurden die MM6 und MM6sr Zellen parallel zum Zeitreihenversuch (VI.2.1) mittels Durchflußzytometrie auf Apoptose untersucht, erkennbar anhand Annexin V-Bindung an Phosphatidylserin der apoptotischen Zellen.

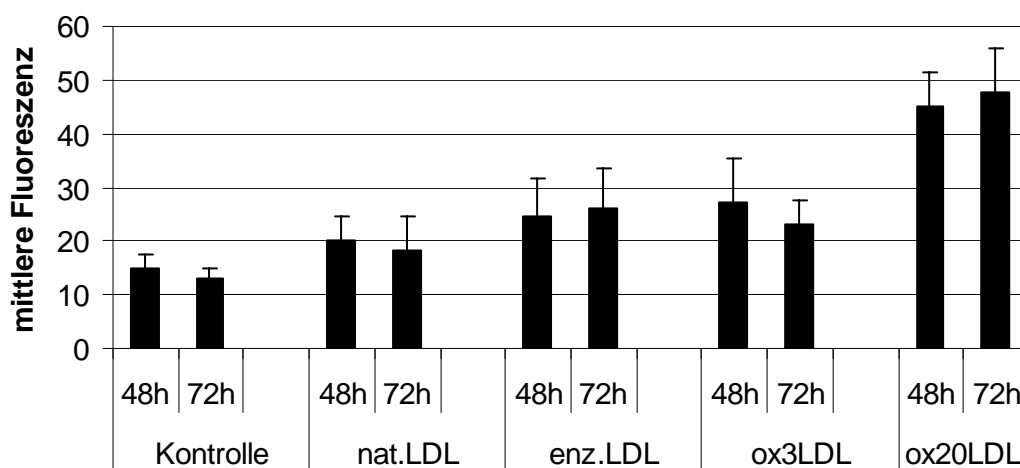


Abb. VI.7.1: Bindung von Annexin V an apoptotische MM6 Zellen: geprüft wurde die Apoptoseinduktion in den Zellen ausgelöst durch modifizierte Lipoproteine, die für 48 h bzw. 72 h auf die Zellen gewirkt hatten. (n = 3). **Statistik:** t – Test: enz.LDL im Vergleich zur Kontrolle nach 72 h: p = 0,126; t – Test ox₂₀LDL im Vergleich zu enz.LDL nach 72 h: p = 0,026

Ergebnis:

Die Daten zeigen, dass in den mit enz.LDL und ox.LDL behandelten MM6 Zellen neben einer verstärkten CD36 Expression (siehe VI.2.1) auch die Anzahl der apoptotischen Zellen zunahm. Nach 24 h war noch kein Unterschied in der Apoptoserate zwischen den Behandlungen erkennbar (Daten nicht gezeigt). Die Apoptoserate in den enz.LDL- und ox.₃LDL-behandelten Zellen lag nur leicht oberhalb der Kontrolle und der nat.LDL - behandelten Zellen (noch unterhalb der Signifikanzschwelle), während ox₂₀LDL deutlich toxischer war. Die MM6sr Zellen zeigten dieselbe Tendenz (nicht dargestellt).

b) In einem zweiten Ansatz wurden MM6 Zellen mit bekannten Apoptoseinduktoren behandelt und sowohl die Apoptoserate wie auch die CD36-Expression nach 24 h und 48 h gemessen.

Die Zellen wurden inkubiert mit 40 ng TRAIL, 5 bzw. 10 µg Hydroxycholesterol, 100µM LPC (Lysophosphatidylcholin) und 50 µM enz.LDL als Vergleich.

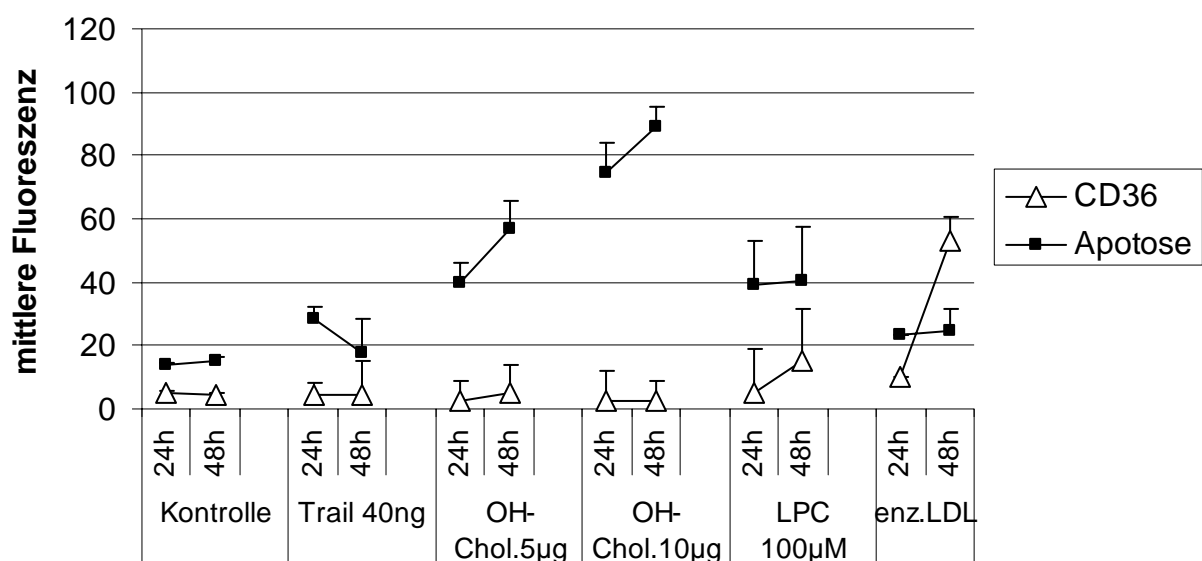


Abb. VI.7.2: Einfluß von Apoptose auf die CD36 Expression in MM6 Zellen nach 24 h und 72 h Die Zellen wurden inkubiert mit 40 ng TRAIL, 5 bzw. 10 µg Hydroxycholesterol, 100µM LPC und 50 µM enz.LDL als Vergleich (n = 3).

Ergebnis:

Alle Apoptoseinduktoren führten zu verstärktem Zelltod, am stärksten ausgeprägt durch 10 µg OH-Cholesterol, waren aber nicht in der Lage, CD36 zu induzieren. Eine Ausnahme stellt das

LPC, worunter es nach 72 h Inkubierung zu einem leichten Anstieg von CD36 kam. Enz.LDL hingegen führte als nur schwacher Apoptoseinduktor wie erwartet zu einer starken CD36-Expression nach 72 h.

Die Ergebnisse zeigen, dass Apoptose und CD36-Exprimierung zwar parallel auftreten, aber nicht abhängig voneinander sind.

8. Enzymatisch modifiziertes LDL induziert die Reifung der Monozyten

CD14 ist ein spezifischer Indikator der Monozytenreifung und –differenzierung. Es sollte überprüft werden, ob die Wirkung von enz.LDL spezifisch ist in der Hochregulierung von CD36 oder ob der Rezeptor unspezifisch durch induzierte allgemeine Differenzierung expriert wird. Auf der anderen Seite wurde festgestellt, ob enz.LDL überhaupt zu einer Differenzierung führt.

MM6 Zellen wurden 72 h mit enz.LDL und ox₂₀LDL inkubiert. Zum Vergleich der basalen CD14 Expression wurden ebenfalls MM6sr Zellen unbehandelt untersucht.

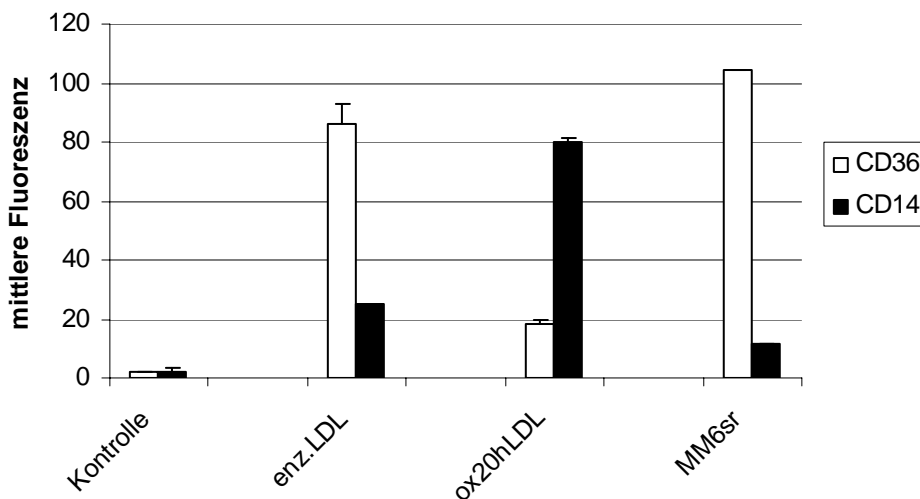


Abb. VI.8.: CD14 – und CD36 Expression in MM6 Zellen nach 72 h Inkubation mit enz.- und ox₂₀LDL in einer Konzentration von 50µg/ml (n = 3, Ausnahme Basisexpression der MM6sr Zellen: n=1)

Ergebnis:

Das Diagramm zeigt, dass MM6 Zellen als Modell für undifferenzierte Monozyten erwartungsgemäß kein CD14 exprimieren. Dieses wird allerdings innerhalb von 72 h durch enz.LDL um das 20fache und durch ox₂₀LDL um das 80fache in der Expression gesteigert.

Der Effekt ist gleichzeitig entgegengesetzt der CD36 Expression. Die Ergebnisse demonstrieren in den behandelten Zellen eine induzierte Reifung (erkennbar an der CD14 Expression), die aber unabhängig von der CD36 Regulierung verläuft.

9. Enzymatisch mod. LDL induziert die CD36-Expression durch Interaktion mit PPAR γ

Nagy et al. beschrieben, dass HODEs in oxidiertem LDL Liganden des PPAR γ Rezeptors sind und durch Transaktivierung dieses intrazellulären Rezeptors die Expression von CD36 regulieren¹⁰⁹. Allerdings sind viele der PPAR γ -Liganden pleiotrop, sodass die Rolle des Rezeptors oft kontrovers diskutiert wird.

In den folgenden Experimenten sollte die Funktion von PPAR γ in der CD36-Induktion durch enz.LDL analysiert werden.

9.1 Enz. LDL führt nicht zu einer Translokation von PPAR γ

a) MM6 Zellen und isolierte humane Blutmonozyten wurden mit nat.LDL, enz.LDL, ox₂₀LDL und 13-HODEs in den beschriebenen Konzentrationen für 24 h und 48 h inkubiert und die PPAR γ -Translokation mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht (siehe Abb. VI.9.1.a und VI.9.1.b im Anhang „Photographien“ im Anschluss an den Ergebnisteil).

b) In einem weiteren Versuchsansatz sollte das Ergebnis durch Western-Blot Screening bestätigt werden. Dazu wurden MM6 Zellen mit enz.LDL und ox₂₀LDL (beide 50 μ g/ml) behandelt und die Expression getrennt im Kern und Zytoplasma dargestellt.

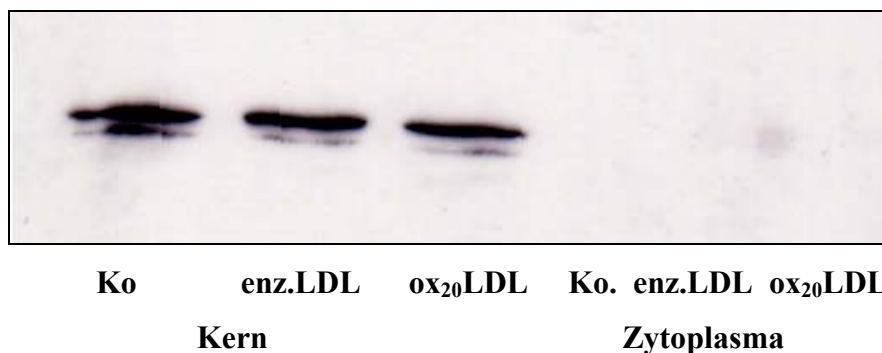


Abb. VI.9.2: Expression von PPAR γ im Kern und Zytoplasma von MM6 Zellen. MM6 Zellen wurden 48 h mit enz.LDL und ox₂₀LDL (beide 50 μ g/ml) behandelt und die Expression getrennt im Kern und Zytoplasma durch Western-Blot dargestellt. Die Kontrolle stellt die spontane Translokation in unbehandelten Zellen dar, (n =1).

Ergebnis:

Die Mikroskopie-Bilder und der Western-Blot zeigen, dass bereits die nativen Zellen eine ausgeprägte Translokation von PPAR γ aufweisen, die in den mit enz.LDL behandelten Zellen keine sichtbare Steigerung mehr erfährt. Auch eine vermehrte Expression des Gesamtproteins, untersucht mittels FACS-Analyse, konnte nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Der klassische Weg der PPAR γ -Aktivierung durch Ligandbindung und konsekutiver Translokation in den Kern scheint somit bei der CD36-Induktion durch enz.LDL in unseren Experimenten keine wesentliche Rolle zu spielen. Ferner widersprechen die Ergebnisse der Ansicht, dass in unreifen Monozyten PPAR γ ausschließlich im Zytoplasma vorliegt und erst während der Differenzierung und/oder Stimulierung in den Kern transloziert ¹⁰⁹.

9.2 PPAR γ ist in verschiedenen unstimulierten Zelllinien bereits ausschließlich im Kern lokalisiert

Nachdem in unstimulierten MM6 Zellen und humanen Blutmonozyten PPAR γ bereits transloziert war, sollten die Verhältnisse in anderen Zelllinien untersucht werden. Gleichzeitig wurde zur Kontrolle der Methodik die Lokalisation von p65, einer Untereinheit des Kernfaktors- κ B (NF- κ B), untersucht. Dieses Protein ist in unstimulierten Zellen zytosolisch lokalisiert und transloziert nach Aktivierung durch proinflammatorische Zytokine (hier TNF α) in den Nucleus.

MM6, MM6sr und Jurkat-Zellen wurden mit und ohne Stimulierung durch TNF α per Western-Blot Screening auf PPAR γ und p65 untersucht.

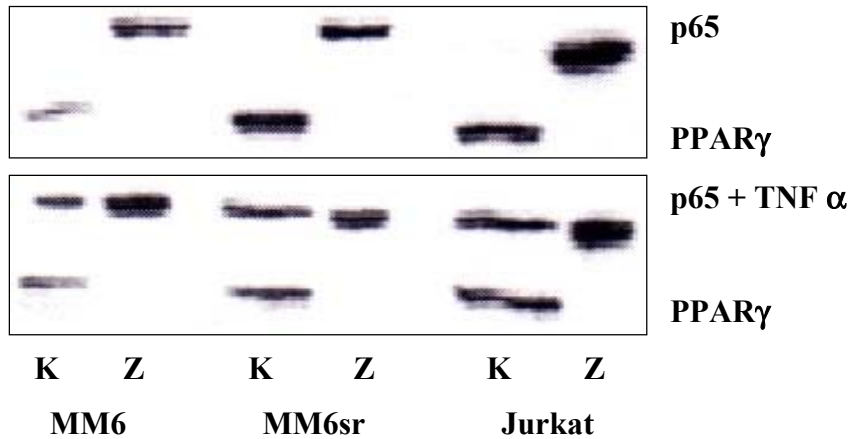


Abb. VI. 9.3: MM6, MM6sr und Jurkat-Zellen wurden mit und ohne Stimulierung durch TNF α per Western-Blot Screening auf PPAR γ und p65 untersucht. Dargestellt sind die Expressionen im Kern (K) und Zytoplasma (Z) (n = 2).

Ergebnis:

PPAR γ befindet sich auch in den anderen getesteten Zelllinien ausschließlich im Kern. Im Gegensatz dazu liegt p65 in den Kontrollzellen ausschließlich zytosolisch vor und tritt erst nach Behandlung mit TNF α wie erwartet in den Kern über. Das schließt einen systematischen Fehler in der Zellfraktionierung weitgehend aus.

9.3 Enz.LDL induziert die CD36 Expression durch die Bindung von PPAR γ an PPRE.

Nachdem vermutet wurde, dass die Induktion des CD36 nicht auf der Translokation des PPAR γ beruht, wurde überprüft, ob PPAR γ an die PPRES des CD36-Gens bindet.

MM6 Zellen wurden 12 h inkubiert mit nativem LDL, enz.LDL, ox₃LDL und PgJ₂ (3 μ M) als Positivkontrolle. Die Kerne wurden extrahiert und die Bindung von PPAR γ an PPRE (PPAR γ Response Elements) des CD36-Gens mittels Electrophoresis-Mobility-Shift-Assay (EMSA) untersucht (die Untersuchung erfolgte am Institut für Molekulargenetik der Universität von Prag).

Kontrolle enz.LDL ox3LDL dPgJ₂

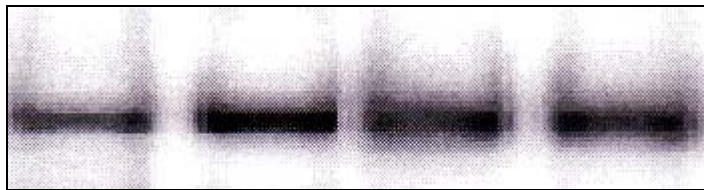


Abb. VI.9.4.: Bindung von PPAR γ an PPRE des CD36 Gens in MM6 Zellen. MM6 Zellen wurden 12 h inkubiert mit nativem LDL, enz.LDL, ox₃LDL (je 50 μ g/ml) und PgJ₂ (3 μ M) als Positivkontrolle. Die Kerne wurden extrahiert und die Bindung von PPAR γ an PPRE des CD36-Gens mittels EMSA untersucht, Kontrolle = unbehandelte Zellen (n = 1).

Ergebnis:

Die Banden zeigen eine vermehrte Bindung von PPAR γ an PPRE in behandelten MM6 Zellen. Es scheint daher, dass enz.LDL die Bindung von PPAR γ an PPRE induziert und dadurch CD36 hochreguliert.

9.4 PPAR γ -/- Makrophagen können CD36 nicht hochregulieren

Um letztendlich einen sicheren Hinweis zu bekommen, ob die CD36-Induktion durch enz.LDL abhängig bzw. unabhängig ist von PPAR γ , wurden embryonale Stammzellen aus Mäusen verwendet (gestiftet vom Howard Hughes Medical Institut, Kalifornien), denen das PPAR γ -Gen fehlt (ES -/-) bzw. vorhanden ist (ES +/+). Diese Zellen wurden zu Makrophagen differenziert und mit enz.LDL 2 Tage inkubiert (nach 3 Tagen in Kultur werden die Zellen verstärkt apoptotisch). Die CD36-Expriemierung wurde im Fluoreszenzmikroskop dargestellt, weil diese Zellen für FACS-Analysen zu groß und adhärennd waren und für Western-Blot Experimente zahlenmäßig nicht ausreichten.

Die Ergebnisse sind in Abb. VI.9.5 im Anhang „Photographien“ veranschaulicht.

Ergebnis:

Nur in den ES +/+ kam es nach Stimulierung mit enz.LDL zu einer verstärkten Expression von CD36 während die ES -/- nicht reagierten.

Fasst man die Ergebnisse zusammen, lässt sich vermuten, dass enz.LDL, ox.LDL und HODEs PPAR γ nicht durch Translokation aktivieren, sondern das schon im Kern vorhandene PPAR γ so modifizieren, dass es an PPRE vom CD36 Gen bindet und so dessen Transkription einleitet, sichtbar an einer verstärkten Expriemierung auf der Zelloberfläche.

VII Diskussion

1. 15-LOX und sPLA₂ – Bedeutung in der Atherosklerose

Das frühe Stadium der Atherosklerose ist gekennzeichnet durch den Übertritt von nativem LDL in den subintimalen Raum, wo es durch verschiedene zelluläre sowie extrazelluläre Prozesse zunächst nur minimal modifiziert wird. Es sollte untersucht werden, wie die Enzyme sekretorische Phospholipase A₂ und die 15-Lipoxidase, die beide in atherosklerotischen Plaques entdeckt wurden, in Kombination das LDL modifizieren und welchen Einfluss dieser Prozess auf die Expression von CD36 und im übertragenen Sinne auf die Pathogenese der Schaumzellbildung haben könnte. Bisher wurden verschiedene Studien beschrieben, die jeweils die Enzyme getrennt untersuchten, neu in dieser Arbeit war die Frage nach einer funktionellen Zusammenarbeit. Die **sPLA₂** stammt aus Makrophagen und glatten Muskelzellen¹⁵⁶ und wird im Rahmen des Entzündungsprozesses als Antwort auf bestimmte Zytokine (IL-1,6, TNF α) sezerniert^{97, 112}. Durch Interaktion der sPLA₂ mit der stark negativ geladenen extrazellulären Matrix (SO₄-GAG) wird das Enzym extrazellulär gebunden und wirkt an Lipoproteinen, deren ApoB-100 ebenfalls an Chondroitin-Sulphat der Matrix bindet⁷⁷. An den LDL-Partikeln kommt es unter dem Einfluss von sPLA₂ zur Freisetzung von Lyso-Phosphatidylcholin und freien Fettsäuren, die proinflammatorisch und zytotoxisch wirken⁶⁷. Die **15-LOX** oxidiert vor allem freie ungesättigte, aber auch an Membranen und Lipoproteine gebundene Fettsäuren zu Hydroperoxiden und führen so zu einer Modifizierung von LDL-Partikeln. Die 15-LOX ist in zirkulierenden Monozyten nicht nachweisbar, wird aber während der Differenzierung zu Makrophagen induziert⁹⁵.

In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass sPLA₂ und 15-LOX in Kombination zu einer starken Freisetzung von Hydroperoxiden, stammend aus ungesättigten Fettsäuren, führen^{113, 157}. Ferner berichtete Nagy et al., dass 13 bzw. 9-HODE Hauptprodukte der 15-Lipoxidase in der Oxidierung von Linolsäure seien und zugleich potente Aktivatoren von PPAR γ , ein Kernrezeptor, der u.a. die Transkription des CD36-Gens steuert¹⁰⁹.

2. Freisetzung von HODEs bei der Modifizierung des LDLs

Basierend auf diesen Aussagen sollte zunächst in dieser Arbeit geprüft werden, ob die kombinierte Behandlung von LDL mit sPLA₂ und 15-LOX tatsächlich zu einer verstärkten Bildung freier HODEs führt und ob diese Reaktion enzymspezifisch ist, d.h. nicht chemisch ausgelöst wird z.B. durch Metalle oder Radikale. Das Ergebnis (VI.1.1) zeigt, dass nur im enz.LDL

(sPLA₂ + 15-LOX) bereits vor artefizieller Hydrolyse der Lipoproteine, *freie* HODEs / HETE_s gefunden wurden. Die Untersuchung der Isomerie der freien Fettsäuren ergab als Hauptprodukt 13-Hydroxyoctadeca-9Z,11E-dienoicacid (Strukturformel siehe Abb.VII.1), von denen 90% in der S-Konfiguration (Linksdrehung der Liganden in abnehmender Oxidationszahl am asymmetrischen C-Atom) vorlagen. Diese Beobachtung lässt einen enzymatischen Ursprung stark vermuten.

Überraschend war, dass die meisten HODEs in dem LDL, das mit 15-LOX (15-Lipoxidase) und ox₃LDL (Kupfer-oxidiertes LDL, 3h) behandelt worden war, gefunden wurden. Eine Erklärung wäre, dass 15-LOX nur initial wenig Hydroxyfettsäuren (HODE) bildet und weitere HODEs z.B. durch Radikalbildung und nicht-enzymatische Reaktionen i.S. einer Kettenreaktion automatisch entstehen, vergleichbar der Theorie von Neuzil et al.¹¹³. Warum das ox₃LDL so viel HODEs enthält und bei längerer Inkubation weitaus weniger, könnte darauf zurückzuführen sein, dass das Kupfer, die während der frühen Inkubationszeit entstehenden Hydroperoxid-Fettsäuren mit zunehmender Inkubationszeit zerstört. Es kann nicht gezeigt werden, ob die veresterten Lipide zunächst oxidiert und dann durch sPLA₂ hydrolysiert werden, oder umgekehrt.

Die Lipoproteinelektrophorese zeigt eine im Vergleich zur Oxidierung mit Kupfer nur geringe Mobilitätsänderung, weshalb man hier von minimal-modifiziertem LDL, wie auch in der Literatur beschrieben¹⁴⁵, sprechen kann. Die Elektrophorese diente gleichzeitig als Kontrolle über den Zustand des LDLs nach Isolierung und Behandlung. Unspezifische Oxidierungsreaktionen während der Inkubationszeit oder bei zu langer Lagerung würden u.a durch Fettsäure-Peroxidation, Aldehyde entstehen lassen, die an positiv geladene Aminogruppen von Apo B binden, wodurch dieses dann elektronegativer wird, erkennbar an einer beschleunigten Wanderung im elektrischen Feld¹⁵¹ (ähnlich der unspezifischen Oxidierung durch Kupfer).

3. Einfluß von enz.LDL auf die CD36 Expression

Da durch Behandlung von LDL mit 15-Lipoxidase und sPLA₂ HODEs freigesetzt werden, die als Aktivatoren von PPAR γ mehrfach beschrieben wurden, sollte es der Literatur nach in den mit enz.LDL behandelten Zellen zu einer verstärkten CD36 Expression kommen. Nagy et al.¹⁰⁹ beschrieben erstmals, dass Kupfer-oxidiertes LDL in THP1-Zellen und humanen Monozyten über PPAR γ -Aktivierung CD36 hochreguliert. Wir überprüften unsere Hypothese deshalb mit THP1 Zellen, die zufällig sehr hohe Basisexpressionen (mittlere Fluoreszenz ca. 150) von CD36 aufwiesen, und humanen Monozyten. Auch wir beobachteten in einer Zeitreihe

von 24 h bis 72 h eine verstärkte CD36 Expression in den mit Kupfer-oxidierten LDL behandelten Zellen, sowohl in THP1 als auch humanen Monozyten. Unerwartet war die Beobachtung, dass enz.LDL in THP 1 Zellen und humanen Monozyten keinen Einfluß auf die CD36 Regulierung zu haben schien, ebenso 13s-HODE als direkter PPAR γ Aktivator.

Es ergab sich daraus die Frage, weshalb die Freisetzung von HODEs durch enz.LDL so ineffektiv bezüglich der CD36 Expression war, während sich ox.LDL durchaus als effektiv erwies.

Das Ergebnis wurde anhand MM6 Zellen unterschiedlicher Reifegrade, erkennbar an der basalen Expression von Scavenger-Rezeptoren, überprüft. In diesem Fall waren die Beobachtungen entgegengesetzt. Enz.LDL zeigte sich als potenter Induktor der CD36 Expression vor allem in MM6 Zellen ohne Scavenger-Rezeptor-Aktivität. Ox.LDL hatte wiederum kaum Einfluss in diesen Zellen.

Die basale Expression von CD36 scheint demnach Einfluss auf die Wirkung des enz.LDLs zu haben. Ist diese sehr hoch, wie z.B. bei den THP 1 Zellen, könnte es sein, dass die Potenz des enz.LDLs zur CD36 Expression nicht ausreicht, die basale Expression mit vielleicht ausgeprägter PPAR γ Stimulation zu übertreffen. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass das stark und unspezifisch oxidierte LDL auch unspezifisch wirkt und mehrerer Wege neben der PPAR γ -Aktivierung bestreitet, die dann CD36 über die basale Expression hinaus induzieren können.

Eine Hypothese, die sich aus diesen Resultaten ergeben könnte, wäre ein möglicher Zusammenhang zwischen Differenzierungsgrad der Monozyten und deren Reaktion auf enz.LDL: die unreifen Monozyten im Blut, die nahezu keine CD36 exprimieren (frisch isolierte humane Monozyten zeigten im Experiment nur minimale CD36 Expression) reagieren maximal auf enz.LDL, während differenzierte Makrophagen mit reichlich Scavenger-Rezeptoren vor allem auf stark oxidiertes LDL ansprechen. Diese Überlegung könnte man in vivo vergleichen mit den Monozyten, die aus der Blutbahn in die Gefäßwand einwandern, dort zunächst mit minimal modifiziertem LDL in Kontakt treten, dadurch verstärkt CD36 exprimieren und dann auch anfälliger für stark oxidiertes LDL werden. Um mit den Ergebnissen Schlußfolgerungen für mögliche in vivo Prozesse zu ziehen, sollten die Versuchsbedingungen möglichst physiologisch sein. Da die Versuche mit Lipoxidase, isoliert aus Sojabohnen und Phospholipase, stammend aus Meerschweinchen-Pankreas, durchgeführt wurden, sollten in einem Ansatz diese Enzyme durch humane, rekombinante Phospholipase und Lipoxidase aus Retikulozyten von Kaninchen als Vertreter der Säugetiere ersetzt werden. Auch mit diesen Enzymen konnte eine Hochregulierung von CD36, allerdings in geringerem Ausmaß, beobachtet werden.

Bezüglich der Versuche mit den isolierten humanen Monozyten bestand das Problem, dass diese Zellen in Kultur schnell durch Adhäsion an das Plastik der Kulturschalen ausdifferenzierten, sodass sich die minimale Inkubationszeit, die das enz.LDL benötigt (nach Zeitversuch ca. 48 h) möglicherweise mit der Reifung und damit verstärkten CD36 Expressierung überschneidet. Der Versuch, durch Teflon-beschichtete Kulturplatten die Adhäsion und damit Reifung zu hemmen, führte zur Apoptose dieser Zellen und somit konnte die Wirkung auf diese Zellen nicht eindeutig bestimmt werden.

4. Die Aufnahme von enz.LDL über den LDL-Rezeptor

Da sich das enz.LDL strukturell kaum vom nativen LDL unterscheiden sollte, wurde überprüft, ob es vom LDL-Rezeptor erkannt und aufgenommen wird. Sigari et al.¹⁴⁵ beschrieben, dass mit 15-LOX behandeltes LDL an den LDL-Rezeptor von Fibroblasten bindet, die Aufnahme von acetyliertem LDL jedoch nicht beeinflusst. Auch deren Untersuchungsreihe zeigt elektrophoretisch nur eine minimal erhöhte Mobilität gegenüber nativem LDL. Die Aufnahme-Versuche zeigten, dass enz.LDL wahrscheinlich zu einem größeren Teil über den LDL-Rezeptor aufgenommen wird als über Scavenger-Rezeptoren. Ox₃LDL scheint ebenfalls durch beide Rezeptoren erkannt zu werden. Der Proteinanteil (vor allem Apo-B) von ox₂₀LDL ist jedoch so stark fragmentiert (die Radikale zerstören der Literatur nach¹⁵¹ die Peptidbindungen), dass es nicht mehr über den LDL-Rezeptor in die Zelle gelangen kann. Dies könnte die geringe Wirkung von ox₂₀LDL in den MM6 Zellen ohne Scavenger-Rezeptoren erklären. Die gegenüber der Kontrolle leicht gesteigerte Induktion ist vielleicht Folge der spontanen Entstehung von freien HODEs während der Oxidierung (VI.1.1). Nicht erklärbar bleibt, wie ox₂₀LDL in MM6 Zellen ohne Scavenger-Rezeptoren die Aufnahme von enz.LDL doch zu über 50 % blockieren kann. Ox₃LDL enthält zwar viele HODEs (VI.1.1), aber in veresterter Form, sodass es deshalb, wie wir zu diesem Zeitpunkt dachten, nicht in MM6 Zellen wirkt. Die Beobachtung, dass enz.LDL und ox₃LDL insgesamt von MM6sr Zellen stärker aufgenommen werden als von MM6 Zellen ist möglicherweise Folge der fehlenden Aufnahme über Scavenger-Rezeptoren in den MM6 Zellen. In einer Studie wurde eine verstärkte Affinität enzymatisch modifizierten LDLs gegenüber CD14-reichen Monozyten beschrieben⁸⁵. Da MM6sr Zellen stärker als MM6 Zellen CD14 exprimieren, könnte auch dies ein Grund für die verstärkte Aufnahme sein.

5. Die Wirkung von 15-LOX LDL und sPLA₂ LDL auf die CD36 Expression

Die Kontrollansätze mit 15-LOX bzw. sPLA₂ allein behandeltem LDL zeigten für 15-LOX LDL einen positiven Einfluss auf CD36 in MM6 Zellen, während sPLA₂ LDL nur sehr gering die CD36 Expression beeinflusste. Das Ergebnis war zunächst (vor Untersuchung der Aufnahme) unerwartet, weil wir vermuteten, dass nur freie HODEs PPAR γ induzieren können, also nur die Kombination beider Enzyme in der CD36 Induktion erfolgreich sein dürfte. Es besteht die Möglichkeit, dass zelleigene Lipasen das LDL während der Inkubation im nachhinein modulieren oder die Fettsäuren nach Oxidierung mittels 15-LOX durch lysosomalen Abbau in der Zelle freigesetzt werden, da 15-LOX LDL ebenfalls über den LDL-Rezeptor aufgenommen werden müsste. Um diesen Zusammenhang zu überprüfen, versuchten wir den Lysosomenapparat zu blockieren. Da die Aufnahme über den LDL-Rezeptor gleichzeitig an einen lysosomalen Abbau gekoppelt ist, müsste eine Hemmung der lysosomalen Enzyme die Hydrolyse der Fettsäuren, z.B. in 15-LOX LDL blockieren und somit die CD36 Expression geringer ausfallen. Dadurch sollte ein weiterer Hinweis für die Aufnahme über den LDL-Rezeptor und eine mögliche Erklärung bezüglich der Wirkung der 15-LOX LDL gefunden werden. Habenicht et al. verwendeten zu diesem Zweck 60 μ M Chloroquin. Sie untersuchten die Freisetzung von Arachidonsäure aus LDL beim lysosomalen Abbau⁶⁶. Dieser Methode war in unseren Experimenten ungeeignet, da Chloroquin die DNA- und RNA-Synthese blockiert, was für die Zellen letal ist und keine Aussage über die CD36 Expression erlaubt. Wir verwendeten deshalb 15 mM NH₃Cl, was den pH in den Lysosomen geringfügig erhöht und so die Enzyme hemmt. NH₃Cl ist sicher in seiner Wirkung nicht spezifisch und die Ergebnisse als eher kritisch zu betrachten. Mit NH₃Cl konnte die CD36 Expression in enz.LDL- und 15-LOX LDL-behandelten Zellen signifikant gesenkt werden, während die Wirkung von PgJ₂ und 13-HODE unbeeinflusst blieb. Das Ergebnis könnte Hinweis darauf sein, dass die Wirkung von 15-LOX LDL auf lysosomalem Abbau beruht. Im Widerspruch zu dieser Theorie steht die Tatsache, dass ox₃LDL ein hohes Potential an HODEs besitzt, ähnlich wie 15-LOX LDL, auch über den LDL Rezeptor in MM6 Zellen gelangt, aber deutlich weniger stark CD36 induziert. Möglicherweise enthält es andere Isomere von HODEs, die geringere Affinität zu PPAR γ haben (nicht getestet). Da das LDL, welches beiden Enzymen zusammen ausgesetzt war, sich effizienter zeigte in der CD36 Expression, als allein mit 15-LOX behandeltes LDL, vermuteten wir, einen Vorteil durch Vorhandensein vieler *freier* HODEs. Daher wurde untersucht, ob Cholesterin-veresterte HODEs PPAR γ aktivieren können. Die an Cholesterin gebundenen Fettsäuren blieben wirkungslos. Freie HODEs könnten leichter die Membran passieren oder sehr viel schneller über Fettsäure-Transportproteine in die Zelle gelangen und so-

mit früher und stärker wirken. Ferner können Cholesterin-veresterte Fettsäuren im Gegensatz zu LDL veresterten HODEs (15-LOX LDL) auch nicht über den LDL-Rezeptor in die Zelle eindringen, ursächlich durch das Fehlen von Apo-B.

6. CD36 Expression, Differenzierung und Apoptose, drei unabhängige Ereignisse

Eine verstärkte CD36 Expression durch Apoptose-Induktion kann nicht generell ausgeschlossen werden. Aus der Literatur geht hervor, dass Bestandteile oxidierten LDLs, wie Lyso-phosphatidylcholin über Supprimierung der Expression des Caspase-Inhibitors Flice-inhibitory protein (FLIP) in Endothelzellen Apoptose induziert. Dieser Effekt ist auch durch minimal modifiziertes LDL gesehen worden. Oxidiertes LDL macht dadurch die Zellen für FAS-vermittelte Apoptose empfindlich¹³⁴. Makrophagen gelten im Gegensatz zu Monozyten als resistent gegenüber FAS-vermittelte Apoptose. Dies beruht auf einer Hochregulierung von FLIP im Laufe der Monozytendifferenzierung¹¹⁹. Auch 25-Hydroxycholesterol ist für die zytotoxische Wirkung des oxidierten LDLs in Schaumzellen und Endothel verantwortlich, wahrscheinlich durch Aktivierung von Calcium-Kanälen und Ca²⁺ Aufnahme in de Zelle¹³³. Calcium aktiviert die cytoplasmatische Phospholipase, die Membranen lysiert. Da CD36 oxidiertes LDL bindet, begünstigt es die Apoptose und Nekrose der Zellen. Darüber hinaus wirkt die Aktivierung von PPAR γ direkt über eine Hemmung der Transkriptionsaktivität der NF κ B Untereinheit p65/Rel A proapoptotisch²⁶.

Es war daher interessant, ob und wie stark Apoptose in unseren Experimenten vorhanden war und ob diese Ursache der CD36 Hochregulierung verantwortlich war, zumal die CD36 Expression und die Anzahl apoptotischer Zellen zeitabhängig parallel anstieg (VI.7.a). Zu diesem Zweck führten wir mit den behandelten Zellen Apoptose-Assays durch. enz.LDL zeigte eine gegenüber nat.LDL verstärkte Apoptose (nicht signifikant), allerdings nicht in dem Ausmaß wie durch ox₂₀LDL. Ox₃LDL nahm eine Mittelstellung ein. Das zeigt, dass mit dem Grad der Oxidierung der Gehalt toxischer Metabolite zunimmt. Um sicher auszuschließen, dass CD36 unspezifisch durch Apoptose exprimiert wird, behandelten wir Zellen mit bekannten Apoptoseaktivatoren. Trotz zum Teil starker proapoptotischer Wirkung blieb die CD36 Expression im Vergleich zur enz.LDL Kontrolle unberührt.

Da CD36 auch im Laufe der Differenzierung von Monozyten verstärkt von Zellen exprimiert wird⁷⁶, ist auch eine unspezifische CD36 Hochregulierung durch Antreiben der Differenzierung in enz.LDL behandelten Zellen nicht auszuschließen. Um diesen Sachverhalt zu überprüfen, wurde parallel die Expression von CD36 und dem Lipopolysaccharid-Rezeptor CD14, als

Indikator der Reife, in enz.- und ox₂₀LDL behandelten Zellen überprüft. Das Ergebnis ergab eine Induktion des CD14 in beiden Ansätzen, allerdings durch ox₂₀LDL 40fach stärker als durch enz.LDL. Das Ergebnis ist konform mit den Resultaten von Nagy und Tontonoz^{109, 154}, die beobachteten, dass 9-, 13-HODE und ox.LDL in THP1 und humanen Monozyten zu einer CD14 Expression führten. Die CD36 Expression war im Gegensatz dazu in enz.LDL behandelten Zellen weitaus stärker. Das könnte hinweisend sein für eine Reifungsinduktion durch enz.- und ox.LDL und somit ein möglichen Zusammenhang zwischen Monozytenreifung in der Gefäßwand und Kontakt zu modifiziertem LDL darstellen. Zum anderen kann gezeigt werden, dass die Induktion von CD36 nicht ausschließlich differenzierungsbedingt ist.

7. Die CD36 Expression und der Zusammenhang mit PPAR γ

Um zu überprüfen, ob PPAR γ tatsächlich das entscheidende Bindeglied ist zwischen enz.LDL Aufnahme und CD36 Expression wurden verschiedene PPAR γ -Nachweisverfahren durchgeführt. Die Experimente mit Fluoreszenzmikroskopie zeigten, dass MM6 Zellen bereits im nativen Zustand eine deutliche Translokation von PPAR γ aufwiesen, die sich auch durch Behandlung mit enz.-, ox₂₀LDL und HODEs nicht weiter steigern ließ. Auch frisch isolierte unbehandelte Monozyten zeigten bereits nach 24 h z.T. deutlich PPAR γ Translokationen und auch nach 48 h war zwischen Behandlung und Kontrolle kein Unterschied in der Expression zu sehen.

Das Ergebnis wurde mit Western-Blot überprüft und auch hier zeigte sich keine verstärkte Translokation durch enz.LDL. Eine Untersuchung des Gesamtproteins mit FACS-Analyse gab keinen Anhalt für dessen vermehrte Expression. Unsere Ergebnisse widersprechen der Literatur, die aussagt, dass HODEs an PPAR γ im Zytosol binden und dieses dadurch in den Kern transloziert, wo es die Expression verschiedener Gene steuert (= Transaktivierung). Allerdings wurde von Kodera et al.⁸⁹ beschrieben, dass abhängig von der Art des Liganden, PPAR γ mit unterschiedlichen Koaktivatoren der Transkription reagiert und dadurch die Transkriptionsaktivität potenziert wird. Während z.B. Troglitazon und 15dPgJ₂ beide durch unterschiedliche Koaktivatoren eine deutliche Transaktivierung von PPAR γ in COS-1 Zellen induzieren, konnte mit 9-HODE keine Aktivator-Interaktion erkannt werden und es war ebenfalls nicht in der Lage, PPAR γ zu translozieren⁸⁹.

Überraschend war außerdem, dass unreife monozytäre Zelllinien, wie MM6 doch eine ausgeprägte PPAR γ Translokation zeigten. In der Literatur wird beschrieben, dass PPAR γ im Ge-

gensatz zu PPAR α in undifferenzierten Monozyten nicht exprimiert und erst im Laufe der Differenzierung zu Makrophagen induziert wird ²⁶. Wir testeten daher weitere Zelllinien wie MM6sr und Jurkat-Zellen mittels Western-Blot auf die Translokation. Auch in diesen Zellen zeigte sich PPAR γ bereits ausschließlich im Kern. Ein Methodikfehler ist aufgrund eines simultanen Nachweises der Translokation von p65 nach Aktivierung unwahrscheinlich. Dieses Protein ist normalerweise im Zytoplasma vorhanden und wandert erst nach Aktivierung durch TNF α in den Kern.

Da wir in unseren Experimenten einen deutlichen CD36 Anstieg ohne Veränderung von PPAR γ im Sinne einer Translokation oder Expression des Gesamtproteins beobachteten, stellte sich die Hypothese, dass dieser Prozeß nicht rein abhängig von PPAR γ ist. Untersuchungen von Spiegelman und Freeman mit PPAR γ defizienten Stammzellen zeigten, dass die Differenzierung von Monozyten entgegen der Ansichten unabhängig ist von PPAR γ ^{24, 106}. Zudem wurde an Hand von Stammzellen gezeigt, dass 15dPgJ₂ und Troglitazon, bekannte PPAR γ Aktivatoren, nicht auf den Rezeptor angewiesen sind, um antiinflammatorisch zu wirken ²⁴. Es besteht demnach die Möglichkeit, dass auch Metabolite in LDL, wie z.B HODEs Effekte auslösen, die unabhängig sind von PPAR γ . Bezüglich der CD36 Expression wurde beschrieben, dass Troglitazon in PPAR γ -/- Zellen CD36 nicht induzieren kann, die unveränderte basale Expression in diesen Zellen jedoch ist Hinweis dafür, dass CD36 auch unabhängig von PPAR γ exprimiert wird, allerdings scheint er unerlässlich bei der Lipid-induzierten Expression ²⁴.

Um dies genauer zu überprüfen, wurde mittels EMSA untersucht, ob in stimulierten Zellen PPAR γ an die PPREs des CD36 Gens bindet. Die Ergebnisse zeigten eine vermehrte Bindung von PPAR γ an PPRE in den mit enz- und ox₃LDL sowie dPgJ₂ behandelten Zellen im Vergleich zur Kontrolle. Daraus lässt sich zumindest eine gewisse Abhängigkeit der CD36 Expression auf der Ebene der Transkription, eingeleitet durch Bindung von PPAR γ an PPRE des CD36 Gens, ableiten. Die Schritte zwischen der Freisetzung von HODEs und der Bindung von PPAR γ an PPRE bleiben unklar. Ein Problem bestand darin, dass kein spezifischer Antagonist für PPAR γ zu erhalten war, mit dem leicht die Funktion des Rezeptors hätte überprüft werden können. BADGE, ein synthetischer Antagonist, ist erfolgreich in der Antagonisierung von PPAR γ in prä-adipozytären Zellen ¹⁶³, wirkt aber agonistisch in Epithelzellen ¹¹ und erwies sich in unseren Experimenten als hoch toxisch gegenüber MM6 Zellen.

Um einen direkten Beweis für die Abhängigkeit / Unabhängigkeit von PPAR γ zu zeigen, wurden embryonale Stammzellen von Mäusen, PPAR γ defizient und Wildtyp, zu Makropha-

gen differenziert und mit enz.LDL behandelt. Fluoreszenzmikroskopische Bilder zeigen eine verminderte Expression von CD36 in den defizienten Zellen, was letztendlich doch stark hinweisend ist für eine teilweise Abhängigkeit der CD36 Expression von PPAR γ . Das Ergebnis ist konform mit dem Resultat von Evans et al (s.o) ²⁴.

8. Zusammenfassung

In dieser Arbeit sollte die Bedeutung enzymatisch modifizierten LDLs bei der Expression von CD36 als bekannter Scavenger-Rezeptor, auf Monozyten/Makrophagen untersucht werden. Modifiziert wurde natives LDL, stammend aus gesunden Spendern, mit sekretorischer Phospholipase₂ und 15-Lipoxidase, die beide in Plaques nachgewiesen worden waren. Die Idee beruhte auf der biochemischen Überlegung, dass durch Hydrolyse Cholesterin-veresterter Fettsäuren mittels Phospholipase u.a. Linolsäure freigesetzt wird, welche unter dem Einfluß der 15-Lipoxidase in ihr entsprechendes Hydroperoxidderivat, HODE (=Hydroxyoktadeca-dienoic-acid) überführt wird. HODEs gelten als bekannte Aktivatoren des Kernrezeptors PPAR γ , der u.a. die Expression von CD36 auf DNA-Ebene reguliert. Es konnte durch HPLC gezeigt werden, dass freie HODEs nur in dem LDL entstanden sind, das mit beiden Enzymen in Kombination behandelt wurde. In der darauf durchgeführten Sequenzchromatographie zeigte sich als Hauptisomer unter allen theoretisch möglichen Isomeren mit deutlicher Dominanz 13-Hydroxyoctadeca-9Z,11E-dienoic-acid, linksdrehend am asymmetrischen C-Atom (Strukturformel siehe Abb. VII.2). Dieses modifizierte LDL erwies sich in FACS-Analysen auch als stärkster Induktor der CD36 Expression auf monozytären Zelllinien mit fehlender/geringer Basisexpression und zeigte eine graduell abnehmende Potenz in den Zelllinien mit hoher basalen Expression. Die Modifizierung führte dabei nur zu geringen Veränderungen i.S. einer Oxidation des LDLs, erkennbar an der im Vergleich zu Kupfer-oxidiertem LDL nur geringen elektrophoretischen Mobilität. Die Modifizierung des LDLs erlaubte noch eine Aufnahme über LDL-Rezeptoren und könnte erklären, warum enzymatisch-modifiziertes LDL im Gegensatz zu stark oxidiertem LDL auch in Zellen ohne Scavenger-Rezeptoren effektiv ist. Widersprechend zur Literatur wurde weder in der Fluoreszenzmikroskopie noch in FACS- oder Western-Blot-Analysen eine Translokation von PPAR γ in den Kern bzw. eine vermehrte Expression des Gesamtproteins nachgewiesen, jedoch eine deutliche Bindung dieses Rezeptors an die PPREs des CD36 Gens (EMSA). Mit Hilfe PPAR γ defizienter Makrophagen konnte eine Abhängigkeit der LDL-induzierten CD36 Expression letztlich doch gezeigt werden, allerdings blieben die genauen Schritte der PPAR γ Aktivierung

durch HODEs unklar. Auch Differenzierung von Monozyten und Apoptoseprozesse könnten laut Literatur die CD36 Expression beeinflussen. Eine parallele Untersuchung von CD36 Induktion und Apoptoserate bzw. CD14 Expression (als Marker der Differenzierung) ergab, dass enzymatisch modifiziertes LDL sowohl eine leichtgradige Differenzierung und Apoptoseinduktion bewirkt, diese aber unabhängig von der CD36 Expression verlaufen.

Aus den Ergebnissen und Literaturquellen lässt sich ein mögliches Modell zur Bildung von Schaumzellen erstellen:

Natives LDL tritt in den subendothelialen Bereich über und bindet über Apo B-100 an Glukosaminoglykane der extrazellulären Matrix. Dort wird es zunächst nur geringfügig modifiziert. In unserem Modell könnten z.B. durch die Sekretion von sPLA₂ aus Makrophagen und vor allem glatten Muskelzellen, stimuliert u.a. durch Entzündungsmediatoren, veresterte Fettsäuren im nativen LDL hydrolysiert werden, begünstigt durch die Kolokalisation von PLA₂ und LDL an Chondroitinsulphat der Glukosaminoglycane⁷⁷. Das sPLA₂LDL kommt dann in Kontakt mit der 15-Lipoxidase, die in Membranen von aktivierten Endothelzellen und Makrophagen lokalisiert ist. Dort oxidiert sie die ungesättigten Fettsäuren, u.a. Linolsäure (freigesetzt durch sPLA₂) zu HODEs. In diesem Stadium besitzt nun das LDL einen hohen Anteil an HODEs ohne insgesamt stark verändert zu sein, sodass es über den LDL-Rezeptor der frisch eingewanderten Monozyten gebunden und internalisiert wird. Ein Teil der Fettsäuren könnte über den lysosomalen Abbau in das Zytosol der Zelle gelangen, ein anderer Weg wäre die direkt Diffusion durch die Zellmembran oder Aufnahme über best. Fettsäuretransporter. Die HODEs aktivieren PPAR γ über hier nicht erklärable Weise, so dass dieser an die PPREs des CD36 Gens bindet und die Transkription des Rezeptors induziert. Das verstärkt exprimierte CD36 bindet dann auch stark oxidiertes LDL und führt zu dessen ungehemmter Aufnahme mit dem Ergebnis der Schaumzellbildung. Da es außerdem stark toxisch ist, kommt es zur Apoptose und Nekrose der Zellen und damit zu den typischen Lipidplaques.

Parallel und z.T abhängig von der Modifizierung des LDLs treten die Monozyten in die Subintima ein und differenzieren dort zu Makrophagen^{117, 122, 123}. Das ist grundsätzlich der Fall, wenn Monozyten ins Gewebe einwandern, könnte in diesem Fall aber auch induziert sein durch das modifizierte LDL, erkennbar an der verstärkten CD14 Expression.

Die Vorgänge werden in der folgenden Abbildung veranschaulicht:

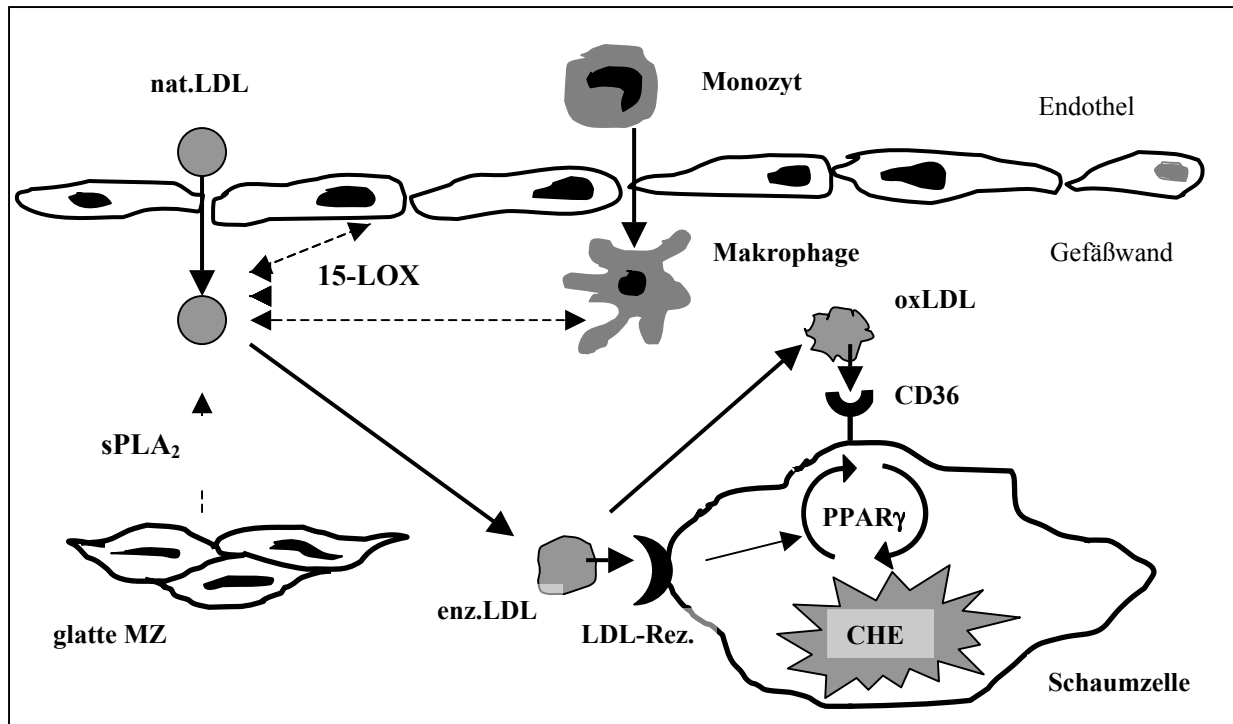


Abb. VII.1: Ein mögliches Modell für die Entstehung von Schaumzellen; modifiziert nach Febbraio et al., J. clin invest: 108: 785-791 (2001); Abkürzungen: enz.LDL = enzymatisch modifiziertes LDL; ox.LDL = oxidiertes LDL; CHE = Cholesterinester; glatte MZ = glatte Muskelzellen; 15-LOX = 15-Lipoxidase; sPLA₂ = sekretorische Phospholipase A₂

Die enzymatische Modifizierung der im LDL veresterten Fettsäuren durch sPLA₂ und 15-LOX veranschaulicht die folgende Abbildung:

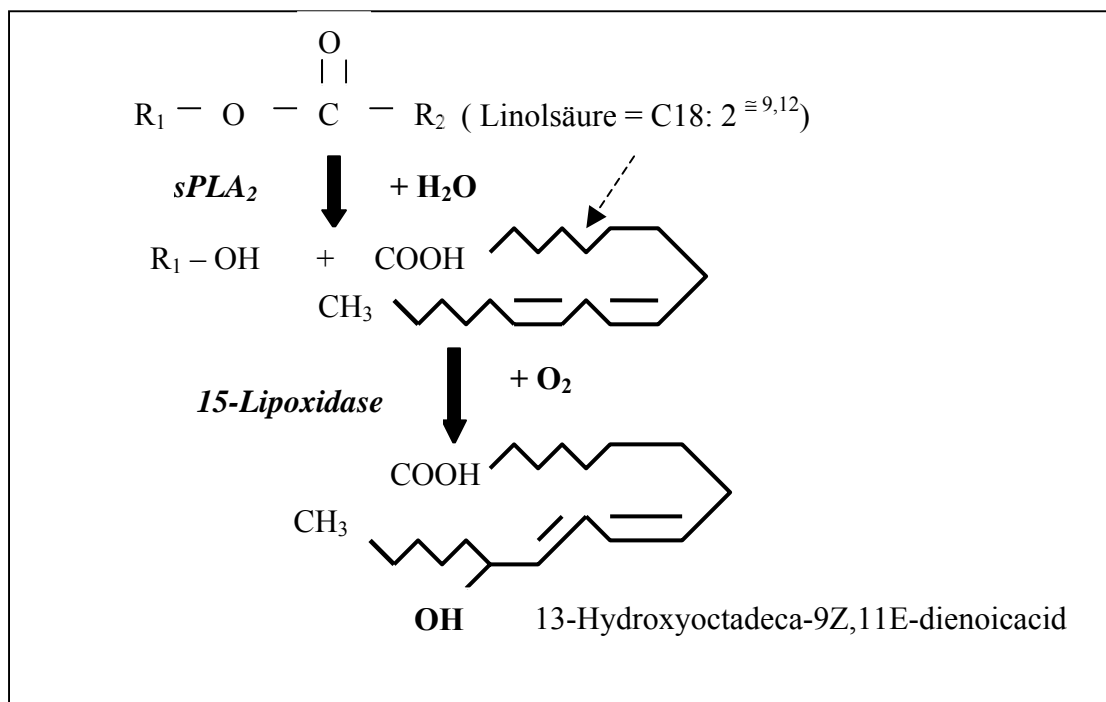


Abb. VII.2: Umwandlung der Linolsäure in ihr Hydroperoxid-Derivat - HODE; Linolsäure ist in Form einer Ester-Bindung an die OH-Gruppe von Cholesterin / Triglyceriden / Phospholipiden (= R₁) gebunden. Unter Einbau eines Moleküls H₂O wird die Esterbindung gespalten (Hydrolyse) und Linosäure freigesetzt. Die 15-Lipoxygenase oxidiert Linolsäure unter Zufuhr von Sauerstoff zu HODE (siehe auch Abb. II.5). Dabei kommt es zu einer Verschiebung der Doppelbindung nach C11 und Bildung einer OH-Gruppe an C13.

Die Entstehung einer Plaque ist komplex und gekennzeichnet durch vielerlei Interaktionen zwischen Zellen untereinander und zwischen Zellen und LDL. Die Hypercholesterinämie ist dabei einer der entscheidenden Risikofaktoren und somit kann das LDL als einer der primären Auslöser gesehen werden. Da das native LDL an sich keinen Schaden in der Gefäßwand anrichtet, ist dessen Modifizierung nötig. Das minimal-modifizierte LDL könnte bei der Bildung von Plaques folgende Bedeutung haben:

- Es wirkt chemotaktisch auf Monozyten^{122, 123} und induziert deren Differenzierung: direkt, erkennbar an Hochregulierung von CD14 (eigene Ergebnisse konform mit^{109, 154}) und indirekt über Induzierung von M-CSF in Endothelzellen in vivo¹¹⁷.
- Es könnte in unreife Monozyten eindringen und über die Expressierung von CD36 diese Zellen auch empfänglich für stark oxidiertes LDL machen.

Die Arbeit zeigt eine Möglichkeit, wie natives LDL im Anfangsstadium der Atherosklerose durch zwei Enzyme so modifiziert wird, dass es sich kaum von nativem LDL unterscheidet, aber trotzdem einen entscheidenden Faktor in der Entstehung von Plaques darstellt.

Literaturverzeichnis:

1. Acton S., Rigotti A., Landshulz K.T., Xu S., Hobbs H.M., Krieger M.: *Identification of Scavenger-receptor BI as a high density lipoprotein receptor*. Science 1996, 271: 518 – 520
2. Acton S.L., Scherer P.E., Lodish H.F., Krieger M.: *Expression cloning of SR-B, a CD36 – related class B scavenger-receptor*. J. Biol. Chem. 1994, 269: 21003 – 21009
3. Anthonen M.W., Stengel D., Hourton D., Ninio E., Johansen B.: *Mildly oxidized LDL induces phospholipase A₂ in human monocyte-derived macrophages*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2000, 20: 1276 - 1282
4. Armesilla A., Vegas M.A.: *Structural organization of the gene for human CD36 glycoprotein*. J. Biol. Chem. 1994, 269: 18985 – 18991
5. Armesilla A.L., Calvo D., Vega M.A.: *Structural and functional characterization of the human CD36 gene promoter*. J. Biol. Chem. 1996, 271: 7781 – 7787
6. Aviram M., Maor I.: *Phospholipase A₂- modified LDL is taken up at enhanced rate by macrophages*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1992, 185: 465 – 47
7. Bailey M.J., Makheej A.N., Lee R., Simon T.C.: *Systemic activation of 15-lipoxygenase in heart, lung and vascular tissue by hypercholesterolemia: relationship to lipoprotein oxidation and atherogenesis*. Atherosclerosis 1995, 113: 247 – 258
8. Bates E.J., Ferrante A., Poulos A., Smithers L., Rathjen D.A., Robinson B.S.: *Inhibitory effects of arachidonic acid (20: 4, n-6) and its monohydroxy-metabolites on procoagulant activity in endothelial cells*. Atherosclerosis 1995, 116: 125 – 133
9. Beamer B.A., Negri C., Yen C.J., Gavrilova O., Rumberger J.M., Durcan M.J., Yarnall D.P., Hawkins A.L., Griffin C.A., Burns D.K., Roth J., Reitman M., Shuldiner A.R.: *Chromosomal localization and partial genomic structure of the human peroxisome proliferators-activated receptor γ (hPPAR γ) gene*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1997, 233: 756 – 759
10. Berliner J.A., Heinecke J.W.: *The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis*. Free Radic. Biol. Med. 1996, 20: 707 – 727
11. Bishop-Bailey D., Hla T., Warner T.D.: *Bisphenol A diglycidyl ether (BADGE) is a PPAR γ agonist in an ECV304 cell line*. Br. J. Pharmacol. 2000, 131: 651 - 654
12. Bonen A., Dyck D.J., Ibrahim A., Abumrad N.A.: *Muscle contractile activity increases fatty acid metabolism and transport and FAT/CD36*. Am. J. Physiol. 1999, 276: E642 – E649

13. Borngräber S., Browner M., Gillmors S., Gerth Ch., Anton M., Fletterick R., Kühn H.: *Shape and specificity in mammalian 15-lipoxygenase active site*. J. Biol. Chem. 1999, 274: 37345 - 37350
14. Bosch H.V.D.: *Intracellular phospholipase A*. Biochim. Biophys. Acta 1980, 604: 191 – 246
15. Boullier A., Gillotte K.L., Hörkkö S., Friedman P., Dennis E.A., Witztum J.L., Steinberg D., Quehenberger O.: *The binding of oxidized LDL to mouse CD36 is mediated in part by oxidized phospholipids that are associated with both the lipid and protein moieties of the lipoprotein*. J. Biol. Chem. 2000, 275: 9163 - 9169
16. Brown M.S., Goldstein L.J.: *Multivalent feedback regulation of HMGCoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth*. J. Lipid Res. 1980, 21: 505 – 517
17. Calvo D., Gomez Coronado D., Suarez Y., Lasuncion M.A., Vega M.A.: *Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL*. J. Lipid Res. 1998, 39: 777 – 788
18. Camp H.S., Tafuri R.: *Regulation of peroxisome proliferators-receptor γ by mitogen-activated protein kinase*. J. Biol. Chem. 1997, 272: 10811 – 10816
19. Carr A.C., Myzak M.C., Stocker R., Mc Call M.R., Frei B.: *Myeloperoxidase binds to low-density lipoprotein: potential implications for atherosclerosis*. FEBS Letters 2000, 487: 176 – 180
20. Cathcart M.K., Morel D.W., Chiolm III G.M.: *Monocytes and neutrophils oxidize low-density lipoprotein making it cytotoxic*. J. Leukoc. Biol. 1985, 38: 341 – 350
21. Chait A., Brazg R.L., Tribble D.L., Krauss R.M.: *Susceptibility of small-dense low density lipoproteins to oxidative modification in subjects with the atherogenic lipoprotein phenotype, patter B*. Am. J. Med. 1993, 94: 350 – 356
22. Chait A., Heinecke J.W.: *Lipoprotein modification: cellular mechanisms*. Curr. Opin. Lipidol. 1994, 5: 365 – 370
23. Charest M.-C., Rhainds D., Falstrault L., Matzouranis T., Brissette L.: *Selective uptake of cholesteryl ester from low density lipoproteins is involved in HepG2 cell cholesterol homeostasis*. Eur. J. Biochem. 1999, 263: 402 – 409
24. Chawla A., Barak Y., Nagy L., Liao D., Tontonoz P., Evans R.M.: *PPAR- γ dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation*. Nature Medicine 2001, 7: 48 – 52

25. Cheng D., Chiang C.C.Y., Qu X.-M., Chang T.-Y.: *Activation of ACAT A: cholesterol acyl-transferase is regulated by cholesterol or by oxysterol in a cell free system.* J. Biol. Chem. 1995, 270: 685 – 695
26. Chinetti Giulia, Griglio S., Antonucci M., Torra I.P., Delerive Ph., Majd Z., Fruchart J.-Ch., Chapman J., Najib J., Staels B.: *Activation of proliferator-activated receptors α and γ induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages.* J. Biol. Chem. 1998, 273: 25573 – 25580
27. Chisolm III G.M., Hazen St.L., Fox P.L., Cathcart M.K. Review: *The oxidation of lipoproteins by monocytes-macrophages; biochemical and biological mechanisms.* J. Biol. Chem. 1999, 274: 25959 – 25962
28. Connor J., Pak C.C., Schroit A.J.: *Exposure of phosphatidylserine in the outer leaflet of human red blood cells: relationship to cell density, cell age, and clearance by mononuclear cells.* J. Biol. Chem. 1994, 269: 2399 – 2404
29. Crowl R.M., Stoller T.J., Conroy R.R., Stoner C.R.: *Induction of phospholipase A₂ gene expression in human hepatoma cells by mediators of the acute phase response.* J. Biol. Chem. 1993, 17: 453 – 464
30. Daugherty A., Cornicelli J.A., Welch K., Sendobry S.M., Rateri D.L.: *Scavenger receptors are present on rabbit aortic endothelial cells in vivo.* Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1997, 17: 2369 – 2375
31. Davies S.S., Pontsler A.V., Marathe G.K., Harrison K. A., Murphy R.C., Hinshaw J.C., Prestwich G.D., Hilaire A. St., Prescott St. M., Zimmerman G.A., McIntyre Th. M.: *Oxidized alkyl phospholipids are specific, high affinity peroxisome proliferator-activated receptor γ ligands and agonists.* J. Biol. Chem. 2001, 276: 16015 – 16023
32. Daviet L., McGregor J.L.: Review: *Functional roles of membrane glycoprotein CD36.* Platelets 1996, 7: 117 - 124
33. De Villiers W.J.S, Fraser I.P., Hughes D.A., Doyle A.G., Gordon S.: *Macrophage-colonial-stimulating factor selectively enhances macrophage scavenger receptor expression and function.* J. Exp. Med. 1994, 180: 705 – 709
34. De Vries H.E., Buchner B., Van Berkel T.J.C., Kuiper J.: *Specific interaction of oxidized low-density lipoprotein with macrophage-derived foam cells isolated from rabbit atherosclerotic lesions.* Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol. 1999, 19: 638 – 645
35. Dennis E.A.: *Diversity of group types, regulation and its function of phospholipase A₂.* J. Biol. Chem. 1994, 269: 13057 – 13060

36. Desvergne B, Wahli W.: *Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism*. Endocrine Reviews 1999, 20(5): 649 – 688
37. Diaz M.N., Frei B., Vita J.A., Keaney J.F.: *Antioxidants and atherosclerotic heart disease*. The New England Journal of Medicine 1997, 7: 408 - 416
38. Diaz-Ricart M., Tandon N.N., Gomez-Ortiz G., Carretero M., Escolar G., Ordians A., Jamieson G.A.: *Antibodies to CD36 (GPIV) inhibit platelet adhesion to subendothelial surfaces under flow conditions*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1996, 16: 883 – 888
39. Dunne D.W., Resnick D., Greenberg J.W., Krieger M., Joiner K.A.: *The type I macrophage scavenger-receptor binds to gram-positive bacteria and recognizes lipoteichoic acid*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1994, 91: 1863 – 1867
40. El Koury J., Hickman S.E., Thomas C.A., Cao L., Silverstein S.C., Loike J.D.: *Scavenger-receptor mediated adhesion of microglia to β -amyloid fibrils*. Nature 1996, 382: 716 – 719
41. El Koury J., Thomas C.A., Loike J.D., Hickman S.E., Cao L., Silverstein S.C.: *Macrophage adhere to glucose – modified basement membrane collagen IV via their scavenger-receptor*. J. Biol. Chem. 1994, 269: 10197 – 10206
42. Endemann G., Stanton L.W., Madden K.S., Bryant C.M., White R.T., Protter A.A.: *CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein*. J. Biol. Chem. 1993, 268: 11811 – 11816
43. Fadok V.A., Voelker D.R., Campbell P.A., Cohen J.J., Bratton D.L., Henson P.M.: *Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages*. J. Immunol. 1992, 148: 2207 - 2216
44. Fadok V.A., Warner M.L., Bratton D.L., Henson P.M.: *CD36 is required for phagocytosis of apoptotic cells by human macrophages that use either a phosphatidylserine receptor or the vitronectin receptor ($\alpha_v\beta_3$)*. J. Immunology 1998, 161: 6250 – 6257
45. Fajas L., Auboeuf D., Raspe E., Schoonjans K., Lefebvre A.M., Saladin R., Najib J., Laville M., Fruchart J.C., Deep S., Vidal-Puig A., Flier J., Briggs M.R., Staels B., Vidal H., Auwerx J.: *The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR- γ gene*. J. Biol. Chem. 1997, 272: 18779 – 18789
46. Febbraio M., Abumrad N., A., Hajjar D.P., Sharma K., Cheng W., Pearce S.F.A., and Silverstein R.L.: *A null mutation in murine CD36 reveals an important role in fatty acid and lipoprotein metabolism*. J. Biol. Chem. 1999, 274: 19055 – 19062

47. Feng J., Han J., Pearson S.F., Silverstein R.L., Gotto A.M., Hajjar D.P., Nicholson A.C.: *Induction of CD36 expression by oxidized LDL and IL-4 by a common signalling pathway dependent on protein kinase C and PPAR- γ* . J. Lipid Res. 2000, 41: 688 – 696
48. Folcik V.A., Nivar-Aristy R., Krajewisky L., Cathcart M.K.: *Lipoxygenase contributes to the oxidation of lipids in human atherosclerotic plaques*. J. Clin. Invest. 1995, 96: 504 – 510
49. Forman B.M., Tontonoz P., Chen J., Brun R.P., Spiegelman B.M., Evans R.M.: *15-Deoxy-delta 12,14-prostaglandin J₂ is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma*. Cell 1995, 83: 803 - 812
50. Fraser I., Hughes D., Gordon S.: *Divalent cation – independent macrophage adhesion inhibited by monoclonal antibody to murine scavenger-receptor*. Nature, 1993, 364: 343 – 346
51. Frieda S., Pearce A., Roy P., Nicholson A.C., Hajjar D.P., Febbraio M., Silverstein R.L.: *Recombinant Glutathione S-Transferase/CD36 fusion proteins define an oxidized low density lipoprotein-binding domain*. J Biol. Chem. 1998, 273: 34875 – 34881
52. Fu Y., Luo N., Lopes-Virella M.F., Garvey W.T.: *The adipocyte lipid binding protein (ALBP / aP2) gene facilitates foam cell formation in human THP-1 macrophages*. Atherosclerosis 2002, 165: 259 - 269
53. Fukumozo M., Shoji T., Emoto M., Kawagishi T., Okuno Y., Nishizawa Y.: *Antibodies against oxidized LDL and carotid artery intima-media thickness in a healthy population*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2000, 20: 703 - 707
54. Gabbay R.A., Sutherland C., Gnudi L., Kahn B.B., O'Brian R.M., Granner D.K., Flier J.S.: *Insulin regulation of phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression does not require activation of the Ras / mitogene-activated protein kinase signalling pathway*. J. Biol. Chem. 1996, 271: 1890 – 1897
55. Geng Y.J., Kodoma T., Hansson G.K.: *Differential expression of scavenger receptor isoforms during monocyte – macrophage differentiation and foam cell formation*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1994, 14: 798 - 806
56. Gillotte K.L., Hörkkö S., Witztum J.L., Steinberg D.: *Oxidized phospholipids, linked to apolipoprotein B of oxidized LDL, are ligands for macrophage scavenger receptor*. J. Lipid Res. 2000, 41: 824 – 833
57. Girnun G.D., Domann F.E., Moore S.A., Robbins M.E.: *Identification of a functional peroxisome proliferators-activated receptor response element in the rat catalase promoter*. Mol. Endocrinol. 2002, 16: 2793 – 2801

58. Glass C.K., Rose D.W., Rosenfeld M.G.: Nuclear receptor coactivators. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1997, 9: 222 - 132
59. Goldstein J.L., Anderson R.W.G., Brown M.S.: *Coated vesicles and receptor-mediated endocytosis.* *Nature* 1979, 279: 679 – 685
60. Goldstein J.L., Brown M.S.: *Regulation of low-density receptors: implication for pathogenesis and therapy of hypercholesterolemia and atherosclerosis.* *Circulation* 1987, 76: 504 – 507
61. Goldstein J.L., Ho Y.K., Bosu S.K., Brown M.S.: *Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979, 76: 333 – 337
62. Greenberg J.W., Fischer W., Joiner K.A.: *Influence of lipoteichoic acid structure on recognition by the macrophage scavenger-receptor.* *Infect. Immun.* 1996, 64: 3318 – 3325
63. Greene M.E., Blumberg B., McBride O.W., Yi H.F., Konquist K., Kwan K., Hsieh L., Greene G., Nimer S.D.: *Isolation of the human Peroxisome Proliferator-activated Receptor gamma cDNA expression in hepatopoietic cells and chromosomal mapping.* *Gene Expr.* 1995,4: 281 – 299
64. Greenwalt D., Lipsky R., Ochenhouse C., Ikedo H., Tandon N., Jamieson G.: *Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine.* *Blood* 1992, 80: 1105 – 1115
65. Greenwalt D., Tandon N.N., Jamieson G.A.: *Role of carbohydrate on the conformation of human and bovin GP IV (CD36).* *Thromb. Haemost.* 1991, 65: 1153 (Abstract)
66. Habenicht A.J.R., Salbach P., Goetig M., Zeh W., Janssen-Timmen, Blattner Chr., King W.C., Glomset J.A.: *The LDL receptor pathway delivers arachidonic acid for eicosanoid formation in cells stimulated by platelet-derived growth factor.* *Nature* 1990, 345: 634 – 636
67. Häkkinen T., Luoma J.S., Hiltunen M.O., Macphee C.H., Milliner K.J., Patel L., Rice S.Q., Tew D.G., Karkola K., Ylä-Herttuala S.: *Lipoprotein-associated phospholipase A₂, platelet-activating factor acetylhydrolase, is expressed by macrophages in human and rabbit atherosclerotic lesions.* *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1999, 19: 2909 – 2917
68. Hampton R.Y., Golenbock D.T., Penman N., Krieger M., Raetz C.R.: *Recognition and plasma clearance of endotoxin by scavenger-receptors.* *Nature* 1991, 352: 342 – 344

69. Hampton R.Y., Raetz C.R.: *Macrophage catabolism of lipid A is regulated by endotoxin stimulation*. J. Biol. Chem. 1991, 266: 19499 – 19509
70. Han J., Nicholson A.C.: *Lipoproteins modulate expression of the macrophage scavenger receptor*. Am. J. Pathol. 1998, 152: 1647 – 1654
71. Harworth R., Platt N., Keshav S., Hughes D., Darley E., Suzuki H., Kurihara Y., Kodoma T., Gordon S.: *The scavenger receptor type A is expressed by activated macrophages and protects the host against lethal endotoxic shock*. J. Exp. Med. 1997, 186: 1431 – 1439
72. Hauser St., Adelmant G., Sarraf P., Wright H.M., Mueller E., Spiegelman B.M.: *Degradation of the peroxisome proliferators activated receptor γ is linked to ligand-dependent activation*. J. Biol. Chem. 2000, 275: 15527 – 18533
73. Hu E., Kim J.B., Sarraf P., Spiegelman B.M. „*Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPAR γ* ” Science 1996, 274: 2100 – 2103
74. Hughes D.A., Fraser I.P., Gordon S.: *Murine macrophage scavenger receptor: in vivo expression and function as receptor for macrophage adhesion in lymphoid and non-lymphoid organs*. Eur. J. Immunol. 1995, 25: 466 – 473
75. Huh H.Y., Lo S.K., Yesner L.M., Silverstein R.L.: *CD36 induction of human monocytes upon adhesion to tumor necrosis factor-activated endothelial cells*. J. Biol. Chem. 1995, 270: 6267 – 6271
76. Huh H.Y., Pearce F.S., Yesner L.M., Schindler J.L., Silverstein R.L.: *Regulated expression of CD36 during monocyte - to - macrophage differentiation: Potential role of CD36 in foam cell formation*. Blood 1996, 87-5: 2020 – 2028
77. Hurt-Camejo E., Andersen S., Standal R., Rosengren B., Sartipy P., Stadberg E., Johansen B.: *Localization of nonpancreatic secretory phospholipase A₂ in normal and atherosclerotic arteries; Activity of isolated enzyme on low-density lipoproteins*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1997, 17: 300 – 309
78. Innerarity T.L.: *The low-density lipoprotein receptor*. Curr. Opin. Lipidol. 1991, 2: 156 – 161
79. Iwashima Y., Eto M., Horiuchi S., Sano H.: *Advanced glycation and product-induced peroxisome proliferator-activated receptor γ gene expression in the cultured mesangial cells*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1999, 264: 441 - 448
80. Jessup W.: *Oxidized lipoproteins and nitric oxide*. Curr. Opin. Lipidol. 1996, 7: 274 - 280

81. Ji Y., Jian B., Wang N., Sun Y., Moya M.L., Philipps M.C., Rothblat G.H., Swaney J.B., Tall A.R.: *SR-BI promotes HDL - mediated cellular cholesterol efflux*. J. Biol. Chem. 1997, 272: 20982 - 20985
82. Jiang Ch., Ting A.T., Seed B.: *PPAR- γ agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines*. Nature 1998, 391: 82 – 86
83. Johnson W.J., Mahlberg F.H., Rothblat G.H., Phillips M.C.: *Cholesterol transport between cells and high-density lipoproteins*. Biochem. Biophys. Acta 1991, 1085: 273 – 298
84. Juge-Aubry C.E., Hammar E., Siegrist-Kaiser C., Pernin A., Takeshita A., Chin W.W., Burger A.G., Meier C.A.: *Regulation of the transcriptional activity of the peroxisome proliferator-activated receptor α by phosphorylation of a ligand-independent transactivity domain*. J. Biol. Chem. 1999, 274: 10505 – 10510
85. Kapinsky M., Torzewski M., Buchler C., Duong C.Q., Rozhe G., Schmitz G.: *Enzymatically degraded LDL preferentially binds to CD14 (high) CD16 (+) monocytes and induces foam cell formation mediated only in part by the class B scavenger-receptor CD36*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2001, 21: 1004 – 1010
86. Kieffer N., Beltaieb A., Legrand C., Coulombel L., Vainchenter W., Edelman L., Breton-Gorius J.: *Developmentally regulated expression of 78 kDa erythroblast membrane glycoprotein immunologically related to the platelet thrombospondin receptor*. Biochem. J. 1989, 262: 835 – 842
87. Kliewer S.A., Lenhard J.M., Willson T.M., Patel J., Morris D.C., Lehmann J.M.: *A prostaglandin J_2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor γ and promotes adipocyte differentiation*. Cell 1995, 83: 813 – 819
88. Kliewer S.A., Umesono K., Noonan D.J., Heyman R.A., Evans R.M.: *Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferators signalling pathways through heterodimer formation of their receptors*. Nature 1992, 358: 771 – 774
89. Kodera Y., Takeyama K., Murayama A., Suzawa M., Masuhiro Y., Kato S.: *Ligand type-specific interactions of peroxisome proliferators-activated receptor γ with transcriptional coactivators*. J. Biol. Chem. 2000, 275: 33201 – 33204
90. Krieger M., Acton S., Ashenas J., Pearson A., Penman M., Resnick D.: *Structure, binding properties and functions of macrophage scavenger-receptor*. J. Biol. Chem. 1993, 268: 4569 – 4572

91. Krieger M., Herz J.: *Structure and function of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptor and LDL receptor – related protein (LRP)*. Annu. Rev. Biochem. 1994, 63: 601 – 637
92. Kritharides L., Jessup W., Mander E.L., Dean R-T.: *Apo A-I mediated efflux of sterols from oxidized LDL-loaded macrophages*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1995, 15: 276 - 289
93. Ku G., Thomas C.E., Akesson A.L., Jackson R.L.: *Induction of Interleukin 1 β expression from human peripheral blood monocyte-derived macrophages by 9-Hydroxyoctadecadienoic Acid*. J. Biol. Chem. 1992, 267: 14183 – 14188
94. Kuhn H., Belkner J., Zaiss S., Fahrenklemper T., Wohlfeil S.: *Involvement of 15-lipoxygenase in early stages of atherogenesis*. J. Exp. Med. 1994, 179: 1903 – 1911
95. Kühn H., Chan L.: *The role of 15-lipoxygenase in atherogenesis: pro- and anti-atherogenic actions*. Current Opinion in Lipidology 1997, 8: 111 – 117
96. Kuijk F.J.G.M., Sevanian A., Handelman G.J., Dratz E.A.: *A new role for phospholipase A₂: protection of membranes from lipid peroxidation damage*. Trends Biochem. Sci. 1987, 12: 31 – 34
97. Kurihara H., Nakano T., Takasu N., Arita H.: *Intracellular localization of group II phospholipase A₂ in rat smooth muscle cells and its relationship to eicosanoid formation*. Biochim. Biophys. Acta 1991, 1082: 285 – 292
98. Landschulz K.T., Pathak R.K., Rigotti A., Krieger M., Hobbs H.H.: *Regulation of scavenger-receptor class B type I, a HDL-receptor, in liver and stereogenic tissues of the rat*. J. Clin. Invest. 1996, 98: 984 – 995
99. Lehmann J.M., Lenhard J.M., Oliver B.B., Ringold G.M., Kliewer S.A.: *Peroxisome proliferators-activated receptor α and γ are activated by indomethacin and after non-steroidal anti-inflammatory drugs*. J. Biol. Chem. 1997, 272: 34006 – 34010
100. Lehmann J.M., Moore L., Smith-Oliver A., Wilkinson W., Willson T.M., Kliewer S.A.: *An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for PPAR γ* . J. Biol. Chem. 1995, 270: 12953 – 12956
101. Li H., Freeman M.W., Libby P.: *Regulation of smooth muscle cell scavenger receptor expression in vivo by atherogenic diets and in vitro by cytokines*. J. Clin. Invest. 1995, 95: 122 – 133
102. Maeno Y., Fujioka H., Hollingdale S., Aitkawa M.: *Structural localization of CD36 in human hepatic sinusoidal lining cells, hepatocytes, human hepatoma (HepG2-A16) cells and C32 amelanotic melanoma cells*. Exp. Parasitol. 1994, 79: 383 – 390

103. Matsumoto et al.: *Human macrophage scavenger receptors: Primary structure, expression and localization in atherosclerotic lesions*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990, 87: 9133 – 9137
104. Matsumoto K., Hirano K., Nozaki S., Takamoto A., Nishida M., Nakagawa-Toyama Y., Janabi M.Y., Ohya T., Yamashita S., Matsuzawa Y.: Expression of macrophage scavenger receptor, CD36, in cultured human aortic smooth muscle cells in association with expression of Peroxisome Proliferator-activated Receptor- γ , which regulates gain of macrophage-like phenotype in vitro and its implication in atherogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2000, 20: 1027 – 1032
105. Maxeiner H., Husemann J., Thomas Ch. A., Loike J.D., Khoury J.E., Silverstone S. C.: *Complementary roles for scavenger receptor A and CD36 of human monocyte-derived macrophages in adhesion to surface coated with oxidized low-density lipoproteins and in secretion of H₂O₂*. J. Exp. Med. 1998, 188: 2257 – 2265
106. Moore K.J., Rosen E.D., Fitzgerald M.L., Randow F., Andersso L.P., Altshuler D., Milstone D.S., Mortensen R. M., Spiegelman B.M., Freeman M.W.: *The role of PPAR- γ in macrophage differentiation and cholesterol uptake*. Nature Medicine 2001, 7: 41 - 47
107. Motojima K., Passilly P., Peters J.M., Gonzalez F.J., Latruffe N.: *Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by Peroxisome proliferators-activated receptor α and γ activators in a tissue- and inducer-specific manner*. J. Biol. Chem. 1998, 273 : 16710 – 16714
108. Murau K., Terpstra V., Green S.R., Kondratenko N., Steinberg D., Quehenberger O.: *Characterization of CLA-1, a human homologue of rodent SR-B1, as a receptor for high-density lipoprotein and apoptotic thymocytes*. J. Biol. Chem. 1997, 272: 17551 – 17557
109. Nagy L., Tontonoz P., Alvarez J.G.A., Chen H., Evans R.M.: *Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR γ* . Cell 1998, 93: 329 – 240
110. Naito M., Suzuki H., Mori T. Matsumoto M., Kodama T., Takahashi K.: *Coexpression of type I and type II human macrophage scavenger receptors in macrophages of various organs and foam cells in atherosclerotic lesions*. Am J Pathol. 1992, 141: 591 – 599
111. Nakagawa T., Nozaki, Nishida M., Yakub J.M., Tomiyama Y., Nakata A., Matsumoto K., Funahashi T. et al.: *Oxidized LDL increases and Interferon- γ decreases ex-*

- pression of CD36 in human monocyte – derived macrophages. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1998, 18: 1350 – 1357
112. Nakano T., Ohara O., Teraoka H., Arita H.: *Group II phospholipase A₂ mRNA synthesis is stimulated by two distinct mechanisms in rat vascular smooth muscle cells.* FEBS Letters 1990, 1: 171 – 174
113. Neuzil J., Upston J.M., Witting P.K., Scott K.F., Stocker R.: *Secretory phospholipase A₂ and lipoprotein lipase enhance 15-lipoxygenase-induced enzymatic and nonenzymatic lipid peroxidation in low-density lipoproteins.* Biochemistry 1998, 37: 9203 - 9210
114. Nicholson A.C., Pearce S.F.A. and R.L.: *Oxidized LDL binds to CD36 on human monocyte-derived macrophages and transfected cell lines.* Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 1995, 15: 269 – 275
115. Nolte R.T., Wisely G.B., Westin S., Cobb J.E., Lambert M.H., Kurokawa R., Rosenfeld R., Willson T.M., Glass C.K., Milburn M.V.: *Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator receptor- γ* Nature 1998, 395: 137 – 143
116. Parathasarathy S., Weiland E., Steinberg D.: *A role for endothelial cell lipoxygenase in the oxidative modification of low density lipoprotein.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989, 86: 1046 – 1050
117. Parhami F., Fang Z.T., Fogelman A.M., Andaliki A., Territo M.C., Berliner J.A.: *Minimal-modified low-density lipoprotein – induced anti-inflammatory responses in endothelial cells are mediated by cyclic adenosine monophosphate.* J. Clin. Invest. 1993, 92: 471 – 478
118. Patel L., Charlton S.J., Marshall I.C., Moore G.B., Coxon P., Moores K., Clapham J.C., Newman S.J., Smith S.A., Macphee C.H.: *PPAR γ is not a critical mediator of primary monocyte differentiation or foam cell formation.* Biochem. Biophys. Res. Commun. 2002, 18: 707 - 712
119. Perlman H., Pagliari L.J., Georganas C., Mano T., Walsh K., Pope R.M.: *FLICE-inhibitory protein expression during macrophage differentiation confers resistance to Fas-mediated apoptosis.* Journal Exp. Medicine 1999, 190: 1679 - 1688
120. Pietsch A., Weber C., Goretzki M., Weber P.C., Lorenz R.L.: *N-3 but not N-6 fatty acids reduce the expression of the combined adhesion and scavenger receptor CD36 in human monocytic cells.* Cell Biochemistry and Function 1995, 13: 211 – 216

121. Poirier H., Braissant O., Niol I., Wahli W., Besnard P.: *9-cis-retinoic acid enhances fatty acid-induced expression of the liver fatty acid-binding protein gene*. FEBS Letters 1997, 412: 480 – 484
122. Quinn M.T., Parthasarathy S., Feng L.G., Steinberg D.: *Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1987, 84: 2995 – 2998
123. Quinn M.T., Parthasarathy S., Steinberg D.: *Lysophosphatidylcholine: a chemotactic factor for human monocyte and its potential role in atherogenesis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998, 85: 2805 – 2809
124. Rapoport S.M., Schewe T., Thiele B.: *Maturational breakdown of mitochondria and other organelles in reticulocytes*. Blood 1991, 23: 105 – 122
125. Reyom S.W., Silverstein R.L., Scotto A., Sparrow J.R.: *Binding of anionic phospholipids to retinal pigment epithelium may be mediated by scavenger receptor CD36*. J. Biol. Chem. 1996, 271: 20536 – 20539
126. Ricciarelli R., Zingg J.-M., Azzi A.: *Vitamin E reduces the uptake of oxidized LDL by inhibiting CD36 scavenger receptor expression in cultured aortic smooth muscle cells*. Circulation 2000, 102: 82 – 87
127. Ricote M., Huang J., Fajas L., Li A., Welch J., Nijab J., Witztum J., Auwerx J., Palinski W., Glass C.: *Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998, 95: 7614 – 7619
128. Ricote M., Li A.C., Willson T.M., Kelly C.J., Glass Ch.K.: *The peroxisome proliferators-activated receptor- γ is a negative regulator of macrophage activation*: Nature 1998, 391: 79 – 82
129. Rigotti A., Edelman E.R., Seifert P., Iqbal S.N., De Mattos R.B., Tempel R.E., Krieger M., Williams D.L.: *Regulation by ACTH of the in vivo expression of the scavenger-receptor class B type I, a high-density-lipoprotein-receptor in stereogenic cells of murine adrenal gland*. J. Biol. Chem. 1996, 271: 33545 – 33549
130. Rinniger F., Brundert M., Jackle S., Kaiser T., Greten H.: *Selective uptake of LDL associated cholesterylesters by human fibroblasts, human HepG2 cells and J774 macrophages in culture*. Biochem. Biophys. Acta 1995, 1255: 141 – 153

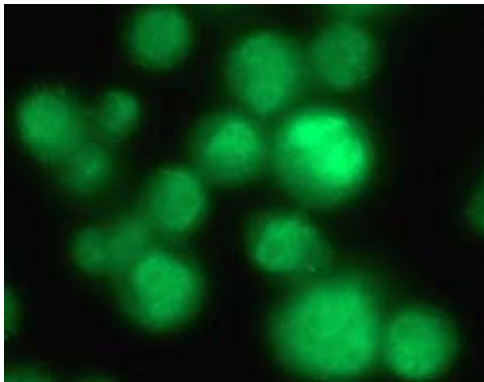
131. Rocchi St., Auwerx J.: *Peroxisome proliferator-activated receptor- γ : a versatile metabolic regulator*. *Ann. Med.* 1999, 31: 342 – 351
132. Ross R., Masuda J., Raines E.W., Gown A.M., Katsuda S., Sasahara M., Malden L.T., Masuko H., Sato H.: *Localization of PDGF-B protein in macrophages in all phases of atherogenesis*. *Science* 1990, 248: 1009 – 1012
133. Rusinol A.E., Yang L., Thewke L., Panini S.R., Kramer M.F., Sinensky M.S.: *Isolation of a somatic cell mutant resistant to the induction of apoptosis by oxidized low density lipoprotein*. *J. Biol. Chem.* 2000, 275: 7296 – 7303
134. Salat M., Walsh K.: *Endothelial cell apoptosis induced by oxidized LDL is associated with the down-regulation of the cellular caspase inhibitor FLIP*. *J. Biol. Chem.* 1998, 273: 33103 – 3106
135. Sambrano G.R., Parthasarathy S. Steinberg D.: *Recognition of oxidatively damaged erythrocytes by a macrophage receptor with specificity for oxidized low density lipoprotein*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994, 91: 3265 – 3269
136. Savill J., Dransfield I., Hogg N., Haslett C.: *Thrombospondin cooperates with CD36 and the VnR in macrophage recognition of neutrophils undergoing apoptosis*. *J. Clin. Invest.* 1992, 90: 1513 – 1522
137. Schmitz G., Robenek H., Assmann G.: *Interaction of high-density lipoproteins with cholesterol ester-laden macrophages: biochemical and morphological characterization of cell surface receptor binding, endocytosis and resecretion of high-density lipoproteins by macrophages*. *EMBO Journal* 1985, 4: 613 – 622
138. Schmitz G., Williamson E.: *High-density lipoprotein metabolism, reverse cholesterol transport and membrane protection*. *Curr. Opin. Lipidol.* 1991, 2: 177 – 189
139. Schneider W.J.: *The low-density lipoprotein receptor*. *Biochem. Biophys. Acta* 1989, 988: 303 – 317
140. Schwarz K., Walther M., Anton M., Gerth Ch., Feussner I., Kühn H.: *Structural basis for lipoxygenase specificity*. *J. Biol. Chem.* 2001, 276: 773 – 779
141. Setty B.N.Y., Berger M., Stuart M.J.: *13-hydroxyoctadeca-9, 11-dienoic acid (13-HODE) inhibits thromboxane A₂ synthesis, and stimulates 12-HETE production in human platelets*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1987, 148: 528 – 533
142. Setty B.N.Y., Berger M., Stuart M.J.: *13-hydroxyoctadecadienoic acid (13-HODE) stimulates prostacyclin production by endothelial cells*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1987, 145: 502 – 509

143. Shao D., Rangwala S.M., Bailey S.T., Krakow S.L., Reginata M.J., Lozar M.A.: *Interdomain communication regulating ligand binding by PPAR γ* . Nature 1998, 396: 377 – 380
144. Shuichi Nozaki, Hirokazu Kashiwagi, Shizuya Yamashita, Tsutomu Nakagawa, Bernd Kostner, Yoshiaki Tomiyama, Atsuyuki Nakata, Masato Ishigami, Jun-ichiro Miyagawa, Kaoru Kameda-Takemura, Yoshiyuki Kurata: *Reduced uptake of oxidized low density lipoproteins in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient subjects*. J. Clin. Invest. 1995, 96: 1859 – 1865
145. Sigari F., Lee C., Witztum J.L., Reaven P.D.: *Fibroblasts that overexpress 15-lipoxygenase generate bioactive and minimal modified LDL*. Arterioscl. Thromb. Vasc. Biol. 1997, 17: 3639 – 3645
146. Spiegelman B.M.: *PPAR- γ in monocytes: less pain, any gain?* Cell 1998, 93: 153 – 155
147. Steinberg D.: *A docking receptor for HDL cholesterol esters*. Science 1996, 271: 468 – 461
148. Suzuki H., Kurihara Y., Tokeya M., Kamada N., Kataoka M., Jishage K., Veda O., Sahaguchi H., Higashi T., Suzuki T., Kodoma T.: *A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection*. Nature 1997, 386: 292 – 296
149. Terpstra V., van Amersfoort E.S., van Velzen A.G., Kuiper J., van Berkel T.J.C.: *Hepatic and extrahepatic scavenger-receptors function in relation to disease*. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2000, 20: 1860 – 1872
150. Terpstra V., Bird D.A., Steinberg D.: *Evidence that the lipid moiety of oxidized low density lipoprotein plays a role in its interaction with macrophage receptor*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1998, 95: 1806 – 1811
151. Thierry J., Teupser D.: *Oxidiertes Low-Density-Lipoprotein und Atherogenese*. Handbuch der Fettstoffwechselstörungen (Hrg.: Schwandt P., Richter W.O., Parhofer K.G.), Schattauer-Ver. 2. Aufl. 2001, 693 – 707
152. Tontonoz P., Hu E., Graves R.A., Budavary A.I., Spiegelman B.M.: *mPPAR γ 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer*. Genes Dev. 1994, 8: 1224 – 1234
153. Tontonoz P., Hu E., Spiegelman B.M.: *Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR γ 2, a lipid-activated transcription factor*. Cell 1994, 79: 1147 – 1156
154. Tontonoz P., Nagy L., Alvarez J.G.A., Thomazy V.A., Evans R.M.: *PPAR γ promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL*. Cell 1998, 93: 241 – 252

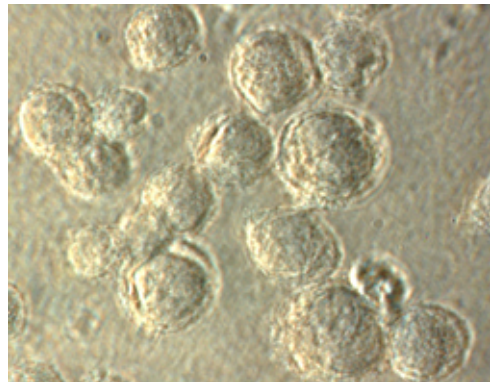
155. Tribble D.L., Holl L.G., Wood P.D., Krauss R.M.: *Variations in oxidative susceptibility among six low density lipoprotein subfractions of differing density and particle size*. *Atherosclerosis* 1992, 93: 189 - 199
156. Uehara Y., Takada S., Hirawa N., Kawabata Y., Nagata T., Numabe A., Hara H., Kudo I., Ikeda T., Inoue K., Sugimoto T., Omata M.: *De novo synthesis of phospholipase A₂ and prostacyclin production by proliferating rat smooth muscle cells*. *Prostaglandins* 1993, 46: 331 – 346
157. Upston J.M., Neuzil J., Stocker R.: *Oxidation of LDL by recombinant human 15-lipoxygenase: evidence for α -tocopherol-dependent oxidation of esterified core and surface lipids*. *J. Lipid Res.* 1996, 37: 2650 – 2661
158. Vie D.P., Pons L., Dennison D.K., Fanslow A.E., Bernini F.: *Induction of acetyl-LDL receptor activity by phorbol ester in human monocyte cell line THP-1*. *J. Lipid Res.* 1989, 30: 1515 – 1524
159. Vu-Dac N., Schoonjans K., Kosykh V., Dallongeville J., Heyman R.A., Staels B., Auwerx J.: *Retinoids increase human apolipoprotein A-II expression through activation of the retinoid x receptor but not the retinoid acid receptor*. *Mol. Cell Biol.* 1996, 16: 3350 – 3360
160. Wang N., Weng W., Breslow L.J., Tall A.: *Scavenger-receptor B-I is upregulated in adrenal gland in apolipoprotein A-I and hepatic lipase knocked-out mice as a response to depletion of cholesterol stress*. *J. Biol. Chem.* 1996, 271: 21001 – 21004
161. Weisgraber K.H., Innerarity T.L., Rall S.C., Mahley R.W.: *Receptor interactions controlling lipoprotein metabolism*. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 1985, 63: 898 – 905
162. Werman A., Hollenberg A., Solanes G., Bjorbaek Ch., Vidal-Puig A.J., Flier J.S.: *Ligand-independent activation domain in the N terminus of Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ (PPAR γ)*. *J. Biol. Chem.* 1997, 272 (32): 20230 – 20235
163. Wright H.M., Clish C.B., Mikami T., Hauser S., Yanagi K., Hiramatsu R., Serhan C.N., Spiegelman B.M.: *A synthetic antagonist for the peroxisome proliferators-activated receptor γ inhibits adipocyte differentiation*. *J. Biol. Chem.* 2000, 275: 1873 - 1877
164. Wyler B., Daviet T., Bortkiewicz H., Bordet J.C., McGregor L.J.: *Cloning of the cDNA encoding human platelet CD36: Comparison to PCR amplified fragments of monocytes, endothelial and HELLA cell*. *Thromb. Haemost.* 1993, 70: 500 – 505

165. Yesner L.M., Hu H.Y., Pearce S.F.A., Silverstein R.L.: *Regulation of monocyte CD36 and TSP expression by soluble mediators*. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1996, 16: 1019 – 1025
166. Ylä-Hertuala S., Luoma J., Viita H., Hiltunen T., Sisto T., Nikkari T.: *Transfer for 15-lipoxygenase gene into rabbit iliac arteries results in the appearance of oxidation-specific lipid-protein adducts characteristic of oxidized low-density lipoprotein*. *J. Clin. Invest.* 1995, 95: 2692 – 2698
167. Ylä-Hertuala S., Rosenfeld M.E., Parthasarathy S., Glass C.K., Sigal E., Witztum J.L., Steinberg D.: *Colocalization of 15-lipoxygenase mRNA and protein with epitopes of oxidized low-density lipoprotein in macrophage-rich areas of atherosclerotic lesions*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1990, 87: 6959 – 6963
168. Yoshida H., Quehenberger O., Kondratenko N., Green S., Steinberg D.: *Minimal oxidized low-density lipoprotein increases expression of scavenger-receptor A, CD36 and macrosialin in resident mouse peritoneal macrophages*. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 1998, 18: 794 – 802
169. Zhang B., Berger J., Zhou G., Elbrecht A., Biswas S., White-Carrington S., Szalkowski D., Moller D.E.: *Insulin- and mitogen-activated protein kinase-mediated phosphorylation and activation of peroxisome proliferators-activated receptor γ* . *J. Biol. Chem.* 271, 31771 – 31774
170. Zhu Y., Qi C., Korenberg J.R., Chen X.N., Noya D., Rao M.S., Reddy J.K.: *Structural organization of the mouse peroxisome proliferators-activated receptor γ (PPAR γ) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR γ isoforms*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, 92: 7921 – 7925

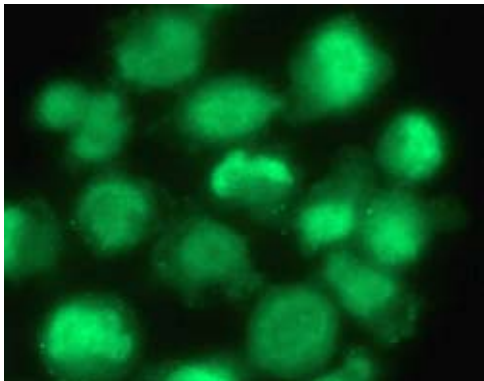
Photographien



Kontrolle

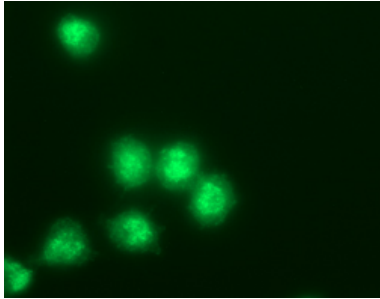


Kontrolle, Phasen-Kontrast

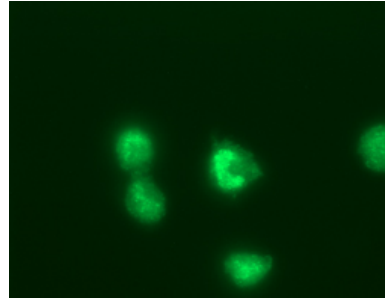


enz.LDL

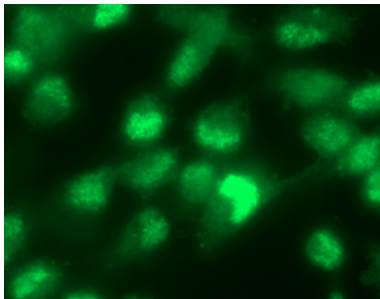
Abb. VI.9.1.a: PPAR γ Expression in MM6 Zellen. MM6 Zellen wurde 24 h mit enz.LDL behandelt (50 μ g/ml) und die Expression im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Das Bild rechts oben stellt die Phasen-Kontrast Aufnahme der Kontroll-Zellen (links oben) dar und soll die Abgrenzung des Kerns zum Zytoplasma hervorheben.



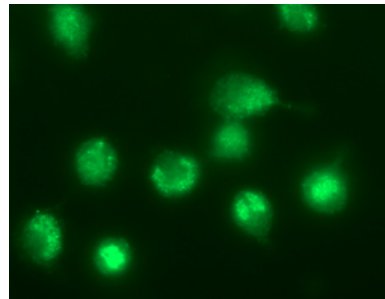
Kontrolle, 24h



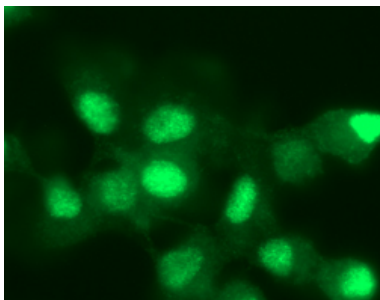
enz.LDL, 24h



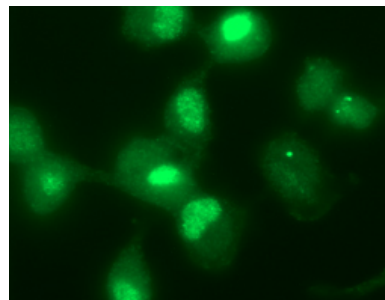
Kontrolle, 48h



enz.LDL, 48h



Kontrolle,72h



enz.LDL, 72h

Abb.VI.9.1.b: PPAR γ Expression in humanen Blutmonozyten. Blutmonozyten wurden für 24 h, 48 h und 72 h mit enz.LDL behandelt (50 μ g/ml) und die PPAR γ Expression mittels Fluoreszenzmikroskopie im Vergleich zur Kontrolle (Fluoreszenz un behandelter Zellen) dargestellt.

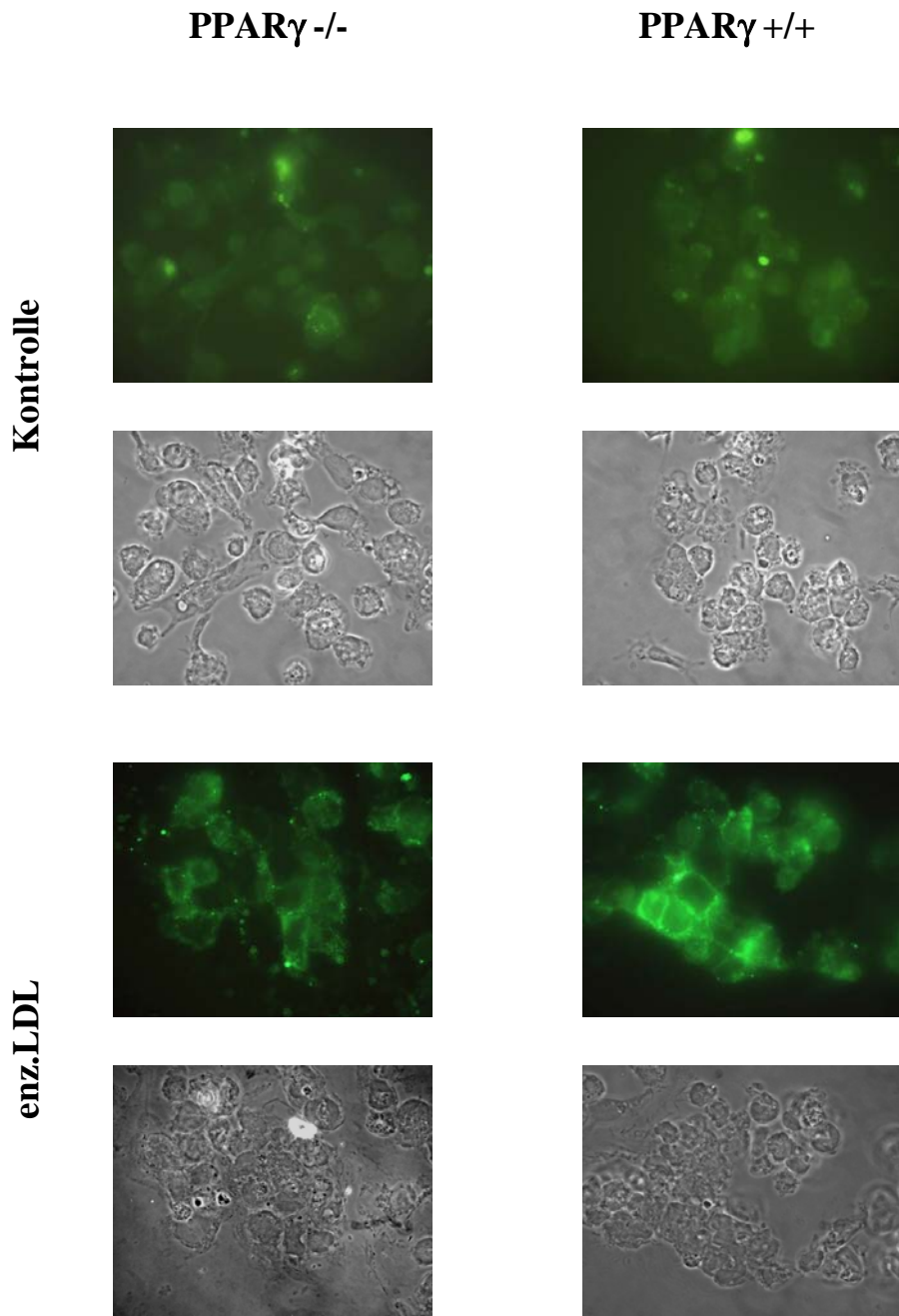


Abb. VI.9.5: CD36 Induktion in PPAR γ -/- und +/+ Makrophagen (differenziert aus embryonalen Stammzellen aus Mäusen) nach Behandlung mit enz.LDL (50 μ g/ml) für 48 h und im Kontrollansatz (unbehandelte Zellen), Fluoreszenz- und Phasen-Kontrast-Aufnahme.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Peter C. Weber möchte ich für die Überlassung des Themas, die Arbeitsmöglichkeiten am Institut sowie die wertvollen Anregungen zur Fertigstellung der Dissertation danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Priv.-Doz. Dr. Nina Hrboticky und Dr. Jiri Neuzil für die ausgezeichnete Betreuung während der praktischen Arbeit und Fertigstellung der Dissertation.

Frau Nina Gellert danke ich für die Ausführung der Western-Blots und Differenzierung der embryonalen Stammzellen in Makrophagen.

Weiterhin danke ich Prof. Kühn, Humboldt-Universität Berlin, für die Analyse der Fettsäuren in den LDL-Proben sowie für die Bereitstellung der aus Kaninchen-Retikulozyten isolierten 15-Lipoxidase.

Frau Dr. Johansen, Universität von Trondheim (Norwegen) danke ich für die Bereitstellung der humanen rekombinanten sekretorischen Phospholipase A₂.

Mein Dank gilt ferner Frau Dr. Andera, Institut für Molekulargenetik der Universität von Prag, für die Durchführung der Elektrophoresis mobility gel-shift assays.

Frau Brigitte Zimmer und Frau Kathrin von Oheimb möchte ich für die Unterstützung bei der Zellkultur sowie Herstellung oxidierten LDLs danken.

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Kristina Irene Jostarndt
Wohnort: Stiftsbogen 35
81375 München
Tel.: 089 / 7148917

Geburtstag und -ort: 28.12.1975 in Marburg

Nationalität: deutsch

Schulbildung

1982 – 1986 Grundsule – Suchsdorf in Kiel
1986 – 1995 Mallinckrodt – Gymnasium in Dortmund

Juni 1995 Abitur

Berufsausbildung

11.1995 – 07.1997 Vorklinischer Studienabschnitt an der LMU München

September 1997 Physikum

11.1997 – 09.2001 Klinischer Studienabschnitt an der LMU München

August 1998 Erstes Staatsexamen
September 2001 Zweites Staatsexamen
Oktober 2002 Drittes Staatsexamen

Dissertation

09.1999 – 09.2001 Experimentelle Forschung unter der Leitung von Prof. Weber am Institut für Epidemiologie und Prophylaxe der Kreislaufkrankheiten, LMU München

Thema: Wirkungsweise enzymatisch modifizierten LDLs bei der Expression des Scavenger-Rezeptors CD36 auf monozytären Zelllinien.

Publikationen:

Kristina Jostarndt, Nina Gellert, Tina Rubic, Christian Weber, Hartmut Kühn, Berit Johansen, Nina Hrboticky, and Jiri Neuzil

Dissociation of Apoptosis Induction and CD36 Upregulation by Enzymatically Modified Low-Density lipoprotein in Monocytic Cells.

Biophysical Biochemical Research Communication 2002; 290, 3: 988 – 993

K. Jostarndt, T. Rubic, H. Kühn, M.W. Anthonsen, L. Andrea, N. Gellert, A. Chawla, M. Trottmann, C. Weber, B. Johansen, R.M. Evans, N. Hrboticky, J. Neuzil

LDL modified by concerted action of secretory phospholipase A₂ and 15-Lipoxygenase upregulates CD36 expression in non-differentiated monocytic cells.

Accepted by Journal of Biological Pharmacology