

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

**Untersuchungen zur mRNA-Expression von MCP-1 und
c-fos bei der Interaktion von Monozyten und
Endothelzellen**

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

vorgelegt von
Michael Zoller
aus
Schwäbisch Hall
2008

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. A. Sellmayer

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. H.-J. Anders

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. D. Reinhart

Tag der mündlichen Prüfung: 31.01.2008

| | |
|--|----|
| Liste der Abkürzungen | 1 |
| 1 Einleitung | 3 |
| 1.1 Allgemein | 3 |
| 1.2 Pathogenese | 4 |
| 1.3 Die Rolle der Monozyten bei der Atheroskleroseentstehung | 8 |
| 1.3.1 Monozyten | 8 |
| 1.3.2 Das Chemokin MCP-1 | 8 |
| 1.3.3 Schaumzellen | 9 |
| 1.4 Die Adhäsionskaskade | 10 |
| 1.4.1 Einteilung der Zelloberflächen-Rezeptoren | 10 |
| 1.4.1.1 Selektine und ihre Liganden | 10 |
| 1.4.1.2 Immunglobulin-Superfamilie (Ig-Superfamilie) | 11 |
| 1.4.1.3 Integrine | 12 |
| 1.4.2 Monozytenadhäsion und -transmigration | 13 |
| 1.5 Signaltransduktion | 15 |
| 1.5.1 c-fos | 16 |
| 1.5.2 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren | 17 |
| 1.5.3 Eicosanoide | 18 |
| 1.5.3.1 Cyclooxygenasen | 20 |
| 1.5.3.2 Lipoxygenasen | 21 |
| 1.5.3.2.1 5-Lipoxygenase | 21 |
| 1.5.3.2.2 12-Lipoxygenase | 22 |
| 1.5.3.2.3 15-Lipoxygenase | 22 |
| 1.5.3.3 Inhibitoren des Arachidonsäurestoffwechsels | 23 |
| 2 Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit | 25 |
| 3 Material und Methoden | 26 |
| 3.1 Material | 26 |
| 3.2 Methoden | 28 |
| 3.2.1 Zellkulturen | 28 |
| 3.2.1.1 Allgemeine Richtlinien für das Arbeiten mit Zellkulturen | 28 |
| 3.2.1.2 Isolation und Präparation der Endothelzellen | 28 |
| 3.2.1.3 Reaktivierung und Präparation der MM6 Zellen | 29 |
| 3.2.2 RNA-Techniken | 31 |

| | |
|--|----|
| 3.2.2.1 Allgemeine Richtlinien für das Arbeiten mit RNA..... | 31 |
| 3.2.2.2 Isolierung gesamtzellulärer RNA..... | 31 |
| 3.2.2.3 Messung der RNA Menge..... | 32 |
| 3.2.3 Northern-Blot..... | 32 |
| 3.2.4 Synthese von <i>Riboprobes</i> (<i>In vitro</i> Transkription)..... | 34 |
| 3.2.5 Hybridisierung..... | 35 |
| 3.2.7 Statistische Auswertung..... | 36 |
| 4 Ergebnisse..... | 37 |
| 4.1 Zellkulturmodell..... | 38 |
| 4.1.1 Expression von MCP-1 und c-fos unter den vorgegebenen Versuchsbedingungen | 38 |
| 4.1.2 Trennung der HUVEC und MM6-Zellen im Transwell®-Membransystem..... | 41 |
| 4.1.3 Induzierbarkeit von MCP-1 in HUVEC..... | 45 |
| 4.1.4 Induzierbarkeit von c-fos in MM6-Zellen..... | 47 |
| 4.2 Untersuchung der Eikosanoidsystem vermittelten Signalübertragung..... | 49 |
| 4.2.1 Versuchsreihe zur selektiven Inhibition von Phospholipase A ₂ | 49 |
| 4.2.2 Inhibition von Cyclooxygenase und Lipoxygenase..... | 52 |
| 4.2.3 Versuchsreihe zur selektiven Inhibition von 5-Lipoxygenase..... | 55 |
| 4.3 Versuchsreihe zur Untersuchung der Signalübertragung über Adhäsionsmoleküle..... | 58 |
| 4.3.1 Versuchsreihe zur Untersuchung der ICAM-1 vermittelten Signalübertragung..... | 58 |
| 4.3.2 Versuchsreihe zur Untersuchung der Fibronectin/Kollagen vermittelten Signalübertragung..... | 61 |
| 5 Diskussion..... | 65 |
| 5.1 VCAM 1 vermittelte MCP-1 Expression..... | 65 |
| 5.2 Signaltransduktion von MCP-1 in HUVEC..... | 68 |
| 5.3 c-fos Induktion in MM6-Zellen..... | 70 |
| 5.4 Stimulation von c-fos durch Kollagen IV..... | 71 |
| 5.5 Stimulation von c-fos durch Arachidonsäure..... | 72 |
| 6 Zusammenfassung..... | 73 |
| 7 Literaturverzeichnis..... | 76 |
| Anhang..... | 95 |
| Danksagung..... | 95 |
| Lebenslauf..... | 96 |

Liste der Abkürzungen

| | |
|------------------------------|---|
| A-, C-, G-, UTP | Adenosin-, Cytosin, Guanosin-, Udenin-Triphosphat |
| A23187 | Calcium-Ionophor A23187 (4-Bromo-Calcimycin) |
| AP-1 | Aktiviertes Protein 1 |
| Bidest. | Bidestilliertes Wasser |
| Bp | Basenpaare |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| cAMP | Cyclisches Adenosin-Monophosphat |
| CCR2 | CC Chemokine Receptor 2 |
| cDNA | Coding Desoxynucleic Acid |
| cGMP | Cyclisches Guanosin-Monophosphat |
| Ci | Curie |
| COX-2 | Cyclooxygenase 2 |
| cpm | counts per minute |
| CREB | Cyclic Adenosine Monophosphate Response Element Binding Protein |
| DAG | Diacylglycerol |
| DEPC | Diethylen Pyrrcarbonat |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonucleinsäure |
| DNase | Desoxyribonuclease |
| DTT | Dithiothreitol |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| FCS | Fetales Kälberserum |
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase |
| HEPES | 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonat |
| HUVEC | Humane Nabelschnurendothelzellen |
| ICAM-1 | Intercellular Cell Adhesion Molecule-1 |
| IEG | Immediate-Early Response Genes |
| IL-1 | Interleukin 1 |
| IP₃ | Inositol-Triphosphat |
| IP₃R | Inositol-Triphosphat Rezeptor |
| LB- Flüssigmedium | Luria-Bertani-Flüssigmedium |
| LPS | Lipopolysaccharide |
| MAPK | Mitogen aktivierte Proteinkinase |
| MCP-1 | Monocyte Chemoattractant Protein-1 |
| M-CSF | Macrophage- Colony Stimulating Factor |
| MM6 | MONO MAC 6 |

| | |
|------------------------|--|
| MOPS | 3-Morpholinopropansulfonsäure |
| mRNA | Messenger Ribonucleic Acid |
| NF-κB | Nuclear Factor κB |
| NO | Nitric Oxide (Stickstoffmonoxid) |
| NSAR | Nichtsteroidales Antirheumatikum |
| NTP | 2'-Ribonucleosid-5'-triphosphat |
| oxLDL | Oxidiertes Low-Density Lipoprotein |
| pAVK | Periphere arterielle Verschlusskrankheit |
| PBS | Phosphatgepufferte Salzlösung |
| PCR | Polymerase chain reaction |
| PDGF | Platelet Derived Growth Factor |
| PGI₂ | Prostaglandin I ₂ |
| PKA | Proteinkinase A |
| PKC | Proteinkinase C |
| PLC | Phospholipase C |
| rATP | ribosomales Adenosin-5'-triphosphat |
| rCTP | ribosomales Cytidin-5'-triphosphat |
| rGTP | ribosomales Guanosin-5'-triphosphat |
| RNA | Ribonucleinsäure |
| RNase | Ribonuclease |
| rpm | Umdrehungen in der Minute |
| RSB | residual salt buffer |
| rUTP | ribosomales Uracil-5'-triphosphat |
| SDS | Sodiumdodecylsulfat |
| SMC | Smooth Muscle Cells |
| SSC | Natriumcitrat |
| TBE | Trisbase mit Borsäure und EDTA |
| TF | Tissue Factor |
| TGF-β | Transforming Growth Factor β |
| TNF-α | Tumor Nekrose Faktor α |
| VCAM-1 | Vascular Cell Adhesion Molecule-1 |

1 Einleitung

1.1 Allgemein

Die Atherosklerose wird heute von der WHO als eine variable Intimaveränderung arterieller Blutgefäße, bestehend aus fokaler Ansammlung von Lipiden, Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, Bindegewebe und Kalziumablagerungen definiert, die mit Veränderungen der Media einhergeht. Diese Gefäßwandveränderungen führen zu Lumeneinengung, Verhärtung, Elastizitätsverlust und schließlich zur Thrombosierung des Gefäßlumens. Die Folgen der Atherosklerose sind arterielle Durchblutungsstörungen, die zum Myokard- und Zerebralinfarkt führen können und die Haupttodesursache in den Industrieländern darstellen. Die atherosklerotische Läsion selbst entspricht einem chronischen entzündlichen Prozeß innerhalb der Gefäßwand (Ross 1999). Nach dieser Vorstellung sind die die Intima auskleidenden Endothelzellen und möglicherweise auch die darunter liegenden glatten Muskelzellen wiederholten oder kontinuierlichen Schädigungen durch chemische, mechanische, immunologische oder toxische Einflüsse ausgesetzt (Ross 1993, Ross 1999). Die geschädigten Zellen induzieren eine spezifische, chronische Entzündungsreaktion mit nachfolgender fibroproliferativer Antwort. Diese Dysfunktion des Endothels wird durch verschiedene Risikofaktoren hervorgerufen und bedingt die Bildung von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche des Endothels. Diese Adhäsionsmoleküle sind in der Lage, zirkulierende Monozyten und T-Lymphozyten zu binden (Ross 1993, Ross 1999). Dieser Prozeß geht mit transendothelialer Migration und subendothelialer Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen unter Mitwirkung zahlreicher Mediatoren einher (Schwartz 1993). Die Monozyten/Makrophagen nehmen eine zentrale Rolle bei der Atherogenese ein, da sie zu jeder Zeit nachweisbar sind (Fuster 1996, Ross 1993, Ross 1999). Ihre eigentliche Aufgabe umfasst die Antigenpräsentation, die Synthese von bioaktiven Substanzen und die Phagozytose. Monozyten/Makrophagen synthetisieren innerhalb der Leukozyten die größte Vielfalt an bioaktiven Substanzen (Fuster et al. 1996, Ross 1993, Ross 1999). Die Erforschung der Interaktion zwischen Endothelzellen und Monozyten/Makrophagen ist somit ein zentraler Aspekt in der Entstehung der Atherosklerose.

1.2 Pathogenese

Aktuell wird Atherosklerose als eine immun-medierte Entzündung mit komplexer Interaktion zwischen Lipidstoffwechsel, Leukozyten, Thrombozyten und Endothelzellen angesehen. (Mangge 2004).

Die Endothelzellläsion wird als erster und wichtigster Schritt in der Pathogenese der Atherosklerose angesehen. Die Endothelzellaktivierung äußert sich in einer erhöhten Adhäsivität des Endothels gegenüber Leukozyten und Thrombozyten, in einer verstärkten Produktion von pro-koagulatorischen Stoffen wie vasoaktiven Molekülen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren (Hansson 2005) und in einer gesteigerten Permeabilität der Endothelzellen (Ross 1999). Durch die erhöhte Permeabilität des Endothels für Makromoleküle, wie z.B. LDL (low density lipoprotein), können diese passiv durch die Endothelzelljunctions diffundieren (Lusis 2000).

Durch die vermehrte Expression von Leukozyten-Adhäsionsmolekülen und von Endothelzell-Adhäsionsmolekülen kommt es zur vermehrten Chemotaxis und Migration von Leukozyten in die Gefäßwand (Ross 1999), [Abbildung 1.1 Stadium I].

Eine Vielzahl von Risikofaktoren sowie Kombinationen dieser Faktoren wurden bisher mit der Ätiologie der Endothelzellläsion in Verbindung gebracht [siehe Tabelle 1.1].

Die frühesten vaskulären atherosklerotischen Läsionen, die sogenannten „fatty streaks“ bestehen vorwiegend aus Entzündungszellen (Makrophagen monozytären Ursprungs, T-Lymphozyten) (Stary 1994). In die Intima eingewanderte Monozyten und Makrophagen nehmen lipidreiche Partikel aus dem Subendothel auf und differenzieren durch oxidierte LDL-Partikel zu Schaumzellen. Begleitet wird diese Erscheinung durch eine vermehrte Migration von glatten Muskelzellen und einer Aktivierung von T-Lymphozyten. Außerdem kommt es zur Adhäsion und Aggregation von Thrombozyten. Der Prozess der Rekrutierung von Monozyten, deren Transformation zu Schaumzellen und die Akkumulation und Proliferation von glatten Muskelzellen induziert die Verdickung der Gefäßintima (Ross 1999), [Abbildung 1.1 Stadium II].

| |
|---|
| Tabakkonsum |
| Erhöhtes LDL-Cholesterin |
| Hypertonie (RR \geq 140/90 mmHg oder antihypertensive Medikation) |
| Niedriges HDL-Cholesterin* (< 1,0 mmol/l bzw. < 40 mg/dl) |
| Diabetes mellitus |
| Familienanamnese positiv für frühzeitige koronare Herzkrankheit Koronare Herzkrankheit bei einem männlichen Verwandten ersten Grades < 55 Jahre Koronare Herzkrankheit bei einem weiblichen Verwandten ersten Grades < 65 Jahre |
| Alter (Männer \geq 45 Jahre, Frauen \geq 55 Jahre) |
| Risikofaktoren durch die Lebensführung Adipositas (BMI \geq 30 kg/m ²) Bewegungsmangel Ernährungsgewohnheiten |
| Neu entdeckte Risikofaktoren Lipoprotein (a) Homocystein Prothrombotische Faktoren Proinflammatorische Faktoren Gestörte Nüchtern glukose Subklinische Atherogenese |

HDL-Cholesterin \geq 1,6mmol/l (\geq 60 mg/dl) gilt als „negativer“ Risikofaktor, sodass ein entsprechender Wert einen der hier genannten Risikofaktoren aufwiegt. LDL = Low-density-Lipoprotein; RR = Blutdruck; HDL= High-density-Lipoprotein, BMI = Body-Mass-Index

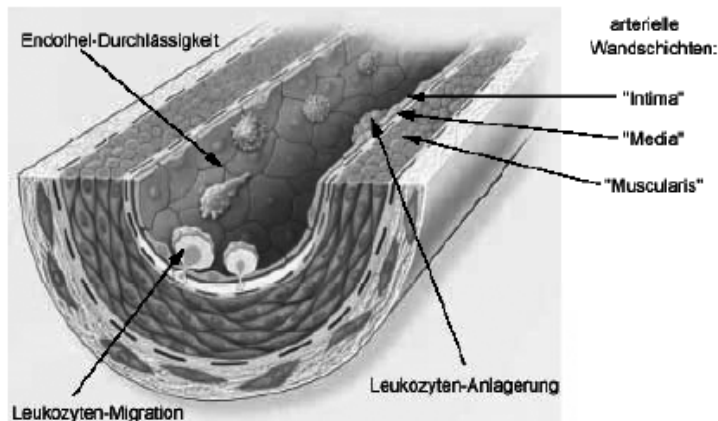
Tabelle 1.1: Wichtige atherosklerotische Risikofaktoren (Quelle: nach Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). JAMA 285:2486, 2001).

Wenn die initiale Entzündungsreaktion die endotheliale Alteration nicht unter Kontrolle bringt, resultiert eine chronische Entzündung. Diese „fatty streaks“ entwickeln sich im Verlauf der Atheroprogression weiter zu manifesten Läsionen. In der Folge kommt es zur zyklischen Akkumulation von mononukleären Zellen, massivem Wachstum des Lipidkerns (Schaumzellen) und schließlich zu einer fibrösen Transformation (Fibröse Plaques). Wie alle Stadien der Atherosklerose wird auch diese von Makrophagen und T-Lymphozyten dominiert (Libby 2002),[Abbildung 1.1 Stadium III].

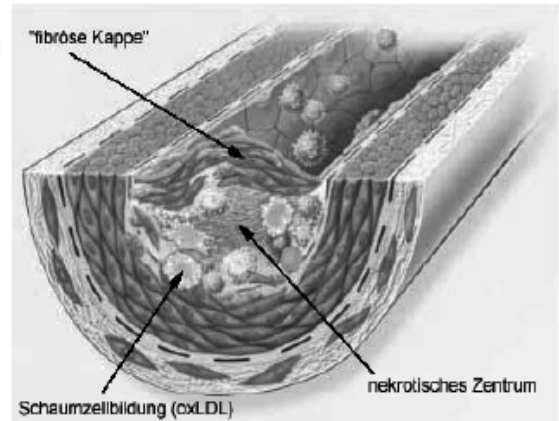
Die Aktivierung der Makrophagen in den Plaques führt zu einer Freisetzung von verschiedenen proteolytischen Enzymen (z.B. Metalloproteinasen), die auf die fibröse Kappe einwirken. Dadurch kann es zur Plaquestabilisierung und zur plötzlichen Plaqueruptur kommen [Abbildung 1.1 Stadium IV].

Diese Ruptur eines atheromatösen Plaques stellt die Hauptursache für den akuten Gefäßverschluss dar und ist damit verantwortlich für den akuten Myokardinfarkt, den akuten zerebrovaskulären Insult sowie den akuten peripheren Gefäßverschluss (Falk 1995).

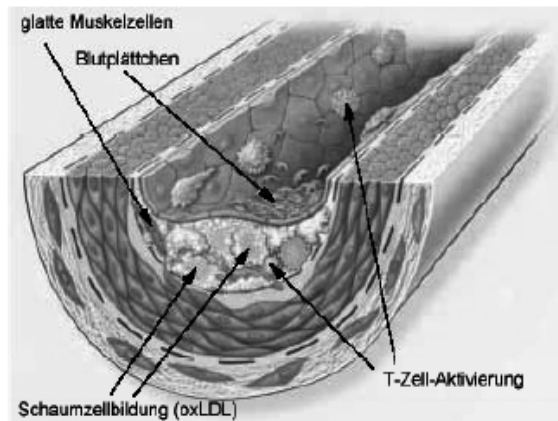
Stadium I



Stadium II



Stadium III



Stadium IV

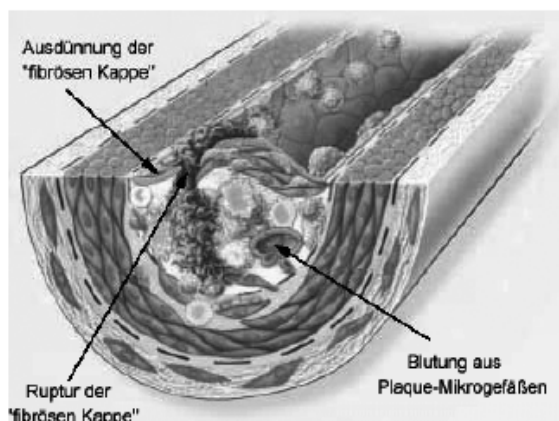


Abbildung 1.1 (Ross 1999)

Stadium I: Schematischer Gefäßschnitt mit adhärierenden Leukozyten, die im Begriff sind, durch Migration in das Subendothel einzuwandern.

Stadium II: Durch eingewanderte und zu Schaumzellen differenzierte Makrophagen bilden sich „fatty streaks“. Die Proliferation von glatten Muskelzellen bewirkt eine Intimaverdickung.

Stadium III: Plaquebildung im atherosklerotischen Gefäß: Die sogenannten „fatty streaks“ entwickeln sich weiter zu manifesten Läsionen. Es kommt zur Ausbildung einer Plaque mit fibröser Kappe.

Stadium IV: Im Plaque befindliche aktivierte Makrophagen setzen proteolytische Enzyme frei, die in der Lage sind, die fibröse Kappe anzugreifen. Folge davon ist die plötzliche Plaqueruptur mit anschließender Thrombosierung.

1.3 Die Rolle der Monozyten bei der Atheroskleroseentstehung

1.3.1 Monozyten

Monozyten spielen bei der Atheroskleroseentstehung eine duale Rolle. In der Frühphase wird die Klärung von modifiziertem, oxidierten LDL (oxLDL) durch Monozyten/ Makrophagen als protektiv (Han 1999; Diaz 1997; Falcone 1991) angesehen., später stimulieren Makrophagen einen Circulus vitiosus, bestehend aus Zellrekrutierung und Freisetzung inflammatorischer Zytokine, und chronifizieren dadurch die arterielle Entzündung.

Die ubiquitär vorkommenden Monozyten, Vorstufe der Gewebsmakrophagen, sind wie bereits dargestellt an jeder Phase der Atherogenese beteiligt (Ross 1999). Generell werden drei Schritte der Monozytenadhärenz an das Endothel unterschieden: Erstens die „rolling“ Phase, welche aus einer verlangsamten Bewegung der Leukozyten entlang der Oberfläche des Endothels besteht. Die anschließende Adhärenz erfolgt mittels Adhäsionsmolekülen z.B. zwischen VLA-4 [Very late antigen 4] und VCAM-1[Vascular cell adhesion molecule 1] (Elices 1990, Li 1993). Drittens erfolgt die Transmigration durch das Endothel. An diesem Prozess nehmen verschieden Chemokine, vor allem MCP-1 [monocyte chemoattractant protein-1] mit seinem CCR2[Chemokin Rezeptor-2] teil. MCP-1 ist ein CC Chemokin, das hauptsächlich über den CCR2 wirkt (Charo 1994).

1.3.2 Das Chemokin MCP-1

MCP-1 ist ein wichtiges chemotaktisches Protein in der Entzündungsreaktion des Endothels. Die Schädigung der Endothelzellen durch mechanische, chemische oder biologische Noxen [siehe Tabelle 1.1] bedingt eine verstärkte Produktion spezifischer Zytokine, allen voran des MCP-1 (Gosling 1999, Gu 1998), welches chemotaktisch auf Monozyten und Lymphozyten wirkt.

Monocytic chemoattractant protein-1, ein Chemokin, ist der Entstehung von sogenannten „fatty streaks“, Plaque-destabilisierenden Vorgängen und Remodellierungsprozessen nach Myokardinfarkt zentral beteiligt (de Lemos 2003). Die bedeutende Rolle von MCP-1 in der Atherogenese konnte im Tiermodell gezeigt werden. In MCP-1- oder MCP-1-Rezeptor-Knockout-Mäusen ist die Cholesterin-induzierte Bildung von atherosklerotischen Läsionen ausgeprägter (Gu 1998, Dawson 1999). So wird MCP-1 in atherosklerotischen Läsionen gefunden, nicht aber in intakten Gefäßen (Yla-Herttuala 1991, Nelken 1991). Daraus kann man schließen, dass die MCP-1 Expression zu einer gesteigerten Atherogenese führt, und zwar durch Rekrutierung von Makrophagen und Akkumulation von oxidiertem Lipid

(Osterud 2003). Diese Funktionen identifizieren MCP-1 als einen zukünftig interessanten, diagnostischen und eventuell auch therapeutisch relevanten Biomarker bei der koronaren Herzkrankheit (Mangge 2004).

1.3.3 Schaumzellen

Die Schaumzellen nehmen eine Schlüsselrolle in der Entstehung der Atherosklerose ein. Nach der Migration wird der Monozyt zum Makrophagen und beginnt mit der vermehrten Expression von Scavenger-Rezeptoren, die modifizierte Lipoproteine aufnehmen können. Und letztendlich wird der Makrophage durch die Aufnahme von Lipiden zur Schaumzelle. Dieser Vorgang wird durch den Makrophagen Colony-Stimulation-Factor (M-CSF) unterstützt. Sie produzieren pro-entzündliche Cytokine, die die lokale entzündliche Verletzung noch verstärken. Zusätzlich schütten sie reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Tissue Factor aus.

Durch die Bildung von Metalloproteinasen (MMPs) kann es zur Destabilisierung der fibrösen Kappe kommen. Die sterbenden Makrophagen und die apoptotischen Zellreste führen dann zum sogenannten „nekrotischen Kern“ der atherosklerotischen Verletzung [siehe Abbildung 1.2].

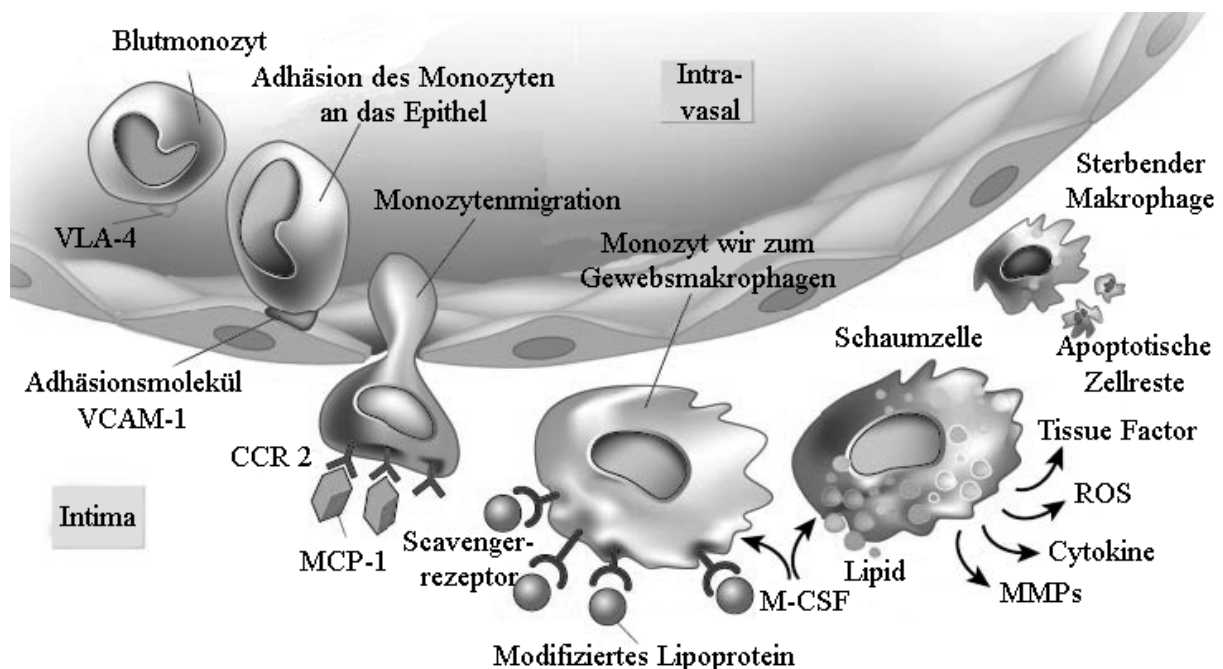


Abbildung 1.2: Monozytenadhäsion und Transformation zum Makrophagen (Libby 2002)

1.4 Die Adhäsionskaskade

Die spezifische Adhäsion von Zellen untereinander oder deren Anheftung an die extrazelluläre Matrix ist eine grundlegende Voraussetzung für die Zellerkennung und für Prozesse der Zellmigration. Sie ist Grundlage für so vielfältige Prozesse wie das Überleben von Zellen, Apoptose, Zelldifferenzierung, Proliferation, Homöostase oder Wundheilung. Bei diesen Phänomenen zeichnet sich die Adhäsion durch Spezifität (Interaktionen von Rezeptoren mit ihren Liganden), Dynamik (Veränderung der Expression und / oder der Affinität von Adhäsionsmolekülen) und Informationsgehalt (Veränderung von Phänotyp, Zellform, Stadium der Zelldifferenzierung oder Position im Zellzyklus) aus. Zell / Zell-Interaktionen und die Adhäsion von Zellen an die extrazelluläre Matrix spielen neben wichtigen physiologischen Phänomenen auch eine Schlüsselrolle bei vielen pathologischen Veränderungen wie eben der Atherosklerose, aber auch bei Tumormetastasierung, Organabstoßungen nach Transplantationen, Ischämie und Autoimmunkrankheiten (Springer, 1990; Frenette 1996a;b).

1.4.1 Einteilung der Zelloberflächen-Rezeptoren

Die beteiligten Zelladhäsionsmoleküle lassen sich unterschiedlichen Familien von Zelloberflächen-Rezeptoren zuordnen:

1. Selektine
2. Immunglobulin-Superfamilie
3. Integrine

Es sei erwähnt, dass neben den o.a. Familien außerdem Cadherine und verschiedene, nicht miteinander verwandte Oberflächenmoleküle mit adhäsiven Fähigkeiten existieren.

1.4.1.1 Selektine und ihre Liganden

Selektine sind Ca^{2+} -abhängige transmembranäre Glykoproteine, deren Vertreter eine Lektin-ähnliche aminoternale Domäne besitzen, der eine variierende Zahl von sich wiederholenden Einheiten mit Homologie zu regulatorischen Proteinen der Komplementkaskade folgt (Gearing 1993). Ferner sind sie durch das Auftreten eines EGF-repeats (*endothelial growth factor*) gekennzeichnet (Bevilacqua 1993). Trotz ihrer kurzen intrazellulären Domäne (Bevilacqua 1993) sind sie in der Lage, nach der Interaktion mit ihren

Liganden co-stimulatorische Signale zu generieren, die zur Aktivierung von Leukozyten beitragen (Brenner 1996; Lo 1997). Sie spielen u.a. eine wichtige Rolle bei der Schmerzkontrolle während inflammatorischer Prozesse (Machelska 1998). Die Vertreter der Selektine vermitteln darüber hinaus die schwache, reversible Bindung von Leukozyten an die Gefäßwand (Gearing 1993). L-Selektin [LAM-1; CD62L] kommt auf Leukozyten vor (Gearing 1993) und wird dort konstitutiv exprimiert (Bevilacqua 1993). P-Selektin [PADGEM; GMP-140; CD62P] wird vorgebildet und in den α -Granula von Blutplättchen oder den Weibel-Palade-Körperchen von Endothelzellen gespeichert (Gearing 1993). Es kann durch Thrombin, Histamin, terminale Komplement-Faktoren, Endotoxine, TNF, Virusinfektionen und H_2O_2 aktiviert werden und wird innerhalb von Sekunden an die Zelloberfläche befördert (Bevilacqua 1993). E-Selektin [ELAM-1; CD62E] wird ausschließlich von Endothelzellen nach der Aktivierung durch Zytokine wie IL-1 oder TNF gebildet (Gearing 1993; Bevilacqua 1993). Das humane E-Selektin enthält Sequenzen, die mit Bindungsstellen von NF γ B und AP-1 übereinstimmen (Bevilacqua 1993). Wie L-Selektin auf der leukozytären Seite, stellt E-Selektin auf endothelialer Seite einen der Hauptvermittler des *rolling* der Leukozyten auf dem Endothel dar. Für P- und E-Selektin sind darüber hinaus spezifische Liganden wie PSGL-1 (Sako 1993) und ESL-1 (Steggmaier 1995) beschrieben worden. E-Selektin spielt eine Rolle bei der Entstehung der Atherosklerose, da es in atherosklerotischen Plaques in erhöhtem Maß exprimiert wird (Abe 1998).

1.4.1.2 Immunglobulin-Superfamilie (Ig-Superfamilie)

Die Mitglieder der Ig-Superfamilie sind ebenfalls transmembranäre Glykoproteine, welche die Membran einmal durchspannen (*single-pass*-Glykoproteine) und vornehmlich eine Ca^{2+} -unabhängige Adhäsion vermitteln (Sluiter 1993; Springer 1994). Sie kommen im Organismus auf verschiedenen Organen und Geweben vor und besitzen mindestens eine Ig-ähnliche Domäne, die auch für Antikörper charakteristisch ist (Springer 1990). Die vermittelte Zell / Zell-Adhäsion erfolgt sowohl über einen homophilen als auch heterophilen Mechanismus (González-Amaro 1998). Den Adhäsionsmolekülen dieser Familie wird u.a. eine große Bedeutung bei der Entwicklung von Wirbeltieren zugeschrieben. So konnte gezeigt werden, dass Mäuse, denen VCAM-1 [Vascular Cell Adhesion Molecule-1] bei der Entwicklung fehlt, entweder anormale Herzen entwickeln, vor der Geburt sterben oder bei Trächtigkeit eine Fehlentwicklung der Plazenta zeigen, da die Allantois nicht mit dem Chorion fusionieren kann (Kwee 1995; Gurtner 1995). Zu den wichtigsten Vertretern zählen neben PECAM

[CD31; auf Endothelzellen, Blutplättchen, Neutrophilen und Monozyten] und NCAM [CD56; auf Nervenzellen] vor allem interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 [ICAM-1] und vaskuläres Adhäsionsmolekül-1 [VCAM-1]. Letztere werden nach Aktivierung während inflammatorischer Prozesse verstärkt exprimiert und sind wichtig für die Adhäsion und transendotheliale Migration von Leukozyten (Carlos 1994). Das Zusammenspiel von ICAM-1 und VCAM-1 ist in der Vergangenheit als eines der wichtigsten Ereignisse bei der Bindung von Leukozyten an Endothelzellen beschrieben worden (Kaplanski 1998). Daraus ergibt sich auch ihre Bedeutung für die Ausbildung der Atherosklerose: *In vivo*-Tierstudien und immunhistochemische Studien von humanen Geweben zeigten, dass die Expression von ICAM-1 und VCAM-1 in atherosklerotischen Plaques stark erhöht ist (Davies 1993).

1.4.1.3 Integrine

Die Mitglieder der Integrin-Familie zählen zu den wichtigsten Oberflächenrezeptoren, die Adhäsion von Zellen untereinander und / oder an die extrazelluläre Matrix vermitteln. Im Folgenden soll nur eine kurze Charakterisierung gegeben werden, da sie hier vornehmlich in ihrer Funktion als Liganden für die Ig-Superfamilie auftreten. Die Erkenntnisse über die Funktionsweise der Integrine liefern allerdings Aspekte, die zur Aufklärung der Rolle anderer Oberflächenrezeptoren beitragen könnten. Integrine sind Zelloberflächenrezeptoren, die Interaktionen zwischen Zellinnerem und Zellumgebung ermöglichen (Hynes 1992). Es handelt sich um $\alpha\beta$ -heterodimere, transmembranäre Glykoproteine (Corbí 1996), die neben Zell / Substrat- Interaktionen auch Zell / Zell-Adhäsion vermitteln, indem sie die zellulären Adhäsionsmoleküle der Ig-Superfamilie binden. Viele Integrine werden konstitutiv an der Zelloberfläche exprimiert, sind aber inaktiv und müssen erst durch ihren Agonisten aktiviert werden (Sánchez-Mateos 1996). Sie übernehmen wichtige Funktionen sowohl bei der hämatopoetischen Zellentwicklung, bei der Zellmigration als Antwort auf Verletzungen, der Angiogenese und für den extrazellulären Matrixkontakt (siehe Abbildung 1.3).

Die Angehörigen dieser Familie sind ubiquitär und übernehmen Signalwirkung (*outside-in-signaling*), wobei Liganden-besetzte und angehäufte (*clustered*) Integrine sowohl Zellform als auch Organisation des Zytoskeletts kontrollieren und eine Vielzahl von biochemischen Signalen generieren (Juliano 1993; Clark 1995). Im Gegensatz zu klassischen Rezeptoren lösen sie außerdem extrazelluläre Effektorantworten aus (*inside-out-signal*) (Shattil 1997). Als wichtige Vertreter seien hier die Liganden für die Ig-Superfamilien-Moleküle ICAM-1 und VCAM-1 erwähnt. $\alpha L\beta 2$ [LFA-1; CD11a/CD18] ist einer der Hauptvermittler der

Adhäsion von Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten an das Endothel und wird von ICAM-1 gebunden. $\alpha 4\beta 1$ [VLA-4; CD49d/CD29] kommt auf Neutrophilen, Monozyten, Lymphozyten und natürlichen Killerzellen vor und ist der Ligand für VCAM-1 (Postigo 1993). Alle Familien tragen mit spezifischen Vertretern zu der Adhäsion und Transmigration von Monozyten bei der Atherosklerose bei. Erst das Zusammenspiel der verschiedenen Zelladhäsionsmoleküle gewährleistet die Rekrutierung der inflammatorischen Zellen (Springer 1990; Kansas 1996). Dabei können unterschiedliche Prozesse unterschiedlichen Rezeptoren zugeordnet werden.

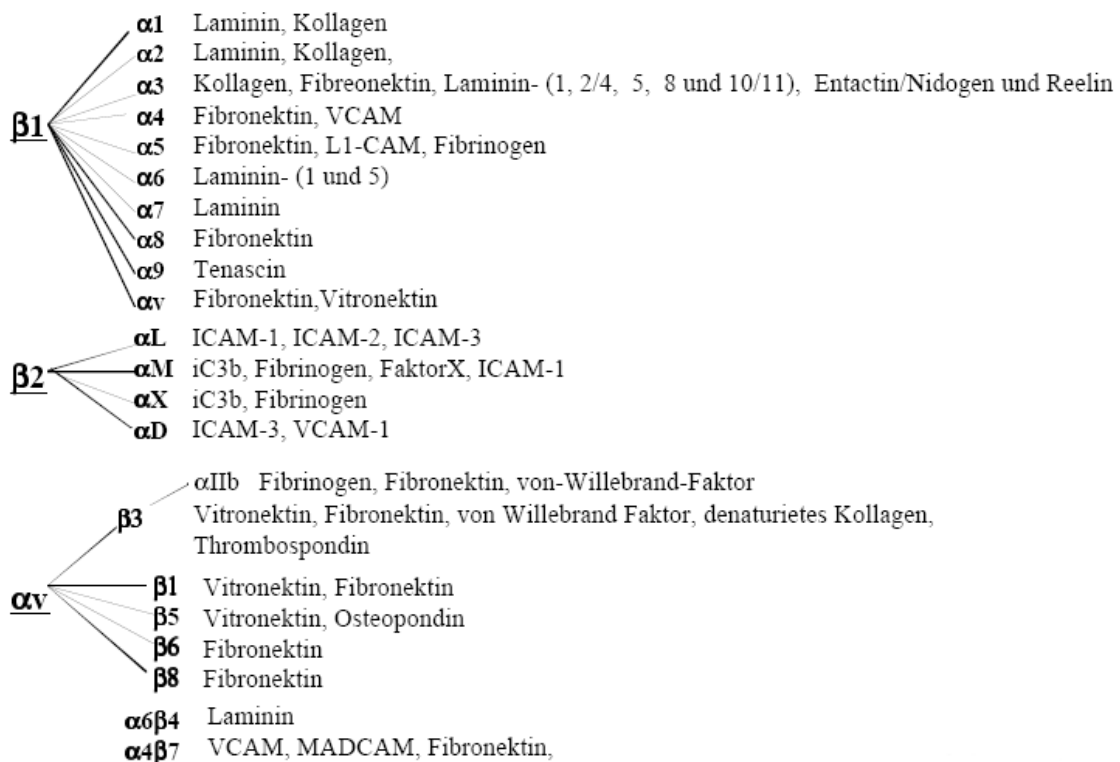


Abbildung 1.3: Die drei Integrin-Subfamilien ($\beta 1$, $\beta 2$ und αv), die verschiedenen Kombinationen und deren Liganden (Jin 2004).

1.4.2 Monozytenadhäsion und -transmigration

Das Zusammenspiel von E-Selektin, ICAM-1 und VCAM-1 bei der Atheroskleroseentstehung. Die Adhäsion von Monozyten an das Endothelium der Arterien ist eines der wesentlichen Ereignisse in der Pathogenese der Atherosklerose. Die Bindung der Monozyten an Endothelzellen erfolgt durch eine Kaskade von Adhäsionsschritten (Springer, 1990; Frenette 1996 b), die durch aufeinanderfolgende Interaktionen von spezifischen

Adhäsionsrezeptoren mit spezifischen Liganden oder Gegenrezeptoren bestimmt wird. Die transendotheliale Migration der Monozyten in den subendothelialen Raum, die Akkumulation in der Intima und Entwicklung zu Schaumzellen ("foam cells") und die Synthese von Zytokinen und Wachstumsfaktoren sind in Folge der Monozytenadhäsion entscheidende pathogenetische Faktoren. Die Endothelzellen nehmen am atherosklerotischen Prozeß mit der Expressierung von zellulären Adhäsionsmolekülen (CAM) auf ihrer Zelloberfläche teil (Fuster 1996, Ross 1993). Diese Adhäsionskaskade ermöglicht es den Monozyten, in die Gefäßwand zu migrieren. Einige der "klassischen" Familien der Adhäsionskaskade (Selektine, Integrine, Immunglobulin-Superfamilie) wurden bisher in experimentell induzierten atherosklerotischen Läsionen von Tieren nachgewiesen. In hypercholesterinämischen Tiermodellen wurde die VCAM-1-Expression auf arteriellen Endothelzellen auf frühen atherosklerotischen Läsionen (Cybulsky 1991) nachgewiesen. Beim Menschen sind bislang folgende zwei Mitglieder der Immunglobulin-Superfamilie nachgewiesen worden: ICAM-1 (Davies 1993, Johnson-Tidey 1994, Poston 1992, Printseva 1992, van der Wal 1992, Wood 1993) und VCAM-1 (Davies 1993, Ruco 1995, Wood 1993). Dabei erfolgt die Rekrutierung der Monozyten bei chronischen Entzündungen wie der Atherosklerose soweit bekannt nach einem ähnlichen Mechanismus wie bei akuter Inflammation. Die Adhäsion wird zunächst durch die Aktivierung des Endothels durch inflammatorische Zytokine wie TNF- α , IL-1 und -4 (Raines 1996) oder Thrombin (Kaplanski 1998) signifikant erhöht. Daraufhin wird in den Endothelzellen die Expression der verschiedenen Oberflächen-Adhäsionsmoleküle induziert, die als Rezeptoren für monozytäre Liganden fungieren (Carlos 1994). Die Oberflächenrezeptoren agieren im Verbund mit chemotaktischen Molekülen wie MCP-1 (*monocyte chemotactic protein-1*) und ermöglichen die Anlagerung der Monozyten. In der ersten Phase adhären die Zellen durch eine reversible Bindung, die seitens der Gefäßwand durch P- und E-Selektin vermittelt wird (*rolling*). Im weiteren Verlauf interagieren nun die endothelialen Oberflächenrezeptoren ICAM-1 und VCAM-1 mit ihren monozytären Liganden. Die anfänglich lockere Bindung über E-Selektin wird dadurch nunmehr durch das irreversible *sticking* abgelöst, so dass die Monozyten fest an der Gefäßwand haften und sich ausbreiten können (*spreading*). VCAM-1 und ICAM-1 ermöglichen neben β_2 -Integrinen die darauf folgende Transmigration der Leukozyten. Aufgrund des chemotaktischen Gradienten, der von Entzündungsherden ausgeht, wandern die Monozyten dann zwischen angrenzenden Endothelzellen zum Ort der Inflammation. Die beteiligten Adhäsionsmoleküle übernehmen bei diesem Prozess mehrere Funktionen. Zum einen vermitteln sie die Bindung der Monozyten an Endothelzellen, zum anderen vermögen sie über freigesetzte Zytokine die

Expression von weiteren Adhäsionsmolekülen zu stimulieren. Dies bedingt seinerseits eine Verstärkung der Monozytenadhäsion und infolgedessen eine erhöhte Einwanderung ins Gewebe. Darüber hinaus kann durch die Bindung des Liganden an seinen Zelloberflächen-Rezeptor ein Signal generiert werden, das intrazelluläre Veränderungen bewirkt. Nicht zuletzt müssen Oberflächenrezeptoren auch Verbindungen zum Zytoskelett aufweisen, um ihre Funktion ausüben zu können.

Dabei sollte hinsichtlich der Atherosklerose zunächst ein besonderes Augenmerk auf den Oberflächenrezeptor VCAM-1 gerichtet werden, da er sowohl die Anheftung als auch die darauf folgende Diapedese von Monozyten vermittelt. Durch eine funktionelle Blockade von VCAM-1 wäre es somit eventuell möglich, zwei unerwünschte Prozesse der chronischen Rekrutierung von Monozyten gleichzeitig zu inhibieren.

1.5 Signaltransduktion

Die Kommunikation zwischen individuellen Zellen oder extrazelluläre Stimuli ist eine wichtige Voraussetzung für die Aufrechterhaltung der Homöostase eines Organismus. Informationen in Form chemischer oder physikalischer Signale z.B. Wachstumsfaktoren, Zytokine, Eicosanoide und Sauerstoffradikale können von Zellen über spezifische Rezeptoren detektiert und in zelluläre Antworten umgesetzt werden, sie beeinflussen die Proliferation und Differenzierung von eukaryotischen Zellen.. Bei einem Großteil der bekannten Rezeptoren handelt es sich um transmembranäre Proteine, die durch Bindung des Liganden an die extrazelluläre Seite des Rezeptors aktiviert werden. Mittlerweile ist eine Vielzahl solcher Signalübertragungswege bekannt. Die Mehrzahl membrandurchspannender Rezeptoren koppelt an heterotrimere Guaninnukleotid-bindende Proteine (G-Proteine), welche die Aktivität verschiedener Effektoren wie Enzyme und Ionenkanäle beeinflussen können. Die Regulation der Aktivität dieser Effektormoleküle führt zu schnellen Veränderungen von „second messenger“- Konzentrationen wie z.B. cAMP, Inositolphosphaten, Diazylglyzerol (DAG) oder zytosolischen Ionenkonzentrationen, wodurch eine zelluläre Antwort ausgelöst wird. Second Messenger wiederum bedingen die Aktivierung spezifischer Proteinkinasen. Die aktivierten Proteinkinasen bilden Kaskaden der Aktivierung und Deaktivierung weiterer Kinasen, wodurch sich der Baum der Signalübertragung in viele Einzelschritte unterteilt. Am Ende solcher Proteinkinase-Kaskaden steht die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, welche die Expression spezifischer Genprodukte im Zellkern regulieren. Mittlerweile konnte

eine Reihe von Transkriptionsfaktoren definiert werden, deren Aktivierung nicht an eine de-novo Synthese ihrer Proteinmatrix gebunden ist. Sie liegen in einer inaktiven Form bereits innerhalb der Zelle vor, und ihre transkriptionelle Aktivität wird durch Bindung spezifischer Aktivatorproteine reguliert. Die Familie dieser Rezeptoren wird als „Immediate Early Response Genes“ bezeichnet. Sie stellen das Endglied in der intrazellulären Signalübertragung dar und binden an spezifische Gensequenzen in der Promotorregion ihrer Zielgene, wodurch deren Transkription und Expression gesteuert wird.

So dienen die „immediate-early-Gene“ als nukleäre Verbindung zwischen zytoplasmatischen Ereignissen und Veränderungen der Genexpression. Die am besten charakterisierten Mitglieder dieser Gruppe sind c-fos, c-jun, NF- κ B und egr-1.

1.5.1 c-fos

Der c-fos Promotor ist einer der am besten studierten Systeme in der Regulation der eukaryotischen Transkription. Er enthält Bindungsstellen für eine Vielzahl von Transkriptionsaktivatoren und -repressoren. Diese Erkenntnis gewann jedoch erst an Bedeutung, als eine Wirkungsbeziehung zwischen aktivierten Transkriptionsfaktoren und der verstärkten Synthese proatherogener Zytokine und Adhäsionsmoleküle im Verletzungsmodell nachgewiesen werden konnte. So konnten in der Promotorregion der Gene für E-Selectin, VCAM-1 und ICAM-1 Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 [transkriptionell aktive Form des Protoonkogens c-fos] nachgewiesen werden (Hu 1994, Hu 1997, Hu 2000, Iademaro 1992, Montgomery 1991, Poston 1992). Durch den AP-1-Weg und den NF- κ B-Weg werden Gene von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-2, IL-6 und TNF- α aktiviert (Chinetti 2000). AP-1 ist auch an der Apoptose beteiligt. Im nekrotischen Kern der atherosklerotischen Läsion findet man, wie erwähnt, apoptotische Zellen (Okura 2000). Die AP-1 Aktivität kann durch verschiedene Stimuli, u.a. Zytokine (Dixit 1989), bakterielle Endotoxine, oxidativen und mechanischen Stress, Antioxidanzien (Monoz 1996) sowie Hypoxie (Brandyopadhyay 1995) und LDL (Zhu 1998) induziert werden. AP-1 verursacht als distale Ereignisse die Induktion der Synthese von Entzündungsmediatoren wie z.B. intercellular adhesion molecule-1 [ICAM-1] und MCP-1 in Endothelzellen (Wang 1999). AP-1 ist ein Homo- oder Heterodimer aus den Protoonkogenen c-fos und c-jun, die Signaltransduktion von jun/fos am Beispiel von Integrinen und Wachstumsfaktoren hat Giaccotti (1999) dargestellt (siehe Abbildung 1.4).

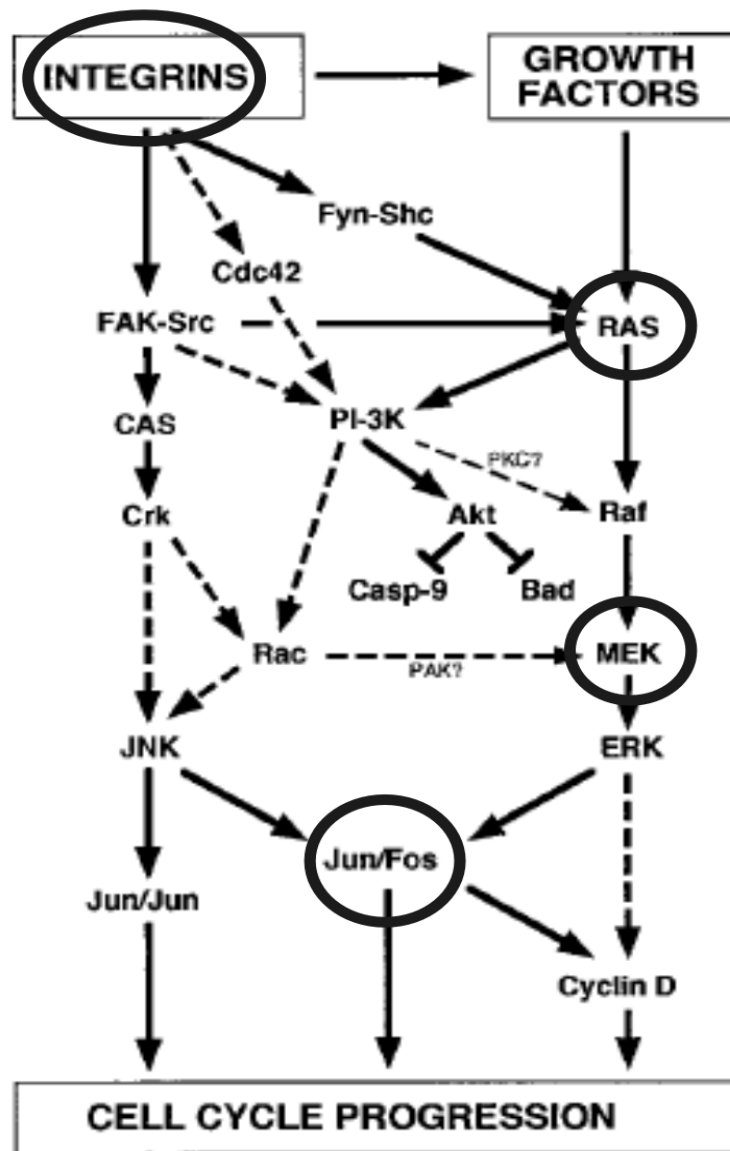


Abbildung 1.4: Aktivierung von Transkriptionsfaktoren Jun/Fos (AP-1) z.B. über Integrine, G-Proteine (RAS) und MAPKinasen (MEK/ERK) (Giancotti 1999).

1.5.2 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) stellen die größte Gruppe der Zelloberflächen-Rezeptoren dar. Mehrere hundert Typen, Subtypen und Isoformen von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren sind während der letzten zehn Jahre identifiziert worden. Die Regulation der Aktivität dieser Effektormoleküle führt zu schnellen Veränderungen von „second messenger“-Konzentrationen wie z.B. cAMP, Inositolphosphaten, Diazylglyzerol (DAG) oder zytosolischen Ionenkonzentrationen, wodurch eine zelluläre Antwort ausgelöst wird. Die über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren regulierten zellulären Funktionen reichen von kurzfristigen Effekten wie der Regulation metabolischer Prozesse bis hin zu langfristigen Effekten wie

Proliferation und Differenzierung. Zum Beispiel können Rho-GTPasen über membranäre Rezeptoren eingegangene extrazelluläre Signale über Kinasekaskaden weiterleiten. Kinasen, die zur großen MAPK (“mitogen activated protein kinase“) -Familie gehören, vermitteln die zelluläre Antwort auf verschiedenste Einflüsse wie beispielsweise Stress. Mögliche Zusammenhänge von G-Proteinen und der Expression von MCP-1 und c- fos zeigt Abbildung 1.5.

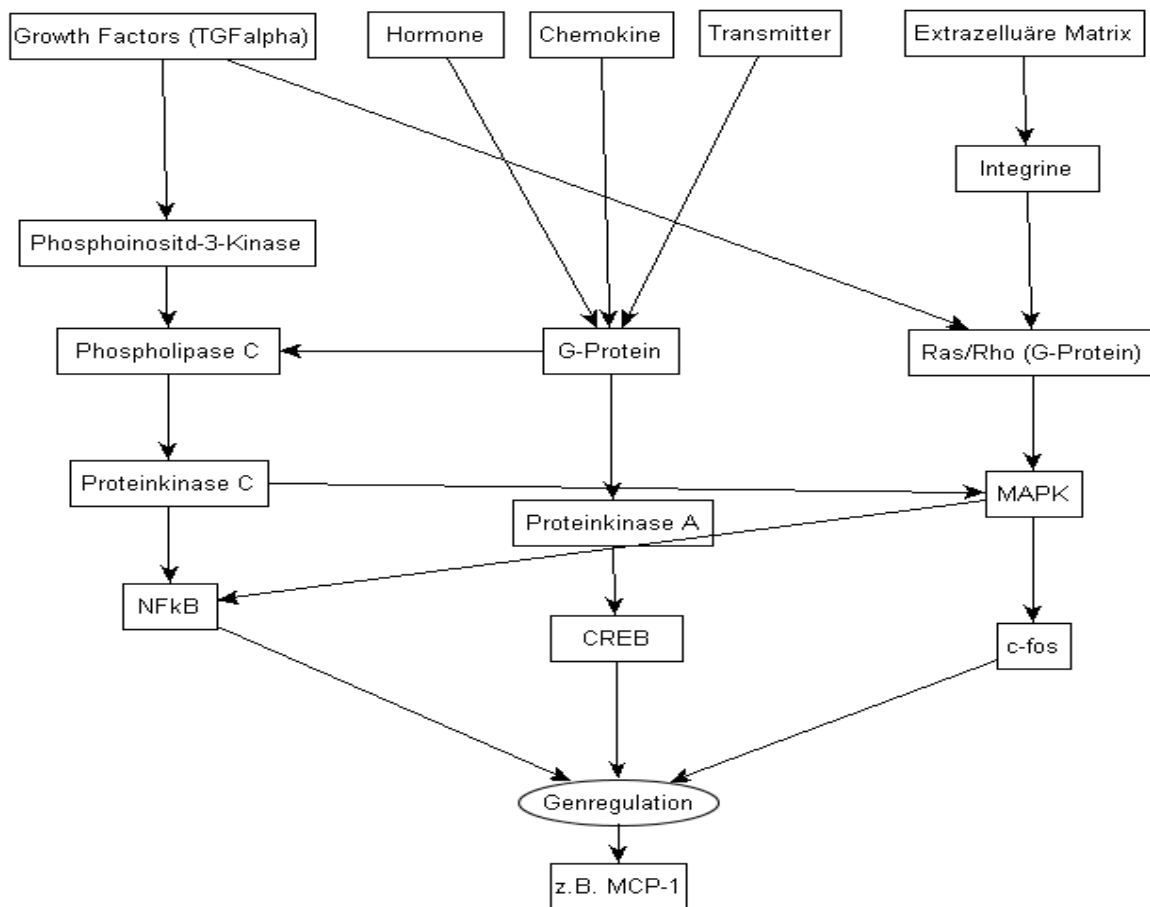


Abbildung 1.5: Ein Ausschnitt verschiedener G-Protein vermittelter Wege im Zusammenhang mit der Expression von MCP-1 und c-fos.

1.5.3 Eicosanoide

Für die Eicosanoide wurden mehrere G-Protein-gekoppelte Rezeptoren beschrieben, die sich in Gewebeverteilung, Ligandenspezifität und Art der Signaltransduktion unterscheiden (Goetzl 1995). Eine Vielzahl von Erkrankungen wird mit der Wirkung von Eicosanoiden in

Verbindung gebracht. So konnte Bauch (1987) beispielsweise in einer Studie aufzeigen, dass kultivierte Endothelzellen aus Umbilikalvenen nach vorausgegangener in vitro Exposition mit atherogenen Risikofaktoren (Nikotin, Diabetes mellitus) ein sowohl qualitativ als auch quantitativ verändertes Metabolitenspektrum der Arachidonsäure aufweisen. Ferner zeigen die Endothelzellen nach Exposition mit den oben angeführten Noxen eine verringerte Zell-Proliferation und ein signifikant verringertes Wachstum. Warso (1983) konnte nachweisen, dass die in atherosklerotischen Plaques erhöhten Werte der 15-HPETE und anderer Fettsäureperoxide zu einer Hemmung der Prostacyclinsynthetase führen und dadurch einen relativen Anstieg an TXA₂ begünstigen. Die Eicosanoide sind eine große Gruppe von intra- und interzellulären Mediatoren, die aus der mehrfach ungesättigte Fettsäure Arachidonsäure gebildet werden, einer raschen Eliminierung unterliegen und ihre Wirkung nur über kurze Strecken entfalten. Die Arachidonsäure wird rezeptorspezifisch über LDL oder auch nicht rezeptorspezifisch aus der Bindung mit Albumin in die Zelle aufgenommen. Arachidonsäure ist integraler Bestandteil der Zelle und wird aus Phospholipiden der Zellmembran unter dem Einfluß von Phospholipasen freigesetzt. Die wichtigste physiologische Funktion der Phospholipide ist der Aufbau von Biomembranen. Durch die Veresterung in Position *sn*-2 der Phospholipide verfügt jede Zelle über einen eigenen Arachidonsäure-Pool. Auf einen Stimulus hin kann Arachidonsäure jedoch sofort aus ihrem Speicher freigesetzt werden. Das Schlüsselenzym für diese Freisetzung stellt die Phospholipase A₂ (PLA₂) dar, welche die Phospholipide in der *sn*-2-Position spaltet. Solche Stimuli, wie z. B. Interleukin-1 (IL-1), IL-6, Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Bradykinin, Calmodulin, Angiotensin II und Thrombin führen zur Aktivierung der normalerweise in inaktiver Form vorliegenden PLA₂. Die wesentlichen an der enzymatischen Oxygenierung beteiligten Enzyme sind die Cyclooxygenase-1, 2 und 3 (COX-1,-2 und 3) sowie 5-, 12- und 15-Lipoxygenase (LO). Arachidonsäure kann über die Enzyme Cyclooxygenase 1 und 2 zu Prostanoiden und über 5-, 12-, oder 15-Lipoxygenase zu Leukotrienen führen (siehe Abbildung 1.5). Eine Übersicht über Bedeutung, Biosynthese, Wirkmechanismus und Beeinflussung von Prostaglandinen und Leukotrienen gibt Funk (2001). Sie wirken auf die Rekrutierung inflammatorischer Zellen, Veränderung von Vasomotorik und Gefäßpermeabilität und Beeinflussung der Aggregation von Thrombozyten (Sigal 1991). Nach wie vor ist die physiologische und pathophysiologische Bedeutung der Eicosanoide nicht bis in alle Einzelheiten geklärt.

1.5.3.1 Cyclooxygenasen

Die Cyclooxygenasen existieren in drei Isoformen. Ihre Produkte, die Prostaglandine, entfalten ihre pathophysiologische Bedeutung unter anderem in der Entwicklung von Entzündungen, Schmerzen und Fieber (Vane 1998). Die COX-1 wird in den meisten Zellen des menschlichen Organismus konstitutiv exprimiert (Seibert 1997). Welche Eicosanoide in den Zellen gebildet werden, ist jedoch von Organ zu Organ sehr verschieden (Jakobsson 1999). Im Gastrointestinaltrakt und im Uterus wirken die Prostaglandine muskelkontraktierend, im Magen wirken sie zytoprotektiv. In den Nieren erhöhen die Prostaglandine den renalen Blutfluss und erhalten die Homöostase der Nierenfunktion. Für die Blutgerinnung ist die COX-1 der Blutplättchen, die hier das Thromboxan bildet, essentiell. Die COX-2, die vor ungefähr 15 Jahren entdeckt wurde, ist dagegen nur in bestimmten Organen, z.B. der Niere, dem Gehirn und dem Rückenmark, konstitutiv exprimiert. Die Tatsache, dass COX-2-knock-out-Mäuse schwere Nephropathien entwickeln und nicht lebensfähig sind, ist Ausdruck für die physiologische Bedeutung dieses Enzyms (Dinchuk 1995, Mitchell 1999, Morteau 2000). Die COX-2 ist in die Regulation des Renin-Angiotensin-Systems und in die glomeruläre Hämodynamik involviert (Hinz 1999). Weiterhin wird die COX-2 im Uterusepithel exprimiert und spielt dort eine Rolle bei der Nidation der befruchteten Eizelle und bei der Angiogenese für den Aufbau der Plazenta (Chakraborty 1996). Die pathophysiologische und physiologische Bedeutung der Produkte der COX-2 erstreckt sich auf akute und proliferative Entzündungen, Arthritis, Angiogenese, Knochenabsorption, Ulcera, Kolonkrebs, Alzheimer-Krankheit, Nierenfunktion, das ZNS und die Reproduktion (Katori 2000). Im Zuge entzündlicher Erkrankungen wird vom Organismus eine Induktion der COX-2 auch in anderen Geweben und Organen ausgelöst. Induktoren der COX-2 sind z.B. Onkogene, inflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren und Mitogene (Dempke 2001, Herschman 1996). Unter der Annahme einer Prognoseverbesserung bezüglich kardiovaskulärer Ereignisse bei verbesserter Endothelfunktion, sollte ein positiver Benefit unter einer Therapie mit COX-2-Hemmern erwartet werden. Einige Arbeiten zeigen gegensätzliche Ergebnisse. Das Risiko kardiovaskulärer Erkrankungen wird in größeren Untersuchungen durch eine Therapie mit COX-2 Hemmern erhöht; hier insbesondere das Risiko einer Myokardinfarktes (Bombardier 2000, Solomon 2004). Zu demselben Ergebnis kommt auch die größere Arbeit von Hippisley und Mitarbeitern, die im Zeitraum von 2000 bis 2004 beinahe 96.000 Patienten untersuchten (Hippisley-Cox 2005). Sie verglichen das Risiko

eines Myokardinfarktes zwischen einer Therapie mit selektiven COX-2 Inhibitoren, einer Therapie mit sonstigen NSAR (u.a Diclofenac und Ibuprofen) und einer Kontrolle. Hier zeigte sich insbesondere eine signifikant höhere Rate an Myokardinfarkten bei Patienten mit COX-2-Hemmertherapie. Die VIGOR-Studie zeigte, dass das Risiko eines Myokardinfarkts unter Rofecoxib (0,4%) höher war als unter Naproxen(0,1%) (Bombardier 2000). In einer weiteren Untersuchung bestätigte sich das erhöhte Risiko eines akuten Myokardinfarkts unter Rofecoxib bei Patienten ohne bisherigen Myokardinfarkt in der Anamnese (Levesque2005). Die Genese dieser Prognoseverschlechterung erscheint aktuell noch unklar. Möglicherweise scheint es einen Zusammenhang mit resultierendem Bluthochdruck und verstärkter Leukozytenadhäsion als Pathomechanismus der Myokardinfarkte zu geben (Muscara 2000). Die FDA (Food and Drug Administration) hatte daher im Frühjahr 2005 beschlossen, dass die o.g. vorhandenen Daten über Rofecoxib, Valdecoxib und Celecoxib ausreichen, um zu dem Schluss zu kommen, dass diese Medikamente signifikant das Risiko eines kardiovaskulären Ereignisses erhöhen, unter anderem in Form von Myokardinfarkten und Schlaganfällen (Okie 2005). Die Existenz einer dritten Isoform, der COX-3, wurde schon länger vermutet (Willoughby 2000) und vor ein paar Jahren nachgewiesen. Sie ist vorwiegend im ZNS lokalisiert (Chandrasekharan 2002).

1.5.3.2 Lipoxygenasen

1.5.3.2.1 5-Lipoxygenase

Das Enzym 5-LOX [5-Lipoxygenase] wird vorwiegend in Neutrophilen, Mastzellen, Basophilen und Makrophagen exprimiert. Produkte der 5-LOX, die Leukotriene (Denzlinger 1996, Silverman 1999), stellen wichtige Mediatoren akuter entzündlicher Erkrankungen und anaphylaktischer Reaktionen dar (Lewis 1990, Mayatepek 1995). Als Krankheitsbilder sind hier u.a. rheumatoide Arthritis, Gicht, Psoriasis und Colitis ulcerosa zu nennen (Müller 1995, Steinhilber 1999). Eine Besonderheit dieses Enzyms ist seine Wechselwirkung mit einem speziellen Kopplungsprotein an der Kernmembran, dem 5-Lipoxygenase-aktivierenden Protein (FLAP), als Voraussetzung für die Enzymaktivität (Ford-Hutchinson 1991). Die Peptido-Leukotriene C4, D4, E4, zusammengefasst als „slow reacting substance of anaphylaxis“ bezeichnet, sind extrem potente Spasmogene an der glatten Muskulatur. Darauf beruht ihre Schlüsselrolle in der Pathogenese des allergischen Asthma bronchiale (Crowther

2000, Steinhilber 1999). Einen Zusammenhang zwischen 5-LOX und Atherosklerose untersuchte die Arbeitsgruppe um Dr. James Dwyer. Sie hatte bei 470 freiwilligen, gesunden Probanden das Gen für die 5-Lipoxygenase analysiert und untersucht, ob es einen Zusammenhang zwischen dem Gen und der Intima-Media-Dicke gibt. Tatsächlich konnte Dwyer et al. belegen, dass jene sechs Prozent der untersuchten Probanden, bei denen auf beiden Chromosomensätzen eine mutierte Form des 5-Lipoxygenase-Gens vorlag, eine signifikant dickere Intima-Media-Schicht aufwiesen als jene, bei denen eines oder beide Gene unverändert waren (Dwyer 2004).

1.5.3.2.2 12-Lipoxygenase

Die 12-LOX wird hauptsächlich in Thrombozyten, Leukozyten und Hautzellen exprimiert (Nie 2000, Ruzicka 1984). Produkte der 12-LOX sind an der Entstehung der Psoriasis (Mitchell 1999, Müller 1994), neuronaler Degeneration und diabetischer Nephropathie (Li 1997, Müller 1994) involviert. Außerdem ist eine Beteiligung an der Tumorentwicklung, insbesondere an der Angiogenese im Tumorgewebe (Krieg 1995, Nie 2002) und an der Metastasierung nachgewiesen worden (Honn 1994, Maccarrone 1997). Hinweise auf eine proatherosklerotische Wirkung der LOX ergeben sich aus folgenden Studien: Makrophagen, bei denen das Gen für die 12/15-LOX zerstört ist, sind weniger in der Lage, LDL zu oxygenieren (Sun 1996), während 15-LOX überexprimierende Fibroblasten und Monozyten dies verstärkt tun (Benz 1995). Die funktionelle Zerstörung der Maus-Makrophagen-12-LOX in Apolipoprotein-E- oder LDL-Rezeptor-knock-out Mäusen führte zu einer signifikanten Verringerung der atherosklerotischen Ablagerungen (Cyrus 1999; George 2001).

1.5.3.2.3 15-Lipoxygenase

Die 15-LOX wird in Retikulozyten, Eosinophilen, Makrophagen sowie in Hautzellen exprimiert. Im Gegensatz zur 5-LOX, die nur freie Arachidonsäure verstoffwechseln kann, ist die 15-LOX der Säugetiere in der Lage, auch andere mehrfach ungesättigte Fettsäuren sowie veresterte mehrfach ungesättigte Fettsäuren zu metabolisieren (Brash 1997, Kuhn 1990). Für die Produkte dieses Enzyms wird eine Wirkung auf die Entwicklung und Differenzierung von Zellen diskutiert (Brinckmann 1998). Sie werden mit Atherosklerose (Ford-Hutchinson 1991, Kuhn 1990), der endothelialen Zellproliferation (Bray 1986), Ausreifung von Blutzellen (van Leyen 1998) sowie entzündlichen und immunologischen Reaktionen (Davis 1987, Prigge

1997, Vanderhoeck 1988) in Verbindung gebracht. Die Überexpression der 15-LOX im vaskulären Endothel führte bei transgenen Mäusen, denen der LDL-Rezeptor fehlt, zu einer Beschleunigung der Entstehung von Atherosklerose (Harats 2000). Des Weiteren hemmen 15-LOX-Inhibitoren die Entwicklung von atherosklerotischen Läsionen in Kaninchen, die mit einer cholesterolreichen Nahrung gefüttert wurden (Bocan 1998; Sendobry 1997). Die von der 15-LOX gebildeten Metaboliten können die Wirkung der Leukotriene antagonisieren (Sheran 1997, Vanderhoeck 1980) bzw. verstärken (Fogh 1988). Für die Produkte der Lipoxygenasen, besonders die HETEs [Hydroxyeicosatetraensäure], ist eine Beteiligung am Wachstum von Krebszellen (Ghosh 1997, Nie 2002) sowie an der Apoptoseauslösung bzw. -hemmung (Avis 2001, Goetzl 1995, Maccarrone 1997, Wong 2002) in der Literatur belegt.

1.5.3.3 Inhibitoren des Arachidonsäurestoffwechsels

Die herausragende Bedeutung der Arachidonsäuremetaboliten im pathophysiologischen Geschehen vieler Erkrankungen hat schon vor Jahren dazu geführt, dass sich zahlreiche Arbeitsgruppen mit der Entwicklung von Inhibitoren der Stoffwechselwege der AA [Arachidonsäure] beschäftigen. Der Arachidonsäuremetabolismus bietet eine Vielzahl von Angriffspunkten, um die pathophysiologische Wirkung der Eicosanoide zu unterbinden. Zum Beispiel durch Inhibition der Phospholipase A₂ (PLA₂) mit AACOCF₃ [Arachidonyl trifluoromethyl ketone] lässt sich der gesamte AA-Stoffwechsel blockieren. Der Redoxinhibitor NDGA (Nordihydroguajarsäure) hemmt die 5-LOX (Gronert 1995). Über das 5-Lipoxygenase-aktivierende Protein [FLAP] kann BAY X 1005 die 5-LOX blockieren (Hatzelmann 1994a). Indometacin und Acetylsalicylsäure (ASS), als Vertreter der Klasse der häufig eingesetzten nichtsteroidalen Antirheumatika, hemmen COX-1 und COX-2 (Berg 1999, Cryer 1998), (vgl. Abbildung 1.6).

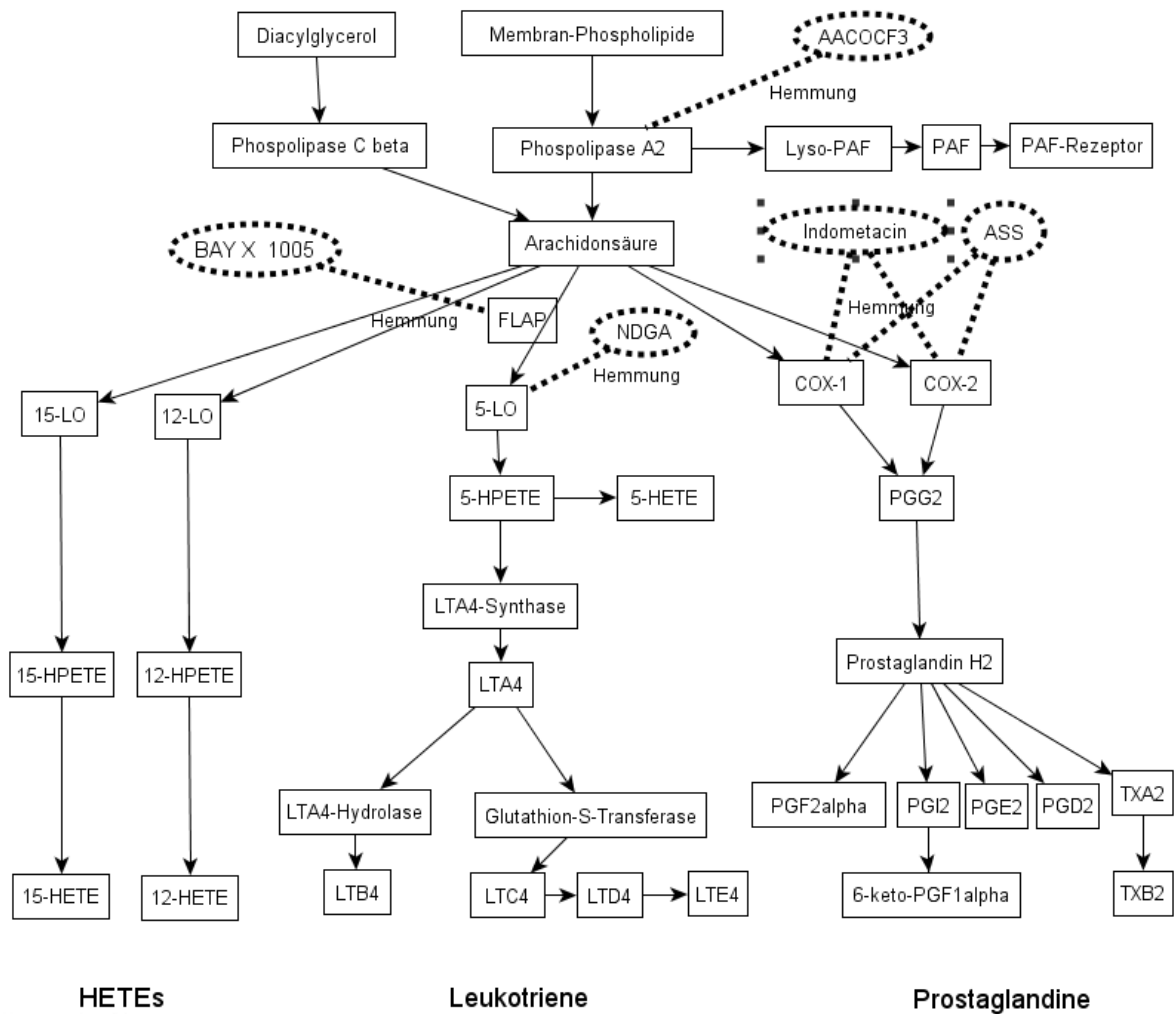


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung wichtiger AA-Stoffwechselwege und wichtige Inhibitoren des Stoffwechsels.

2 Problemstellung und Zielsetzung der Arbeit

Die Adhäsion von Monozyten an das Endothelium ist eine der ersten Veränderungen, die in arteriosklerotischen Läsionen auftreten (Fuster 1996, Lusis 2000, Ross 1993).

Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der Monozyten und deren Interaktionen mit dem Endothel in der Anfangsphase der Atheroskleroseentstehung zu untersuchen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die zellbiologischen Auswirkungen in Endothelzellen/ Monozyten nach Inkubation und Stimulation der beiden Zellarten miteinander untersucht. Dabei sollte ein in-vitro Modell etabliert werden. Hierbei wurde besonderes Augenmerk auf die Expression des an der Regulation der Zellproliferation beteiligten Transkriptionsfaktors c-fos und dem Zytokin MCP-1 gelegt. Es sollte untersucht werden, inwieweit die Interaktion der beiden Zellarten zu einer vermehrten Expression von c-fos und MCP-1 führt und welche extra- und intrazellulären Signalübertragungswege an diesem Prozess beteiligt sind.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Substanzen und Geräte

Folgende Substanzen wurden von der Firma PROMOCELL bezogen:

Endothelial Cell Growth Medium

Supplement Mix

Die Firma CLONTECH lieferte:

Express Hyp - Hybridization Solution

AMERSHAM lieferte:

[α^{32} .Phosphor] CTP

FLUKA lieferte:

Pyruvat NA^+ -Salz

GibcoBRL lieferte:

Non-essential Amino Acid

Agarose (UltraPURE™)

Reverse Transkriptase – Superscript II Plus RNase H⁻

10xDNaseI-Puffer

DTT (100mM)

GAMBRO lieferte:

Filterpatrone U2000

GENTRA lieferte:

PureScript™ Gesamt-RNA Isolierungskit

Cell Lysis Solution

Protein DNA Precipitation Solution

CORNING lieferte:

24 Well Platten

Zellkulturkolben 75 cm² / 25 cm²

Zellkulturschalen

BIOCHROM lieferte:

Kollagen G 3 mg/ml

PROMEGA lieferte:

5x Transkriptionspuffer

Polymerasen SP6 und T7

RNasin (RNase Inhibitor)

QIAGEN lieferte:

QIAGEN-tip

QIAGEN-Plasmid-Kit Midi 25

Dianova/Bio 101 lieferte:

L-Broth Kapseln

SIGMA lieferte:

α -Chymotrypsin

Cholecalciferol (VD₃)

Diethyl Pyrocarbonate (DEPEC)

Dimethyl Sulfoxid (DMSO)

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)

Fetal Bovine Solution (FCS)

Ficoll 400

Insulin

L-Glutamin 200 mM

Oxalacetat

Penicillin 10000 units / Streptomycin 10 mg (ml)

RPMI-Medium

Salmon Testes DNA

Sodium Bicarbonate Solution 7,5%

Transforming Growth Factor (TGF β)

Trypsin-EDTA Solution

Und alle übrigen Zellkulturkomponenten und Chemikalien stammen von SIGMA.

Folgende Geräte der angegebenen Hersteller wurden verwendet:

Dialysepumpe Fresenius BP742

Dialyseschlauchsystem AX1897-2

Optima TLX-Ultracentrifuge von BECKMANN

Speed Vac–Univapo 150 H von UNIEQUIP

Spectrophotometer UVIKON 930 von KONTRON INSTRUMENTS

VacuGeneXL-Blot-Apparatur von PHARMACIA

Nytran® Nylonmembran 0,45 μ m von SCHLEICHER & SCHUELL

UV-Stratalinker® 1800 von STRATAGENE

Push-Column-Vorrichtung von STRATAGENE

Scintillationszähler Wallal 1410 von PHARMACIA

Steri-Cult Incubator von FORMA SCIENETIFIC
Heraeus Omnifuge 2.0 RS

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkulturen

3.2.1.1 Allgemeine Richtlinien für das Arbeiten mit Zellkulturen

Alle Arbeitsschritte mit der Endothelzellkultur und den MM6 Zellen wurden ausschließlich mit sterilen Materialien und in einer Sterilbank mit laminalem Luftzug ausgeführt. Die Inkubation erfolgte in sterilen Zellkulturschalen und -kolben in einem Steri-Cult Inkubator bei 37° C, wasserdampfgesättigter Atmosphäre und Zusatz von 5 Volumenprozent CO₂.

3.2.1.2 Isolation und Präparation der Endothelzellen

Benötigte Substanzen:

Endothelzellmedium

Endothelial Cell Growth Medium+Supplement Mix+10%FCS

Inkubationspuffer

Maßangabe für 1 Liter:

CaCl₂ 0,147 g

KCl 0,201 g

NaHCO₃ 2,100 g

KH₂PO₄ 0,195 g

HEPES 4,766 g

NaCl 7,024 g

MgSO₄ 0,168 g

Glucose 2,000 g

Puffer anschließend auf pH 7,40 einstellen.

Menschliche Endothelzellen (HUVEC) sind von Nabelschnüren mit Hilfe von α -Chymotrypsin isoliert worden. Die Präparation der Nabelschnur erfolgte durch Aufsuchen der Vene, Sondierung und anschließendes Ausspülen mit PBS. Danach wurde die Vene mit α -Chymotrypsin gefüllt, abgeklemmt und für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Suspension in einer 2ml FCS Lösung aufgefangen (Neutralisierung des Chymotrypsins) und mit 20 ml PBS nachgespült. Schließlich ist die Suspension für 8 Minuten

bei 800 rpm und 20 °C zentrifugiert, der Überstand bis auf 0,5 ml abgesaugt und mit 7 ml Endothelzellmedium aufgefüllt worden. Nach zweimaliger Resuspension wurden die Zellen in einen Zellkulturkolben (25cm²) pipettiert und anschließend bei 37 °C inkubiert. Der Zellkulturkolben ist vorher kollagenisiert (Kollagen 1:40 mit PBS verdünnt) worden. Nach 2 Std., 24 Std. und 3-4 Tagen wurde das Medium ausgetauscht. Die Konfluenz war meist am 5-6 Tag erreicht (siehe Abbildung 3.1). Bei Konfluenz erfolgte die Aufteilung der Zellen. Nach Absaugen des alten Mediums konnten die Zellen mit 0,5%iger Trypsinlösung abgelöst, danach in 10 ml Endothelzellmedium resuspendiert und auf Zellkulturschalen (9cm) oder Zellkulturkoben (75 cm²) aufgeteilt werden. Anschließend wurde am 3. bis 4. Tag das Medium gewechselt und nach Konfluenz am 6. bis 7. Tag die Versuche durchgeführt. Die Durchführung der Versuche erfolgte nach 7 Tagen ohne neuerlichen Mediumwechsel, um die Zellen vor Durchführung der Versuche nicht erneut zu stimulieren. Die Verwendung der Zellen im Rahmen von Versuchsreihen erfolgte zwischen den Passagen 2-5, danach wurden die Zellen verworfen. Die Zellkulturschalen wurden 2 Stunden vor dem Versuch mit Inkubationspuffer bei (37° C) inkubiert.

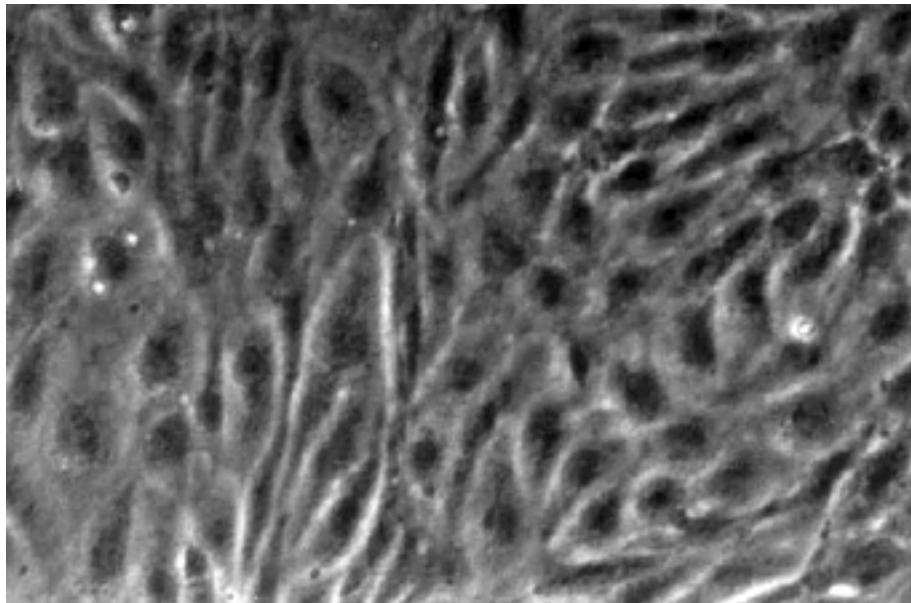


Abbildung 3.1: Konfluenten Endothelzellmonolayer mit typischer Morphologie kultivierter Endothelzellen (Lichtmikroskopische Aufnahme, 400fache Vergrößerung).

3.2.1.3 Reaktivierung und Präparation der MM6 Zellen

Benötigte Substanzen:

Modifiziertes RPMI-Medium für MM6-Zellen

500 ml RPMI-Medium

5 ml L-Glutamin

1 ml Oxalacetat (500mM Stammlösung)
1 ml Pyruvat NA^+ -Salz (500mM Stammlösung)
10 ml Penicillin / Streptomycin
5 ml Non-essential Amino Acid
5 ml Insulinlösung 0,9 mg/ml

Herstellung der Insulinlösung:

Lösung A: (in 1 l destilliertes Wasser, mit CO_2 begasen bis pH 6,0)

8,0 g NaCl

0,4 g KCl

0,35 g NaHCO_3

1,0 g Glucose

Lösung B:

NaHCO_3 7,5%

Zur Herstellung der Insulinlösung ist von Lösung A 25 ml, von Lösung B 30ml und 50 mg Insulin zugegeben worden. Nachdem die o.g. Insulinlösungen in das Medium pipettiert wurden, konnte es nun steril filtriert und mit Hilfe einer Dialysepumpe von LPS befreit werden.

MM6 Zellen (5-6 Mio.) sind (in Konservierungslösung 20% DMSO- und 10% RPMI-Medium) im Wasserbad bei 37 °C und Zugabe von 25 ml warmem modifiziertem RPMI-Medium (+ 10% FCS) aufgetaut worden. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation über 10 Minuten bei 800 rpm. Danach wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet erneut mit 25 ml resuspendiert. Nach nochmaliger Zentrifugation und Resuspension sind die Zellen auf eine 24-Well-Platte verteilt worden. Schließlich erfolgte alle 3 Tage ein Mediumwechsel und erneute Verteilung auf eine 24-Well-Platte. Die Verwendung der Zellen im Rahmen von Versuchsreihen erfolgte zwischen den Passagen 4-18, danach wurden die Zellen verworfen. 72 Stunden vor Versuchsbeginn wurden die MM6 Zellen auf 200.000 Zellen/ml eingestellt und für die Ausdifferenzierung mit Vitamin D_3 (10 nM) und $\text{TGF}\beta_1$ (1 ng/ml) vorbehandelt.

3.2.2 RNA-Techniken

3.2.2.1 Allgemeine Richtlinien für das Arbeiten mit RNA

Bei allen Arbeiten mit RNA wurden sterile Plastik- oder gebackene Glasgefäße (200°C, 8 h) verwendet. Alle Lösungen sind durch Zusatz von DEPC von RNase befreit worden. Dazu wurden die Lösungen mit 0,1% DEPC versetzt, mindestens 16h bei 37°C inkubiert und anschließend zur Entfernung von DEPC autoklaviert. DEPC inaktiviert RNasen irreversibel und zersetzt sich beim Autoklavieren in CO₂ und Wasser.

3.2.2.2 Isolierung gesamtzellulärer RNA

Die nach 72 Stunden mit Vitamin D₃ und TGFβ₁ differenzierten MM6-Zellen und die in Zellkulturschalen 2 Stunden mit Inkubationspuffer präinkubierten Endothelzellen wurden nach Versuchsbedingungen gemeinsam oder getrennt für 30 Minuten im Inkubationspuffer belassen. Anschließend erfolgte die Präinkubation und Stimulation nach Versuchsanleitungen (siehe Ergebnisteil). Zur Isolation der gesamtzellulären RNA ist das PureScript™ Gesamt-RNA Isolierungskit verwendet worden. Es basiert auf der Methode einer modifizierten Salzpräzipitation in Kombination mit einer äußerst effektiven Inhibition von RNase. Die in Kulturschalen kultivierten HUVEC und die MM6-Zellen wurden nach Absaugen des Inkubationspuffers und zweimaligen Waschen mit PBS mit 600 µl Cell-Lysis-Solution versetzt. Nach 5 Minuten konnte das Lysat mit einem Schaber abkratzt und in ein Ultrazentrifugationsgefäß überführt werden. Nach der Zugabe von 200 µl Protein-DNA-Precipitation-Solution wurde das Lysat 10 Minuten über Kopf geschüttelt, 15 Minuten auf Eis gestellt und zentrifugiert (80000 rpm, 5 Minuten, 4°C). Anschließend ist die im wässrigen Überstand befindliche RNA in eine 1,5 ml Eppendorf-Tube überführt worden. Nach der Zugabe von 600 µl Isopropanol wurden die Tubes sofort 50x invertiert und 3 Minuten bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren und Absaugen des Überstands wurde das Pellet 10 Minuten in der Speedvac vakuum getrocknet. Zur Aufbewahrung sind die Proben mit 110 µl 0,1% DEPC-Wasser versetzt und über Nacht eingefroren worden.

3.2.2.3 Messung der RNA Menge

Die RNA Menge ist mit Hilfe eines UV-Spektrophotometers bei 260 nm Wellenlänge bestimmt worden. Dazu mussten 10 µl aus den aufgetauten 110 µl entnommen und zu 990 µl DEPC-Wasser zugeben werden. Nach gemessener und errechneter RNA Menge erfolgte die Verdünnung der Proben mit DEPC-Wasser, um in jeder Probe dieselbe RNA Konzentration zu erreichen.

3.2.3 Northern-Blot

Benötigte Substanzen:

10 x MOPS

200 nM MOPS

50 nM Natriumacetat

10 nM EDTA, pH 7,0

RSB-Lösung

50% Formamid

2,2M Formaldehyd (37%)

1 x MOPS

RLB

15% Ficoll (Ficoll 400, Serva)

5 x MOPS

0,5% Bromphenolblau

166µg/ml Ethidiumbromid

20 x SSC

3M NaCl

0,3M NaCitrat pH 7,0

Agarosegel

Auf 175 ml

1,75 g Agarose

126 ml Aqua bidest.

31,5 ml Formaldehyd(37%)

17,5 ml 10 x MOPS

Blotting-Lösung

Auf 2l:

500 ml 20xSSC
2 ml 10 N NaOH
1498 ml Aqua bidest.

Die Northern Blot Technik bietet die Option, einzelne RNA Moleküle in einem RNA-Gemisch qualitativ und quantitativ nachzuweisen. 10µg-20µg GesamtRNA-Isolate wurden in der SpeedVac getrocknet, mit RSB rückgelöst (16µl RSB/10µg RNA) und den Probenauftragspuffer RLB zugegeben (4µl RLB/10µg RNA). Anschließend sind die Proben 15 Minuten bei 60°C denaturiert und in Eiswasser abgeschreckt worden. Dann erfolgte das Auftragen und elektrophoretische Auftrennen der RNA mittels Agarosegel in 1x MOPS für 12 Stunden bei 20 Volt. Im Anschluß an die Elektrophorese wurde das Gel unter UV-Licht photographiert. Dabei war unter dem UV-Licht die mit Ethidiumbromid angefärbte 18s und 28s ribosomale Bande zu sehen. Bei qualitativ guter RNA sah man zwei scharfe Banden [siehe Abbildung 3.1].

Abbildung 3.1 UV-Licht Aufnahme eines erfolgreich durchgeführten RNA Gelelektrophorese. Durch das unter UV-Licht fluoreszierende Ethidiumbromid wird die 28s- und 18s-Bande der aufgetragenen RNA sichtbar gemacht.

Die gelelektrophoretisch aufgetrennte RNA ist nun mit der VacuGeneXL-Blot-Apparatur gemäß der Gebrauchsanweisung auf eine mit 10xSSC vorbehandelten Nylonmembran transferiert und immobilisiert worden. Zur Entfernung anhaftender Agarosereste konnte die

Membran kurz in 2xSSC gewaschen werden. Durch UV-Bestrahlung mit dem Stratalinker® wurde die RNA kovalent auf der Membran fixiert.

3.2.4 Synthese von *Riboprobes* (*In vitro* Transkription)

Benötigte Substanzen:

Riboprobe-Ansatz

- 1,0 µl linearisierte Plasmidmatrize (1µg/µl)
- 4,0 µl 5x Transkriptionspuffer
- 4,0 µl Ribo-NTP-Mix (je 2,5 mM rATP, rGTP, UTP)
- 2,0 µl 100 mM DTT
- 2,5 µl 0,1 mM CTP
- 0,5 µl Rnasin (1U/ml)
- 5,0 µl α [³²P]-CTP (250µCi)
- 1,0 µl RNA-Polymerase (SP6- oder T7-Polymerase, 1U)

DNaseI-Ansatz

- 1,0 µl RNase-freie DNaseI
- 5,0 µl 10xDNaseI-Puffer
- 24,0 µl DEPEC-Wasser

Die dem zellulären Transkript komplementäre antisense RNA-Hybridisierungssonde ist durch *in vitro* Transkription generiert worden. Die verwendeten rekombinanten Plasmide enthielten die interessante cDNA-Gen-Sequenz (MCP-1, c-fos, GAPDH) zwischen zwei starken RNA-Polymerase Promotoren (SP6- oder T7-Polymerase). Vor der Transkription wurden die Plasmide mit Hilfe eines geeigneten Restriktionsenzym am 5'-Ende der cDNA linearisiert. Zur Überprüfung der vollständigen Linearisierung wurde die DNA mittels eines analytischen Agarosegels (0,7 %) elektrophoretisch aufgetrennt. Um die Riboprobe-Sonde (antisense) zu synthetisieren, wurde die RNA-Polymerase verwendet, die am 3'-Ende der cDNA angrenzenden Promotor bindet. Die radioaktive Markierung erfolgt über den Einbau von α [³²P]-CTP in die neusynthetisierten RNA-Stränge. Die DNA-Matrize ist nach Beendigung der Polymerisation (1 Stunde, 37°C) durch RNase-freie DNaseI (15 Minuten, 37°C) verdaut und die nicht-eingebauten freien Nukleotide über Gelfiltration mit einer Push-Column-

Vorrichtung abgetrennt worden. Die Einbaueffizienz konnte durch Messung im Scintillationszähler bestimmt werden.

3.2.5 Hybridisierung

Benötigte Substanzen:

Hybridisierungslösung

50% Formamid

5 x SSPE

2 x Denhardts

0,1% SDS

0,1 mg/ml ultraschallbehandelte, hitzedenaturierte Lachssperma-DNA

20 x SSPE

3,6 M NaCl

0,2 M Na₂HPO₄ x H₂O

20 nM EDTA, pH 7,7

100 x Denhardts

2% Ficoll 400

2% Polyvinylpyrrolidon

2% BSA

Waschlösung

0,2 x SSPE

0,1% SDS

Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wurde die Membran für 3 Stunden bei 65°C in Hybridisierungslösung präinkubiert. Die Hybridisierungsreaktion erfolgt über Nacht bei 65°C. Hierfür ist die Hybridisierungslösung mit 10⁶ cpm/ml α[³²P]-CTP markierten Riboprobe (siehe oben) versetzt worden. Nach Beendigung der Hybridisierung wurden die Filter bei 65°C dreimal mit Waschlösung gewaschen. Während dieser aufeinanderfolgenden, jeweils 30minütigen Waschschriffe löste sich die unspezifische gebundene Sondenmoleküle ab. Die noch feuchte Membran wurde in Haushaltsfolie eingeschlagen und unter Verwendung einer Signalverstärkerfolie bei -80°C auf Röntgenfilm exponiert. Zur Entwicklung ist der exponierte Film 5 Minuten im Entwickler belassen, dann 3-5 Minuten gewässert, danach 5 Minuten fixiert und anschließend weitere 30 Minuten im Wasser gespült worden. Standardmäßig wurde bei jedem Versuch eine Hybridisierung mit GAPDH durchgeführt, um einen gleichmäßigen Probenauftrag überprüfen zu können.

3.2.7 Statistische Auswertung

Alle Experimente wurden dreimal durchgeführt, wodurch die Reproduzierbarkeit der Versuche sichergestellt wurde. Die Auswertung der Filme erfolgte zunächst rein visuell durch Vergleich der Bandenstärke. Zusätzlich erfolgte eine densitometrische Auswertung der Banden mithilfe eines Laser-Densitometers sowie die Auswertung der Messwerte mittels kommerzieller Software (Scanalytics ZeroScan), um auch geringe Unterschiede in der Expression quantifizieren zu können sowie um Effekte durch ungleichmäßigen Probenauftrag ausschließen zu können. Die Daten wurden als arithmetische Mittelwerte plus Standardabweichung (+SD) dargestellt.

4 Ergebnisse

Monozyten und Makrophagen spielen, wie in dieser Arbeit dargestellt, eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Atherosklerose. Die Aufgaben der Makrophagen sind nicht nur, wie seit langem bekannt, als antigenpräsentierende Zellen für T-Lymphozyten zu dienen, sondern auch als Fresszellen oder Scavenger-Zellen Fremdkörper direkt zu beseitigen, wobei sie proinflammatorische Mediatoren wie z.B. Wachstumsfaktoren und Zytokine freisetzen. Über calciumabhängige intrazelluläre Übertragungswege wirken vermutlich verschiedene Noxen, die an der Pathogenese der Atherosklerose, z.B. LDL (Allen 1998) und Shear Stress (Ando 1988), verantwortlich sind. Durch den initialen Kontakt mit sensibilisierenden Stimuli wird eine Reihe von Zellfunktionen heraufreguliert (Johnston 1988). Dies beinhaltet eine erhöhte basale, intrazelluläre Kalziumkonzentration wie auch eine vermehrte Fähigkeit zur Endozytose (Marodi 1991 und 1993). Besonders Ox-LDL wurden als proinflammatorische Stimuli diskutiert, weil durch z.B. Lipidhydroperoxide ein oxidativer Stress ausgelöst werden kann, von dem bekannt ist, dass er zu einer AP-1 Aktivierung führt (Uchida 1999, Natarajan 2001). Oxidationsprodukte der ersten Phase scheinen bei der Rekrutierung von Monozyten beteiligt zu sein. Diese schwach oxidierten LDL sind potentielle Induktoren proinflammatorischer Mediatoren (Berliner 1990). So werden Endothelzellen durch mm-LDL [minimal-modifiziertes LDL] zur Expression von MCP-1 angeregt (Dwivedi 2001). Im vorliegenden Zellkulturmodell soll nun untersucht werden, ob es durch Stimulation von Calcium-Ionophor A23187 und durch den Zellkontakt zwischen HUVEC und MM6-Zellen zu einer vermehrten Expression von MCP-1 und c-fos kommt. Calcium Ionophor A23187 ist eine organische Verbindung. Seine Eigenschaft besteht darin, Ca^{2+} -Ionen zu binden und durch Zellmembranen zu transportieren. Durch die intrazelluläre Anhäufung von Ca^{2+} -Ionen wird z.B. Phospholipase A_2 aktiviert, die wiederum Fettsäuren (z.B. Arachidonsäuren) aus Membranphospholipiden freisetzt. Je nach Versuchsaufbau wurden die Endothelzellen mit und ohne Monozyten für 30 Minuten inkubiert und anschließend für 60 Minuten mit A23187 in einer Konzentration von 10 μMol stimuliert. Im Folgenden wird das angewandte Zellkulturmodell erläutert und die Ergebnisse der Versuchsreihen dargestellt.

4.1 Zellkulturmodell

4.1.1 Expression von MCP-1 und c-fos unter den vorgegebenen Versuchsbedingungen

Der Nachweis einer vitro und in vivo Aktivierung durch atherogene Faktoren gelang mittlerweile für das Protoonkogen c-fos und MCP-1 (Korenaga 1997, Shyy 1995). MCP-1 wird in atherosklerotischen Läsionen gefunden, nicht aber in intakten Gefäßen (Yla-Herttuala 1991, Nelken 1991). Transgene Mäuse, die MCP-1 vermehrt exprimieren, hatten ein dreifach erhöhtes oxidiertes Lipid sowie eine erhöhte Aktivierung der Makrophagen (Aiello 1999). Da in der vorliegenden Arbeit diese Aktivierung simuliert und der Aktivierungsweg untersucht werden soll, wurden konfluente Endothelzellmonolayer (HUVEC) und MM6-Zellen in der in Abschnitt 3.2.1.2 beschriebenen Art und Weise kultiviert und die Inkubation mit Stimulation der beiden Zellarten durchgeführt. Die mRNA wurde nach dem in Abschnitt 3.2.2.2. beschriebenen Verfahren extrahiert und abschließend Northern-Blot Analysen für die mRNA von c-fos, MCP-1 und GAPDH durchgeführt.

Die Abbildung 4.1 zeigt ein Autoradiogramm einer Northern-Blot Analyse für die mRNA von MCP-1 und GAPDH, darunter ein Säulendiagramm, in dem die grafische Auswertung der mittels Laserdensitometrie ermittelten Dichtewerte der Blots von drei identischen Experimenten gezeigt wird. Es konnte in dieser Versuchreihe gezeigt werden, dass die Inkubation von HUVEC mit MM6-Zellen zu einer signifikanten Steigerung der Expression von MCP-1 mRNA um 87,4% im Vergleich zur alleinigen HUVEC-Kultur führt. Dieser Effekt lässt sich in geringerer Ausprägung auch bei der Expression von c-fos nachweisen, wie in Abbildung 4.2 zu sehen ist. Hier zeigt sich in der Northern-Blot Analyse für die mRNA von c-fos und GAPDH eine Steigerung der Expression von c-fos um 58% bei Inkubation der beiden Zellarten im Gegensatz zur alleinigen HUVEC-Kultur. Eine ähnliche c-fos Expression konnte Treitl (2004) in durch A23187 stimulierte und verletzte HUVEC nachweisen.

Die maximale Expression von MCP-1 und c-fos unter diesen Bedingungen wurde für die späteren Inhibitionsversuche als Kontrolle auf 100 % festgelegt.

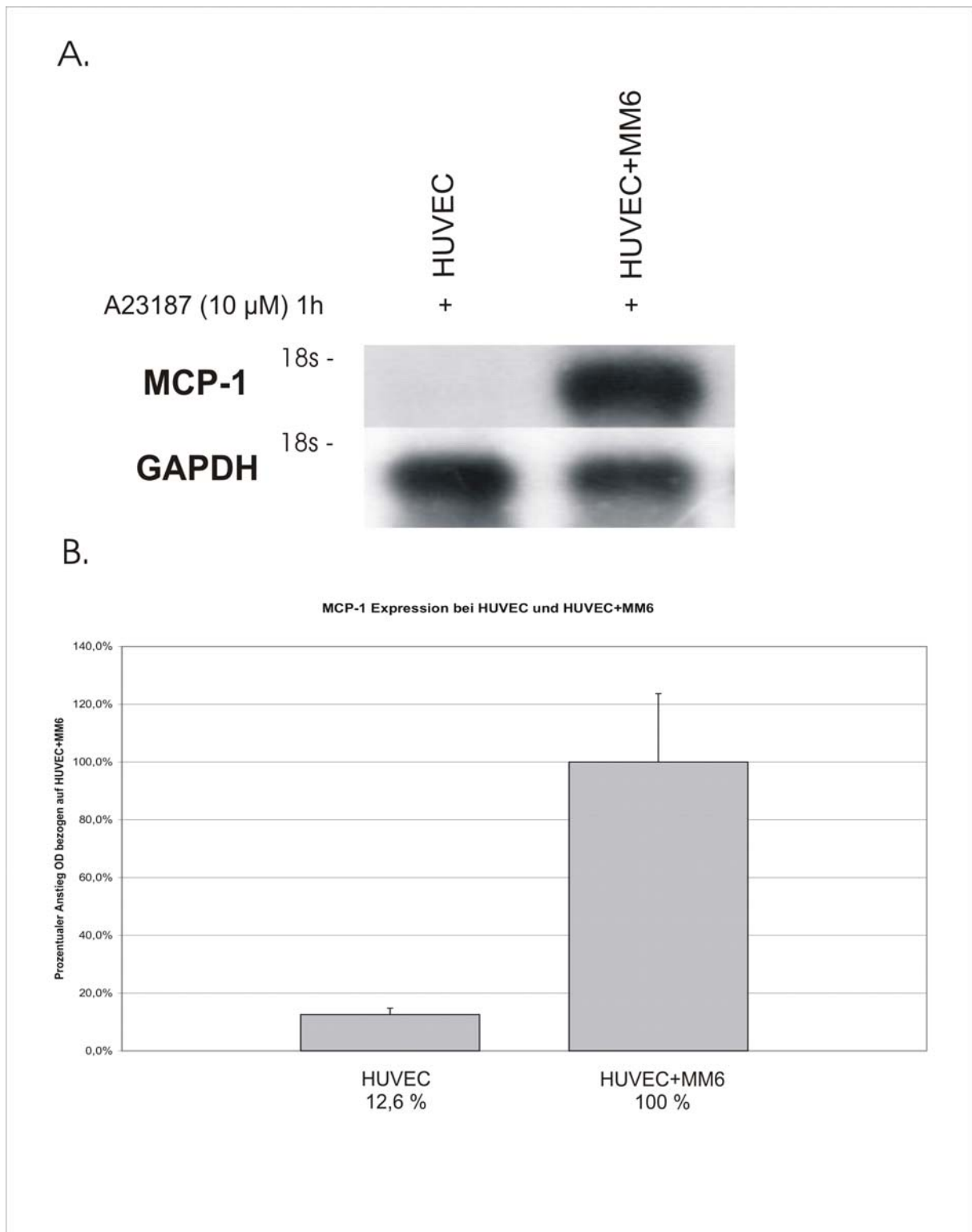


Abbildung 4.1

A: Autoradiogramm einer Northern-Blot Analyse für die mRNA von MCP-1 und GAPDH. Die HUVEC wurden für 30 Minuten mit oder ohne MM6 Zellen inkubiert und anschließend mit A23187 für 60 Minuten stimuliert.

B: Grafische Auswertung der mittels Laserdensitometrie ermittelten Dichtewerte der Blots von drei identischen Experimenten. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert +/- Standardabweichung von drei Messungen. Bei HUVEC mit MM6 Zellen kommt es zu einer signifikanten Steigerung der Expression von MCP-1 um 87,4% im Vergleich zu den HUVEC ohne MM6 Zellen.

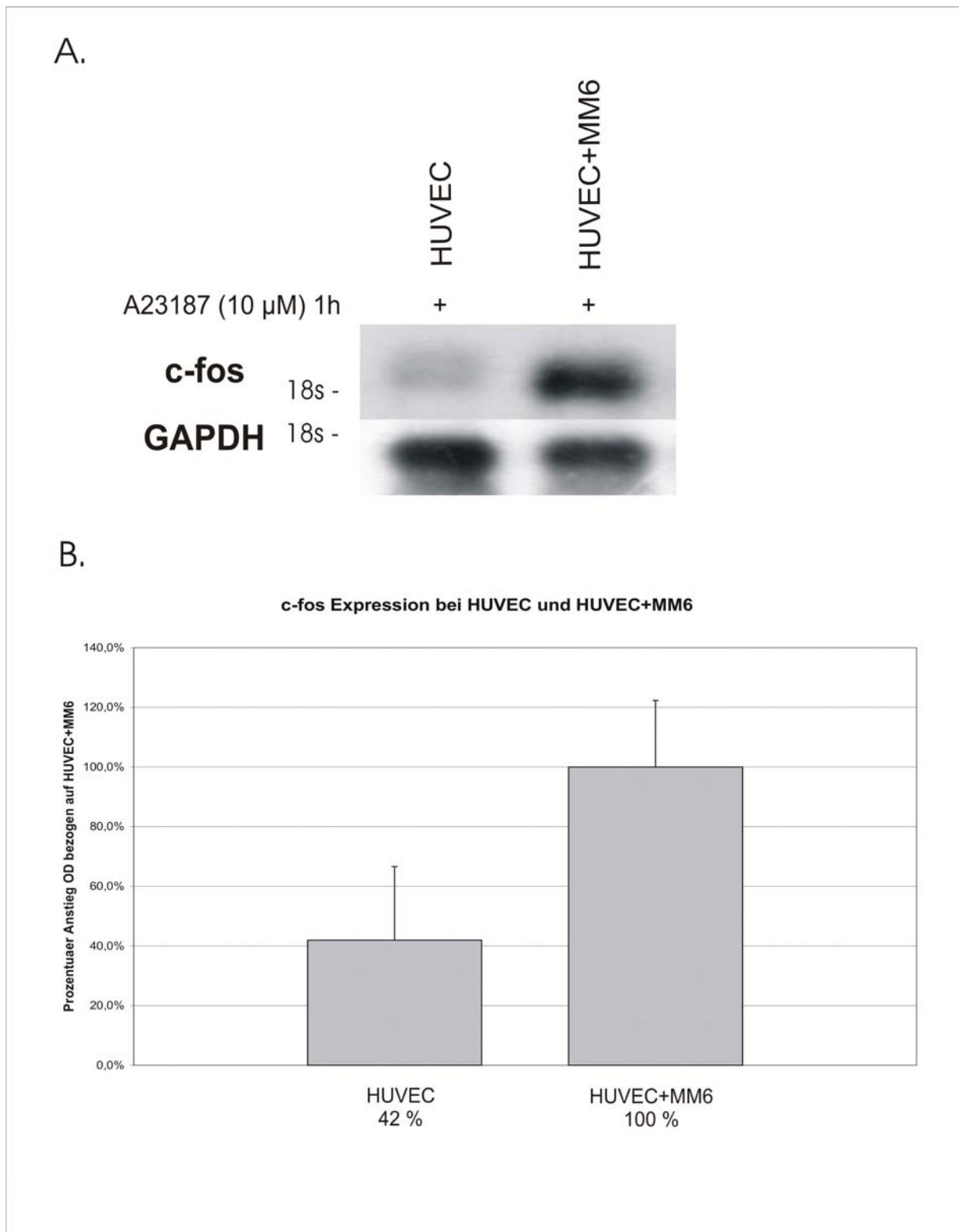


Abbildung 4.2

A: Autoradiogramm einer Northern-Blot Analyse für die mRNA von c-fos und GAPDH. Die HUVEC wurden für 30 Minuten mit oder ohne MM6 Zellen inkubiert und anschließend mit A23187 für 60 Minuten stimuliert.

B: Grafische Auswertung der mittels Laserdensitometrie ermittelten Dichtewerte der Blots von drei identischen Experimenten. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert +/- Standardabweichung von drei Messungen. Bei HUVEC mit MM6 Zellen kommt es zu einer signifikanten Steigerung der Expression von c-fos um 58 % im Vergleich zu den HUVEC ohne MM6 Zellen.

4.1.2 Trennung der HUVEC und MM6-Zellen im Transwell®-Membransystem

Das Ziel dieser Versuchreihe war festzustellen, ob die Induzierbarkeit von MCP-1 und c-fos in diesem Modell vom direkten Zellkontakt zwischen HUVEC und MM6-Zellen abhängig ist oder ob die Induktion auch über kurze Distanzen zwischen den Zellen vermittelt wird.

Grundlage dieser Versuchreihe war die Verwendung von Transwell®-Membransystemen, bei denen die MM6-Zellen auf der permeablen Polycarbonatmembran (Porengröße $0,45\ \mu\text{M}$, Membrandicke $10\ \mu\text{M}$) ausgesät und die HUVEC in der Schale als Monolayer kultiviert wurden (Siehe Abbildung 4.3).

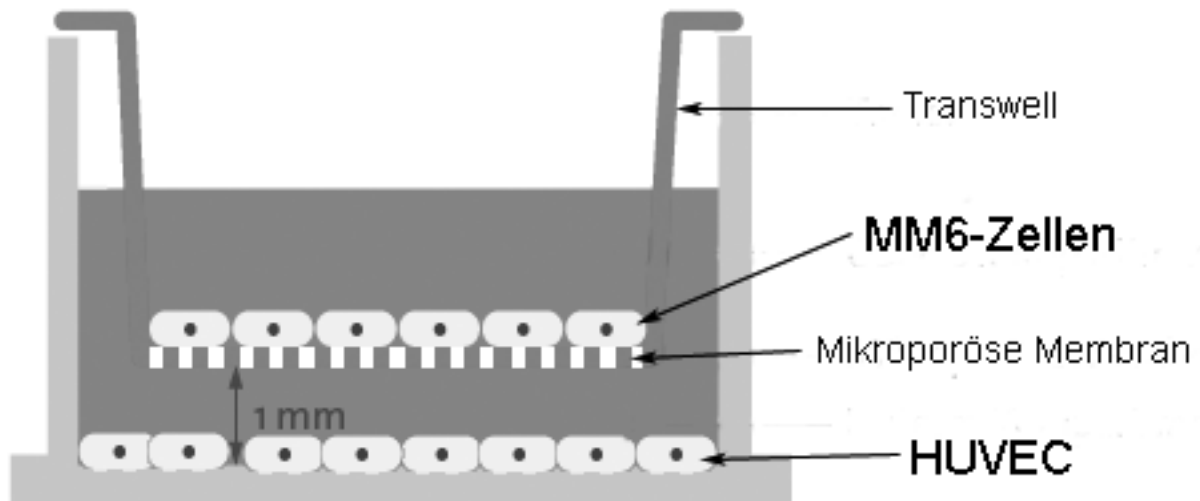


Abbildung 4.3: Schematischer Aufbau des Transwell®-Membransystem-Versuchs

Unter den Co-Kulturbedingungen dieser Versuchreihe demonstrierten HUVEC eine Induzierbarkeit für MCP-1 in Anwesenheit von MM6-Zellen, die in direkter Co-Kultur deutlich stärker ausgeprägt war als in indirekter Co-Kultur unter Einsatz eines Transwell-Filters.

Die indirekten Co-Kulturen exprimierten 54,2% weniger MCP-1 als die direkten Co-Kulturen, wie in Abbildung 4.4 zu sehen ist. Dies lässt den Schluss zu, dass die Induzierbarkeit von MCP-1 in diesem Modell von der Adhäsion der beiden Zellarten abhängig ist.

Umgekehrt zeigten die nächsten Versuchsreihen, dass die Induzierbarkeit für c-fos in indirekter Co-Kultur genauso ausgeprägt war wie in direkter Co-Kultur. Die Differenz der beiden Co-Kulturen betrug im Mittel nur 7,6%, wie in Abbildung 4.5 zu sehen ist. Das bedeutet keinen signifikanten Unterschied in der Expression von c-fos zwischen der direkten und indirekten, mit Transwell-Filtern inkubierten Co-Kultur. Daraus lässt sich schließen, dass ein Zell-Zell-Kontakt für die vermehrte Expression von c-fos nicht notwendig ist.

Außerdem ist anzunehmen, dass die vermehrte Expression von MCP-1 am ehesten aus den HUVEC und die von c-fos aus den MM6-Zellen stammen. Wie in Abbildung 4.4 deutlich zu sehen ist, stammen 45,4 % der MCP-1 Expression von den HUVEC, und im Vergleich dazu werden nur 0,4 % von den MM6-Zellen exprimiert. Bei der Expression von c-fos ist es umgekehrt: hier werden 85,5 % des c-fos von den MM6-Zellen exprimiert und nur 22,1 % von den HUVEC [Siehe Abbildung 4.5]. Um diese Vermutung zu verifizieren, wurden weitere Versuche mit Actinomycin D durchgeführt.

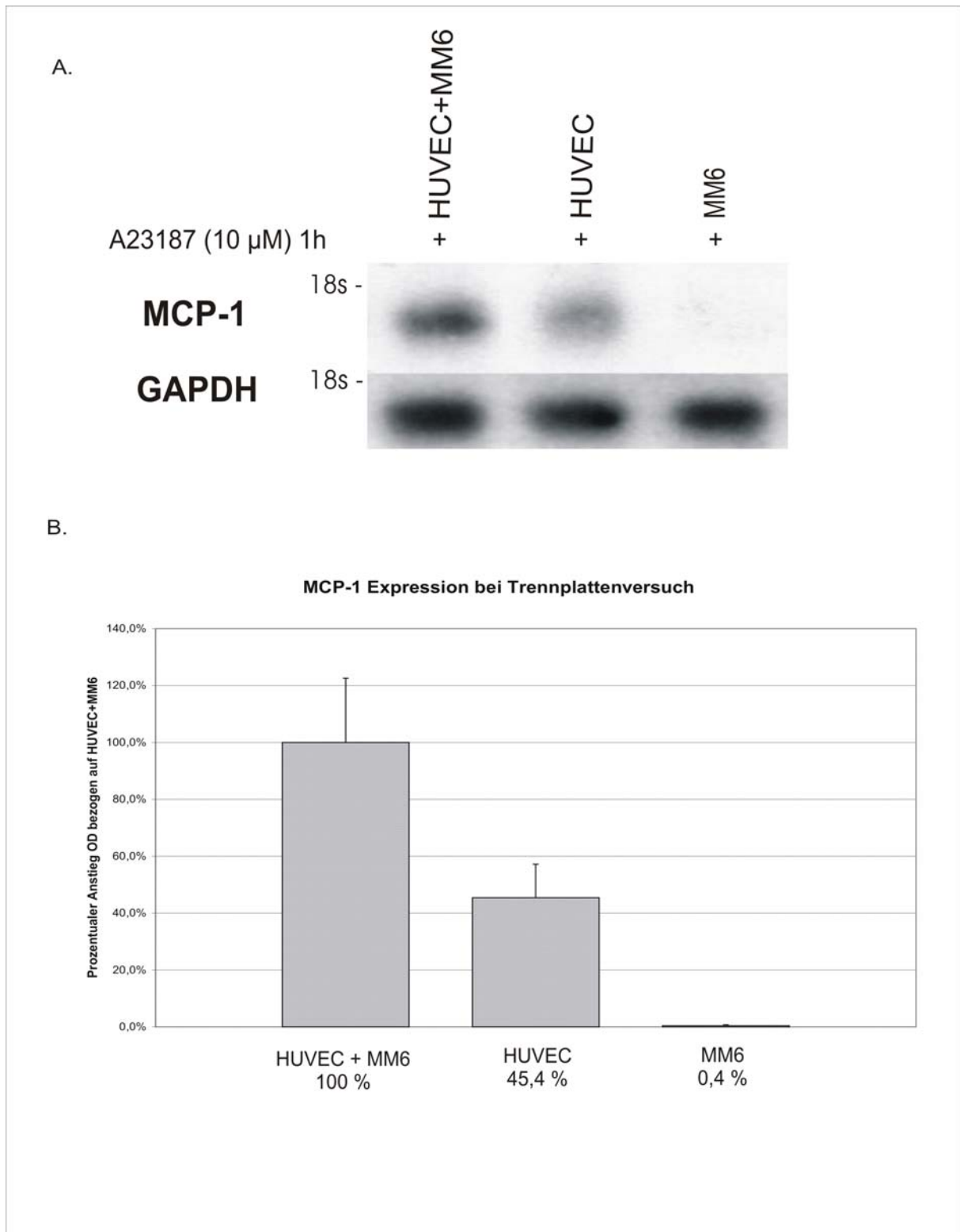


Abbildung 4.4

A: Autoradiogramm einer Northern-Blot Analyse für die mRNA von MCP-1 und GAPDH. Die HUVEC wurden für 30 Minuten gemeinsam oder durch das Transwell®-Membransystem getrennt mit den MM6-Zellen inkubiert und anschließend mit A23187 für 60 Minuten stimuliert.

B: Grafische Auswertung der mittels Laserdensitometrie ermittelten Dichtewerte der Blots von drei identischen Experimenten. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert +/- Standardabweichung von drei Messungen. Es zeigt sich, dass die Steigerung der Expression von MCP-1 vom Zell-Zell-Kontakt abhängig ist.

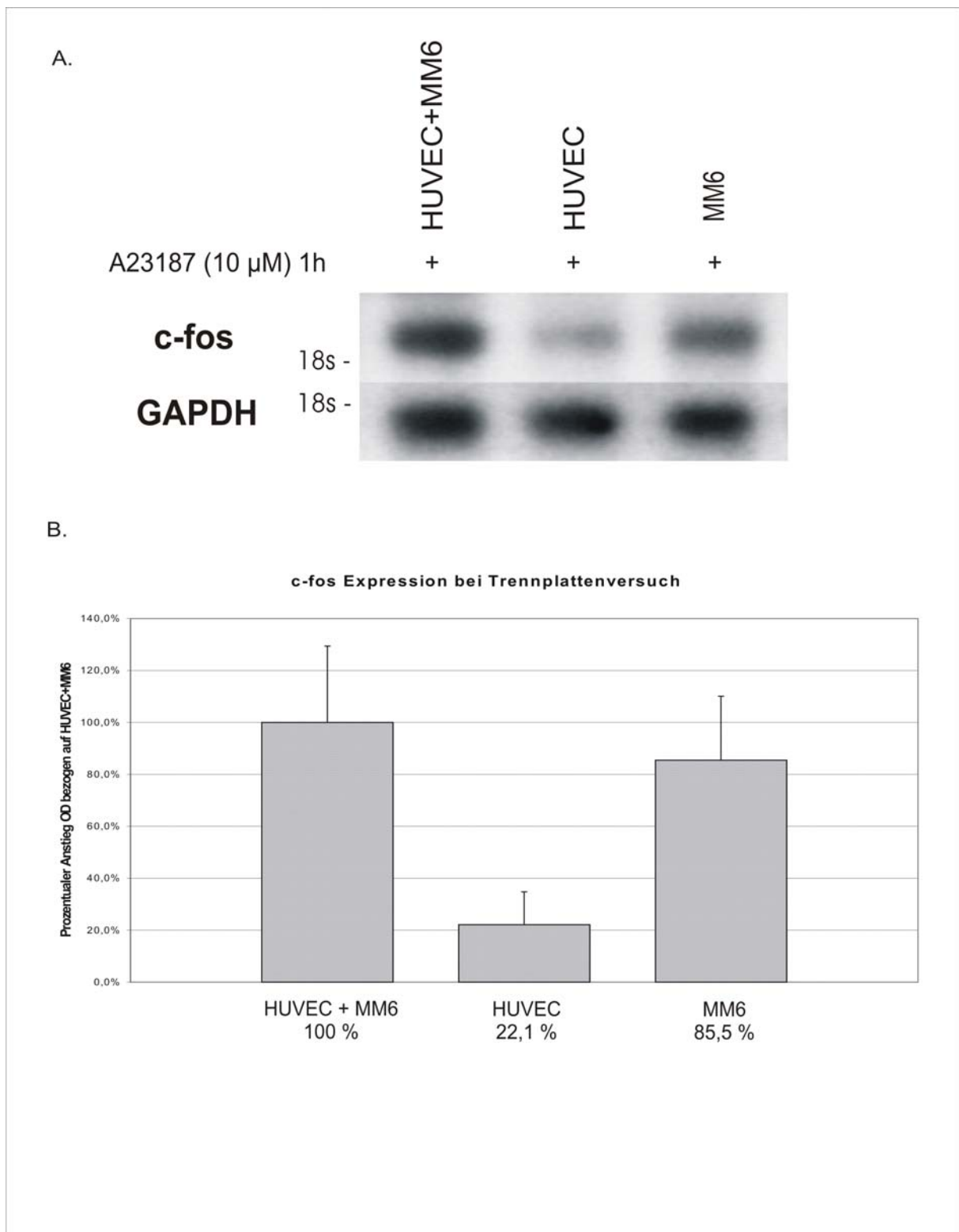


Abbildung 4.5

A: Autoradiogramm einer Northern-Blot Analyse für die mRNA von c-fos und GAPDH. Die HUVEC wurden für 30 Minuten mit Zell-Zell Kontakt oder durch das Transwell®-Membransystemen mit den MM6-Zellen inkubiert und anschließend mit A23187 für 60 Minuten stimuliert.

B: Grafische Auswertung der mittels Laserdensitometrie ermittelten Dichtewerte der Blots von drei identischen Experimenten. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert +/- Standardabweichung von drei Messungen. Es zeigt sich, dass die Steigerung der Expression von c-fos unabhängig von Zell-Zell-Kontakt exprimiert wird.

4.1.3 Induzierbarkeit von MCP-1 in HUVEC

Die beschriebenen Ergebnisse der durchgeführten Experimente legen die Vermutung nahe, dass für die vermehrte Expression von MCP-1 die HUVEC verantwortlich sind. Um dies zu untersuchen, wurde eine Versuchreihe mit Actinomycin D durchgeführt. Actinomycin D oder Dactinomycin (Handelsnamen *Lyovac-Cosmegen®*, *Cosmegen®*; Hersteller: MSD) ist ein Zytostatikum zur Behandlung von Krebserkrankungen. Es gehört zur Gruppe der zytotoxischen Antibiotika. Seine antineoplastische Wirkung wird durch die Bindung an DNA vermittelt, wo Actinomycin D die RNA-Synthese hemmt.

In niedrigen Dosierungen hemmt Actinomycin D die DNA-abhängige RNA-Synthese durch Interkalation der Guanin-Nukleotide der DNA. Durch die Bindung an die DNA wird die DNA-abhängige RNA-Polymerase blockiert: die Bildung von mRNA unterbleibt und die Proteinproduktion nimmt ab. In höherer Dosierung wird durch Actinomycin D auch die DNA-Replikation gehemmt. Hierbei wird die DNA-Polymerase in ihrer Aktivität blockiert.

In dieser Versuchreihe wurden die beiden Zellarten für 20 Minuten mit einer Konzentration von 5 µg/ml Actinomycin D vorbehandelt, um die Bildung von mRNA zu blockieren. Die Versuchreihe wurde so durchgeführt, dass einmal HUVEC und gleichzeitig MM6-Zellen und einmal jeweils nur eine Zellart vorbehandelt wurden. In den Versuchen, in denen nur eine Zellart blockiert wurde, konnte die jeweils andere Zellart weiter mRNA bilden.

Die Versuchreihe wurde wie folgt durchgeführt: Die Versuche 1-3 sind Kontrollen, d.h. HUVEC, MM6-Zellen und HUVEC+MM6-Zellen werden ohne Actinomycin D inkubiert. In den nächsten drei Versuchen wurden die HUVEC für 20 Minuten mit Actinomycin D vorbehandelt, um damit die Bildung von mRNA zu blockieren. Anschließend wurde bei dem Versuch 5, 6 und 8 MM6-Zellen zugeben, die MM6-Zellen im Versuch 6 und 8 wurden aber ebenfalls 20 Minuten mit Actinomycin D vorbehandelt. Im Versuch 7 wurden mit Actinomycin D vorbehandelte MM6-Zellen ohne HUVEC inkubiert. Vor Inkubation der Zellen wurde das Actinomycin D wieder ausgewaschen. Damit sollte verhindert werden, dass das Actinomycin D nicht die unbehandelten Zellen blockieren konnte.

In der Abbildung 4.6 ist zu sehen, dass es ausschließlich bei den Versuchen 3 und 8 zu einer vermehrten Expression von MCP-1 kommt. Da in Versuch 8 nur die HUVEC mRNA exprimieren konnten, führt dies zu dem Schluss, dass die HUVEC für die vermehrte Expression von MCP-1 verantwortlich sind. Damit kommt es zu einer MCP-1 Induktion in HUVEC durch MM6-Zellen Kontakt und Stimulation, diese Induktion konnte in HUVEC bisher durch TNF α und IL-1 ausgelöst werden (Sica 1990).

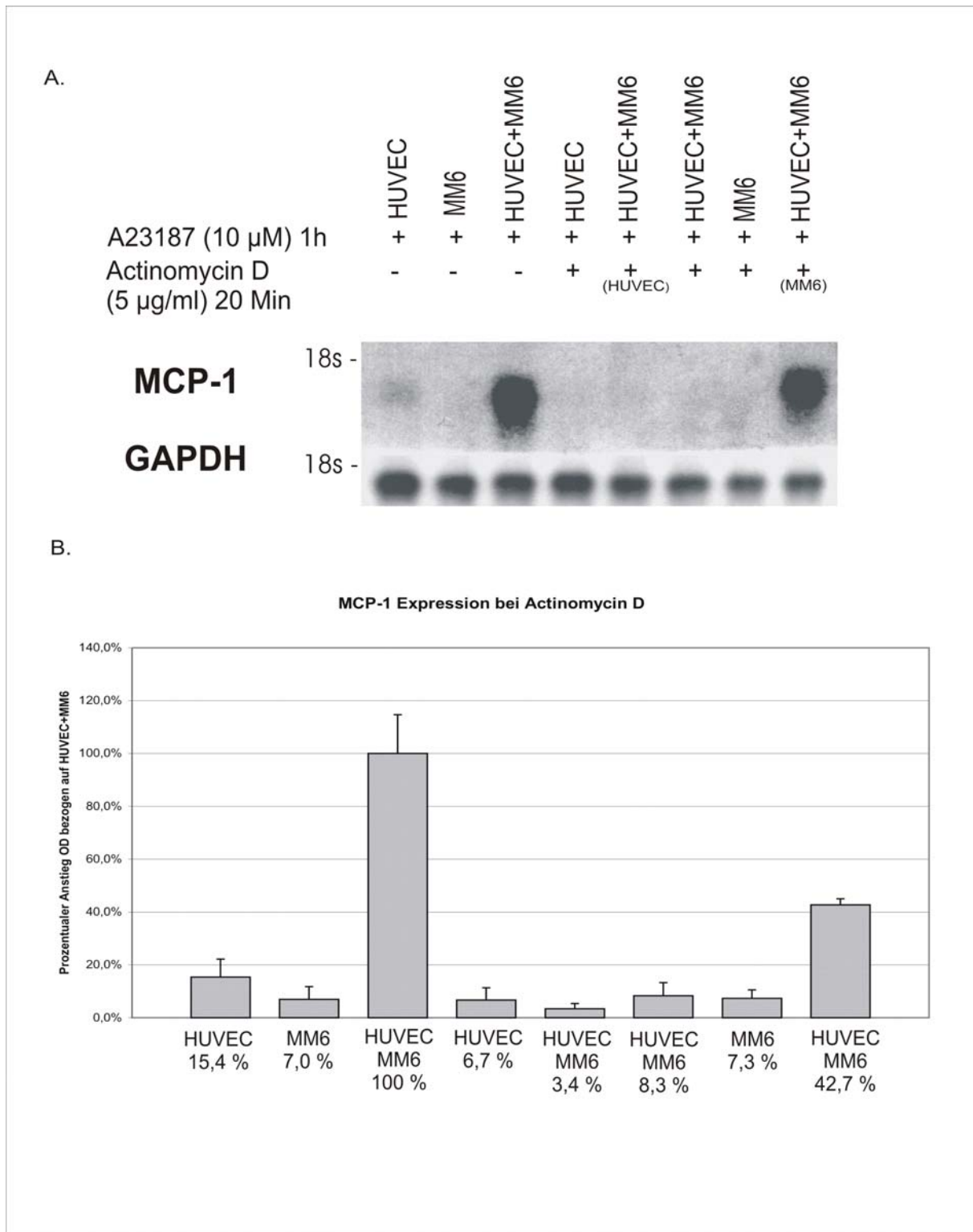


Abbildung 4.6

A: Autoradiogramm einer Northern-Blot Analyse für die mRNA von MCP-1 und GAPDH. Die HUVEC wurden für 30 Minuten mit oder ohne MM6 Zellen inkubiert und anschließend mit A23187 für 60 Minuten stimuliert.

Zuvor wurden die Zellen je nach Versuchsreihe 20 Minuten mit Actinomycin D (5 μ g/ml) vorbehandelt.

B: Grafische Auswertung der mittels Laserdensitometrie ermittelten Dichtewerte der Blots von drei identischen Experimenten. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert +/- Standardabweichung von drei Messungen. Es zeigt sich, dass es nur bei unbehandelten HUVEC mit vorbehandelten MM6-Zellen zu einer signifikanten Steigerung der Expression von MCP-1 kommt.

4.1.4 Induzierbarkeit von c-fos in MM6-Zellen

In einer in derselben Weise aufgebauten Versuchsanordnung zur Expression von c-fos ergab, dass in diesem Fall die MM6-Zellen für die vermehrte Expression verantwortlich sind. Damit entsteht diese c-fos Expression nicht aus dem gleichen Zelltyp wie bei Treitl (2004), diese vermehrte c-fos Expression stammte nicht wie in dieser Arbeit aus MM6-Zellen sondern aus den verletzten HUVEC. Wie in Abbildung 4.7 zu sehen ist, ist im Versuch 3 und 5 eine vermehrte Expression zu erkennen, und da in Versuch 5 nur MM6-Zellen die mRNA exprimieren können, muss die vermehrte Expression folglich von c-fos von den MM6-Zellen ausgehen.

Zusammenfassend stammt die vermehrte MCP-1 Expression in diesem in vitro Zellkulturmodell von den Endothelzellen, die durch Calcium-Ionophor und die Adhäsion der Monozyten aktiviert wurden. „Die Endothelzellaktivierung äußert sich in einer erhöhten Adhäsivität des Endothels gegenüber Monozyten und in einer verstärkten Produktion von chemotaktischen Faktoren wie MCP-1 (Hansson, 2005; Lüscher 2000).“ Diese vermehrte Expression von MCP-1 in HUVEC ist vergleichbar mit der von Rimbach (2000) durch stimulierte Makrophagen induzierte Expression von MCP-1.

Auch die Aktivierung der Monozyten, die unabhängig von der Endothelzelladhäsion, jedoch stimuliert durch Calcium-Ionophor vermehrte c-fos exprimieren, entspricht der Pathogenese der Atherosklerose. „Es sind die Monozyten, die wahrscheinlich über ihren Rezeptor CCR2 und dessen Bindung an MCP-1 aktiviert und angezogen werden (Boisvert 1998; Boring 1998; Dawson 1999; Gu 1998).“ Diese vermehrte Expression von c-fos konnte die Gruppe um Doktor (1994) bereits nachweisen.

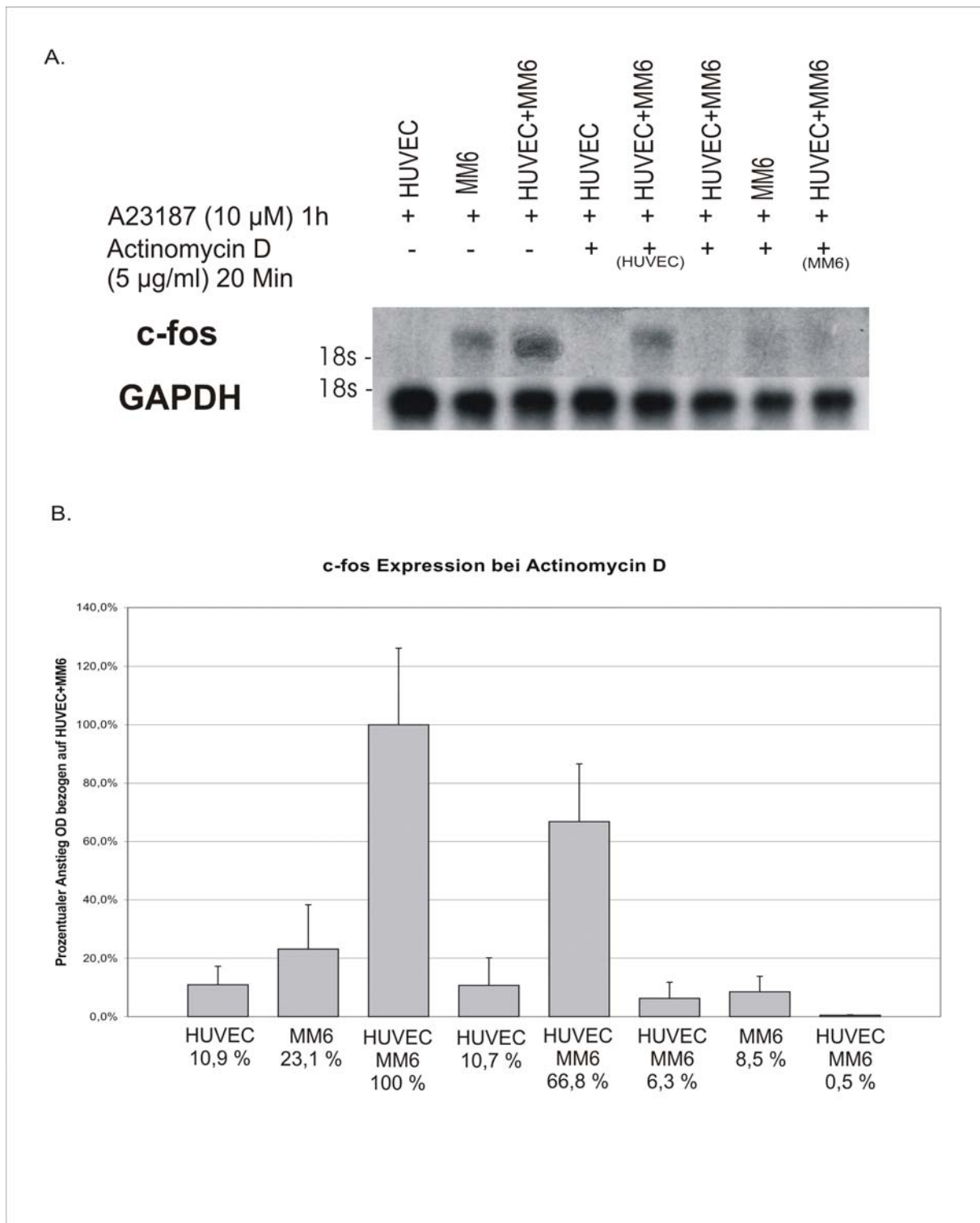


Abbildung 4.7

A: Autoradiogramm einer Northern-Blot Analyse für die mRNA von c-fos und GAPDH. Die HUVEC wurden für 30 Minuten mit oder ohne MM6 Zellen inkubiert und anschließend mit A23187 für 60 Minuten stimuliert. Zuvor wurden die Zellen je nach Versuchsreihe 20 Minuten mit Actinomycin D (5 μ g/ml) vorbehandelt.

B: Grafische Auswertung der mittels Laserdensitometrie ermittelten Dichtewerte der Blots von drei identischen Experimenten. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert \pm Standardabweichung von drei Messungen. Es zeigt sich, dass es nur bei vorbehandelten HUVEC mit unbehandelten MM6-Zellen zu einer signifikanten Steigerung der Expression von c-fos kommt.

4.2 Untersuchung der Eikosanoidsystem vermittelten Signalübertragung

4.2.1 Versuchsreihe zur selektiven Inhibition von Phospholipase A₂

Die Synthese von Arachidonsäuremetaboliten im menschlichen Blut kann *in-vitro* durch verschiedene Stimuli induziert werden. Hierzu gehören Calcium-Ionophor A23187 (Borgeat 1979). Um auszuschließen, dass dies der Grund für die Aktivierung der Monozyten oder Endothelzellen ist, wurden die HUVEC und MM6-Zellen mit AACOCF₃ (Calbiochem 100109) vorbehandelt. AACOCF₃ (arachidonoyl trifluoromethyl ketone) ist ein selektiver cytosolischer Phospholipase A₂ Inhibitor, der durch Inhibition der Phospholipase A₂ (PLA₂) den gesamten AA-Stoffwechsel blockiert. Um diesen hemmenden Effekt von AACOCF₃ auszugleichen, wurde bei der dritten Versuchsanordnung mit Arachidonsäure (Sigma A9673) präinkubiert.

Es zeigte sich jedoch, wie in Abbildung 4.8 zu sehen, auch hier keine signifikante Hemmung der Expression von MCP-1, und auch bei c-fos [siehe Abbildung 4.9] war keine verminderte Expression zu erkennen. In Abbildung 4.9 ist die vermehrte Expression von c-fos mit 210,7 % auffällig. In diesen Versuchen wurden die HUVEC und MM6-Zellen mit Arachidonsäure präinkubiert. Die vermehrte Expression entspricht den veröffentlichten Daten von Danesch (1994), bei denen es bei 3T3 Fibroblasten zu einer erhöhten Expression von c-fos kam bei Präinkubation mit Arachidonsäure.

Somit bestätigt sich, wie auch in den Versuchsreihen zuvor, dass der Arachidonsäurestoffwechsel keinen hemmenden Einfluss auf die Expression von MCP-1 und c-fos hat. Es ist jedoch anzumerken, dass eine 30minütige Präinkubation mit Arachidonsäure zu einer 100 % Steigerung der Expression von c-fos führt die durch AACOCF₃ nicht gehemmt wird, wie in Abbildung 4.9 zu sehen ist. Erste Hinweise auf eine mögliche nicht Beteiligung der Phospholipase A₂ lieferte die mehrfach zitierte Arbeit von Danesch 1994. Der Gruppe gelang es, in einem Zellkulturmodell mit 3T3 Fibroblasten die Beteiligung der Proteinkinase C bei der erhöhten Expression von c-fos unter Stimulation mit Arachidonsäure nachzuweisen.

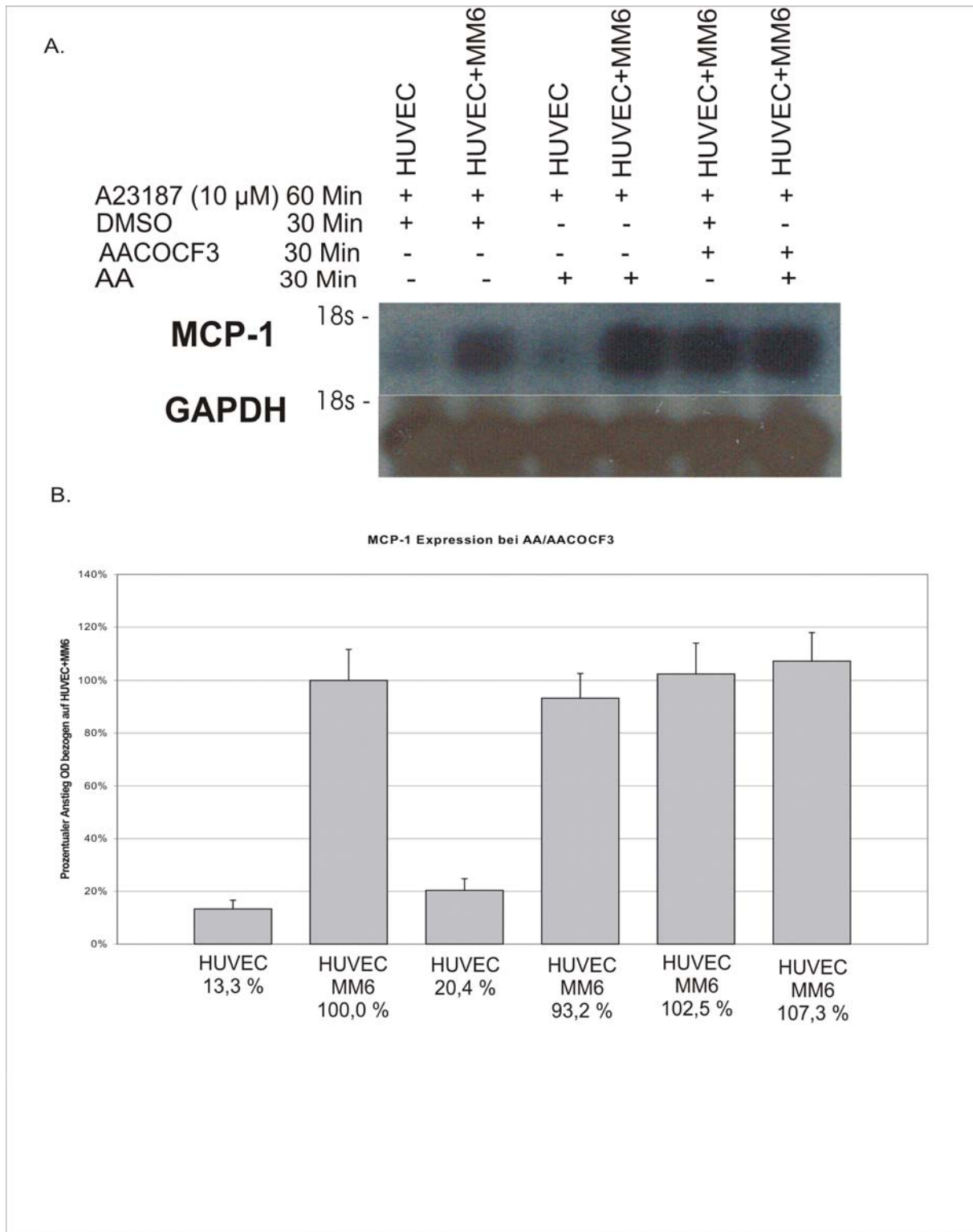


Abbildung 4.8

A: Autoradiogramm einer Northern-Blot Analyse für die mRNA von MCP-1 und GAPDH. Die HUVEC wurden für 30 Minuten mit oder ohne MM6 Zellen inkubiert und anschließend mit A23187 für 60 Minuten stimuliert. Zuvor wurden die Zellen je nach Versuchsreihe 30 Minuten mit DMSO oder Arachidonsäure (AA) präinkubiert. Im Versuch 5 und 6 wurde zusätzlich mit AACOCF3 vorbehandelt.

B: Grafische Auswertung der mittels Laserdensitometrie ermittelten Dichtewerte der Blots von drei identischen Experimenten. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert +/- Standardabweichung von drei Messungen. Es zeigt sich keine signifikante Hemmung der Expression von MCP-1.

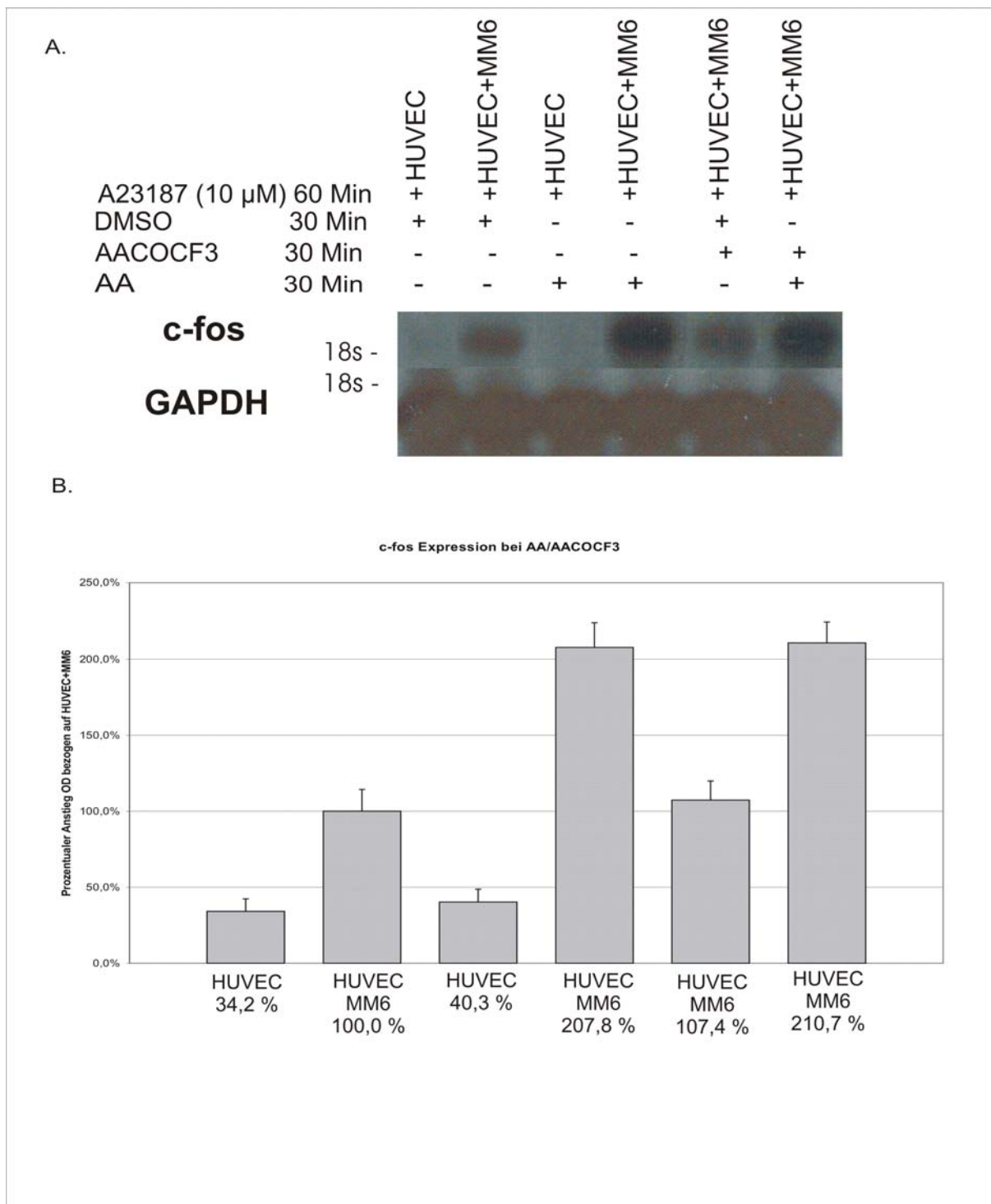


Abbildung 4.9

A: Autoradiogramm einer Northern-Blot Analyse für die mRNA von c-fos und GAPDH. Die HUVEC wurden für 30 Minuten mit oder ohne MM6 Zellen inkubiert und anschließend mit A23187 für 60 Minuten stimuliert. Zuvor wurden die Zellen je nach Versuchsreihe 30 Minuten mit DMSO oder Arachidonsäure (AA) präinkubiert. Im Versuch 5 und 6 wurde zusätzlich mit AACOCF3 vorbehandelt.

B: Grafische Auswertung der mittels Laserdensitometrie ermittelten Dichtewerte der Blots von drei identischen Experimenten. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert +/- Standardabweichung von drei Messungen. Es zeigt sich keine signifikante Hemmung der Expression von c-fos, auffällig war die erhöhte Expression von c-fos bei Präinkubation mit Arachidonsäure.

4.2.2 Inhibition von Cyclooxygenase und Lipoxygenase

Möglicherweise ist bei der Signaltransduktion von MCP-1 oder c-fos der Arachidonsäuremetabolismus doch beteiligt. Hinweise dafür lieferte die Gruppe um Danesch (1994), die zeigen konnte, dass in 3T3 Fibroblasten die c-fos Expression an den Arachidonsäuremetabolismus gekoppelt ist. Klinische Studien weisen darauf hin, dass ASS die Endothelfunktion bei kardiovaskulär erkrankten Patienten verbessern und die Entwicklung atherosklerotischer Gefäßveränderungen verzögern kann (Ranke 1993; Husain 1998; Noon 1998; Monobe 2001). Auch in verschiedenen Tiermodellen vermindert ASS im Vergleich zu Placebo die durch cholesterolreiche Diät oder Verletzung des Gefäßes induzierte Atherogenese (Pick 1979; Kim 1983; Schaub 1983; Volker 1990; Paul 2000). Durch ASS Gabe sollte im folgenden Versuch ermittelt werden, ob es im verwendeten in-vitro Modell zu einer Hemmung der Expression von MCP-1 oder c-fos kommt. Yang (2004) konnte mit ASS die durch TNF α induzierte MCP-1 Expression in HUVEC hemmen. Darüber hinaus wurden zwei weitere Inhibitoren des Arachidonsäurestoffwechsels untersucht: NDGA (Nordihydroguajaretsäure) ein 5-LOX-Inhibitor und Indometacin ein COX-1/2-Inhibitor. Indometacin konnte von Danesch zur Inhibition von AA induziertem c-fos in 3T3 Fibroblasten verwendet werden (Danesch 1994).

Weder ASS, Indometacin noch NDGA bewirkten in diesen Versuchen eine Hemmung von MCP-1 oder c-fos. In Abbildung 4.10 ist zu sehen, dass weder ASS noch die anderen oben genannten Inhibitoren einen hemmenden Effekt auf die Expression von MCP-1 haben. ASS, NDGA und Indometacin wurden in einer Konzentration von 10 μ Mol für 30 Minuten mit den Zellen inkubiert wie in den Versuchen bei Danesch et al.

Auch der Hemmversuch, in Abbildung 4.11 dargestellt, zeigt keine Hemmung der Expression von c-fos. Zusammenfassend kann nach Auswertung dieser Versuchsreihen festgestellt werden, dass weder ASS, NDGA noch Indometacin in diesem Zellkulturmodell zu einer signifikanten Hemmung des c-fos führen. Dies lässt den Schluss zu, dass die Arachidonsäurekaskade nicht an der vermehrten Expression von MCP-1 und c-fos beteiligt ist.

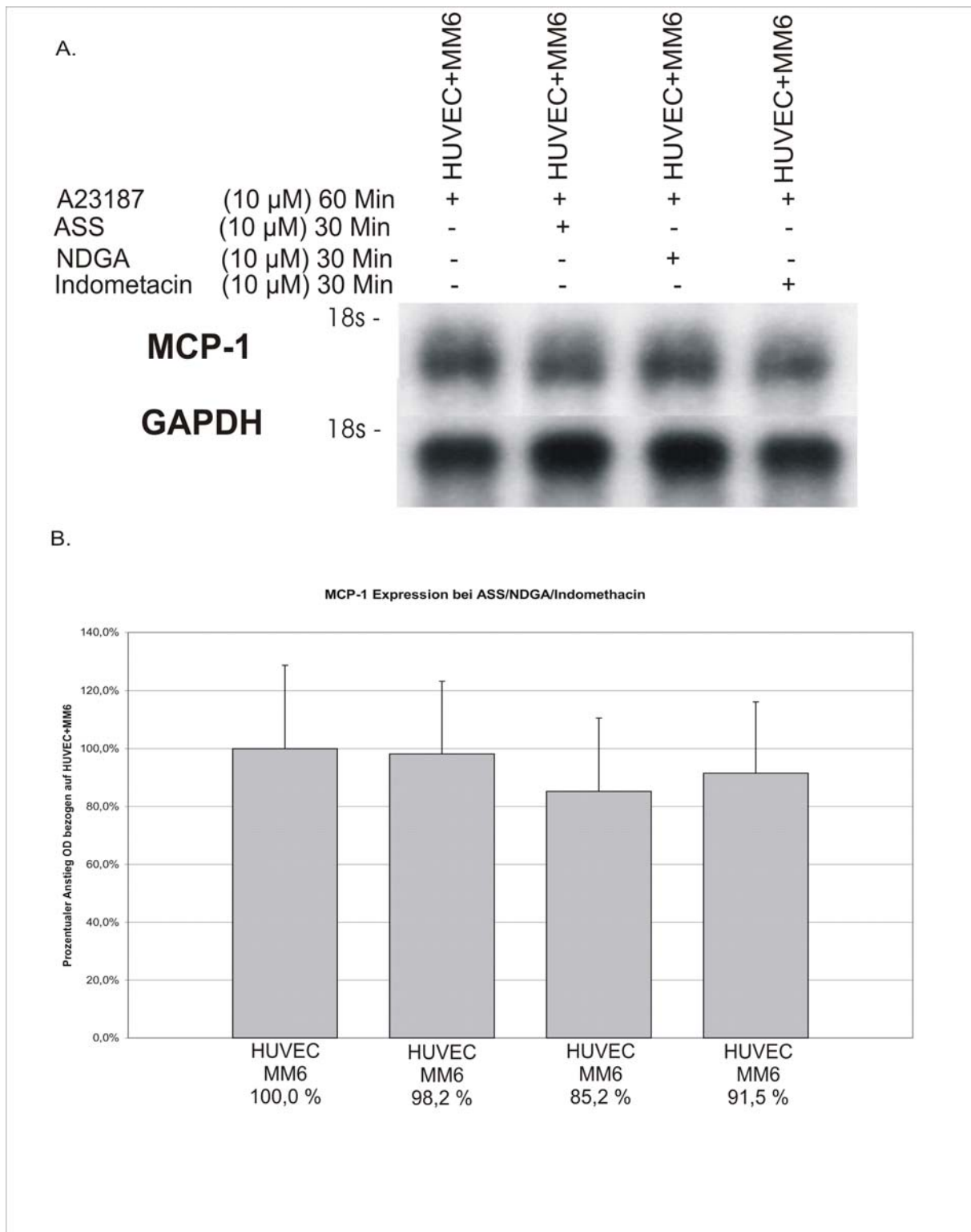


Abbildung 4.10

A: Autoradiogramm einer Northern-Blot Analyse für die mRNA von MCP-1 und GAPDH. Die HUVEC wurden für 30 Minuten mit MM6 Zellen inkubiert und anschließend mit A23187 für 60 Minuten stimuliert. Zuvor wurden die Zellen je nach Versuchsreihe 30 Minuten mit ASS, NDGA oder Indometacin vorbehandelt.

B: Grafische Auswertung der mittels Laserdensitometrie ermittelten Dichtewerte der Blots von drei identischen Experimenten. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert +/- Standardabweichung von drei Messungen. Es zeigt sich keine signifikante Hemmung der Expression von MCP-1.

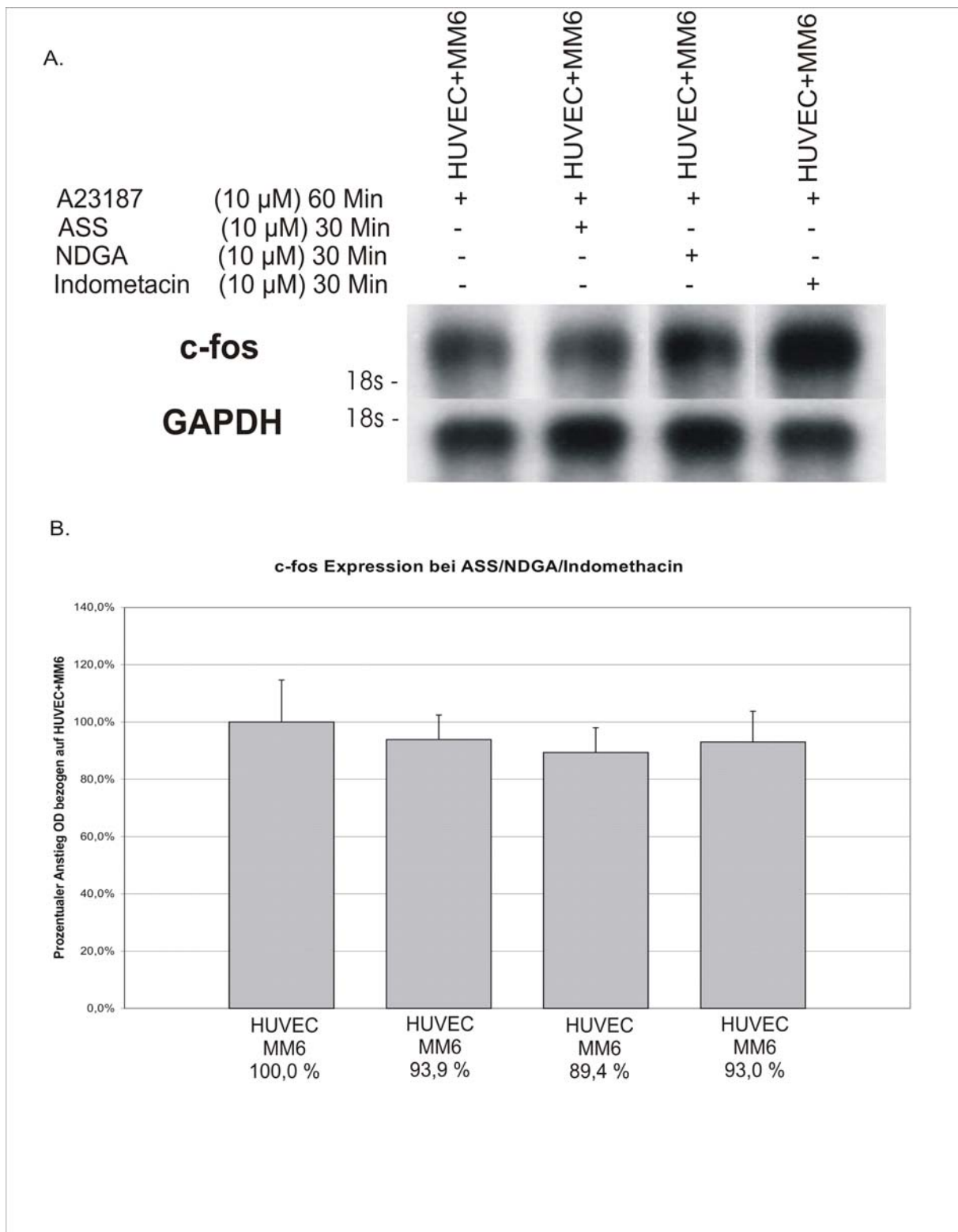


Abbildung 4.11

A: Autoradiogramm einer Northern-Blot Analyse für die mRNA von c-fos und GAPDH. Die HUVEC wurden für 30 Minuten mit MM6 Zellen inkubiert und anschließend mit A23187 für 60 Minuten stimuliert. Zuvor wurden die Zellen je nach Versuchsreihe 30 Minuten mit ASS, NDGA oder Indometacin vorbehandelt.

B: Grafische Auswertung der mittels Laserdensitometrie ermittelten Dichtewerte der Blots von drei identischen Experimenten. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert +/- Standardabweichung von drei Messungen. Es zeigt sich keine signifikante Hemmung der Expression von c-fos.

4.2.3 Versuchsreihe zur selektiven Inhibition von 5-Lipoxygenase

Obwohl in der zuvor dargestellten Versuchsreihe zu sehen war, dass die vermehrte Expression von MCP-1 und c-fos nicht über den Arachidonsäurestoffwechsel induziert wird, ist in dieser Versuchsreihe ein zusätzlicher selektiver 5-Lipoxygenase-Inhibitor getestet worden. Der hier verwendete Hemmstoff Bay X ist ein selektiver Leukotrien B₄-Inhibitor (LTB₄), ein Translokationshemmer, der keinen direkten Einfluss auf das Enzym hat, sondern der die Bindung von der 5-Lipoxygenase an das 5-lipoxygenaseaktivierende Protein (FLAP) verhindert und dadurch die 5-Lipoxygenase hemmt.

Das nicht-peptidische LTB₄ wird vermehrt in entzündlichen Exsudaten gefunden. Für Leukozyten besitzt LTB₄ eine starke chemotaktische Wirkung und führt damit zu einer Ansammlung dieser Zellen. Überdies spielt LTB₄ eine zentrale Rolle bei der Induktion der Expression von endothelialen und leukozytären Oberflächenmolekülen, die für die Adhäsion und Transmigration der Neutrophilen ins perivaskuläre Gewebe notwendig sind (Tonnesen, 1989). In einigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die prosekretorischen Effekte von Granulozyten-Aktivatoren wie dem Calcium-Ionophor A23187 indirekt über endogen gebildetes LTB₄ oder PAF vermittelt werden (McDonald 1994; Hatzelmann 1994b; Zhou 1993). Darüber hinaus ist der Lipidmediator wie LTB₄ ein chemotaktischer Faktor, der Granulozyten zur Endotheladhäsion veranlasst und die nachfolgende Diapedese einleitet (Zimmermann 1996). Außerdem konnte gezeigt werden das LTB₄ in Monozyten zur vermehrten Expression von c-fos führt (Rola-Pleszcynski 1992).

In den folgenden Versuchsreihen wurde mit Bay X in einer Konzentration von 10 µMol und einer Inkubationszeit von 30 Minuten selektiv das Leukotrien B₄ gehemmt. Unter Bay X ist keine signifikante Hemmung der MCP-1 Expression zu sehen, und auch die Expression von c-fos wurde darunter nicht gehemmt, wie in den Abbildung 4.12 und 4.13 zu sehen ist.

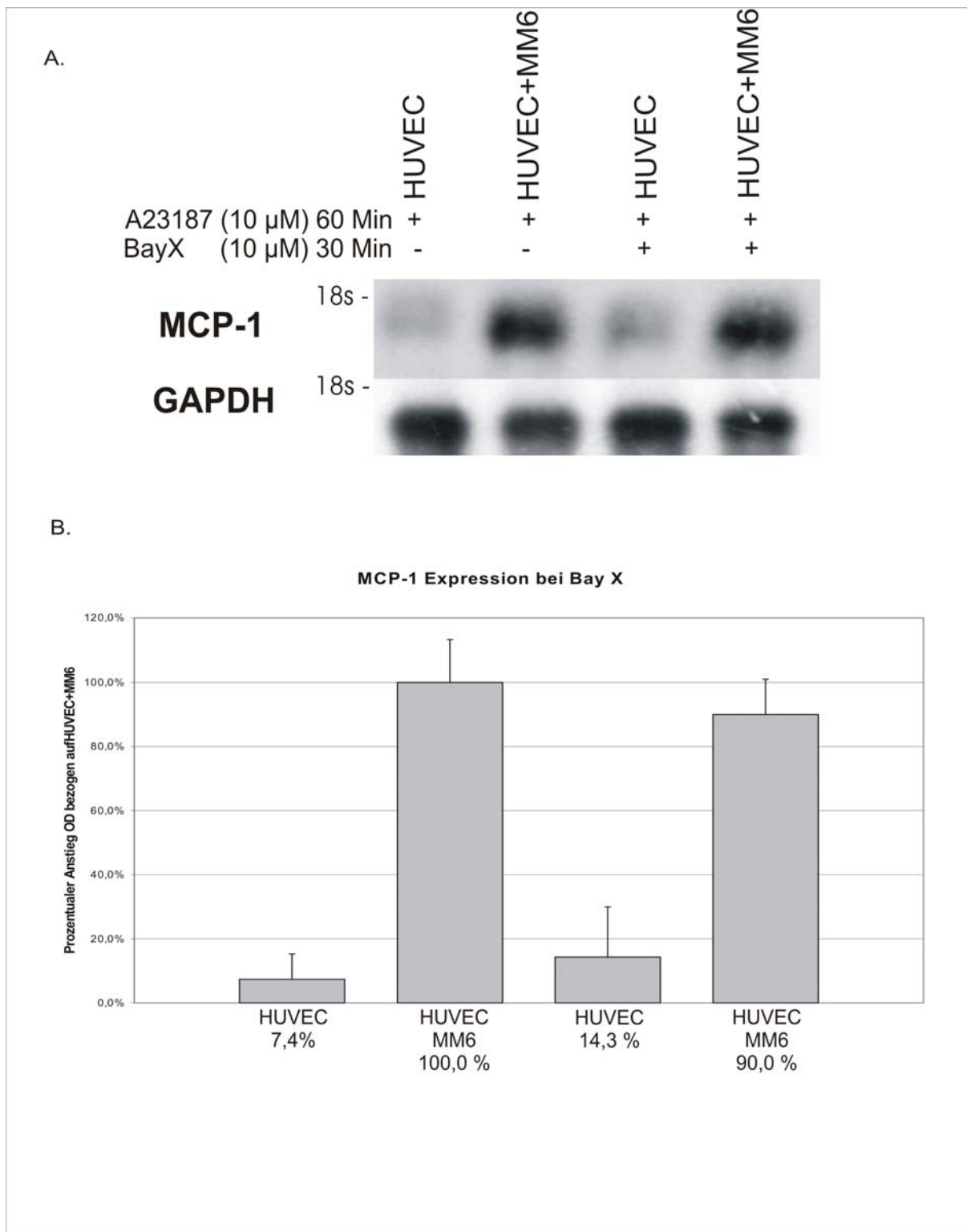


Abbildung 4.12

A: Autoradiogramm einer Northern-Blot Analyse für die mRNA von MCP-1 und GAPDH. Die HUVEC wurden für 30 Minuten mit oder ohne MM6 Zellen inkubiert und anschließend mit A23187 für 60 Minuten stimuliert. Zuvor wurden die Zellen je nach Versuchsreihe 30 Minuten mit Bay X 1005 vorbehandelt.

B: Grafische Auswertung der mittels Laserdensitometrie ermittelten Dichtewerte der Blots von drei identischen Experimenten. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert +/- Standardabweichung von drei Messungen. Es zeigt sich keine signifikante Hemmung der Expression von MCP-1.

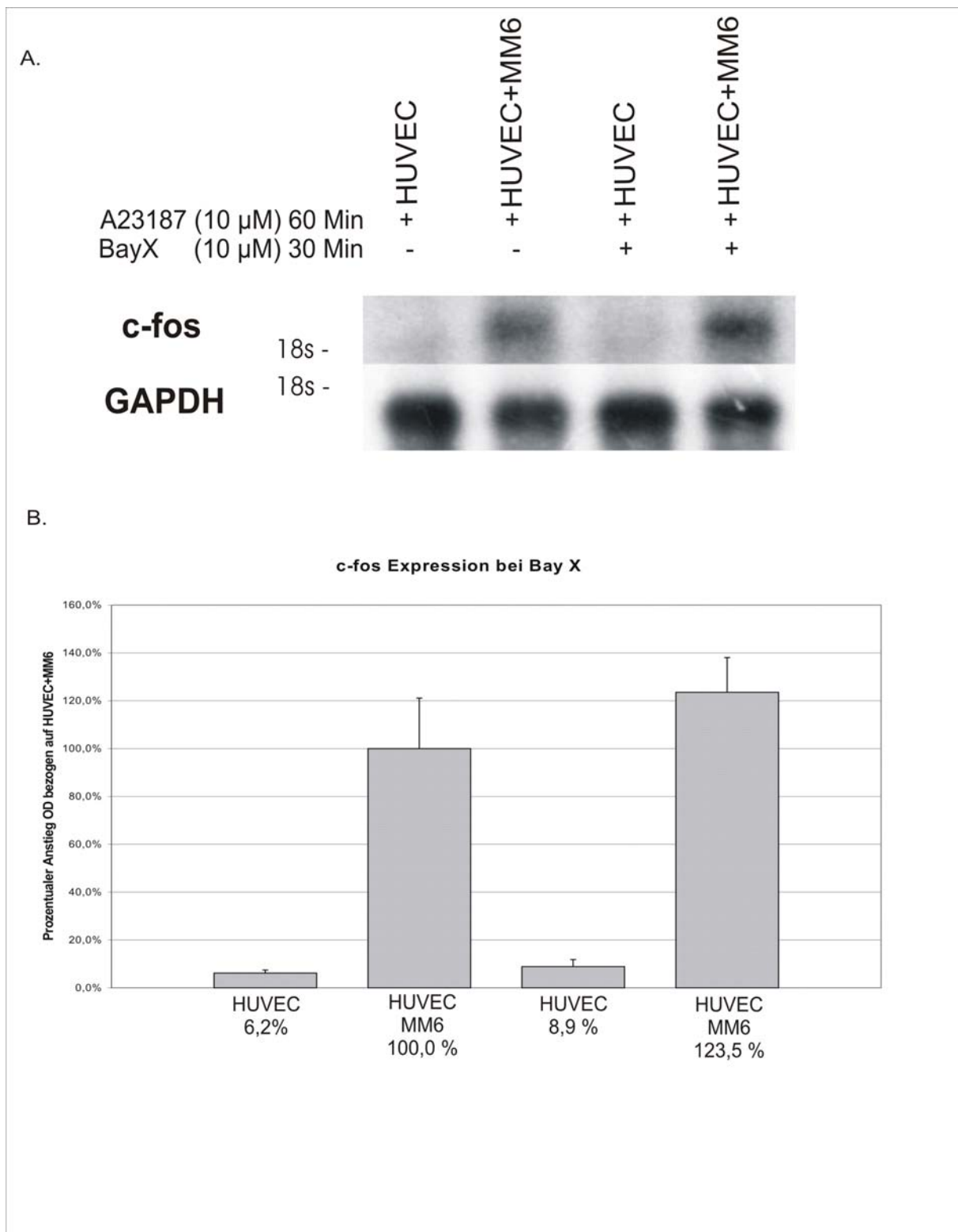


Abbildung 4.13

A: Autoradiogramm einer Northern-Blot Analyse für die mRNA von c-fos und GAPDH. Die HUVEC wurden für 30 Minuten mit oder ohne MM6 Zellen inkubiert und anschließend mit A23187 für 60 Minuten stimuliert. Zuvor wurden die Zellen je nach Versuchsreihe 30 Minuten mit Bay X 1005 vorbehandelt.

B: Grafische Auswertung der mittels Laserdensitometrie ermittelten Dichtewerte der Blots von drei identischen Experimenten. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert +/- Standardabweichung von drei Messungen. Es zeigt sich keine signifikante Hemmung der Expression von c-fos.

4.3 Versuchsreihe zur Untersuchung der Signalübertragung über Adhäsionsmoleküle

4.3.1 Versuchsreihe zur Untersuchung der ICAM-1 vermittelten Signalübertragung

Neben E-Selektin trägt die endotheliale Expression von ICAM-1 maßgeblich zur Adhäsion von Monozyten bei. Das interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) wird auf Fibroblasten, Leukozyten, Endothel-, Epithel- und vielen Tumorzellen exprimiert (Gearing 1993; Van de Stolpe 1996). Als Liganden sind sowohl β_2 -Integrine (LFA-1; Mac-1) auf Leukozyten (Rothlein 1986; Staunton 1988) als auch Rhinoviren (Staunton 1988; Greve 1989) und Plasmodium falciparum-infizierte Erythrozyten beschrieben worden (Ockenhouse 1992a; 1992b). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass ICAM-1 direkt Fibrinogen binden kann (Altieri 1993; Languino 1995). Auf Endothelzellen wird es in geringen Mengen konstitutiv exprimiert und kann dort nach Stimulation mit TNF, IFN- γ und IL-1 verstärkt nachgewiesen werden (Dustin 1986, 1988; Rothlein 1988). Durch Antikörper-Blockade lässt sich *in vitro* die ICAM-1 vermittelte Transmigration von Neutrophilen inhibieren (Furie 1991).

Um zu verifizieren, ob ICAM-1 eine Rolle in der Signalübertragung der Interaktion der MM6-Zellen mit den HUVEC spielt, wurden die Zellen in dieser Versuchsreihe 30 Minuten mit ICAM-1 Antikörper (R & D Systems Clone BBIG-11 (11C8I)) vorbehandelt und damit versucht, den Signalübertragungsweg zu blockieren.

Es zeigte sich in dieser Versuchsreihe (siehe Abbildung 4.14), dass es zu keiner signifikanten Hemmung der Expression von MCP-1 kommt. Auch die Versuchsreihe zur Ermittlung der c-fos Expression ergab keine signifikante Hemmung, wie in Abbildung 4.15 zu sehen ist.

Damit kann davon ausgegangen werden, dass die Interaktion der HUVEC mit den MM6-Zellen in diesem Versuchmodell, die zu einer vermehrten Expression von c-fos und MCP-1 führen, nicht über ICAM-1 vermittelt wird.

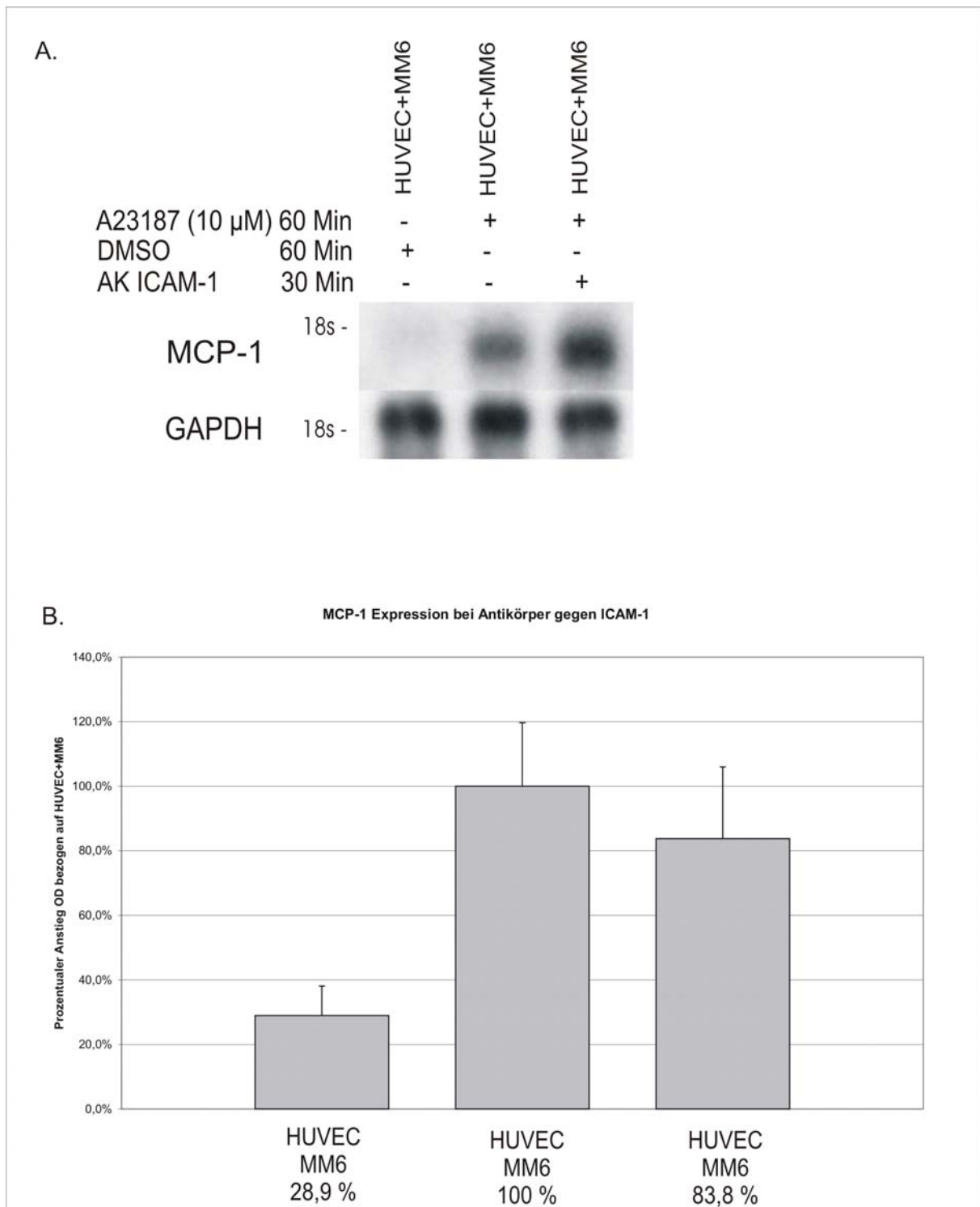


Abbildung 4.14

A: Autoradiogramm einer Northern-Blot Analyse für die mRNA von MCP-1 und GAPDH. Die HUVEC wurden für 30 Minuten mit MM6 Zellen inkubiert und anschließend mit A23187 oder DMSO für 60 Minuten stimuliert. Zuvor wurden die Zellen je nach Versuchsreihe 30 Minuten mit ICAM-1 Antikörper (5 μ g/ml) vorbehandelt.

B: Grafische Auswertung der mittels Laserdensitometrie ermittelten Dichtewerte der Blots von drei identischen Experimenten. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert +/- Standardabweichung von drei Messungen. Es zeigt sich keine signifikante Hemmung der Expression von MCP-1.

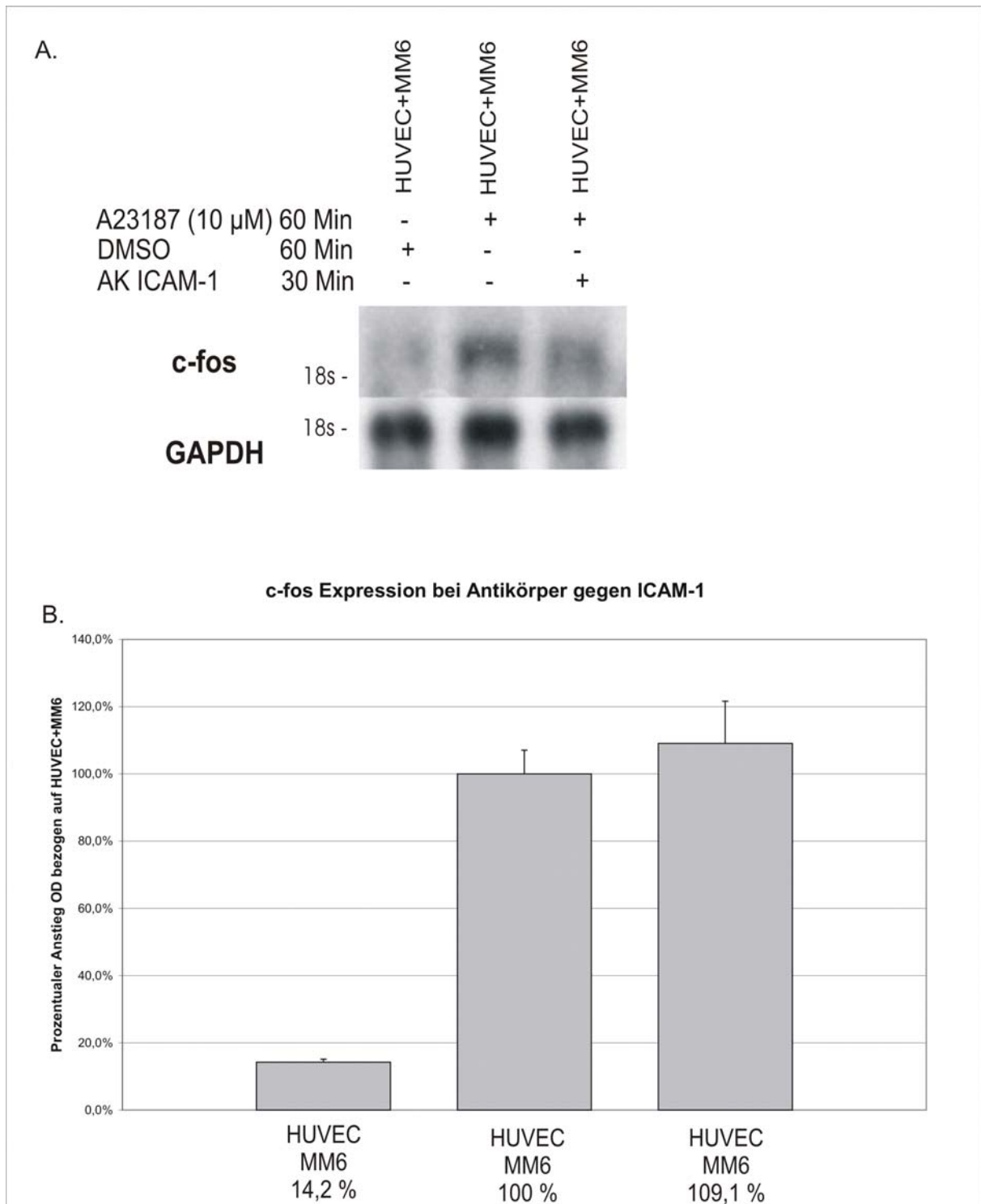


Abbildung 4.15

A: Autoradiogramm einer Northern-Blot Analyse für die mRNA von c-fos und GAPDH. Die HUVEC wurden für 30 Minuten mit MM6 Zellen inkubiert und anschließend mit A23187 für 60 Minuten stimuliert. Zuvor wurden die Zellen je nach Versuchsreihe 30 Minuten mit ICAM-1 Antikörper (5 μ g/ml) vorbehandelt.

B: Grafische Auswertung der mittels Laserdensitometrie ermittelten Dichtewerte der Blots von drei identischen Experimenten. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert +/- Standardabweichung von drei Messungen. Es zeigt sich keine signifikante Hemmung der Expression von c-fos.

4.3.2 Versuchsreihe zur Untersuchung der Fibronectin/Kollagen vermittelten Signalübertragung

Die extrazelluläre Matrix besteht hauptsächlich aus Kollagenen und einem Netzwerk von Glycoproteinen, darunter Fibronectin und Proteoglycane. Die extrazelluläre Matrix dient nicht nur als Stützgewebe für Myozyten und Kapillaren, sondern ist auch maßgeblich an Form, Funktion, Wachstum und Differenzierung der Zellen beteiligt. Es ist möglich, dass eine veränderte Zusammensetzung der extrazellulären Matrix nicht nur ihre Elastizität und somit ihre Reaktion auf mechanische Beanspruchung, sondern auch das Zellwachstum, die Adhäsion und die Wundheilung beeinflusst. Fibronectin ist ein dimeres Glycoprotein, das in der extrazellulären Matrix (ECM) fast aller Gewebe vorkommt und als Brücke zwischen den Zellen und dem interstitiellen Kollagenetzwerk dient. Das Integrin *Very Late Antigen 4* (VLA-4) wird auf der Oberfläche der meisten Leukozyten und verwandten Zellen, wie Lymphozyten, Eosinophilen, Monozyten, Basophilen und Mastzellen exprimiert (Hemler 1987). Das Integrin wurde besonders auf Neutrophilen bei diversen entzündlichen Prozessen gefunden (Issekutz 1996). Zwei natürliche Liganden binden an VLA-4, das extrazelluläre Molekül Fibronectin über sein *Connecting Segment-1* [CS-1] (Wayner 1989) sowie das *Vascular Cell Adhesion Molecule-1* [VCAM-1] (Elices 1990). Die Interaktion zwischen VLA-4 und VCAM-1 und/oder Fibronectin wird als Schlüssel für die Leukozytenadhäsion, Migration und Aktivierung gesehen (Vanderslice 2004). Studien verschiedener Gruppen zeigten erfolgreich, dass die Verwendung von Fibronectinpeptiden zur Blockade von Zell-Zell-Interaktion in vitro (Kumar 1996) und Reduzierung von Monozytenrekrutierung führt (Wahl 1994, Molossi 1995). Deshalb sollte auf der Grundlage dieser Erkenntnisse untersucht werden, ob es möglich ist, mit Fibronectin (Sigma F1141) die in den obigen Versuchen beschriebene Aktivierung der MM6-Zellen und der Endothelzellen zu hemmen. Zur Kontrolle wurde ein Versuch mit Kollagen (Biochrom), einem weiteren extrazellulären Matrix-Protein, durchgeführt.

Wie in Abbildung 4.16 zu sehen ist, kommt es in Versuchsbedingung 4 zu einer signifikanten Hemmung der Expression von MCP-1 um 74,9 %. In diesem Versuch wurden die HUVEC und MM6-Zellen mit 30µg/ml Fibronectin für 30 Minuten inkubiert. In der Kontrollgruppe mit 30µg/ml Kollagen konnte keine Hemmung der Expression von MCP-1 festgestellt werden.

Im Versuch mit c-fos, wie in Abbildung 4.17 zu sehen, kam es zu keiner signifikanten Hemmung, sondern zu einer vermehrten Expression von c-fos um 47,5 % bei Inkubation der HUVEC und MM6-Zellen mit Kollagen.

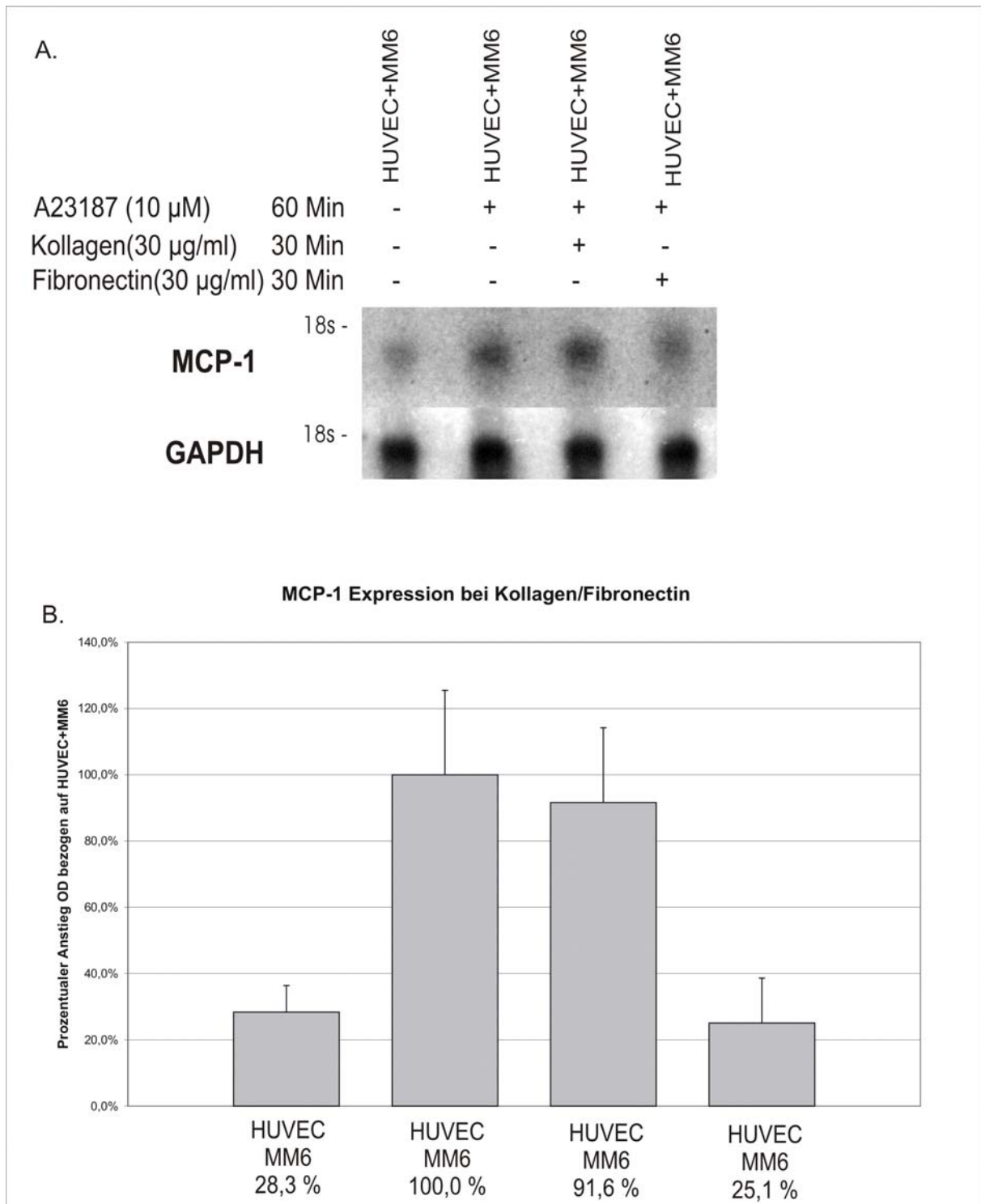


Abbildung 4.16

A: Autoradiogramm einer Northern-Blot Analyse für die mRNA von MCP-1 und GAPDH. Die HUVEC wurden für 30 Minuten mit MM6 Zellen inkubiert und anschließend mit A23187 für 60 Minuten stimuliert. Zuvor wurden die Zellen je nach Versuchsreihe 30 Minuten mit Fibronectin oder Kollagen (30 μ g/ml) vorbehandelt.

B: Grafische Auswertung der mittels Laserdensitometrie ermittelten Dichtewerte der Blots von drei identischen Experimenten. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert +/- Standardabweichung von drei Messungen. Es zeigt sich eine signifikante Hemmung der Expression von MCP-1 bei Gabe von Fibronectin.

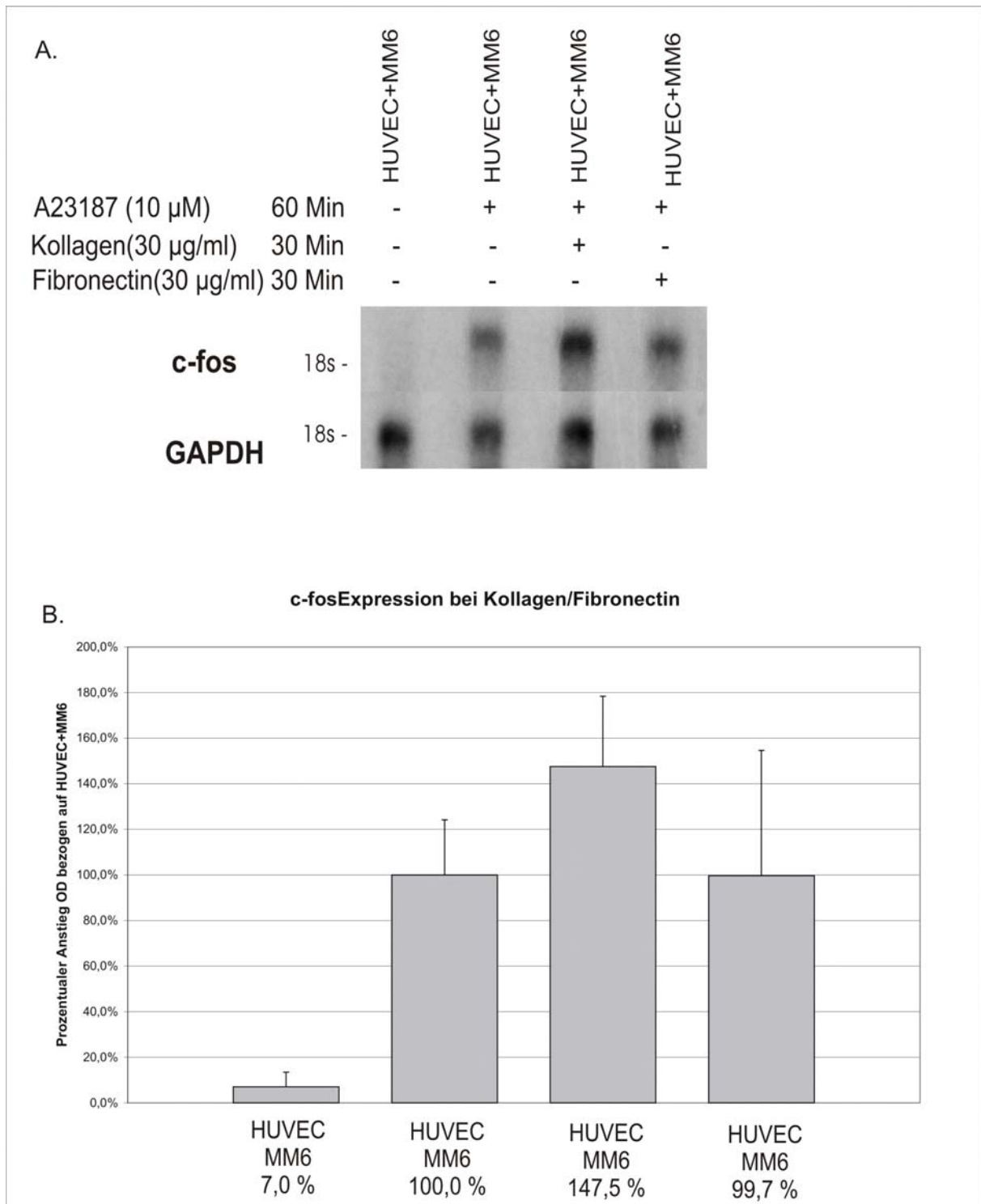


Abbildung 4.17

A: Autoradiogramm einer Northern-Blot Analyse für die mRNA von c-fos und GAPDH. Die HUVEC wurden für 30 Minuten mit MM6 Zellen inkubiert und anschließend mit A23187 für 60 Minuten stimuliert. Zuvor wurden die Zellen je nach Versuchsreihe 30 Minuten mit Fibronectin oder Kollagen (30 μ g/ml) vorbehandelt.

B: Grafische Auswertung der mittels Laserdensitometrie ermittelten Dichtewerte der Blots von drei identischen Experimenten. Jeder Balken repräsentiert den Mittelwert +/- Standardabweichung von drei Messungen. Es zeigt sich keine signifikante Hemmung der Expression von c-fos, bei Gabe von Kollagen kam es eher zu einer vermehrten Expression von c-fos.

Zusammenfassend ist die MCP-1 Expression im Zellkulturmodell dieser Arbeit signifikant durch Fibronectin hemmbar. In den Versuchen mit Kollagen und Arachidonsäure zeigte sich eine Steigerung der Expression von c-fos. Ob diese vermehrte Expression von c-fos von den MM6-Zellen stammt, ist im Folgenden nicht näher untersucht worden.

5 Diskussion

In dieser Arbeit konnte durch verschiedene *in vitro* Versuchsreihen mit HUVEC und MM6-Zellen gezeigt werden, dass durch Stimulation mit A23187 eine erhöhte Expression von c-fos in MM6-Zellen erreicht wird, die unabhängig von einem Zellkontakt mit HUVEC ist. Die vermehrte Expression von MCP-1 in HUVEC ist dagegen von einem Zellkontakt mit den MM6-Zellen direkt abhängig.

Die durchgeführten Versuche zur Hemmung von c-fos in den MM6-Zellen führten zu keiner signifikanten Reduktion der Expression von c-fos. Eine Möglichkeit, dies zu erklären, wäre eine Überstimulation der MM6-Zellen durch 10 μmol A23187. Im Gegensatz dazu konnte in einer Versuchreihe die vermehrte Expression von MCP-1 in HUVEC durch das Glykoprotein Fibronectin gehemmt werden.

5.1 VCAM 1 vermittelte MCP-1 Expression

Da zahlreiche Untersuchungen VCAM-1 als einen der wichtigsten endothelialen Mediatoren bei der Adhäsion und Transmigration von Monozyten bei diesem Phänomen beschreiben, verspricht seine Blockade den effektivsten Rückgang der Immunantwort. VCAM-1 wurde daher zunächst auf seine Interaktion mit Monozyten untersucht. Die Analysen zeigten, dass der Rezeptor sowohl Adhäsion als auch Transmigration der Monozyten vermittelt.

Bisherige Untersuchungen implizierten eine VCAM-1 vermittelte Monozytenadhäsion. So wird beschrieben, dass VCAM-1 in humanen atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen wurde und mit der Akkumulation von Monozyten korreliert zu sein schien (O'Brien 1996). In einfachen *in vitro* Versuchen konnte gezeigt werden, dass VCAM-1, welches von Endothelzellen exprimiert wird, die Adhäsion von Monozyten und Lymphozyten unterstützte (Carlos 1990; Cybulsky 1991; Henseleit 1994). Bei Ratten bedingte die erhöhte VCAM-1 Expression nach der Verletzung von Arterien die Adhäsion von Monozyten und Makrophagen (Landry 1997). Ferner bewirkte die Blockade des Rezeptors mit anti-VCAM-1 in Durchflussexperimenten, bei denen die *Arteria carotis* aus ApoE-defizienten Mäusen mit Monozyten durchspült wurde, eine Abnahme der gebundenen Monozyten (Huo 2000). Auch unstimulierte HUVEC, die mit dem Gen VCAM-1 von Kaninchen transfiziert worden waren, zeigten bei laminaren Durchflussversuchen gegenüber nativen Zellen eine signifikante Erhöhung von gebundenen Monozyten (Gerszten 1998). Allen Untersuchungen ist jedoch

gemeinsam, dass VCAM-1 immer im Verbund mit weiteren endothelialen Oberflächenrezeptoren exprimiert wurde. Unter inflammatorischen Situationen werden neben VCAM-1, aber auch E-Selektin und ICAM-1 verstärkt exprimiert (Carlos 1994), so dass nicht zweifelsfrei geklärt werden konnte, inwieweit die Rekrutierung von Monozyten tatsächlich VCAM-1 zugeschrieben werden kann. So wäre es möglich, dass erst die lockere Bindung, die durch E-Selektin vermittelt wird, die Ausbildung einer festen Bindung von Monozyten an VCAM-1 ermöglicht oder dass vor allem ICAM-1 die Adhäsion der Monozyten vermittelt. Derlei Signalfunktion wurde schon in früheren Untersuchungen vermutet (Yoshida 1996). Auch die Spezifizierung der vermittelten Leukozytenrekrutierung durch gezielte Blockade von VCAM-1 mit anti-VCAM-1 oder die verstärkte Expression von VCAM-1 gegenüber anderen Rezeptoren, die Gerszten 1998 erzielten, erlaubten nur den Schluss einer Beteiligung. Inwiefern aber durch die gleichzeitige Expression verschiedener Rezeptoren möglicherweise intrazellulär Signale generiert wurden, die wiederum die bereits erwähnten oder noch weitere Rezeptoren (in)aktivierten, bleibt bisher ungeklärt. Versuche zur Interaktion zwischen VCAM-1 und VLA-4 zeigten, dass dadurch auch die Bindung von LFA-1 exprimierenden T-Zellen an immobilisiertes ICAM-1 induziert wurde (Porter 1997; Chan 2000). Eine andere Untersuchung belegte, dass die Blockade des Oberflächenmoleküls mit anti-VCAM-1 Veränderungen im intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel und die Ausbildung von Stressfasern bedingte (Lorenzon 1998). Versuche, welche die Interaktion von VLA-4 und VCAM-1 an HUVEC analysierten, konnten zeigen, dass VCAM-1 die laterale Migration von Monozyten ermöglicht (Weber 1998). Koch gelang es 1995 zu zeigen, dass VCAM-1 die Chemotaxis von Endothelzellen stimulierte. In der gleichen Studie wurde nachgewiesen, dass die Angiogenese und die damit einhergehende Wanderung von Endothelzellen durch VCAM-1 bestimmt wurden. Ähnliche Beobachtungen wurden bei der Transmigration von humanen Melanoma-Zelllinien gemacht (Mould 1994). Auch die Arbeit von Gerszten wies 1998 darauf hin, dass bei ihren Untersuchungen VCAM-1 offensichtlich an allen Schritten der Leukozytenrekrutierung beteiligt war. Die transendotheliale Migration von Monozyten durch HUVEC konnte durch anti-VCAM-1 ebenfalls komplett geblockt werden (Shang 1998). Die bisherigen Untersuchungen beschränken sich klassischerweise auf die Blockade des Rezeptors mit anti-VCAM-1, um eine Beteiligung des Oberflächenrezeptors an den Vorgängen der Adhäsion und Transmigration nachzuweisen. Eine gezielte Hemmung durch Fibronectin ist schon beschrieben worden. Studien verschiedener Gruppen zeigten erfolgreich, dass die Verwendung von Fibronectinpeptiden zur Blockade von Zell-Zell-Interaktion in vitro

(Kumar 1996) und zur Reduzierung von Monozytenrekrutierung führt (Wahl 1994, Molossi 1995).

Fibronectin vermittelt die Adhäsion zwischen Zellen und extrazellulärer Matrix. Es ist ein multifunktionelles Glykoprotein, welches in den folgenden drei Formen vorkommt: Als zirkulierendes Plasmaprotein, transientes Adhäsionsmolekül bei einer Vielzahl von Zellen oder als unlösliche Fibrille in der extrazellulären Matrix. Im Extrazellulärraum bilden Fibronectine Dimere, die durch Disulfid-Brücken quervernetzt werden. Fibronectin bindet einerseits an Kollagen und Heparin in der extrazellulären Matrix und andererseits an Zelladhäsionsmoleküle wie Integrin. Da die Integrine wiederum über Brückenmoleküle mit intrazellulärem Actin verbunden sind, kann das Fibronectin "von außen" Einfluß auf die Zellen nehmen. Fibronectin spielt eine wichtige Rolle bei der Zelladhäsion, Migration und Differenzierung (Mostafavi-Pour 2003, Rosso 2004). Es enthält verschiedene Aminosäure-Motive wie RGD, LDV und REDV, die für die Zellbindung wichtig sind. Diese Motive werden von verschiedenen Integrinen erkannt und gebunden (Kao 1999), [siehe Abbildung 5.1].

Abbildung 5.1: Fibronectinprotein mit seinen verschiedenen Bindungsstellen z.B. auch für VLA-4 [$\alpha 4\beta 1$].

Es wäre also vorstellbar, dass Fibronectin durch eine Bindung an das VLA-4 Integrin die Bindung von VCAM-1 behindert und es deshalb nicht zu einer Adhäsion der MM6-Zellen

und HUVEC kommt und dies wiederum die MCP-1 Expression hemmt. [Siehe Abbildung 5.2]

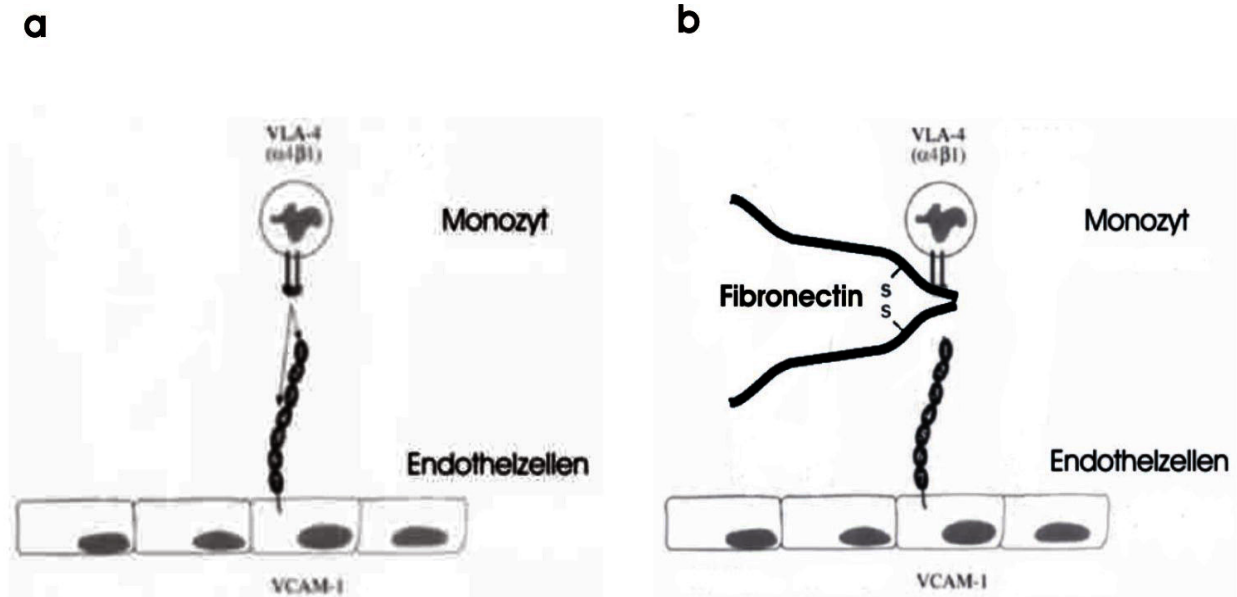


Abbildung 5.2:

- a. Adhäsion des Monozyten durch VLA-4 und VCAM-1
- b. Verhinderung der Adhäsion durch Fibronectin

Vorstellbar wäre auch, dass durch die Bindung des Fibronectins an das VLA-4 Integrin der MM6-Zellen diese eine antiinflammatorischen Funktion mit der Expression von z.B. IL-10 entwickeln, welches dann antiinflammatorisch auf die HUVEC einwirkt und dadurch die MCP-1 Expression hemmt.

5.2 Signaltransduktion von MCP-1 in HUVEC

Die Vermutung, dass die vermehrte MCP-1 Expression über die intrazelluläre Arachidonsäurekaskade vermittelt wird, konnte in den Hemmversuchen mit ASS, NDGA, Indometacin und AACOCF3 nicht bestätigt werden. Möglicherweise kommt es durch die Bindung von VCAM-1 mit seinem Liganden VLA-4 zu einer Aktivierung, die unabhängig vom Arachidonsäuremetabolismus ist. Vorstellbar wäre z.B. eine Aktivierung über NF-κB. Viele induzierbare Moleküle in Endothelzellen, die bei der Atherosklerose von Bedeutung sind, wie z.B. VCAM-1, ICAM-1, E-Selektin oder MCP-1, enthalten NF-κB Bindungsstellen innerhalb ihrer Promotorregionen (Neish 1992; Voraberger 1991). NF-κB können also bei der Regulation dieser Moleküle beteiligt sein (Lin 1996; Roebuck 1995; Ledebur 1995).

Ähnlich der Signaltransduktion bei CD 40 in Epithelzellen könnte VCAM-1 [CD106] über TRAF [TNF receptor-associated factor] und die MAP-Kinase-Kaskade NF- κ B induzieren [siehe Abbildung 5.3].

Abbildung 5.3: CD40L Signaling Pathway [Quelle: BioCarta Pathways] (Young 1998, Hayden 2004)

Durch die Induktion von NF- κ B kommt es zur vermehrten Expression von MCP-1 (Collins 2001). MCP-1 übt seine Wirkung auf die Zielzellen über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aus, die nach Aktivierung zur Bildung von Inositol-Triphosphat, intrazellulärer Kalziumfreisetzung und Aktivierung der Proteinkinase C führen. Ein weiterer Signalweg beinhaltet die Aktivierung von Proteinen der Rho-Familie, welche die Zellmotilität reguliert (Luster 1998). Seine Hauptfunktion besteht in der chemotaktischen Wirkung auf Monozyten, T-Lymphozyten und basophile Granulozyten (Gosling 1999). Aber auch die Extravasation, Adhäsion und Phagozytose von Makrophagen werden durch MCP-1 reguliert. Die MCP-1 Bildung von Endothelzellen trägt entscheidend dazu bei, dass ein Chemokingradient zwischen Gefäßlumen und dem subendothelialen Raum entsteht und so Monozyten angezogen werden. Auch wenn die MCP-1 Expression in den Endothelzellen noch nicht vollständig verstanden

ist, könnte eine Verminderung der Sekretion dieses Chemokins einen vielversprechenden Ansatz in der Modulation der Atherogenese darstellen.

5.3 c-fos Induktion in MM6-Zellen

Die c-fos Induktion ist häufig mit einem Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration assoziiert. Ein Beispiel der c-fos Induktion in Makrophagen zeigt die Abbildung 5.4.

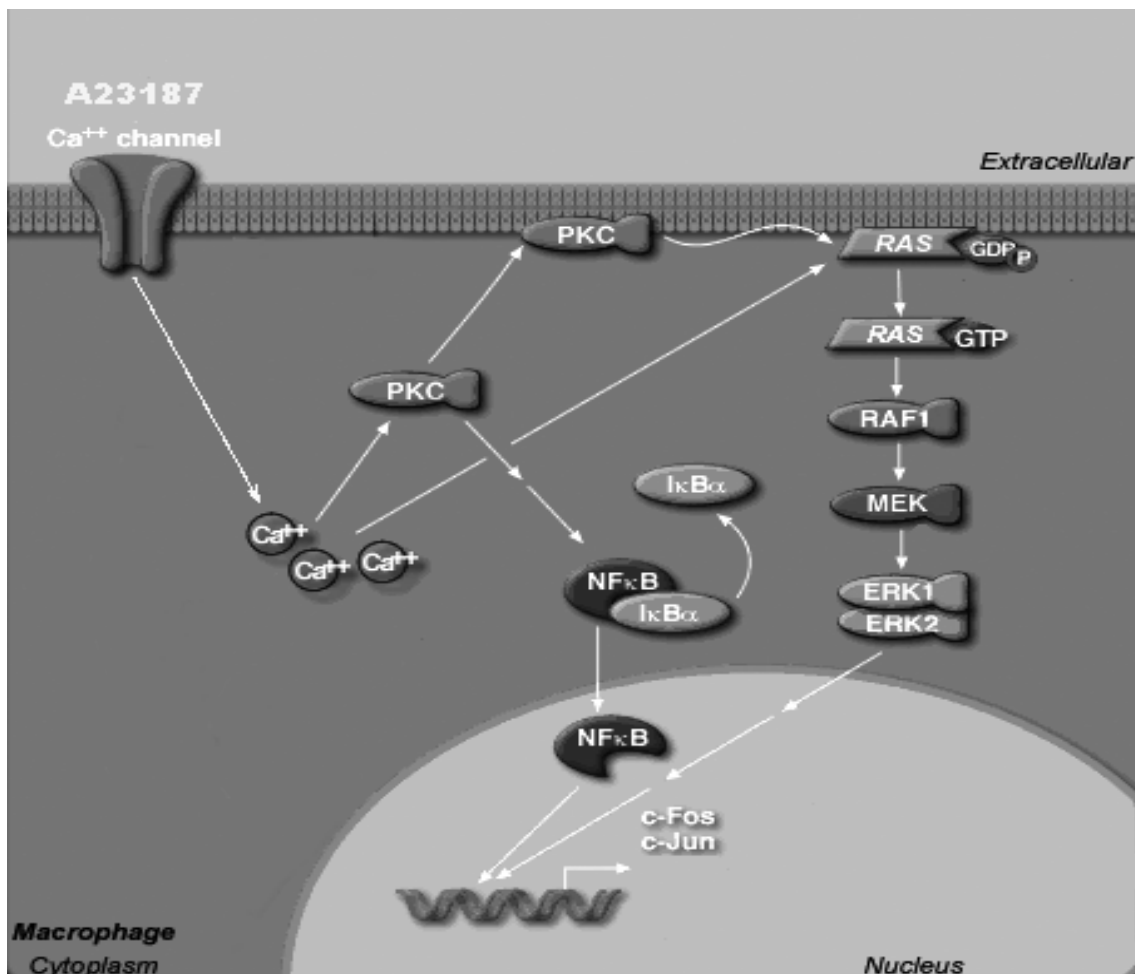


Abbildung 5.4: Modifizierte Abbildung aus BioCarta Pathways.

Die Abbildung zeigt eine Mögliche Induktion von c-fos in Makrophagen (Karin 1995; Ghosh 1998; Genot 2000; Cantrell 1996; Avruch 1994).

Die Steigerung der Expression von c-fos in den MM6-Zellen könnte dadurch erklärt werden, dass möglicherweise das A23187 eine Überstimulation der MM6-Zellen verursachte. Das Ionophor A23187, auch als Calcimycin bezeichnet, besitzt eine hydrophobe Außenseite, welche eine Passage durch die Doppellipidschicht der Zellmembran ermöglicht. A23187

funktioniert als sogenannter ‚shuttle‘. Dabei werden Protonen (H⁺) in einem Pendelmechanismus gegen Kationen, vorzugsweise gegen divalente Kationen wie Ca²⁺ und Mg²⁺, ausgetauscht (Pohl 1990). Dabei kommt es zum Anstieg der intrazellulären Calcium-Konzentration und möglicherweise zur Aktivierung von Proteinkinase C [PKC], welche über NF-κB oder RAS/MAP-Kinasen zur Induktion von c-fos führt.

Dass die Phospholipase A₂ und damit der Arachidonsäuremetabolismus mit der erhöhten Expression von c-fos zusammenhängt, ist in diesem Fall nicht wahrscheinlich, da sonst eine Hemmung von c-fos durch AACOCF₃, ASS, NDGA oder Indometacin hätte stattfinden müssen. Es ist nicht auszuschließen, dass durch Zugabe des A23187 es zu einer Überstimulation der Monozyten kam, die nicht durch o.g. Stoffe zu hemmen war.

5.4 Stimulation von c-fos durch Kollagen IV

Alle mehrzelligen Organismen sind in Zellverbänden, den Geweben, organisiert, die sich zu größeren Funktionseinheiten, den Organen, verbinden. In den Geweben stehen die Zellen in engem Kontakt mit komplexen extrazellulären Makromolekülen, die als extrazelluläre Matrix (EZM) bekannt sind. Kollagene sind die Hauptproteine der extrazellulären Matrix. Die Zellen interagieren mit speziellen Oberflächen-Rezeptoren, den Integrinen (Adams 1993). Integrine können zusätzlich zu ihrer adhäsiven Funktion intrazelluläre Signaltransduktionskaskaden aktivieren. Durch Adhäsion werden intrazelluläre Prozesse in Gang gesetzt, die zur Umstrukturierung des Cytoskeletts und zur Induktion von Signalkaskaden führen können. Diese intrazellulären Vorgänge können ihrerseits Affinität, Expressionsmuster und Spezifität der Oberflächen-Rezeptoren beeinflussen (Aplin et al., 1998). So wird Integrin-abhängig die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration erhöht, Tyrosin- und Serin/Threonin-Phosphorylierungen induziert, der Inositollipid-Metabolismus beeinflusst und die Aktivität der Familie der kleinen GTPasen moduliert (Giancotti 1999; Danen 2001; Schwartz, 2001; Arthur 2002), [siehe Abbildung 5.5].

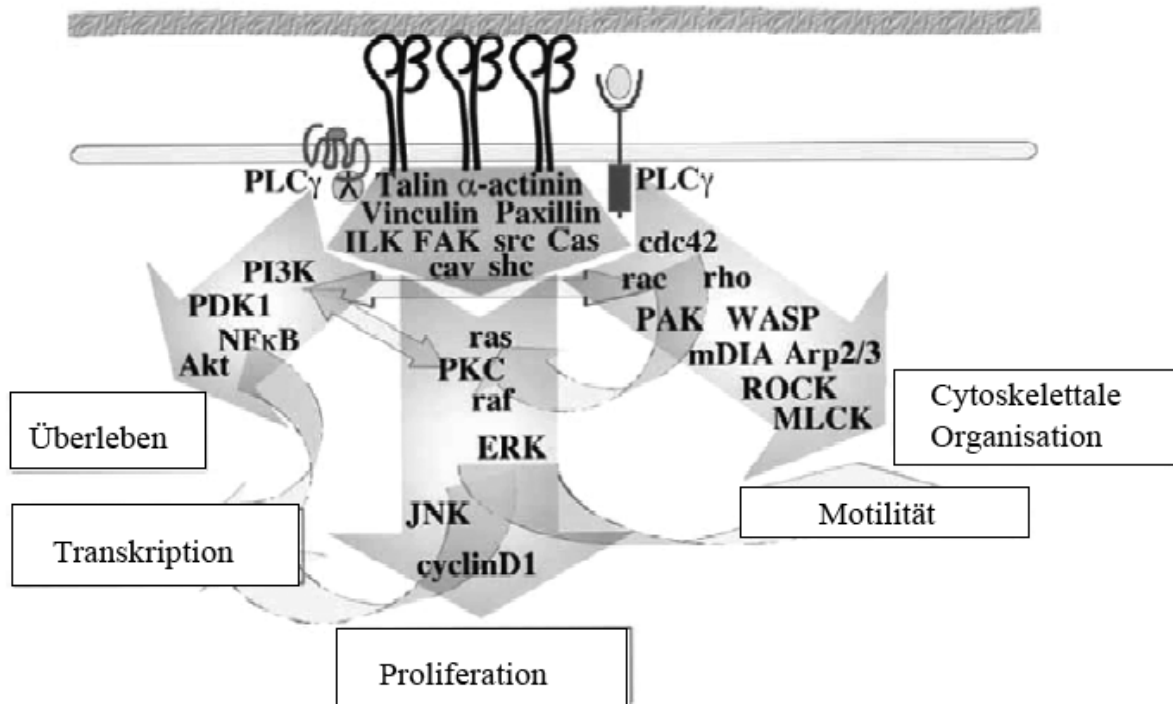


Abbildung 5.5: Übersichtsschema zur Funktion der Integreine (Hynes 2002)

Integreine führen zur Rekrutierung von Proteinen wie Talin, α -Aktinin, Vinkulin, Paxillin, ILK (Integrin-Linked-Kinase), FAK (Fokal-Adhesion-Kinase), Adapter-Proteine wie src, Cas und Shc. Die Aktivierung der PI3K (Phosphatidylinositol-3-Kinase) führt zur Aktivierung von PDK1 (Phosphoinositide-Dependent-Protein-Kinase 1) und Akt und so zum Überleben der Zellen. Die Regulation der MAP-Kinasen ERK1/ERK2- und JNK- (JUN-N-Terminal-Kinase) Aktivitäten durch die PKC (Proteinkinase C) stimuliert die Zellproliferation. Die Aktivierung der kleinen GTPasen wie Rac1, Cdc42 und Rho durch ROK (RhoA-Binding-Kinase) und MLCK (Myosin-Light-Chain-Kinase) kontrolliert die Organisation des Cytoskeletts und die Zellmotilität.

Durch diese vielseitige Signaltransduktion der Integreine scheint es möglich, dass das zugegebene Kollagen IV Integrin-vermittelt zu einer vermehrten Expression des Immediate-Early Gene c-fos führen kann. So führt zum Beispiel die Aktivierung vom ERK/MAPK-Signalweg oder von NF- κ B zu einer Induktion von c-fos [siehe Abbildung 5.4].

5.5 Stimulation von c-fos durch Arachidonsäure

Die gesteigerte Expression von c-fos durch Arachidonsäure wäre durch eine Aktivierung der Proteinkinase C [PKC] zu erklären. Diese gesteigerte c-fos Expression unter Beteiligung der PKC konnte Danesch 1994 in 3T3 Fibroblasten nachweisen. Proteinkinase C wird nicht nur durch Ca^{2+} und DAG aktiviert sondern auch durch Arachidonsäure (Asaoka 1992). Die PKC kann die c-fos Expression über mehrere Wege induzieren [siehe Abbildung 5.4]. Damit ist auch erklärt warum AACOCF3 keine Hemmung der c-fos Expression induziert, da der PKC-Weg unabhängig von PLA_2 -Weg ist.

6 Zusammenfassung

Die Atherosklerose und ihre Folgeerkrankungen stellen die häufigste Todesursache in den westlichen Industrienationen dar. Aktuell wird die Atherosklerose als eine immun-medierte Entzündung mit komplexer Interaktion zwischen Lipidstoffwechsel, Leukozyten, Thrombozyten und Endothelzellen angesehen. Monozyten/Makrophagen spielen in der komplexen Pathogenese eine zentrale Rolle, da sie in jedem Stadium nachweisbar sind. Die Erforschung der Interaktion zwischen Endothelzellen und Monozyten/Makrophagen ist somit ein zentraler Aspekt zum genaueren Verständnis der Entstehung der Atherosklerose.

In der vorliegenden Arbeit wurden Veränderungen in der Genexpression an humanen vaskulären Endothelzellen [HUVEC] sowie mitbeteiligte intrazelluläre Signalübertragungswege nach Interaktion mit Mono Mac 6 Zellen [MM6] in vitro untersucht. Schwerpunktmäßig wurde die Genexpression von MCP-1 und c-fos, zwei in der Pathogenese der Atherosklerose zentralen Gene, analysiert.

Experimentell wurde im Zellkulturmodell mit Northern-Blot Technik nachgewiesen, dass durch Stimulation und Interaktion der beiden Zellarten die mRNA-Transkription von c-fos und MCP-1 induziert wird. Dass die Induktion von MCP-1 von der Adhäsion der HUVEC mit den MM6-Zellen abhängig ist, konnte mit Hilfe von Transwell®-Membransystemen gezeigt werden. Bei diesem Membransystem sind die MM6-Zellen auf einer permeablen Polycarbonatmembran ausgesät und die HUVEC in der Schale als Monolayer kultiviert. Dadurch sind die Zellen im gleichen Medium, können aber nicht adhären. Durch Versuche mit Actinomycin D (zytotoxisches Antibiotikum welches die RNA-Synthese hemmt) konnte bestätigt werden, dass es die HUVEC sind welche vermehrt MCP-1 exprimieren.

Im Gegensatz dazu zeigten die Actinomycin D-Versuche zur Expression von c-fos, dass die gesteigerte Expression in den MM6-Zellen induziert wird. Bei den Transwell®-Versuchen war keine Adhäsion der beiden Zellarten nötig um die gesteigerte Transkription der mRNA von c-fos in den MM6-Zellen zu induzieren, wohingegen eine verstärkte Expression von MCP-1, wie oben erläutert, in den HUVEC nur bei Zelladhäsion stattfand. (siehe Abbildung 6.1).

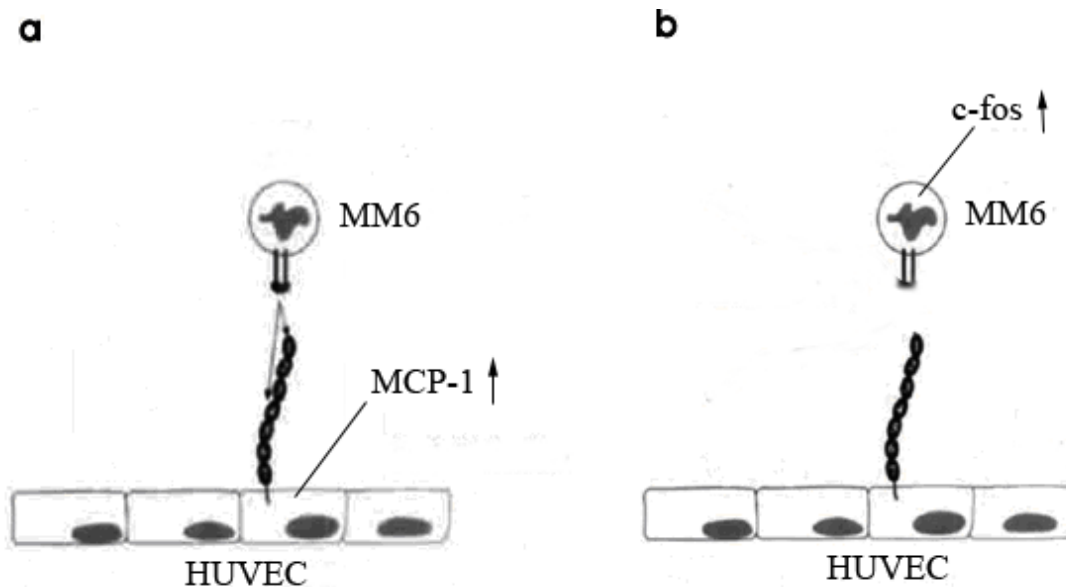


Abbildung 6.1

- a. Gesteigerte MCP-1 Expression aus HUVEC durch Adhäsion induziert.
- b. Gesteigerte c-fos Expression aus MM6-Zellen ohne Adhäsion induziert.

Ein weiterer wichtiger Aspekt aus den Ergebnissen dieser Arbeit ist, dass die gesteigerte Expression von c-fos durch die Zugabe von Kollagen und Arachidonsäure noch verstärkt werden konnte. Möglicherweise handelt es sich bei der vermehrten Expression von c-fos um eine beginnende Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen wie sie in der Pathogenese der Atherosklerose beschrieben wird.

Bei der Signaltransduktion konnte die Beteiligung des Arachidonsäurestoffwechsels bei der Synthesesteigerung der mRNA von c-fos durch Versuche mit ASS, Indometacin, NDGA (Nordihydroguajaretsäure) und Bay X nicht betätigt werden. Eine Erklärung hierfür wäre, dass die zugegebene Arachidonsäure als „Second Messenger“ die Proteinkinase C induzieren aber nicht im Arachidonsäure-metabolismus verstoffwechselt werden kann.

Die Versuche die vermehrte MCP-1 Expression aus den HUVEC durch die oben genannten Cyclooxygenase-oder Lipoxygenase-Hemmstoffe zu hemmen führten zu keinem signifikanten Ergebnis.

Darüber hinaus konnte in weiteren Versuchen dieser Arbeit die vermehrte Transkription von MCP-1 in den HUVEC durch Fibronectin gehemmt werden, was darauf schließen lässt, dass das vascular cell adhesion molecule 1 [VCAM-1] als Adhäsionsmolekül eine wichtige Rolle bei der

interaktionsinduzierten Transkription von MCP-1 spielt. Fibronectin kann mit seiner Bindungsstelle für VLA-4, welches die Bindungsstelle für die Endothelzellen an die Monozyten ist, die Bindung zwischen VLA-4 und VCAM-1 verhindern (siehe Abbildung 6.2). Möglichweise kann Fibronectin nicht nur die vermehrte MCP-1 Transkription sondern auch die Adhäsion der Monozyten an die Endothelzellen verhindern und somit zwei bedeutende Schritte in der Pathogenese der Atherosklerose beeinflussen.

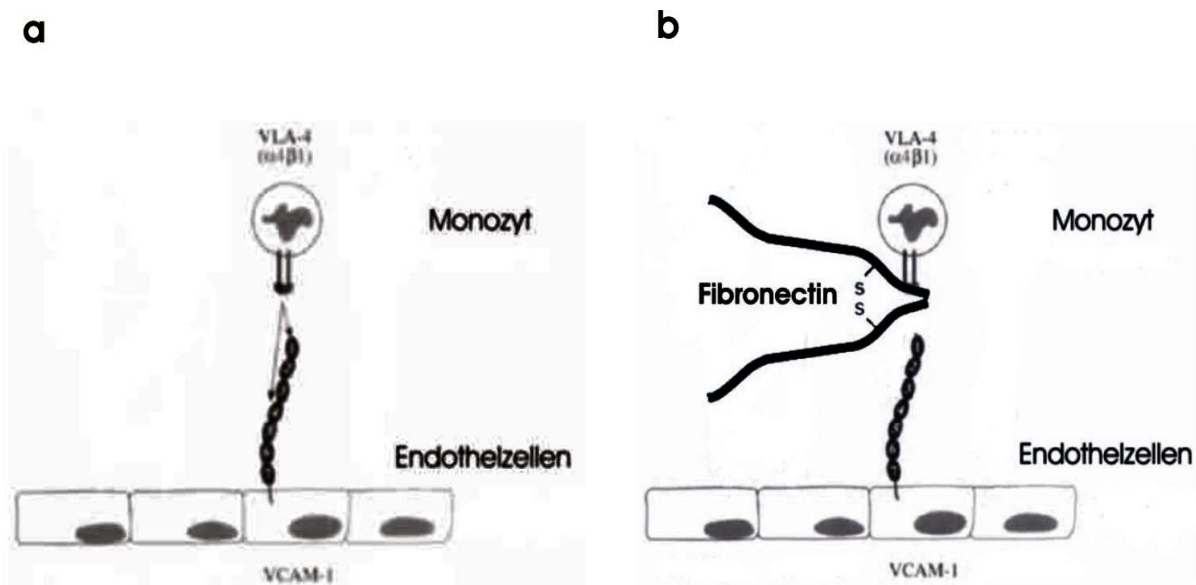


Abbildung 6.2

- a. Adhäsion des Monozyten durch VLA-4 und VCAM-1**
- b. Verhinderung der Adhäsion durch Fibronectin**

Zusammenfassend können die Ergebnisse dieser Arbeit Ansatzpunkte für die weiterführende Erforschung der zugrunde liegenden Signalübertragungswege liefern, auf deren Grundlage zukünftige Modelle zur Prävention und Behandlung der Atherosklerose aufbauen können.

7 Literaturverzeichnis

1. Abe Y, El-Masri B, Kimball KT, et al. (1998) Soluble cell adhesion molecules in hypertriglyceridemia and potential significance on monocyte adhesion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**: 723-731.
2. Adams JC, Watt FM. (1993) Regulation of development and differentiation by the extracellular matrix. *Development* **117**: 1183-1198.
3. Aiello RJ, Bourassa PA, Lindsey S, et al. (1999) Monocyte chemoattractant protein-1 accelerates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**: 1518-1525.
4. Allen S, Khan S, Al-Mohanna F, Batten P, Yacoub M. (1998) Native low density lipoprotein-induced calcium transients trigger VCAM-1 and E-selectin expression in cultured human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* **101**: 1064-1075.
5. Altieri DC, Plescia J, Plow EF. (1993) The structural motif glycine 190-valine 202 of the fibrinogen gamma chain interacts with CD11b/CD18 integrin (alpha M beta 2, Mac-1) and promotes leukocyte adhesion. *J Biol Chem* **268**: 1847-1853.
6. Ando J, Komatsuda T, Kamiya A. (1988) Cytoplasmic calcium response to fluid shear stress in cultured vascular endothelial cells. *In Vitro Cell Dev Biol* **24**: 871-877.
7. Aplin AE, Howe A, Alahari SK, Juliano RL. (1998) Signal transduction and signal modulation by cell adhesion receptors: the role of integrins, cadherins, immunoglobulin-cell adhesion molecules, and selectins. *Pharmacol Rev* **50**: 197-263.
8. Arthur WT, Noren NK, Burridge K. (2002) Regulation of Rho family GTPases by cell-cell and cell-matrix adhesion. *Biol Res* **35**: 239-246.
9. Asaoka Y, Yoshida K, Oka M, et al. (1992) The signal-induced phospholipid degradation cascade and protein kinase C activation. *Ciba Found Symp* **164**: 50-59; discussion 59-65.
10. Avis I, Hong SH, Martinez A, et al. (2001) Five-lipoxygenase inhibitors can mediate apoptosis in human breast cancer cell lines through complex eicosanoid interactions. *Faseb J* **15**: 2007-2009.
11. Avruch J, Zhang XF, Kyriakis JM. (1994) Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway. *Trends Biochem Sci* **19**: 279-283.
12. Balsinde J, Bianco ID, Ackermann EJ, Conde-Frieboes K, Dennis EA. (1995) Inhibition of calcium-independent phospholipase A2 prevents arachidonic acid

- incorporation and phospholipid remodeling in P388D1 macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 8527-8531.
13. Bandyopadhyay RS, Phelan M, Faller DV. (1995) Hypoxia induces AP-1-regulated genes and AP-1 transcription factor binding in human endothelial and other cell types. *Biochim Biophys Acta* **1264**: 72-78.
 14. Bauch HJ, Vischer P, Kehrel B, et al. (1987) Atherosclerotic risk factors and their influence on prostaglandin metabolism in cultured endothelial and smooth muscle cells. *Prog Clin Biol Res* **242**: 329-336.
 15. Benz DJ, Mol M, Ezaki M, et al. (1995) Enhanced levels of lipoperoxides in low density lipoprotein incubated with murine fibroblast expressing high levels of human 15-lipoxygenase. *J Biol Chem* **270**: 5191-5197.
 16. Bereziat G. (1996) [Diversity of phospholipases A2 and their functions]. *C R Seances Soc Biol Fil* **190**: 409-416.
 17. Berg J, Fellier H, Christoph T, Grarup J, Stimmeder D. (1999) The analgesic NSAID lornoxicam inhibits cyclooxygenase (COX)-1/-2, inducible nitric oxide synthase (iNOS), and the formation of interleukin (IL)-6 in vitro. *Inflamm Res* **48**: 369-379.
 18. Berliner JA, Territo MC, Sevanian A, et al. (1990) Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. *J Clin Invest* **85**: 1260-1266.
 19. Bevilacqua MP, Nelson RM. (1993) Selectins. *J Clin Invest* **91**: 379-387.
 20. Bocan TM, Rosebury WS, Mueller SB, et al. (1998) A specific 15-lipoxygenase inhibitor limits the progression and monocyte-macrophage enrichment of hypercholesterolemia-induced atherosclerosis in the rabbit. *Atherosclerosis* **136**: 203-216.
 21. Boisvert WA, Santiago R, Curtiss LK, Terkeltaub RA. (1998) A leukocyte homologue of the IL-8 receptor CXCR-2 mediates the accumulation of macrophages in atherosclerotic lesions of LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest* **101**: 353-363.
 22. Bombardier C, Laine L, Reicin A, et al. (2000) Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis. VIGOR Study Group. *N Engl J Med* **343**: 1520-1528, 1522 p following 1528.
 23. Borgeat P, Samuelsson B. (1979) Arachidonic acid metabolism in polymorphonuclear leukocytes: effects of ionophore A23187. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**: 2148-2152.
 24. Boring L, Gosling J, Cleary M, Charo IF. (1998) Decreased lesion formation in CCR2^{-/-} mice reveals a role for chemokines in the initiation of atherosclerosis. *Nature* **394**: 894-897.

25. Brash AR, Boeglin WE, Chang MS. (1997) Discovery of a second 15S-lipoxygenase in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 6148-6152.
26. Bray MA. (1986) Leukotrienes in inflammation. *Agents Actions* **19**: 87-99.
27. Brenner B, Gulbins E, Schlottmann K, et al. (1996) L-selectin activates the Ras pathway via the tyrosine kinase p56lck. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 15376-15381.
28. Brinckmann R, Schnurr K, Heydeck D, Rosenbach T, Kolde G, Kuhn H. (1998) Membrane translocation of 15-lipoxygenase in hematopoietic cells is calcium-dependent and activates the oxygenase activity of the enzyme. *Blood* **91**: 64-74.
29. Burke JR, Davern LB, Gregor KR, Todderud G, Alford JG, Tramposch KM. (1997) Phosphorylation and calcium influx are not sufficient for the activation of cytosolic phospholipase A2 in U937 cells: requirement for a Gi alpha-type G-protein. *Biochim Biophys Acta* **1341**: 223-237.
30. Cantrell DA. (1996) T cell antigen receptor signal transduction pathways. *Cancer Surv* **27**: 165-175.
31. Carlos TM, Harlan JM. (1994) Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* **84**: 2068-2101.
32. Carlos TM, Schwartz BR, Kovach NL, et al. (1990) Vascular cell adhesion molecule-1 mediates lymphocyte adherence to cytokine-activated cultured human endothelial cells. *Blood* **76**: 965-970.
33. Chakraborty I, Das SK, Wang J, Dey SK. (1996) Developmental expression of the cyclo-oxygenase-1 and cyclo-oxygenase-2 genes in the peri-implantation mouse uterus and their differential regulation by the blastocyst and ovarian steroids. *J Mol Endocrinol* **16**: 107-122.
34. Chan JR, Hyduk SJ, Cybulsky MI. (2000) Alpha 4 beta 1 integrin/VCAM-1 interaction activates alpha L beta 2 integrin-mediated adhesion to ICAM-1 in human T cells. *J Immunol* **164**: 746-753.
35. Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, et al. (2002) COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 13926-13931.
36. Charo IF, Myers SJ, Herman A, Franci C, Connolly AJ, Coughlin SR. (1994) Molecular cloning and functional expression of two monocyte chemoattractant protein 1 receptors reveals alternative splicing of the carboxyl-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 2752-2756.

37. Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. (2000) Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm Res* **49**: 497-505.
38. Clark EA, Brugge JS. (1995) Integrins and signal transduction pathways: the road taken. *Science* **268**: 233-239.
39. Collins T, Cybulsky MI. (2001) NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis? *J Clin Invest* **107**: 255-264.
40. Corbi. (1996) Leukocyte Integrins: Structure, Expression and Funktion. *Book*.
41. Crowther SD, Rees PJ. (2000) Current treatment of asthma--focus on leukotrienes. *Expert Opin Pharmacother* **1**: 1021-1040.
42. Cryer B, Feldman M. (1998) Cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 selectivity of widely used nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med* **104**: 413-421.
43. Cybulsky MI, Gimbrone MA, Jr. (1991) Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* **251**: 788-791.
44. Cyrus T, Witztum JL, Rader DJ, et al. (1999) Disruption of the 12/15-lipoxygenase gene diminishes atherosclerosis in apo E-deficient mice. *J Clin Invest* **103**: 1597-1604.
45. Danen EH, Yamada KM. (2001) Fibronectin, integrins, and growth control. *J Cell Physiol* **189**: 1-13.
46. Danesch U, Weber PC, Sellmayer A. (1994) Arachidonic acid increases c-fos and Egr-1 mRNA in 3T3 fibroblasts by formation of prostaglandin E2 and activation of protein kinase C. *J Biol Chem* **269**: 27258-27263.
47. Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJ, et al. (1993) The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J Pathol* **171**: 223-229.
48. Davies P. (1987) Lipoxygenase products in immunity. *Immunol Invest* **16**: 623-647.
49. Dawson TC, Kuziel WA, Osahar TA, Maeda N. (1999) Absence of CC chemokine receptor-2 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* **143**: 205-211.
50. Dawson TC, Kuziel WA, Osahar TA, Maeda N. (1999) Absence of CC chemokine receptor-2 reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* **143**: 205-211.
51. de Lemos JA, Morrow DA, Sabatine MS, et al. (2003) Association between plasma levels of monocyte chemoattractant protein-1 and long-term clinical outcomes in patients with acute coronary syndromes. *Circulation* **107**: 690-695.

52. Dempke W, Rie C, Grothey A, Schmoll HJ. (2001) Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? *J Cancer Res Clin Oncol* **127**: 411-417.
53. Denzlinger C. (1996) Biology and pathophysiology of leukotrienes. *Crit Rev Oncol Hematol* **23**: 167-223.
54. Diaz MN, Frei B, Vita JA, Keaney JF, Jr. (1997) Antioxidants and atherosclerotic heart disease. *N Engl J Med* **337**: 408-416.
55. Dinchuk JE, Car BD, Focht RJ, et al. (1995) Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II. *Nature* **378**: 406-409.
56. Dixit VM, Marks RM, Sarma V, Prochownik EV. (1989) The antimitogenic action of tumor necrosis factor is associated with increased AP-1/c-jun proto-oncogene transcription. *J Biol Chem* **264**: 16905-16909.
57. Dokter WH, Sierdsema SJ, Esselink MT, Halie MR, Vellenga E. (1994) Interleukin-4-mediated inhibition of C-Fos mRNA expression: role of the lipoxigenase directed pathway. *Leukemia* **8**: 1181-1184.
58. Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA. (1986) Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol* **137**: 245-254.
59. Dwivedi A, Anggard EE, Carrier MJ. (2001) Oxidized LDL-mediated monocyte adhesion to endothelial cells does not involve NFkappaB. *Biochem Biophys Res Commun* **284**: 239-244.
60. Dwyer JH, Allayee H, Dwyer KM, et al. (2004) Arachidonate 5-lipoxygenase promoter genotype, dietary arachidonic acid, and atherosclerosis. *N Engl J Med* **350**: 29-37.
61. Elices MJ, Osborn L, Takada Y, et al. (1990) VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell* **60**: 577-584.
62. Falcone DJ, McCaffrey TA, Vergilio JA. (1991) Stimulation of macrophage urokinase expression by polyanions is protein kinase C-dependent and requires protein and RNA synthesis. *J Biol Chem* **266**: 22726-22732.
63. Falk E, Shah PK, Fuster V. (1995) Coronary plaque disruption. *Circulation* **92**: 657-671.
64. Fogh K, Herlin T, Kragballe K. (1988) In vitro inhibition of leukotriene B4 formation by exogenous 5-lipoxygenase inhibitors is associated with enhanced generation of

- 15-hydroxy-eicosatetraenoic acid (15-HETE) by human neutrophils. *Arch Dermatol Res* **280**: 430-436.
65. Ford-Hutchinson AW. (1991) FLAP: a novel drug target for inhibiting the synthesis of leukotrienes. *Trends Pharmacol Sci* **12**: 68-70.
66. Frenette PS, Wagner DD. (1996 a) Adhesion molecules--Part 1. *N Engl J Med* **334**: 1526-1529.
67. Frenette PS, Wagner DD. (1996 b) Adhesion molecules--Part II: Blood vessels and blood cells. *N Engl J Med* **335**: 43-45.
68. Funk CD. (2001) Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* **294**: 1871-1875.
69. Furie MB, Tancinco MC, Smith CW. (1991) Monoclonal antibodies to leukocyte integrins CD11a/CD18 and CD11b/CD18 or intercellular adhesion molecule-1 inhibit chemoattractant-stimulated neutrophil transendothelial migration in vitro. *Blood* **78**: 2089-2097.
70. Fuster. (1996) Atherosclerosis and Coronary Artery Disease.
71. Gearing AJ, Newman W. (1993) Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol Today* **14**: 506-512.
72. Genot E, Cantrell DA. (2000) Ras regulation and function in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* **12**: 289-294.
73. George J, Afek A, Shaish A, et al. (2001) 12/15-Lipoxygenase gene disruption attenuates atherogenesis in LDL receptor-deficient mice. *Circulation* **104**: 1646-1650.
74. Gerszten RE, Lim YC, Ding HT, et al. (1998) Adhesion of monocytes to vascular cell adhesion molecule-1-transduced human endothelial cells: implications for atherogenesis. *Circ Res* **82**: 871-878.
75. Ghosh J, Myers CE. (1997) Arachidonic acid stimulates prostate cancer cell growth: critical role of 5-lipoxygenase. *Biochem Biophys Res Commun* **235**: 418-423.
76. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. (1998) NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* **16**: 225-260.
77. Giancotti FG, Ruoslahti E. (1999) Integrin signaling. *Science* **285**: 1028-1032.
78. Glaser KB, Sung A, Bauer J, Weichman BM. (1993) Regulation of eicosanoid biosynthesis in the macrophage. Involvement of protein tyrosine phosphorylation and modulation by selective protein tyrosine kinase inhibitors. *Biochem Pharmacol* **45**: 711-721.

79. Goetzl EJ, An S, Smith WL. (1995) Specificity of expression and effects of eicosanoid mediators in normal physiology and human diseases. *Faseb J* **9**: 1051-1058.
80. Gonzalez-Amaro R, Diaz-Gonzalez F, Sanchez-Madrid F. (1998) Adhesion molecules in inflammatory diseases. *Drugs* **56**: 977-988.
81. Gosling J, Slaymaker S, Gu L, et al. (1999) MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. *J Clin Invest* **103**: 773-778.
82. Gosling J, Slaymaker S, Gu L, et al. (1999) MCP-1 deficiency reduces susceptibility to atherosclerosis in mice that overexpress human apolipoprotein B. *J Clin Invest* **103**: 773-778.
83. Greve JM, Davis G, Meyer AM, et al. (1989) The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. *Cell* **56**: 839-847.
84. Gronert K, Virk SM, Herman CA. (1995) Endogenous sulfidopeptide leukotriene synthesis and 12-lipoxygenase activity in bullfrog (*Rana catesbeiana*) erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* **1255**: 311-319.
85. Gu L, Okada Y, Clinton SK, et al. (1998) Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell* **2**: 275-281.
86. Gu L, Okada Y, Clinton SK, et al. (1998) Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell* **2**: 275-281.
87. Gurtner GC, Davis V, Li H, McCoy MJ, Sharpe A, Cybulsky MI. (1995) Targeted disruption of the murine VCAM1 gene: essential role of VCAM-1 in chorioallantoic fusion and placentation. *Genes Dev* **9**: 1-14.
88. Han J, Hajjar DP, Tauras JM, Nicholson AC. (1999) Cellular cholesterol regulates expression of the macrophage type B scavenger receptor, CD36. *J Lipid Res* **40**: 830-838.
89. Hansson GK. (2005) Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* **352**: 1685-1695.
90. Harats D, Shaish A, George J, et al. (2000) Overexpression of 15-lipoxygenase in vascular endothelium accelerates early atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**: 2100-2105.

91. Hatzelmann A, Fruchtmann R, Mohrs KH, et al. (1994 a) Mode of action of the leukotriene synthesis (FLAP) inhibitor BAY X 1005: implications for biological regulation of 5-lipoxygenase. *Agents Actions* **43**: 64-68.
92. Hatzelmann A, Fruchtmann R, Mohrs KH, Raddatz S, Muller-Peddinghaus R. (1994 b) Ca²⁺ ionophore A23187-stimulated secretion of azurophil granules in human polymorphonuclear leukocytes is largely mediated by endogenously formed leukotriene B₄. *Biochem Pharmacol* **48**: 31-39.
93. Hayden MS, Ghosh S. (2004) Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* **18**: 2195-2224.
94. Hemler ME, Huang C, Takada Y, Schwarz L, Strominger JL, Clabby ML. (1987) Characterization of the cell surface heterodimer VLA-4 and related peptides. *J Biol Chem* **262**: 11478-11485.
95. Henseleit U, Steinbrink K, Sunderkotter C, Goebeler M, Roth J, Sorg C. (1994) Expression of murine VCAM-1 in vitro and in different models of inflammation in vivo: correlation with immigration of monocytes. *Exp Dermatol* **3**: 249-256.
96. Herschman HR. (1996) Prostaglandin synthase 2. *Biochim Biophys Acta* **1299**: 125-140.
97. Hinz B, Brune K. (1999) [COX-1 and COX-2: functions and pharmacological effects]. *Pharm Unserer Zeit* **28**: 21-29.
98. Hippisley-Cox J, Coupland C. (2005) Risk of myocardial infarction in patients taking cyclo-oxygenase-2 inhibitors or conventional non-steroidal anti-inflammatory drugs: population based nested case-control analysis. *Bmj* **330**: 1366.
99. Honn KV, Tang DG, Gao X, et al. (1994) 12-lipoxygenases and 12(S)-HETE: role in cancer metastasis. *Cancer Metastasis Rev* **13**: 365-396.
100. Hu RM, Levin ER. (1994) Astrocyte growth is regulated by neuropeptides through Tis 8 and basic fibroblast growth factor. *J Clin Invest* **93**: 1820-1827.
101. Hu Y, Cheng L, Hochleitner BW, Xu Q. (1997) Activation of mitogen-activated protein kinases (ERK/JNK) and AP-1 transcription factor in rat carotid arteries after balloon injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**: 2808-2816.
102. Hu Y, Kiely JM, Szenté BE, Rosenzweig A, Gimbrone MA, Jr. (2000) E-selectin-dependent signaling via the mitogen-activated protein kinase pathway in vascular endothelial cells. *J Immunol* **165**: 2142-2148.
103. Huo Y, Hafezi-Moghadam A, Ley K. (2000) Role of vascular cell adhesion molecule-1 and fibronectin connecting segment-1 in monocyte rolling and adhesion on early atherosclerotic lesions. *Circ Res* **87**: 153-159.

104. Husain S, Andrews NP, Mulcahy D, Panza JA, Quyyumi AA. (1998) Aspirin improves endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Circulation* **97**: 716-720.
105. Hynes RO. (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* **69**: 11-25.
106. Hynes RO. (2002) Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**: 673-687.
107. Iademaro MF, McQuillan JJ, Rosen GD, Dean DC. (1992) Characterization of the promoter for vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). *J Biol Chem* **267**: 16323-16329.
108. Issekutz TB, Miyasaka M, Issekutz AC. (1996) Rat blood neutrophils express very late antigen 4 and it mediates migration to arthritic joint and dermal inflammation. *J Exp Med* **183**: 2175-2184.
109. Jakobsson PJ, Thoren S, Morgenstern R, Samuelsson B. (1999) Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 7220-7225.
110. Jin H, Varner J. (2004) Integrins: roles in cancer development and as treatment targets. *Br J Cancer* **90**: 561-565.
111. Johnson-Tidey RR, McGregor JL, Taylor PR, Poston RN. (1994) Increase in the adhesion molecule P-selectin in endothelium overlying atherosclerotic plaques. Coexpression with intercellular adhesion molecule-1. *Am J Pathol* **144**: 952-961.
112. Johnston RB, Jr. (1988) Current concepts: immunology. Monocytes and macrophages. *N Engl J Med* **318**: 747-752.
113. Juliano RL, Haskill S. (1993) Signal transduction from the extracellular matrix. *J Cell Biol* **120**: 577-585.
114. Kansas GS. (1996) Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood* **88**: 3259-3287.
115. Kao WJ. (1999) Evaluation of protein-modulated macrophage behavior on biomaterials: designing biomimetic materials for cellular engineering. *Biomaterials* **20**: 2213-2221.
116. Kaplanski G, Marin V, Fabrigoule M, et al. (1998) Thrombin-activated human endothelial cells support monocyte adhesion in vitro following expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1; CD54) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1; CD106). *Blood* **92**: 1259-1267.

117. Karin M. (1995) The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* **270**: 16483-16486.
118. Katori M, Majima M. (2000) Cyclooxygenase-2: its rich diversity of roles and possible application of its selective inhibitors. *Inflamm Res* **49**: 367-392.
119. Kim DN, Lee KT, Schmee J, Thomas WA. (1983) Anti-proliferative effect of pyridinolcarbamate and of aspirin in the early stages of atherogenesis in swine. *Atherosclerosis* **48**: 1-13.
120. Koch AE, Halloran MM, Haskell CJ, Shah MR, Polverini PJ. (1995) Angiogenesis mediated by soluble forms of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1. *Nature* **376**: 517-519.
121. Korenaga R, Ando J, Kosaki K, Isshiki M, Takada Y, Kamiya A. (1997) Negative transcriptional regulation of the VCAM-1 gene by fluid shear stress in murine endothelial cells. *Am J Physiol* **273**: C1506-1515.
122. Kramer RM, Sharp JD. (1997) Structure, function and regulation of Ca²⁺-sensitive cytosolic phospholipase A2 (cPLA2). *FEBS Lett* **410**: 49-53.
123. Krieg P, Kinzig A, Ress-Loschke M, et al. (1995) 12-Lipoxygenase isoenzymes in mouse skin tumor development. *Mol Carcinog* **14**: 118-129.
124. Kuhn H, Belkner J, Wiesner R, Brash AR. (1990) Oxygenation of biological membranes by the pure reticulocyte lipoxygenase. *J Biol Chem* **265**: 18351-18361.
125. Kumar A, Eckmam JR, Swerlick RA, Wick TM. (1996) Phorbol ester stimulation increases sickle erythrocyte adherence to endothelium: a novel pathway involving alpha 4 beta 1 integrin receptors on sickle reticulocytes and fibronectin. *Blood* **88**: 4348-4358.
126. Kwee L, Baldwin HS, Shen HM, et al. (1995) Defective development of the embryonic and extraembryonic circulatory systems in vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) deficient mice. *Development* **121**: 489-503.
127. Landry DB, Couper LL, Bryant SR, Lindner V. (1997) Activation of the NF-kappa B and I kappa B system in smooth muscle cells after rat arterial injury. Induction of vascular cell adhesion molecule-1 and monocyte chemoattractant protein-1. *Am J Pathol* **151**: 1085-1095.
128. Languino LR, Duperray A, Joganic KJ, Fornaro M, Thornton GB, Altieri DC. (1995) Regulation of leukocyte-endothelium interaction and leukocyte transendothelial migration by intercellular adhesion molecule 1-fibrinogen recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 1505-1509.

129. Ledebur HC, Parks TP. (1995) Transcriptional regulation of the intercellular adhesion molecule-1 gene by inflammatory cytokines in human endothelial cells. Essential roles of a variant NF-kappa B site and p65 homodimers. *J Biol Chem* **270**: 933-943.
130. Levesque LE, Brophy JM, Zhang B. (2005) The risk for myocardial infarction with cyclooxygenase-2 inhibitors: a population study of elderly adults. *Ann Intern Med* **142**: 481-489.
131. Lewis RA, Austen KF, Soberman RJ. (1990) Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. Biochemistry and relation to pathobiology in human diseases. *N Engl J Med* **323**: 645-655.
132. Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA, Jr., Libby P. (1993) An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Arterioscler Thromb* **13**: 197-204.
133. Li Y, Maher P, Schubert D. (1997) A role for 12-lipoxygenase in nerve cell death caused by glutathione depletion. *Neuron* **19**: 453-463.
134. Libby P, Ridker PM, Maseri A. (2002) Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* **105**: 1135-1143.
135. Lin JH, Zhu Y, Liao HL, Kobari Y, Groszek L, Stemerman MB. (1996) Induction of vascular cell adhesion molecule-1 by low-density lipoprotein. *Atherosclerosis* **127**: 185-194.
136. Lo SK, Golenbock DT, Sass PM, Maskati A, Xu H, Silverstein RL. (1997) Engagement of the Lewis X antigen (CD15) results in monocyte activation. *Blood* **89**: 307-314.
137. Lorenzon P, Vecile E, Nardon E, et al. (1998) Endothelial cell E- and P-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 function as signaling receptors. *J Cell Biol* **142**: 1381-1391.
138. Lusis AJ. (2000) Atherosclerosis. *Nature* **407**: 233-241.
139. Luster AD. (1998) Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* **338**: 436-445.
140. Maccarrone M, Catani MV, Agro AF, Melino G. (1997) Involvement of 5-lipoxygenase in programmed cell death of cancer cells. *Cell Death Differ* **4**: 396-402.
141. Machelska H, Cabot PJ, Mousa SA, Zhang Q, Stein C. (1998) Pain control in inflammation governed by selectins. *Nat Med* **4**: 1425-1428.
142. Mangge (2004) Inflammatorische Biomarker und Atherosklerose.

143. Marodi L, Korchak HM, Johnston RB, Jr. (1991) Mechanisms of host defense against *Candida* species. I. Phagocytosis by monocytes and monocyte-derived macrophages. *J Immunol* **146**: 2783-2789.
144. Marodi L, Schreiber S, Anderson DC, MacDermott RP, Korchak HM, Johnston RB, Jr. (1993) Enhancement of macrophage candidacidal activity by interferon-gamma. Increased phagocytosis, killing, and calcium signal mediated by a decreased number of mannose receptors. *J Clin Invest* **91**: 2596-2601.
145. Mayatepek E, Hoffmann GF. (1995) Leukotrienes: biosynthesis, metabolism, and pathophysiologic significance. *Pediatr Res* **37**: 1-9.
146. McDonald PP, McColl SR, Braquet P, Borgeat P. (1994) Autocrine enhancement of leukotriene synthesis by endogenous leukotriene B₄ and platelet-activating factor in human neutrophils. *Br J Pharmacol* **111**: 852-860.
147. Mitchell JA, Warner TD. (1999) Cyclo-oxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. *Br J Pharmacol* **128**: 1121-1132.
148. Molossi S, Elices M, Arrhenius T, Diaz R, Coulber C, Rabinovitch M. (1995) Blockade of very late antigen-4 integrin binding to fibronectin with connecting segment-1 peptide reduces accelerated coronary arteriopathy in rabbit cardiac allografts. *J Clin Invest* **95**: 2601-2610.
149. Monobe H, Yamanari H, Nakamura K, Ohe T. (2001) Effects of low-dose aspirin on endothelial function in hypertensive patients. *Clin Cardiol* **24**: 705-709.
150. Montgomery KF, Osborn L, Hession C, et al. (1991) Activation of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1) gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 6523-6527.
151. Morteau O. (2000) Prostaglandins and inflammation: the cyclooxygenase controversy. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **48**: 473-480.
152. Mostafavi-Pour Z, Askari JA, Parkinson SJ, Parker PJ, Ng TT, Humphries MJ. (2003) Integrin-specific signaling pathways controlling focal adhesion formation and cell migration. *J Cell Biol* **161**: 155-167.
153. Mould AP, Askari JA, Craig SE, Garratt AN, Clements J, Humphries MJ. (1994) Integrin alpha 4 beta 1-mediated melanoma cell adhesion and migration on vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and the alternatively spliced III_{CS} region of fibronectin. *J Biol Chem* **269**: 27224-27230.
154. Muller K. (1994) 5-Lipoxygenase and 12-lipoxygenase: attractive targets for the development of novel antipsoriatic drugs. *Arch Pharm (Weinheim)* **327**: 3-19.

155. Munoz C, Castellanos MC, Alfranca A, et al. (1996) Transcriptional up-regulation of intracellular adhesion molecule-1 in human endothelial cells by the antioxidant pyrrolidine dithiocarbamate involves the activation of activating protein-1. *J Immunol* **157**: 3587-3597.
156. Muscara MN, Vergnolle N, Lovren F, et al. (2000) Selective cyclo-oxygenase-2 inhibition with celecoxib elevates blood pressure and promotes leukocyte adherence. *Br J Pharmacol* **129**: 1423-1430.
157. Narumiya S. (1994) Prostanoid receptors. Structure, function, and distribution. *Ann N Y Acad Sci* **744**: 126-138.
158. Natarajan R, Gupta S, Fisher BJ, Ghosh S, Fowler AA, 3rd. (2001) Nitric oxide suppresses IL-8 transcription by inhibiting c-Jun N-terminal kinase-induced AP-1 activation. *Exp Cell Res* **266**: 203-212.
159. Neish AS, Williams AJ, Palmer HJ, Whitley MZ, Collins T. (1992) Functional analysis of the human vascular cell adhesion molecule 1 promoter. *J Exp Med* **176**: 1583-1593.
160. Nelken NA, Coughlin SR, Gordon D, Wilcox JN. (1991) Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J Clin Invest* **88**: 1121-1127.
161. Nie D, Honn KV. (2002) Cyclooxygenase, lipoxygenase and tumor angiogenesis. *Cell Mol Life Sci* **59**: 799-807.
162. Nie D, Tang K, Diglio C, Honn KV. (2000) Eicosanoid regulation of angiogenesis: role of endothelial arachidonate 12-lipoxygenase. *Blood* **95**: 2304-2311.
163. Noon JP, Walker BR, Hand MF, Webb DJ. (1998) Impairment of forearm vasodilatation to acetylcholine in hypercholesterolemia is reversed by aspirin. *Cardiovasc Res* **38**: 480-484.
164. O'Brien KD, McDonald TO, Chait A, Allen MD, Alpers CE. (1996) Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leukocyte content. *Circulation* **93**: 672-682.
165. Ockenhouse CF, Betageri R, Springer TA, Staunton DE. (1992 a) Plasmodium falciparum-infected erythrocytes bind ICAM-1 at a site distinct from LFA-1, Mac-1, and human rhinovirus. *Cell* **68**: 63-69.
166. Ockenhouse CF, Tegoshi T, Maeno Y, et al. (1992 b) Human vascular endothelial cell adhesion receptors for Plasmodium falciparum-infected erythrocytes: roles for

- endothelial leukocyte adhesion molecule 1 and vascular cell adhesion molecule 1. *J Exp Med* **176**: 1183-1189.
167. Okie S. (2005) Raising the safety bar--the FDA's coxib meeting. *N Engl J Med* **352**: 1283-1285.
168. Okura Y, Brink M, Itabe H, Scheidegger KJ, Kalangos A, Delafontaine P. (2000) Oxidized low-density lipoprotein is associated with apoptosis of vascular smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques. *Circulation* **102**: 2680-2686.
169. Osterud B, Bjorklid E. (2003) Role of monocytes in atherogenesis. *Physiol Rev* **83**: 1069-1112.
170. Paul A, Calleja L, Camps J, et al. (2000) The continuous administration of aspirin attenuates atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Life Sci* **68**: 457-465.
171. Pick R, Chediak J, Glick G. (1979) Aspirin inhibits development of coronary atherosclerosis in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) fed an atherogenic diet. *J Clin Invest* **63**: 158-162.
172. Pohl P, Antonenko YN, Yaguzhinsky LS. (1990) Kinetic properties of cation/H(+)-exchange: calcimycin (A23187)-mediated Ca²⁺/2H(+)-exchange on the bilayer lipid membrane. *Biochim Biophys Acta* **1027**: 295-300.
173. Porter JC, Hogg N. (1997) Integrin cross talk: activation of lymphocyte function-associated antigen-1 on human T cells alters alpha4beta1- and alpha5beta1-mediated function. *J Cell Biol* **138**: 1437-1447.
174. Postigo AA, Teixido J, Sanchez-Madrid F. (1993) The alpha 4 beta 1/VCAM-1 adhesion pathway in physiology and disease. *Res Immunol* **144**: 723-735; discussion 754-762.
175. Poston RN, Haskard DO, Coucher JR, Gall NP, Johnson-Tidey RR. (1992) Expression of intercellular adhesion molecule-1 in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* **140**: 665-673.
176. Prigge ST, Boyington JC, Faig M, Doctor KS, Gaffney BJ, Amzel LM. (1997) Structure and mechanism of lipoxygenases. *Biochimie* **79**: 629-636.
177. Printseva O, Peclo MM, Gown AM. (1992) Various cell types in human atherosclerotic lesions express ICAM-1. Further immunocytochemical and immunochemical studies employing monoclonal antibody 10F3. *Am J Pathol* **140**: 889-896.
178. Raines EW, Ross R. (1996) Multiple growth factors are associated with lesions of atherosclerosis: specificity or redundancy? *Bioessays* **18**: 271-282.

179. Ranke C, Hecker H, Creutzig A, Alexander K. (1993) Dose-dependent effect of aspirin on carotid atherosclerosis. *Circulation* **87**: 1873-1879.
180. Rimbach G, Valacchi G, Canali R, Virgili F. (2000) Macrophages stimulated with IFN-gamma activate NF-kappa B and induce MCP-1 gene expression in primary human endothelial cells. *Mol Cell Biol Res Commun* **3**: 238-242.
181. Roebuck KA, Rahman A, Lakshminarayanan V, Janakidevi K, Malik AB. (1995) H₂O₂ and tumor necrosis factor-alpha activate intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) gene transcription through distinct cis-regulatory elements within the ICAM-1 promoter. *J Biol Chem* **270**: 18966-18974.
182. Rola-Pleszczynski M, Stankova J. (1992) Leukotriene B4 enhances interleukin-6 (IL-6) production and IL-6 messenger RNA accumulation in human monocytes in vitro: transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *Blood* **80**: 1004-1011.
183. Ross R. (1993) The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* **362**: 801-809.
184. Ross R. (1999) Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J* **138**: S419-420.
185. Rosso F, Giordano A, Barbarisi M, Barbarisi A. (2004) From cell-ECM interactions to tissue engineering. *J Cell Physiol* **199**: 174-180.
186. Rothlein R, Dustin ML, Marlin SD, Springer TA. (1986) A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *J Immunol* **137**: 1270-1274.
187. Ruco LP, Uccini S, Stoppacciaro A, et al. (1995) The lymphoepithelial organization of the tonsil: an immunohistochemical study in chronic recurrent tonsillitis. *J Pathol* **176**: 391-398.
188. Ruzicka T, Printz MP. (1984) Arachidonic acid metabolism in skin: a review. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **100**: 121-160.
189. Sako D, Chang XJ, Barone KM, et al. (1993) Expression cloning of a functional glycoprotein ligand for P-selectin. *Cell* **75**: 1179-1186.
190. Sanchez-Mateos P, Cabanas C, Sanchez-Madrid F. (1996) Regulation of integrin function. *Semin Cancer Biol* **7**: 99-109.
191. Schade UF, Burmeister I, Elekes E, Engel R, Wolter DT. (1989) Mononuclear phagocytes and eicosanoids: aspects of their synthesis and biological activities. *Blut* **59**: 475-485.

192. Schaub RG, Keith JC, Jr., Rawlings CA. (1983) Effect of acetylsalicylic acid on vascular damage and myointimal proliferation in canine pulmonary arteries subjected to chronic injury by *Dirofilaria immitis*. *Am J Vet Res* **44**: 449-454.
193. Schwartz CJ, Valente AJ, Sprague EA. (1993) A modern view of atherogenesis. *Am J Cardiol* **71**: 9B-14B.
194. Schwartz MA. (2001) Integrin signaling revisited. *Trends Cell Biol* **11**: 466-470.
195. Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Isakson P. (1997) Distribution of COX-1 and COX-2 in normal and inflamed tissues. *Adv Exp Med Biol* **400A**: 167-170.
196. Sendobry SM, Cornicelli JA, Welch K, et al. (1997) Attenuation of diet-induced atherosclerosis in rabbits with a highly selective 15-lipoxygenase inhibitor lacking significant antioxidant properties. *Br J Pharmacol* **120**: 1199-1206.
197. Serhan CN, Drazen JM. (1997) Antiinflammatory potential of lipoxygenase-derived eicosanoids: a molecular switch at 5 and 15 positions? *J Clin Invest* **99**: 1147-1148.
198. Shang XZ, Lang BJ, Issekutz AC. (1998) Adhesion molecule mechanisms mediating monocyte migration through synovial fibroblast and endothelium barriers: role for CD11/CD18, very late antigen-4 (CD49d/CD29), very late antigen-5 (CD49e/CD29), and vascular cell adhesion molecule-1 (CD106). *J Immunol* **160**: 467-474.
199. Shattil SJ, Ginsberg MH. (1997) Integrin signaling in vascular biology. *J Clin Invest* **100**: S91-95.
200. Shyy JY, Lin MC, Han J, Lu Y, Petrim M, Chien S. (1995) The cis-acting phorbol ester "12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate"-responsive element is involved in shear stress-induced monocyte chemotactic protein 1 gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 8069-8073.
201. Sica A, Wang JM, Colotta F, et al. (1990) Monocyte chemotactic and activating factor gene expression induced in endothelial cells by IL-1 and tumor necrosis factor. *J Immunol* **144**: 3034-3038.
202. Sigal E. (1991) The molecular biology of mammalian arachidonic acid metabolism. *Am J Physiol* **260**: L13-28.
203. Silverman ES, Drazen JM. (1999) The biology of 5-lipoxygenase: function, structure, and regulatory mechanisms. *Proc Assoc Am Physicians* **111**: 525-536.
204. Sluiter W, Pietersma A, Lamers JM, Koster JF. (1993) Leukocyte adhesion molecules on the vascular endothelium: their role in the pathogenesis of cardiovascular disease and the mechanisms underlying their expression. *J Cardiovasc Pharmacol* **22 Suppl 4**: S37-44.

205. Smith WL. (1992) Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. *Am J Physiol* **263**: F181-191.
206. Solomon DH, Schneeweiss S, Glynn RJ, et al. (2004) Relationship between selective cyclooxygenase-2 inhibitors and acute myocardial infarction in older adults. *Circulation* **109**: 2068-2073.
207. Springer TA. (1990) Adhesion receptors of the immune system. *Nature* **346**: 425-434.
208. Springer TA. (1994) Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* **76**: 301-314.
209. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, et al. (1994) A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* **89**: 2462-2478.
210. Staunton DE, Marlin SD, Stratowa C, Dustin ML, Springer TA. (1988) Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families. *Cell* **52**: 925-933.
211. Steegmaier M, Levinovitz A, Isenmann S, et al. (1995) The E-selectin-ligand ESL-1 is a variant of a receptor for fibroblast growth factor. *Nature* **373**: 615-620.
212. Steinhilber D. (1999) 5-Lipoxygenase: a target for antiinflammatory drugs revisited. *Curr Med Chem* **6**: 71-85.
213. Sun D, Funk CD. (1996) Disruption of 12/15-lipoxygenase expression in peritoneal macrophages. Enhanced utilization of the 5-lipoxygenase pathway and diminished oxidation of low density lipoprotein. *J Biol Chem* **271**: 24055-24062.
214. Tonnesen MG. (1989) Neutrophil-endothelial cell interactions: mechanisms of neutrophil adherence to vascular endothelium. *J Invest Dermatol* **93**: 53S-58S.
215. Treitl M. (2004) Untersuchung über die Expression von Early-Response Genen und intrazelluläre Signalübertragungswege nach Verletzung humaner vaskulärer Endothelzellmonolayer in vitro. *Dissertation*
216. Uchida K, Shiraishi M, Naito Y, Torii Y, Nakamura Y, Osawa T. (1999) Activation of stress signaling pathways by the end product of lipid peroxidation. 4-hydroxy-2-nonenal is a potential inducer of intracellular peroxide production. *J Biol Chem* **274**: 2234-2242.
217. van de Stolpe A, van der Saag PT. (1996) Intercellular adhesion molecule-1. *J Mol Med* **74**: 13-33.

218. van der Wal AC, Das PK, Tigges AJ, Becker AE. (1992) Adhesion molecules on the endothelium and mononuclear cells in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* **141**: 1427-1433.
219. van Leyen K, Duvoisin RM, Engelhardt H, Wiedmann M. (1998) A function for lipoxygenase in programmed organelle degradation. *Nature* **395**: 392-395.
220. Vanderhoek JY. (1988) Role of the 15-lipoxygenase in the immune system. *Ann NY Acad Sci* **524**: 240-251.
221. Vanderhoek JY, Bryant RW, Bailey JM. (1980) Inhibition of leukotriene biosynthesis by the leukocyte product 15-hydroxy-5,8,11,13-eicosatetraenoic acid. *J Biol Chem* **255**: 10064-10066.
222. Vanderslice P, Biediger RJ, Woodside DG, Berens KL, Holland GW, Dixon RA. (2004) Development of cell adhesion molecule antagonists as therapeutics for asthma and COPD. *Pulm Pharmacol Ther* **17**: 1-10.
223. Vane JR, Botting RM. (1998) Anti-inflammatory drugs and their mechanism of action. *Inflamm Res* **47 Suppl 2**: S78-87.
224. Volker W, Faber V. (1990) Aspirin reduces the growth of medial and neointimal thickenings in balloon-injured rat carotid arteries. *Stroke* **21**: IV44-45.
225. Voraberger G, Schafer R, Stratowa C. (1991) Cloning of the human gene for intercellular adhesion molecule 1 and analysis of its 5'-regulatory region. Induction by cytokines and phorbol ester. *J Immunol* **147**: 2777-2786.
226. Wahl SM, Allen JB, Hines KL, et al. (1994) Synthetic fibronectin peptides suppress arthritis in rats by interrupting leukocyte adhesion and recruitment. *J Clin Invest* **94**: 655-662.
227. Wang N, Verna L, Hardy S, Forsayeth J, Zhu Y, Stemerman MB. (1999) Adenovirus-mediated overexpression of c-Jun and c-Fos induces intercellular adhesion molecule-1 and monocyte chemoattractant protein-1 in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**: 2078-2084.
228. Warso MA, Lands WE. (1983) Lipid peroxidation in relation to prostacyclin and thromboxane physiology and pathophysiology. *Br Med Bull* **39**: 277-280.
229. Wayner EA, Garcia-Pardo A, Humphries MJ, McDonald JA, Carter WG. (1989) Identification and characterization of the T lymphocyte adhesion receptor for an alternative cell attachment domain (CS-1) in plasma fibronectin. *J Cell Biol* **109**: 1321-1330.

230. Weber C, Springer TA. (1998) Interaction of very late antigen-4 with VCAM-1 supports transendothelial chemotaxis of monocytes by facilitating lateral migration. *J Immunol* **161**: 6825-6834.
231. Willoughby DA, Moore AR, Colville-Nash PR. (2000) COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. *Lancet* **355**: 646-648.
232. Wong BC, Wang WP, Cho CH, et al. (2001) 12-Lipoxygenase inhibition induced apoptosis in human gastric cancer cells. *Carcinogenesis* **22**: 1349-1354.
233. Wood KM, Cadogan MD, Ramshaw AL, Parums DV. (1993) The distribution of adhesion molecules in human atherosclerosis. *Histopathology* **22**: 437-444.
234. Yang YY, Hu CJ, Chang SM, Tai TY, Leu SJ. (2004) Aspirin inhibits monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 expression in TNF-alpha stimulated human umbilical vein endothelial cells. *Atherosclerosis* **174**: 207-213.
235. Yla-Herttuala S, Lipton BA, Rosenfeld ME, et al. (1991) Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 5252-5256.
236. Yoshida M, Westlin WF, Wang N, et al. (1996) Leukocyte adhesion to vascular endothelium induces E-selectin linkage to the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* **133**: 445-455.
237. Young LS, Eliopoulos AG, Gallagher NJ, Dawson CW. (1998) CD40 and epithelial cells: across the great divide. *Immunol Today* **19**: 502-506.
238. Zhou HL, Chabot-Fletcher M, Foley JJ, et al. (1993) Association between leukotriene B4-induced phospholipase D activation and degranulation of human neutrophils. *Biochem Pharmacol* **46**: 139-148.
239. Zhu Y, Lin JH, Liao HL, et al. (1998) LDL induces transcription factor activator protein-1 in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **18**: 473-480.
240. Zimmerman GA, Elstad MR, Lorant DE, et al. (1996) Platelet-activating factor (PAF): signalling and adhesion in cell-cell interactions. *Adv Exp Med Biol* **416**: 297-304.

Anhang

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. med. P.C. Weber für die Überlassung des Themas, für die Bereitstellung des Labors und der Arbeitsmittel sowie die vielseitigen Arbeitsmöglichkeiten am Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten meinen besonderen Dank ausdrücken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. med. A. Sellmayer der mit unermüdlicher Geduld mir jederzeit für Fragen und Diskussion zur Verfügung stand und außerordentlich zur Entstehung einer vertrauensvollen, angenehmen Atmosphäre beitrug.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. hum. biol. P. Arnaoutis für die hervorragende Unterstützung bei der Optimierung der Methoden sowie für Diskussionen der Ergebnisse.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Frau M. Morbitzer sowie Frau B. Böhlig für die Einführung und Unterstützung bei den technischen Arbeiten im Labor.

Allen Mitarbeitern des Instituts, die mich bei der Durchführung und Fertigstellung dieser Promotionsarbeit stets hilfreich unterstützt haben, möchte ich ebenfalls danken.

Des weiteren möchte ich mich bei meiner Frau Johanna Patika-Zoller ganz herzlich für ihre Geduld, Motivation und für ihre konstruktive Kritik beim Lesen der Arbeit bedanken.

Ausserdem möchte ich mich ausdrücklich bei meinen Eltern bedanken, die mir nicht nur mein Studium und diese Arbeit ermöglichten, sondern mich auch immer in jeglicher Hinsicht unterstützen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Michael Zoller

Geboren am: 18.08.1971 in Schwäbisch Hall

Familienstand: verheiratet

Schulbildung

1979 – 1987 Grundschule und Hauptschule in Ingelfingen

1987 – 1993 Schlossgymnasium in Künzelsau

Abschluss mit der Allgemeinen Hochschulreife

Zivildienst

1993 – 1995 Rettungshelferausbildung im Rettungsdienst beim Roten Kreuz

1995 Weiterbildung zum Rettungssanitäter

Hochschulausbildung

1995-2001 Studium der Humanmedizin an der LMU München

1997 Physikum

1998 1. Staatsexamen

2000 2. Staatsexamen

2000/1 Praktisches Jahr

2001 3. Staatsexamen

2002/3 AIP in der Klinik für Anaesthesiologie der LMU München

seit 2003/8 Assistenzarzt an der Klinik für Anaesthesiologie der LMU München