

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

**Der Einfluss der Nikotinsäure auf die Expression
von PPAR γ , Scavenger Rezeptoren und ABCA-1 auf
monozytoiden und hepatischen Zellen**

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

vorgelegt von
Matthias Trottmann
aus Wasserburg am Inn

November 2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. R. L. Lorenz

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. P. Lohse
Prof. Dr. med. K. Parhofer

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

Tag der mündlichen Prüfung: 18. November 2004

Meinen Eltern

A INHALTSVERZEICHNIS

A	Inhaltsverzeichnis	1
B	Abkürzungen	5
1	Einleitung.....	7
1.1	Die Bedeutung der LDL- und HDL-Konzentration als Risikofaktoren für die Entstehung einer Atherosklerose.....	7
1.2	Therapieoptionen bei der Behandlung der Atherosklerose.....	7
1.3	Die Nikotinsäure	8
1.3.1	Der Metabolismus der Nikotinsäure.....	8
1.3.2	Die klinische Bedeutung der Nikotinsäure	8
1.3.3	Der Wirkmechanismus der Nikotinsäure	11
1.3.3.1	Die Nikotinsäure beeinflusst die Eicosanoidsynthese.....	11
1.3.3.2	Die Nikotinsäure führt zu einer G _i -vermittelten Hemmung der Adenylatcyclase in Adipozyten	11
1.3.3.3	Nicotinsäure inhibiert die Fettsäuresynthese in der Leber	12
1.3.3.4	Die Nikotinsäure stimuliert den Apo-AI Plasmaspiegel.....	12
1.4	Das High-density Lipoprotein (HDL).....	12
1.4.1	Die antiatherogene Wirkung des HDL	13
1.4.2	Der reverse Cholesterintransport.....	13
1.4.2.1	Der HDL-Zyklus	13
1.4.2.2	Die Bindungsrezeptoren des Apo-AI	14
1.4.3	Die Bedeutung von ABCA-1 für den Cholesterinefflux der Zelle	15
1.4.4	Die Regulation des ABCA-1 über PPAR und LXR.....	18
1.5	Peroxisome Proliferator-activated Receptors und Liver X receptors	18
1.5.1	Die Rezeptorenfamilie der PPARs.....	19
1.5.1.1	PPAR γ	19
1.5.1.2	PPAR α und PPAR β	20
1.5.2	Die nukleären Rezeptoren LXR α und LXR β	21
2	Fragestellung.....	22
3	Material und Methoden.....	23
3.1	Material.....	23
3.1.1	Geräte	23
3.1.2	Chemikalien.....	24
3.1.3	Antikörper	25

3.1.4	Zellkulturen	25
3.1.5	Kultur-Medien	25
3.1.6	Puffer und Lösungen	26
3.2	Methoden	27
3.2.1	Zellkultivierung.....	27
3.2.1.1	Kultur monozytärer Zelllinien	27
3.2.1.2	Kultur der hepatischen Zelllinie HepG ₂	27
3.2.1.3	Präparation und Kultur humaner Monozyten aus Vollblut.....	27
3.2.2	Behandlung der Zellen mit Nikotinsäure.....	29
3.2.3	Bestimmung der spezifischen mRNA-Transkripte	29
3.2.3.1	mRNA Isolierung	30
3.2.3.2	DNase Behandlung	31
3.2.3.3	Die Bestimmung der RNA-Konzentration	31
3.2.3.4	Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion (PCR)	32
3.2.3.5	Die qualitative Messung mit der Agarosegel-Elektrophorese	35
3.2.3.6	Die quantitative Messung der mRNA-Amplifikate mit der HPLC	35
3.2.4	Durchflusszytometrie-Analytik	36
3.2.4.1	Bestimmung der CD36-Oberflächenexpression mittels FACS	38
3.2.4.2	Messung der PPAR γ - Expression mittels FACS.....	39
3.2.4.3	Messung apoptotischer Zellen mit Annexin V.....	39
3.2.5	Cholesterin - Effluxversuche.....	40
3.2.5.1	Die Präparation des low-density Lipoprotein und Oxidierung zu oxLDL	40
3.2.5.2	Lipoproteinbestimmung	41
3.2.5.3	Die Delipidierung von high-density Lipoprotein	42
3.2.5.4	Die Messung des zellulären Gesamtcholesterins	42
3.2.6	Statistische Auswertung	43
4	Ergebnisse	44
4.1	Ergebnisse der Annexin V Messung.....	44
4.2	Ergebnisse auf mRNA Ebene.....	44
4.2.1	Die Messungen der mRNA Expressionen in der MM6sr Zelle.....	45
4.2.1.1	Qualitative Überprüfung der Effekte der Nikotinsäurebehandlung auf MM6-Zellen	45
4.2.1.2	Die mRNA-Expression von CD36 in MM6sr Zellen	45
4.2.1.3	Die mRNA-Expression von PPAR γ in MM6sr Zellen	46
4.2.1.4	Die mRNA-Expression des LDL-R in MM6sr Zellen	46

4.2.1.5	Die mRNA-Expression des Scavenger Rezeptors SR-BI in MM6sr Zellen.	47
4.2.1.6	Die mRNA-Expression des Cholesterin-Transporters ABCA-1 in MM6sr Zellen.....	47
4.2.1.7	Die mRNA-Expression des Scavenger Rezeptors LOX-1 in MM6sr Zellen.....	48
4.2.2	Nikotinsäure-Effekte in HepG ₂ Zellen	48
4.2.2.1	Die mRNA-Expression von CD36 in HepG ₂ Zellen.....	49
4.2.2.2	Die mRNA-Expression von PPAR _γ in HepG ₂ Zellen.....	49
4.2.2.3	Die mRNA-Expression des LDL-R in HepG ₂ Zellen	49
4.2.2.4	Die mRNA-Expression des SR-BI in HepG ₂ Zellen	50
4.2.2.5	Die mRNA-Expression des ABCA-1 in HepG ₂ Zellen	50
4.2.2.6	Die mRNA-Expression von LOX-1 in HepG ₂ Zellen	51
4.2.2.7	Die mRNA-Expression der PEPCK in HepG ₂ Zellen	51
4.2.3	Die Messungen der CD36 – und ABCA-1 – mRNA – Expressionen in PBMCs	52
4.3	Ergebnisse auf Ebene der Proteinexpression	53
4.4	Ergebnisse der Effluxversuche	53
5	Diskussion	55
5.1	Erklärungsansätze zum Wirkungsmechanismus der Nikotinsäure	55
5.1.1	Rezeptoren der Nikotinsäure	55
5.1.2	Nikotinsäure hemmt die Lipasen durch Hemmung der Adenylatcyclase	55
5.1.3	Weitere hepatische Effekte von Nikotinsäure	56
5.1.4	Durch Nikotinsäure wird der Apo-AI Plasmaspiegel erhöht	56
5.1.5	Der Einfluss der Nikotinsäure auf die Synthese zellulärer Eicosanoide.....	56
5.2	Die PPAR _γ Expression nach Nikotinsäuregabe.....	57
5.2.1	Nikotinsäure stimuliert die Expression von PPAR _γ	57
5.2.2	PPAR _γ ein zentraler Kernrezeptor im Lipidstoffwechsel.....	57
5.3	Folgen der PPAR _γ Stimulation durch Nikotinsäure.....	58
5.3.1	Der Einfluss von Nikotinsäure auf die Expression von CD36	59
5.3.1.1	Der CD36 Rezeptor	59
5.3.1.2	Durch Nikotinsäureinkubation steigt die mRNA Expression von CD36	61
5.3.1.3	Folgen der CD36 Stimulation durch Nikotinsäure.....	61
5.3.2	Die Wirkung der Nikotinsäure auf Rezeptoren und Transporter des reversen Cholesterintransports.....	62
5.3.2.1	Der Scavenger Rezeptor BI.....	62
5.3.2.2	Nikotinsäure und SR-BI	63

5.3.2.3	Die Regulation von ABCA-1 durch Nikotinsäure.....	63
5.3.2.4	Funktionelle Folgen der Stimulation von SR-BI und ABCA-1 durch Nikotinsäure	63
5.4	Die Expression des LDL-Rezeptor und LOX-1 nach Nikotinsäuregabe.....	66
5.4.1	Der LDL-Rezeptor	66
5.4.2	Die Expression des LDL-Rezeptors wird durch Nikotinsäureinkubation nicht beeinflusst.....	66
5.4.3	Nicotinsäure und LOX-1	67
5.4.3.1	Der Lektin-like ox-LDL Receptor (LOX-1).....	67
5.4.3.2	Expression der LOX-1 mRNA nach Nikotinsäuregabe	67
5.5	Nicotinsäure und die Phosphoenolpyruvatcarboxykinase	68
5.6	Nicotinsäure und Cholesterinhomöostase	68
5.7	Ausblick auf weitere hypothetische Wirkungsmechanismen der Nikotinsäure	71
5.7.1	Potentielle weitere Folgen einer PPAR γ Stimulation durch Nikotinsäure....	71
5.7.2	Hypothetische Folgen einer LXR α Stimulation	71
5.8	Die Nikotinsäure in der praktischen Anwendung	72
5.8.1	Nicotinsäure in verschiedenen Arzneiformen	72
5.8.2	Lipidologische Studien mit Nikotinsäure	73
5.8.3	Klinische Studien zur Kombination der Nikotinsäure mit Statinen	73
6	Zusammenfassung	75
C	Literaturverzeichnis	77
D	Danksagung	86
E	Lebenslauf.....	87

B ABKÜRZUNGEN

a	Jahr	dL	Deziliter
A	Adenin	DNA	Desoxyribonukleinsäure
Abb.	Abbildung	dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
ABCA-1	ATP-binding cassette A-1	E	Extinktion, z. B. E ₂₈₀ bei 280 nm
ABCB-11	ATP-binding cassette B-11	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ABCC-2	ATP-binding cassette C-2	FACS	Fluorescence activated cell scanner; Durchflusszytometer
ABCG-5	ATP-binding cassette G-5	FATP	fatty acid transport protein
ACAT	Cholesterin-Acyltransferase	FATS	Familial Atherosclerosis Treatment Study
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A	F_c	fragment crystallisable
acLDL	acetyliertes LDL	FCS	fetal calf serum; fetales Kälberserum
ACS	Acyl-CoA-Synthetase	FDA	U. S. Food and Drug Administration
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon	FFS	freie Fettsäure
A-FABP	adipocyte fatty acid binding protein	FITC	Fluorescein Isothiocyanat
Ak	Antikörper	FSC	Forward-Scatter
AP-1	activation protein 1	g	Gramm
Apo-AI/AII	Apolipoprotein AI bzw. AII	G	Guanin
Apo-B₁₀₀	Apolipoprotein B ₁₀₀	gCh	Gesamtcholesterin
Apo-E	Apolipoprotein E	GG-PP	Geranylgeranylpyrophosphat
AU	area-units, Flächeneinheiten	h	Stunden
ATP	Adenosintriphosphat	³H	Tritium
bp	Basenpaare	hABCA1-TG	transgene Maus mit Überexpression von humanem ABCA-1 ¹⁴³
BSA	Bovines Serum Albumin	HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
bzw.	beziehungsweise	HCL	Salzsäure
c	Konzentration	hDP-receptor	human prostanoid DP receptor
C	Cytosin	HDL	high density lipoprotein
°C	Grad Celsius	HDL_{2/3}	Unterfraktionen des HDL
Ca²⁺	Kalzium	Hepes	N-(2-Hydroxyethyl) Piperazin-N-(2-Ethansulfonsäure)
CaCl₂	Kalziumchlorid	HepG₂	Leberzelllinie ⁶¹
CD	cluster of differentiation	8S-HETE	8S-hydroxyeicosatetraenoic acid
CDP	Coronary Drug Project	HH-1	Highly hydrophobic segment 1
C/EBP	CAAT / enhancer binding protein	HL	hepatische Lipase
CETP	Cholesterolester-Transfer Protein	HMG-CoA	Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A
Ch	Cholesterin	HPLC	high performance liquid chromatography
Che	Cholesterinester	HS	Humanserum
Chyl	Chylomikron	HSL	hormone-sensitive lipase
Chyl-Rem	Chylomikron-Remnant	HSP-70	heat shock protein 70
CLA-1	CD36 and LIMP-II analogous-1 (entspricht SR-BI)	Ig	Immunglobulin (z. B. IgG: Typ G)
CO₂	Kohlendioxid	Kap.	Kapitel
CoA	Coenzym A	KCl	Kaliumchlorid
COO⁻	Carboxylgruppe, carboxylendständiger Rest	Ko	Kontrolle
CYP7A1	7 α -Hydroxylase	L	Liter
d	Tage oder Dicke	LCAT	Lecithin-Cholesterin-Acyltransferase
D	Dichtegradientenlösung	LDL	low density lipoprotein
ddPGJ₂	15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J ₂	LDL-R	LDL-Rezeptor
DEAE	Diethylaminoethyl	LDLR^{-/-}	LDL-R knock-out Maus ⁸⁰
DEPC	Diethylpyrocarbonat	LOX-1	Lectin like receptor for oxLDL-1
dest.	destillata	Lp(a)	Lipoprotein (a)
DGAT2	Diacylglycerolacyl-Transferase 2	LPL	Lipoproteinlipase
dHDL	delipidiertes HDL		

LPS	Lipopolysaccharid	PPARβ	Peroxisome Proliferator Activated Receptor β (entspricht PPAR δ)
LXRα	Liver X Receptor α	PPARγ	Peroxisome Proliferator Activated Receptor γ
LXRβ	Liver X Receptor β	PPRE	PPAR response element
LXRE	LXR response element	PRPP	5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat
M	Mol	PUMA-G	protein upregulated in macrophages by interferon γ
mg	Milligramm	R	regulatory domain
MgCl₂	Magnesium Chlorid	RH	Random Hexamer (pd(N) ₆)
min	Minute	RNA	Ribonukleinsäure
Mio	Million	rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
mL	Milliliter	RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute Medium 1640
mm	Millimeter	RT	Raumtemperatur, reverse Transkription
mM	Millimol	RT-PCR	Reverse Transkriptions- PCR
MM6sr	Mono Mac 6; monozytoide Zelllinie ¹⁵⁴	RXR	Retinol-X-Rezeptor
M-MuLV	reverse Transkriptase aus Mäuse-Leukämie Virus	s	Sekunde
mRNA	messenger-RNA	sdLDL	small dense LDL particle
MSD-1/-2	multi-spanning membrane domain 1 bzw. 2	SEM	standard error of mean
MW	molar weight	sMFI	mittlere Fluoreszenzaktivität
n	Anzahl	SR	Scavenger Rezeptor
N	normale	SR-AI/AII/AIII	Scavenger Rezeptor Klasse A Typ I bzw. II, III
NaAzid	Natriumazid	SR-BI/BII	Scavenger Rezeptor Klasse B Typ I bzw. II
NaCl	Natriumchlorid	SREBP1	sterol response element binding protein 1
Na₂CO₃	Natriumcarbonat	SREC	scavenger receptor expressed by endothelial cells
NAD⁺	Nicotinamadeninucleotid	SSC	Sideward-Scatter
NADP	Nicotinamadeninucleotidphosphat	STAT	signal transducer and activator of transcription
NaHCO₃	Natriumbikarbonat	T	Thymin
NaOH	Natronlauge	Tab.	Tabelle
NCEH	neutral cholesteryl ester hydrolase	Taq	Thermophilus aquaticus
NDB-1/-2	nucleotid binding domain 1 bzw. 2	TBE	Tris-Borat-EDTA
NEAA	non-essential amino acids	TG	Triglycerid
NF-κB	nuclear factor (NF-) kappa B	tgl.	täglich
NH₃⁺	Aminogruppe, aminoendständiger Rest	TNFα	tumor necrosis factor α
Nia	Niacin, Nikotinsäure	TNFβ	tumor necrosis factor β
nl MI	nicht letaler Myokardinfarkt	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan
nm	Nanometer	Tris-HCl	Tris-(hydroxymethyl)-amino-methanhydrochlorid
No.	Number	U	Unit
Nr.	Nummer	u. a.	unter anderem
ns	nicht signifikant	UV	Ultraviolett
oxLDL	oxidized low density lipoprotein	UZ	Ultrazentrifuge
p	Irrtumswahrscheinlichkeit	VLDL	very low-density Lipoprotein
p. A.	Reinheitsgrad: zur Analyse	Vol.	Volume
PAI-1	Plasmin activator inhibitor type 1	z. B.	zum Beispiel
PBMC	peripheral blood mononuclear cells	ϵ	molekularer Extinktionskoeffizient
PBS	phospat buffered saline	μg	Mikrogramm
PCR	polymerase chain reaction	μL	Mikroliter
PEPCK	Phosphoenolpyruvatcarboxykinase	μm	Mikrometer
PFA	Paraformaldehyd	μM	Mikromolar
pg	Pikogramm		
PGD₂	Prostaglandin D ₂		
PIP₂	Phosphatidylinositol-bis-phosphat		
PON1	plasma paraoxonase 1		
PPARα	Peroxisome Proliferator Activated Receptor α		

1 EINLEITUNG

1.1 Die Bedeutung der LDL- und HDL-Konzentration als Risikofaktoren für die Entstehung einer Atherosklerose

Hohe low-density lipoprotein (LDL)- und niedrige high-density lipoprotein (HDL)-Konzentrationen im Blut sind als Risikofaktoren für die Bildung atherosklerotischer Gefäßveränderungen nachgewiesen.

Das Risiko eines Myokardinfarktes steigt proportional zum LDL-Spiegel⁸⁷. Aus Interventionsstudien konnte errechnet werden, dass durch die Senkung des LDL-Cholesterin pro Prozentpunkt eine Senkung des Risikos kardiovaskulärer Erkrankungen um 1,0 – 1,5 % erreicht werden kann⁵⁴.

Im Gegensatz dazu verhält sich das epidemiologische Risiko einer Gefäßstenosierung umgekehrt proportional zur HDL-Konzentration¹⁰⁵. So konnte unter anderem in der Framingham Studie nachgewiesen werden, dass Männer mit Serum HDL-Cholesterin Konzentrationen unter 35 mg/dL etwa viermal häufiger eine koronare Herzerkrankung erleiden, als diejenigen mit Serum-Konzentrationen über 55 mg/dL¹⁴⁸. Weitere Studien bestätigten die Bedeutung des HDL-Cholesterinspiegels bei der Pathogenese der Atherosklerose^{47, 46, 63, 117}.

1.2 Therapieoptionen bei der Behandlung der Atherosklerose

Wichtig zur Verhinderung eines Fortschreitens der arteriosklerotischen Läsionen ist die Reduktion von kausal gesicherten Risikofaktoren, wenn möglich deren Vermeidung. Liegen erhöhte LDL-, beziehungsweise eine zu niedrige HDL-Cholesterinkonzentration im Serum vor, so sollte bei der Behandlung primär versucht werden, diese durch Lebensstiländerungen des Patienten zu bessern.

Reicht dieses nicht aus, sollten Medikamenten zum Ausgleich der Dyslipidämie zur Anwendung kommen. Zur Verfügung stehen vor allem die Hydroxymethylglutaryl-Coenzym A-Reduktase Inhibitoren (HMG-CoA-Reduktase Inhibitoren) und die PPAR γ -agonistischen Fibrate, des Weiteren Austauschharze und die Nikotinsäure^{29, 48, 92, 128}.

1.3 Die Nikotinsäure

Bei der Nikotinsäure (Synonyme Niacin, Nicotinat, 3-Pyridincarbonsäure und Vitamin PP) handelt es sich um ein wasserlösliches B-Vitamin, welches auch von der essentiellen Aminosäure Tryptophan abgeleitet werden kann (siehe Abbildung 1).

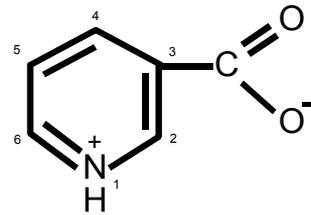


Abb. 1: Strukturformel der Nikotinsäure ¹³⁴

1.3.1 Der Metabolismus der Nikotinsäure

Der Mensch kann die erforderliche Nikotinsäuremenge direkt mit der Nahrung aufnehmen oder synthetisieren, vorausgesetzt er nimmt stattdessen die adäquate Menge des Provitamins Tryptophan auf. Essentiell für den Organismus ist die Reaktion der Nikotinsäure mit dem 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat (PRPP) zum Nicotinatribonucleotid, einer Vorstufe des Nicotinamidadenindinucleotid (NAD⁺) und des Nicotinamidadenindinucleotidphosphat (NADP). Beide, NAD⁺ und NADP sind Coenzyme von Dehydrogenasen ¹³⁴.

Durch Mangel von Nikotinsäure kann es zum Krankheitsbild Pellagra kommen, charakterisiert durch Dermatitis, Diarrhoe und geistige Verwirrung ¹³⁴.

Die Nikotinsäure kann im Körper auf zwei unterschiedlichen Wegen metabolisiert werden (siehe Abbildung 2). Zum einem wird sie durch Konjugation mit Glycin in Nikotinursäure umgewandelt, die auch für den Flushing-Effekt verantwortlich gemacht wurde. Zum anderen wird die Nikotinsäure durch eine Kette von Oxidationen und Reduktionen zu Nikotinamid metabolisiert. Metaboliten dieses Abbauweges wurden mit der hepatotoxischen Wirkung der Nikotinsäure in Zusammenhang gebracht ¹⁰⁸.

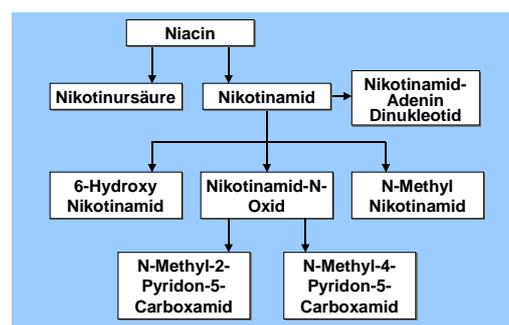


Abb. 2: Metabolismus der Nikotinsäure ¹⁰⁸

1.3.2 Die klinische Bedeutung der Nikotinsäure

Seit 1954 wurde die Nikotinsäure zur Therapie von Fettstoffwechselstörungen verwendet ⁶. Dabei konnte die lipidsenkende Wirkung in mehreren großen klinischen Studien nachgewiesen werden (siehe Tabelle 1).

Im Coronary Drug Project (CDP), einer großangelegten klinischen Langzeitstudie in der mehrere Lipidsenker und Östrogen untersucht wurden, konnte einzig für die Nikotinsäure gezeigt werden, dass sowohl die Morbidität, als auch Gesamtmortalität unter Therapie signifikant gesenkt wurde³⁰. Bei Patienten, die über 6 Jahre mit Nikotinsäure behandelt wurden, war darunter das Gesamt-Cholesterin um 10 % gesenkt. Es zeigte sich sowohl eine hoch signifikante Reduktion der Häufigkeit nichttödlicher Myokardinfarkte (- 27 %), als auch ein signifikant geringeres Auftreten von zerebrovaskulären Ereignissen (- 26 %) ³⁰.

Bei erneutem follow-up nach 15 Jahren - ohne Studienmedikation nach dem 6. Jahr - wurde für die Nikotinsäuregruppe eine anhaltende Mortalitätssenkung um 11 % nachgewiesen²¹.

Trotz der auch in weiteren Studien bewiesenen HDL-steigernden Wirkung, wurde Nikotinsäure seit Verfügbarkeit der Statine wegen ihrer subjektiv unangenehmen, aber nicht gefährlichen Nebenwirkungen in Deutschland nur noch wenig verordnet (siehe Tabelle 2).

Häufig kommt es vor allem bei Therapiebeginn zur so genannten Flush-Reaktion, einer spontan einsetzenden, eventuell stark juckenden Vasodilatation der Haut, die zum Therapieabbruch führen kann.

Nebenwirkungen nach Niacingabe (1 x tgl. 0,5 – 3,0 g)

- Flushreaktionen
- Gastrointestinale Störungen
- Gastritis
- Schwere toxische Hepatitis
- Übelkeit

Nebenwirkungen unter Dauertherapie

- Glukoseintoleranz
- Passagerer Transaminasenanstieg
- Hyperurikämie

Tab. 2: Nebenwirkungen der Nikotinsäure¹¹⁵

Studie	Medikamente	n	Dauer (a)	Effekt auf Lipide										Wirkung auf kardiovaskuläre Krankheiten	Wirkung auf kardiovaskuläre Mortalität	Quelle	
				gCh	TG	LDL	HDL	HDL ₂	HDL ₃	ApoAI	ApoAII	ApoE	Lp(a)				
CDP (1975)	Niacin 3 g/d	8341	6,2	-9,9 %	-26,1 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nl MI -26 % (p < 0,05)	ns	30
Canner et al. (CDP follow up)	-	-	15,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	Gesamtmortalität -10,6 % (p=0,00004)	21
Knopp et al. (1985)	Niacin 3,0 g/d	71	0,5	-	-32,0 %	-20,0 %	+30,0 %	+43,0%	-	-	+/- 0 %	-	-	-	-	-	69
	Nicobid™ 3,0 g/d			-	-6,0 %	-12,0 %	+17,0 %	+/- 0 %	-	-	+/- 0 %	-	-	-	-		
FATS (1990)	Niacin 4 g/d + Colestipol 30 g/d	146	2,5	-	-	-32,0 %	+43,0 %	-	-	-	-	-	-	-	Angiographisch: Progression -25 % Regression +39 %	-	15
	Lovastatin 40 mg/d + Colestipol 30 g/d			-	-	-46,0 %	+15,0 %	-	-	-	-	-	-	-	Angiographisch: Progression -21 % Regression +32 %	-	
Knopp et al. (1998)	Niacin 1,5 g/d	223	0,3	-8,0 %	-18,0 %	-12,0 %	+17,0 %	+33,0%	+16,0%	+6,0 %	-	-7,0 %	-11,0 %	-	-	70	
	Niacin 3,0 g/d			-18,0 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	Niaspan™ 1,5 g/d			-8,0 %	-16,0 %	-12,0 %	+20,0 %	+37,0%	+17,0%	+8,0 %	-	-9,0 %	-15,0 %	-	-		
Sakai et al. (2001)	Niacin 2,0 g/d	139	0,3	-	-	-	-	-	-	+24,0 % ± 4,4 %	+5,0 % - +8,0 %	-	-	-	-	-	121
	Gemfibrozil 1,2 g/d			-	-	-	-	-	-	-	-	kein Effekt	+5,0 % - +8,0 %	-	-	-	
Kashyap et al. (2002)	Nicostatin™ Niacin + Statin	814	1,0	-	-41,0 %	-47,0 %	+41,0 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	64

Tab. 1: Überblick über klinische Studien mit Nikotinsäureverabreichung

CDP = Coronary Drug Project; FATS = Familial Atherosclerosis Treatment Study; gCh = gesamtes Cholesterin; TG = Triglyceride; ns = nicht signifikant; nl MI = nichtletaler Myokardinfarkt; n = Studienteilnehmer

1.3.3 Der Wirkmechanismus der Nikotinsäure

Der molekulare Wirkungsmechanismus der Nikotinsäure in pharmakologischer Dosierung ist ungeklärt. In verschiedenen Untersuchungen ergaben sich Hinweise auf unterschiedliche Angriffspunkte.

1.3.3.1 Die Nikotinsäure beeinflusst die Eicosanoidsynthese

Sowohl *in vitro* Versuchen als auch *ex vivo* Untersuchungen konnte eine Beeinflussung einzelner Eicosanoide oder deren Metaboliten nachgewiesen werden (siehe Abbildung 3)^{62, 95, 101, 119, 120}.

Einige Nebenwirkungen der Nikotinsäure, etwa die Flush-Reaktion, die durch eine starke Dilatation der Hautgefäße ausgelöst wird, ist erklärbar durch den massiven Anstieg des Prostaglandin D₂ (PGD₂)^{95, 119}.

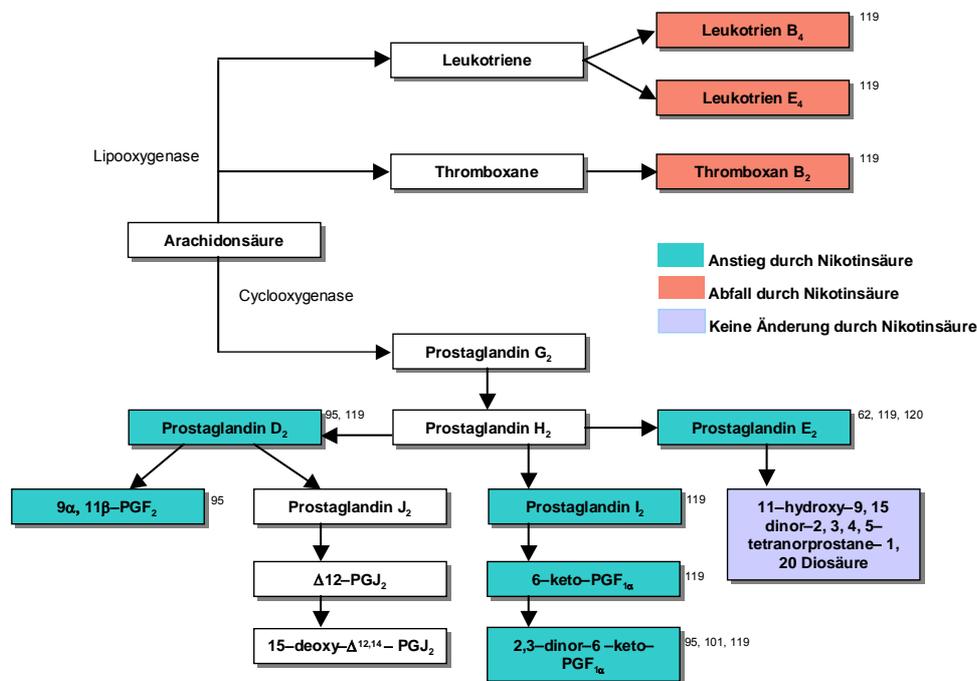


Abb. 3: Beeinflussung der Eicosanoidsynthese durch die Nikotinsäure

1.3.3.2 Die Nikotinsäure führt zu einer G_i-vermittelten Hemmung der Adenylatcyclase in Adipozyten

Ein anderer Angriffspunkt wurde von Aktories et al. beschrieben. In Versuchen konnte nach Nikotinsäuregabe eine Hemmung der Adenylatcyclase in Adipozyten beobachtet werden, mit daraus folgendem Abfall der zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP) Konzentration^{3, 5, 150}. Als Folge niedriger Konzentrationen kommt es zur Hemmung der cAMP-abhängigen Triglyceridlipase und demzufolge zu einem Abfall der Lipolyse im Fettgewebe^{18, 22}.

Neue Arbeiten zeigten, dass die Hemmung der Adenylatcyclase auf Nikotinsäure durch ein G_i -Protein vermittelt wird. Als ein Nikotinsäure-Rezeptor konnte kürzlich in der Maus PUMA-G (protein upregulated in macrophages by interferon- γ) und auf humanen Zellen hHM74b isoliert werden^{81, 129, 142, 149} (siehe Abbildung 4 A).

Beim Menschen wird hHM74b vor allem im Adipozyten, im Milz- und im Lungengewebe exprimiert. In humanen Makrophagen konnte der Rezeptor - anders als in der Maus - aber nicht nachgewiesen werden^{82, 129, 149}.

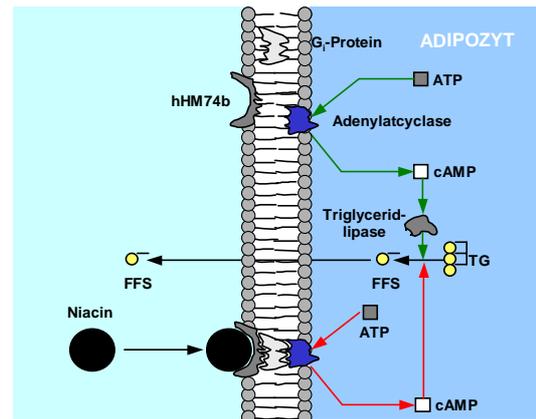


Abb. 4 A: Beeinflussung der intrazellulären cAMP Konzentration durch die Nikotinsäure

1.3.3.3 Nikotinsäure inhibiert die Fettsäuresynthese in der Leber

Die Nikotinsäure inhibiert direkt die Diacylglycerolacyltransferase 2 (DGAT2) in Hepatozyten⁸⁶. Als Folge wird die Fettsäuresynthese gehemmt, das möglicherweise zum Abfall der Triglyceride beiträgt (siehe Abbildung 4 B).

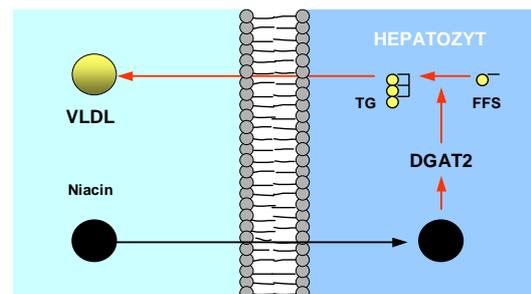


Abb. 4 B: Nikotinsäure inhibiert die DGAT2 im Hepatozyten

1.3.3.4 Die Nikotinsäure stimuliert den Apo-AI Plasmaspiegel

Weitere Arbeiten zeigten in *ex vivo* Versuchen nach Nikotinsäuregabe einen erhöhten Apolipoprotein AI (Apo-AI) Plasmaspiegel (siehe Tabelle 1). Hierbei wurde angenommen, dass die Nikotinsäure nicht eine Neusynthese des Apo-AI stimuliert, sondern die Aufnahme in Hepatozyten inhibiert^{60, 121}.

1.4 Das High-density Lipoprotein (HDL)

Die HDL-Partikel bestehen aus einem Kern mit Triglyceriden, Cholesterinestern und einer Hülle. Diese setzt sich zusammen aus unverestertem Cholesterin, Phospholipiden und den Apolipoproteinen A-I und A-II. Durch Ultrazentrifugation können als Unterfraktionen des HDL das HDL₂ und das HDL₃ abgetrennt werden^{48, 63}. Alle HDL-Partikel besitzen Apo-AI, wobei etwa 50 % zusätzlich das Apo-AII enthalten (HDL₂). Apo-AI ist für die Bindung des HDL-Partikels an unterschiedlichen Rezeptoren von Bedeutung, des Weiteren für die Aktivierung der Fibrinolyse⁶³.

Als Bildungsort des sogenannten präHDL-Partikels (HDL_{3c}) gilt vor allem die Leber, die ebenfalls den Hauptanteil des HDL eliminiert, daneben der Darm, die Gonaden, die Nieren und Nebennieren^{63, 74}.

1.4.1 Die antiatherogene Wirkung des HDL

Durch mehrere Mechanismen wirkt das HDL antiatherogen, zum einen durch den für den Fettstoffwechsel wichtigen reversen Cholesterintransport von peripheren Zellen zur Leber^{68, 74, 134}. Zum anderen wird mittels der auf den HDL-Partikel transportierten Paraoxonase 1 (PON1) die durch reaktiven O₂-Radikalen ausgelöste Oxidation des LDL zum oxidierten LDL (oxLDL) - welches über Scavenger Rezeptoren aufgenommen werden kann¹³² - inhibiert. Somit kann das HDL über PON1 als Antioxidans wirken^{63, 74, 85}.

Weiter kann das HDL Adhäsionsmoleküle (u. a. E-Selectin auf Endothelzellen) reduzieren und über Apo-AI die Fibrinolyse steigern^{63, 74}.

1.4.2 Der reverse Cholesterintransport

Zusätzlich zur zelleigenen de-novo Cholesterinsynthese werden periphere Zellen durch Aufnahme von LDL mit Cholesterin versorgt. Neben dem Einbau in Zellmembranen wird das Cholesterin in steroidproduzierende Drüsen für die Synthese von Steroidhormonen verwendet. Praktisch alle peripheren Gewebe, mit Ausnahme der Leber, können Steroide nicht katabolisieren. Deshalb ist zur Vermeidung einer Akkumulation von Steroiden, ein Rücktransport von der Peripherie zur Leber notwendig. Dieser wird als reverser Cholesterintransport bezeichnet (siehe Abbildung 5). Nur in der Leber kann über die Galle Cholesterin direkt, oder als eine der Gallensäuren indirekt eliminiert werden^{68, 74, 134}.

1.4.2.1 Der HDL-Zyklus

Das auch als präHDL bezeichnete HDL_{3c} wird vor allem von Hepatozyten, aber auch von Darmgewebe freigesetzt. Des Weiteren wird auch HDL_{2b} nach Cholesterinabgabe als HDL_{3c} wiederverwendet.

Das HDL_{3c} nimmt überschüssiges Cholesterin von extrahepatischen Zellen auf und wird somit zum HDL_{3a/b}. Dies erfolgt zum Beispiel nach Bindung am sogenannten Scavenger Rezeptor BI (SR-BI) auf der Zelle². Dabei wird das Lipoproteinpartikel nicht internalisiert, sondern durch ein Transportsystem in der Plasmamembranen - reguliert durch die ATP-binding cassette A-1 (ABCA-1) - extrazellulär mit Cholesterin beladen¹¹¹ (siehe auch Kap. 1.4.3).

Im Gegensatz dazu kommt es bei einer Bindung des HDL_{2b} an das Cubilin zur Endozytose des gesamten HDL_{2b}-Partikels. Cubilin konnte aber bisher nicht auf Leberzellen isoliert werden. Ein weiterer, auch als „HDL Katabolismus Rezeptor“ bezeichneter Akzeptor wird deshalb vermutet^{50, 73}.

Des Weiteren wurde eine Bindung des HDL_{2b} an der hepatische Lipase (HL) beschrieben. Auch hier rezirkuliert das HDL_{2b} als HDL_{3c} nach erfolgter Triglyceridabgabe^{63, 74} (siehe auch Abbildung 5).

1.4.3 Die Bedeutung von ABCA-1 für den Cholesterinefflux der Zelle

Die Interaktion zwischen dem Apo-AI des HDL einerseits und Phospholipiden und Cholesterin aus peripheren Zellen andererseits konnte erst in den letzten Jahren molekular aufgeklärt werden.

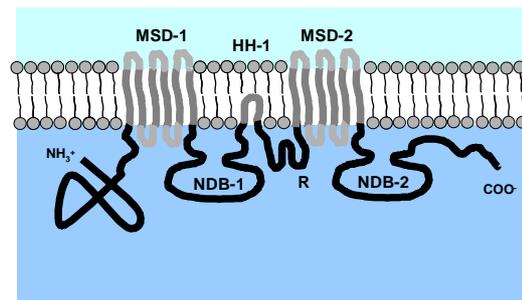
Hierbei brachten Untersuchungen des genetischen Defekts der Tangierkrankheit wichtige Erkenntnisse. Diese autosomal-rezessive Krankheit ist gekennzeichnet durch sehr niedrige HDL-Cholesterinspiegel und starke Akkumulation von Cholesterinestern in den Zellen des retikuloendothelialen Systems. Symptomatisch kommt es unter anderem zu einer Splenomegalie, zu vergrößerten Tonsillen und Lymphknoten, vor allem aber zu einer frühen Ausbildung arteriosklerotischer Gefäßläsionen⁴³.

Im Jahre 1999 konnte gezeigt werden, dass eine dysfunktionelle Mutation des ATP-binding-cassette transporter A-1 (ABCA-1) die Ursache des Leidens ist^{11, 78, 99, 118}.

ABCA-1 gehört zur Proteinsuperfamilie der ATP-binding-cassette transporter (ABC). Proteine dieser Familie, bekannt sind bis jetzt mehr als vierzig, wurden auf Plasmamembranen und intrazellulären Kompartimenten einer Vielzahl von Geweben gefunden. Kennzeichnen aller ABC-Proteine ist eine „ATP-Bindungskassette“, die bei den meisten ABC-Proteinen durch Hydrolyse von ATP den transmembranären Transport unterschiedlicher Substrate dient^{125, 126}.

Neben ABCC-2 und ABCB-11, wurde ABCA-1 als Lipidtransporter identifiziert, wobei neuere Arbeiten zeigten konnten, dass ABCA-1 das Cholesterin nicht direkt transportiert, sondern den Transfer aus dem äußeren Blatt der Plasmamembran auf Apo-AI unter ATP-Verbrauch indirekt vermittelt¹³⁶. Weiter besteht auf der Plasmamembran eine räumliche Assoziation von ABCA-1 mit den Caveolae und lipid rafts (siehe Abbildung 6)¹²⁵. Bei Defekt von ABCA-1, wie bei der Tangier-Krankheit vorliegend, resultiert eine verminderte Cholesterinabgabe des peripheren Gewebes auf Apo-AI haltige Partikel.

Die Struktur des ABCA-1 ist in Abbildung 7 dargestellt und zeigt unter anderem das highly hydrophobic segment-1 (HH-1), dem Bindungsort des Cholesterins¹⁷. In einer Arbeit von Langmann et al. wurden unterschiedliche Gewebe auf die Lokalisation von ABCA-1 untersucht. Hierbei zeigte sich, dass vor allem Hepatozyten, intestinale Zellen und Makrophagen ABCA-1 exprimieren⁷⁷.



MSD -1 / -2 Multi-spanning membrane domain -1 / -2

NDB -1 / -2 Nucleotide binding domain -1 / -2

HH -1 Highly hydrophobic segment -1

R Regulatory domain

Abb. 7: Struktur der ATP-binding cassette A1

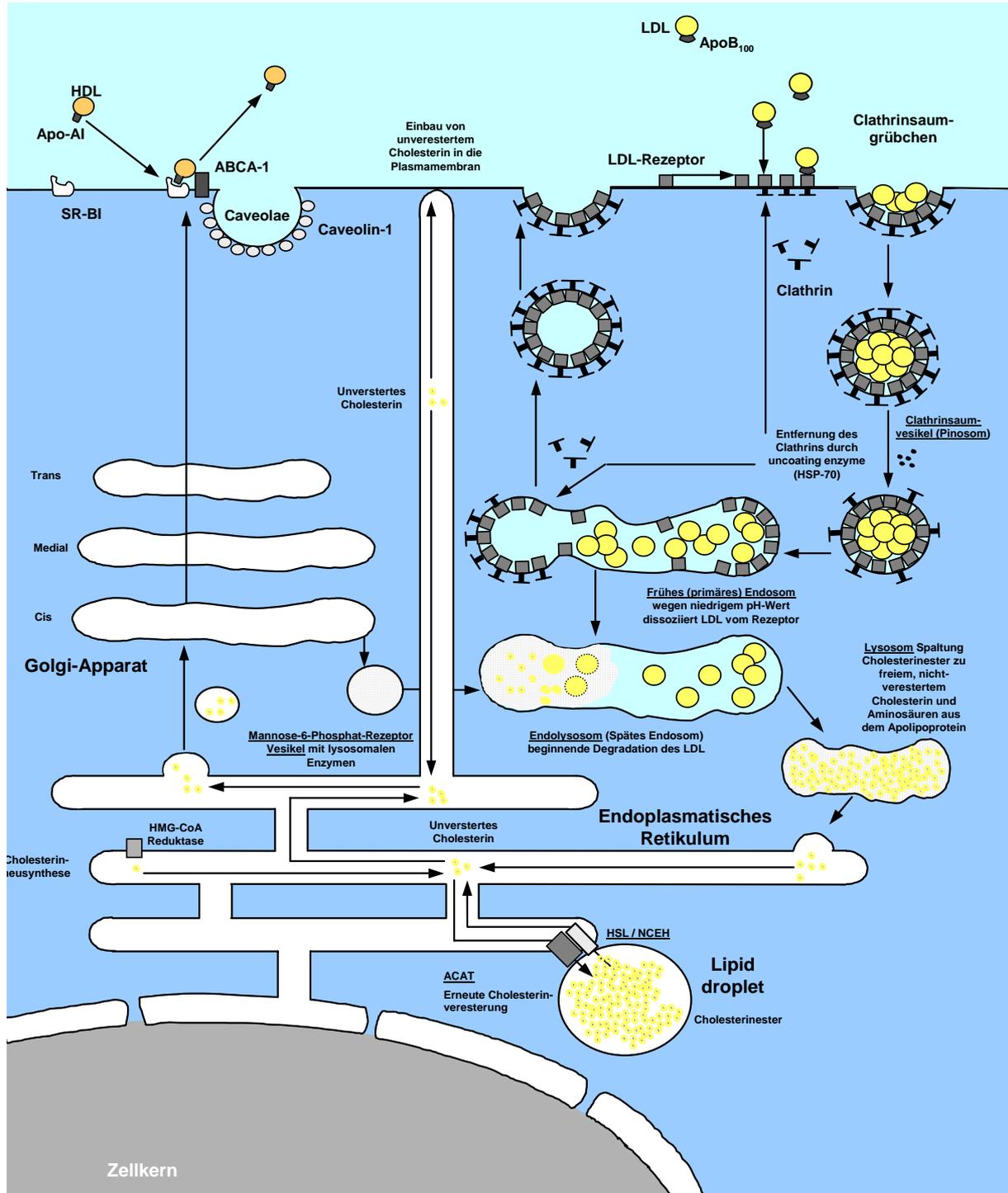


Abb. 6: Die Cholesterinaufnahme und -abgabe der peripheren Zelle 35, 125, 134

Der Einfluss von Nikotinsäure auf die Expression von PPAR γ , Scavenger Rezeptoren und ABCA-1 auf monozytoiden und hepatischen Zellen

1.4.4 Die Regulation des ABCA-1 über PPAR und LXR

Die Regulation des ABCA-1 ist nicht vollständig geklärt. Wie gezeigt werden konnte findet eine Regulation über die Kernhormonrezeptoren Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) und Liver X receptors (LXR) statt.

So konnte in Versuchen mit PPAR γ -null-embryonalen Stammzellen beobachtet werden, dass ohne das Vorhandensein von PPAR γ eine Stimulation von ABCA-1 ausbleibt^{24, 28}.

In einer Arbeit von Chawla et al. konnte gezeigt werden, dass PPAR γ die Expression von LXR α induziert, das die ABCA-1 Transkription fördert²⁴. Die Expression von ABCA-1 wird im Makrophagen nicht nur vom Transkriptionsfaktor PPAR γ stimuliert, sondern wie gezeigt werden konnte auch durch cAMP¹⁰².

Weitere Arbeiten zeigten nach Cholesterinaufnahme von Makrophagen eine Expressionszunahme von ABCA-1^{77, 103}. Dies ist von Bedeutung, berücksichtigt man, dass durch PPAR γ Stimulation eine Expression des scavenger receptors CD36 erfolgt^{96, 141}. CD36 ist ein bedeutender Rezeptor der Cholesterin- und oxLDL-Aufnahme des Makrophagen⁹⁹. Durch gleichzeitige PPAR γ Stimulation von CD36 und ABCA-1 wird nach der Aufnahme, die Übertragung des Cholesterins vom Makrophagen auf das HDL-Partikel geregelt^{25, 28, 79}.

Auch im Enterozyten wird ABCA-1 exprimiert. Bei hohem Cholesteringehalt der Nahrung konnte nicht nur eine Inhibition der fraktionellen Cholesterinabsorption beobachtet werden, sondern auch eine Stimulation von ABCA-1 durch LXR α ²⁴ mit resultierendem Cholesterinreexport in das Darmlumen¹¹².

Als weitere Stimulatoren der ABCA-1 Expression zeigten sich neben dem Oncostatin M, auch das Geranylgeranyl-Phosphat¹²⁶. Eine Regulation durch PPAR β in Makrophagen wird diskutiert^{100, 114}. Für das HDL₃-Cholesterin konnte eine Inhibition der ABCA-1 Expression nachgewiesen werden⁷⁷.

1.5 Peroxisome Proliferator-activated Receptors und Liver X receptors

PPARs und LXRs sind nukleare Transkriptionsfaktoren. Wie in neueren Untersuchungen nachgewiesen werden konnte, besteht ein enger Zusammenhang zwischen der Aktivierung von PPARs und LXRs²⁴.

1.5.1 Die Rezeptorenfamilie der PPARs

Bei der Proteinfamilie der PPARs handelt es sich um eine erstmals 1990 isolierte Kernhormonrezeptorenfamilie ⁵⁵, die ligandenabhängig als Transkriptionsfaktoren wirken ⁶⁶.

Es werden drei Isotypen (PPAR α - γ) unterschieden ³⁶, die auf unterschiedlichen Genen lokalisiert sind. Sie besitzen unterschiedliche Funktionen, Liganden und Zelllokalisationen. Die PPARs regulieren viele komplexe Zellabläufe, vor allem im Fettstoffwechsel, die Differenzierung von Adipozyten und die Apoptoseinduktion ⁶⁶ (siehe Tabelle 3).

Die PPARs dimerisieren mit dem Retinoid X-Rezeptor (RXR), dem Rezeptor der 9-cis-Retinoinsäure und translozieren in den Zellkern. Dort bindet der Komplex an Peroxisome-proliferator response elements (PPREs) im Promotor diverser Gene und kann die Transkription unterschiedlicher Proteine stimulieren oder inhibieren. Zwar können PPARs auch alleine binden, ihre Wirkung ist aber als Hetero-Dimer mit RXR potenter (siehe Abbildung 8) ⁶⁶.

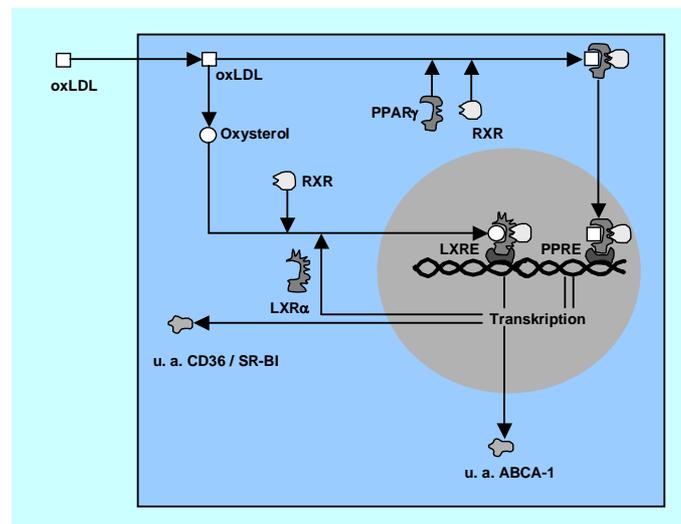


Abb. 8: Die Regulation von PPAR γ und LXR α in der Zelle

1.5.1.1 PPAR γ

Lokalisiert auf dem Chromosom 3 werden durch alternatives Splicing drei Untertypen von PPAR γ (Typ 1–3) beschrieben. PPAR γ kommt vor allem im Fettgewebe, weniger im Kolon und in Makrophagen vor ³². Als Stimuli gelten vor allem Fettsäuren, Eicosanoide (u. a. die 8S-hydroxyeicosatetraenoic acid [8S-HETE] und Prostaglandine), Thiazolidindione (u.a. Rosiglitazon) ³² und das sterol response element binding protein 1 (SREBP1) ³². Als potenter endogener PPAR γ -Stimulus wurde 1995 erstmalig das 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J₂ (ddPGJ₂) beschrieben ^{41, 67}, ein Metabolit des PGD₂.

1.5.1.2 PPAR α und PPAR β

PPAR α (lokalisiert auf Chromosom 15) wird vor allem im braunen Fettgewebe und in Parenchymzellen der Leber exprimiert⁶⁶. Als eine der Hauptfunktion werden die Enzyme der Fettsäureoxidation zu Acetyl-CoA und Ketonkörpern in der Leber reguliert. Die Fettsäuren aus dem Fettgewebe können über PPAR α ihren eigenen Metabolismus stimulieren^{66, 114}.

Über PPAR β (entspricht PPAR δ) ist bisher wenig bekannt. Diskutiert wird unter anderem eine Stimulation von ABCA-1 in Makrophagen, im Gegensatz zu PPAR α das den Cholesterinefflux aus Zellen nicht beeinflusst^{100, 114}.

	Vorkommen	Stimulierende Liganden	Funktion
PPARα (NR1C1)	<ul style="list-style-type: none"> Braunes Fettgewebe Leber (v. a. Parenchym) Niere Herz Skelettmuskel^{66, 114} 	<ul style="list-style-type: none"> Fibrate³² Langkettige mehrfach ungesättigte Fettsäuren (u. a. Linolsäure) oxidierte Fettsäuren (u. a. Phytansäure, konjugierte Linolensäure) Eicosanoide (u. a. 8S-HETE, Leukotriene B4)⁶⁶ Peroxisome proliferator (Wy 14643) Thiazolidine (in hohen Konzentrationen)¹¹⁴ 	<ul style="list-style-type: none"> Stimuliert die β-Oxidation von Fettsäuren¹¹⁴ Adipogenese
PPARβ (NR1C2, PPAR δ , NUC1, FAAR)	In vielen Geweben, v. a.: <ul style="list-style-type: none"> Darm Niere Herz⁶⁶ 	<ul style="list-style-type: none"> Fibrate¹¹⁴ Mehrfach ungesättigte Fettsäuren oxidierte Fettsäuren⁶⁶ 	<ul style="list-style-type: none"> Fragliche Stimulation der ATP-binding Cassette A-1 (ABCA-1) im Makrophagen^{100, 114, 131} Verbindung zum Colonkazinom⁶⁶ Reguliert Expression der Acyl-CoA Synthetase 2 im Gehirn⁶⁶ Fragliche Mitwirkung bei der Implantation des Embryos und der Dezidualisation⁶⁶
PPARγ (NR1C3)	<ul style="list-style-type: none"> Fettgewebe Kolon Immunsystem Retina⁶⁶ 	<ul style="list-style-type: none"> Mehrfach ungesättigte Fettsäuren oxidierte Fettsäuren⁶⁶ Prostaglandine (15-deoxy-$\Delta^{12,14}$-PGJ₂)⁶⁶ Thiazolidine³² GW7845¹³⁵ SREBP1³² 	<p>Stimuliert:</p> <ul style="list-style-type: none"> Expression der Lipoproteinlipase (LPL)³² Expression von Fettsäurerezeptoren (u. a. adipocyte fatty acid binding protein [A-FABP] und Fatty acid transport protein [FATP])³² Acyl-CoA Synthetase (ACS) Phosphoenolpyruvatkarboxykinase (PEPCK)¹⁴⁰ ATP-binding Cassette A-1 (ABCA-1)^{24, 28} Scavenger-Rezeptoren (v. a. CD36^{96, 141}, SR-BI²⁷) LXRα⁴⁰ 7α-Hydrolase (CYP7A1)²⁶ <p>Inhibiert:</p> <ul style="list-style-type: none"> Scavenger Rezeptor A-I (SR-AI)¹¹³ Nitric oxide synthase¹¹³ Gelatinase B¹¹³ STAT¹¹³ NF-κB¹¹³ AP-1¹¹³ <p>Insulinsensitivität wird gesteigert^{45, 32} Zusammen mit C/EBP (Transkriptionsfaktor): Ausdifferenzierung der Präadipozyten zu Adipozyten⁵⁹</p>

Tab. 3: Überblick über die einzelnen Peroxisome proliferator-activated receptors

1.5.2 Die nukleären Rezeptoren LXR α und LXR β

Eine weitere Gruppe von Kernhormonrezeptoren umfasst die Liver X Rezeptoren α und β (LXR α und LXR β). Wie die PPARs, bilden sie mit RXR ein Heterodimer ⁷⁶.

In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass LXR α vor allem in der Leber, im Darm und im Makrophagen exprimiert wird ¹⁴⁵. LXR β konnte in einer Vielzahl von Geweben nachgewiesen werden, unter anderem in der Leber, aber auch im Gehirn und im Makrophagen ¹⁰⁶. Im Makrophagen kommt es nach starker Lipidbelastung zu einem Shift: die anfänglich niedrige LXR α Konzentration steigt an und übertrifft schließlich die Konzentration von LXR β ⁷⁵.

Als Liganden von LXRs konnten vor allem unterschiedliche Oxysterole ^{57, 58}, das oxLDL und die Liganden von PPAR γ nachgewiesen werden ⁴⁰. Für das Geranylgeraniol (einem Metaboliten des Mevalonat) oder seinen Metaboliten Geranylgeranylpyrophosphat (GG-PP) wurde eine inhibitorische Wirkung gezeigt ⁴².

Wie für PPAR γ konnte auch für LXR α eine stimulierende Wirkung auf die Expression von ABCA-1 nachgewiesen werden. Das LXR α Gen scheint selbst ein direktes Ziel von PPAR γ ²⁴ und von LXR α selbst zu sein ¹⁵². Eine Beeinflussung von ABCA-1 durch LXR β konnte nicht nachgewiesen werden ^{40, 75}.

2 FRAGESTELLUNG

Der Wirkungsmechanismus der Nikotinsäure, hier insbesondere die Vermittlung der Anstiege von HDL ist nicht detailliert aufgeklärt.

Da Nikotinsäure die systemischen PGD-Spiegel massiv erhöhen kann, ddPGJ₂ ein Hauptmetabolit des PGD ist und selbst als wichtigster endogener Aktivator von PPAR_γ gilt, wurde untersucht,

- ob Nikotinsäure die PPAR_γ Expression beeinflusst
- ob sich die Transkription PPAR_γ-abhängige Lipid-Rezeptoren und -Transporter im Makrophagen- und Hepatozytenmodell nach Nikotinsäureinkubation verändert
- weiter wurde funktionell untersucht, ob durch Nikotinsäureexposition die zelluläre Cholesterinhomöostase in einem Makrophagenmodell in Richtung reversen Cholesterintransport beeinflusst wird
- schließlich wurde geprüft, ob diese Effekte auch an humanen Monozyten nachweisbar sind.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

Für diese Arbeit wurden folgende Materialien verwendet:

3.1.1 Geräte

- **Autoklav** Schütt Bioclave, Göttingen
- **Automatik-Pipetten** Gilson ABIMED, Langenfeld
- **Cell Lifter** Sarstedt, Nümbrecht
- **Centriflo-Filter:** amicon centriflo 24 Centriflo
Ultrafiltration Membrane Cones (1052 CF25) Milli Pore, Billerica, MA, USA
- **Destilliertes Wasser:** Milli Q Plus PF Milli Pore, Billerica, MA, USA
- **DNA Thermal Cycler 480** Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA
- **Durchflusszytometer (FACScan) HP 900** Becton Dickinson, Heidelberg
Workstation für die FACScan Research Software
Auswertesoftware: CellQuest™ Version 3.1f
- **Eismaschine:** NordCap SPR 75 Frimont, Mailand, Italien
- **FACS-Röhrchen** Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
- **Gelelektrophorese** BioRad, München
Gelkammer: Sub-Cell GT DNA
Elektrophoresis Cell
- **HPLC** Gilson ABIMED, Langenfeld
1 Dynamic Mixer 811C
1 UV-Detektor 115
2 Pumpen 307 und 306
Auswertesoftware: 712 HPLC Controller
Version 1.20
Autoinjektor 234
System Interface Module 506C
Injektionsventil Rheodyne 7125
Säulen: PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Hauptsäule: PE TSK DEAE: 4,6 mm Innendurchmesser x 35 mm Länge unporöses Material, 2,5 µm Partikeldurchmesser
Vorsäule: TC II Gel DEAE 4,6 mm Innendurchmesser, 15 mm Länge, 2,5 µm Partikeldurchmesser
- **Kulturflaschen, Kulturschalen:** Limbro, Titertek, ICN Biomedicals Inc., CH-5522 Tägering, Schweiz
96 U-shaped wells
24er well-Platte, Multiwell™
75 mL Flasche Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
125 mL Flasche, Nunclon™ Δ Surface Nalge Nunc International, Dänemark
Nalge Nunc International, Dänemark
Microlance, Frankreich
- **Kanülen:** 0,4 mm Innendurchmesser
- **Mikroskop:** Olympus, Japan
IX 50-S8-F2 Krück, Berlin
- **pH-Meter:** 765 Calimatic mit Messkette SE 103
- **Photometer:** Biochrom LTD, Cambridge, England
RNA/DNA-Calculator Gene Quant II
Uvikon 922 (für Lowry) Kontron Instruments, Neufahrn
BioRad, München
- **Real-time Cycler (iCycler)**
- **Reaktionsgefäße:** Biozym, Oldendorf
1,5 mL Cup Biozym, Oldendorf
2,0 mL Cup
7,0 mL Centritubes Beckman Instruments Inc., Palo Alto, CA, USA

- 15 mL Cup
- 50 mL Cup
- **Spritzen:** 1, 2, 5, 10, 50 mL
- **Steri-Cult 200 Incubator Forma Scientific**
- **Steri-Cap™ Vacuum Drive Disposable Filtration System**
- **Sterilbank: GELAIRE BSB 4A**
- **Sterile Auslaufpipetten**
- **Sterilfilter Minisart**
- **Stickstoffbehälter**
- **Vortexer:**
Reax 2000
- **Waagen**
- **Wasserbad**
- **Zentrifugen:**
neoLab 16/18 für PCR
Omnifuge 20 RS für Zellkultur
MR18 22 für mRNA-Isolierung
Univapo 100 H (Vakuumentrifuge)
Multifuge 3 L-R für Lipoproteinextraktion

3.1.2 Chemikalien

- Aceton
- NEEO Agarose
- Annexin V-Binding Buffer (10x Concentrate)
- Borsäure
- Bovines Serum Albumin
- Calciumchlorid
- Cholesterinassay-Kit
- Chloroform p. A.
- Dextrane
- Diethylether p. A.
- 1, 4 - Dioxan
- DNA-Leiter 100 bp
- DNA/Protein-Pelleting-Solution, Quantum Prep®
Aqua Pure RNA Isolation Kit
- Ethanol p. A.
- Ethidium Bromid
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)
Dinatriumsalz-Dihydrat
- Hanks´ Balanced Salt Solution (10fach)
- Hepes Buffer 1 M
- Humanserum
- Isopropanol
- Kaliumbromid
- Kaliumchlorid (P-5405)
- Ladepuffer 6x für Gelelektrophorese
- Lysis-Solution, Quantum Prep®
Aqua Pure RNA Isolation Kit
- Magnesium Chlorid 25 mM für PCR
- Methanol
- Natrium-Acetat-Lösung
- Natriumchlorid p. A.
- Nikotinsäure (Nicotinic acid; Niacin;
Pyridine-3-carboxylic acid)
- Paraformaldehyd

- Sarstedt AG & Co, Nürnberg
- Sarstedt AG & Co, Nürnberg
- Braun, Melsungen
- Labotec GmbH, Göttingen
- Milli Pore, Billerica, MA, USA
- Flow Laboratories, Michigan City, IN, USA
- Sarstedt, Nürnberg
- Sartorius, Göttingen
- L´air liquide, Champigny, Frankreich
- Heidolph, Karlsruhe
- Sartorius, Göttingen
- Köttermann, Ütze-Hänigsen
- Hermle Labortechnik, Wehingen
- Heraeus Instruments GmbH, Osterode
- Jouan GmbH, Unterhaching
- Uniequipe GmbH, Martinsried
- Heraeus Kendro Laboratory Products GmbH,
Langenselbold

- Merck, Darmstadt
- Rotigrose, Roth, Karlsruhe
- Phar Mingen, Becton Dickinson Labware
- Sigma, Deisenhofen
- Sigma, Deisenhofen
- Sigma, Deisenhofen
- Fa. Rolf Greiner Biochemica, Flacht
- Merck, Darmstadt
- Sigma, Deisenhofen
- Merck, Darmstadt
- Sigma, Deisenhofen
- PeqLab Biotechnologie, Erlangen
- BioRad, München

- Merck, Darmstadt
- Roth, Karlsruhe

- Merck, Darmstadt
- Sigma, Deisenhofen
- Sigma, Deisenhofen
- Bio Whittaker, Rockland, ME, USA
- Fluca Chemie, Buchs, Schweiz
- Sigma, Deisenhofen
- Sigma, Deisenhofen
- PeqLab Biotechnologie, Erlangen
- BioRad, München

- Qiagen, München
- Merck, Darmstadt
- Sigma, Deisenhofen
- Merck, Darmstadt
- Sigma, Deisenhofen

- Sigma, Deisenhofen

- Phospat Buffered Solution mit Kalzium, Magnesium PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich
- Phospat Buffered Solution ohne Kalzium, Magnesium PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich
- Primer-Oligonucleotid Metabion GmbH, Martinsried
- Random Hexamer (pd(N)₆) Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
- Ready-To-Go™ RT-PCR-Beads Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
- RNA-Hydration-Solution, Quantum Prep® Aqua Pure RNA Isolation Kit BioRad, München
- RQ1 DNase Buffer 10x Reaction Promega, Madison, WI, USA
- RQ1 RNase-Free DNase Promega, Madison, WI, USA
- RQ1 DNase Stop-solution Promega, Madison, WI, USA
- Seromed Ficoll Separating Solution, Dichte 1,077 Biochrom KG, Berlin
- Sample Clean Up Columns Chromosystems & Chemicals GmbH, München
- Sybr® Green I nucleid acid gel strain Molecular Probes, Eugene, OR, USA
- Tris-(hydroxymethyl)-amino-methane, hydrochloride p.A. Serva GmbH, Heidelberg
- Trypsin-EDTA Solution (1x) Sigma, Deisenhofen

3.1.3 Antikörper

- Annexin V-FITC Phar Mingen, Becton Dickinson, Heidelberg
- Anti-mouse FITC-Ak Goat F(ab')₂ Ig fragment Dako A/S, Dänemark
- Mouse Anti Human CD36 FA6-152 Klon IgG Immunotech, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA
- Mouse IgG₁ kappa (MOPC 21) Sigma, Deisenhofen
- PPAR_γ-IgG₁ mouse monoclonal Ak (E-8) Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA

3.1.4 Zellkulturen

- Hep G₂ American Type Culture Collection, Rockville MD, USA
- MM6sr Siehe Ziegler-Heitbrock et al. ¹⁵⁴

3.1.5 Kultur-Medien

Für Kultivierung folgender Zellen:

- **MM6sr:**
 - a) Anteilig 500 mL RPMI-1640 (Sigma R-7880, Deisenhofen), 200 U/mL Penicillin (Sigma P-0781, Deisenhofen), 200 µg/mL Streptomycin (Serva 47 970), 5 mL NEAA 100x (Sigma M-7145, Deisenhofen), 9 µg/mL Insulin (Sigma I-6634, Deisenhofen) gelöst in phosphatfreiem Puffer, 1 mL 500 mM Oxalacetat (Sigma, Deisenhofen) gelöst in Aqua dest. und 1 mL 500 mM Pyruvat (Sigma, Deisenhofen) gelöst in Aqua dest.
 - b) Nach dem Mischen mit LPS-Dialysefilter U2000 (Gambro Healthcare, Lakewood, CA, USA) und Steril-Filter (Nalgene Disposable Filter 150 mL, 0,2 µM, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) filtrieren
 - c) Medium vor Gebrauch mit 10 % FCS (Sigma, Deisenhofen) versetzen
- **Hep G2:**
 - a) Zum Ablösen: Trypsin-EDTA-Lösung (Sigma, Deisenhofen) und Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma, Deisenhofen) mit 10 % FCS (Sigma, Deisenhofen)
 - b) Für die Kultur: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma, Deisenhofen) mit 10 % FCS (Sigma, Deisenhofen)

- **PBMC:**

- a) Für die Isolierung: RPMI-1640 (Sigma, Deisenhofen) mit 4 mM Glutamat (Sigma, Deisenhofen) und Penicillin-Streptomycin Solution (1000 U; Sigma, Deisenhofen) (= Medium A)
- b) Zur Unterbindung der Plättchenaggregation: wie a) zusätzlich 2,5 μ M Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat (Merck, Darmstadt)
- c) Für Kultivierung: wie a) und zusätzlich 20 % sterilfiltriertes autologes Serum des entsprechenden Spenders

3.1.6 Puffer und Lösungen

- **TBE (pH 8,0)**, Laufpuffer für Agarose-Gel:

Mischen von 0,5 M Tris (basisch) (Serva GmbH, Heidelberg), 0,415 M Borsäure (Sigma, Deisenhofen) und 10 mM EDTA. (Merck, Darmstadt)

- **DEPC-Wasser:**

2 mL Diethylpyrocarbonat (Sigma, Deisenhofen) werden zu 1 L Milli-Q Wasser gegeben, gut geschüttelt und anschließend autoklaviert (Zerstörung der enzymdegenerativen Potenz von DEPC)

- **HBSS-Lösung** für CD36 FACS-Messung:

Für 250 mL: 25 mL HBSS (10fach; Sigma, Deisenhofen) mit 2,5 mL 1 M HEPES (Sigma, Deisenhofen), 0,25 mL 1 mM $MgCl_2$ (Sigma, Deisenhofen) und 0,25 mL 1 mM $CaCl_2$ (Sigma, Deisenhofen). Mit Milli-Q Wasser wurde auf 250 mL aufgefüllt.

- **Phosphatfreier Puffer** für MM6sr-Medium:

Puck A: 137 mM NaCl (Sigma S-5886, Deisenhofen) mit 5,36 mM KCl (Sigma P-5405, Deisenhofen), 4,17 mM $NaHCO_3$ (Sigma S-5761, Deisenhofen), 5,05 mM D^+ -Glucose-Monohydrat (Sigma G-7021, Deisenhofen) gelöst in 1 L Aqua dest. und mit CO_2 begasen bis pH 6,0 erreicht ist

Puck B: 7,5 % $NaHCO_3$ (Sigma S-8761, Deisenhofen)
phosphatfreier Puffer: 50 mL Puck A und 60 mL Puck B

- **Lösen der Nikotinsäure** (MW: 123.1):

Zur Herstellung der Stammlösung (100fach): 123.1 mg Nikotinsäure (Sigma, Deisenhofen) gelöst in 10 mL PBS mit Calcium und Magnesium, pH-Einstellung auf 7,4. Auf 1 mL Medium wurden 10 μ L Behandlung gegeben (1 mM)

- **Herstellung der Dichtegradientenlösungen für die LDL-Präparation (4°C lagern):**

D1 (1,080 g/mL): 250 mL Aqua dest. mit 30 g NaCl und 0,25 g Na-EDTA (pH 7,4)

D2 (1,050 g/mL): 250 mL Aqua dest. mit 18,5 g NaCl und 0,25 g Na-EDTA (pH 7,4)

D3 (1,000 g/mL): 250 mL Aqua dest. mit 0,25 g Na-EDTA (pH 7,4)

- **Herstellung der Lösungen für die Proteinbestimmung (nach Lowry):**

Lösung A: 10 g 2 % Na_2CO_3 (Merck, Darmstadt) mit 0,8 g 0,16% Natriumtartrat (Merck, Darmstadt) und 5 g 1% Natriumdodecylsulfat (Merck, Darmstadt) in 500 mL NaOH (0,1 N; Merck, Darmstadt) lösen

Lösung B: 4 g 4 % Kupfersulfat (Merck, Darmstadt) in 100 mL Aqua dest.

Lösung C: 1 mL Lösung B mit 100 mL Lösung A

Lösung D: Aqua dest. mit Folin Ciocalteu – Phenol - Reagenz p. A. (Merck, Darmstadt)

- **Herstellung der Resolubilisierungs-Lösung für die Delipidierung von HDL (pH 7,4):**

0,01 M Tris (Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg) mit 0,1 M NaCl, 0,001 M NaAzid (Sigma, Deisenhofen) und 2 M Guanidin HCl (Sigma, Deisenhofen)

3.2 Methoden

3.2.1 Zellkultivierung

Alle Arbeiten zur Zellkultivierung finden unter der Sterilbank statt. Die Kultivierung erfolgt in einem Inkubator bei 37°C, 5 % CO₂ Gehalt und 95 % Luftfeuchtigkeit.

3.2.1.1 Kultur monozytärer Zelllinien

Die stark differenzierte human monozytoide Zelllinie Mono Mac 6 wird als Makrophagenmodell verwendet¹⁵⁴. Die Zellen werden in einer Konzentration von 0,2 Millionen Zellen pro mL MM6sr-Medium (siehe Kap. 3.1.5) in 24 well Platten verteilt und für 3 Tage im Inkubator gehalten. Wegen leichter Adhärenz der Zellen kann nach 3 Tagen je 1 mL der 2 mL fassenden Wells abgehoben werden. Durch Verwirbelung mit dem Pipettenstrahl werden die Zellen suspendiert und in einem 50 mL Cup gesammelt. Nach anschließendem Zählen werden die MM6sr Zellen erneut nach Konzentrationseinstellung mit neuem Medium auf eine 24 well Platte verteilt bzw. verwendet. Nach 3 Tagen kann eine Verdopplung der Zellzahl angenommen werden.

3.2.1.2 Kultur der hepatischen Zelllinie HepG₂

Bei der humanen Leberzelllinie HepG₂ handelt es sich um eine etablierte Zelllinie zur Untersuchung des Lipidmetabolismus der Leber⁶¹.

Die Kultur erfolgt in 75 mL bzw. 125 mL fassenden Kulturflaschen in 8 mL bzw. 15 mL HepG₂-Medium (siehe Kap. 3.1.5) für 2 Tage im Inkubator. Die Zellzahl hat sich nach dieser Zeit verdoppelt. Für die Zellpassage nach 2 Tagen wird das Medium abgegossen und die Zellen mit PBS gewaschen. Bei der HepG₂ Zelle handelt es sich um eine adhärente Zelle, so dass nach dem Absaugen des PBS zur Ablösung der Zellen 1 mL bzw. 3 mL vorgewärmtes Trypsin für 2 min in die Kulturflasche zugegeben wird. Durch kräftiges Schwenken der Kulturflasche lösen sich die Zellen vom Boden. Die Zellsuspension wird zusammen mit 4 mL bzw. 12 mL frischem HepG₂ Medium mit hohem Druck durch die Pipette gepresst. Somit können noch vorhandene Zellkonglomerate gelöst werden. Nach Überführen in 50 mL-Cups und Zentrifugieren (1000 rpm/ 3 min/ RT) wird das Medium-Trypsin-Gemisch abgesaugt und das Zellpellet zur weiteren Verarbeitung verwendet.

3.2.1.3 Präparation und Kultur humaner Monozyten aus Vollblut

Für die Versuche mit humanen Monozyten wird 150 mL Blut von vier gesunden Probanden verwendet. Das Blut wird in zwei 50 mL Perfusoren-Spritzen aufgezogen, in

denen als antikoagulierende Substanz 5 mL Natrium-Citrat-Lösung und 5 mL sterilfiltriertes Dextran 500 in PBS vorgelegt werden. Die übrigen 50 mL Blut werden in Serumröhrchen aufgezogen. Alle Spritzen und Röhrchen werden direkt nach der Abnahme kurz geschwenkt, die Serumröhrchen gleich danach auf Eis gehalten.

Die Perfusor-Spritzen werden 30 min bei Raumtemperatur senkrecht auf ihrem Stempel aufgestellt, so dass sich Erythrozyten und Thrombozyten entsprechend der Schwerkraft absetzen können. Es wird auf Eis gearbeitet um eine frühzeitige Adhäsion der Monozyten zu verhindern.

Die obere Phase der Perfusor-Spritzen, mit den noch in Lösung befindlichen mononukleären Zellen, wird vorsichtig mit einer 19 Guage Nadel über 15 mL eiskalter Ficoll Trennlösung (Dichte 1,077) in ein 50 mL Cups überschichtet. Eine Abtrennung der noch vereinzelt im Plasma befindlichen Erythrozyten von peripheren mononukleären Blutzellen (peripheral blood mononuclear cells; PBMC) erfolgt in der vorgekühlten Zentrifuge (2000 rpm/ 4°C/ 20 min, ohne Abbremsen).

Nach Zentrifugation wird die milchig-weiße Bande zwischen der Ficoll- und der Serumphase, bestehend aus den mononukleären Zellen, mit einer 10 mL Pipette vorsichtig unter kreisenden Bewegungen abgesaugt und in ein neues 50 mL Cup überführt, das 10 mL kaltes Medium A (siehe Kap. 3.1.6) und 2 mM EDTA enthält. Anschließend wird das Cup auf 50 mL mit Medium A aufgefüllt und zentrifugiert (1500 rpm/ 4°C/ 10 min).

Nach Zentrifugation wird der Überstand verworfen, das Pellet mit 45 mL Medium A plus EDTA resuspendiert und die Zellzahl lichtmikroskopisch bestimmt. Aus 50 mL Blut können etwa 50 Mio. PBMCs isoliert werden. Durch nochmaliges Zentrifugieren (1500 rpm/ 4°C/ 10 min) werden die Monozyten von restlichen Thrombozyten, Erythrozyten und sonstigen Verunreinigungen befreit.

Nach der Zentrifugation wird das Pellet mit dem für den Versuch gewünschten Volumen mit Medium A plus 20 % autologem Serum resuspendiert und in Kulturschalen inkubiert.

Für die Herstellung des autologen Serums werden die Serumröhrchen nach 45 min zweimal zentrifugiert (2500 rpm/ 4°C/ 20 min) und in einer Verdünnung von 1:5 mit Medium A vermischt.

Für die Versuche werden $5 - 10 \times 10^6$ Zellen in 2,0 mL PBMC-Medium (siehe Kap. 3.1.5) pro well gehalten. Nach 2 Stunden sind die Zellen adhären, so dass die jeweilige Behandlung (Nikotinsäure bzw. PBS) zugegeben werden kann.

Nach der Inkubation der Zellen wird das alte Medium abgesaugt und mit kaltem PBS überdeckt 10 min auf Eis gehalten. Zur zusätzlichen Minderung der Zelladhäsion wird Calcium- und Magnesium-freies PBS verwendet. Mit einem Zellschaber werden die Zellen vorsichtig abgehoben und in ein 15 mL Cup überführt. Die nun in Lösung befindlichen Zellen werden zur mRNA-Isolierung weiterverwendet.

3.2.2 Behandlung der Zellen mit Nikotinsäure

Die leicht adhären MM6sr-Zelle wird mit neuem MM6sr-Medium und jeweils mit Nikotinsäure (für 1 mM Nikotinsäure werden 10 μ L Stammlösung pro mL Medium gegeben) oder PBS (10 μ L pro mL Medium) als Kontrolle versetzt und auf 2 mL fassenden 24 well Platten verteilt.

Die adhären HepG₂-Zellen und PBMCs werden nach Adhärenz in der Kulturflasche bzw. Kulturschale (nach 24 h) mit frischem Medium versetzt, welches Nikotinsäure (für 1 mM Nikotinsäure werden 10 μ L Stammlösung pro mL Medium gegeben) oder PBS Kontrolle (10 μ L pro mL Medium) enthält. Es finden Messungen sowohl 3 Stunden als auch 48 Stunden nach Nikotinsäurezugabe statt.

3.2.3 Bestimmung der spezifischen mRNA-Transkripte

Die mRNA-Expression wird indirekt gemessen: Nach der RNA Isolierung wird die RNA mittels reverser Transkription in DNA umgeschrieben.

In der Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction PCR) kann spezifisch die cDNA der gesuchten mRNA exponentiell vervielfältigt werden. Die so genannten Amplifikate werden anschließend prozentual gegenüber dem Amplifikat von Aktin-mRNA mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC) Trennung und UV-Detektion berechnet. Das Strukturprotein β -Aktin wurde unabhängig von der Behandlung mit Nikotinsäure in der Zelle gebildet und kann somit als interner Standard verwendet werden (siehe Abbildung 9).

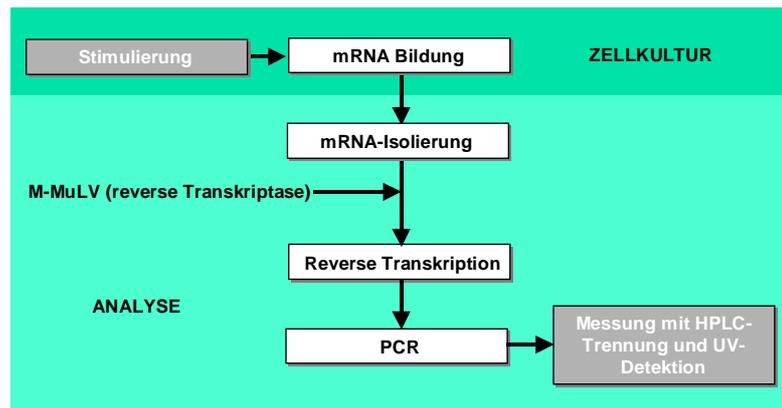


Abb. 9: Prinzipieller Ablauf der mRNA Messungen

3.2.3.1 mRNA Isolierung

Zur Vermeidung einer möglichen Verunreinigung mit Fremd-RNA, DNA und RNAsen wird mit Handschuhen unter der Sterilbank gearbeitet und nur autoklavierte Materialien verwendet. Alle wässrigen Lösungen werden mit DEPC-Wasser versetzt.

Zur Isolierung der mRNA werden 2 Mio. Zellen in ein 15 mL Cup überführt und abzentrifugiert (800 rpm/ 18°C/ 5 min). Der Überstand wird abgesaugt, das Pellet mit 1 mL PBS ohne Calcium und Magnesium resuspendiert, in ein autoklaviertes 2 mL Cup überführt und in einer vorgekühlten Zentrifuge erneut zentrifugiert (15.000 rpm/ 5°C/ 2 min). Die weiteren Arbeitsschritte erfolgen auf Eis.

Die folgende Isolierung wird mit dem Aqua Pure RNA Isolation Kit (Quantum Prep[®]; BioRad, München) durchgeführt.

Der Überstand wird entfernt und zum Zellpellet wird 300 µL Lysis-Solution zugegeben. Nach Zugabe von 100 µL DNA/Pelleting-Solution, wird das Cup zehnmal gekippt, kurz gevortext und für 5 min auf Eis inkubiert.

Nach Abzentrifugieren (14.000 rpm/ 4°C/ 3 min) findet eine Trennung in eine proteinhaltige Zwischenschicht und einen RNA-haltigen Überstand statt. Dieser Überstand wird in ein neues autoklaviertes 2 mL Cup überführt und mit 300 µL 100%igem Isopropanol vermischt. Es folgen fünfundzwanzigmaliges Kippen, kurzes Vortexen und Zentrifugieren (14.000 rpm/ 4°C/ 3 min).

Die RNA liegt nun im Pellet vor, der Überstand wird entfernt. Das Pellet wird mit 300 µL 70%igem Ethanol (verdünnt mit DEPC-Wasser) vorsichtig resuspendiert, bis es vollständig gelöst ist.

Nochmaliges kurzes Zentrifugieren (14.000/ 4°C/ 1 min) folgt. Nach Entfernung des Ethanols wird das Cup für 20 min an der Luft getrocknet. Die Isolierung ist abgeschlossen.

Zur Aufbewahrung wird die RNA in 65 µL RNA-Hydratation-Solution gelöst, in ein neues autoklaviertes 1 mL Cup gegeben und bei – 80°C eingefroren.

3.2.3.2 DNase Behandlung

Zur Elimination eventueller Verunreinigungen mit DNA wird bei jeder Probe eine DNase Behandlung durchgeführt. Alle weiteren Arbeitsschritte finden auf Eis statt.

Ein Mix bestehend aus 5 µL RQ1 DNase Buffer 10x Reaction und jeweils 2,5 µL DEPC-Wasser und RQ1 RNase-Free DNase wird vorbereitet. Zur DNase Behandlung werden 40 µL RNA-Lösung mit 10 µL Mix in einem neuen autoklaviertem 1 mL Cup versetzt.

Die Probe wird im Thermocycler 15 min bei 37°C erwärmt und nach Zugabe von 5,0 µl RQ1 DNase Stop-solution für 10 min bei 65°C erhitzt. Es wird der vom DNase-Hersteller (Promega, Madison, WI, USA) mitgelieferte Puffer und die Stop-solution verwendet.

3.2.3.3 Die Bestimmung der RNA-Konzentration

Nach der DNase Behandlung wird der RNA-Gehalt mittels eines Zweistrahl-Photometers in einer Verdünnung von 1:20 quantifiziert. Die Proben werden gegen DEPC-Wasser bei 260 nm (spezifisch für RNA) und 280 nm (spezifisch für Proteine) gemessen. Der Quotient aus beiden Extinktionen E_{260}/E_{280} – die sogenannte Ratio – gibt Aufschluss über die Proteinverunreinigung der Probe. Nur Proben mit einer Ratio $\geq 1,600$ werden für die weitere PCR verwendet.

Die RNA Konzentration errechnet sich gemäß dem Lambert-Beerschen Gesetz über den molaren Extinktionskoeffizienten (ϵ) wie folgt:

$$E = c \cdot d \cdot \epsilon$$

wobei c die Konzentration und d die Küvettschichtdicke in cm beschreibt. Für die RNA ergibt sich bei einer Konzentrationseinheit von µg/mL und einer Küvettdicke von 1 cm folgende Berechnung:

$$C_{\text{RNA}} [\mu\text{g/mL}] = E_{260} \cdot 40 \cdot \text{Verdünnungsfaktor (hier: 20)}$$

Nach Ermittlung des RNA-Gehaltes werden die Proben bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt. Die Proben bleiben bei dieser Temperatur über Jahre stabil und können jederzeit für eine reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR) verwendet werden.

3.2.3.4 Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine Methode zur exponentiellen Vervielfältigung (Amplifizierung) spezifischer DNA-Sequenzen.

Das Reaktionsprinzip der PCR ist aus der DNA-Replikation abgeleitet. Die PCR verwendet DNA-Polynukleotide, deren Sequenzen aus den flankierenden Bereichen des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts bestimmt werden. In der vorliegenden Arbeit wird die mRNA-Expression gemessen. Diese muss vor der PCR mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben werden.

Hierzu werden Ready-To-Go™ RT-PCR-Beads verwendet, so dass die RT-PCR und die nachfolgende PCR in einem Cup mit nur einem Pipettierschritt durchgeführt werden kann. Dadurch wird neben einem zeitlichen Gewinn vor allem eine Minderung möglicher Kontamination der gewünschten Probe erreicht.

Das vorgefertigte Bead enthält in einer Succrose-Hülle:

- M-MuLV (reverse Transkriptase FPLC*pure*™)
- RNAguard™
- Ribonuclease Inhibitor
- 2,0 U taq-Polymerase
- 200 μM pro dNTP
- 1,5 mM MgCl_2
- 60 mM KCl
- 10 mM Tris-HCl (pH bei 9,0 bei Raumtemperatur)

Die RNA-Probe wird auf 10 μL mit DEPC-Wasser in einer Konzentration von 2 $\mu\text{g/ml}$ eingestellt. Zu jedem Bead wird ein Mix, bestehend aus der jeweiligen RNA-Probe, dem jeweiligem Primer, Magnesium und Random Hexamer (pd(N)_6) zugegeben (Siehe Tabelle 4). Mit DEPC-Wasser wird ein Endvolumen von 40 μL eingestellt.

Primer	Konzentration RNA-Probe (μL)	Primerkonzentration (μM)	Magnesiumkonzentration (mM)	Konzentration $\text{pd}(\text{N})_6$ (μL)	Annealing-Temperatur ($^{\circ}\text{C}$)	Zykluszahl
Aktin	10	0,4	2,0	5,0	60	30
CD36		0,6				
SR-BI		0,4	2,5			32
PPAR γ		0,6				30
ABCA-1						36
PEPCK						32
LOX-1						30
LDL-R						

Tab. 4: Übersicht über die verwendeten Primermischungen

Synthetisiert wurden die Primer von Metabion GmbH (München), wobei für β -Aktin, CD36¹⁰⁹, den LDL-Rezeptor (LDL-R)¹²⁴, den lectin-like oxLDL receptor-1 (LOX-1)³⁴, PEPCK³³ und ABCA1²⁸ etablierte Sequenzen verwendet wurden. Für die Amplifikation von SR-B1 und PPAR γ wurden neue Primer ausgewählt. Um eine hohe Spezifität dieser Primer zu erzielen, wurden diese mittels BLAST search¹³⁸ nochmals mit den Sequenzen der Genbank verglichen (siehe Tabelle 5). Die PCR-Konditionen wurden in Vorversuchen für jedes Amplifikat optimiert.

Primer	Primersequenz	Fragmentlänge (bp)	Quelle
Aktin	5'- AGA GAT GGC CAC GGC TGC TT - 3' 5'- ATT TGC GGT GGA CGA TGG AG - 3'	540	109, 124
CD36	5'- GAG AAC TGT TAT GGG GCT AT - 3' 5'- TTC AAC TGG AGA GGC AAA GG - 3'	389	109, 124
SR-BI	5'-CTT CCT CGA GTA CCG CAC-3' 5'-GAG CCA CGA AGC GAT AGG-3	574	selbst designt
PPAR γ	5'- CAT GGC AAT TGA ATG TCG TG - 3' 5'- CGT GGA CTC CAT ATT TGA GG - 3'	655	selbst designt
ABCA-1	5'- GGC AAT GGC ACT GAG GAA GAT GCT GAA A - 3' 5'- GCA CTG CAG GAT TGT CAC CAC AGC AAA - 3'	1100	28
PEPCK	5'- TCC ACC TCC TTC TCC CAG AA - 3' 5'- ATG CGG CCC TTC TTT GGC TA - 3'	325	33
LOX-1	5'- TTA CTC TCC ATG GTG GTG CC - 3' 5'- AGC TTC TTC TGC TTG TTG CC - 3'	192	34
LDL-R	5'- CAA TGT CTC ACC AAG CTC TG - 3' 5'- TCT GTC TCG AGG GGT AGC TG - 3'	245	109, 124

Tab. 5: Übersicht Primersequenzen

Danach wird die Probe im Thermocycler mit variabler Zykluszahl je nach Primer behandelt (siehe Tabelle 4). Folgende Zeiten und Temperaturen wurden gewählt:

Reverse Transkription: 20 min bei 42 $^{\circ}\text{C}$ danach
5 min bei 95 $^{\circ}\text{C}$

- PCR (pro Zyklus):**
- I. 30 s bei 95 °C Denaturierung
 - II. 40 s bei 60 °C Annealing
 - III. 40 s bei 72 °C Polymerisation

Im ersten Schritt der PCR, der Denaturierung bei 95°C, wird die DNA durch Hitze in Einzelstränge aufgeschmolzen. Beim Annealing binden (hybridisieren) die spezifischen Oligonukleotidprimer an die einzelsträngige DNA-Matrize. Die optimale Temperatur ist abhängig sowohl von der Primerlänge als auch von dessen G/C-Gehalt und wurde für die hier verwendeten Primer bei 60°C gewählt. Im dritten Schritt, der Polymerisation bei 72°C, kann nun die Taq-Polymerase an den durch die Primer markierten Regionen binden und mit der DNA-Synthese beginnen.

In jedem Reaktionszyklus verdoppelt sich die Menge des von den Primern flankierten DNA-Abschnittes. Im ersten Reaktionszyklus entstehen bei der Polymerisation DNA-Moleküle, deren 5'-Ende zwar durch den eingesetzten Primer begrenzt ist, deren 3'-Ende aber durch den möglichen Abbruch der Polymerisation an einer beliebigen Stelle der Matrize sehr unterschiedlich aussehen kann. Da sich die Konzentration der Ausgangsmatrize nicht verändert, nimmt die Zahl derartiger DNA-Moleküle höchstens linear mit der Zykluszahl zu. Die Anzahl der Reaktionsprodukte wächst exponentiell mit der Zykluszahl, da sich ihre Konzentration mit jedem Zyklus verdoppelt (siehe auch Abbildung 10).

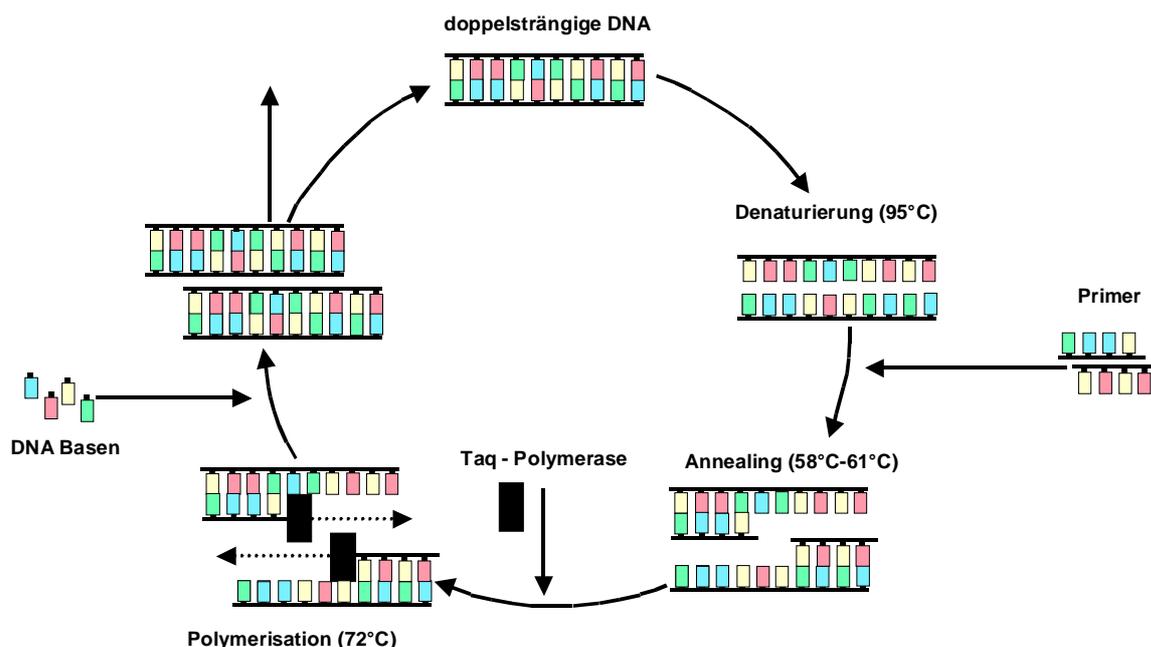


Abb. 10: Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die optimale Zykluszahl muss für jedes Amplifikat getestet werden, um einen Vergleich verschiedener Behandlungen mit einer Kontrolle zu ermöglichen. Weil unter anderem die Menge an Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP) begrenzt ist, erreicht die Reaktion bei hoher Zykluszahl immer eine Plateauphase. Beim Vergleich unterschiedlicher Behandlungen ist die Zykluszahl so zu wählen, dass sich die Reaktionen noch in der exponentiellen Phase befinden.

Die amplifizierte Probe wird bis zum Auftragen auf ein Agarose-Gel oder der quantitativen Messung mittels HPLC bei – 20 °C aufbewahrt.

3.2.3.5 Die qualitative Messung mit der Agarosegel-Elektrophorese

Auf Grund ihrer negativen Ladung wandern Nukleinsäuren im elektrischen Feld und können ihrer Größe nach gelelektrophoretisch getrennt werden. Als Gelmatrices dient Agarose, ein natürlich vorkommendes Zuckerpolymer. Zur Darstellung der DNA-Amplifikate wird der Interkalationsfarbstoff Ethidiumbromid verwendet, der unter UV-Licht (254 nm) fluoresziert.

Zur Herstellung 1%iger Agarosegele wird Agarose in 0,5x TBE-Puffer aufgekocht und 0,1 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt.

10 µL der DNA-Probe wird mit 2 µL sechsfach Ladepuffer vermischt und auf das Gel aufgetragen. Als Größenmarker dient eine 100 bp-Leiter (10 µL).

Die Auftrennung erfolgt bei 100 Volt über 45 Minuten. Anschließend wird das Gel im durchscheinenden UV-Licht fotografiert (Blende 8, Belichtungszeit 0,5 s).

3.2.3.6 Die quantitative Messung der mRNA-Amplifikate mit der HPLC

Mit Hilfe der High Performance Liquid Chromatography (HPLC) wird eine quantitative Auswertung der DNA-Amplifikate ermöglicht³⁴. Somit kann indirekt die ursprüngliche mRNA Menge bestimmt werden. Für die Messung wird 40 µL der amplifizierten Probe eingesetzt.

Die HPLC trennt die Probe an einer Ionenaustauscher-Säule auf. Diese Säule besteht aus nicht-porösem DEAE-Material mit einer Partikelgröße von 2,5 µm und den Dimensionen 4,6 x 35 mm über die über 15 min ein Gradient von 30 % bis 60 % einer 1 M NaCl-Lösung (in 25 mM Tris-HCl pH 9,0 abgepuffert) angelegt wird. Eine Auftrennung der DNA-Fragmente mit einer Länge von 150 – 700 bp ist somit möglich.

In einem Durchfluss-Photometer wird die Probe bei 260 nm detektiert und durch Integration der korrespondierenden Peak-Flächen quantifiziert. Die Integration der Flächeneinheiten erfolgt dimensionslos in Flächeneinheiten (AU = Area-Units).

Die jeweilige Amplifikatmenge wird prozentual zu der Menge des Aktin-Amplifikats berechnet. Das Strukturprotein Aktin dient als interner Standard, da es weder durch Zelldifferenzierung noch durch Nikotinsäure beeinflusst wird. Unvermeidliche Schwankungen der mRNA-Extraktion können somit kompensiert werden (siehe Abbildung 11).

Für die Versuche mit PBMCs stand für die PCR ein Real-time Cycler zur Verfügung (iCycler, Biorad). Die spezifischen Amplifikate werden mit Fluoreszenz detektiert (SybrGreen I, Molecular Probes) und die Rezeptorenexpression prozentual auf die β -Aktin Expression in derselben Zellextraktion bezogen ¹¹⁶.

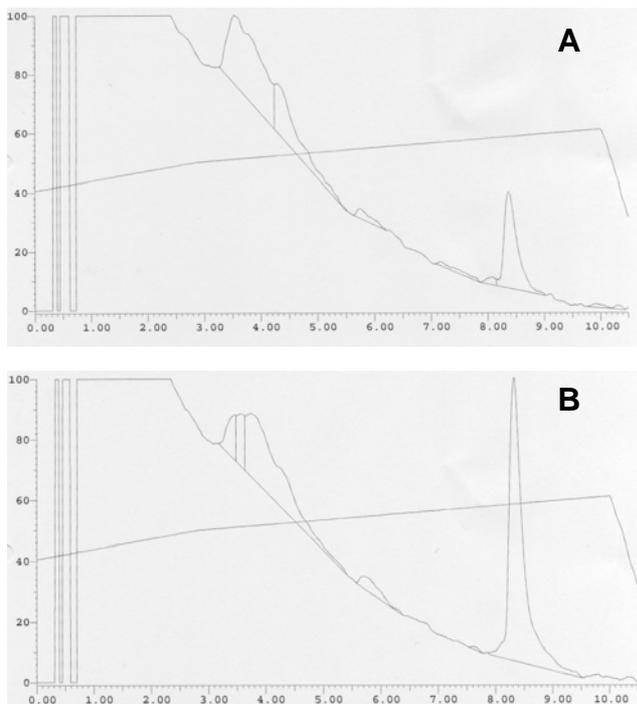


Abb. 11: Repräsentative HPLC-Chromatogramme, hier als Beispiel PCR-Produkte von PPAR γ nach RT-PCR, isoliert aus MM6sr-Zellen. Kontrollzellen behandelt mit PBS (**A**) und Zellen nach 3 h Nikotinsäureinkubation (**B**). Dargestellt sind die „dot-plots“ der entsprechenden Analysen. Die Integration der Peak-Flächen erfolgt dimensionslos in Flächeneinheiten (AU = Area-Units).

3.2.4 Durchflusszytometrie-Analytik

Mit der Durchflusszytometrie (fluorescence activated cell scan; FACS) kann an Einzelzellen in Suspension Fluoreszenz gemessen werden.

Zur Markierung werden direkt antigenbindende fluoreszierende Antikörper verwendet oder alternativ fluoreszierende Antikörper die gegen antigenbindende, nicht-fluoreszierende Antikörper gerichtet sind. In dieser Arbeit werden FITC-markierte Antikörper für die Bestimmung von CD36 und PPAR γ auf bzw. in MM6sr Zellen verwendet.

Die mittels Laser ausgelöste Fluoreszenz kann von spontanen Fluoreszenzeigenschaften der Zelle klar abgegrenzt werden. Durch Festlegung einer Durchlasseinschränkung (Umgrenzung eines gate) werden Zellfragmente von der Messung ausgeschlossen. In jeder Analyse werden 10.000 gatede Zellen gezählt und ausgewertet.

Durch die Intensität des Streulichts und deren Ablenkung können Erkenntnisse über Zellgröße (Forward-Scatter = FSC; kleinste Unterscheidung 0,5 μm) und Granularität (Sideward-Scatter = SSC) gewonnen werden.

Mit der Immunfluoreszenz können sowohl Bindungsstellen auf der Zelloberfläche als auch intrazelluläre quantifiziert werden. Bei der Messung intrazellulärer Antigene muss die Zelle vor der Antikörpermarkierung permeabilisiert werden.

Um die Spezifität des Antikörpers sicher zu stellen, wird zu jeder Probe eine Isotyp-Kontrolle des betreffenden Antikörpers parallel durchgeführt. Mit diesen kontrolliert man die unspezifische Bindung an alle Oberflächenmoleküle, die eine Affinität zu der Antikörper-Familie aufweisen, ohne mit dem gesuchten Epitop übereinzustimmen.

Durch die Verdünnung und Fixierung der Proben vor dem Messen mit 200 μL Paraformaldehyd-Lösung (2 % PFA in PBS) kann eine optimal Flussrate von 1000 bis 1500 Zellen pro Sekunde erreicht werden.

Die spezifische Bindung berechnet sich aus der Differenz der Fluoreszenz-Mittelwerte (mean) von monoklonalem spezifischen Antikörper und Isotyp (siehe Abbildung 12).

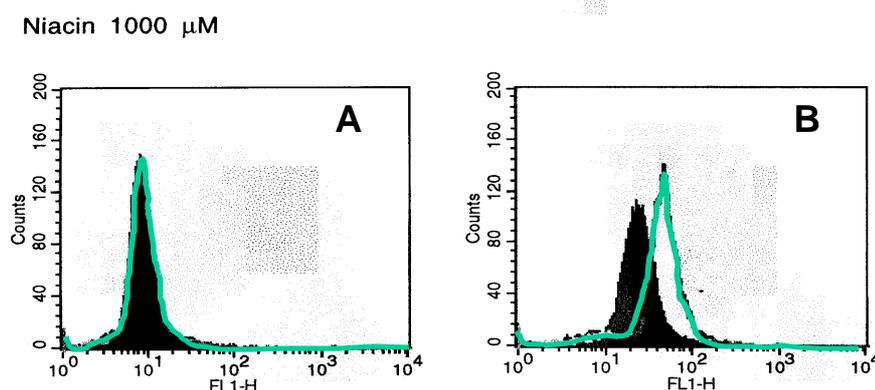


Abb. 12: Repräsentative FACS-Histogramme. Schwarzer Peak MM6sr-Kontrollzellen (nach Gabe von PBS), grüne Peaks MM6sr-Zellen nach 3 h Inkubation mit 1 mM Nikotinsäure. **(A)** Darstellung der Bindung des Isotyps Mouse IgG₁ kappa (MOPC 21). **(B)** Darstellung der Bindung von Anti-mouse FITC-Ak Goat F(ab')₂ Ig fragment am PPAR γ -IgG₁ mouse monoklonal Ak (E-8) in der MM6sr-Zellen.

3.2.4.1 Bestimmung der CD36-Oberflächenexpression mittels FACS

Nach der Behandlung der MM6sr-Zelle mit 1 mM Nikotinsäure (siehe Kap. 3.1.6), werden 10^6 Zellen pro Behandlung ausgezählt, abzentrifugiert (800 rpm/ 20 °C/ 4 min) einmal mit 1 mL 10facher Hanks´ Balanced Salt Solution (HBSS) plus 0,5 % bovines Serumalbumin (BSA) gewaschen und erneut zentrifugiert (800 rpm/ 20 °C/ 4 min). Bei allen weiteren Schritten wird auf Eis gearbeitet um eine Internalisierung des Oberflächenrezeptors zu vermeiden.

Zur Blockierung unspezifischer Bindungen am F_c -Rezeptoren werden die Zellen mit 500 μ L HBSS plus 5,0 % Humanserum (HS) über 30 min bei 4 °C inkubiert.

Nach Ende der Inkubation werden 500 μ L HBSS plus 0,5 % BSA zugeben und abzentrifugiert (800 rpm/ 20 °C/ 4 min). Die blockierten Zellen können nun resuspendiert in 400 μ L HBSS plus 0,5 % BSA auf zwei Wells einer 96 Well-Platte verteilt werden (200 μ L/ well, $0,5 \times 10^6$ Zellen/ Well). Nach Zentrifugation (1200 rpm/ 4 °C/ 4 min) wird einmalig mit 200 μ L HBSS plus 0,5 % BSA (1200 rpm/ 4 °C/ 4 min) gewaschen.

Es folgt die Inkubation der Probe mit 1:20 verdünntem (gelöst in 50 μ L HBSS + 0,5 % BSA) primären Antikörper (Mouse Anti-Human CD36 FA6-152 Klon IgG) bzw. Isotyp (Mouse IgG₁ kappa [MOPC 21]) für 30 min bei 4°C.

Nach Zugabe von 150 μ L HBSS plus 0,5 % BSA und Abzentrifugieren (1200 rpm/ 4 °C/ 4 min) wird die Platte zweimal gewaschen (200 μ L HBSS + 0,5 % BSA; 1200 rpm/ 4 °C/ 4 min).

Danach wird mit dem sekundären Antikörper (Anti-mouse FITC-Ak Goat F(ab')₂ Ig fragment) in einer Verdünnung 1:25 (gelöst in 50 μ L HBSS + 0,5 % BSA) für 30 min inkubiert. Dieser bindet sowohl am monoklonalen Antikörper als auch am Isotyp. Um die Fluoreszenz des sekundären Antikörpers bis zur FACS-Messung zu erhalten, werden die weiteren Schritte unter Lichtschutz durchgeführt.

Nach Zugabe von 150 μ L HBSS plus 0,5 % BSA und Abzentrifugieren (1200 rpm/ 4 °C/ 4 min), wird die Platte noch zweimal gewaschen. Es folgt eine Fixierung der Zellen mit 200 μ L Paraformaldehyd-Lösung (2 % PFA in PBS) und eine Überführung der Proben in die FACS-Röhrchen. Mit der FACS-Messung kann begonnen werden.

3.2.4.2 Messung der PPAR γ - Expression mittels FACS

Der PPAR γ ist ein intrazellulärer Rezeptor. Aus diesem Grund müssen die Zellen vor der Antikörper-Markierung fixiert und permeabilisiert werden. Da bei diesem Schritt Zellen leicht beschädigt werden, ist eine größere Anzahl von Zellen einzusetzen. Nach der Behandlung der MM6sr-Zelle (siehe unter 3.2.2) werden $1,5 \times 10^6$ Zellen pro Behandlung ausgezählt, abzentrifugiert (800 rpm/ 20 °C/ 4 min) und einmal mit 1 mL PBS gewaschen (800 rpm/ 20 °C/ 4 min). Es folgt eine Fixierung der Zellen mit 1 mL 2 % PFA in PBS über 30 min bei Raumtemperatur.

Zur Permeabilisierung werden die Zellen 1 min mit 500 μ L eiskaltem Aceton/Methanol (Mischungsverhältnis 1:1) behandelt. Danach werden sofort 5 mL PBS zur Neutralisierung zugegeben und abzentrifugiert (800 rpm/ 20 °C/ 4 min). Vor bzw. nach dem Permeabilisieren der Zellen wird jeweils zweimal mit 1 mL PBS bzw. 1 ml PBS plus 1.5 % HS gewaschen (800 rpm/ 20 °C/ 4 min). Anschließend wird die unspezifische Bindung mit 500 μ l PBS plus 10 % HS für 30 min bei Raumtemperatur geblockt.

Nach Ende der Inkubation, werden die geblockten Zellen abzentrifugiert (800 rpm/ 20 °C/ 4 min) in 400 μ L PBS plus 1,5 % HS resuspendiert und auf Wells verteilt (200 μ l/well, ca. $0,75 \times 10^6$ Zellen/well). Die folgenden Schritte entsprechen denen der Messung des Oberflächenrezeptors CD36. Einziger Unterschied ist das Arbeiten bei Raumtemperatur und das Waschen mit PBS plus 1.5 % HS.

Als Antikörper kommen zur Verwendung: der monoklonale PPAR γ -Antikörper (PPAR γ -IgG₁ mouse monoclonal Ak [E-8]) und als Isotyp (Mouse IgG₁ kappa [MOPC 21]) die 1:40 verdünnt werden (gelöst in 50 μ L PBS plus 1.5 % HS).

Als sekundärer Antikörper wird in einer Verdünnung 1:25 (gelöst in 50 μ L PBS plus 1,5 % HS) der Ziege anti-Maus Antikörper (Anti-mouse FITC-Ak Goat F(ab')₂ Ig fragment) verwendet.

3.2.4.3 Messung apoptotischer Zellen mit Annexin V

Zur Kontrolle der Zell-Toxizität unterschiedlicher Nikotinsäurekonzentrationen wird eine FACS-Messung mit fluoreszenz-markiertem Annexin V durchgeführt. Tritt eine Zelle in Apoptose, führt dies unter anderem zu einer Umverteilung von Phospholipiden in der Zellmembran, mit Anstieg von Phosphatidylserin auf der Außenseite. Dies ist für die Erkennung und Entfernung apoptotischer Zellen durch Makrophagen von

Bedeutung. Fluoreszenz-markiertes Annexin V kann an Phosphatidylserin binden und ist somit ein etablierter Marker zum Nachweis apoptotischer Zellen ⁷².

In der vorliegenden Arbeit werden $2,0 \times 10^5$ Zellen in 500 μL Medium in einem 1,5 mL Cup einmal mit 1 mL PBS gewaschen und abzentrifugiert (800 rpm/ 4°C/ 5 min). Pro Behandlung werden 178 μL PBS, 20 μL Annexin V-Binding Buffer (10x Concentrate) und 2 μL Annexin V-FITC als Mix vorbereitet. Das Zellpellet wird mit 100 μL PBS resuspendiert und anschließend mit 200 μL Mix versetzt. Es wird für 20 min auf Eis im Dunkeln inkubiert. In der folgenden FACS Messung wird der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen ermittelt ³⁸.

3.2.5 Cholesterin - Effluxversuche

Für die Cholesterin - Effluxversuche werden oxidiertes LDL (oxLDL) ¹²⁷ und delipidiertes HDL (dHDL) ¹⁰⁴ benötigt. Diese werden vor den Effluxversuchen präpariert.

Für die Versuche (Überblick über zeitlichen Ablauf des Versuches siehe Abbildung 13) werden 10^6 MM6sr Zellen anfangs und erneut nach 24 h mit 1 mM Nikotinsäure oder PBS (als Kontrolle) stimuliert. Beim Zeitpunkt der zweiten Stimulation werden außerdem die Zellen mit 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ oxLDL inkubiert. Nach 72 h werden die Zellen gewaschen und anschließend für 24 h mit 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ dHDL inkubiert. 96 h nach Versuchsbeginn folgt das Abzentrifugieren der Zellen und Cholesterinextraktion mit anschließender Messung der intrazellulären Cholesterinkonzentration mittels eines Enzymassays ¹¹⁶.

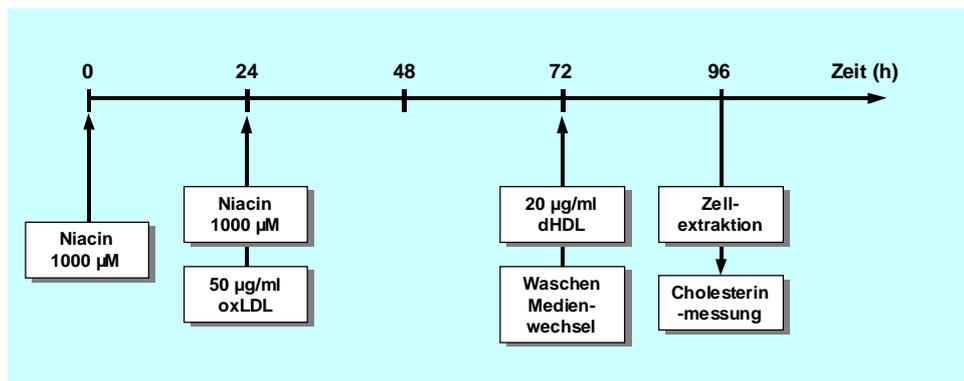


Abb. 13: Zeitlicher Ablauf der Effluxversuche

3.2.5.1 Die Präparation des low-density Lipoprotein und Oxidierung zu oxLDL

Zur LDL-Präparation (modifiziert nach Schulz ¹²⁷) wird 80 mL Vollblut von gesunden Spendern verwendet. Die Spender waren frei von Medikamenten, nüchtern, Nicht-raucher und mit normalen Plasma-Lipidspiegeln. Dieses wird in zwei 50 mL Spritzen aufgenommen, in denen jeweils 2,0 mL EDTA enthalten sind.

Das Plasma wird zentrifugiert (3000 rpm/ 10 °C/ 10 min), der Überstand abpipettiert und in einem 50 mL Cup, das mit Aceton und H₂O vorgespült ist, gesammelt. Weiter werden 5 mL Plasma in 6 UZ-Röhrchen (mit Aceton und H₂O vorgespült) gefüllt, austariert und danach zentrifugiert (13.000 rpm/ 10 °C/ 13 min).

Aus den UZ-Röhrchen werden jeweils 4,5 mL Plasma entnommen und in vorbereitete 50 mL Cups gegeben, in denen 11,07 g Kaliumbromid enthalten sind. Danach wird vorsichtig gemischt und 4 mL in ein UZ-Röhrchen (mit Aceton und H₂O vorgespült) überführt.

Anschließend werden die Dichtegradientenlösungen (zur Herstellung der Dichtegradientenlösungen siehe 3.1.6) zugefügt: Jeweils 3 mL von D1 und D2, 2 mL von D3.

Das LDL wird durch sequentielle Ultrazentrifugation (150.000 rpm/ 10°C/ 20 h) nach dem Prinzip von Havel in dem Intervall von 1,019 bis 1,063 g/mL Dichtegradient isoliert⁵¹. Das von HDL und LDL gereinigte LDL wird dialysiert, um die Salze zu entfernen. Danach wird das LDL sterilfiltriert und mit N₂ begast, um Oxidation zu verhindern und bei 4°C unter Lichtausschluss aufbewahrt und innerhalb von 4 Wochen verwendet.

Die Oxidation des LDL wird mit Kupfersulfat durchgeführt, wobei vorher ein Dialyse-schritt notwendig ist, um den Komplexbildner EDTA - der die Kupferionen abfangen würde - zu entfernen. Das LDL wird mit einer Proteinkonzentration von 200 µg/mL über 20 h bei 37°C in Gegenwart von CuSO₄ oxidiert. Die Reaktion wird mit EDTA (0,24 mM) gestoppt.

3.2.5.2 Lipoproteinbestimmung

Die Messung der Lipoproteinkonzentration erfolgt durch photometrische Messung der Apolipoproteine (nach Lowry⁸³).

Hierzu werden zu 1 mL Probevolumen 3 mL Lösung C gegeben, gevortext und anschließend 300 µL Lösung D gemischt (Herstellung der Lösungen siehe 3.1.6).

Es folgt eine Inkubation von 45 min bei Raumtemperatur. Vor der photometrischen Messung gegen den Leerwert (1 mL Aqua dest.) bei 660 nm wird die Probe im kalten Wasserbad abgekühlt. Es werden Doppelwerte gemessen, wobei 10 µL Probe in 990 µL H₂O und 20 µL Probe in 980 µL H₂O gelöst werden. Mit dem Dialysepuffer wird auf das eingesetzte Lipoprotein-Ausgangsvolumen aufgefüllt.

3.2.5.3 Die Delipidierung von high-density Lipoprotein

Zur Delipidierung des HDL (nach Osborne für wässrige Proben ¹⁰⁴), werden 250 µL Plasmalipoproteinlösung (HDL) langsam und tröpfchenweise in 3 mL Methanol (100 % absolut, 4°C) gegeben, der auf dem Vortex geschüttelt wird.

Anschließend werden 7 mL Diethylether (gekühlt bei 0°C) zugegeben und für 10 min auf Eis inkubiert. Es folgt eine Zentrifugation (1000 rpm/ 4°C/ 4 min) und ein Absaugen des Überstandes.

Danach wird während das Gemisch gevortext wird, erneut 10 mL Diethylether hinzugeben und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend folgt eine Zentrifugation (1000 rpm/ 4°C/ 4 min) und eine Entfernung des Überstandes durch Absaugen.

Der Ether wird mit Stickstoff abgeblasen und das zurückbleibende delipidierte HDL mit 250 µL Resolubilisierungs-Lösung wieder aufgelöst (siehe 3.1.6). Nach einer sterilen Filtration wird das delipidierte HDL bei 4°C lichtgeschützt aufbewahrt.

3.2.5.4 Die Messung des zellulären Gesamtcholesterins

Für die Gesamtcholesterin-Extraktion (modifiziert nach Folch ¹¹⁶) werden ca. 8-10 Mio. MM6sr Zellen pro Ansatz in einem 15 mL Falcon Röhrchen gesammelt. Die Röhrchen werden zentrifugiert (800 rpm/ 4°C/ 5 min) und der Überstand in ein neues 15 mL Röhrchen überführt.

Anschließend wird 200 µL Methanol (4°C) zugeben und das Gemisch gevortext. Jeweils nach der Zugabe von 1,2 mL Chloroform (4°C) und 450 µL 0,88 % KCl (4°C) wird 200 µL Methanol (4°C) zugeben und intensiv geschüttelt. Es folgt eine Zentrifugation (3000 rpm/ 4°C/ 2 min), nach der die obere Phase (ca. 900 µL) abgenommen und verworfen wird.

Es werden 163 µL Methanol und 163 µL 0,88 % KCl zugeben und gevortext. Mit einer Pipettenspitze wird die untere Phase (800 - 1000 µL) aufgenommen und in ein 2 mL Cup überführt.

In einer Vakuum-Zentrifuge wird das in dem 2 mL Cup enthaltene Chloroform-Methanol Gemisch über 30 - 40 min Zentrifugation verdampft und so das Gesamtcholesterin aufkonzentriert.

Auf das getrocknete Pellet werden 25 µL eines Isopropanol/Dioxan-Gemisch (1:1) gegeben und leicht gevortext. Das Dioxan wird zuvor durch Durchlaufen aluminiumhaltige Säulchen (Chromsystems) von Peroxiden befreit.

Nach kurzer Zentrifugation werden 10 μL in eine Plastik-Küvette geben, zu dem 1 μL Cholesterin-Assay/Kit gemischt werden. Es folgt eine 10 minütige Inkubation bei 25°C mit anschließender photometrischen Messung von Doppelwerte bei 546 nm (Enzymatischer Farbtest zur Gesamtcholesterinbestimmung; Fa. Rolf Greiner).

3.2.6 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Die Versuchsanzahl n ist in der jeweiligen Legende angegeben. Die statistische Signifikanz wurde bei Normalverteilung mittels zweiseitigem Student's T-Test. Bei Versuchsreihen mit Zellen aus Zelllinien wurde diese unverbunden errechnet, bei Versuchen mit Zellen von Probanden wurden diese entsprechend verbunden ermittelt. Die Irrtumswahrscheinlichkeit p ist in den Abbildungen wie folgt angezeigt:

$p \leq 0,05$	=	*
$p \leq 0,01$	=	**
$p \leq 0,005$	=	***

4 ERGEBNISSE

4.1 Ergebnisse der Annexin V Messung

In Inkubationen mit Nikotinsäure wurde die Zelltoxizität steigender Konzentrationen ermittelt. Nach Zugabe von Annexin V-FITC zu den vorbehandelten MM6sr-Zellen kommt es zu einer Markierung apoptotischer Zellen. Mittels FACS konnte eine Quantifizierung durchgeführt werden ⁷².

Als Anhalt für den zu prüfenden Konzentrationsbereich dienten publizierte pharmakologische Untersuchungen, bei denen nüchterne Plasmaspiegel von Nikotinamid - einem Derivat der Nikotinsäure - von 0,218 mM bis 0,464 mM gemessen wurden ¹⁰⁷. Die MM6sr Zellen wurden mit 0,5 mM, 1 mM, 2 mM, 3 mM und 5 mM Nikotinsäure für 48 Stunden inkubiert. Wie in Abbildung 14 gezeigt, stieg die Bindung des Annexin V selbst bei einer Inkubation mit 5 mM Nikotinsäure nicht an.

Für die folgenden Versuche wurde eine Konzentration von 1 mM Nikotinsäure gewählt, die somit keine erkennbaren toxischen Effekte hatte.

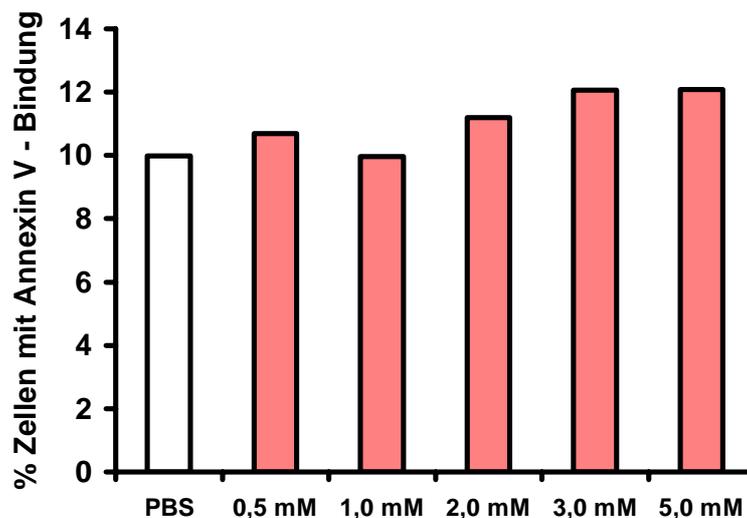


Abb. 14: Prozentualer Anteil der MM6sr Zellen mit Annexin V Bindungen unterschiedlicher Nikotinsäurekonzentrationen. Weißer Balken entsprechen der Kontrolle mit PBS, rote Balken mit Nikotinsäurekonzentrationen von 0,5 mM, 1,0 mM, 2,0 mM, 3,0 mM und 5,0 mM. (n = 2).

4.2 Ergebnisse auf mRNA Ebene

Um den Effekt der Nikotinsäure auf der Ebene der Rezeptorentranskription zu untersuchen wurden sowohl MM6sr als auch HepG₂ Zellen für 3 Stunden beziehungsweise 48 Stunden mit 1 mM Nikotinsäure inkubiert. Die spezifischen mRNA-Konzentrationen von Lipid-Rezeptoren wurden mittels RT-PCR und HPLC analysiert. Als interner Standard wurde β -Aktin verwendet, ein zelluläres Strukturprotein, das von der

Zelldifferenzierung unabhängig und ohne erkennbare Beeinflussung durch Nikotinsäurebehandlung gebildet wurde. Die Rezeptorenexpression wurde prozentual auf die β -Aktin Expression in derselben Zellextraktion bezogen.

4.2.1 Die Messungen der mRNA Expressionen in der MM6sr Zelle

Die MM6-Zelle ist als Makrophagenmodell akzeptiert ¹⁵⁴. Nach der Behandlung mit 1 mM Nikotinsäure wurde die mRNA Expression folgender Rezeptoren untersucht: CD36, PPAR γ , SR-BI, ABCA-1, LOX-1 und der LDL-Rezeptor.

Zur Erfassung früher und später Effekte wurden die mRNA Expression der MM6sr Zellen nach 3 und 48 Stunden Inkubation gemessen. Dies war deshalb von Interesse, weil gezeigt werden konnte, dass Prostaglandine bereits kurze Zeit nach Nikotinsäurebehandlung massiv vermehrt gebildet werden ⁹⁵. Um langsame Effekte der Nikotinsäure nicht zu übersehen, wurde außerdem der spätere Zeitpunkt gewählt.

4.2.1.1 Qualitative Überprüfung der Effekte der Nikotinsäurebehandlung auf MM6-Zellen

Vor der quantitativen Messung mittels HPLC, erfolgte eine qualitative Abschätzung durch Gelelektrophorese. Hierzu wurden Amplifikate mit Primern für PPAR γ , CD36, SR-BI und LDL-R gelelektrophoretisch getrennt und mit Ethidium - Bromid angefärbt. Verstärkte Banden konnten nach der Behandlung bei PPAR γ , CD36 und SR-BI beobachtet werden. Bei β -Aktin und LDL-R konnte kein Unterschied dargestellt werden (siehe Abbildung 15).

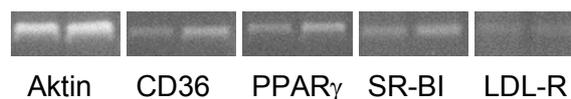


Abb. 15: Nikotinsäureeffekt auf die Transkription von β -Aktin, PPAR γ , CD36 und LDL-R. Darstellung der DNA-Banden im Ethidiumbromid Gel nach elektrophoretischer Auftrennung der spezifischen RT-PCR Amplifikate. MM6sr Zellen wurden 48 h mit 1 mM Nikotinsäure inkubiert. Kontrolle mit PBS (linke Banden) und Behandlung mit Nikotinsäure 1 mM (rechte Banden).

4.2.1.2 Die mRNA-Expression von CD36 in MM6sr Zellen

Die mRNA-Expression von CD36 nahm in MM6sr Zellen, im Vergleich zur Kontrollbehandlung mit PBS, nach 3 h Inkubation mit 1 mM Nikotinsäure signifikant um das etwa zweifache (Abbildung 16 A) und nach 48 h hoch signifikant um das etwa 2,5 fache zu (Abbildung 16 B).

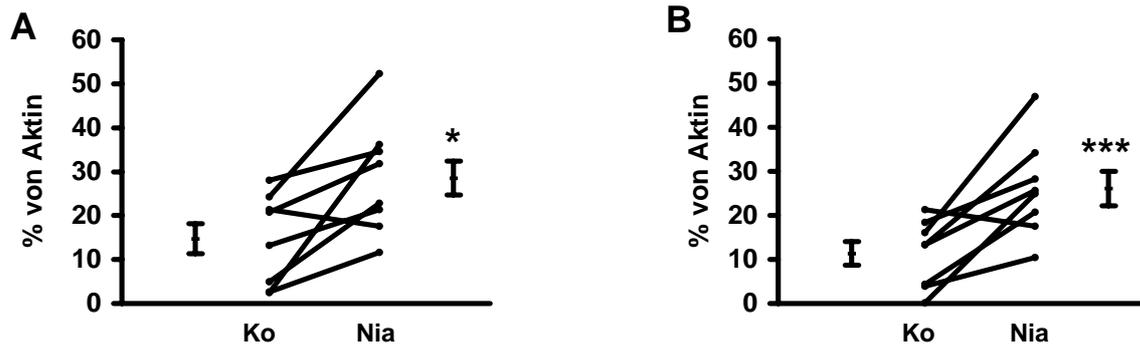


Abb. 16: Quantifizierung der CD36 mRNA nach 3 h (A) und 48 h (B) nach 1 mM Behandlung mit Nikotinsäure (Nia) und Kontrolle mit PBS (Ko) mittels HPLC in MM6sr Zellen. Darstellung der einzelnen Versuche prozentual zur jeweiligen β -Aktin Expression. Zusätzliche Darstellung der Mittelwerte \pm SEM. $n = 8$, * $p \leq 0.05$, *** $p \leq 0.001$.

4.2.1.3 Die mRNA-Expression von PPAR γ in MM6sr Zellen

Nach 3 h Behandlung mit Nikotinsäure konnte in MM6sr-Zellen auch ein signifikanter Anstieg um etwa das Doppelte der PPAR γ mRNA-Expression - im Vergleich zu parallel inkubierten Kontrollzellen - gemessen werden (siehe Abbildung 17 A). Dieser Effekt wurde nach 48 h noch deutlicher. Hier zeigte sich eine hoch signifikante Zunahme der mRNA Expression um das 3,5 fache (siehe Abbildung 17 B).



Abb. 17: Quantifizierung der PPAR γ mRNA nach 3 h (A) und 48 h (B) nach 1,0 mM Behandlung mit Nikotinsäure (Nia) und Kontrolle mit PBS (Ko) mittels HPLC in MM6sr Zellen. Darstellung der einzelnen Versuche prozentual zur jeweiligen β -Aktin Expression. Zusätzliche Darstellung der Mittelwerte \pm SEM. $n \geq 6$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

4.2.1.4 Die mRNA-Expression des LDL-R in MM6sr Zellen

Die mRNA-Expression des LDL-Rezeptors in MM6sr Zellen zeigte keine Veränderung nach Zugabe von 1 mM Nikotinsäure, weder nach 3 h (siehe Abbildung 18 A), noch nach 48 h (siehe Abbildung 18 B).

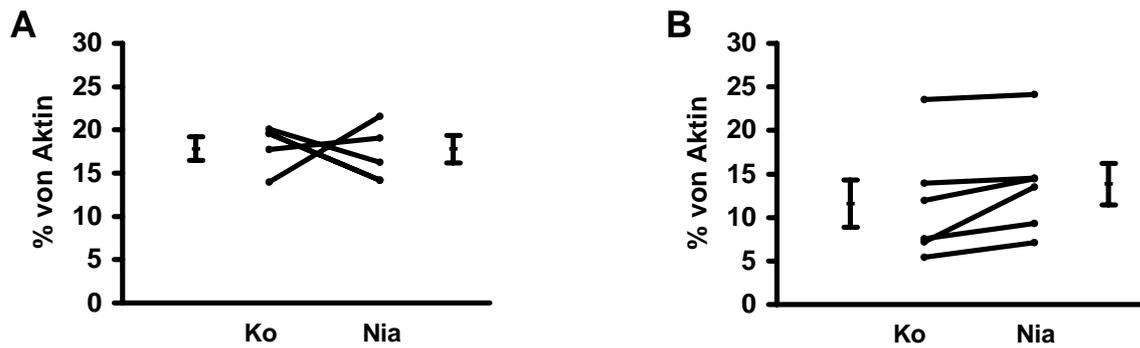


Abb. 18: Quantifizierung der LDL-R mRNA Expression nach 3 h (A) und 48 h (B) nach 1 mM Behandlung mit Nikotinsäure (Nia) und Kontrolle mit PBS (Ko) mittels HPLC in MM6sr Zellen. Darstellung der einzelnen Versuche prozentual zur jeweiligen β -Aktin Expression. Zusätzliche Darstellung der Mittelwerte \pm SEM. $n \geq 4$.

4.2.1.5 Die mRNA-Expression des Scavenger Rezeptors SR-BI in MM6sr Zellen

Bei der Messung der SR-BI mRNA Expression ergab sich ein biphasischer Verlauf. Einem anfänglichen signifikanten Anstieg der mRNA-Expression nikotinsäurestimulierter Zellen nach 3 h um das zweifache (siehe Abbildung 19 A), folgte eine signifikante Abnahme um die Hälfte nach 48 h (siehe Abbildung 19 B) gegenüber der Kontrollzellen.

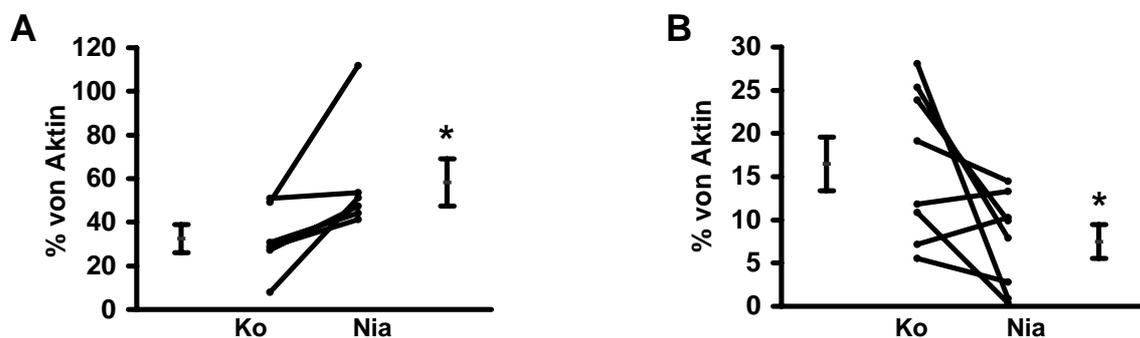


Abb. 19: Quantifizierung der SR-BI mRNA nach 3 h (A) und 48 h (B) nach 1 mM Behandlung mit Nikotinsäure (Nia) und Kontrolle mit PBS (Ko) mittels HPLC in MM6sr Zellen. Darstellung der einzelnen Versuche prozentual zur jeweiligen β -Aktin Expression. Zusätzliche Darstellung der Mittelwerte \pm SEM. $n \geq 6$, * $p \leq 0.05$.

4.2.1.6 Die mRNA-Expression des Cholesterin-Transporters ABCA-1 in MM6sr Zellen

Bei der Messung der mRNA-Expression des ABCA-1 konnte nach 3 h eine Zunahme um etwa das Doppelte gemessen werden (siehe Abbildung 20 A). Auch nach 48 h war im Vergleich zur Kontrollzelle eine signifikante Mehrexpression des ABCA-1 auf im Mittel mehr als das zweifache zu beobachten (siehe Abbildung 20 B).

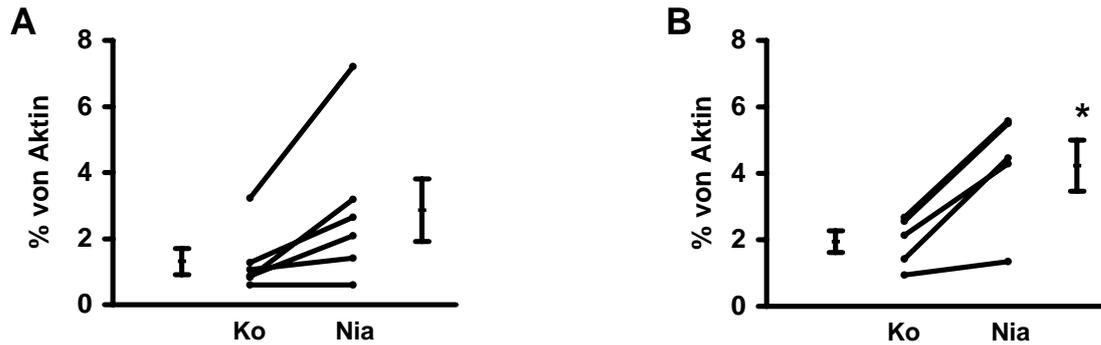


Abb. 20: Quantifizierung der ABCA-1 mRNA nach 3 h (A) und 48 h (B) nach 1 mM Behandlung mit Nikotinsäure (Nia) und Kontrolle mit PBS (Ko) mittels HPLC in MM6sr Zellen. Darstellung der einzelnen Versuche prozentual zur jeweiligen β -Aktin Expression. Zusätzliche Darstellung der Mittelwerte \pm SEM. $n \geq 5$, * $p \leq 0.05$.

4.2.1.7 Die mRNA-Expression des Scavenger Rezeptors LOX-1 in MM6sr Zellen

Die mRNA-Expression von LOX-1 veränderte sich in MM6sr Zellen weder nach 3 h Inkubation mit 1 mM Nikotinsäure, noch nach 48 h signifikant (siehe Abbildung 21 A bzw. 21 B).



Abb. 21: Quantifizierung der LOX-1 mRNA nach 3 h (A) und 48 h (B) nach 1 mM Behandlung mit Nikotinsäure (Nia) und Kontrolle mit PBS (Ko) mittels HPLC in MM6sr Zellen. Darstellung der einzelnen Versuche prozentual zur jeweiligen β -Aktin Expression. Zusätzliche Darstellung der Mittelwerte \pm SEM. $n \geq 3$.

4.2.2 Nikotinsäure-Effekte in HepG₂ Zellen

Nach der Wirkung von Nikotinsäure auf Lipoproteinrezeptoren im Makrophagenmodell wurden als Modell für den hepatischen Stoffwechsel von Lipoproteinen zusätzlich HepG₂ Zellen untersucht⁶¹. Wie die MM6sr Zellen wurden diese hepatischen Zellen mit 1 mM Nikotinsäure für 3 Stunden und 48 Stunden inkubiert.

Zusätzlich zu den schon in MM6sr Zellen gemessenen Rezeptorenexpressionen wurde die Bildung der Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEPCK) bestimmt. Die PEPCK, die vom Monozyten/Makrophagen nicht exprimiert wird, ist in Hepatozyten ein Schlüsselenzym der Gluconeogenese¹³⁴. Bekannt war, dass nach Nikotinsäuregabe die Expression der PEPCK ansteigt⁹³.

4.2.2.1 Die mRNA-Expression von CD36 in HepG₂ Zellen

Die mRNA-Expression von CD36 nahm in HepG₂-Zellen nach 48 h Inkubation mit 1 mM Nikotinsäure signifikant um etwa das Doppelte zu (siehe Abbildung 22).

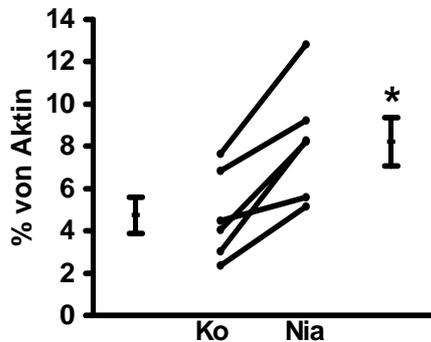


Abb. 22: Quantifizierung der CD36 mRNA nach 48 h nach 1 mM Behandlung mit Nikotinsäure (Nia) und Kontrolle mit PBS (Ko) in HepG₂ Zellen. Darstellung der einzelnen Versuche prozentual zur jeweiligen β -Aktin Expression. Zusätzliche Darstellung der Mittelwerte \pm SEM. n = 6; * p \leq 0,05.

4.2.2.2 Die mRNA-Expression von PPAR γ in HepG₂ Zellen

Die Messung der PPAR γ mRNA-Expression zeigte einen geringen frühen Anstieg auf das 1,4 fache nach 3 h Nikotinsäurestimulation (Abbildung 23 A). Dieser Effekt war nach 48 h bereits vollständig abgeklungen (Abbildung 23 B).

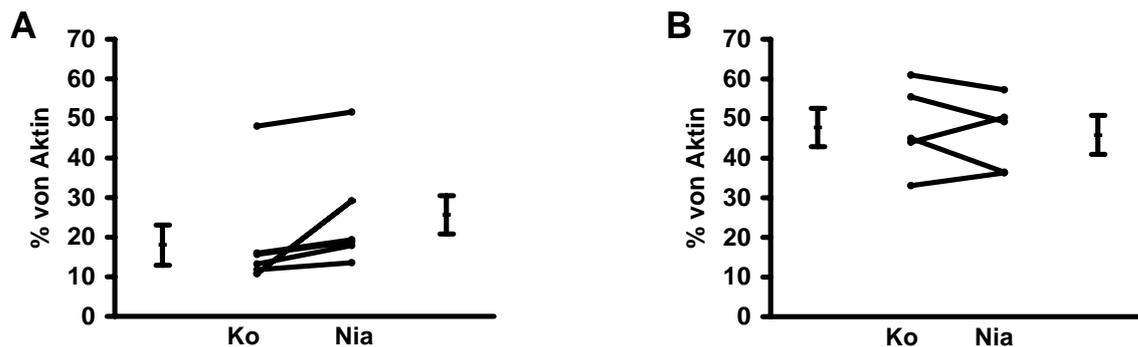


Abb. 23: Quantifizierung der PPAR γ mRNA nach 3 h (A) und 48 h (B) nach 1 mM Behandlung mit Nikotinsäure (Nia) und Kontrolle mit PBS (Ko) mittels HPLC in HepG₂ Zellen. Darstellung der einzelnen Versuche prozentual zur jeweiligen β -Aktin Expression. Zusätzliche Darstellung der Mittelwerte \pm SEM. n = 5.

4.2.2.3 Die mRNA-Expression des LDL-R in HepG₂ Zellen

Die Stimulation mit 1 mM Nikotinsäure zeigte im Vergleich zur Kontrolle mit PBS keinen systematischen Effekt auf die Expression des LDL-Rezeptors, weder nach 3 h Inkubation (Abbildung 24 A), noch nach 48 h (Abbildung 24 B).

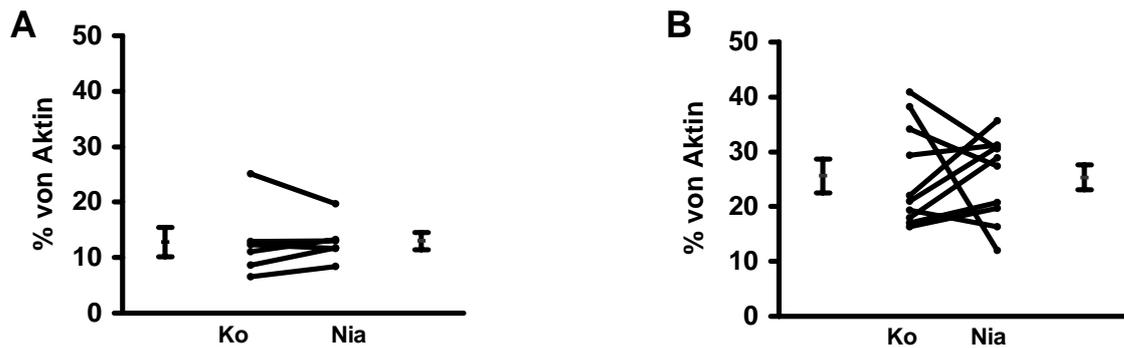


Abb. 24: Quantifizierung der LDL-R mRNA nach 3 h (A) und 48 h (B) nach 1 mM Behandlung mit Nikotinsäure (Nia) und Kontrolle mit PBS (Ko) mittels HPLC in HepG₂ Zellen. Darstellung der einzelnen Versuche prozentual zur jeweiligen β-Aktin Expression. Zusätzliche Darstellung der Mittelwerte ± SEM. n ≥ 6.

4.2.2.4 Die mRNA-Expression des SR-BI in HepG₂ Zellen

Bei der Untersuchung der SR-BI Expression konnte nach 3 h eine Tendenz zur Abnahme nach Nikotinsäurestimulation gemessen werden (Abbildung 25 A). Nach 48 h zeigte sich keine Veränderung der mRNA Expression (Abbildung 25 B).

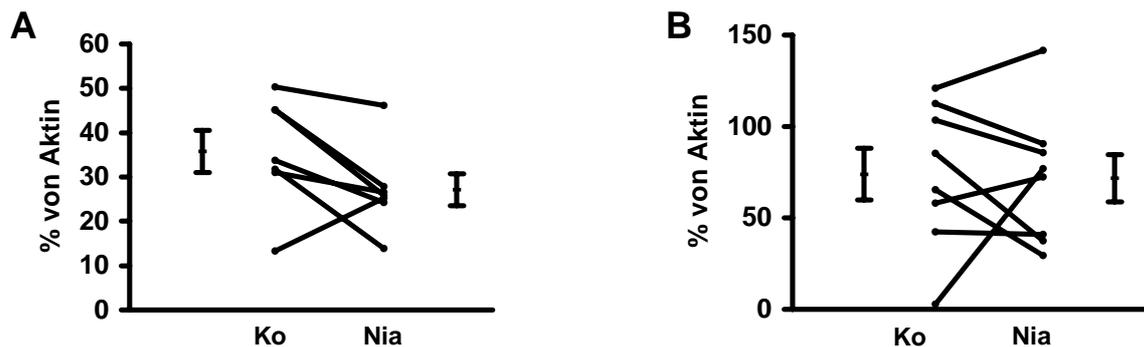


Abb. 25: Quantifizierung der SR-BI mRNA nach 3 h (A) und 48 h (B) nach 1 mM Behandlung mit Nikotinsäure (Nia) und Kontrolle mit PBS (Ko) mittels HPLC in HepG₂ Zellen. Darstellung der einzelnen Versuche prozentual zur jeweiligen β-Aktin Expression. Zusätzliche Darstellung der Mittelwerte ± SEM. n ≥ 7.

4.2.2.5 Die mRNA-Expression des ABCA-1 in HepG₂ Zellen

Ein signifikanter Anstieg der ABCA-1 mRNA-Expression nach Nikotinsäuregabe war schon frühzeitig nachweisbar. Nach 3 h kam es zu einer signifikanten Zunahme um das 2,5 fache (Abbildung 26 A). Diese Stimulation war nach 48 h weiterhin nachzuweisen, hier bestand noch ein hoch signifikanter Anstieg auf das 1,5 fache (Abbildung 26 B).

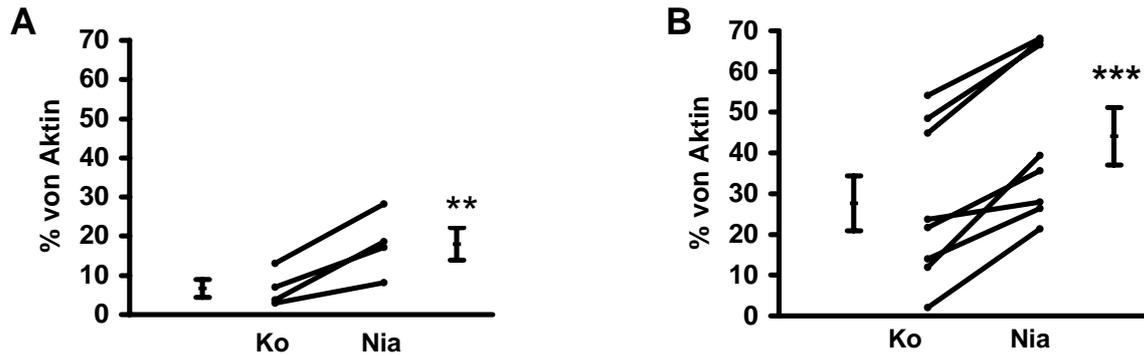


Abb. 26: Quantifizierung der ABCA-1 mRNA nach 3 h (A) und 48 h (B) nach 1 mM Behandlung mit Nikotinsäure (Nia) und Kontrolle mit PBS (Ko) mittels HPLC in HepG₂ Zellen. Darstellung der einzelnen Versuche prozentual zur jeweiligen β -Aktin Expression. Zusätzliche Darstellung der Mittelwerte \pm SEM. $n \geq 4$, ** $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

4.2.2.6 Die mRNA-Expression von LOX-1 in HepG₂ Zellen

Die mRNA-Expression von LOX-1 blieb in HepG₂-Zellen nach 48 h Inkubation mit 1 mM Nikotinsäure unverändert (siehe Abbildung 27).

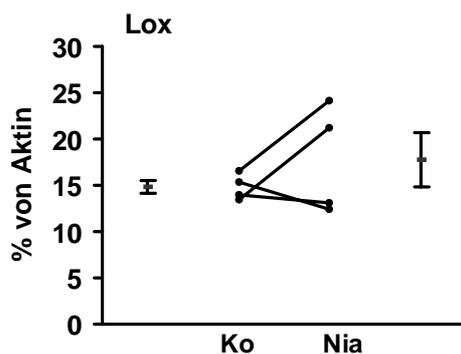


Abb. 27: Quantifizierung der LOX-1 mRNA nach 48 h nach 1,0 mM Behandlung mit Nikotinsäure (Nia) und Kontrolle mit PBS (Ko) mittels HPLC in HepG₂ Zellen. Darstellung der einzelnen Versuche prozentual zur jeweiligen β -Aktin Expression. Zusätzliche Darstellung der Mittelwerte \pm SEM. $n = 4$.

4.2.2.7 Die mRNA-Expression der PEPCK in HepG₂ Zellen

Zur Kontrolle wurde die Expression der in Leberzellen gebildeten PEPCK untersucht. Nach 3 h Nikotinsäurestimulation war keine Veränderung der mRNA Expression messbar (Abbildung 28 A). Erst nach 48 h war eine tendenzielle Zunahme um das 1,7 fache zu beobachten (Abbildung 28 B).

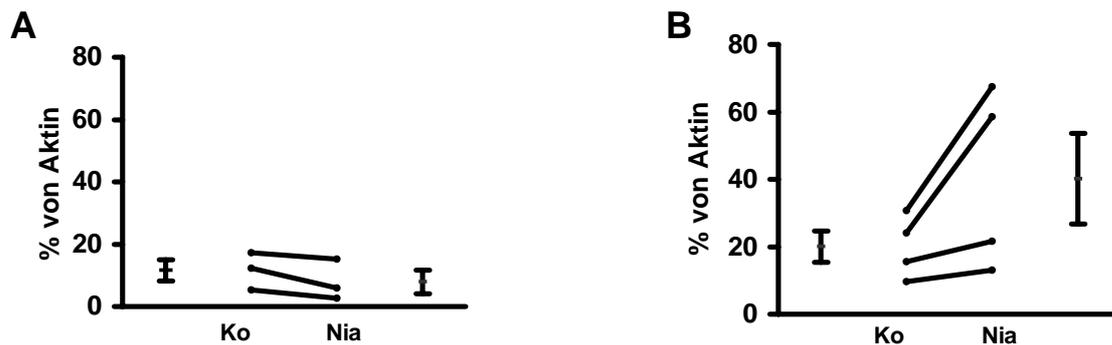


Abb. 28: Quantifizierung der PEPCK mRNA nach 3 h (A) und 48 h (B) nach 1 mM Behandlung mit Nikotinsäure (Nia) und Kontrolle mit PBS (Ko) mittels HPLC in HepG₂ Zellen. Darstellung der einzelnen Versuche prozentual zur jeweiligen β-Aktin Expression. Zusätzliche Darstellung der Mittelwerte ± SEM. n ≥ 3.

4.2.3 Die Messungen der CD36 – und ABCA-1 – mRNA – Expressionen in PBMCs

Um neben den Ergebnissen mit den permanenten Zelllinien MM6sr und HepG₂ auch Erkenntnisse über das Verhalten peripherer humaner mononukleärer Zellen zu erlangen, wurden zusätzlich Versuche mit frisch präparierten PBMCs durchgeführt. Diese wurden aus dem Blut von vier gesunden Spendern isoliert und für 3 Stunden mit 1 mM Nikotinsäure inkubiert. Anschließend wurde mittels RT-PCR und HPLC die mRNA Expression von CD36 und ABCA-1 bestimmt.

Hierbei fand sich ein vergleichbares Spektrum der Effekte auf die bereits in MM6sr Zellen untersuchten Rezeptoren. Sowohl die CD36 als auch die ABCA-1 mRNA Expression stieg nach Behandlung bei allen Spendern an (siehe Abbildung 29). Somit waren auch nicht maligne transformierte Monozyten/Makrophagen durch Nikotinsäure ganz ähnlich wie MM6 Zellen beeinflussbar.

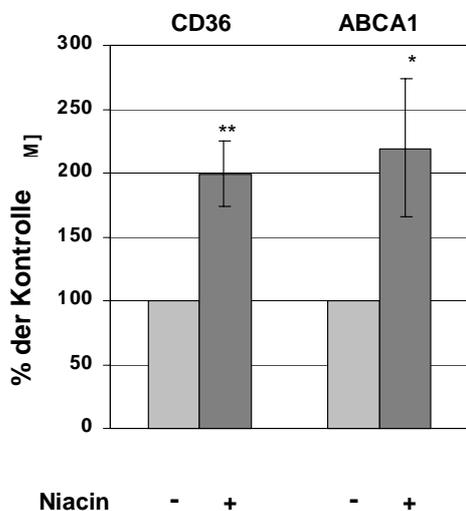


Abb. 29: Quantifizierung der CD36 mRNA (links) und ABCA-1 mRNA (rechts) nach 1 mM Behandlung mit Nikotinsäure (+) und Kontrolle mit PBS (-) mittels quantitativer RT-PCR in PBMC nach 3 Stunden Inkubation. Prozentuale Darstellung zur Kontrolle. Zusätzliche Darstellung der Mittelwerte ± SEM. n = 8, * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01.

4.3 Ergebnisse auf Ebene der Proteinexpression

Neben der Untersuchung der mRNA-Expressionen, wurde die Auswirkung einer 3 stündigen Inkubation mit Nikotinsäure auf die PPAR γ und CD36 Proteinsynthese in MM6sr Zellen untersucht. Hierzu wurden die Expression von PPAR γ in den hierfür permeabilisierten Zellen (siehe Abbildung 30 A) und von CD36 auf der Zelloberfläche (siehe Abbildung 30 B) durch die spezifische Bindung von fluoreszenz-markierten Antikörpern in FACS-Analysen ermittelt.

Die spezifischen Effekte der Behandlung mit 1 mM Nikotinsäure und der Kontrolle mit PBS wurden durch Abzug der IgM-Kontrollen (Isotyp) von der Markierung mit den spezifischen Antikörpern errechnet. Bei jeder Messung wurde dabei die spezifische mittlere Fluoreszenz-Aktivität (sMFI) von 10.000 Zellen gemessen und die Verteilung statistisch dargestellt.

Die intrazelluläre Expression von PPAR γ nahm nach 3 stündiger Nikotinsäureinkubation nur tendenziell zu (siehe Abbildung 30 A). Die Oberflächenexpression von CD36 zeigte nach 3 h unter Behandlung noch keine Veränderungen (siehe Abbildung 30 B).

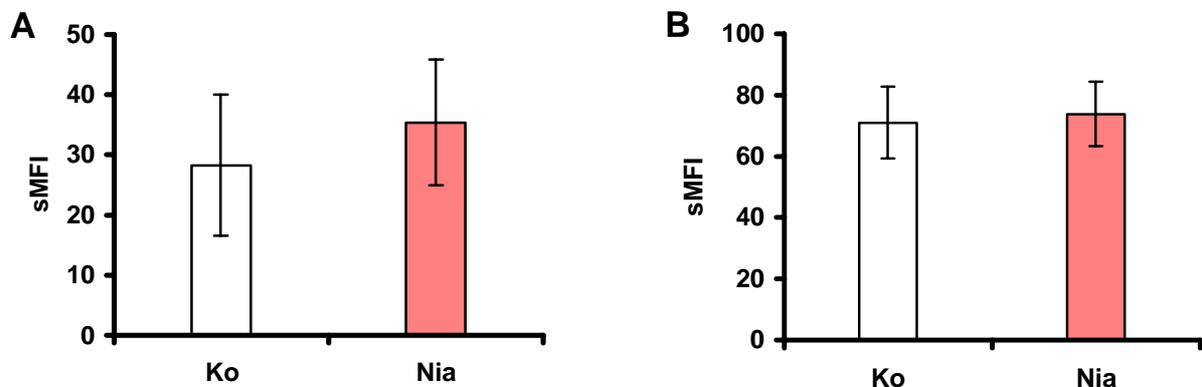


Abb. 30: Darstellung der spezifischen mittleren Fluoreszenz-Aktivität (sMFI) von 10.000 gateden Zellen nach 3 stündiger Inkubation mit 1 mM Nikotinsäure (Nia), Kontrollen mit PBS (Ko). Zur Darstellung kommen die Proteinexpression von PPAR γ (A) und CD36 (B). Mittelwerte \pm SEM. $n \geq 3$.

4.4 Ergebnisse der Effluxversuche

Es folgten Experimente die die funktionellen Bedeutung der durch Nikotinsäurebehandlung induzierte Veränderungen der am zellulären Cholesterinkatabolismus beteiligten Rezeptoren und Transporter untersuchen sollten.

Hierzu wurden MM6sr-Zellen mit 1 mM Nikotinsäure zu zwei Zeitpunkten stimuliert (zu Beginn und nach 24 h) und nach 24 h mit 50 μ g/mL oxidiertem LDL (oxLDL) be-

laden. Nach 72 h wurden die Zellen gewaschen und anschließend für weitere 24 h mit 20 µg/mL delipidiertem HDL (dHDL) inkubiert. Nach 96 h folgt die Cholesterinextraktion aus den Zellen mit anschließender Messung der intrazellulären Gesamtcholesterinkonzentration (in pg Cholesterin/Zelle) (siehe auch Abbildung 13).

Nach Nikotinsäuregabe kam es zu einer signifikanten Abnahme des intrazellulären Cholesteringehalts, sowohl der Zelle, die im normalen Medium gehalten wurden, als auch der Zellen, bei denen nach 24 h oxLDL zum Medium gegeben wurde (siehe Abbildung 31).

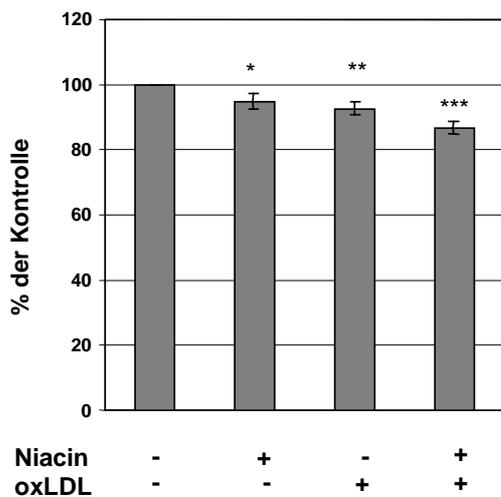


Abb. 31: Darstellung der Effekte der Nikotinsäure auf den zellulären Cholesteringehalt und den dHDL stimulierten Cholesterinefflux monozytoider Zellen. Von links nach rechts: Cholesteringehalt der Zellen ohne Behandlung, nach Nikotinsäuregabe, nach Gabe von oxLDL und nach der Kombination von Nikotinsäure und oxLDL (means ± SEM, n = 4; * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001).

Durch die Behandlung mit Nikotinsäure kam es zu einer signifikanten Zunahme des zellulären Cholesterineffluxes auf dHDL (siehe Abbildung 32).

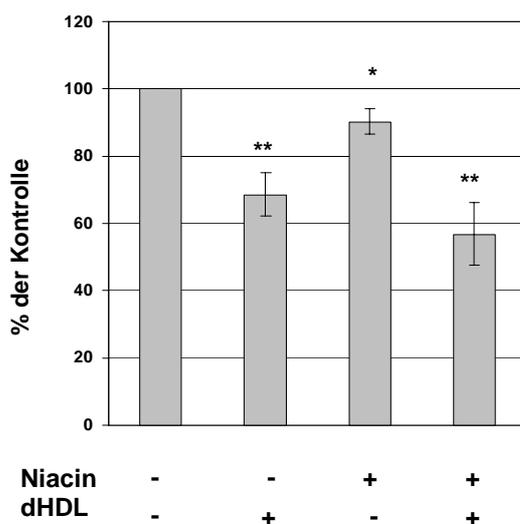


Abb. 32: Darstellung der Effekte der Nikotinsäure auf den zellulären Cholesteringehalt und den dHDL stimulierten Cholesterinefflux monozytoider Zellen. Intrazellulärer Cholesteringehalt in den Kontrollzellen ohne Nikotinsäurebehandlung und ohne Zugabe von dHDL, in durch dHDL entladenen Zellen, in nikotinsäurebehandelten Zellen, in nikotinsäurebehandelten und durch dHDL-entladenen Zellen. Mittelwerte ± SEM. n ≥ 8, * p < 0.05, ** p < 0.01.

5 DISKUSSION

Obwohl in seiner Wirkung auf Serumlipidspiegel vielfach untersucht, blieb der genaue Wirkungsmechanismus der Nikotinsäure bis jetzt unklar. Eine Vielzahl möglicher Angriffspunkte wird diskutiert. In einer großen Zahl klinischer Studien und experimenteller Arbeiten konnte nach Nikotinsäuregabe deskriptiv eine Senkung der Gesamtcholesterin-, Triglycerid-, Lp(a)-, LDL-Cholesterinkonzentration und eine Steigerung der HDL-Cholesterinkonzentration gezeigt werden (siehe Tabelle 1).

Die Mechanismen, die zu einem Anstieg der HDL-Cholesterinkonzentration führen - und die wohl den hauptsächlichsten vitalen Nutzen der Nikotinsäure vermitteln - sind bis jetzt nur ansatzweise geklärt. Unter einer Vielzahl von Effekten des HDL ist vor allem die antiatherogene Wirkung von Bedeutung (siehe Kap. 1.4.1)^{63, 74}.

Erst in den letzten Jahren konnten Teile des komplexen Mechanismus der Beladung der Apo-AI haltigen HDL-Partikel mit unverestertem Cholesterin durch periphere Zellen und dessen Rücktransport zur Leber mit anschließender Elimination durch Hepatozyten molekular verstanden werden.

5.1 Erklärungsansätze zum Wirkungsmechanismus der Nikotinsäure

5.1.1 Rezeptoren der Nikotinsäure

Ein putativer Nikotinsäurerezeptor - ein spezifischer Guanine nucleotide sensitive binding site für [³H] Nikotinsäure - konnte kürzlich in der Mausmakrophagenlinie RAW 264.7 isoliert werden⁸². In den Adipozyten der Maus konnte vor kurzem dieser Bindungsort als PUMA-G und beim Menschen als hHM74b - vor allem auf Adipozyten, und im Milz- und Lungengewebe - nachgewiesen werden^{81, 129, 142, 149} (siehe Abbildung 4 A). Der hHM74b wird auf humanen Makrophagen aber nicht exprimiert¹⁴⁹. Nach Bindung an diesen Rezeptoren kommt es zu einer G_i-Protein vermittelten Hemmung der Adenylatcyclase.

5.1.2 Nikotinsäure hemmt die Lipasen durch Hemmung der Adenylatcyclase

Die Untersuchungen zu den genannten Nikotinsäurerezeptoren ergänzen die Arbeiten von Aktories et. al, in denen nach Nikotinsäuregabe in Adipozyten ein Abfall der cAMP Konzentration gezeigt worden war^{3, 5, 150}. Auf Grund der niedrigen cAMP-Konzentration wurde eine Hemmung der Triglyceridlipase und demzufolge ein Abfall der Lipolyse im Fettgewebe postuliert^{18, 22}.

Weiter konnte gezeigt werden, dass die Nikotinsäure die hepatische Lipase (HL) inhibiert^{37, 122, 153}. Hohe Aktivitäten der HL führten zu einem Anstieg von small dense LDL particles (sdLDL) und einer Abnahme von HDL₂¹⁵³. Für das sdLDL konnte ein leichteres Eindringen in die Arterienwand und leichtere Bindung mit Proteoglykanen nachgewiesen werden, einem wichtigen Aspekt für den Abtransport von Lipiden aus der Gefäßwand⁹.

5.1.3 Weitere hepatische Effekte von Nikotinsäure

Die Nikotinsäure inhibiert direkt die Diacylglycerolacyltransferase 2 (DGAT2) in Hepatozyten⁸⁶, was die Triglyceridsynthese somit hemmt. Dies ist unter anderem als Ursache für den Abfall der Triglyceride von Bedeutung (siehe Abbildung 4 B).

Als weitere Wirkung kann eine Stimulation der Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEPCK) nach Nikotinsäuregabe beobachtet werden⁹³. Die PEPCK katalysiert die Umwandlung von Oxalacetat zu Phosphoenolpyruvat, einem entscheidendem Schritt der Gluconeogenese (siehe Abbildung 37)⁵⁶. Der Effekt auf die PEPCK war in diesen Experimenten tendenziell verzögert nach 48 h zu beobachten.

5.1.4 Durch Nikotinsäure wird der Apo-AI Plasmaspiegel erhöht

Nikotinsäuregabe erhöht die Apo-AI Spiegel *in vivo*. Nach Inkubation von HepG₂ Zellen mit 3 mM Nikotinsäure kam es aber weder zu einem intrazellulärem Anstieg von radioaktiv-markiertem Apo-AI, noch zu einem Anstieg von radioaktiv-markiertem Cholesterin. Postuliert wurde, dass Nikotinsäure nicht eine Neusynthese des Apo-AI stimuliert, sondern die Aufnahme des kompletten Apo-AI HDL in die Hepatozyten inhibiert^{60, 121}. Hier wird eine Inhibition des noch nicht bekannten hepatischen „Katabolismus Rezeptor“ für HDL diskutiert⁶³.

5.1.5 Der Einfluss der Nikotinsäure auf die Synthese zellulärer Eicosanoide

Eine Beeinflussung einzelner Eicosanoide durch die Nikotinsäure konnte in einer Vielzahl von Arbeiten gezeigt werden (siehe Abbildung 3).

In vitro Versuchen konnte ein Abfall sowohl der Leukotriene B₄ und E₄, als auch von Thromboxan B₂ im Blutplasma nüchternen Probanden beobachtet werden¹¹⁹.

In vivo Versuche erbrachten insbesondere einen massiven Anstieg des Prostaglandins D₂^{95, 119}. Durch den Anstieg des PGD₂, einem stark vasodilatatorisch wirkendem Prostaglandin, konnte die als Flush-Reaktion bezeichnete und unter Nikotinsäuretherapie häufig auftretende Nebenwirkung erklärt werden.

Die Stimulation der PGD₂ Synthese hat vor allem sekundär Auswirkungen. Zum einen steigt die zelluläre cAMP-Konzentration durch Stimulation über autokrine und parakrine Bindung des PGD₂ an seinen Plasmamembranrezeptor¹². Des Weiteren kommt es zu einem Anstieg des ddPGJ₂, einem Metaboliten des PGD₂. Das ddPGJ₂ wurde als potentester endogener Ligand von PPAR_γ beschrieben⁶⁷.

5.2 Die PPAR_γ Expression nach Nikotinsäuregabe

Die vorliegende Arbeit untersuchte deshalb primär die Hypothese, ob durch Nikotinsäuregabe PPAR_γ-abhängige Schlüsselrezeptoren des reversen Cholesterintransports in monozytoiden Zellen stimuliert werden können.

5.2.1 Nikotinsäure stimuliert die Expression von PPAR_γ

Nach der Inkubation mit 1 mM Nikotinsäure konnte ein signifikanter Anstieg der mRNA-Expression von PPAR_γ in monozytoiden und tendenziell auch in hepatischen Zellen nachgewiesen werden (siehe Abbildungen 17 bzw. 23). Die Effekte konnten nach 3 h beobachtet werden und hielten für mindestens 48 h an.

Neben der Wirkung der Nikotinsäure auf mRNA-Ebene wurde auch der Effekt auf der Proteinebene überprüft. Hierzu wurden MM6sr-Zellen für 3 h mit Nikotinsäure inkubiert und nach der Permeabilisierung und Markierung mit monoklonalen Antikörpern mittels Durchflusszytometrie gemessen. Die Stimulation von PPAR_γ konnte auf Proteinebene bestätigt werden. Es zeigte sich eine tendenzielle Zunahme der Proteinexpression unter der kurzzeitigen Nikotinsäureinkubation (siehe Abbildung 30 A).

Das war auch mit Western blot Untersuchungen extraplasmatischer und nukleärer Proteinextraktionen nach Nikotinsäurebehandlung zu beobachten. Hier zeigte sich zusätzlich eine deutliche Translokation von PPAR_γ. Direkt oder indirekt wirkt Nikotinsäure somit zumindest auch über den PPAR_γ Signalweg.

5.2.2 PPAR_γ ein zentraler Kernrezeptor im Lipidstoffwechsel

Die Rolle von PPAR_γ bei der Transkription verschiedener Proteine wurde in jüngster Zeit in vielen Arbeiten untersucht.

Im Makrophagen stimuliert PPAR_γ die Expression verschiedener Scavenger Rezeptoren. Vor allem CD36 wird durch PPAR_γ Stimulation vermehrt exprimiert, mit der Folge einer vermehrten oxLDL Aufnahme des Makrophagen^{96, 141}. Auch der vor allem in der Leber exprimierte Scavenger Rezeptor B-I (SR-BI), der bei der Aufnahme von Cholesterin aus dem HDL-Partikel beteiligt ist, wird durch PPAR_γ stimuliert²⁷.

Dagegen wird im peripheren Makrophagen durch PPAR γ die Expression der ATP-binding Cassette A-1 (ABCA-1) gesteigert, so dass über die Interaktion mit dem Apo-AI des HDL-Partikels eine Abgabe von zellulärem Cholesterin an das HDL-Partikel stattfinden kann^{28, 24}.

Die simultane Stimulation von CD36 und ABCA-1 sollte einerseits die Mobilisation von extrazellulären Lipidansammlungen fördern und andererseits eine Schaumzellbildung vermeiden.

PPAR γ stimuliert auch die Expression der vaskulären Lipoproteinlipase (LPL), die aus Triglyceriden der Chylomikronen freie Fettsäuren abspaltet³². Des Weiteren werden viele Transporter und Rezeptoren von Fettsäuren durch PPAR γ stimuliert, u. a. das adipocyte fatty acid binding protein (A-FABP) im Adipozyten und das fatty acid transport protein (FATP) in der Leber³².

Die Stimulation der Acyl-CoA Synthetase (ACS) durch PPAR γ fixiert die freien Fettsäuren in der Zelle und verhindert so eine Rückdiffusion von aufgenommenen Fettsäuren aus der Zelle⁶⁶. Weiter bewirkt PPAR γ zusammen mit C/EBP (einem Transkriptionsfaktor) eine Ausdifferenzierung der Präadipozyten zu Adipozyten⁶⁶. Auch der Plasmin Activator Inhibitor Type-1 (PAI-1) wird durch PPAR γ stimuliert⁸⁹. Durch die Stimulation der Expression der Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEPCK) durch PPAR γ , wird auch ein entscheidendes Enzym der Gluconeogenese reguliert¹⁴⁰.

Durch Gabe von Thiazolidindionen, potenten PPAR γ -Stimulatoren, wird die Glucoseaufnahme in den Skelettmuskel gefördert, was deren antidiabetische Wirkung erklärt^{32, 66}. Wie bereits im Kapitel 1.5.2 erwähnt wurde, stimulieren PPAR Liganden auch die LXR Expression⁴⁰.

Mit PPAR γ -Liganden konnte in LDL-Rezeptor knock-out Mäusen (LDLR^{-/-}) auch eine Inhibition der pro-inflammatorischen Gene von TNF α und Gelatinase B beobachtet werden⁸⁰.

5.3 Folgen der PPAR γ Stimulation durch Nikotinsäure

Wie in früheren Studien gezeigt werden konnte, kommt PPAR γ eine Schlüsselrolle im Lipidstoffwechsel zu³². Auf Grund dieser Rolle und der in dieser Arbeit gefundenen Stimulation von PPAR γ durch Nikotinsäure in Monozyten/Makrophagen ist ein weiterer wichtiger Mechanismus der Nikotinsäure zu postulieren. Zur Überprüfung wurden

die mRNA-Expression PPAR γ abhängig regulierter Rezeptoren und Transporter nach Nikotinsäuregabe mittels RT-PCR und HPLC gemessen. Das Hauptinteresse galt den Proteinen des HDL-Metabolismus ABCA-1 und SR-BI.

5.3.1 Der Einfluss von Nikotinsäure auf die Expression von CD36

Als einer der PPAR γ regulierten Rezeptoren ist CD36 der quantitativ bedeutendste Scavenger Rezeptor¹⁴¹. Durch diesen Rezeptor wird ein großer Anteil modifizierter LDL-Partikel – vor allem die durch O₂-Radikale im Subendothel entstandene oxidierten LDL (oxLDL)^{65, 132, 147} – aus den extrazellulären Lipidakkumulationen in die Makrophagen aufgenommen^{39, 97, 99, 151}.

5.3.1.1 Der CD36 Rezeptor

Der CD36 Rezeptor wird nach der internationalen Nomenklatur der Oberflächenrezeptoren („Cluster of differentiation“) als Nummer 36 geführt (siehe Abbildung 33 und Tabelle 6). Auf einer Vielzahl von Zellen vorkommend, variiert die Molekülgröße des CD36 Rezeptors durch unterschiedliche Glykosilierung abhängig vom Zelltypus³¹.

Außer auf einer Reihe von unterschiedlichen Zellen der Leber wird CD36 vor allem auf Monozyten/Makrophagen, Adipozyten, Thrombozyten und mikrovaskulären Endothelzellen exprimiert¹³⁹. Anfangs wurde CD36 als Adhäsionsmolekül und Rezeptor für Thrombospondin, Kollagen, langkettige Fettsäuren und Plasmodium falciparum infizierte Erythrozyten angesehen^{8, 137}.

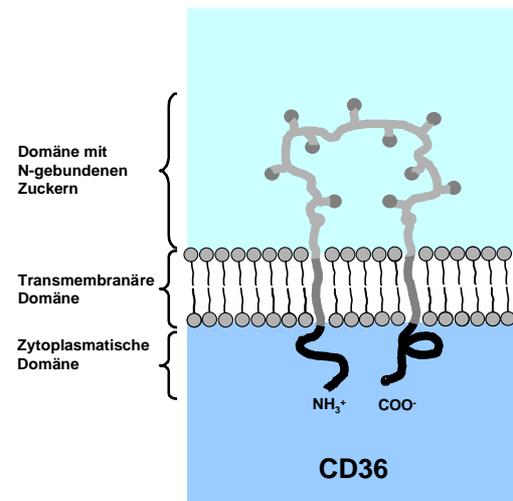


Abb. 33: Struktur des Scavenger Rezeptor CD36¹³⁹

Erstmals wurde CD36 1993 auch als Rezeptor für oxLDL erkannt^{39, 97, 99, 151}. In Untersuchungen an genetisch CD36-defizienten Patienten konnte nachgewiesen werden, dass CD36 für ungefähr 50 % der oxLDL Aufnahme in den Makrophagen verantwortlich ist⁹⁹. Zusätzlich konnten Calvo et al. in Versuchen auch eine zelluläre Aufnahme nativer LDL, VLDL und HDL über CD36 zeigen²⁰.

Scavenger - Rezeptoren	Expression	Ligand	Cellular Fate	Intracellular Signaling	Funktion
Klasse A SR-AI SR-AII	Kupffersche Sternzellen, Sinusoidale Endothelzellen, Gewebemakrophagen, Schaumzellen	acLDL, oxLDL, M-BSA, LPS, Bakterien, Lipoteichonsäure, Polyinosinsäure, Polyguanosinsäure	Endozytose Phagozytose Einfluß auf Adhäsion	Proteinkinase C, PIP ₂ , PPAR _γ , Ca ²⁺ -Einstrom, NF-κB	Bindung und Aufnahme gram positiver/negativer Bakterien Antigenpresentierung Aufnahme apoptotischer Thymozyten Antiinflammatorische Funktion ⁵² Adhäsion während dem homing von Monozyten ⁴⁴ Endozytose von Lipiden ¹³⁰ Inhibition durch PPAR _γ ¹¹⁴
SR-AIII			Gelöste Form im Plasma	Bindung, Plasminogen-Aktivierung, Antigen-Präsentation	
MARCO	Kupffersche Sternzellen unter inflammatorischen Konditionen, Makrophagen in der Marginalzone der Milz und der Lymphknoten	acLDL, Bakterien, LPS	Endozytose Phagozytose		Bindung und Aufnahme gram positiver/negativer Bakterien
Klasse B SR-BI/CLA-1 SR-BII	Hepatozyten, Kupffersche Sternzellen nach Cholesterinreicher Diät oder hochdosierter Östrogenbehandlung	HDL, LDL, VLDL, modifizierte Lipoproteine, apoptotische Zellen, anionische Phospholipide	Endozytose Phagozytose Docking Protein Intrazellulärer Transport von Cholesterin (Ester)		Fettsäuretransport Phagozytose apoptotischer T-Zellen und beschädigter Erythrozyten Adhäsion von Monozyten
CD36	Kupffersche Sternzellen, Sinusoidale Endothelzellen, Hepatozyten während bestimmter Infektionskrankheiten, HepG2-Zellen, Monozyten/ Makrophagen, Thrombozyten, Adipozyten, mikrovaskuläre Endothelzellen, Brustepithelzellen	HDL, LDL, VLDL, modifizierte Lipoproteine, apoptotische Zellen, anionische Phospholipide Fettsäuren, Thrombospondin, Kollagen, P. falciparum-infizierte Erythrozyten	Langsame Endozytose Phagozytose	Aktivierung der Protein-Tyrosin-Kinase	Fettsäuretransport Phagozytose apoptotischer T-Zellen und beschädigter Erythrozyten
Croquemort	Drosophila Hemozyten/ Makrophagen	Apoptotische Zellen	Phagozytose		Phagozytose apoptotischer T-Zellen und beschädigter Erythrozyten
Klasse C Drosophila SR-C	Drosophila Hemozyten/ Makrophagen	acLDL	Endozytose		
Klasse D CD68/Macrosialin	Kupffersche Sternzellen, Gewebemakrophagen	oxLDL, BSA, phosphatidylserine Liposomen, Malondialdehyd	Endozytose (hauptsächliche intrazelluläre Lokalisation)		
Klasse E LOX-1	Kupffersche Sternzellen? Endothelzellen der Leber? Gefäßendothelzellen, Monozyten/ Makrophagen	oxLDL, carrageenan, Polyinosinsäure, apoptotische Zellen	Endozytose Phagozytose		
Klasse F SREC	Endothelzellen der Leber? Gefäßendothelzellen?	acLDL, oxLDL	Endozytose		

Tab. 6: Übersicht über Scavenger Rezeptoren¹³⁹

5.3.1.2 Durch Nikotinsäureinkubation steigt die mRNA Expression von CD36

Ausgehend von der PPAR γ -stimulierenden Wirkung der Nikotinsäure wurde der Einfluss auch auf die Expression von CD36 in MM6sr und HepG₂ Zellen untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass nach Nikotinsäureinkubation die mRNA Expression von CD36 signifikant in beiden Zelllinien ansteigt (siehe Abbildungen 16 bzw. 22). Auch in den Versuchen mit PBMCs konnte dieser Effekt bestätigt werden (siehe Abbildung 29). Bei der Untersuchung der CD36-Proteinexpression auf MM6sr Zellen konnte nach 3 h eine Zunahme noch nicht nachgewiesen werden (siehe Abbildung 30 B).

Da Nikotinsäure nicht nur über eine vermehrte Expression, sondern auch über eine vermehrte Aktivierung von PPAR γ über ddPGJ₂ wirken könnte, wurden in weiteren Versuchen MM6sr Zellen mit Nikotinsäure und dem Cyclooxygenase-Hemmer Acetylsalicylsäure gleichzeitig inkubiert. Hier zeigte sich bei der Messung der CD36 mRNA Expression eine Inhibition des Expressionsanstieges. In späteren Versuchen wurden die Zellen kombiniert mit Nikotinsäure und Ro 31-8220, einem Inhibitor der cAMP-aktivierten Proteinkinase A (PKA), inkubiert. Hier konnte unbeeinflusst von Ro eine signifikante Zunahme der CD36 mRNA-Expression - auf das gleiche Niveau wie durch Nikotinsäure alleine - gemessen werden. Ein Cyclooxygenase-abhängiger Signalweg - vermittelt über PGD₂, ddPGJ₂ und PPAR γ - konnte somit für die Stimulation von CD36 durch Nikotinsäure gezeigt werden, während der cAMP/PKA Signalweg offenbar keine Rolle hierfür spielt.

5.3.1.3 Folgen der CD36 Stimulation durch Nikotinsäure

Durch die frühzeitige Stimulation von PPAR γ nach Nikotinsäuregabe folgt also ein früher Anstieg der CD36 mRNA Expression. Als Folge der Stimulation des CD36 wird die Aufnahmekapazität modifizierter Lipoproteine des Makrophagen verstärkt und weiter die Entfernung vor allem des im Subendothel entstandenen extrazellulären oxLDL fördert.

Auch auf der hepatischen Zelle steigt die CD36 Rezeptordichte. Möglicherweise wird dadurch vermehrt modifiziertes LDL hepatisch geklärt. Nach Degradierung und Spaltung der Cholesterinester zu freiem Cholesterin kann die Leber das Cholesterin dann direkt oder nach der Oxidation zu Gallensäuren über die Galle ausscheiden und somit eliminieren, als letzter Schritt des reversen Cholesterintransports.

5.3.2 Die Wirkung der Nikotinsäure auf Rezeptoren und Transporter des reversen Cholesterintransports

In anschließenden Versuchen wurde die Wirkung der Nikotinsäure auf die Expression weiterer PPAR γ abhängiger Rezeptoren und Transporter des reversen Cholesterintransports untersucht. Neben dem bekannt PPAR γ -reguliertem SR-BI²⁷ wurde der ebenfalls teilweise PPAR γ -regulierte Cholesterinexporter ABCA-1²⁸ auf eine mögliche Beeinflussung durch Nikotinsäure überprüft.

5.3.2.1 Der Scavenger Rezeptor BI

Der Scavenger-receptor BI (SR-BI) wird vor allem nach cholesterinreicher Diät und nach Behandlung mit hohen Östrogen- oder ACTH-Dosen auf Hepatozyten, gonadalen und adrenalen Zellen, sowie auf Monozyten vermehrt exprimiert. Die Rezeptorenexpression sinkt aber nach der Monozytendifferenzierung zum Makrophagen^{1, 2, 139} (siehe Abbildung 34 und Tabelle 6).

Die Funktionen von SR-BI sind vielschichtig. Erstmals konnte Acton et al. zeigen, dass SR-BI auf Hepatozyten das Apo-AI des HDL mit hoher Affinität binden kann, wobei nach der Bindung keine Aufnahme des

gesamten HDL-Partikels erfolgt, sondern nur eine Internalisierung von Cholesterinestern aus dem HDL-Kern in die Zelle. Ist diese Aufnahme beendet, löst sich das delipidierte HDL-Partikel vom Rezeptor und rezirkuliert, um aus der Peripherie erneut Cholesterin aufzunehmen².

Des Weiteren können native VLDL-, LDL- und modifizierter LDL-Partikel (wie oxidiertes und glykosyliertes LDL) mittels SR-BI endozytotisch aufgenommen werden^{19, 98, 99}. Auch die Phagozytose apoptotischer T-Zellen und beschädigter Erythrozyten durch SR-BI wurde beschrieben. Eine weitere Rolle kommt dem Rezeptor bei der Monozytenadhäsion zu¹³⁹.

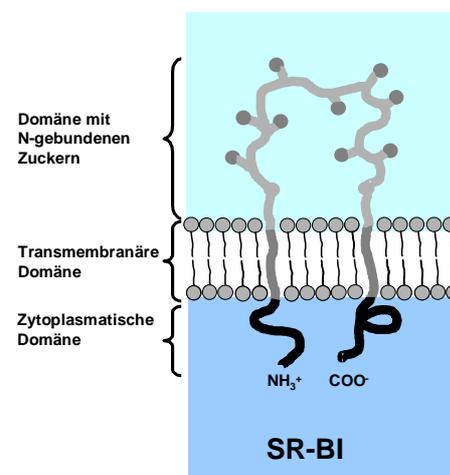


Abb. 34: Die Struktur des Scavenger Rezeptor BI¹³⁹

5.3.2.2 Nikotinsäure und SR-BI

In dieser Arbeit zeigte sich ein gegenläufiges, biphasisches Verhalten der SR-BI Expression in MM6sr Zellen nach Nikotinsäureinkubation (siehe Abbildung 19). In HepG₂ Zellen konnte nach 3 h Inkubation mit 1 mM Nikotinsäure eine tendenzielle Abnahme gemessen werden (siehe Abbildung 25 A). Dieser Effekt war nach 48 h nicht mehr nachweisbar (siehe Abbildung 25 B). Generell waren die Effekte von Nikotinsäure auf SR-BI weniger ausgeprägt als auf CD36. Es ist deshalb fraglich, ob die Effekte von Nikotinsäure auf SR-BI für den reversen Cholesterintransport von Bedeutung sind.

5.3.2.3 Die Regulation von ABCA-1 durch Nikotinsäure

Die nächsten Versuche galten der Untersuchung von ABCA-1, einem erst kürzlich beschriebenen zellulären Cholesterinexporter. Dessen zentrale Bedeutung für den reversen Cholesterintransport ergibt sich aus der Modellerkrankung Morbus Tangier, bei der ABCA-1 dysfunktional mutiert ist. Auch für ABCA-1 konnte eine Stimulation der Expression durch PPAR γ gezeigt werden²⁸ (siehe Kap. 1.4.4).

In der vorliegenden Arbeit konnte sowohl in MM6sr Zellen (siehe Abbildung 20), als auch in HepG₂ Zellen (siehe Abbildung 26) und PBMCs (siehe Abbildung 29) ein Anstieg der ABCA-1 mRNA-Expression nach Nikotinsäuregabe beobachtet werden. Diese Effekte zeigten sich bereits 3 h nach Behandlung und hielten mindestens für 48 h an.

5.3.2.4 Funktionelle Folgen der Stimulation von SR-BI und ABCA-1 durch Nikotinsäure

Für ABCA-1 konnte gezeigt werden, dass zelluläres Cholesterin auf die Außenseite der Plasmamembran transportiert wird, wo es dann leicht auf Apo-AI haltige HDL-Partikel transferiert werden kann. Der Zelle wird es somit ermöglicht, sich der durch erhöhte CD36 Expression bedingte intrazellulären Cholesterinansammlung wieder geordnet zu entledigen. Als Folge einer gesteigerten ABCA-1 Transkription mit Förderung der Einschleusung in den reversen Cholesterintransport wird somit eine Schaumzellbildung verhindert¹³.

Diese Auswirkungen der durch Nikotinsäure hervorgerufenen Veränderungen in der CD36 und ABCA-1 Expression konnte tatsächlich funktionell nachgewiesen werden. Die Nikotinsäure reduzierte signifikant den intrazellulären Cholesteringehalt, verstärkte die Fähigkeit der Zellen einer Überladung mit modifizierten Lipoproteinen

standzuhalten und stimulierte den HDL-vermittelten Cholesterinefflux. Die pathophysiologische Bedeutung der ABCA-1 Aktivität für den zellulären Cholesterinexport konnte auch in anderen Modellen belegt werden ¹³. Ersten klinischen Untersuchungen zufolge besteht auch eine Korrelation der ABCA-1 Aktivität und der Verdickung der Arterienwand als Frühzeichen der Atherosklerose beim Menschen ¹⁴⁴.

Durch den raschen Anstieg der SR-BI mRNA-Expression am Monozyten/Makrophagen (siehe Abbildung 19 A) könnte dann eine frühe Bindung des präHDL in der Gefäßwand ermöglicht werden, eine wichtige Voraussetzung für die Cholesterinübertragung durch ABCA-1 (siehe Abbildung 5). Der nach 48 h gemessene SR-BI mRNA-Expressionsabfall (siehe Abbildung 19 B) könnte als Reaktion der Zelle auf den bereits reduzierten intrazellulären Cholesteringehalt nach Nikotinsäuregabe interpretiert werden (siehe Abbildung 31).

Um den reversen Cholesterintransport zu komplettieren, müssen die HDL-Partikel in der Leber - dem einzigen Organ des quantitativ relevanten Cholesterinkatabolismus - entladen und das Cholesterin über die Galle ausgeschieden werden (siehe Abbildung 5). Lange Zeit galt die selektive Entfernung der Lipide aus HDL durch die hepatische Lipase (HL) als der entscheidende Mechanismus.

Nach Nikotinsäurebehandlung konnte aber eine Inhibition der HL gemessen werden ^{37, 122, 153}. Später wurde SR-BI - ursprünglich als ein Homolog zum CD36 auf dem Monozyten/Makrophagen gefunden - als hepatischer HDL-Rezeptor identifiziert ². Es konnte gezeigt werden, dass durch SR-BI die Lipide in die Zelle aufgenommen werden, ohne dass das Apo-AI Protein internalisiert wird.

Die unveränderte SR-BI mRNA-Expression der HepG₂-Zellen ist gut mit Untersuchungen zu vereinbaren, in denen gezeigt werden konnte, dass nach Nikotinsäuregabe die Apo-AI Plasmaspiegel ansteigen. Hierbei kam es weder zu einem intrazellulärem Anstieg von radioaktiv-markiertem Apo-AI, noch zu einem Anstieg von radioaktiv-markiertem Cholesterin. Postuliert wurde, dass Nikotinsäure nicht eine Neusynthese des Apo-AI stimuliert, sondern die Aufnahme des Apo-AI HDL in die Hepatozyten begrenzt ist und bei vermehrter peripherer Produktion die Spiegel ansteigen müssen ^{60, 121}.

Weiter konnte in den HepG₂-Zellen - einem etabliertem Modell des hepatischen Lipidmetabolismus - eine Stimulation von ABCA-1 durch Nikotinsäure gezeigt werden. ABCA-1 wird ausgeprägt von Hepatozyten exprimiert ⁷⁷, wobei die Bedeutung für den

hepatischen Cholesterinmetabolismus bis jetzt nicht voll verstanden ist. Es gibt Hinweise dafür, dass ABCA-1 für die Exkretion von Cholesterin in die Galle von Bedeutung ist. So konnte beobachtet werden, dass in transgenetischen Mäusen mit Überexpression von human ABCA-1 (hABCA1-Tg), die Cholesterinkonzentration in der Galle gesteigert ist ¹⁴³.

In Nagetieren könnte die Nikotinsäure die Gallensäureproduktion durch die Stimulation von PPAR γ - LXR α und 7 α -Hydroxylase (CYP7A1), einem Schlüsselenzym bei der Konversion des Cholesterins zu Gallensäuren, indirekt aktivieren. Dies ist aber beim Menschen wohl ohne Bedeutung, weil dem humanen 7 α -Hydroxylase Promotor das LXR α response element fehlt ²⁶.

In weiterführenden Untersuchungen wurden die Signalwege der Nikotinsäurewirkung auf die ABCA-1-Expression - mittels spezifischer Agonisten und Inhibitoren - untersucht. Hier zeigte sich nach Nikotinsäuregabe, eine anhaltende Stimulation der ABCA-1 Expression auch nach Koinkubation mit dem Cyclooxygenaseinhibitor Acetylsalicylsäure ¹¹⁶.

Damit scheint eine Vermittlung des Nikotinsäureeffekts auf ABCA-1 analog zum Effekt auf CD36 über PGD₂, ddPGJ₂ und PPAR γ unwahrscheinlich. Es könnten hierfür der signifikante Anstieg von cAMP und LXR α nach Nikotinsäureinkubation als Signalwege in Frage kommen. In der Tat war der Nikotinsäureeffekt auf die ABCA-1 Expression mit dem PKA-Inhibitor zu hemmen.

Der moderate cAMP-Anstieg durch Nikotinsäure in unserem Makrophagenmodell muss dabei nicht direkt über ein Rezeptoren-gekoppeltes G_s-Protein reguliert werden, sondern möglicherweise führen weitere nicht identifizierte Signalwege indirekt zu einem sekundären cAMP-Anstieg. Das LXR α Gen selbst ist ein direktes Ziel von PPAR γ und sekundär kommt es dann zu einer Stimulation von ABCA-1 ²⁴.

Auch für cAMP konnte bereits eine direkte Steigerung der ABCA-1-Transkription nachgewiesen werden ¹⁰². Eine Stimulation von cAMP durch PGD₂ über den human prostanoid DP receptor (hDP receptor) ist bekannt ¹². Dies kann aber nicht die erhaltene ABCA-1 Stimulation durch Nikotinsäure auch bei Cyclooxygenasehemmung erklären. Eine parallele Stimulation von ABCA-1 durch die Nikotinsäure sowohl über PGD₂, ddPGJ₂ und PPAR γ als auch über einen PGD₂-cAMP Signalweg mit folglichem ABCA-1 Anstieg wäre aber denkbar.

5.4 Die Expression des LDL-Rezeptor und LOX-1 nach Nikotinsäuregabe

Um die Spezifität der PPAR γ Stimulation durch Nikotinsäuregabe für den CD36 Anstieg zu untermauern, wurden in weiteren Versuchen auch der LDL-Rezeptor und LOX-1 nach Inkubation mit 1 mM Nikotinsäure untersucht. Für beide Rezeptoren ist eine PPAR γ -abhängige Regulation nicht bekannt.

5.4.1 Der LDL-Rezeptor

Der LDL-Rezeptor ist ein Transmembranprotein, das aus fünf Domänen besteht (siehe Abbildung 35). Er ist in spezialisierten Bereichen der Zellmembran - den Clathrinsaumgrübchen („coated pits“) - lokalisiert. Diese Grübchen enthalten an der Membrannenseite Clathrin-Proteine, die ein Gitter unter den einzelnen LDL-Rezeptoren bilden und koordinative Aufgaben übernehmen ³⁵.

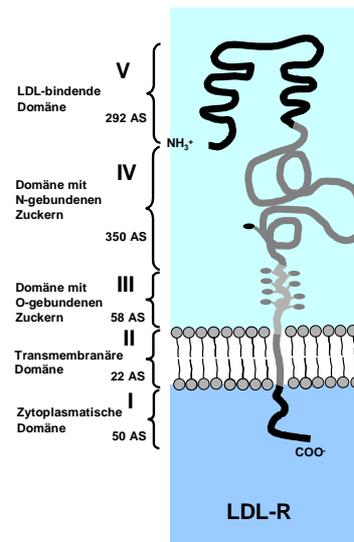


Abb. 35: Die Struktur des LDL-Rezeptors ¹³⁴

Die Aufnahme der LDL-Partikel in die Zielzelle erfolgt über Endozytose. Nach Bindung von ApoB₁₀₀ am LDL-Rezeptor und ApoE am LDL-receptor related protein (LRP) erfolgt eine Invagination, mit der eine Internalisierung des LDL-Partikels beginnt. Clathrin wird mittels eines Entfernungsenzyms (uncoating enzyme, HSP-70) entfernt, so dass ein primäres Endosom entsteht. Wegen des erniedrigten pH-Wertes - nach Verschmelzung mit Lysosomen - dissoziiert LDL dann vom Rezeptor. Dieser rezirkuliert zur Membran und übernimmt erneut Bindungsfunktionen ^{35, 134} (siehe Abbildung 6). Für die LDL-Rezeptor-Transkription wurde eine SREBP1 feed-back Regulation nachgewiesen ¹⁶.

5.4.2 Die Expression des LDL-Rezeptors wird durch Nikotinsäureinkubation nicht beeinflusst

Auch hier wurde die mRNA Expression in MM6sr und HepG₂ Zellen zu zwei Zeitpunkten (3 h und 48 h) gemessen. Für den LDL-R konnte zu beiden Zeitpunkten in beiden Zelllinien keine Veränderung gemessen werden (siehe Abbildungen 18 bzw. 24).

Es kann festgestellt werden, dass der LDL-R offenbar nicht durch Nikotinsäure reguliert wird. Die gering gradig ansteigende Rezeptorexpression im Makrophagen nach 48 h könnte als Gegenreaktion auf die zelluläre Cholesterindepletion nach Nikotinsäureinkubation interpretiert werden. Wie bereits erwähnt, stimuliert Nikotinsäure sowohl die SR-BI als auch die ABCA-1 mRNA Expression. Durch vermehrte LDL-R Synthese wird dann Cholesterin kompensatorisch in den Makrophagen aufgenommen.

5.4.3 Nikotinsäure und LOX-1

Bei LOX-1 handelt es sich um einen weiteren kürzlich beschriebenen Scavenger Rezeptor, der PPAR γ unabhängig reguliert wird⁵³.

5.4.3.1 Der Lektin-like ox-LDL Rezeptor (LOX-1)

Der Lektin-like ox-LDL Rezeptor (LOX-1) wurde erstmalig von Sawamura et al. aus bovinen Endothelzellen kloniert¹²³. Dieser Rezeptor ist in seiner Struktur komplett unterschiedlich zu den anderen Scavenger Rezeptoren (siehe Abbildung 36). Nachgewiesen werden konnte dieser Rezeptor auf Monozyten/Makrophagen und

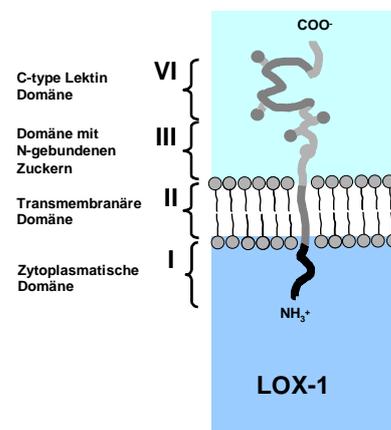


Abb. 36: Die Struktur von LOX-1⁵⁰

vaskulären Endothelzellen¹³⁹. Er bindet vor allem oxLDL, dessen Bindung nicht durch einen Überschuss von nativem LDL gehemmt werden kann^{91, 94}. Bisher konnte eine Stimulation von LOX-1 durch tumor necrosis factor α (TNF α)⁹¹ und tumor necrosis factor β 1 (TNF β 1)³⁴, Angiotensin II, Scherkräfte der Gefäßwände und durch Liganden von PPAR α , wie Fenofibrat und WY14643⁵³ gezeigt werden.

5.4.3.2 Expression der LOX-1 mRNA nach Nikotinsäuregabe

Die mRNA-Expression von LOX-1 veränderte sich in MM6sr- und in HepG₂-Zellen weder nach 3 h Inkubation mit 1 mM Nikotinsäure, noch nach 48 h (siehe Abbildungen 21 bzw. 27).

LOX-1 wird also nicht über Nikotinsäure sensible Signalwege reguliert. Die Konstanz von LOX-1, wie der LDL-R, schließt auch einen generellen unspezifischen Effekt von Nikotinsäure auf die Transkription in den untersuchten Konzentrationen aus.

5.5 Nikotinsäure und die Phosphoenolpyruvatcarboxykinase

Der Muskel bevorzugt bei plötzlicher Aktivität als Energiequelle Glucose. Hierbei ist die Geschwindigkeit der Glykolyse höher als die des Citratzyklus. Ein Großteil des unter diesen Bedingungen gebildeten Pyruvats wird daher zu Lactat reduziert, das zur Leber transportiert und dort wieder in Glucose umgewandelt werden kann.

Die Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEPCK) katalysiert die für die Gluconeogenese entscheidenden Schritte der Decarboxylierung des Oxalacetats und der anschließenden Phosphorylierung zum Phosphoenolpyruvat ¹³⁴ (siehe Abbildung 37).

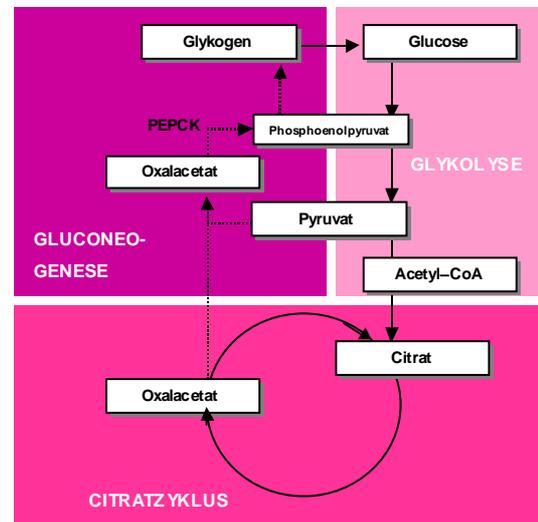


Abb. 37: Die Phosphoenolpyruvatcarboxykinase (PEPCK) im Glucosemetabolismus

Exprimiert wird die PEPCK vor allem in der Leber, in der Niere und in Adipozyten ¹⁴⁰. Moreno et al. konnte zeigen, dass Nikotinsäuregabe die PEPCK in hepatischen Zellen der Ratte stimuliert ⁹³. In einer späteren Arbeit von Tontonoz et al. wurde nachgewiesen, dass die Transkription der PEPCK von PPAR γ 2 in Adipozyten reguliert wird ¹⁴⁰.

In der vorliegenden Arbeit konnte in HepG₂ nach Inkubation mit 1 mM Nikotinsäure erst nach 48 h Nikotinsäurestimulation eine tendenzielle Zunahme der PEPCK mRNA beobachtet werden (siehe Abbildung 28). Offensichtlich ist die Kinetik der Nikotinsäureeffekte auf die PEPCK Transkription in HepG₂-Zellen langsamer als die auf die Lipid-Rezeptoren. Moreno et al. konnten nach wenigen Stunden ein Anstieg der PEPCK-Aktivität messen ⁹³.

5.6 Nikotinsäure und Cholesterinhomöostase

In Abbildung 38 sind die durch diese Untersuchungen beschriebene zusätzliche Effekte der Nikotinsäure skizziert. Nach der Gabe der Nikotinsäure kommt es zu einer Stimulierung der PGD₂-Synthese im Monozyten/Makrophagen ^{95, 119}.

Zum einen steigt auf Nikotinsäure direkt oder nach der Bindung des PGD₂ am hDP receptor das intrazelluläre cAMP an ¹², zum anderen wird einer der Hauptmetaboliten

des PGD₂, das 15-deoxy $\Delta^{12,14}$ PGJ₂ vermehrt gebildet. Dieser wirkt als potenter PPAR γ -Stimulus^{41, 67}. Für die Stimulation von ABCA-1 scheint überwiegend das angestiegene cAMP¹⁰², weniger der PPAR γ - LXR α -Signalweg von Bedeutung zu sein²⁴.

Weiter stimuliert PPAR γ die CD36 Expression^{96, 164}. Hierfür scheint überwiegend ein cyclooxygenaseabhängiger wohl über PGD₂, PGJ₂ und PPAR γ vermittelter Signalweg von Bedeutung zu sein. Folge der CD36 Stimulation ist eine Zunahme der oxLDL Aufnahme in Makrophagen. Dies wirkt extrazellulären Lipidakkumulationen in der Gefäßintima entgegen^{39, 99}. Kurzfristig kommt es weiter durch eine PPAR γ -Stimulation zu einem Anstieg der SR-BI Rezeptordichte auf den Monozyten/Makrophagen²⁷. Dies fördert eine frühe Bindung des präHDL und ist eine Voraussetzung für die Cholesterinübertragung durch ABCA-1 auf die HDL-Partikel.

Auch im Hepatozyten kommt es ebenfalls zu einer Stimulation von ddPGJ₂ und cAMP, mit der Folge eines Anstieges von PPAR γ , ABCA-1 und CD36. Durch die Stimulation von CD36 in Hepatozyten können oxidierte VLDL-remnants und LDL vermehrt aufgenommen. Die SR-BI Expression in den HepG₂ Zellen bleibt unverändert. Die Rolle von ABCA-1 in Hepatozyten ist nicht vollständig geklärt. Eine Beteiligung von ABCA-1 bei der Exkretion von Cholesterin in die Galle scheint wahrscheinlich, wie für verschiedene ABC-Transporter - etwa ABCB-11 - gezeigt werden konnte¹²⁵. Für ABCG-5, einen Transporter, der die Rücksekretion von Phytosterolen im Darm-lumen und die Sekretion von Cholesterin in die Galleflüssigkeit vermittelt, konnte ebenfalls eine LXR-abhängige Regulation nachgewiesen werden¹¹⁰.

Die Nikotinsäure inhibiert direkt die Diacylglycerolacyltransferase (DGAT2) im Hepatozyten mit folglich Hemmung der Triglyceridsynthese und Abfall der Triglyceridkonzentration⁸⁶. Weiter hemmt die Nikotinsäure die Apo-AI Aufnahme in den Hepatozyten^{60, 121}, das wieder zur peripheren Beladung mit Cholesterin zur Verfügung steht.

In Nagetieren könnte des Weiteren die Nikotinsäure die Gallensäureproduktion durch die Stimulation von PPAR γ - LXR α und CYP7A1, indirekt aktivieren. CYP7A1 konvertiert das Cholesterin zu Gallensäuren. Dem humanen 7 α -Hydrolase Promotor fehlt das LXR α response element, so dass diese Regulation beim Menschen ohne Bedeutung sein dürfte²⁶.

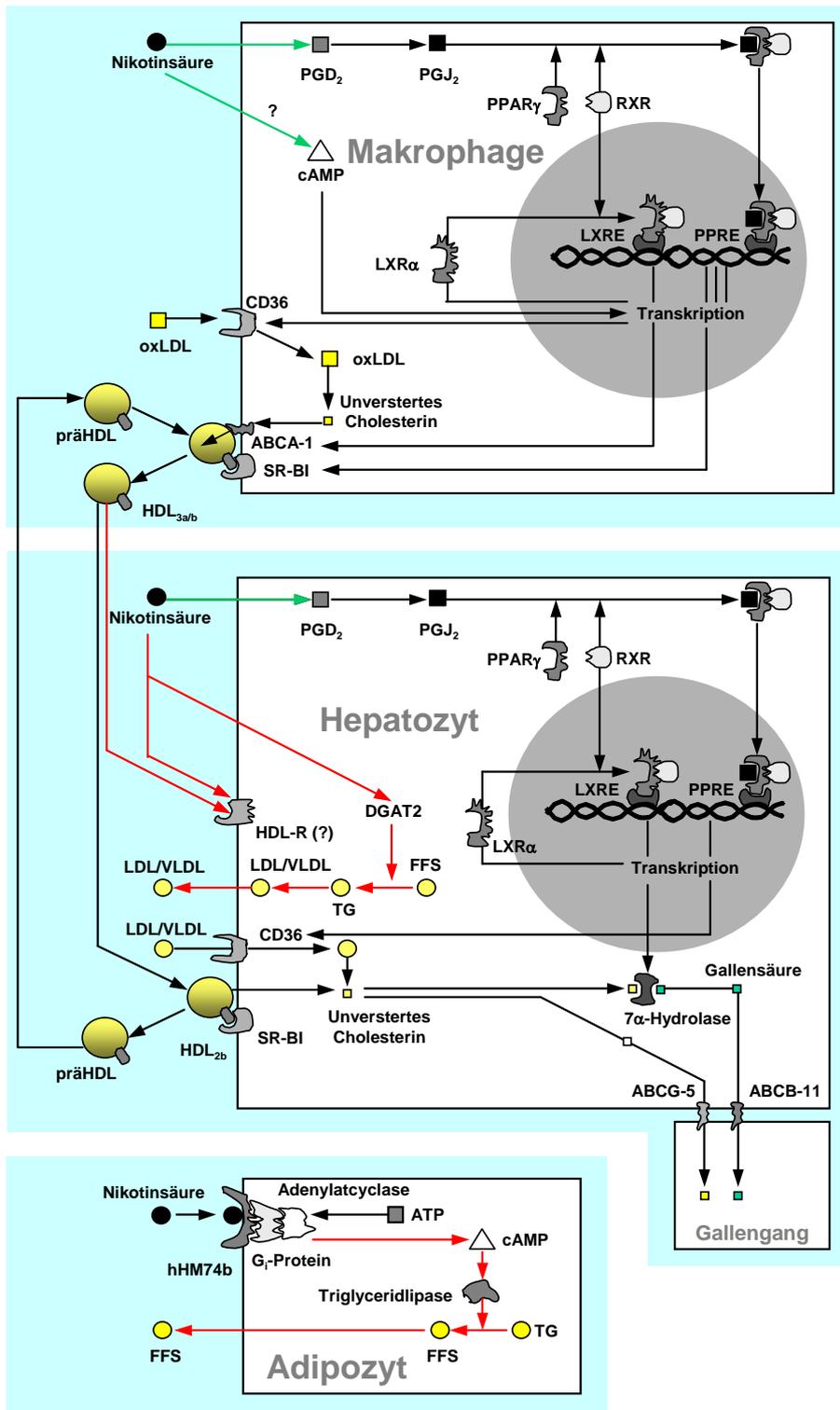


Abb. 38: Nikotinsäure und Cholesterinhomeostase

Der Einfluss von Nikotinsäure auf die Expression von PPAR_γ, Scavenger Rezeptoren und ABCA-1 auf monozytoiden und hepatischen Zellen

5.7 Ausblick auf weitere hypothetische Wirkungsmechanismen der Nikotinsäure

Möglicherweise könnte durch Nikotinsäuregabe und nachfolgender PPAR γ - bzw. LXR α -Stimulation die Expression weiterer Proteine beeinflusst werden, die im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht wurden.

5.7.1 Potentielle weitere Folgen einer PPAR γ Stimulation durch Nikotinsäure

Da es durch die Stimulation von PPAR γ zu einer Synthesezunahme der Lipoproteinlipase (LPL) kommt, könnte es auch nach Nikotinsäuregabe zu einem Anstieg der LPL und somit zu einer schnellen peripheren Verwertung der freien Fettsäuren aus den Triglyceriden der Chylomikronen und des VLDL ³². Eine gesteigerte LPL-Expression - stimuliert durch PPAR γ - könnte einen weiteren Erklärungsansatz für die Senkung des VLDL-Cholesterins geben, neben der bekannten Inhibition der hepatischen Triglyceridlipase durch G $_i$ -Protein vermittelte Inhibition der Adenylatcyclase ^{129, 142}.

Bei einer Insulinresistenz oder eines Defekts der Adipozyten, freie Fettsäuren aufzunehmen, kann es zu einem erhöhten Anfall freier Fettsäuren aus Chylomikronen an der Leber kommen. Dort kommt es zu vermehrter Triglyceridsynthese, verminderter LDL Proteolyse und gesteigerter VLDL Produktion und Sekretion ⁷⁴.

In mehreren publizierten Arbeiten konnte eine Verbesserung der Glukosetoleranz nach Nikotinsäuregabe gezeigt werden ^{7, 146}. Möglicherweise ist die Stimulation von PPAR γ durch Nikotinsäure hier ebenfalls von Bedeutung. Die Verbesserung der Insulinsensitivität und peripheren Verwertung diabetischer Lipide durch PPAR γ -Liganden Stimulation ist mehrfach gezeigt worden ^{32, 45, 66}.

5.7.2 Hypothetische Folgen einer LXR α Stimulation

Als Liganden von LXR konnten vor allem unterschiedliche Oxysterole ^{57, 58}, Liganden von PPAR γ ⁴⁰, und weitere oxLDL-Komponenten nachgewiesen werden. Bei Stimulation der LXR α -Expression durch Nikotinsäure wäre sekundär auch eine Regulation LXR-abhängiger Rezeptoren denkbar. Die Bedeutung vor allem von LXR α für den Cholesterinefflux wurde in den letzten Jahren zunehmend erkannt.

Wie Laffitte et al nachweisen konnte, kommt es durch eine Stimulation von LXR α/β zu einer Expressionszunahme von Apolipoprotein (ApoE) in Makrophagen und Adipozyten. Das ApoE ist sowohl für den systemischen als auch für den zellulären Cholesterinmetabolismus von Bedeutung. In Chylomikronen, VLDL und IDL vor-

kommend, bindet das ApoE am LDL-receptor related protein (LRP) der Zielzellen, vor allem in der Leber, aber auch im Darm, im Adipozyten und im Makrophagen und ermöglicht so eine Aufnahme des Lipoproteinpartikels. Eine mögliche Stimulation der ApoE Expression durch PPAR γ und LXR nach Nikotinsäuregabe, könnte also eine weitere Erklärungsmöglichkeit sinkender VLDL Konzentrationen sein ⁷⁶.

Zuletzt erwähnt, dass auch das Cholesterolester-Transfer Protein (CETP) durch LXR α reguliert wird. Dem HDL-Partikel wird durch Bindung an das CETP ermöglicht, Cholesterinester auf Chylomikronen-Remnants, VLDL und LDL zu übertragen. Dadurch kann ein Teil des Cholesterins über nachfolgende Aufnahme dieser Partikel durch den LDL-Rezeptoren und LRP aus dem Blut entfernt werden (siehe Abbildung 5) ⁸⁴. Auch hier wäre ein günstiger Einfluss der Nikotinsäure denkbar.

5.8 Die Nikotinsäure in der praktischen Anwendung

Der positive Effekt einer medikamentöse Therapie von Dyslipidämien mit Statinen ist breit gesichert. Der Vorteil der Statine - unter anderem wegen geringerer subjektiver Nebenwirkungen - gegenüber der Nikotinsäure - unbestreitbar. Auf Grund der Wirkungen der Nikotinsäure auf den HDL-Metabolismus ist allerdings eine kombinierte Therapie mit Statinen potentiell überlegen.

5.8.1 Nikotinsäure in verschiedenen Arzneiformen

Die Nikotinsäure ist international in verschiedenen Arzneiformen verfügbar. Neben den schnell freisetzenden Präparaten gibt es unterschiedlich retardierte Formen.

Die Nikotinsäure war früher vor allem als „time-release“ (u. a. Nicobid) und als unretardiertes Nikotinsäurepräparat im Gebrauch. Zur Zeit ist von der amerikanischen FDA das Präparat Niaspan™ zugelassen, das mit einer Freisetzungzeit von circa 12 Stunden auch als „intermediate release“ bezeichnet wird. Weitere retardierte Präparate auf dem US-amerikanischen Markt werden auch als „long acting“ oder „time release“ - Formulierungen zusammengefasst und sind sogar als Nahrungsergänzungsmittel im Handel. Sie weisen zum Teil eine Freisetzung von bis zu 24 Stunden auf und sind nicht mit dem zugelassenen Präparat austauschbar ⁷¹. In klinischer Erprobung ist die Kombination von unretardierter Nikotinsäure mit Lovastatin (Nicostatin™) ⁶⁴.

In Deutschland ist reine Nikotinsäure derzeit nur als Vitaminpräparat oder als Vasodilatator im Handel (Nicobion®). Derzeit noch im Rahmen der Altzulassung verfügbar

ist Nicolip[®] mit dem Inhaltsstoff Inositolnicotinat und Complamin spezial retard[®] mit dem Wirkstoff Xantinolnicotinat.

Die verschiedenen Nikotinsäure-Präparate unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Nebenwirkungen und einzelnen Effekten auf die Lipoproteine (siehe auch Tabelle 1). Die „time-release“ Präparate (u. a. Nicobid[™], Absorption > 12 h) sind häufiger hepatotoxisch und in ihrer Wirkung den retardierten und unretardierten unterlegen. Diese sind nur als Lebensmittelzusatz im Handel ⁶⁹.

Die unretardierte Nikotinsäure wirkt stärker HDL steigernd als die Statine, ist ihnen aber in der LDL-senkenden Wirkung unterlegen. In angiographischen Untersuchungen zeigte sich insgesamt ein leichter Vorteil der unretardierten Nikotinsäure ¹⁵. Bei der unretardierten Form kommt es seltener zu hepatotoxischen Nebenwirkung, häufig sind aber die genannten Flush-Reaktionen.

5.8.2 Lipidologische Studien mit Nikotinsäure

Zusammenfassend lassen sich die wichtigsten Wirkungen der Nikotinsäure auf die Plasmalipidspiegel wie folgt beschreiben:

- Die Nikotinsäure bewirkt eine Senkung des Gesamtcholesterins und des LDL, die quantitativ den Statinen unterlegen. Durch Kombination beider Präparate addieren sich die LDL-senkenden Effekte ^{15, 64}.
- Im Vergleich zu den anderen Lipidsenkern kommt es durch Gabe der Nikotinsäure zur potentesten Steigerung der HDL-Konzentration ²⁹. Nach Nikotinsäure als auch Niaspan[™]-Gabe konnten erhöhte Spiegel von HDL, HDL₂ als auch HDL₃ gemessen werden ⁶³.
- Im Vergleich mit den derzeit eingesetzten Lipidsenkern konnte einzig durch Nikotinsäuregabe eine deutliche Senkung der Lp(a)-Konzentration erreicht werden ^{23, 49, 74}.

5.8.3 Klinische Studien zur Kombination der Nikotinsäure mit Statinen

Vielversprechend erweist sich eine Kombination von Nikotinsäure mit Statinen, bei der sich die unterschiedlichen Effekte beider Medikamente gut ergänzen. So konnten Brown et al. in einer klinischen Studie doppelblind eine signifikante Abnahme klinischer vaskulärer Ereignisse gegenüber einem Placebo um 60 % zeigen ¹⁴.

Das erst seit kurzem in klinischer Verwendung befindliche Kombinationspräparat Nicostatin[™] zeigte bereits jetzt interessante Ergebnisse. So konnte eine starke Sen-

kung des LDL (- 47 %) und Steigerung des HDL (+ 41 %) im Vergleich zum Placebo nachgewiesen werden ⁶⁴.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Das natürliche Vitamin Nikotinsäure wird seit 1955 in pharmakologischer Dosierung als Medikament zur Behandlung von Dyslipidämien und bei arteriosklerotischen Gefäßveränderungen verwendet.

Von Nikotinsäure konnte als erstem Medikament bereits 1975 im Coronary Drug Project nachgewiesen werden, dass es die Mortalität nach Myokardinfarkt signifikant und anhaltend reduziert. Nikotinsäure senkt den LDL-Plasmaspiegel und erhöht den HDL-Spiegel. Während der Nikotinsäureeffekt auf LDL vielfach untersucht wurde, ist über den Mechanismus der HDL-Erhöhung bisher wenig bekannt.

Nicotinsäure stimuliert massiv die PGD₂-Synthese *in vivo*. Der Hauptmetabolit von PGD₂, das 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J₂, wurde kürzlich als wichtigster endogener Aktivator des nukleären Transkriptionsfaktors PPAR γ erkannt. PPAR γ ist entscheidend an der Regulation des Scavenger Rezeptors CD36 und des zellulären Cholesterinexporters ABCA-1 beteiligt. Diese Rezeptoren dominieren die zelluläre Aufnahme modifizierter LDL-Partikel und die Ausschleusung zellulären Cholesterins auf HDL-Partikel und damit die Cholesterinhomöostase in Monozyten/Makrophagen in der Gefäßwand.

Deshalb war es Ziel der Arbeit an einem Makrophagenmodell zu untersuchen, ob Nikotinsäure Scavenger-Rezeptoren und zelluläre Cholesterin-Transporter tatsächlich beeinflusst und so über einen gesteigerten reversen Cholesterintransport aus der Peripherie zur Leber seinen klinischen Nutzen vermitteln könnte.

Als Modelle wurden die differenzierte humane Monozytenlinie MM6, die humane hepatische Linie HepG₂ und frisch präparierte humane Monozyten verwendet. Die Expression der Scavenger Rezeptoren CD36, SR-BI, LOX-1, des LDL-R, des Cholesterinexporters ABCA-1, des Transkriptionsfaktors PPAR γ und von β -Aktin wurden durch reverse Transkription der spezifischen mRNAs, nachfolgende PCR und Quantifizierung der Amplifikate über HPLC bestimmt. Die Proteinexpression von CD36 und PPAR γ wurden mittels spezifischer Antikörper nach Fluoreszenzmarkierung im FACS gemessen. Die Änderung des zellulären Cholesteringehalts durch Inkubationen mit Nikotinsäure, oxLDL und delipidiertem HDL wurde nach zellulärer Lipidextraktion in einem adaptierten enzymatischen Assay gemessen.

Im Makrophagenmodell stimulierte die Inkubation der Zellen mit Nikotinsäure schon nach 3 h und mindestens bis 48 h anhaltend die Transkription von PPAR γ , des PPAR γ abhängigen Scavenger-Rezeptors CD36 und des zellulären Cholesterinexporters ABCA-1. Dagegen blieb die Transkription des ApoB-spezifischen LDL-R und des Scavenger-Rezeptors LOX-1 unverändert. Vergleichbare Effekte waren auch am Hepatozytenmodell nachweisbar. Die Effekte auf die PPAR γ und CD36 Expression waren tendenziell auch auf Proteinebene nachweisbar. Die Stimulation von CD36 und ABCA-1 durch Nikotinsäure konnte auf RNA-Ebene auch an frisch präparierten peripheren Monozyten von Normalpersonen nachgewiesen werden. Die funktionelle Bedeutung der Nikotinsäureeffekte wurde in einem Cholesterin-Aufnahme und Efflux-Assay überprüft. Dabei reduzierte die Inkubation mit Nikotinsäure den zellulären Cholesteringehalt basal und unter oxLDL-Exposition und steigerte den zellulären Cholesterin-Efflux auf delipidiertes HDL.

Diese neuen Effekte der Nikotinsäure auf mehrere Lipid-Rezeptoren und -Transporter können Lipidablagerungen in der Gefäßintima reduzieren, der Schaumzellbildung entgegenwirken und durch vermehrte Einschleusung von zellulärem Cholesterin in den reversen Cholesterintransport zurück zur Leber die HDL-Spiegel erhöhen.

Diese peripheren Effekte der Nikotinsäure ergänzen die Effekte von Statinen und liefern ein Rational für einen potentiell überadditiven klinischen Nutzen durch die Kombinationstherapie, die gegenwärtig klinisch geprüft wird.

C LITERATURVERZEICHNIS

A

1. Acton SL, Scherer PE, Lodish HF, Krieger M. *Expression cloning of SR-BI, a CD36 related class B scavenger receptor*. Journal of Biological Chemistry. Aug. 1994; 269 (33): 21003-21009.
2. Acton SL, Rigotti A, Landschutz KT, Xu s, Krieger M. *Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor*. Science. 1996; 271: 518-520.
3. Aktories K, Jakobs KH, Schulz G. *Nicotinic acid inhibits adipocyte cyclase in a hormone-like manner*. FEBS Letters. 1980; 115: 11-14.
4. Aktories K, Schulz G, Jakobs KH. *Stimulation of a low K_m GTPase by inhibitors of adipocyte adenylate cyclase*. Molecular Pharmacology. 1982; 21: 336-342.
5. Aktories K, Schulz G, Jakobs KH. *Inhibition of adenylate cyclase and stimulation of a high affinity GTPase by the antilipolytic agents, nicotinic acid, acipimox and various related compounds*. Arzneimittelforschung. 1983; 33 (II), Nr. 11: 1525-1527.
6. Altschul R, Hoffer A, Stephen JD. *Influence of nicotinic acid on serum cholesterol in man*. Archives of Biochemistry and Biophysics. 1955; 54: 558-559.
7. Alvarsson M, Grill V. *Impact of nicotinic acid treatment on insulin secretion and insulin sensitivity in low and high insulin responders*. Scandinavian Journal of clinical and laboratory investigation. Oct. 1996; 56 (6): 563-570.
8. Asch AS, Silbiger S, Heimer E, Nachman RL. *Thrombospondin sequence motif (CSVTCG) is responsible for CD36 binding*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 1992; Vol. 182, No. 3: 1208-1217.

B

9. Björnheden T, Babyi A, Bodjers G, Wiklund O. *Accumulation of lipoprotein fractions and subfractions in the arterial wall, determined in an in vitro perfusion system*. Atherosclerosis. 1996; 123: 43-56.
10. Boden WE, Pearson TA. *Raising low levels of high-density lipoprotein cholesterol is an important target of therapy*. American Journal of Cardiology. 2000; 85: 645-650.
11. Bodzioch M, Orsó E, Klucken J, Langmann T, Böttcher A, Diederich W, Drobnik W, Barlage S, Büchler C, Porsch-Özcürümez M, Kaminski WE, Hahmann HW, Oette K, Rothe K, Aslanidis C, Lackner KJ, Schmitz G. *The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease*. Nature Genetics. Aug. 1999; Vol. 22: 347-351.
12. Boie Y, Sawyer N, Slipetz DM, Metters KM and Abramovitz M. *Molecular cloning and characterization of the human prostanoid DP receptor*. The Journal of Biological Chemistry. 1995; 270 (32): 18910-18916.
13. Bortnick A, Rothblat GH, Stoudt G, Hoppe KL, Royer LJ, McNeish J, Francone OL. *The correlation of ATP-binding cassette 1 mRNA levels with cholesterol efflux from various cell lines*. Journal of Biological Chemistry. 2000; 275 (37): 28634-28640.
14. Brown BG, Zhao XQ, Chait A, Fisher LD, Cheung MC, Morse JS, Dowdy AA, Marino EK, Bolson EL, Alaupovic PA, Frohlich J, Albers JJ. *Simvastatin and Niacin, antioxidant vitamins, or the combination for the prevention of coronary disease*. The New England Journal of Medicine. Nov. 29, 2001; Vol. 345, No. 22: 1583-1592.
15. Brown G, Albers JJ, Fisher LD, Schaefer SM, Lin JT, Kaplan C, Zhao XQ, Bisson BD, Fitzpatrick VF, Dodge HT. *Regression of coronary artery disease as a result of intensive lipid-lowering therapy in men with high levels of apolipoprotein B*. The New England Journal of Medicine. 1990 Nov; 323 (19): 1289-1298.
16. Brown MS, Goldstein LJ. *The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor*. Cell. 1997; 89 (3): 331-340.
17. Bungert S, Molday LL, Molday RS. *Membrane Topology of the ATP Binding Cassette Transporter ABCR and its Relationship to ABC1 and Related ABCA Transporters*. The Journal of Biological Chemistry. 2001 June 29; Vol. 276, No. 26: 23539-23546.
18. Butcher RW, Baird CE, Sutherland EW. *Effects of lipolytic and antilipolytic substances on adenosine 3',5'-monophosphate levels in isolated fat cells*. The Journal of Biological Chemistry. Apr 25, 1968; 243 (8): 1705-1712.

C

19. Calvo D, Gomez-Coronado D, Lasuncion MA, Vega MA. *CLA-1 is an 85-kD plasma membrane glycoprotein that acts as a high-affinity receptor for both native (HDL, LDL and VLDL) and modified (oxLDL and acLDL) lipoproteins*. *Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 1997; 17: 2341-2349.
20. Calvo D, Gomez Coronado D, Suarez Y, Lasuncion MA, Vega MA. *Human CD36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL*. *Journal of Lipid Research*. 1998; 39: 777-788.
21. Canner PL, Berge KG, Wenger NK, Stamler J, Friedman L, Prinead RJ, Friedewald W. *Fifteen year mortality in Coronary Drug Project patients: Long-term Benefit with Niacin*. *Journal of American College of Cardiology*. Dec. 1986; Vol. 8 No. 6: 1245-1255.
22. Carlson LA. *Studies on the effect on nicotinic acid on catecholamine-stimulated lipolysis in adipose tissue in vitro*. *Acta medica scandinavica*. 1963; Vol. 173 (fasc. 6): 719-722.
23. Carlson LA, Hamsten A, Asplund A. *Pronounced lowering of serum levels of lipoprotein (a) in hyperlipidaemic subjects treated with nicotinic acid*. *Journal of Internal medicine*. 1989; 226: 271-276.
24. Chawla A. et al. *A PPAR γ -LXR-ABCA-1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis*. *Molecular Cell*. 2001; 7: 161-171.
25. Chawla A, Barak Y, Nagy L, Liao D, Tontonoz P, Evans RM. *PPAR- γ dependent and independent effect on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation*. *Nature Medicine*. Jan. 2001; Vol. 7, No.1: 48-52.
26. Chiang JY, Kimmel R, Stroup D. *Regulation of cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7A1) transcription by the liver orphan receptor (LXR α)*. *Gene*. 2001 Jan 10; 262 (1-2): 257-265.
27. Chinetti G, Gbaguidi FG, Griglio S. *CLA-1/SR-BI is expressed in atherosclerotic Lesion Macrophages and regulated by Activators of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors*. *Circulation*. May 23, 2000; 101: 2411-2417.
28. Chinetti G, Lestavel S, Bocher V, Remaley AT, Neve B, Torra IP, Teissier E, Minnich A, Jaye M, Duverger N, Brewer HB, Fruchart JC, Clavey V, Steals B. *PPAR- α and PPAR- γ activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway*. *Nature Medicine*. Jan. 2001; Vol. 7, No.1: 53-58.
29. Chong PH, Bachenheimer BS. *Current, New and Future Treatments in Dyslipidaemia and Artherosclerosis*. *Drugs*. Jul. 2000; 60 (1): 55-93.
30. The Coronary Drug Project Research Group. *Clofibrate and Niacin in coronary heart disease*. *JAMA*. 1975; 231: 360-381.

D

31. Daviet L, McGregor JL. *Functional roles of membrane glycoprotein CD36*. *Platelets*. 1996; 7: 117-124.
32. Desvergne B, Wahli W. *Peroxisome Proliferator-Activated Receptors: Nuclear Control of Metabolism*. *Endocrine reviews*. 1999; 20 (5): 649-688.
33. Devine JH, Eubank DW, Clouthier DE, Tontonoz P, Spiegelman BM, Hammer RE, Beale EG. *Adipose Expression of the Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Promotor Requires Peroxisome Proliferator-activated Receptor γ and cis-9-Retinoic Acid Receptor Binding to an Adipocyte-specific Enhancer in vivo*. *The journal of biological chemistry*. May 1999; Vol. 274, No. 19: 13604-13612.
34. Draude G, Lorenz RL. *TGF- β 1 downregulates CD36 and scavenger receptor A but upregulates LOX-1 in human macrophages*. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 2000; 278: H1042-H1048.
35. Drenckhahn D, Zenker W. *Benninghoff Anatomie Band 1*. Urban & Schwarzenberg 1994: 55.
36. Dreyer C, Krey G, Keller H, Givel F, Helftenbein G, Wahli W. *Control of the Peroxisomal β -Oxidation Pathway by a Novel Family of Nuclear Hormone Receptors*. *Cell*. Mar 6, 1992; Vol. 68: 879-887.
37. Dugi KA, Amar MJ, Haudenschild CC, Shamburek RD, Bensadoun A, Hoyt RF Jr, Fruchart NJ, Madj Z, Brewer HB Jr, Santamaria-Fojo S. *In vivo evidence for both lipolytic and nonlipolytic function of hepatic lipase in the metabolism of HDL*. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 2000; 20: 793-800.

E

38. Erl W, Hansson GK, de Martin R, Draude G, Weber KS, Weber C. *Nuclear Factor- κ B Regulates Induction of Apoptosis and Inhibitor of Apoptosis Protein-1 Expression in Vascular Smooth Muscle Cells*. *Circulation Research*. 1999; 84: 668-677.
39. Endemann G, Stanton LW, Madden KS, Bryant CM, White RT, Potter AA. *CD36 is a receptor for oxidized low-density lipoprotein*. *The Journal of Biological Chemistry*. 1993; 268 (16): 11811-11816.

F

40. Fitzgerald ML, Moore KJ, Freeman MW. *Nuclear hormone receptors and cholesterol trafficking: the orphans find a new home*. *Journal of Molecular Medicine*. 2002 May; 80 (5): 271-281.
41. Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. *15 desoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR γ* . *Cell*. Dec. 1995; 83: 803-812.
42. Forman BM, Ruan B, Chen J, Schroeffer Jr. GJ, Evans RM. *The orphan nuclear receptor LXR α is positively and negatively regulated by distinct products of mevalonate metabolism*. *Biochemistry*. Sep. 1997; Vol. 94: 10588-10593.
43. Francis GA, Knopp RH, Oram JF. *Defective Removal of Cellular Cholesterol and Phospholipids by Apolipoprotein A-I in Tangier Disease*. *The Journal of Clinical Investigation*. 1995; 96: 78-87.
44. Fraser I, Hughes D, Gordon S. *Divalent cation-independent macrophage adhesion inhibited by monoclonal antibody to murine scavenger receptor*. *Nature*. Jul. 1993; 364: 343-346.

G

45. Gin H, Rigalleau V. *Insulinorésistance: approches thérapeutiques*. *Annales d'Endocrinologie (Paris)*. 1999; Vol. 60: 188-196.
46. Ginsburg GS, Safran C, Pasternak RC. *Frequency of low serum high-density lipoprotein cholesterol levels in hospitalized patients with "desirable" total cholesterol levels*. *American Journal of Cardiology*. 1991; 68: 187-192.
47. Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, et al. *High density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease: four prospective American studies*. *Circulation*. 1989; 79 (1): 8-15.
48. Gotto Jr. AM. *Dyslipidemia and Atherosclerosis, A forecast of Pharmaceutical Approaches*. *Circulation*. 1993; 87 [suppl III]: III-54-III-59.
49. Guyton JR, Goldberg AC, Kreisberg RA, Sprecher DL, Superko HR, O'Connor CM. *Effectiveness of Once-Nightly Dosing of Extended-Release Niacin Alone and in Combination for Hypercholesterolemia*. *American Journal of Cardiology*. 1998; 82: 737-743.

H

50. Hammad SM, Steingrimur S, Twal WO, Drake CJ, Fleming P, Remaley A, Brewer B, Argraves WS. *Cubilin, the endocytic receptor for intrinsic factor-vitamin B12 complex, mediates high density lipoprotein holoparticle endocytosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 1999; 96: 10158-10163.
51. Havel RJ, Eder H, Bradgon J. *The distribution and chemical preparation of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum*. *Journal of Clinical Investigations*. 1955; 34: 1345-1353.
52. Haworth R, Platt N, Keshav S, Hughes D, Darley E, Suzuki H, Kurihara Y, Kodama T, Gordon S. *The macrophage scavenger receptor type A is expressed by activated macrophages and protects the host against lethal endotoxic shock*. *Journal of Experimental Medicine*. 1997; 186: 1431-1439.
53. Hayashida K, Kume N, Minami M, Kita T. *Peroxisome proliferator-activated receptor α ligands increase lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor-1 expression in vascular endothelial cells*. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Dec. 2001; 947: 370-372.

54. Hennekens CH, Ridker PM eds. *Clinical trials in cardiovascular disease: a companion to Braunwald's Heart Disease. Section 2. Treatment trials*. Philadelphia: W. B. Saunders. 1999: 206.
- I**
55. Issemann I, Green S. *Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators*. Nature. 1990 Oct 18; 347 (6295) 645-650.
56. Ilyedjian PB, Marie S, Gjinovci A, Genin B, Deng SP, Buhler L, Morel P, Metha G. *Glucokinase and Cytosolic Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (GTP) in the Human Liver*. The Journal of Clinical Investigation. May 1995; Vol. 95: 1966-1973.
- J**
57. Janowski BA, Willy PJ, Devi TR, Falck JR, Mangelsdorf DJ. *An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR α* . Nature. Oct. 1996; Vol. 383: 728-731.
58. Janowski BA, Grogan MJ, Jones SA, Wisely GB, Kliewer SA, Corey EJ, Mangelsdorf DJ. *Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXR α and LXR β* . Pharmacology. Jan. 1999; Vol. 96: 266-271.
59. Jiang WG, Redfern A, Bryce RP, Mansel RE. *Peroxisome proliferator activated receptor- γ mediates the action of gamma linolenic acid in breast cancer cells*. Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids. 2000; 62 (2): 119-127.
60. Jin FY, Kamanna VS, Kashyap ML. *Niacin decreases removal of high-density lipoprotein apolipoprotein AI but not cholesterol ester by HepG2 cells*. Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology. 1997; 17: 2020-2028.
61. Jin FY, Kamanna VS, Kashyap ML. *Niacin Accelerates Intracellular ApoB Degradation by Inhibiting Triacylglycerol Synthesis in Human Hepatoblastoma (HepG2) Cells*. Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology. 1999; 19: 1051-1059.
- K**
62. Kaijser L, Wennmalm Å. *Nicotinic acid stimulates prostaglandin syntheses in the rabbit heart without releasing noradrenaline*. Acta physiologica Scandinavica. 1978; 102: 246-247.
63. Kashyap ML. *Mechanistic Studies of High-Density Lipoproteins*. American Journal of Cardiology. 1998; 82: 42U-48U.
64. Kashyap ML, McGovern ME, Berra K, Guyton JR, Kwiterovich PO, Harper WL, Toth PD, Favrot LK, Kerzner B, Nash SD, Bays HE, Simmons PD. *Long-term safety and efficacy of a once-daily Niacin/lovastatin formulation for patients with dyslipidemia*. American Journal of Cardiology. 2002 Mar 15; 89 (6): 672-8.
65. Keil U, Liese AD, Hense HW, Filipiak B, Doring A, Stieber J, Löwel H. *Classical risk factors and their impact on incident non-fatal and fatal myocardial infarction an all-cause mortality in southern Germany. Results from the MONICA Augsburg cohort study 1984-1992. Monitoring trends and determinants in cardiovascular diseases*. European Heart Journal. 1998; 19: 1197-1207.
66. Kersten S, Desvergne B, Wahli W. *Roles of PPARs in health and disease*. Nature. May 25, 2000; Vol. 405: 421-424.
67. Kliewer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM. *A Prostaglandin J₂ Metabolite Binds Peroxisome Proliferator – Activated Receptor γ and Promotes Adipocyte Differentiation*. Cell. 1995; Vol. 83: 813-819.
68. Klinker R, Silbernagl S. *Lehrbuch der Physiologie*. Georg Thieme Verlag. 1996; 366-371.
69. Knopp RH, Ginsberg J, Albers JJ, Hoff C, Ogilvie JT, Warnick GR, Burrows E, Retzlaff B, Poole M. *Contrasting effects of unmodified and time-release forms of Niacin on lipoproteins in hyperlipidemic subjects: clues to mechanism of action of Niacin*. Metabolism. 1985 Jul; 34 (7): 642-650.
70. Knopp RH, Alagona P, Davidson M, Goldberg AC, Kafonek SD, Kashyap M, Sprecher D, Superko HR, Jenkins S, Marcovina S. *Equivalent efficacy of a time-release form of Niacin (Niaspan) given once-a-night versus plain Niacin in the management of hyperlipidemia*. Metabolism. 1998 Sep; 47 (9): 1097-1104.
71. Knopp RH. *Evaluating Niacin in its Various Forms*. The American Journal of Cardiology. Dec. 2000; Vol. 86 (12A): 51L-56L.

72. Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH. *Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis*. Blood. 1994 Sep 1; 84 (5):1415-1420.
73. Kozyraki R, Fyfe J, Kristiansen M, Gerdes C, Jacobsen C, Cui S, Christensen EI, Aminoff M, de la Chapelle A, Krahe R. et al. *The intrinsic factor-vitamin B12, cubilin, is a high-affinity apolipoprotein A-I receptor facilitating endocytosis of high-density lipoprotein*. Nature Medicine. June 1999; 5 (6): 656-661.
74. Kwiterovich Jr. PO. *The Metabolic Pathways of High-Density Lipoprotein, Low-Density Lipoprotein, and Triglycerides: A Current Review*. The American Journal of Cardiology. Dec. 2000; Vol. 86 (12A): 5L-10L.

L

75. Laffitte BA, Joseph SB, Walczak R, Pei L, Wilpitz DC, Collins JL, Tontonoz P. *Autoregulation of the Human Liver X Receptor α Promotor*. Molecular and Cellular Biology. 2001 Nov; Vol. 21 No. 22: 7558-7568.
76. Laffitte BA, Repa JJ, Joseph SB, Wilpitz DC, Kast HR, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P. *LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Jan. 2001; Vol. 98, No. 2: 507-512.
77. Langmann T, Klucken J, Reil M, Liebisch G, Luciani MF, Chimini G, Kaminski WE, Schmitz G. *Molecular Cloning of the Human ATP-Binding Cassette Transporter 1 (hABC1): Evidence for Sterol-Dependent Regulation in Macrophages*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 1999; 257: 29-33.
78. Lawn RM, Wade DP, Garvin MR, Wang X, Schwartz K, Porter JG, Seilhamer JJ, Vaughan AM, Oram JF. *The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway*. The Journal of Clinical Investigation. Oct. 1999; Vol. 104, No. 8: R25-R31.
79. Lazar MA. *Progress in cardiovascular biology: PPAR for the course*. Nature Medicine. Jan. 2001; Vol. 7, No.1: 23-24.
80. Li A, Brown KK, Silvestre MJ, Willson TM, Palinski W, Glass CK. *Peroxisome proliferator activated receptor γ ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor deficient mice*. Journal of Clinical Investigation. 2000; Vol. 106, No. 4: 523-531.
81. Lorenzen A, Stannek C, Lang H, Andrianov V, Kalvinsh I, Schwabe U. *Characterization of a G Protein-Coupled Receptor for Nicotinic Acid*. Molecular Pharmacology. 2001; 59: 349-357.
82. Lorenzen A, Stannek C, Burmeister A, Kalvish I, Schwabe U. *G protein-coupled receptor for nicotinic acid in mouse macrophages*. Biochemical Pharmacology. 2002; 64: 245-248.
83. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. Journal of Biological Chemistry. 1951; 193: 265-275.
84. Luo Y, Liang CP, Tall AR. *The Orphan Nuclear Receptor LRH-1 Potentiates the Sterol-mediated Induction of the Human CETP Gene by Liver X Receptor*. The Journal of Biological Chemistry. 2001 July 6; Vol. 276, No. 27: 24767-24773.
85. Lusis AJ. *Atherosclerosis*. Nature. Sep. 14, 2000; 407: 233-241.

M

86. Malik S, Kashyap ML. *Niacin, lipids, and heart disease*. Current Cardiology Reports. 2003 Nov; 5 (6): 470-476.
87. Manninen V, Tenkanen L, Koskinen P, Huttunen JK, Mantari M, Heinonen OP, Frick MH. *Joint effects of serum triglyceride and LDL cholesterol and HDL cholesterol concentrations on coronary heart disease risk in the Helsinki heart study*. Circulation. 1992; 85: 178-187.
88. Martin G, Schoonjans K, Lefebvre AM, Staels B, Auwerx J. *Coordinate Regulation of the Expression of the Fatty Acid Transport Protein and Acyl-CoA Synthetase Genes by PPAR α and PPAR γ Activators*. The Journal of Biological Chemistry. Nov.7, 1997; 272 No.45: 28210-28217.
89. Marx N, Boucier T, Sukhova GK, Libby P, Plutzky J. *PPAR γ Activation in Human Endothelial Cells Increases Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 Expression. PPAR γ as a Potential Mediator in Vascular Disease*. Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology. 1999; 19: 546-551.

90. Matsumoto K, Hirano K, Nozaki S, Takamoto A, Nishida M, Nakagawa-Toyama Y, Janabi MY, Ohya T, Yamashita S, Matsuzawa Y. *Expression of Macrophage (MΦ) Scavenger Receptor, CD36, in Cultured Human Aortic Smooth Muscle Cells in Association with Expression of Peroxisome Proliferator Activated Receptor-γ, Which Regulates Gain of MΦ-Like Phenotype In Vitro, and Its Implication in Atherogenesis*. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 2000; 20: 1027-1032.
91. Mehta JL, Li D. Identification, regulation and function of a novel lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor. *Journal of the American College of Cardiology*. May 1, 2002; 39 (9): 1429-1435.
92. Miller NE. *Pharmacological Intervention for Altering Lipid Metabolism*. *Drugs*. 1990; 40 (Suppl. 1): 26-32.
93. Moreno FJ, Benito M, Sanchez-Medina F, Medina JM, Mayor F. *Pyruvate kinase activity and gluconeogenesis in rat liver after glycogen depletion with nicotinic acid*. *Molecular Cell Biochemistry*. 1976 Nov. 30; 13 (2): 89-93.
94. Moriwaki H, Kume N, Sawamura T, Aoyama T, Hoshikawa H, Ochi H, Nishi E, Masaki T, Kita T. *Ligand specificity of LOX-1, novel endothelial receptor for oxidized low density lipoprotein*. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Diseases*. 1998; 10: 1541-1547.
95. Morrow JD, Parsons WG, Roberts LJ. *Release of markedly increased quantities of Prostaglandin D2 in vivo in humans following the administration of Nicotinic Acid*. *Prostaglandins*. Aug. 1989; Vol. 38, No. 2: 263-274.

N

96. Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM. *Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR gamma*. *Cell*. Apr. 17, 1998; 93 (2): 229-240.
97. Nakagawa T, Nozaki S, Nishida M, Yakub JM, Tomiyama Y, Nakata A, Matsumoto K, Funahashi T, Kameda TK, Kurata Y et al. *Oxidized LDL increases and interferon-gamma decreases expression of CD36 in human monocyte-derived macrophages*. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 1998; 18: 1350-1357.
98. Nicholson AC, Frieda S, Pearce A, Silverstein RL. *Oxidized LDL binds to CD36 on human monocyte-derived macrophages and transfected cell lines. Evidence implicating the lipid moiety of the lipoprotein as the binding site*. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Diseases*. 1995; 15: 269-275.
99. Nozaki S, Kashiwagi H, Yamashita S, Nakagawa T, Kostner B, Tomiyama Y, Nakata A, Ishigami M, Miyagawa J, Kameda-Takemura K, Kurata Y, Matsuzawa Y. *Reduced uptake of oxidized low-density lipoprotein in monocyte-derived macrophages from CD36 deficient subjects*. *Journal of Clinical Investigation*. Oct. 1995; Vol. 96: 1859-1865.

O

100. Oliver WR, Shenk JL, Snaith MR, Russell CS, Plunket KD, Bodkin NL, Lewis MC, Winegar DA, Sznajdman ML, Lambert MH, Xu HE, Sternbach DD, Kliewer SA, Hansen BC, Willson TM. *A selective peroxisome proliferator activated receptor agonist promotes reverse cholesterol transport*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. Apr. 2001. Vol. 98, No. 5; 5306-5311.
101. Olsson AG, Carlson LA, Ånggard E, Ciabattini G. *Prostacyclin production augmented in the short term by nicotinic acid*. *Lancet*. Sep. 1983; 2: 565-566.
102. Oram JF, Lawn RM, Garvin MR, Wade DP. *ABCA1 Is the cAMP-inducible Apolipoprotein that Mediates Cholesterol Secretion from Macrophages*. *The Journal of Biological Chemistry*. Nov. 2000; Vol. 275, No. 44, 34508 – 34511.
103. Orsó E, Broccardo C, Kaminski WE, Bottcher A, Liebisch G, Drobnik W, Gotz A, Chambenoit O, Diederich W, Langmann T, Spruss T, Luciani MF, Rothe G, Lackner KJ, Chimini G, Schmitz G. *Transport of lipids from golgi to plasma membrane is defective in tangier disease patients and Abc1-deficient mice*. *Nature Genetics*. Feb. 2000; 24 (2):192-196.
104. Osborne JC Jr. *Delipidation of plasma lipoproteins*. *Methods in Enzymology*. 1986; Vol. 128: 213-222.

P

105. Pearson TA, Boden WE. *Introduction: Raising Low HDL-Cholesterol in CAD*. The American Journal of Cardiology. Dec. 2000; Vol. 86 (12): 1L-4L.
106. Peet D, Janowski B, Mangelsdorf D. *The LXRs: a new class of oxysterol receptors*. Current Opinion in Genetics & Development. 1998; 571-575.
107. Petley A, Macklin B, Renwick AG, Wilkin TJ. *The Pharmacokinetics of Nicotinamide in Humans and Rodents*. Diabetes. Feb 1995; Vol. 44: 152-155.
108. Piepho RW. *The Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Agents Proven to Raise High-Density Lipoprotein Cholesterol*. The American Journal of Cardiology. Dec. 2000; Vol. 86 (12A): 35L-40L.
109. Pietsch A, Erl W, Lorenz RL. *Lovastatin reduces expression of the combined adhesion and scavenger receptor CD36 in human monocytic cells*. Biochemical Pharmacology. 1996; 52 (3): 433-439.
110. Plosch T, Bloks VW, Terasawa Y, Berdy S, Siegler K, Van Der Sluijs F, Kema IP, Groen AK, Shan B, Kuipers F, Schwartz M. *Sisterolemia in ABC-Transporter G5-deficient mice is aggravated on activation of the liver-X receptor*. Gastroenterology. Jan. 2004; 126 (1): 290-300.

R

111. Remaley AT, Rust S, Rosier M, Knapper C, Naudin L, Broccardo C, Peterson KM, Koch C, Arnould I, Prades C, et al. *Human ATP-binding cassette transporter A-1 (ABC1): genomic organization and identification of the genetic defect in the original Tangier disease kindred*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA. 1999; 96 No. 22: 12685-12690.
112. Repa JJ, Turley SD, Lobaccaro JA, Medina J, Li L, Lustig K, Shan B, Heyman RA, Dietschy JM, Mangelsdorf DJ. *Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers*. Science. 2000 Sep 1; 289 (5484): 1524-1529.
113. Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. *The peroxisome proliferator-activated receptor γ is a negative regulator of macrophage activation*. Nature. Jan. 1998; Vol. 391: 79-82.
114. Ricote M, Glass CK. *New roles for PPARs in cholesterol homeostasis*. TRENDS in Pharmacological Sciences. Sept. 2001; Vol. 22 No. 9: 441-443.
115. Rote Liste[®] 2002, Arzneimittelverzeichnis für Deutschland, Rote Liste[®] Service GmbH, Frankfurt a. M. 2002: 315-316.
116. Rubic T, Trottmann M, Lorenz RL. *Stimulation of CD36 and the key effector of reverse cholesterol transport ATP-binding cassette A1 in monocytoid cells by niacin*. Biochemical Pharmacology. 2004 (67): 411-419.
117. Rubins HB, Robins SJ, Collins D. *Gemfibrozil for the secondary prevention of coronary heart disease in men with of high density lipoprotein cholesterol: Veteran Affairs High-Density Lipoprotein Cholesterol Intervention Trial Study Group*. The New England Journal of Medicine. 1999; 341 (6): 410-418.
118. Rust S, Rosier M, Funke H, Real J, Amoura Z, Piette JC, Deleuze JF, Brewer HB, Duverger N, Deneffe P, Assmann G. *Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1*. Nature Genetics. Aug. 1999; 22 (4): 352-55.

S

119. Saareks V, Mucha I, Sievi E, Riutta A. *Nicotinic Acid and Pyridoxine Modulate Arachidonic Acid Metabolism in vitro and ex vivo in Man*. Pharmacology and Toxicology. 1999; 84: 274-280.
120. Sahin I, Tuncer M, Ayanoglu FG, Kayaalp SO. *Effects of pyridine and some of its derivatives on prostaglandin synthesis*. Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie. 1984; 270: 324-329.
121. Sakai T, Kamanna V, Kashyap ML. *Niacin, but not Gemfibrazil, Selectively Increases LP-AI, a Cardioprotective Subfraction of HDL, in Patients With Low HDL Cholesterol*. Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology. 2001; July 20: 21: 1783-1789.
122. Santamarina-Fojo S, Haudenschild C, Amar M. *The role of hepatic lipase in lipoprotein metabolism and atherosclerosis*. Current Opinion in Lipidology. 1996; 7: 117-123.
123. Sawamura T, Kume N, Aoyama T, Moriwaki H, Hoshikawa H, Aiba Y, Tanaka T, Miwa S, Katsura Y, Kita T et al. *An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein*. Nature. Mar. 1997; 386: 73-77.

124. Scheithe R, Heidenthal AK, Danesch U, Mauthner E, Hapfelmeier G, Becker A, Pietsch A, Weber PC, Hrboticky N. *Acetylated LDL Endocytosis by the Human Monocytic Mono Mac 6sr Cells Is not mediated by the Macrophage Type I and II Scavenger Receptors*. Artherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology. 1997; 17: 1024-1031.
125. Schmitz G, Kaminski WE. *ABC Transporters and Cholesterol Metabolism*. Frontiers in Bioscience. 2001 March 1; 6: d505-514.
126. Schmitz G, Kaminski WE. *ATP-binding Cassette (ABC) Transporters in Atherosclerosis*. Current Atherosclerosis Reports. 2002 May; 4 (3): 243-251.
127. Schulz T, Schiffel H, Scheithe R, Hrboticky N, Lorenz RL. *Preserved Antioxidative Defense of Lipoproteins in Renal Failure and During Hemodialysis*. American Journal of Kidney Diseases. Apr. 1995; 25 (4): 564-571.
128. Sirtori CR, Manzoni C, Lovati MR. *Mechanisms of Lipid-Lowering Agents*. Cardiology. 1991; 78: 226-235.
129. Soga T, Kamohara M, Takasaki J, Matsumoto S, Saito T, Ohishi T, Hiyama H, Matsuo A, Matsushime H, Furuichi K. *Molecular identification of nicotinic acid receptor*. Biochemical and Biophysical Research Communications. Mar 28, 2003; 303 (1): 364-369.
130. Sparrow CP, Parthasarathy S, Steinberg D. *A macrophage receptor that recognizes oxidized low density lipoprotein but not acetylated low density lipoprotein*. The Journal of Biological Chemistry. 1989; 264 (5): 2599-2604.
131. Staels B. *New roles for PPARs in cholesterol homeostasis. Response from Staels*. TRENDS in Pharmacological Sciences. Sept. 2001; Vol. 22 No. 9: 444.
132. Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL. *Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity*. The New England Journal of Medicine. 1989; 320 (14): 915-924.
133. Strickland DK, Gonias SL, Argraves WS. *Diverse roles for the LDL receptor family*. Trends in Endocrinology and Metabolism. 2002 Mar; 13 (2): 66-74.
134. Stryer L. *Biochemie*. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg. 4. Auflage 1996.
135. Suh N, Wang Y, Williams CR, Risingsong R, Gilmer T, Willson TM, Sporn MB. *A new Ligand for the Peroxisome proliferator activated receptor- γ (PPAR γ), GW7845, Inhibits Rat Mammary Carcinogenesis*. Cancer Research. Nov. 15, 1999. 59; 5671-5673.
136. Szakács G, Langmann T, Ozvegy C, Orsó E, Schmitz G, Váradi A, Sarkadi B. *Characterization of the ATPase cycle of human ABCA1: implications for its function as a regulator rather than an active transporter*. Biochemical and Biophysical Research Communications. Nov. 16 2001; 288 (5): 1258-1264.

T

137. Tandon NN, Kralisz U, Jamieson GA. *Identification of glycoprotein IV (CD36) as a primary receptor for platelet-collagen adhesion*. Journal of Biological Chemistry. 1989; 264 (13): 7576-7583.
138. Tatusova TA, Madden TL. *BLAST to sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences*. FEMS Microbiology Letters. 1999; 174 (2): 247-250.
139. Terpstra V, van Amersfoort ES, van Velzen AG, Kuiper J, van Berkel TJC. *Hepatic and Extrahepatic Scavenger Receptors. Function in Relation to Disease*. Artherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology. 2000; 20: 1860-1872.
140. Tontonoz P, Hu E, Devine J, Beale EG, Spiegelman BM. *PPAR γ 2 Regulates Adipose Expression of the Phosphoenolpyruvate Carboxykinase Gene*. Molecular and cellular Biology. Jan. 1995; Vol. 15, No. 1: 351-357.
141. Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM. *PPAR gamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL*. Cell. Apr. 17, 1998; 93 (2): 241-252.
142. Tunaru S, Kero J, Schaub A, Wufka C, Blaukat A, Pfeffer K, Offermanns S. *PUMA-G and HM74 are receptors for nicotinic acid and mediate its anti-lipolytic effect*. Nature Medicine. Mar 9, 2003; 3: 352-355.

V

143. Vaisman BL, Lambert G, Amar M, Joyce C, Ito T, Shamburek RD, Cain WJ, Fruchart-Najib J, Neufeld ED, Remaley AT, Brewer HB Jr, Santamarina-Fojo S. *ABCA1 overexpression leads to hyperalphalipoproteinemia and increased biliary cholesterol excretion in transgenic mice*. Journal of Clinical Investigation. 2001 Jul; 108 (2): 303-9.

144. van Dam MJ, de Groot E, Clee SM, Hovingh GK, Roelants R, Brooks-Wilson A, Zwinderman AH, Smit AJ, Smelt AH, Groen AK, Hayden MR, Kastelein JJ. *Association between increased arterial-wall thickness and impairment in ABCA-1 driven cholesterol efflux: an observational study*. *Lancet*. 2002; 359 (9300): 37-42.
145. Venkateswaran A, Laffitte BA, Joseph SB, Mak PA, Wilpitz DC, Edwards PA, Tontonoz P. *Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear receptor LXR α* . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Oct. 2000; Vol. 97, No. 22. 12097-12102.

W

146. Wahlberg G, Walldius G, Efendic S. *Effects of nicotinic acid on glucose tolerance and glucose incorporation into adipose tissue in hypertriglyceridaemia*. *Scandinavian Journal of clinical and laboratory investigation*. Oct. 1992; 52 (6): 537-545.
147. Waxman DJ. *Minireview. P450 Gene Induction by Structurally Diverse Xenochemicals: Central Role of Nuclear Receptors CAR, PXR, and PPAR*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. Sep. 1999; Vol. 369, No. 1: 11-23.
148. Wilson PWF, Abbott RD, Castelli WP. *High density lipoprotein cholesterol and mortality: the Framingham Heart Study*. *Arteriosclerosis*. 1988; 8: 737-741.
149. Wise A, Foord SM, Fraser NJ, Barnes AA, Elshourbagy N, Eilert M, Ignar DM, Murdock PR, Steplewski K, Green A, Brown AJ, Dowell SJ, Szekeres PG, Hassall DG, Marshall FH, Wilson S, Pike NB. *Molecular identification of high and low affinity receptors for nicotinic acid*. *The Journal of Biological Chemistry*. Mar 14, 2003; 278 (11): 9869-9874.

Y

150. Yeaman SJ. *Hormone-sensitive lipase – A multipurpose enzyme in lipid metabolism*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1990; 1052: 128-132.
151. Yoshida H, Quehenberger O, Kondratenko N, Green S, Steinberg D. *Minimally oxidized low-density lipoprotein increases expression of scavenger receptor A, CD36, and macrossialin in resident mouse peritoneal macrophages*. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Diseases*. 1998; 18: 794-802.
152. Yu L, Bolten C, Bhat G, Woodring-Dietz J, Li S, Prayaga SK, Xia C, Lala DS. *Induction of Human Liver X Receptor Gene Expression Via an Autoregulatory Loop Mechanism*. *Molecular Endocrinology*. 2002; 16 (3): 506-514.

Z

153. Zambon A, Hokanson JE, Brown BG, Brunzell JD. *Evidence for a New Pathophysiological Mechanism for Coronary Artery Disease Regression, Hepatic Lipase-Mediated Changes in LDL Density*. *Circulation*. 1999; 99: 1959-1964.
154. Ziegler-Heitbrock HWL, Thiel E, Fütterer A, Herzog V, Wirtz A, Riethmüller G. *Establishment of a Human Cell Line (Mono Mac 6) with Characteristics of Mature Monocytes*. *International Journal of Cancer*. 1988; 41: 456-461.

D DANKSAGUNG

Zu allererst gilt mein größter Dank Herrn **Prof. Dr. med. Reinhard Lorenz** für die Überlassung eines Themas mit hohem wissenschaftlichen Potential. Als Doktorvater nahm sich Prof. Lorenz sehr viel Zeit bei der Betreuung. Er hatte stets ein offenes Ohr bei anstehenden Problemen, seine Kreativität bei mancher Problemfindung und Lösung gilt meine besondere Bewunderung. Ich hoffe, dass mir Herr Prof. Lorenz auch nach Beendigung meiner Institutsarbeit weiterhin als stets kompetenter und verständnisvoller Gesprächspartner erhalten bleiben wird.

Herrn **Prof. Dr. med. P. C. Weber** möchte ich danken für die hervorragenden Arbeitsmöglichkeiten und das entspannte Arbeitsklima in seinem Institut.

Ein besonderer Dank gilt **Tina Rubic** für die stete Unterstützung meiner Arbeit mit Rat und Tat. Viele Experimentansätze wurden durch ihr fundiertes Wissen und kritisches Denken erst ermöglicht und verbessert. Die fröhliche Zusammenarbeit mit ihr wird mir fehlen.

Herzlichen Dank an **Brigitte Zimmer** für die professionelle Hilfe und die vielseitige Unterstützung jeglicher Art.

Danke auch für **Frau Bretzke** und **Frau Reinhardt** für alle organisatorische Hilfen.

Des weiteren gilt **Steffen Siguda** und **Andreas Lietz** mein außerordentlicher Dank. Als meine persönliche Computerexperten wurde ihr Rat von mir oft und gerne in Anspruch genommen. Meist gehörten scheinbar unlösbare Computerprobleme schon nach einem kurzen Telefonat und einigen Tastenkombinationen der Vergangenheit an.

Danke an **Dorothea Strobach**. Ihre ausführlichen Korrekturvorschläge waren mir eine große Hilfe.

Danke an die **Probanden**, die Ihr Blut für die PBMC Versuche zur Verfügung stellten. Last but not least möchte ich mich auch bei **Philip Ajouri** bedanken. Als guter Freund und Mitbewohner gehört auch er jetzt zum erlauchten Kreis der PPAR γ Experten.

Zuletzt besonderer Dank an **meine Eltern**. Für ihre Begleitung durch alle Höhen und Tiefen der vorliegenden Arbeit, durch ihre materielle und geistige Unterstützung.

E LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Geburt: 2. März 1975 in Wasserburg am Inn
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schul Ausbildung

1981 – 1983 Grunds chule Vaterstetten
1983 – 1985 Grunds chule Ebersberg
1985 – 1994 Gymnasium Grafing (Abitur)

Zivildienst

Sept. 1994 – Okt. 1995 Betreuungszentrum der katholischen Jugendfürsorge e. V., Steinhö-
ring (Kindergarten und Sonderschule für Geistigbehinderte)

Akademische Ausbildung und Berufstätigkeit

Nov. 1995 – Okt 1997 Studium der Humanmedizin an der Julius – Maximilians – Universität
Würzburg (Ärztliche Vorprüfung)
Nov. 1997 – Okt 2002 Studium der Humanmedizin an der Ludwigs – Maximilians –
Universität München (I. und II. Staatsexamen)
April 2000 – Juni 2004 Arbeit an der Dissertation bei Herrn Prof. R. Lorenz (Institut für
Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislauferkrankungen; Klinikum
Innenstadt, Universität München); Thema: „Der Einfluss von
Nikotinsäure auf die Expression von PPAR γ , Scavenger Rezeptoren
und ABCA-1 auf monozytoiden und hepatischen Zellen“
Okt. 2001 – Jan. 2002 Erster Teil des Praktischen Jahres im Fach Chirurgie im KH München
– Harlaching (Abteilung Viszeralchirurgie, Dir. Prof. Horn)
Feb. 2002 – Mai 2002 Zweiter Teil des Praktischen Jahres im Fach Urologie im
Klinikum Grosshadern (Dir. Prof. Hofstetter)
Juni 2002 – Sept. 2002 Dritter Teil des Praktischen Jahres im Fach Innere Medizin im
KH München – Harlaching (Abteilung Hämatologie – Onkologie, Dir.
Prof. Hartenstein)
Oktober 2002 Drittes Staatsexamen
Jan. 2003 – Juni 2004 Arzt im Praktikum (AiP) in der Urologischen Klinik, Klinikum
Grosshadern (Dir. Prof. Hofstetter und Prof. Stief)
Juli 2004 Approbation
seit Juli 2004 Assistenzarzt in der Urologischen Klinik, Klinikum Grosshadern
(Dir. Prof. Stief)

Praktika

März 1996	Pflegepraktikum Unfallchirurgie; KH Ebersberg
August 1996	Pflegepraktikum Innere Medizin; KH Wasserburg am Inn
April 1997	Praktikum Innere Medizin; KH Wasserburg am Inn
März 1998	Famulatur Viszeralchirurgie; KH Ebersberg
März 1999	Famulatur Praxis für Kinderchirurgie bei PD Dr. Angerpointner, Zenettistr. 48, München
April 1999 – Feb. 2001	Praktikum der Anästhesie in der Praxis für Kinderchirurgie (einen Vormittag pro Woche) bei Dr. Günter (Zenettistr. 48, München)
Mai 1999 – Mai 2001	Zusatzkurs "Einführung in die Tropenmedizin"; Klinikum Rechts der Isar, TU München (Prof. Disko; 3 Semester)
August 1999	Famulatur Gynäkologie; Wohlfahrtklinik, Gräfelfing
September 1999	Famulatur Innere Medizin; Hospicio Hospital, Margao, Goa, Indien
März 2001	Famulatur Anästhesie; Paracelsus Klinik, München
April 2001 – Juli 2001	Praktikum der Anästhesie; Paracelsus Klinik, München (einen Vormittag pro Woche)

Originalarbeiten

Rubic T, Trottmann M, Lorenz RL. *Stimulation of CD 36 and the key effector of reverse cholesterol transport ATP-binding cassette A1 in monocytoïd cells by niacin*. Biochemical Pharmacology 2004 Feb 1; 67: 411 - 419.

Reich O, Mseddi A, Zaak D, Trottmann M, Hungerhuber E, Schneede P. *Use of argon plasma coagulation in endourology: in vitro experiments*. Urology 2004 Feb; 63 (2): 387 -391.

Jostarndt K, Rubic T, Kuhn H, Anthosen MW, Andera L, Gellert N, Trottmann M, Weber C, Johansen B, Hrboticky N, Neuzil J. *Enzymatically modified low-density lipoprotein upregulates CD36 in low-differentiated monocytoïd cells in a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-dependent way*. Biochemical Pharmacology. 2004 Mar 1; 67 (5): 841-854.

Sonstige Aktivitäten

seit 1985	Mitglied im Bund der Pfadfinderinnen und Pfadfinder (BdP) e. V.; Gruppenleitertätigkeit (Stamm Barrakuda, Vaterstetten)
1996 – 1999	Leitung von Kursen zur Ausbildung von Jugendgruppenleitern bayerischer Pfadfinderstämme

Sprachkenntnisse

Deutsch	Muttersprache
Englisch	fließend in Wort und Schrift (Leistungskurs Englisch)
Französisch	Schulkenntnisse

Freizeitinteressen

Musik (Klavier), Konzerte, Reisen (Südostasien, Japan, Indien, USA, Mexiko, Neuseeland),
Schwimmen