
Aus dem Institut für Prophylaxe und Epidemiologie der Kreislaufkrankheiten

Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof.Dr.med. P.C. Weber

Effekte des anti-inflammatorischen Cytokins IL-10 auf die Expression und Regulation
von Scavenger Rezeptoren, des Cholesterinexporters ABCA1 und die Cholesterin-
Homöostase monocytoider Zellen

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Tina Rubic

aus Split/Kroatien

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

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

2. Berichterstatter: Prof.Dr.med. B. Göke

Mitberichterstatter: Prof.Dr.rer.nat.Dr.rer.biol.hum. K.-S. Boos

Prof.Dr.med. St. Endres

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

Tag der mündlichen Prüfung: 15.12.2004

Der Beginn aller Wissenschaften ist das Erstaunen, dass die Dinge sind, wie sie sind.
(Aristoteles)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
1 Einleitung.....	1
1.1 Atherogenese	1
1.2 Monocyten und Makrophagen in der Atherosklerose.....	2
1.3 Schaumzellen	3
1.4 Lipoproteine und ihre Bedeutung in der Atherosklerose.....	4
1.5 Scavenger Rezeptoren und peroxisome proliferator activated receptors (PPARs)	8
1.5.1 Scavenger Rezeptoren.....	8
1.5.2 Peroxisome proliferator activated receptors (PPARs)	9
1.6 Reverser Cholesterintransport und der Cholesterinexporter ABCA1.....	11
1.6.1 Reverser Cholesterintransport.....	11
1.6.2 Regulation des Cholesterinexporter ABCA1	13
1.7 Adhäsionsmoleküle in der Atherogenese	14
1.8 Cytokine, T _H 1- und T _H 2-Antwort	16
1.9 IL-10, IL-10 Rezeptor (IL-10R) und die klassische IL-10R- Signaltransduktion..	17
1.10 Die Rolle von IL-10 in Atherosklerose-Tiermodellen, <i>in vitro</i> und humanen Krankheiten.....	19
2 Zielsetzung der Arbeit	23
3 Material und Methoden.....	25
3.1 Verwendete Geräte	25

3.2	Chemikalien und Reagenzien	26
3.3	Lösungen und Puffer	30
3.3.1	DEPC-Wasser für Real-time RT-PCR	30
3.3.2	HHMC-Lösung für FACS-Versuche	31
3.3.3	TBE-Puffer für Agarosegele	31
3.3.4	Annealing-Puffer für RNAi.....	31
3.3.5	Puffer für Gesamtproteinextraktion (WCEB-Puffer).....	31
3.3.6	Puffer für Cytosol- und Kernextraktion	31
3.3.6.1	Hypononischer Puffer	31
3.3.6.2	Lysepuffer	31
3.3.6.3	0,02 M KCl-Puffer	32
3.3.6.4	0,6 M KCl-Puffer	32
3.3.6.5	0,3 M KCl-Puffer	32
3.3.6.6	Protease-Inhibitor-Mix	32
3.3.7	Sammel- und Laufgele für Western Blot	32
3.3.8	Puffer für Western Blot	33
3.3.8.1	Lower- und Upper Tris Puffer.....	33
3.3.8.2	Laufpuffer.....	33
3.3.8.3	Transferpuffer.....	33
3.3.8.4	TBS-Puffer	33
3.3.8.5	Blockierungspuffer.....	33
3.3.8.6	Probenpuffer	33
3.3.9	Lösungen für LDL-Präparation	34
3.3.9.1	Dichtegradientenlösungen	34
3.3.9.2	PBS-Puffer	34

3.3.9.3	Resolubilisierungslösung für dHDL	34
3.3.10	Herstellung der Oil Red O Färbelösung	34
3.4	Oligonukleotidprimer.....	35
3.5	Kultivierung eukaryotischer Zellen	36
3.5.1	Kultur von THP-1 Zellen, transient und stabil transfizierten THP-1 Zellen	36
3.5.2	Präparation und Kultur von PBMCs.....	36
3.5.3	Einfrieren und Auftauen von eukaryotischen Zellen	37
3.6	Kultivierung von Bakterien	37
3.6.1	Anzucht von <i>E.coli</i> Bakterien.....	37
3.6.2	Lagerung von <i>E.coli</i> Bakterien	37
3.7	Arbeiten mit Nukleinsäuren.....	38
3.7.1	Isolierung von Gesamt-RNA	38
3.7.2	DNase Behandlung von Gesamt-RNA	39
3.7.3	Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA	39
3.7.4	Agarose-Gelelektrophorese	39
3.7.5	Präzipitation von Nukleinsäuren.....	40
3.7.6	Isolierung des ligierten pSilencer™ 1.0-U6 Vektors aus dem Agarosegel. 40	
3.7.7	Plasmidgewinnung aus <i>E.coli</i> Bakterien	41
3.7.7.1	Midi-Präparation aus <i>E.coli</i> Bakterien und Plasmidverdau.....	41
3.7.7.2	Maxi-Präparation aus <i>E.coli</i> Bakterien.....	41
3.7.8	Plasmidsequenzierung	42
3.8	RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction).....	42
3.8.1	Reverse Transkription.....	42
3.8.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	43

3.8.3	Real-time RT-PCR	43
3.8.3.1	Spezifität der Produkte	44
3.8.3.2	Effizienz der PCR.....	44
3.8.3.3	Absolute und relative Quantifizierung	45
3.8.3.4	Etablierung der PCR-Parameter	46
3.9	RNA interference (RNAi)	47
3.9.1	Herstellung der siRNA Konstrukte und Subklonierung.....	48
3.9.1.1	Annealing von Oligonukleotiden für RNAi	49
3.9.1.2	Ligation mit dem pSilencer™ 1.0-U6 Vektor.....	49
3.9.1.3	Transformation von kompetenten <i>E.coli</i> Bakterien (DH5 α) mittels Hitzeschock	50
3.9.1.4	Klonierung.....	50
3.9.1.5	Restriktionsanalysen für die Konstrukte	51
3.9.1.6	Transfektion von THP-1 Zellen	51
3.9.1.7	Stabile Transfektion von THP-1 Zellen	52
3.9.1.8	Transiente Transfektion von THP-1 Zellen	52
3.10	Durchflusszytometrie/FACS	52
3.10.1	Oberflächenproteine	53
3.10.1.1	CD36-Färbung.....	53
3.10.1.2	ICAM-1-Färbung	54
3.10.2	Intrazelluläre Proteine	54
3.10.2.1	PPAR γ -Färbung.....	54
3.11	Western Blot.....	55
3.11.1	Gesamtproteinextraktion aus PMA-differenzierten THP-1 Zellen	55
3.11.2	Cytosol-Kern-Extraktion aus PMA-differenzierten THP-1 Zellen	56

3.11.3	Proteinbestimmung nach Lowry.....	57
3.11.4	Polyacrylamidgele für Western Blot.....	57
3.11.5	Transfer der Proteine auf Nitrocellulosemembran.....	58
3.11.6	Inkubation mit Antikörpern und Immundetektion.....	58
3.12	Arbeiten mit Lipoproteinen	59
3.12.1	Isolierung von Lipoproteinen aus Plasma.....	59
3.12.2	Entsalzung von nativem LDL (natLDL).....	60
3.12.3	Herstellung von oxidiertem LDL (oxLDL)	60
3.12.4	Delipidierung von HDL (dHDL)	61
3.12.5	Zelluläre Lipidextraktion und Cholesterin-Messung.....	61
3.12.6	Zellulärer Lipid-Aufnahme-Efflux-Assay	62
3.13	Fettfärbung mittels Oil Red O	62
3.14	Messung von zyklischem AMP (cAMP).....	63
3.15	TransAM™ Assay für die NFκB Untereinheiten p50 und p65.....	63
4	Ergebnisse.....	65
4.1	Etablierung der Real-time RT-PCR.....	65
4.1.1.1	Standardgerade und Schmelzkurvenanalyse.....	66
4.2	IL-10 reduziert die Expression von CD36.....	69
4.2.1	Transkription von CD36 nach IL-10 Exposition	69
4.2.1.1	THP-1 Zellen und PMA-differenzierte THP-1 Zellen.....	69
4.2.1.2	IL-10 Effekt auf CD36 in PBMCs.....	70
4.2.2	CD36 Proteinexpression mittels Durchflusszytometrie nach IL-10 Behandlung	71
4.2.3	CD36 Expression nach Koinkubationen mit IL-10 und dem PPARγ- Agonisten 15d-PGJ ₂ oder Indomethacin.....	71

4.3	IL-10 reduziert die Expression und Translokation von PPAR γ	73
4.3.1	IL-10 und die Proteinexpression von PPAR γ mittels Durchflusszytometrie	73
4.3.2	IL-10 und die Proteinexpression von PPAR γ mittels Western Blot	74
4.4	IL-10 induziert die Expression von ABCA1	75
4.4.1	Transkription von ABCA1	75
4.4.1.1	Effekte von IL-10 auf ABCA1 in THP-1 Zellen und PMA- differenzierten THP-1 Zellen	75
4.4.1.2	Effekte von IL-10 auf ABCA1 in PBMCs	76
4.4.2	Proteinexpression von ABCA1 mittels Western Blot	77
4.4.3	Koinkubationen von IL-10 mit PPAR γ -Agonisten und ABCA1 Expression	77
4.4.3.1	15d-PGJ ₂ als PPAR γ -Agonist	77
4.4.3.2	Koinkubationen mit dem PPAR α Liganden Fenofibrat.....	78
4.4.3.3	ABCA1 Induktion über den LXR α -Signaltransduktionsweg	79
4.4.3.4	ABCA1 Expression bei Koinkubationen mit dem RXR α Liganden 9-cis retinoic acid (9-cis RA)	80
4.4.3.5	IL-10 Effekt und STAT3-STAT5-Hemmung	81
4.4.3.6	IL-10 Effekt und Proteinkinase A (PKA)-Hemmung	82
4.4.4	IL-10 induziert zelluläres cAMP	83
4.5	IL-10 induziert die Expression von LXR α	84
4.5.1	IL-10 und Transkription von LXR α	84
4.5.2	IL-10 und Proteinexpression von LXR α	85
4.5.3	Koinkubationen mit IL-10 und LXR α Transkription	86
4.5.3.1	Koinkubationen mit dem LXR α Liganden 22-Hydroxycholesterol (22- OHC)	86

4.5.3.2	Koinkubation mit dem RXR α Ligand 9-cis retinoic acid (9-cis RA).....	87
4.5.3.3	PPAR α Ligand Fenofibrat.....	88
4.6	IL-10 hat keinen Effekt auf SR-BI.....	89
4.7	IL-10 induziert die Expression des LDL-Rezeptors in PMA-differenzierten THP-1 Zellen	89
4.8	IL-10 Effekte auf die Aufnahme und Efflux von Cholesterin mit oxidiertem LDL (oxLDL) und delipidiertem HDL (dHDL).....	90
4.8.1	Zelluläre Granularitätsbestimmung nach Lipoprotein-Aufnahme mittels Durchflusszytometrie.....	92
4.9	Oil Red O Färbung nach Aufnahme- und Efflux-Versuchen	93
4.10	IL-10 reduziert die LPS-induzierte ICAM-1 Expression	94
4.11	IL-10 hat keinen Effekt auf die I κ B- α Expression.....	95
4.12	Effekte von IL-10 auf die NF κ B Untereinheiten p50 und p65.....	96
4.12.1	IL-10 Effekte auf die cytosolische Fraktion von NF κ B (p50 und p65).....	97
4.12.2	IL-10 Effekte auf die nukleäre Fraktion von NF κ B	97
4.13	IL-10 Effekte nach Ausschaltung des LXR α -Signaltransduktionsweges mittels RNA interference (RNAi).....	98
4.13.1	Verifizierung des LXR α siRNA Konstruktes (Restriktionsverdau).....	99
4.13.1.1	IL-10 Effekte auf ABCA1 in LXR α "knock down" Zellen.....	101
5	Diskussion.....	105
5.1	Etablierung der Real-time RT-PCR.....	105
5.2	IL-10 reduziert CD36 via Inhibition von PPAR γ	106
5.3	Auswirkung der reduzierten CD36 Expression auf die Aufnahme von oxLDL.....	107
5.4	IL-10 stimuliert den reversen Cholesterintransport	108

5.4.1	IL-10 induziert den Cholesterinexporter ABCA1 und den Transkriptionsfaktor LXR α	108
5.4.2	Regulationsmechanismen von ABCA1 durch IL-10	109
5.5	Funktionelle Auswirkung der gesteigerten ABCA1 Expression.....	113
5.6	IL-10 und SR-BI Expression.....	114
5.7	IL-10 und LDL-Rezeptor Expression	114
5.8	IL-10 reduziert die LPS-induzierte Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1	115
5.9	Einfluss von IL-10 auf I κ B- α und die NF κ B Untereinheiten p50 und p65.....	116
5.10	RNA interference (RNAi) mit dem LXR α -Signalweg	117
5.11	Mögliche medizinische Bedeutung der IL-10 Effekte auf die zelluläre Cholesterin-Homöostase	119
6	Zusammenfassung.....	121
7	Literatur.....	125
	Danksagung.....	145
	Publikationsliste	147
	Curriculum vitae.....	151

Abkürzungsverzeichnis

A (Absorption)

ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A1)

Apo (Apolipoprotein)

APS (Ammoniumpersulfat)

bp (Basenpaare)

C (Konzentration)

CETP (Cholesterinester-Transferprotein)

cAMP (zyklisches AMP)

CRE (cAMP response element)

cDNA (komplementäre DNA)

C_t-Wert (threshold cycle)

dHDL (delipidiertes high density lipoprotein)

DMSO (Dimethylsulfoxid)

DEPC (Diethylpyrocarbonat)

DTT (Dithiothreitol)

ddH₂O (Reinstwasser)

dsRNA (doppelsträngige RNA)

DNA (desoxyribonucleic acid)

Da (Dalton)

EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)

FITC (Fluoreszeinisothiozyanat)

FCS (foetal calf serum)

FSC (forward scatter)

FACS (fluorescent associated cell sorter)

GFP (green fluorescence protein)

HMG-CoA-Reduktase (Hydroxymethylglutaryl-CoA-Reduktase)

HDL (high density lipoprotein)

22-OHC (22-Hydroxycholesterol)

HRP (horse radish peroxidase)

IFN γ (Interferon gamma)

IL-10R (Interleukin-10 Rezeptor)

ICAM-1 (intercellular adhesion molecule-1)

IDL (intermediate density lipoprotein)

IL (Interleukin)

JAK1 (Janus Kinase 1)

LCAT (Lecithin-Cholesterin-Acyl-Transferase)

LXR α (liver X receptor alpha)

LDL (low density lipoprotein)

LDL-Rezeptor (low density lipoprotein Rezeptor)

LPS (Lipopolysaccharid)

LOX-1 (lectin-like oxidised LDL receptor-1)

LB-Medium (Luria Broth-Medium)

LXRE (LXR α response element)

mmLDL (minimally oxidised low density lipoprotein)

MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1)

MCSF (monocyte colony stimulating factor)

MMPase (Matrix-Metallo-Proteinase)

M-MLV (moloney murine leukemia virus)

- mRNA (messenger RNA)
- natLDL (natives low density lipoprotein)
- NOS (nitric oxide synthase)
- NFκB (nuclear factor kappa B)
- ORO (Oil Red O Färbung)
- oxLDL (oxidiertes low density lipoprotein)
- OD (optische Dichte)
- PMA (Phorbolmyristatacetat)
- PLTP (Phospholipid-Transferprotein)
- PPAR (peroxisome proliferator activated receptor)
- 15d-PGJ₂ (15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J₂)
- PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride)
- PPREs (PPAR-response elements)
- PSGL-1 (P-Selektin glycoprotein-1)
- PFA (Paraformaldehyd)
- PNPP (p-Nitrophenylphosphat)
- PBMCs (periphere mononukleäre Blutzellen)
- PBS (phosphate buffered saline)
- PKA (Proteinkinase A)
- RT (Raumtemperatur)
- U/min (Umdrehungen pro Minute)
- RCT (reverser Cholesterintransport)
- RNAi (RNA interference)
- RNA (ribonucleic acid)
- RXR (retinoic acid X receptor)

9-cis RA (9-cis retinoic acid)

RISC (RNA-inducing silencing complex)

SR-BI (Scavenger Rezeptor Typ BI)

SR-A (Scavenger Rezeptor A)

STAT3 (signal transducer and activator of transcription-3)

SOCS-3 (suppressor of cytokine signalling-3)

SH2 (*Src* homology 2)

SREBP (sterol regulatory element binding protein)

SCAP (SREBP cleavage activating protein)

SBE (STAT binding element)

SDS (Natriumdodecylsulfat)

siRNA (small interference RNA)

SSC (sideward scatter)

TG (Triglyceride)

T_H1 (T-Helfer Zellen Typ 1)

T_H2 (T-Helfer Zellen Typ 2)

TNF- α/β (tumor necrosis factor alpha/beta)

TGF β (transforming growth factor beta)

Tyk2 (Tyrosinkinase 2)

UV (Ultraviolett)

VCAM (vascular cell adhesion molecule)

VLDL (very low density lipoprotein)

Es wurden die allgemeinen SI-Einheiten und die chemischen Elementsysteme verwendet.

1 Einleitung

1.1 Atherogenese

Früher wurde der atherosklerotische Prozess im Wesentlichen als passive Ablagerung von Lipiden und Lipoproteinen in der Gefäßwand aufgefasst. Heute muss man die Atherosklerose als einen hoch komplexen, aktiven Prozess mit inflammatorischen Reaktionen in der Gefäßwand betrachten (Ross 1999). Atherosklerose-bedingte Erkrankungen sind immer noch die Haupttodesursache in westlichen Ländern (Lusis 2000, Ross 1995). Für eine Reihe von Therapeutika, wie z.B. lipidsenkende Medikamente (z.B. Niacin, Statine, Fibrate), die an arteriosklerotischen Risikofaktoren angreifen, wurde auch ein vitaler Nutzen gezeigt.

Die frühe Phase der Atherogenese, noch vor Entstehung morphologischer Veränderungen, ist gekennzeichnet durch die sogenannte endotheliale Dysfunktion. Die Permeabilität des Endothels für Lipoproteine und andere zirkulierende Stoffe im Plasma nimmt dabei zu. In der Folge werden Endothelzellen aktiviert und exprimieren vermehrt sogenannte Adhäsionsmoleküle auf ihrer Zelloberfläche. Vor allem die Selektine vermitteln zunächst den temporären Kontakt von Monocyten/Lymphocyten/Thrombocyten mit dem Endothel. Durch eine weitere Familie von Adhäsionsmolekülen, sogenannte CAMs (cellular adhesion molecules), kommt es zur festen Anheftung von diesen Zellen an die Gefäßwand. Im Weiteren Verlauf dringen vor allem die Monocyten/Lymphocyten aktiv in den subintimalen Raum ein. Auto- und parakrine pro-inflammatorische Cytokine und Chemokine regen weitere Monocyten an, in die Intima einzudringen. Monocyten differenzieren dort zu Makrophagen und nach Lipidbeladung entstehen Schaumzellen, deren Ansammlung als "fatty streak" makroskopisch die frühen Läsionen kennzeichnet. Während der Differenzierung setzen die Makrophagen ihrerseits vermehrt inflammatorische Cytokine und Chemokine, wie z.B. TNF- α , verschiedene Interleukine und MCP-1, frei. Zu Schaumzellen transformierte Makrophagen akkumulieren in der wachsenden Läsion. Diese pro-inflammatorische Umgebung aktiviert auch die glatten Muskelzellen in der Gefäßwand. Sie wandern aus

der Media in die entstehende intimale Läsion ein. Glatte Muskelzellen, Fibroblasten und sezernierte extrazelluläre Matrix können eine fibröse Kappe über den Läsionen bilden. Untersuchungen zeigten, dass sich Makrophagen, T-Lymphocyten und Mastzellen vermehrt in der Schulter von atherosklerotischen Plaques finden. Unter dem Einfluss von Scherkräften und Matrix-Metalloproteinasen kann diese fibröse Kappe aufreißen. An diesen Stellen kommt es gehäuft zur Ruptur (Libby 2001). Der thrombogene Lipidkern der Plaques sowie Collagen und Tissue Factor (TF) werden im Gefäß luminal exprimiert (Wilcox et al. 1989). Die Aktivierung von Thrombocyten und des Hämostasesystems führt zur Thrombusbildung.

1.2 Monocyten und Makrophagen in der Atherosklerose

Monocyten und Makrophagen spielen eine zentrale Rolle bei inflammatorischen Krankheiten, wie z.B. Rheumatoide Arthritis, Atherosklerose oder Asthma. Das proinflammatorische Potential der Monocyten, ihre Aktivierung und Differenzierung und spätere Sekretion von Mediatoren, wie z.B. Cytokinen, Chemokinen, Radikalen, proteolytischen Enzymen, Prostaglandinen, Wachstumsfaktoren, beeinflusst entscheidend die Progression dieser Erkrankungen (Osterud and Bjorklid 2003).

Wenn zirkulierende, periphere Monocyten in den subendothelialen Bereich transmigrieren, kommt es zur Reifung der Monocyten zu Makrophagen. Dieser Differenzierungsprozess macht die Zellen bereit für die aktive Teilnahme an der inflammatorischen Antwort. Dieser Prozess ist von vielen Transkriptionsfaktoren abhängig. So konnte auch eine neue Rolle von NF κ B in diesem Zusammenhang gezeigt werden (Takashiba et al. 1999).

Natives LDL kann die Intima in beide Richtungen durchdringen. Kommt es allerdings zu einem exzessiven Eindringen von LDL in die Gefäßwand, kann das native LDL in der Matrix an Proteoglycane gebunden werden. LDL wird in der Gefäßwand chemisch modifiziert und von Makrophagen aufgenommen, die zu Schaumzellen degenerieren und inflammatorische Mediatoren freisetzen können, wie z.B. TNF α , IL-1 β , IL-8 und MCSF.

1.3 Schaumzellen

Der Mechanismus der Schaumzellbildung ist intensiv untersucht worden (Berliner et al. 1995, Brown and Goldstein 1986, Chisolm et al. 1999, Steinberg 1997, Witztum and Steinberg 1991). Normalerweise sind Makrophagen vor toxischer Cholesterinbelastung geschützt, weil bei erhöhten intrazellulären Cholesterinpools die Transkription des LDL-Rezeptors herunter reguliert wird (s.a. 1.4). Die Regulation des LDL-Rezeptors ebenso wie die HMG-CoA-Reduktase (Hydroxymethylglutaryl-CoA-Reduktase) unterliegt also einem negativen Feedback-Mechanismus über den SREBP-Signaltransduktionsweg.

Modifiziertes LDL, vor allem oxidiertes LDL, wird über andere Rezeptoren in die Zellen aufgenommen, die sogenannten Scavenger Rezeptoren, die keiner negativen Feedback-Regulation unterliegen (Berliner et al. 1995, Chisolm et al. 1999, Steinberg 1997, Witztum and Steinberg 1991). Im Gegenteil kann sogar ihr Substrat, modifiziertes LDL, die Transkription einiger Scavenger-Rezeptoren induzieren. Sie unterliegen somit im gewissen Sinne einer positiven Feedback-Kontrolle. Weiterhin hat es verschiedene Effekte auf den Lipidmetabolismus und die Akkumulation von Makrophagen (Gomez-Munoz et al. 2000, Jong et al. 2000, Stengel et al. 1998, Wang et al. 1999). Modifiziertes LDL wirkt nicht nur selbst chemotaktisch auf Monocyten, sondern reguliert zudem die Expression von MCSF (Quinn et al. 1987, Rajavashisth et al. 1990) und MCP-1 (Leonard and Yoshimura 1990). Des Weiteren kann oxidiertes LDL auch pro-inflammatorische Effekte induzieren, wie z.B. die Proliferation von glatten Muskelzellen (Hamilton et al. 1999, Martens et al. 1999, Matsumura et al. 1999, Sakai et al. 1999), die Expression pro-inflammatorischer Cytokine (Huang et al. 1999a, Petit et al. 1999), eine erhöhte Expression von Matrix-Metalloproteinasen und eine inhibierte Expression von iNOS (Huang et al. 1999b). Daneben wirkt modifiziertes LDL in höheren Konzentrationen direkt cytotoxisch (Li et al. 1998).

Der Arrest zirkulierender Monocyten und Lymphocyten durch Hochregulierung von spezifischen Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und VCAM-1 sind einer der ersten Schritte in der Atheroskleroseentstehung. Abbildung 1-1 zeigt eine Übersicht von verschiedenen beteiligten Zellen und Mediatoren.

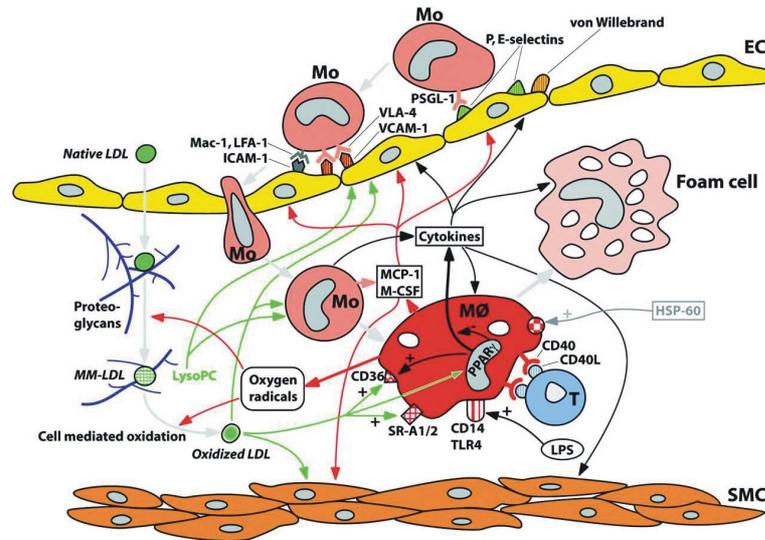


Abbildung 1-1: Schaumzellbildung in der Intima. Die Rolle von Monocyten und Makrophagen in der Atherogenese unter Mitwirkung von Lipoproteinen, Scavenger Rezeptoren, Adhäsionsmolekülen und anderen. Aus (Osterud and Bjorklid 2003).

Monocyten und Makrophagen können aber auch reparative Effekte in der Atherosklerose ausüben. Wichtig hierbei zu erwähnen ist der reverse Cholesterintransport, der für die Mobilisierung von Cholesterin aus der Gefäßwand und den Rücktransport zur Leber eine Rolle spielt. Die Expression von spezifischen Membranproteinen, des Cholesterinexporters ABCA1 und die Sekretion von ApoE sind hierfür von großer Bedeutung (Stein et al. 2002).

1.4 Lipoproteine und ihre Bedeutung in der Atherosklerose

Lipoproteine lassen sich aufgrund ihrer unterschiedlichen Eigenschaften in verschiedene Klassen unterteilen. Mit Hilfe der Ultrazentrifugation können die Lipoproteine nach ihrer Dichte in fünf Hauptklassen aufgetrennt werden (Kostner 1976): Chylomikronen ($d < 1,000$), Very Low Density Lipoprotein (VLDL, $d < 1,006$), Intermediate Density Lipoprotein (IDL, $d < 1,019$), Low Density Lipoprotein (LDL, $d < 1,063$) und High Density Lipoprotein (HDL₂, $d < 1,125$ und HDL₃, $d < 1,210$). In Tabelle 1 ist die chemische Zusammensetzung der Plasma-Lipoproteine aufgeführt.

Tabelle 1: Die Zusammensetzung der Plasma-Lipoproteine angegeben in % der Lipoproteinmasse.

Lipoprotein	Protein	Triglyceride	Phospholipide	Cholesterin frei	Cholesterin verestert
in % der Lipoproteinmasse					
Chylomikronen	1-2	85-90	4-8	1-3	2-5
VLDL	10	55-65	15-20	5-10	10-15
LDL	25	5-10	20-25	5-10	35-45
HDL	45-55	3-5	25-30	5-10	15-45

Die Apolipoproteine besitzen als Proteinkomponente der Lipoproteine neben der Stabilisierung der Lipidkomplexe auch spezifische Funktionen im Lipidtransport. Ihre Einteilung erfolgt nach der ABC-Nomenklatur (Alaupovic 1971). Apo AI und Apo AII sind die hauptsächlichen Proteine der HDL-Fraktion, LDL besteht im Wesentlichen aus Apo B100. Die drei niedermolekularen Peptide Apo CI, Apo CII und Apo CIII sind in der VLDL-, aber auch in der HDL-Fraktion nachweisbar (s. Tabelle 2).

Tabelle 2: Verteilung der Lipoproteine angegeben in % des gesamten Proteinanteils.

Lipoprotein	AI	AII	B	CI	CII	CIII
in % des gesamten Proteinanteils						
Chylomikronen	Spuren	Spuren	5-20	15	15	40
VLDL	Spuren	Spuren	40	10	10	30
LDL	-	-	95-98	Spuren	Spuren	Spuren
HDL	65-70	20-25	Spuren	1-2	1-2	2-4

Cholesterin ist ein wichtiger Bestandteil aller Zellmembranen. Da Cholesterin schlecht wasserlöslich ist, kann es im Blut nur mit Hilfe der sogenannten Lipoproteine transportiert werden. Lipoproteine umschließen das Cholesterin mit ihrem Eiweißanteil so, dass es wasser-dispergierbar wird und im Blut befördert werden kann. Für den Transport von Cholesterin im Blut sind besonders die Lipoproteine LDL und HDL verantwortlich. LDL-Partikel transportieren das Cholesterin von der Leber zu den übrigen Körperzellen, die das Cholesterin aufnehmen und weiterverarbeiten können. Die Aufnahme erfolgt über den LDL-Rezeptor und unterliegt einem negativen Feedback-Mechanismus. Ist reichlich Cholesterin vorhanden, wird sowohl die Expression des LDL-Rezeptors als auch die Aktivität des Schrittmacherenzym HMG-CoA-Reduktase, das für zelluläre *de novo* Cholesterinsynthese verantwortlich ist, über den SREBP-Signaltransduktionsweg vermindert (Brown and Goldstein 1986, Goldstein and Brown 1990). Die HDL-Partikel hingegen nehmen das Cholesterin umgekehrt von den peripheren Körperzellen auf und befördern es zur Leber. Dort wird das Cholesterin teilweise zu Gallensäuren oxidiert. Cholesterin und Gallensäuren können biliär sezerniert werden und werden dann teilweise reabsorbiert und teilweise fäkal ausgeschieden.

Exogen zugeführte Lipide, darunter auch Cholesterin, werden im Duodenum und Dünndarm als Micellen resorbiert. In der Darmwand werden daraus als Transportpartikel die größten Lipoproteine mit geringster Dichte, die sogenannten Chylomikronen synthetisiert. Sie erreichen über die Lymphe unter Umgehung des Portalkreislaufes den systemischen Blutkreislauf und so die peripheren Gewebe. Gefäßendothelständige Lipasen in der Mikrozirkulation spalten aus ihren Hauptfettkomponenten, die Triglyceride und freie Fettsäuren ab. Dabei verbleiben cholesterinreiche Restpartikel, die sogenannten Remnants. Sie werden bei Passage durch die Leber von den Zellen erkannt, gebunden und über spezifische Rezeptoren aufgenommen.

Die Leber synthetisiert ihrerseits einen etwas kleineren Lipoprotein-Typ, die triglyceridreichen VLDLs. In der Zirkulation werden sie wiederum durch Gefäßwandlipasen unter Abgabe von Triglyceriden verkleinert. Es entstehen IDLs und schließlich die stark cholesterinangereicherten LDLs.

Ein weiterer wichtiger Weg zur Elimination von Cholesterin läuft über HDL. Diese sehr kleinen Lipoproteine werden primär in der Leber und im Darm synthetisiert. Sie sind in der Lage, Cholesterin in veresterter Form der Leber zuzuführen, von der es nach Metabolisierung zu Gallensäuren ausgeschieden wird (Simons and Ikonen 2000).

Natives LDL kann vor allem in der Intima durch Oxidation, Lipolyse und Aggregation modifiziert werden. Die wichtigste Modifikation stellt die Oxidation dar. Zuerst entsteht mmLDL (minimal oxidiertes LDL), das noch gering verändert ist, aber bereits die Monocyten/Endothel-Interaktionen induzieren kann (Watson et al. 1997). Dieses mmLDL wird noch vom LDL-Rezeptor erkannt und aufgenommen. Wird das LDL jedoch stärker oxidiert, erfolgt die Aufnahme über die sogenannten Scavenger Rezeptoren. Wandern zirkulierende Monocyten in den subendothelialen Bereich, reifen sie zu Makrophagen und exprimieren diese Scavenger Rezeptoren auf ihrer Oberfläche. Da die Aufnahme von modifizierten LDL-Partikeln über Scavenger Rezeptoren keinem Feedback-Mechanismus unterliegt, kommt es nach exzessiven Aufnahmen von oxidiertem LDL zu Schaumzellbildung (Berliner et al. 1995, Bhakdi et al. 1995, Steinberg et al. 1989).

1.5 Scavenger Rezeptoren und peroxisome proliferator activated receptors (PPARs)

1.5.1 Scavenger Rezeptoren

Scavenger Rezeptoren sind Rezeptoren, die oxidiertes LDL und strukturell nicht verwandte Liganden binden können. Der quantitativ wichtigste Vertreter der Scavenger Rezeptoren ist CD36. CD36 ist ein 88 kDa großes Plasmamembranglykoprotein, das auf fast allen Zellen exprimiert werden kann (Greenwalt et al. 1992, Abumrad et al. 1993, Han et al. 1997). Der Rezeptor ist nicht nur an der Phagozytose von apoptotischen Zellen und Zellfragmenten beteiligt, sondern auch für die zelluläre Aufnahme von modifiziertem LDL, hauptsächlich oxidiertem LDL, verantwortlich (Endemann et al. 1993, Nicholson et al. 1995, Nozaki et al. 1995). Auch der Scavenger Rezeptor B1 (SR-BI) gehört zur CD36 Familie. Er weist ca. 30 % Aminosäuresequenzhomologie zu CD36 auf (Acton et al. 1996). Im Gegensatz zu CD36, bindet SR-BI auch natives LDL und HDL und wird als hepatischer HDL-Rezeptor angesehen (Murao et al. 1997, Acton et al. 1996, Temel et al. 1997, Rigotti et al. 1995). Scavenger Rezeptor A (SR-A) wird in Monocyten und Hepatocyten exprimiert und ist hauptsächlich für die Aufnahme von acetyliertem LDL verantwortlich (Kunjathoor et al. 2002).

Ein weiterer Vertreter der Scavenger Rezeptoren ist LOX-1 (lectin-like oxidised LDL receptor-1) (Sawamura et al. 1997). LOX-1 ist ubiquitär exprimiert und bindet mild oxidiertes LDL, aber kein natives LDL (Sawamura et al. 1997, Adachi et al. 1997).

Tabelle 3: Übersicht über die wichtigsten Scavenger Rezeptoren und den LDL-Rezeptor. ECs = Endothelzellen, SMCs = glatte Muskelzellen, PS = Phospholipide, natLDL = natives LDL, mmLDL = minimal oxidiertes LDL, oxLDL = oxidiertes LDL, acLDL = acetyliertes LDL.

Rezeptoren	Liganden	Expression in
CD36	oxLDL, LDL, HDL, VLDL, PL, apoptotische Zellen, Fettsäuren	Monocyten, Makrophagen, Thrombocyten, ECs, SMCs
SR-A	HDL, acLDL, oxLDL, LDL, VLDL, LPS, apoptotische Zellen	Hepatocyten, Monocyten
SR-BI	HDL, LDL, oxLDL, acLDL, VLDL, PL	Hepatocyten, Monocyten
LOX-1	oxLDL, apoptotische Zellen	ECs, SMCs, Monocyten, Makrophagen, Fibroblasten
LDL-Rezeptor	natLDL, mmLDL	alle Zellen

1.5.2 Peroxisome proliferator activated receptors (PPARs)

In den letzten Jahren hat eine Gruppe neuer Regulatoren der Genexpression, peroxisome proliferator activated receptors (PPARs), ein wachsendes Interesse in der Atheroskleroseforschung gefunden. Anfänglich als Zielproteine für bestimmte lipidsenkende Substanzen identifiziert, die in der Leber von Nagern zur Vermehrung und Vergrößerung von Peroxisomen führt, wurden PPARs dann als nukleäre Transkriptionsfaktoren auch beim Menschen charakterisiert. PPARs besitzen eine Liganden- sowie eine DNA-Bindedomäne. Nach der Aktivierung durch ihre Liganden bilden sie Heterodimere mit RXR (retinoic acid X receptor) und binden an definierte PPREs (PPAR-response elements) in der Promotorregion ihrer Zielgene. Bisher sind drei Unterarten bekannt: PPAR α , PPAR β /PPAR δ und PPAR γ .

PPAR α reguliert vor allem die Genexpression in Lipidkatabolismen (Kliwer et al. 1997). Aktivatoren für diesen Transkriptionsfaktor sind mehrfach-ungesättigte Fettsäuren (PUFA), wie Docosahexaensäure (DHA), Eicosapentaensäure (EPA) oder

Eicosatetraensäure (ETYA), Eicosanoide (Kliwer et al. 1997), sowie lipidsenkende Fibratderivate, wie Fenofibrat oder Gemfibrozil (Forman et al. 1997). PPAR α wird in unterschiedlichen Organen, wie Leber, Herz und Niere exprimiert und reguliert dort unter anderem die Genexpression von Enzymen der Fettsäureoxidation und bestimmter Apolipoproteine, wie z.B. Apo CIII (Auboeuf et al. 1997).

PPAR γ ist einer der zentralen Mediatoren der Genregulation in der Adipogenese (Tontonoz et al. 1994) und kontrolliert in Adipocyten die Expression der Lipoprotein-Lipase, des fatty-binding-Proteins und weiterer Gene. Aktivatoren für PPAR γ sind natürlich vorkommende Substanzen, wie das Prostaglandin-D2-Derivat (15d-PGJ₂) oder bestimmte Formen oxidiertes Linolensäure, sowie eine Gruppe neuer Antidiabetika-Thiazolidindione (TZDs), wie Troglitazon, Piaglitazon oder Rosiglitazon (Lehmann et al. 1995). Diese Substanzen erhöhen die Insulinsensitivität, die Glukose- und Fettsäureaufnahme in peripheren Organen und Fettgewebe und senken so den Blutzucker- und Triglyceridspiegel (Schoonjans and Auwerx 2000).

In Monocyten und Makrophagen konnte gezeigt werden, dass PPAR α -Aktivierung die Expression von Tissue Factor (TF) und dadurch die pro-koagulatorische Aktivität hemmt (Marx et al. 2001). Auf molekularer Ebene scheinen die Effekte von PPAR α vor allem durch inhibitorische Wirkungen auf andere transkriptionelle Signalwege, wie die Aktivierung von AP-1 und NF κ B, vermittelt zu werden (Marx et al. 2001, Staels et al. 1998).

Vergleichbar mit PPAR α wird PPAR γ ebenfalls in Endothelzellen und Monocyten/Makrophagen exprimiert (Jiang et al. 1998, Marx et al. 1999, Marx et al. 1998, Ricote et al. 1998a, Ricote et al. 1998b). PPAR γ hat eine protektive Wirkung. So kann z.B. die Reduktion von ICAM-1 und E-Selektin durch Troglitazon und 15d-PGJ₂ zu einer verminderten Einwanderung von Monocyten in die Gefäßwand führen (Pasceri et al. 2000). Darüber hinaus hemmen PPAR γ -Aktivatoren die IFN γ -induzierte Freisetzung von chemotaktisch-wirksamen Proteinen, sogenannte Chemokine. Diesen wird eine besondere Bedeutung im Rahmen der "Anlockung" von monocytären Zellen zugesprochen (Marx et al. 2000).

Im Gegensatz zu diesen positiven Effekten von PPAR γ -Aktivatoren in Monocyten und Makrophagen gibt es Arbeiten, die die Stimulation von potentiell pro-atherogenen Mechanismen zeigen konnten. So führt eine Aktivierung von PPAR γ zu einer vermehrten Expression des Scavenger Rezeptors CD36, was eine vermehrte Aufnahme von oxidiertem LDL und eine Differenzierung zu Schaumzellen begünstigt (Nagy et al. 1998, Tontonoz et al. 1998).

1.6 Reverser Cholesterintransport und der Cholesterinexporter ABCA1

1.6.1 Reverser Cholesterintransport

John Glomset stellte schon vor ungefähr 30 Jahren die Hypothese des reversen Cholesterintransportes auf, da zwar alle Zellen Cholesterin synthetisieren, aber nicht katabolisieren können, könne es sonst zu Cholesterinakkumulationen kommen (Glomset 1968). Reverser Cholesterintransport bedeutet, dass Cholesterin von den peripheren extrahepatischen Zellen und Geweben zur Leber und vielleicht auch zum Darm zur Katabolisierung und Exkretion transportiert wird und die als einzige Organe dazu nennenswert in der Lage sind. Entscheidend für den reversen Cholesterintransport im Plasma ist das HDL bzw. Apo A-I (Sviridov and Nestel 2002). Die normale Beladung von HDL bzw. Apo A-I mit zellulärem Cholesterin erfordert aber einen zellulären Cholesterinexporter ABCA1 (ATP-binding cassette transporter A1). Das ABCA1 Gen wurde 1994 von der Gruppe um Chimini kloniert (Luciani et al. 1994). 1999 entdeckten drei Arbeitsgruppen unabhängig voneinander, dass die durch extrem niedrige HDL-Spiegel charakterisierte Tangier Krankheit durch Mutationen im ABCA1 Gen hervorgerufen wird und mit diesem neuen Schlüsselprotein konnte man nun die Mechanismen und die Regulation des Cholesterineffluxes untersuchen (Bodzioch et al. 1999, Rust et al. 1999, Brooks-Wilson et al. 1999). Es sind mindestens drei unterschiedliche Mechanismen des zellulären Cholesterineffluxes bekannt: einfache Diffusion aus der Membran auf Akzeptormoleküle, SR-BI-vermittelter Efflux und ABCA1-vermittelter Efflux. Die einfache Diffusion durch die Membran wird eingeschränkt durch die extrem schlechte Wasserlöslichkeit von Cholesterin, das Vorhandensein von Akzeptoren und dem Konzentrationsgradienten. Der Rezeptor SR-

BI vermittelt den Lipidaustausch zwischen Zellmembran und Plasmakompartiment bidirektional. Im Gegensatz dazu fördert der Cholesterinexporter ABCA1 nur den unidirektionalen Efflux aus den Zellen auf HDL und dürfte *in vivo* der quantitativ absolut dominierte Mechanismus des zellulären Cholesterineffluxes sein (Yancey et al. 2003).

Der reverse Cholesterintransport umfasst mindestens fünf Schritte:

- (1) Abgabe von Cholesterin aus den Zellen an spezifische Akzeptoren im Plasma (Cholesterinefflux)
- (2) Veresterung von freiem Cholesterin innerhalb der HDL-Partikel durch Lezithin-Cholesterin-Acyl-Transferase (LCAT)
- (3) Transfer von Cholesterinestern zu den Apo B-enthaltenden Lipoproteinen (Cholesterintransfer)
- (4) Remodeling von HDL und
- (5) Aufnahme von Cholesterin aus den HDL-Partikeln in die Leber und möglicherweise auch durch die Nieren und Darm, sowie endokrine Drüsen über Lipoprotein-Rezeptoren (Cholesterinaufnahme) (Fielding and Fielding 1995).

Das folgende Schema zur HDL Inter-Konversion ist entnommen dem Übersichtsartikel von Sviridov und Nestel (Sviridov and Nestel 2002) (Abbildung 1-2). Reverser Cholesterintransport beginnt mit dem ABCA1-abhängigen Efflux des zellulären Cholesterins auf lipidfreies Apo A-I und damit der Bildung von $\text{pre}\beta_1$ -HDL-Partikeln. Diese kleinen lipidarmen Partikel ($\text{pre}\beta_1$ -HDL) sind der initiale Akzeptor für zelluläres Cholesterin. Durch zunehmende Akkumulation von Cholesterin wachsen diese Partikel zu größeren Partikeln, dem sogenannten $\text{pre}\beta_2$ -HDL. Durch Wirkung der LCAT wird Cholesterin zunehmend verestert und durch möglichen Erwerb von zusätzlichen Apo A-I Molekülen reifen $\text{pre}\beta_2$ zu α_3 -HDL Partikeln. Diese Partikel erlangen weiter Cholesterin von $\text{pre}\beta$ -HDL und vielleicht auch von peripheren Zellen (Sasahara et al. 1998), und werden so zu größeren α_2 -HDL- und α_1 -HDL-Partikeln geformt. Der nächste Reifungsschritt von HDL beinhaltet den Austausch von akkumulierten

Cholesterinestern gegen Triglyceride durch die Beteiligung von Cholesterinester-Transferprotein (CETP), den Transfer von Phospholipiden durch die Beteiligung von Phospholipid-Transferprotein (PLTP) und die Hydrolyse von TGs und Phospholipiden durch die hepatische Lipase, ohne dass eine Aufnahme in die Leber erforderlich ist. Es werden so wieder kleinere α_3 -HDL-Partikel und lipidfreies Apo A-I zurückgewonnen (Liang et al. 1994, Liang et al. 1995). Die zuletzt genannten werden erneut durch zelluläres Phospholipid und Cholesterin re-lipidiert, um $\text{pre}\beta_1$ -HDL-Partikel zu bilden.

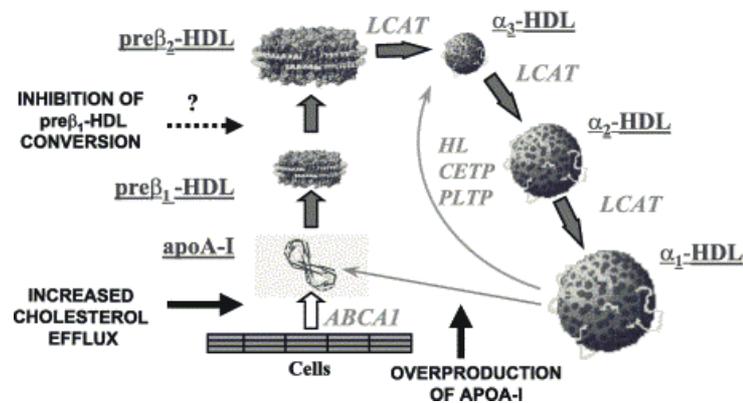


Abbildung 1-2: Turnover von HDL-Untereinheiten während des reversen Cholesterintransportes (aus (Sviridov and Nestel 2002)).

1.6.2 Regulation des Cholesterinexporter ABCA1

Die zelluläre Expression von ABCA1 wird u.a. durch cAMP (zyklisches AMP), Oxysterole, 9-cis RA (9-cis retinoic acid), PPAR Agonisten, $\text{IFN}\gamma$ (Panousis and Zuckerman 2000), $\text{IL-1}\beta$ (Hamon et al. 1997, Kronqvist et al. 1999) und $\text{TGF}\beta$ (Panousis et al. 2001) reguliert. Langmann und Kollegen zeigten, dass es nach einer Inkubation mit acetyliertem LDL zu einer Induktion der ABCA1 Transkription und Proteinexpression in humanen Monocyten kam (Langmann et al. 1999). Auch konnte gezeigt werden, dass Oxysterole ABCA1 stimulieren können und zwar über die Aktivierung und Heterodimerbildung des Transkriptionsfaktors $\text{LXR}\alpha$ (liver x receptor α) und $\text{RXR}\alpha$ (retinoic acid x receptor α) (Repa et al. 2000). Lawn und Kollegen berichteten in ihrer Arbeit, dass cAMP eine 10-fache Steigerung von ABCA1 in humanen Fibroblasten hervorrufen konnte (Lawn et al. 1999). Dies wurde auch von anderen Arbeitsgruppen bestätigt (Haghsassand et al. 2001, Oram et al. 2000). Chinetti

und Kollegen, aber auch andere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass PPAR α - und PPAR γ -Agonisten die ABCA1 mRNA Expression in Makrophagen und den Apo AI-medierten Cholesterinefflux induzieren konnten (Chinetti et al. 2001, Oliver et al. 2001). Dies wurde in Makrophagen von Tangier Kranken nicht gefunden (Chinetti et al. 2001). Chawla und Kollegen berichteten, dass Ligandenaktivierung von PPAR γ zu einer Induktion von LXR α und somit zur ABCA1 Induktion führt (Chawla et al. 2001).

Tabelle 4: Regulation der ABCA1 Expression.

ABCA1 Induktion	ABCA1 Reduktion
cAMP (zyklisches AMP)	IFN γ (Interferon γ)
Oxysterole	
9-cis RA (retinoic acid)	
PPAR-Agonisten	
TGF β (transforming growth factor β)	
IL-1 β (Interleukin-1 β)	
acetyliertes LDL	
Apolipoproteine	

1.7 Adhäsionsmoleküle in der Atherogenese

Wie bereits erwähnt, wird die Atherosklerose als ein inflammatorischer Prozess aufgefasst. Während dieser Entzündungsreaktion kommt es zu einer Vielfalt von Zell-Zell-Interaktionen, so z.B. zwischen Monocyten/Leukocyten und dem Endothel. Die

Proteine, die die mechanische Interaktionen vermitteln, werden Adhäsionsmoleküle genannt und können in vier Familien gegliedert werden: (1) Selektine, (2) Selektinliganden, (3) Integrine und (4) Mitglieder der Immunglobulinsuperfamilie (Harlan 1992). Eine wichtige Funktion dieser Adhäsionsmoleküle besteht darin, die Leukocyten-Rekrutierung aus der Zirkulation durch initiales Rollen der Leukocyten auf dem Endothel, die fixe Adhäsion und Aktivierung und schließlich die Transmigration der Leukocyten in das Gewebe zu fördern. Das erste Rollen der Leukocyten wird überwiegend durch Selektine der Leukocyten und Endothelzellen und Selektinliganden der jeweils anderen Zellen bewerkstelligt, wie z.B. E-Selektin auf Endothelzellen, P-Selektin auf Thrombocyten, L-Selektin auf Leukocyten und PSGL-1 (P-Selektin glycoprotein-1) (Kansas 1996). Die feste Adhäsion und Transmigration der Leukocyten wird dagegen durch Integrine, heterodimere Moleküle, wie z.B. CD29 ($\beta 1$ Integrin, VLA), CD18 ($\beta 2$ Integrin), CD11a/18 ($\alpha_L \beta_2$, LFA-1), CD11b/18 ($\alpha_M \beta_2$, Mac-1), GPIIb/IIIa ($\beta 3$) und durch Interaktion mit Adhäsionsmolekülen der Immunglobulinsuperfamilie (ICAM-1, -2 und -3, PECAM-1, VCAM-1) vermittelt (Harlan 1992), (Huo and Ley 2001). In Abbildung 1-3 ist eine schematische Darstellung der Interaktion von Leukocyten und Endothelzellen und die Rolle der verschiedenen Adhäsionsmoleküle gezeigt (Blankenberg et al. 2003). Diverse Adhäsionsmoleküle konnten in atherosklerotischen Läsionen vermehrt nachgewiesen werden (Johnson-Tidey et al. 1994, Davies et al. 1993, Poston et al. 1992, O'Brien et al. 1993, Nakashima et al. 1998). Viele als arteriosklerotische Risikomarker etablierte Noxen erhöhen die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Monocyten oder Endothelzellen und vermitteln wahrscheinlich so frühe Schritte der Atherogenese (Ross 1999).

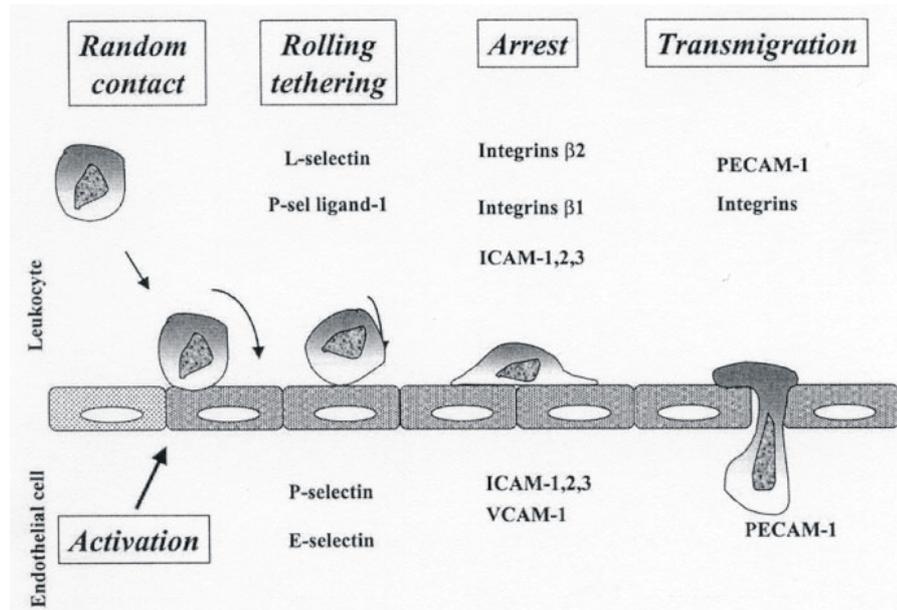


Abbildung 1-3: Schematische Darstellung der Interaktion von Leukozyten und Endothelzellen während dem initialen Schritt in der Atherosklerose und die Rolle der verschiedenen Adhäsionsmoleküle in diesem Prozess aus (Blankenberg et al. 2003).

1.8 Cytokine, T_H1- und T_H2-Antwort

Cytokine sind kleine, meist lösliche Proteine (ca. 25 kDa) und werden von verschiedenen Zellen im Körper vor allem myeloiden und lymphatischen Zellen meist auf einen Stimulus durch die Bindung an den passenden Rezeptor sezerniert. Sie wirken autokrin und parakrin vor allem auf Lymphocyten, Monocyten und Leukozyten (Janeway 2001).

Zwei Subpopulationen von CD4⁺ T-Zellen, die Typ 1 T-Helfer Zellen (T_H 1) und Typ 2 T-Helfer Zellen (T_H 2), lassen sich anhand ihres Cytokinmusters unterscheiden. Die T_H 1 Zellen produzieren pro-inflammatorische Cytokine, wie z.B. IFN γ , IL-1 β , IL-2 und TNF α/β , die Makrophagen aktivieren können und für die Zell-medierte Immunität verantwortlich sind. Im Gegensatz dazu, produzieren die T_H 2 Zellen anti-inflammatorische Cytokine, wie z.B. IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13, die für eine starke humorale Antwort (Antikörperreaktion) verantwortlich sind und verschiedene Makrophagenfunktionen inhibieren können. Zusätzlich zu ihren unterschiedlichen Rollen in der humoralen Immunantwort können polarisierte T_H 1 und T_H 2 Zellen für

verschiedene immunopathologische Reaktionen im Menschen verantwortlich sein (Romagnani 2001).

1.9 IL-10, IL-10 Rezeptor (IL-10R) und die klassische IL-10R-Signaltransduktion

IL-10 wird auch als CSIF (cytokine synthesis inhibitory factor), MCSFIII (mast cell growth factor III) und B-TCGF (B cell-derived T cell growth factor) bezeichnet. Das Gen für IL-10 ist auf Chromosom 1q lokalisiert, hat eine Größe von 4.7 kb und besitzt fünf Exons und vier Introns. Es kodiert für ein 18 kDa homodimeres Protein, das hauptsächlich von CD4⁺ T-Zellen und aktivierten Monocyten/Makrophagen produziert wird. Eine einzigartige Eigenschaft des anti-inflammatorischen Cytokins IL-10 ist seine Fähigkeit, pro-inflammatorische Cytokine, wie z.B. IL-1 β , IL-6 und IL-8, zu hemmen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass IL-12, IFN γ und IL-4 die IL-10 Synthese steigern. IL-10 erhöht die Expression des Chemokin-Rezeptors CCR5 und inhibiert die Expression von MHC Klasse II Antigenen, CD54 (ICAM-1), CD80 (B7) und CD86 (B7.2) (Moore et al. 2001). IL-10 wirkt in verschiedenen *in vitro* und Tiermodellen stark anti-inflammatorisch. IL-10 vermittelt seine Effekte über einen spezifischen Oberflächenrezeptor der Cytokinrezeptor-Klasse II.

Der IL-10 Rezeptor Komplex ist ein Tetramer und besteht aus zwei IL-10R1 Ketten, an denen der Ligand bindet (Abbildung 1-4) und zwei IL-10R2 Ketten, die essentiell für die Signaltransduktion sind (Abbildung 1-5). Sowohl die IL-10R1 Ketten als auch die IL-10R2 Ketten gehören zur Cytokinrezeptor-Familie Klasse II, die auch IFN α und IFN γ umfasst.

IL-10R1 Ketten werden auf Zellen hematopoetischer Herkunft exprimiert, wie z.B. T-Zellen, B-Zellen, Monocyten, Makrophagen und andere. IL-10R2 Ketten scheinen ubiquitär exprimiert zu sein und sind in ihrer Funktion noch nicht voll verstanden (de Waal Malefyt 2001).

Weder die IL-10R1 noch die IL-10R2 Kette besitzen eine intrinsische Kinaseaktivität. Eine IL-10 Behandlung induziert in den Zellen eine Phosphorylierung der IL-10R1-

assoziierten JAK1 (Janus kinase 1) und der IL-10R2-assoziierten TYK2 Kinasen (Finbloom and Winestock 1995, Ho et al. 1995).



Abbildung 1-4: Kristallstruktur des humanen IL-10/IL-10R1 Komplexes (aus der Proteindatenbank PDB RCSB).

Funktionelle IL-10 Rezeptorkomplexe (IL-10R) sind Tetramere, die zwei IL-10R1 Polypeptidketten und zwei IL-10R2 Ketten besitzen. Die IL-10-Signaltransduktion in Monocyten wird durch die Bindung des homodimerischen Cytokins IL-10 an die extrazellulären Domänen der zwei benachbarten IL-10R1 Moleküle initiiert. Die Bindung aktiviert die Rezeptor-assoziierten Janus Tyrosinkinasen, JAK1 und Tyk2. Diese Kinasen phosphorylieren dann spezifisch Tyrosinreste (Y446 und Y496) an der intrazellulären Domäne der IL-10R1 Kette. Einmal phosphoryliert, dienen diese Tyrosinreste und ihre flankierenden Peptidsequenzen als temporäre Andockstellen für den latenten, cytosolischen Transkriptionsfaktor STAT3 (signal transducer and activator of transcription 3). STAT3 bindet transient über seine SH2 (*Src* homology 2) Domäne an diese IL-10R1 Kette und wird seinerseits durch die Rezeptor-assoziierten JAKs Tyrosin-phosphoryliert. Ist STAT3 einmal aktiviert, löst es sich vom Rezeptor und dimerisiert mit anderen phosphorylierten STAT3 Molekülen. Sie translozieren in den Kern, wo sie mit hoher Affinität an SBEs (STAT binding elements), die sich in den Promotorsequenzen der verschiedenen IL-10-abhängigen Gene befinden, binden. Eines dieser Gene ist SOCS-3 (suppressor of cytokine signalling-3), ein Mitglied der neu identifizierten Familie der JAK/STAT Inhibitorgene. Die Fähigkeit von IL-10 sehr

schnell die Expression von SOCS-3 zu induzieren, könnte erklären, wie IL-10 die Induktion vieler Gene in Monocyten durch andere Cytokine hemmt (Abbildung 1-5).

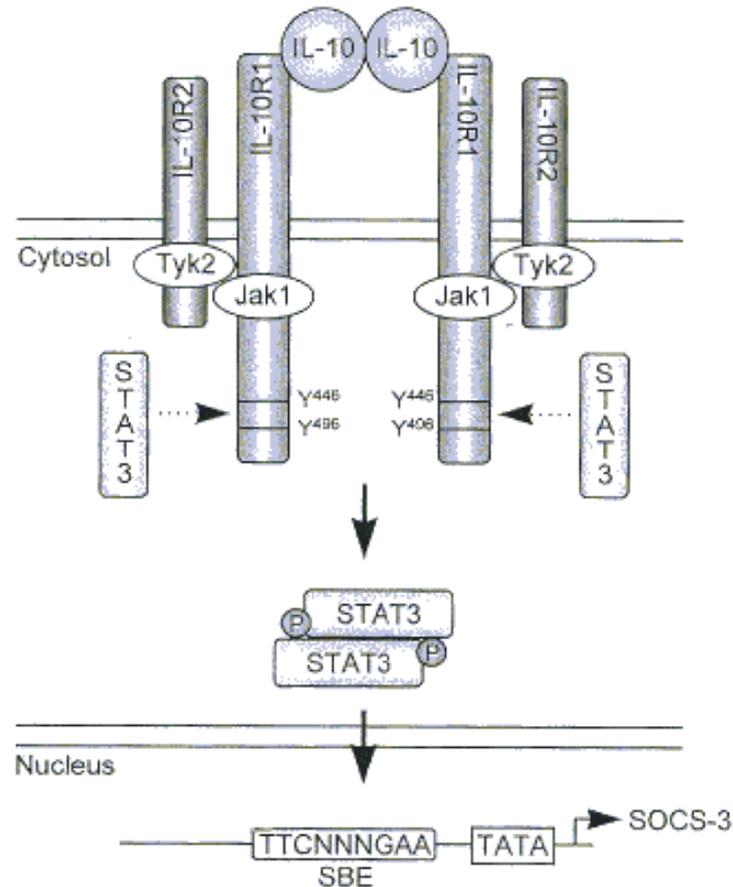


Abbildung 1-5: Ein Modell für die IL-10-Signaltransduktion in humanen mononukleären Phagozyten aus (Donnelly et al. 1999).

1.10 Die Rolle von IL-10 in Atherosklerose-Tiermodellen, *in vitro* und humanen Krankheiten

IL-10 besitzt ausgeprägt anti-inflammatorische Eigenschaften, was in verschiedenen Tiermodellen gezeigt werden konnte (de Waal Malefyt 2001). IL-10 spielt eine protektive Rolle bei lokalisierten inflammatorischen Krankheiten, wie Pankreatitis (Van Laethem et al. 1995), Hepatitis (Arai et al. 1995), Peritonitis (van der Poll et al. 1995), aber auch bei Rheumatoider Arthritis (Kasama et al. 1995, Tanaka et al. 1996). Bei IL-

IL-10 knock out (IL-10^{-/-}) Mäusen wurden eine erhöhte T-Zell-Infiltration, IFN γ - und iNOS-Expression und andere Marker für eine Entzündungsreaktion gefunden.

Außer den anti-inflammatorischen Effekten von IL-10 konnte in verschiedenen Atherosklerose-Tiermodellen aber auch eine Reduktion der Bildung von Schaumzellen durch IL-10 gezeigt werden. In den Arbeiten von Pinderski-Oslund und Kollegen (Pinderski Oslund et al. 1999) und Mallat und Kollegen (Mallat et al. 1999a) wurden IL-10 überexprimierende, transgene (IL-10^{+/+}) Mäuse und IL-10 knock out (IL-10^{-/-}) Mäuse generiert. Nach einer 15- bis 16-wöchigen atherogenen Diät wurden keine Veränderungen im Gesamtcholesterinspiegel gesehen, wobei es bei IL-10^{-/-} Mäusen zu einem erhöhten LDL- und einem erniedrigten HDL-Spiegel kam. Die LDL- und HDL-Cholesterinwerte waren zwischen Wildtypmäusen und transgenen Mäusen vergleichbar. Ein erniedrigter HDL-Cholesterin Spiegel deutet auf eine potentielle Rolle der Balance zwischen pro- und anti-inflammatorischen Cytokinen im HDL-Metabolismus hin. Außerdem waren die atherosklerotischen Läsionen bei IL-10^{-/-} Mäusen um ein vielfaches größer als bei Wildtypmäusen. Die Läsionen zeigten "fatty streak" Formationen, eine fibröse Kappe und massive Akkumulationen von Lipiden in mononukleären Zellen. Die IL-10^{+/+} dagegen wiesen minimale Läsionen im Vergleich zu Kontrolltieren auf und waren somit vor Schaumzellbildung geschützt (Abbildung 1-6). Es lag deshalb nahe, Effekte von IL-10 auf die zelluläre Cholesterin-Homöostase in Makrophagen zu vermuten.

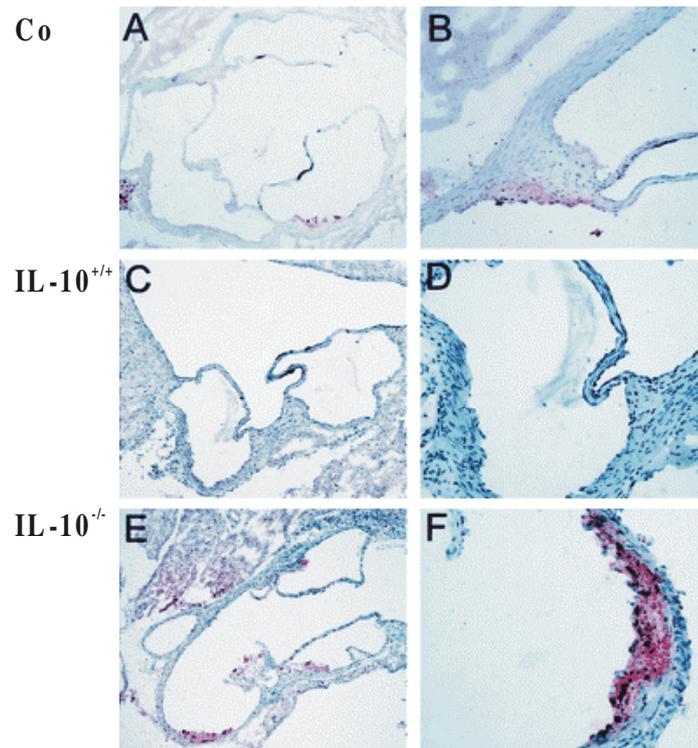


Abbildung 1-6: Schnitt durch die Aortenwurzel. Anfärbung akkumulierter Lipide in mononukleären Zellen nach 16-wöchiger atherogenen Nahrung mittels Oil Red O: Wildtypmäuse (A, B), IL-10^{+/+} (C, D) und IL-10^{-/-} (E, F); links 10-fache und rechts 40-fache Vergrößerung. Aus (Pinderski Oslund et al. 1999).

2 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, den Einfluss des anti-inflammatorischen Cytokins IL-10 auf den Cholesterinmetabolismus in Monocyten/Makrophagen zu klären. Insbesondere sollte die Wirkung von IL-10 auf die Expression von Scavenger Rezeptoren, des Cholesterinexporters ABCA1, des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 und die zugrunde liegenden Regulationsmechanismen untersucht werden.

Als Monocyten/Makrophagen Modell wurde die humane, monocytäre Zelllinie THP-1 ausgewählt, die zu reifen Makrophagen ausdifferenziert werden kann. Die Effekte einer IL-10 Inkubation von Monocyten und Makrophagen auf die oben genannten Rezeptoren sollten auf RNA- und Proteinebene quantifiziert werden. Die Folgen für die zelluläre Cholesterin-Homöostase, die Cholesterinaufnahme und den zellulären Cholesterinefflux sollten mittels Funktionstests charakterisiert werden.

Schließlich sollten durch Verwendung von spezifischen Agonisten und Antagonisten und mittels siRNA-Technik hergestellter spezifischer "knock-down" Varianten des verwendeten Zellmodells die beteiligten Signaltransduktionswege charakterisiert werden.

3 Material und Methoden

3.1 Verwendete Geräte

Autoklav	Systemec GmbH, Wetterberg
Centriflo cones (CF 25, Amicon)	Biorad, München
Durchflusszytometer (FACScan)	Becton Dickinson, Heidelberg
Einmalküvetten Plastibrand®	Brand GmbH, Wertheim
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
Gelelektrophoresen:	
Gelkammer Sub Cell	Biorad, München
Stromversorgung	Amersham Biotech., Upsala (S)
Gene Quant II RNA/DNA Calculator	Amersham Biotech., Cambridge (UK)
6-, 24- und 96-Lochrundbodenplatten	Sarstedt, Nümbrecht
Nucleofector™	Amaxa, Köln
PCR-Tubes 0.2 ml (Ultra Thin Wall Tubes)	Bioplastics, Landgraf (NL)
PCR-Tubes 0.5 ml	Biozym Diagnostics, Oldendorf
PD-10 Säulchen	Amersham Biotech., Upsala (S)
Petrischalen	Sarstedt, Nümbrecht
pH-Meter 765 Calimatic SE 103	Knick, Berlin
Photometer Uvikon 922	Kontron Instruments, Neufahrn
Pipetten	Gilson Abimed, Langenfeld
Pipettenspitzen 10 µl Diamond D 10	Gilson, Langenfeld
Pipettenspitzen 20-1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Plastikröhrchen (1.5 ml und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg

Plastikröhrchen (15 ml und 50 ml)	Falcon, Heidelberg
Real-Time PCR iCycler iQ	Biorad, München
Reinstwasser (ddH ₂ O) Anlage	Milli Pore, Eschborn
Spritzen	Becton Dickinson, Heidelberg
Sterilbank GELAIRE BSB 4 A	Flow Laboratories, Michigan (USA)
Sterilfilter 0.2 µm	Sartorius, Nürnberg
Stickstoffbehälter	L'air liquide. Champigny (F)
T75 und T25 Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht
TECAN-Reader	GENios
Thermal-Cycler Perkin Elmer 480	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Vortexer Heidolph Reax 2000	Heidolph
Waagen	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	Köttermann Labortechnik, München
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht
<u>Zentrifugen:</u>	
Beckmann LZ Ultrazentrifuge	Beckmann Instruments, München
Hereaus Multifuge 3 C-R	Kendro, Osterode
Jonan MR 1822	Jonan GmbH, Unterhaching
Neo Lab 16/18	Hermle Labortechnik, Wehingen

3.2 Chemikalien und Reagenzien

Acylamid	Sigma, Deisendorf
Agarose	Roth, Karlsruhe
Albumin Bovin	Sigma, Deisendorf
Ammoniumpersulfat (APS)	Biorad, München
<u>Antikörper:</u> ABCA1	Acris, Hiddenhausen

CD36 (FA6)	Serotec (USA)
ICAM-1 (CD54)	Immunotech
I κ B- α (C-21)	Santa Cruz, Heidelberg
Isotyp (MOPC 21)	Sigma, Deisendorf
LXR α	Dianova, Hamburg
p50 (NLS-G)	Santa Cruz, Heidelberg
p65 (C-20)	Santa Cruz, Heidelberg
phospho-I κ B- α	Cell Signaling, Frankfurt
PPAR γ (E-8)	Santa Cruz, Heidelberg
PPAR γ	Cell Signaling, Frankfurt
anti-mouse-FITC	Dako (DK)
anti-mouse-HRP	Amersham Biotech., Upsala (S)
anti-rabbit-HRP	Cell Signalling, Frankfurt
Aqua Pure Isolation Kit	Biorad, München
Biocoll Separating Solution	Biochrom AG, Berlin
Biorad External Well Factor Solution	Biorad, München
Borsäure	Sigma, Deisendorf
Calciumchlorid	Sigma, Deisendorf
Cell Line Nucleofector™ Kit V	Amaxa, Köln
Chloroform p.A.	Merck, Darmstadt
Cholesterin Liquicolor	Rolf Greiner Biochemica, Flacht
Citrat	Universitätsapotheke, München
CorrelateEIA Direct cAMP	Assay Design, Ann Arbor (USA)
Dextran T 500	Amersham Biosciences, Upsala (S)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma, Deisendorf

Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma, Deisendorf
Dioxan	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisendorf
DNA-Standards	Boehringer, Mannheim
ECL-Lösung (Chemilumineszenz)	Pierce, Rockford (USA)
Endofree Kit	Qiagen, Hilden
Ethanol p.A.	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma, Deisendorf
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, Deisendorf
FACS Flow	Becton Dickinson, Heidelberg
Fenofibrate	Sigma, Deisendorf
Foetal Calf Serum (FCS)	Sigma, Deisendorf
Folin & Ciocalteus Phenol Reagent	Sigma, Deisendorf
Geneticin	Gibco (UK)
Glycerol	Sigma, Deisendorf
Glycin	Roth, Karlsruhe
Guanidin-HCl	Sigma, Deisendorf
Hank's Balanced Salt Solution (10x)	Sigma, Deisendorf
Hepes Buffer 1 M	Sigma, Deisendorf
22-(R)-Hydroxycholesterol (22-OHC)	Sigma, Deisendorf
rHu IL-10	Promocell GmbH, Heidelberg
Kaliumbromid	Sigma, Deisendorf
Kaliumchlorid	Sigma, Deisendorf
Kupfersulfat	Sigma, Deisendorf
LB-Medium (Luria Broth)	MOBIO, Dianova, Hamburg

Magnesiumchlorid	Sigma, Deisendorf
Methanol p.A.	Merck, Darmstadt
Metafectene	Biontex, München
β -Mercaptoethanol	Sigma, Deisendorf
Natriumacetat	Sigma, Deisendorf
Natriumazid	Sigma, Deisendorf
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Sigma, Deisendorf
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Biorad, München
Natrium-EDTA	Sigma, Deisendorf
Natriumtartrat	Sigma, Deisendorf
Nitrocellulosemembran	Amersham Biotech., Upsala (S)
NucleoBond Kit	Macherey-Nagel, Düren
Oil Red O Pulver	Sigma, Deisendorf
Oligonukleotid-Synthese	Metabion, Martinsried
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma, Deisendorf
PBS \pm Mg ²⁺ /Ca ²⁺	Pan Biotech, Aidenbach
Penicillin	Sigma, Deisendorf
Phorbolmyristatacetat (PMA)	Sigma, Deisendorf
Piceatannol	Calbiochem (Merck), Darmstadt
2-Propanol p.A.	Merck, Darmstadt
Protease-Inhibitoren	Sigma, Deisendorf
Protein-Standards	Biorad, München
pSilencer™ 1.0-U6 Vektor	Ambion (UK)

Ready-To-Go RT-PCR Beads	Amersham Biotech., Upsala (S)
Restriktionsenzyme:	
ApaA I	New England Biolabs, Frankfurt
EcoR I	New England Biolabs, Frankfurt
BamH I	New England Biolabs, Frankfurt
Xho I	New England Biolabs, Frankfurt
9-cis Retinoic acid (9-cis RA)	Sigma, Deisendorf
RNase freie DNase	Promega, Madison (USA)
RPMI 1640 Medium	PAA Lab. (A)
SOCS-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Streptomycin	Sigma, Deisendorf
SybrGreen I (10000-fach)	Molecular Probes, Eudene (USA)
T4 DNA Ligase	Invitrogen, Karlsruhe
TEMED	Biorad, München
TransAM™ NFκB	Active Motif, Rixensart, (B)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	Sigma, Deisendorf
Triton X-100	Sigma, Deisendorf
Tween 20	Sigma, Deisendorf

3.3 Lösungen und Puffer

3.3.1 DEPC-Wasser für Real-time RT-PCR

2 ml DEPC in 1 l Reinstwasser (ddH₂O) geben, gut schütteln und ca. 2 h einwirken lassen; anschließend autoklavieren, um das DEPC zu zerstören.

3.3.2 HHMC-Lösung für FACS-Versuche

0,25 g BSA, 5 ml Hank's Lösung (10-fach), 500 µl HEPES, 50 µl MgCl₂, 50 µl CaCl₂, ad 50 ml Reinstwasser (ddH₂O)

3.3.3 TBE-Puffer für Agarosegele

0,5 M Tris (basisch), 0,415 M Borsäure, 10 mM EDTA, Reinstwasser (ddH₂O)
pH 8.0

3.3.4 Annealing-Puffer für RNAi

100 mM Ka-Acetat, 30 mM HEPES, pH 7,4, 2 mM Mg-Acetat, Reinstwasser (ddH₂O)

3.3.5 Puffer für Gesamtproteinextraktion (WCEB-Puffer)

25 mM HEPES, 0,3 M NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM EDTA, 0,5 % Triton X-100, 10 % Glycerin, Reinstwasser (ddH₂O)

Protease-Inhibitor-Mix:

200 µl β-Glycerophosphat, 100 µl Benzamidin, 100 µl PNPP, 60 µl Na-Vanadat, 20 µl DTT, 10 µl Leupeptin, 10 µl Pepstatin, 10 µl Aprotinin, 100 µl PMSF, ad 10 ml Reinstwasser (ddH₂O)

3.3.6 Puffer für Cytosol- und Kernextraktion

3.3.6.1 Hypononischer Puffer

10 mM HEPES (pH 7,3), 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM PMSF, 0,5 % Protease-Inhibitor-Mix (3.3.6.6), ad 10 ml Reinstwasser (ddH₂O)

3.3.6.2 Lysepuffer

10 mM HEPES (pH 7,3), 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,4 % Nonidet P-40, 0,5 % Protease-Inhibitor-Mix (3.3.6.6), ad 10 ml Reinstwasser (ddH₂O)

3.3.6.3 0,02 M KCl-Puffer

20 mM HEPES (pH 7,3), 22 % Glycerol (99 %-ig), 0,02 M KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM EDTA, 0,5 % Protease-Inhibitor-Mix (3.3.6.6), ad 10 ml Reinstwasser (ddH₂O)

3.3.6.4 0,6 M KCl-Puffer

20 mM HEPES (pH 7,3), 22 % Glycerol (99 %-ig), 0,6 M KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM EDTA, 0,5 % Protease-Inhibitor-Mix (3.3.6.6), ad 10 ml Reinstwasser (ddH₂O)

3.3.6.5 0,3 M KCl-Puffer

(für Proteinbestimmung, Verdünnen von Proben)

410 µl 0,02 M KCl-Puffer und 390 µl 0,6 M KCl-Puffer

3.3.6.6 Protease-Inhibitor-Mix

15 µg/ml Leupepetin, 15 µg/ml Aprotinin, 1 mM DTT, 0,2 mM EDTA (pH 8)

3.3.7 Sammel- und Laufgele für Western Blot

Die SDS-PAGE wurde mit dem Minigel System der Firma Biorad durchgeführt. Jeweils zwei kleine Gele (10 ml) wurden in folgender Zusammensetzung gegossen:

Sammelgele (3 %): 3,25 ml Reinstwasser (ddH₂O), 1,25 ml Upper Tris Puffer (3.3.8.1), 500 µl Acrylamid, 30 µl 10 %-iges APS und 5 µl TEMED

Laufgele (10 %): 4,10 ml Reinstwasser (ddH₂O), 2,50 ml Lower Tris Puffer (3.3.8.1), 3,34 ml Acrylamid, 62,50 µl 10 %-iges APS und 3,75 µl TEMED

Laufgele (7,5 %): 4,93 ml Reinstwasser (ddH₂O), 2,50 ml Lower Tris Puffer (3.3.8.1), 2,50 ml Acrylamid, 62,50 µl 10 % APS und 3,75 µl TEMED

3.3.8 Puffer für Western Blot

3.3.8.1 Lower- und Upper Tris Puffer

Lower Tris (4-fach):

90,9 g THAM (Tris base), 10 ml 20 % SDS, ad 10 ml Reinstwasser (ddH₂O)

pH 8,8

Upper Tris (4-fach):

6,06 g THAM (Tris base), 2 ml SDS, ad 100 ml Reinstwasser (ddH₂O)

pH 6,8

3.3.8.2 Laufpuffer

10-fach: 60 g THAM (Tris base), 288 g Glycin, 100 ml 20 % SDS, ad 2 l Reinstwasser (ddH₂O)

80 ml Laufpuffer (10-fach), ad 800 ml Reinstwasser (ddH₂O)

3.3.8.3 Transferpuffer

3,03 g Tris, 14,4 g Glycin, 800 ml Reinstwasser (ddH₂O), 200 ml Methanol

(kühl stellen)

3.3.8.4 TBS-Puffer

10 ml 1 M Tris (pH 10,88), 33 ml 5 M NaCl, 1000 ml Reinstwasser (ddH₂O), 1 ml Tween (0,1 %)

3.3.8.5 Blockierungspuffer

5 g Milchpulver (5 %), 100 ml TBS/Tween

3.3.8.6 Probenpuffer

55 mM Tris/HCl (pH 6,8), 4 % SDS, 40 % Glycerin, 4,3 % β -Mercaptoethanol, 0,1 % Bromphenolblau

3.3.9 Lösungen für LDL-Präparation

3.3.9.1 Dichtegradientenlösungen

Um das LDL und HDL mittels Ultrazentrifugation aus dem Plasma zu gewinnen, benötigte man drei verschiedene Lösungen für die Dichtegradienten:

D 1 (1,080 g/ml): 250 ml Reinstwasser (ddH₂O), 30 g NaCl, 0,25 g Na-EDTA; pH 7,4

D 2 (1,050 g/ml): 250 ml Reinstwasser (ddH₂O), 18,5 g NaCl, 0,25 g Na-EDTA; pH 7,4

D 3 (1,000 g/ml): 250 ml Reinstwasser (ddH₂O), 0,25 g Na-EDTA; pH 7,4

3.3.9.2 PBS-Puffer

0,524 g Natriumdihydrogenphosphat, 2,883 g Dinatriumhydrogenphosphat, 17,532 g NaCl, ad 2 l Reinstwasser (ddH₂O)

pH 7,4

3.3.9.3 Resolubilisierungslösung für dHDL

0,01 M Tris, 0,1 M NaCl, 0,001 M Na-Azid, 2 M Guanidin HCl

pH 7,4

3.3.10 Herstellung der Oil Red O Färbelösung

500 mg Oil Red O Pulver wurden mit 100 ml reinem 2-Propanol gemischt (0,5 %-ige Lösung) und für 1 h, unter gelegentlichem Rühren, stehen gelassen. Die Lösung ist lichtgeschützt für 6-12 Monate haltbar. Um die Zellen zu färben, wurde stets eine frische Arbeitslösung (0,3 %-ig) hergestellt, indem man die 0,5 %-ige Lösung mit Reinstwasser (ddH₂O) in einem Verhältnis von 3:2 mischte. Diese Lösung ist maximal für 2 h haltbar. Nachdem diese Mischung 10 min stehen gelassen wurde, filtrierte man diese durch ein Whatmanpapier oder einen Papierfilter.

3.4 Oligonukleotidprimer

Tabelle 5: Oligonukleotidprimer, die in der vorliegenden Arbeit für die Real-time RT-PCR und Sequenzierungen verwendet wurden.

Primer	Sequenz	Referenzen
β-Aktin (297 bp)	forward: 5'-GCG AGA AGA TGA CCC AGA TCA-3' reverse: 5'-TCT CCT TAA TGT CAC GCA CGA-3'	Tib Mol Biol
GAPDH (250 bp)	forward: 5'-TTG GTA TCG TGG AAG GAC TCA-3' reverse: 5'-TGT CAT CAT ATT TGG CAG GTT T-3'	(Kielar et al. 2001)
CD36 (389 bp)	forward: 5'-GAG AAC TGT TAT GGG GCT AT-3' reverse: 5'-TTC AAC TGG AGA GGC AAA GG-3'	(Pietsch et al. 1996)
ABCA1 (206 bp)	forward: 5'-GCA CTG AGG AAG ATG CTG AAA-3' reverse: 5'-AGT TCC TGG AAG GTC TTG TTC AC-3'	(Kielar et al. 2001)
ABCA1 (349 bp)	forward: 5'-TGA CAA GTC TGT GCA ATG GAT CAA-3' reverse: 5'-GAT ACG AGA CAC AGC CTG GTA GAT-3'	(Plat and Mensink 2002)
LXRα (142 bp)	forward: 5'-AGA GGA GGA ACA GGC TCA TGC-3' reverse: 5'-AAA GGA GCG CCG GTT ACA CT-3'	(Fu et al. 2001)
LDL-R (245 bp)	forward: 5'-CAA TGT CTC ACC AAG CTC TG-3' reverse: 5'-TCT GTC TCG AGG GGT AGC TG-3'	(Scheithe et al. 1997)
SR-BI (547 bp)	forward: 5'-CTT CCT CGA GTA CCG CAC-3' reverse: 5'-GAG CCA CGA AGC GAT AGG-3'	(Rubic et al. 2004)
P1/P4	forward: 5'-GAG ACT ATA AAT ATC CCT TGG-3' reverse: 5'-GAC CAT GAT TAC GCC AAG CGC G-3'	Sequenzierung

3.5 Kultivierung eukaryotischer Zellen

3.5.1 Kultur von THP-1 Zellen, transient und stabil transfizierten THP-1 Zellen

THP-1 Zellen wurden alle 3 bis 4 Tage passagiert. Sie wurden auf $0,2 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt, bei 1000 U/min für 5 min abzentrifugiert und in T75 Zellkulturflaschen im Brutschrank (37°C, 5 % CO₂, 95 % Luftfeuchtigkeit) kultiviert. Die Zellen benötigten folgendes Medium: RPMI-1640, 10 % hitzeinaktiviertes FCS und 1 % Penicillin und Streptomycin. Um THP-1 Zellen zu Makrophagen ausdifferenzieren zu lassen, wurde 160 nM PMA für 72 h zugegeben. Anschließend wurde das Medium gewechselt und die Zellen stimuliert.

Für die Selektion von stabil transfizierten THP-1 Zellen wurde das RPMI-Medium zusätzlich mit 600 µg/ml Geneticin versetzt.

3.5.2 Präparation und Kultur von PBMCs

Aus 100 ml Vollblut von gesunden Spendern wurden mittels Ficoll-Dichtegradient periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) isoliert. Eine 50 ml Spritze wurde mit 5 ml Citrat und 5 ml Dextran (6 %) vorgefüllt, um die Gerinnung zu vermeiden. Nach der Blutabnahme und Mischung wurde die 50 ml Spritze für 30 min aufrecht auf den Stempel gestellt, damit sich die Blutplättchen absetzen konnten. In ein 50 ml Falcon-Röhrchen wurde 12,5 ml Ficoll-Lösung (1,077 g/ml) vorgelegt, die Nadel im 90° Winkel gebogen und das Plasma langsam auf die Ficoll-Lösung gegeben. Danach wurden die Zellen für 20 min bei 2000 U/min, 10°C und ohne Bremse abzentrifugiert. In der mittleren Schicht befanden sich die PBMCs. In ein neues 50 ml Falcon-Röhrchen wurde 20 ml kaltes RPMI-Medium (ohne Zusätze) vorgelegt und die PBMC-Schicht vorsichtig mit einer Pipette aufgenommen und in das neue Falcon-Röhrchen überführt. Die Zellen wurden erneut abzentrifugiert (1000 U/min, 5 min, 10°C). Nach einem weiteren gleichen Wasch- und Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 2 ml Eppendorf-Cups verteilt. Nun konnten die PBMCs für Kurzversuche (3 h) verwendet werden.

3.5.3 Einfrieren und Auftauen von eukaryotischen Zellen

Zum Einfrieren wurden 2×10^6 Zellen abzentrifugiert (1000 U/min, 5 min, RT), der Überstand verworfen und mit 1,8 ml Einfriermedium versetzt, das wie folgt zusammengesetzt war: RPMI-Medium (3.5.1), 20 % DMSO und 1 % steriles FCS. Die Zellen wurden über Nacht bei -80°C eingefroren und am nächsten Tag in einen Stickstoffbehälter verlagert.

Die eingefrorenen Zellen wurden aus dem Stickstoffbehälter entnommen und leicht angetaut. Die Prozedur musste schnell erfolgen, da das vorhandene DMSO toxisch für die Zellen ist. 30 ml kaltes RPMI-Medium (3.5.1) wurde in ein 50 ml Falcon-Röhrchen vorlegt und die eingefrorenen Zellen in dieses Medium gegeben. Nach dem Abzentrifugieren (1000 U/min, 5 min, RT) wurden die Zellen in 10 ml warmem RPMI-Medium (3.5.1) aufgenommen, in eine T25 Zellkulturflasche gegeben und im Brutschrank kultiviert.

3.6 Kultivierung von Bakterien

3.6.1 Anzucht von *E.coli* Bakterien

Kompetente Bakterien (*E.coli*, DH5 α) wurden im LB-Medium kultiviert. Für diese Arbeit wurde ein fertiges LB-Pulver der Firma MOBIO, Dianova verwendet, welches mit der entsprechenden Menge an Reinstwasser (ddH₂O) versetzt wurde (2,5 g LB-Pulver/100 ml Reinstwasser (ddH₂O)). Kompetente *E.coli* Bakterien (DH5 α) wurden freundlicherweise von Frau Dr. Krump-Konvalinkova zur Verfügung gestellt.

3.6.2 Lagerung von *E.coli* Bakterien

Bakterien wurden bei -80°C gelagert, indem man 500 μl 60 % steriles Glycerol und 1500 μl Bakterienkultur mischte.

3.7 Arbeiten mit Nukleinsäuren

3.7.1 Isolierung von Gesamt-RNA

RNA degradiert wesentlich leichter als DNA. Im Gegensatz zu DNasen, deren Aktivität von Metallionen abhängt, erfordern RNasen keine Kofaktoren. Gesamt-RNA besteht aus einem Gemisch von rRNA (ribosomaler RNA), tRNA (Transfer-RNA), mRNA (messenger RNA) und anderen. Die mRNA macht daran nur einen Anteil von ca. 2-5 % aus.

Wenn man mit RNA arbeitet, sollte stets darauf geachtet werden, dass alle Flächen mit Ethanol abgewischt, Handschuhe getragen, autoklavierte Einwegmaterialien und DEPC-Wasser verwendet werden, um eine Degradierung der RNA durch RNasen zu vermeiden. Außerdem sollten alle Zentrifugationsschritte bei 4°C durchgeführt werden. Die Verwendung von DEPC-Wasser (3.3.1) dient dazu, RNase-frei zu arbeiten. Für die Isolierung von Gesamt-RNA wurde der Aqua Pure Total RNA Isolation Kit der Firma Biorad verwendet.

1-2x10⁶ THP-1 Zellen, 2x10⁶ PMA-differenzierte THP-1 Zellen oder 5-10x10⁶ PBMCs wurden für die Isolierung verwendet. Die Zellen wurden in 15 ml Falcon-Röhrchen gesammelt und abzentrifugiert (1000 U/min, 5 min, RT). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml sterilem PBS gewaschen und in ein 2 ml Eppendorf-Cup überführt. Nachdem die Zellen abzentrifugiert (14000 U/min, 5 min, 4°C) und der Überstand verworfen wurde, gab man 300 µl Lysis-Solution hinzu. Die Zellsuspension wurde durch 10-maliges Aufziehen mit der Pipette resuspendiert. Danach gab man 100 µl DNA/Protein-Pelleting-Solution hinzu, schwenkte das Eppendorf-Cup 10-20-mal und inkubierte es 5 min auf Eis. Dann wurde es abzentrifugiert (14000 U/min, 10 min, 4°C). 300 µl 2-Propanol wurde in ein neues 2 ml Eppendorf-Cup vorgelegt und die klare Phase aus dem abzentrifugierten Eppendorf-Cup wurde vorsichtig überführt. Nach 25-maligem Schwenken wurde die RNA gefällt und für 30 min oder länger bei -20°C inkubiert, um die Ausbeute zu erhöhen. Nach dem Zentrifugieren (14000 U/min, 10 min, 4°C) wurde der Überstand vorsichtig verworfen und die RNA mit 300 µl Ethanol (70 %-ig) gewaschen. Wieder erfolgte ein Zentrifugationsschritt (14000 U/min, 10 min, 4°C). Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und die RNA für 20-30 min an

der Luft getrocknet. Die RNA wurde je nach Pelletgröße mit RNA-Hydrations-Lösung gelöst und bis zum Gebrauch bei -80°C aufbewahrt.

3.7.2 DNase Behandlung von Gesamt-RNA

Zur Entfernung von Resten genomischer DNA wurden alle Proben einer DNase-Behandlung unterzogen. Man stellte sich nach dem Herstellerprotokoll einen Mix für 60 μl RNA her, der aus folgenden Reagenzien bestand: 7,5 μl Puffer (10-fach), 3,75 μl DEPC-Wasser und 3,75 μl DNase. 15 μl von diesem Mix wurde zu jeder Probe gegeben. Die Reaktion lief bei 37°C für 15 min im PCR-Gerät ab. Danach versetzte man jedes Eppendorf-Cup mit 7,5 μl Stop-Lösung und inkubierte es für weitere 10 min bei 65°C , um die Reaktion zu stoppen und das Enzym zu inaktivieren.

3.7.3 Konzentrationsbestimmung von RNA und DNA

Die RNA- und DNA-Konzentration wurde photometrisch bestimmt, wobei die Nucleinsäuren bei 260 nm und die Proteine bei 280 nm gemessen wurden. Die Konzentration der RNA bzw. DNA errechnete sich aus der optischen Dichte (OD) bei 260 nm gegen den Leerwert (hier: DEPC-Wasser), der Verdünnung und einem für RNA bzw. DNA spezifischen Multiplikationsfaktor, der bei RNA 40 und bei DNA 50 ist. Aus dem Verhältnis (ratio) der $\text{OD}_{260\text{nm}}$ und der $\text{OD}_{280\text{nm}}$ erhielt man eine Aussage über Proteinkontaminationen in der jeweiligen Probe. Reine RNA bzw. DNA sollte eine Ratio von > 1.8 (optimal 2) haben, wobei die Werte auch vom pH und Salzgehalt abhängig sind.

$$C_{\text{RNA}} [\mu\text{g/ml}] = A_{260\text{ nm}} \times \text{Multiplikationsfaktor } 40 \times \text{Verdünnungsfaktor } 20$$

$$C_{\text{DNA}} [\mu\text{g/ml}] = A_{260\text{ nm}} \times \text{Multiplikationsfaktor } 50 \times \text{Verdünnungsfaktor } 20$$

3.7.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist die einfachste Methode, DNA-Fragmente voneinander zu trennen und identifizieren. Um eine gute Fragmenttrennung zu erreichen, verwendet man üblicherweise Agarosekonzentrationen von 0,8-2 %. In der vorliegenden Arbeit wurden immer 0,8- und 1,5 %-ige Gele verwendet.

Agarose wurde mit 1-fach TBE-Puffer (3.3.3) in der Mikrowelle gekocht, bis die Agarose gelöst war. Dann gab man 0,5 µg/ml Ethidiumbromid in die geschmolzene und leicht abgekühlte Agarose und goss daraus ein Gel. Sobald die Agarose erhärtet war, wurde 1-fach TBE-Puffer (3.3.3) in die Kammer gegeben, der Größenmarker und die DNA-Lösung aufgetragen, die zuvor mit Probenpuffer (3.3.8.6) versetzt wurden, und ließ das Gel bei 100-120 V für 30-60 min laufen.

3.7.5 Präzipitation von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren fallen durch Zugabe einer hohen Konzentration monovalenter Kationen aus. Zur Fällung von RNA wurde 2 M Natriumacetat pH 4,0 und zur Fällung von DNA 3 M Natriumacetat pH 5,0 verwendet. Die Proben wurden mit dem 1-fachen Volumen 2-Propanol versetzt und gemischt. Um die Ausbeute von RNA bzw. DNA zu erhöhen, wurden die Proben bei -20°C gefällt. Die gefällte RNA bzw. DNA wurde abzentrifugiert (14000 U/min, 10 min, 4°C) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, um Salz- und Alkoholreste zu entfernen, luftgetrocknet und anschließend mit Rehydrierungslösung versetzt.

3.7.6 Isolierung des ligierten pSilencer™ 1.0-U6 Vektors aus dem Agarosegel

Mit Hilfe von Low-Melting-Agarose können DNA-Fragmente nach der Elektrophorese aus dem Gel zurückgewonnen und zum Klonieren weiter verwendet werden. Diese Agarose besitzt einen Schmelzpunkt von 65°C. Beim Aufschmelzen der Agarose bei dieser Temperatur kommt es nicht zu einer Denaturierung der DNA. Der verwendete pSilencer™ 1.0-U6 Vektor der Firma Ambion (Abbildung 3-1) wurde mit den Restriktionsenzymen Apa AI und Eco RI linearisiert. Die benötigte DNA-Bande wurde unter UV-Licht aus dem Gel geschnitten und in ein 2 ml Eppendorf-Cup überführt. Das Gewicht der ausgeschnittenen Bande wurde bestimmt und auf ein Volumen von 300-500 µl mit sterilem Wasser aufgefüllt. Das Gemisch wurde noch mit 1/10 des Gesamtvolumens 3 M Natriumacetat pH 9,0 versetzt und für 10 min bei 65°C im Heizblock geschüttelt. Die Trennung der Agarose von den Nukleinsäuren erfolgte durch Zugabe von einem Volumen TE-Phenol und starkem Schütteln für 30 sek, bis eine weiße Emulsion entstand. Diese Emulsion wurde für 10 min bei 14000 U/min abzentrifugiert und die wässrige Phase abgenommen und nochmals mit einem Volumen

Phenol/Chloroform versetzt und zentrifugiert. Dadurch wurden Agaroserückstände aus der wässrigen Phase entfernt. Aus der erhaltenen wässrigen Phase wurden die Nukleinsäuren gefällt und weiter verwendet.

3.7.7 Plasmidgewinnung aus *E.coli* Bakterien

Nach der Transformation von Bakterien mit einem Vektor kann man das eingebrachte Plasmid durch Wachstum der Bakterien vermehren. Dazu wurden die jeweiligen Klone in unterschiedlichen Mengen LB-Medium (3.6.1) angeimpft, 5 mg/ml Ampicillin hinzugefügt und bei 37°C über Nacht hochgeschüttelt. Die Ernte der Bakterien erfolgte durch Zentrifugation für 5 min, 6000 U/min und 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet weiter verwendet.

3.7.7.1 Midi-Präparation aus *E.coli* Bakterien und Plasmidverdau

Die Präparation mittlerer Plasmidmengen aus *E.coli* diene analytischen Zwecken, wie z.B. der Sequenzierung oder einem Restriktionsverdau, und wurde mit dem Nucleo-Bond Kit der Firma Macherey-Nagel durchgeführt. Die jeweiligen Klone wurden dafür in 50 ml LB-Medium (3.6.1) angeimpft und über Nacht hochgeschüttelt. Für einen Verdau wurde ein 25 µl Ansatz pipettiert. Dazu wurden 1-3 µl Plasmid-DNA (ca. 600 ng/ml), 1 µl des jeweiligen Enzyms (Bam HI und/oder Xho I), 2,5 µl 10-fach Puffer, 0,5 µl BSA und Reinstwasser (ddH₂O) verwendet. Der Verdau wurde bei 37°C für 1 h im Heizblock durchgeführt. Nach dem Verdau und der anschließenden Trennung der Nukleinsäuren im Agarosegel konnte festgestellt werden, ob die gewünschten DNA-Fragmente im Plasmid eingebaut waren.

3.7.7.2 Maxi-Präparation aus *E.coli* Bakterien

Zur Transfektion von THP-1 Zellen wurde die Plasmid-DNA mit dem EndoFree Plasmid Maxi Kit von Qiagen isoliert. Damit konnte eine hohe Ausbeute (~500 µg/ml) an reiner Plasmid-DNA, die frei von Endotoxinen (LPS) war, erreicht werden. Hierzu wurden 100 ml LB-Medium (3.6.1) mit dem zu isolierenden Klon angeimpft und über Nacht hochgeschüttelt. Auch hier wurde das mitgelieferte Herstellerprotokoll angewandt. Die Plasmid-DNA wurde je nach Pelletgröße mit TE-Puffer, der im Kit enthalten war, gelöst.

3.7.8 Plasmidsequenzierung

Die Sequenzierungen der isolierten Plasmide, meist aus einer Midi-Präparation, wurden von der Sequenzierfirma Agova in Berlin vorgenommen. 1 µg der Plasmid-DNA je Probe wurde in sterile 1,5 ml Eppendorf-Cups pipettiert und an die Sequenzierfirma geschickt. Zum Sequenzieren der DNA im pSilencer™ 1.0-U6 Vektor wurden die Primer P1 und P4 (Tabelle 5) ausgewählt und von der Firma Agova verwendet. Die Analyse und Bestätigung der Sequenzen erfolgte mit der Software BLAST (Tatusova and Madden 1999).

3.8 RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

3.8.1 Reverse Transkription

Die RT-PCR ist eine komplexe Methode und alle physikalischen und chemischen Parameter der Reaktion sind voneinander abhängig. Sie müssen bei der Optimierung sorgfältig ausgewählt werden, um Spezifität, Sensitivität und Reproduzierbarkeit zu gewährleisten. Da RNA nicht als Template für die PCR dienen kann, muss die isolierte mRNA oder Gesamt-RNA mit Oligonukleotidprimern in komplementäre DNA (cDNA) revers transkribiert (RT) werden (Bustin 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde dies mit der reversen Transkriptase M-MLV (moloney murine leukemia virus) bewerkstelligt, wobei das Arbeitsoptimum des Enzyms zwischen 37 und 42°C liegt. Um eine komplette Umschreibung von RNA in cDNA zu gewährleisten, wurde die RT für 30 min bei 42°C durchgeführt. Als Primer können Oligo-dT-Primer, Hexamerprimer (random hexamer primer) oder spezifische Primer verwendet werden. Da stets Gesamt-RNA isoliert wurde, wurden Hexamerprimer, die in den Ready-To-Go RT-PCR beads (Amersham Biosciences) mitgeliefert wurden, verwendet. Diese "Beads" enthalten folgende Komponenten für einen 50 µl Ansatz: 2,0 U Taq DNA Polymerase, 10 mM Tris-HCl (pH 9,0), 60 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, Nukleotide, 200 µM von jedem dNTP und M-MLV.

3.8.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mittels PCR können kleinste Mengen an cDNA durch sequentielle Wiederholungen amplifiziert werden (Entdecker Kary Mullis, 1983). Nach dem Umschreiben von RNA in cDNA und dem Aufschmelzen der cDNA für 5 min bei 95°C in Einzelstränge kommt es zur eigentlichen PCR. Der erste Schritt ist die sogenannte Denaturierung. Das Template wird nochmals für 30 sek bei 95°C in Einzelstränge aufgeschmolzen. Im Anschluss wird die Temperatur soweit abgekühlt, dass die spezifischen Primer an die DNA hybridisieren können. Dieser Schritt wird Annealing genannt und findet meistens bei 55-65°C für 20-60 sek statt. Nach der Anlagerung der spezifischen Primer beginnt die Taq-Polymerase mit der Kettenverlängerung. Dieser Schritt wird Elongation oder Extension genannt und bei 72°C für 20-60 sek durchgeführt. Diese drei Schritte werden je nach eingesetzter Templatmenge in der Regel 20- bis 40-mal wiederholt, um eine exponentielle Vermehrung der Proben-cDNA im Abschnitt zwischen den Primern zu bekommen.

3.8.3 Real-time RT-PCR

Durch die Applikation der Fluoreszenz-Technik und passenden Geräten für die PCR können nun Amplifikation, Detektion und Quantifizierung in Echtzeit verfolgt werden. Heutzutage sind die PCR-Geräte mit einer UV-Lampe und einer CCD-Kamera ausgestattet, um den fluoreszierenden Farbstoff anzuregen und die emittierten Photonen zu messen und zu dokumentieren. In der vorliegenden Arbeit wurde der iCycler der Firma Biorad und der Farbstoff SybrGreen I (Molecular Probes) für die Real-time PCR benutzt (Morrison et al. 1998). SybrGreen I ist ein fluoreszierender Farbstoff, der in doppelsträngige DNA interkaliert und dann ein hohes Fluoreszenzsignal liefert. Während der Annealingphase lagern sich nach und nach die Fluoreszenzmoleküle in die entstehenden Doppelsträngen ein. Angeregt durch eine Lichtquelle im Gerät beginnen sie zu fluoreszieren. Das von ihnen abgegebene Licht kann von den optischen Detektoren des Gerätes erfasst werden. Der Anstieg der Fluoreszenz in jedem Reaktionsgefäß wird während der ganzen Reaktion dokumentiert. So kann genau festgestellt werden, wann die Amplifikation optisch nachweisbar wird und wie lange sie exponentiell verläuft. Die Benutzung von SybrGreen I ist sehr einfach und kostengünstig. Da sich der Farbstoff in jegliche doppelsträngige DNA einlagert, kann

nicht zwischen spezifischem Produkt, Fehlprodukten oder Primerdimeren unterschieden werden. Mit der anschließenden Analyse der Amplifikat-Schmelzkurven kann man jedoch die entstandenen Produkte gut charakterisieren und Fehlamplifikate entdecken. Im allgemeinen wurden während der PCR-Etablierung die Produkte durch Gelelektrophorese kontrolliert.

Es gibt aber noch weitere Möglichkeiten, die Amplifikationen zu quantifizieren: Molecular-Beacons (Tyagi and Kramer 1996), Hybridisierungssonden meist Lightcyler (Wittwer et al. 1997) und Hydrolysesonden meist Taqman (Gut et al. 1999, Livak et al. 1995). Auch wenn der Detektionsmarker bei diesen Methoden meist direkt an die spezifischen Primer gekoppelt ist, muss auch bei diesen Methoden die Spezifität der Amplifikate stets überprüft werden.

3.8.3.1 Spezifität der Produkte

Der Schmelzpunkt, T_m , ist die Temperatur, bei der nur noch die Hälfte der komplementären Sequenzen hybridisiert vorliegen. Mit der Schmelzkurvenanalyse können die entstandenen Amplifikate nach der Länge charakterisiert werden. Man kann sowohl zwischen dem spezifischen Produkt, als auch zwischen den Fehlprodukten und den Primerdimeren unterscheiden, da diese in der Regel kleiner sind und deshalb einen niedrigeren Schmelzpunkt haben. Zur Bestätigung, dass wirklich nur ein Amplifikat, d.h. die erwartete Länge, entstanden ist, muss die PCR-Reaktion auf ein Agarosegel aufgetragen werden und ausgewertet werden. Außerdem ist es ratsam, das entstandene Produkt nach Optimierung der PCR sequenzieren zu lassen.

3.8.3.2 Effizienz der PCR

Die Effizienz einer PCR ist sehr entscheidend, wenn man spezifische mRNAs quantifizieren und vergleichen möchte. Diese Amplifikationseffizienz wird bestimmt, indem man die RNA etwa in 10-fachen Verdünnungsschritten amplifiziert. Verläuft eine PCR exakt exponentiell, ist bei logarithmischem Auftrag des Signals über dem Schwellenzyklus eine Gerade mit der Steigung $-3,320$ ($\cong -^2\log_{10}$) und ein Korrelationskoeffizient von 1,000 zu erwarten. Reale Meßwerte kommen dem bei guter Etablierung der PCR sehr nahe (s. Abbildung 4-2).

3.8.3.3 Absolute und relative Quantifizierung

Bei der absoluten Quantifizierung wird anhand einer externen Kalibrierungskurve die Expression des Zielgens quantifiziert. Bei der relativen Quantifizierung wird die Expression des Zielgens mit der eines internen Standards (housekeeping gene) von derselben Probe verglichen. Dabei wird also der gesamte Analysengang von der RNA-Isolierung bis zur PCR kontrolliert. Als Zielparameter wird der sogenannte C_t -Wert (threshold cycle) bestimmt. Der C_t -Wert bedeutet die (interpolierte) Zyklenzahl, bei der das Signal in einer Probe zum erstenmal eine vorher gewählte Schwellenintensität überschreitet, die für alle Probenplätze in gleicherweise bestimmt wird. Dabei wird die Differenz zwischen dem C_t -Wert des Rezeptors und dem C_t -Wert des internen Standards derselben Probe gebildet (ΔC_t). Der C_t -Wert in der Kontrollprobe wird von dem Wert der Behandlung abgezogen ($\Delta(\Delta C_t)$). Es werden also durch den ($\Delta(\Delta C_t)$)-Wert die experimentell bedingten Unterschiede zwischen zwei Proben noch bezüglich der internen Standards kontrolliert. Der fold change, d.h. die Änderung der RNA-Expression im Vergleich zur Kontrolle, wird durch Delogarithmieren zur Basis zwei berechnet. Die Formel ist wie folgt (Applied 1997):

$$\text{fold change} = 2^{-\Delta(\Delta C_t)},$$

wobei $\Delta C_t = C_t \text{ (Rezeptor)} - C_t \text{ (interner Standard)}$

und $\Delta(\Delta C_t) = \Delta C_t \text{ (Behandlung)} - \Delta C_t \text{ (Kontrolle)}$

Für die Quantifizierung wird der Betrag der exponentiellen Amplifikation der DNA-Fragmente in der PCR ausgenutzt. Als Richtlinie für den Schwellenwert C_t nimmt man die Zykluszahl, bei der sich das Fluoreszenzsignal etwa 10-fach vom Hintergrund zwischen den ersten 10 Zyklen abhebt (= C_t -Wert).

Ein idealer interner Standard (housekeeping gene) sollte unter den verwendeten experimentellen Bedingungen stets konstant exprimiert werden, d.h. unter Kontrollbedingungen wie nach experimentellen Manipulationen konstant bleiben (Bustin 2000). Als interne Standards werden meistens drei Genprodukte verwendet, nämlich β -Aktin, GAPDH und rRNA, obwohl auch andere beschrieben wurden, wie z.B. Cyclophilin und 18S RNA. In der vorliegenden Arbeit wurden β -Aktin und GAPDH verwendet, da experimentelle Manipulationen keine Veränderungen aufwiesen

und die absolute Höhe der Expression nahe bei der Expression der spezifischen Zielgene dieser Arbeit lag.

3.8.3.4 Etablierung der PCR-Parameter

Es ist sehr wichtig, dass alle Parameter und Reagenzien, die in einer spezifischen RT-PCR benötigt werden, vorher hierfür optimiert werden. Nicht optimierte Temperaturprofile und Konzentrationen führen zu einer suboptimalen Effizienz der PCR und zur Bildung von unspezifischen Fehlprodukten und Primerdimeren.

Die Amplifikatlänge für die Real-time RT-PCR sollte nicht größer als 500 bp betragen, um die Enzyme optimal auszunutzen. Für die meisten Experimente wurde initial eine Gesamt-RNA-Konzentration von 1000 ng pro 50 µl Ansatz verwendet.

Die Auswahl der spezifischen Primer ist von großer Bedeutung. Mit verschiedenen Programmen kann die Spezifität der Primer Genom-weit überprüft werden (z.B. BLAST (Altschul et al. 1997)). Die optimale Länge der Primer sollte 15-25 Nukleotide betragen und der GC-Gehalt zwischen 40 und 60 % liegen. Die Differenz der Schmelztemperatur (T_m) zwischen den beiden Primern, die meistens zwischen 56 und 62°C liegt, sollte nicht mehr als 2-4°C betragen und die eingesetzte Konzentration sollte zwischen 100-300 nM sein, um einen akzeptablen Bereich der exponentiellen spezifischen Amplifikate zu erreichen. Eine zu hohe Konzentration führt zur Bildung von Primerdimeren und eine zu niedrige Konzentration führt zu einem ineffizienten Annealing. Es ist ratsam am 3'-Ende ein C oder G zu haben, um eine bessere Bindung und Elongation zu erhalten. Primer sollten keine internen Sekundärstrukturen, wie z.B. Haarnadeln (hair pins), bilden, weil dann die Bindung an das Template reduziert wird. Außerdem dürfen die Primer nicht miteinander hybridisieren und sollten eine sehr geringe Komplementarität an ihren Enden besitzen, da dies zur Bildung von Primerdimeren führen kann.

SybrGreen I ist ein fluoreszierender Farbstoff, der in doppelsträngige DNA interkaliert. In gelöster Form ist seine Leuchtkraft gering, erhöht sich aber drastisch in DNA-gebundener Form. SybrGreen I wird direkt in das PCR-Röhrchen gegeben. Zwischenverdünnungen von SybrGreen I sollten lichtgeschützt im Kühlschrank aufbewahrt werden.

MgCl₂ ist essentiell als Kofaktor für die Taq-Polymerase. Zu hohe Konzentrationen fördern die Amplifikation unspezifischer Fragmente (Schmierbildung im Agarosegel sichtbar) und erhöhen die Schmelztemperatur. Eine zu niedrige Konzentration führt zu einem ineffizienten Annealing und reduziert damit die Syntheseeffizienz. In den Ansätzen wurden Konzentrationen zwischen 1,5 und 4 mM MgCl₂ verwendet.

Die reverse Transkription wurde immer bei 42°C für 30 min durchgeführt, da hier die M-MLV ihr Arbeitsoptimum hat. Danach erfolgte der erste Denaturierungsschritt bei 95°C für 5 min und die weiteren dann bei 95°C für 20 sek. Die Annealing-Temperatur für das Andocken der spezifischen Primer wurde für jede spezifische mRNA separat etabliert und lag bei 58 bzw. 60°C für 20 sek. Die Verlängerung der Stränge, auch Extension genannt, wurde durch die Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus*, einem hitzestabilen Bakterienstamm, bewerkstelligt und erfolgte bei 72°C für 20 sek. Diese drei Schritte ($\hat{=}$ 1 Zyklus) wurden 30- bis 40-mal wiederholt. Nach jedem Real-Time PCR-Lauf erfolgte für jede Probe eine Schmelzkurvenanalyse. Diese war wie folgt: Aufschmelzen bei 95°C für 1 min, Erhitzen mit ansteigender Temperatur à 0,5°C für 8 sek über einen Bereich von 55-98°C. Kontrolliert wird die erste Ableitung der Fluoreszenzintensitätskurve, die genaue Gauss'sche Kurven für jedes Amplifikat erbringen sollte.

Da mit SybrGreen I gearbeitet wurde, musste vor jedem Lauf eine sogenannte "well factor plate" verwendet werden. Sie diente als allgemeine Kalibrierung der gesamten Platte und als individuelle Kalibrierung für jeden einzelnen Probenplatz. Eine 10-fach konzentrierte Lösung (external well factor solution) wurde von der Firma Biorad zur Verfügung gestellt, 1:10 mit DEPC-Wasser (3.3.1) verdünnt und war für 3 bis 4 Wochen im Kühlschrank haltbar.

3.9 RNA interference (RNAi)

RNA interference (RNAi) bezeichnet die experimentelle Ausnutzung eines natürlichen Mechanismus der Virusabwehr in den Zellen, mit dem die Expression bestimmter Genprodukte durch kurze, spezifische, doppelsträngige RNA-Moleküle unterdrückt wird. Indem small interference (si) RNAs nach Entwinden spezifisch an mRNA binden,

kann die doppelsträngige siRNA/mRNA anschließend durch doppelstrangspezifische Nukleasen rasch abgebaut werden (Zamore 2001, Dykxhoorn et al. 2003).

RNAi-Mechanismus:

Doppelsträngige (ds) RNA wird durch das Enzym Dicer, einem Mitglied der RNase III Familie, in siRNAs gespalten. Diese siRNAs sind meist 21-23 Nukleotide lang und der Prozess ist ATP-abhängig. Die siRNAs werden dann in den RNA-inducing silencing complex (RISC) aufgenommen. Obwohl die Aufnahme von siRNAs durch RISC ATP-unabhängig ist, benötigt das Entwinden der siRNA-Duplex ATP. Nach dem Entwinden kann der einzelsträngige Gegenstrang (antisense) RISC und mRNA, die eine komplementäre Sequenz aufweist, hybridisieren. Die Target-RNA wird dann spezifisch von Nukleasen geschnitten. Durch experimentelle Einbringung spezifischer siRNAs kann dieser natürliche zelluläre Mechanismus zur spezifischen Unterdrückung eines Genproduktes verwendet werden.

3.9.1 Herstellung der siRNA Konstrukte und Subklonierung

Plasmide sind zirkuläre, doppelsträngige DNA-Moleküle, die sich unabhängig vom bakteriellen Genom in Bakterien vermehren können. Die Minimalausstattung eines Plasmids besteht aus einem Replikationsstart (ORI, origin of replication), einem Selektionsgen (meist ein Antibiotikaresistenzgen) und einer Klonierungsstelle (multiple cloning site), um eine gewünschte DNA-Sequenz ins Plasmid einbauen zu können.

Der in der Arbeit verwendete Vektor (pSilencerTM 1.0-U6) der Firma Ambion ist 3.24 kb lang und besitzt ein Ampicillin-Resistenzgen (Abbildung 3-1). Der pSilencerTM 1.0-U6 Vektor wurde freundlicherweise von Frau Dr. Krump-Konvalinkova zur Verfügung gestellt.

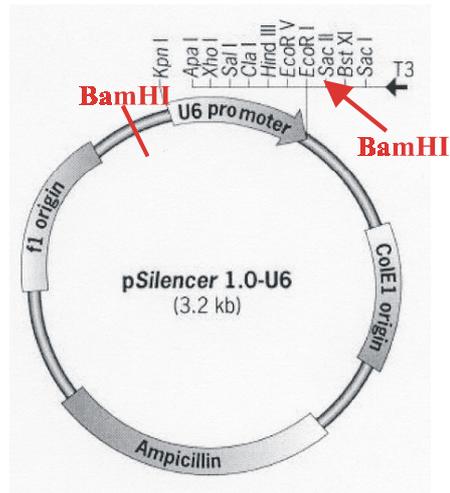


Abbildung 3-1: pSilencer™ 1.0-U6 Vektor der Firma Ambion mit den verwendeten Schnittstellen Apa AI, EcoR I, Bam HI und Xho I.

3.9.1.1 Annealing von Oligonukleotiden für RNAi

Synthetisierte Oligonukleotide wurden mit DEPC-Wasser (3.3.1) so verdünnt, dass sie eine Endkonzentration von 1 µg/ml hatten. Folgender Mix wurde für einen Ansatz pipettiert: 2 µl sense-Oligonukleotide, 2 µl antisense-Oligonukleotide und 46 µl Annealingpuffer (3.3.4). Die Oligonukleotide wurde für 3 min bei 90°C aufgeschmolzen und langsam auf 37°C abgekühlt, damit die Oligonukleotide miteinander hybridisieren konnten. Der Ansatz wurde für eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert.

3.9.1.2 Ligation mit dem pSilencer™ 1.0-U6 Vektor

Die T4 DNA Ligase katalysiert die Bildung einer Phosphodiester-Bindung zwischen der 5'-Phosphatgruppe und der 3'-Hydroxylgruppe von doppelsträngiger DNA. Somit kann sowohl DNA mit glatten als auch mit überhängenden Enden verknüpft werden. Die linearisierte DNA des pSilencer™ 1.0-U6 Vektors und die jeweiligen annealten doppelsträngigen Oligonukleotide wurden so verdünnt, dass man eine Endkonzentration von 0,1 µg/µl bzw. 10 ng/µl erhielt. Man setzte immer einen Kontrollansatz und die verschiedenen Ansätze mit dem spezifischen Insert an. Die Ansätze wurden leicht gevortext und über Nacht bei 16°C im Wasserbad inkubiert.

Kontrollansatz:

1 µl Annealingpuffer, 1 µl (ca. 100 ng/ml) linearisierter pSilencer™ 1.0-U6 Vektor, 1 µl T4 Ligase 10-fach Puffer, 1 µl T4 DNA Ligase, 6 µl Reinstwasser (ddH₂O)

Ansatz für die Konstrukte:

1 µl verdünntes Insert, 1 µl linearisierter pSilencer™ 1.0-U6 Vektor (ca. 100 ng/ml), 1 µl T4 Ligase 10-fach Puffer, 1 µl T4 DNA Ligase, 6 µl Reinstwasser (ddH₂O)

3.9.1.3 Transformation von kompetenten *E.coli* Bakterien (DH5α) mittels

Hitzeschock

Die Ligationsprodukte wurden aus dem Wasserbad genommen und auf Eis gestellt. Kompetente *E.coli* Bakterien wurden aus dem -80°C Gefrierschrank geholt und auf Eis gestellt, um sie langsam aufzutauen. 2,5 µl Ligationsprodukt bzw. Kontrollansatz wurden mit 50 µl *E.coli* Suspension leicht resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. In der Zwischenzeit wurden zwei Thermoblöcke auf 37°C bzw. 42°C vorgeheizt. Nach der Inkubationszeit wurden die Eppendorf-Cups für 90 sek bei 42°C (Hitzeschock) gehalten, um eine Penetration in die *E.coli* Bakterien zu erreichen und danach für 2 min auf Eis gestellt. 150 µl SOCS-Medium, das vom Hersteller mitgeliefert wurde, wurde in jedes Eppendorf-Cup gegeben und die Bakterien zur Erholung für 45 min bei 37°C im Heizblock unter Schütteln inkubiert. 100 µl der jeweiligen Bakteriensuspension wurden auf Agarplatten mit Ampicillin gegeben, ausgestrichen und über Nacht kopfüber im Brutschrank inkubiert.

3.9.1.4 Klonierung

Eine Klonierung ist die massenhafte, identische Vermehrung eines DNA-Fragments, was durch Einführung in einen Vektor, mit dem ein Wirtsbakterium infiziert werden kann, ermöglicht wird. Erst durch die Klonierung kann man große Mengen eines DNA-Fragments herstellen, die dann für Experimente herangezogen werden können.

Waren *E.coli*-Kolonien nach der Transformation mit dem Vektor auf den Agarplatten gewachsen, wurde frisches autoklaviertes LB-Medium (3.6.1) mit 5 mg/ml Ampicillin hergestellt. Eine Kolonie wurde gepickt und 15 ml LB-Medium (3.6.1) angeimpft. Über Nacht wurde die Kultur hochgeschüttelt. Sicherheitshalber wurde eine kleine Kultur

eingefroren (3.6.2). Aus 2 ml Bakterienkultur wurde eine 100 ml Kultur über Nacht angesetzt, hochgeschüttelt und anschließend eine Plasmidpräparation (3.7.7.1) durchgeführt.

3.9.1.5 Restriktionsanalysen für die Konstrukte

Um ein DNA-Fragment in einen Vektor einzubauen, muss die doppelsträngige DNA des verwendeten Vektors mit Restriktionsendonukleasen bzw. Restriktionsenzymen geschnitten werden. Dabei handelt es sich um bakterielle Enzyme, die bestimmte Sequenzabschnitte auf der DNA erkennen und schneiden. Die Restriktionsenzyme erkennen je nach Spezifität 4-8 bp in einem DNA-Strang. Die Erkennungssequenzen sind meist Palindrome, d.h. symmetrisch und damit in beiden Strängen gleich aufgebaut. Am häufigsten werden Enzyme mit Erkennungssequenzen von sechs Basen verwendet. Um den verwendeten pSilencer™ 1.0-U6 Vektor zu linearisieren, wurden die Restriktionsenzyme Apa I und EcoR I verwendet.

Die eingesetzte Enzymmenge wird in Units (U) angegeben, dabei schneidet 1 U Enzym 1 µg doppelsträngige DNA pro Stunde. Das Temperaturoptimum der eingesetzten Enzyme wurde dem Herstellerprotokoll entnommen, der verwendete Puffer wurde mitgeliefert. Der Verdau wurde bei 37°C im Heizblock für 60 min durchgeführt. Die Restriktionsenzyme BamH I und Xho I wurden verwendet. Für einen 25 µl Ansatz wurden folgende Reagenzien verwendet: 2,5 µl 10-fach Puffer, 1-3 µl DNA (ca. 500-600 ng/ml), 1 µl von jeweiligem Enzym, 0,5 µl BSA (dient zur Enzym-Stabilisierung) und Reinstwasser (ddH₂O).

3.9.1.6 Transfektion von THP-1 Zellen

Zellen können auf unterschiedlichste Weise mit Plasmiden transfiziert werden, z.B. mittels Endo- oder Phagocytose, Fusion mit der Zelle, Elektroporation, Mikroinjektion oder verschiedener Virensysteme. In der vorliegenden Arbeit wurde Metafectene der Firma Biontex und der Cell Line Nucleofector™ Kit V der Firma Amaxa (das Nucleofector™ Gerät von Amaxa wurde von Dr. Stefan Linder freundlicherweise zur Verfügung gestellt) verwendet. Die zu transfizierenden Zellen sollten im proliferierenden und vitalen Zustand und die DNA frei von Endotoxinen (LPS) sein, was durch die Verwendung des EndoFree Kits von Qiagen gesichert wurde. Die

Transfektionseffizienzen von THP-1 Zellen wurden mit einem GFP-Vektor (pGFP.C I, green fluorescence protein, von Frau Dr. Krump-Konvalinkova freundlicherweise zur Verfügung gestellt) ausgetestet. GFP ist ein fluoreszierendes Quallenprotein, das ein ähnliches Anregungs- und Emissionsspektrum wie Fluorescein hat. THP-1 Zellen wurden mit verschiedenen DNA- und Metafectene-Konzentrationen und für verschiedene Zeiten bzw. mit dem Cell Line Nucleofector™ Kit V für unterschiedliche Zeiten nach Protokoll transfiziert und die Transfektionseffizienzen mittels Durchflusszytometrie gemessen.

3.9.1.7 Stabile Transfektion von THP-1 Zellen

Eine stabile Transfektion zeichnet sich dadurch aus, dass die Fremd-DNA in das Genom der Zellen stabil (d.h. dauerhaft) eingebaut wird. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Kotransfektion mit dem jeweiligen Konstrukt und dem G418-Vektor (pcDNA3; von Frau Dr. Krump-Konvalinkova freundlicherweise zur Verfügung gestellt) durchgeführt, da dieser eine Geneticin-Resistenz aufweist, was zur Selektion erfolgreich transfizierter Zellen benutzt werden kann. Nach verschiedenen Vorversuchen wurden 600 µg/ml Geneticin in dem RPMI-Medium (3.5.1) zur Selektion erfolgreich transfizierter Zellen verwendet.

3.9.1.8 Transiente Transfektion von THP-1 Zellen

Transfizierte Fremd-DNA wird in den Zellen meist nach einigen Tagen wieder ausgeschleust oder abgebaut. Deshalb sind transiente Transfektionen nur für Kurzzeitversuche geeignet. In der vorliegenden Arbeit wurden die Zellen für 24 h mit dem Cell Line Nucleofector™ Kit V nach Protokoll transfiziert, das Medium gewechselt und die Zellen inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde Gesamt-RNA isoliert und die interessierenden Transkripte mittels Real-time RT-PCR quantifiziert.

3.10 Durchflusszytometrie/FACS

Die Durchflusszytometrie, in der präparativen Form auch FACS (fluorescence activated cell sorting) genannt, ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung optischer Merkmale, wie Granularität, Größe oder durch Fluoreszenzfarbstoff-markierte Antikörper detektierte Oberflächenmoleküle oder intrazelluläre Proteine auf

Einzelzellebene. Zur Analyse werden die Zellen einer Zellsuspension in einem Kapillarstrom an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbei geleitet. Bei exakter Anregung der Elektronen des Fluoreszenzfarbstoffes durch den monochromatischen Laserstrahl werden diese auf ein höheres Energieniveau gehoben. Nach dem Laserpuls fallen die Elektronen unter Abgabe von Energie (in Form von Photonen) auf ihr Ursprungsniveau zurück. Die emittierte Photonen-charakteristische Wellenlänge, die durch einen Photodetektor registriert wird, verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern/Zelle, was für alle analysierten Zellen als Histogramm-Plots dargestellt werden kann. Zusätzlich werden durch die Lichtbeugung und Lichtstreuung (auch als forward scatter (FSC) und sideward scatter (SSC) bezeichnet) Informationen über die Größe und die Granularität der Zellen gewonnen, was man anhand eines Dot-Plots gegeneinander auftragen kann.

Eine gleichzeitige FACS-Messung mit Antikörpern, die mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierte sind, ist möglich, weil sich die geeigneten Farbstoffe bei einer gemeinsamen Wellenlänge anregen lassen, aber über unterschiedliche, für den jeweiligen Farbstoff charakteristische Emissionsfrequenzen verfügen. Bei FITC ist das Absorptionsmaximum bei 495 nm und Emissionsmaximum bei 519 nm. Man kann aber auch Farbstoffe detektieren, die von den Zellen selbst produziert werden, wie z. B. GFP, welches als Kontrolle der Transfektionseffizienz genutzt werden kann.

3.10.1 Oberflächenproteine

3.10.1.1 CD36-Färbung

Der Oberflächenrezeptor CD36 ist der quantitativ wichtigste Scavenger Rezeptor (1.5.1), der die Aufnahme von modifiziertem LDL vermittelt. Nach der experimentellen Inkubationszeit wurden THP-1 Zellen in einem 15 ml Falcon-Röhrchen gesammelt und bei 1000 U/min für 5 min zentrifugiert. Danach wurden die Zellen mit HHMC-Lösung (3.3.2) gewaschen und in 96-Lochrundbodenplatten verteilt und nochmals zentrifugiert (1000 U/min, 5 min, 10°C). Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und unspezifische Bindestellen durch Vorinkubation mit 5 % Humanserum für 30 min auf Eis gesättigt. Nach zweimaligem Waschen mit HHMC-Lösung (3.3.2) wurden die Zellen entweder mit einem irrelevanten primären Antikörper (Isotyp-Kontrolle, 1:100) oder einem

spezifischen CD36 (FA6, 1:40) Antikörper für 45 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden erneut zweimal mit HHMC-Lösung (3.3.2) gewaschen und wieder bei 1000 U/min für 5 min zentrifugiert. Der sekundäre, FITC-gekoppelte Antikörper wurde 1:100 verdünnt und für 45 min auf Eis inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen mit 3,7 %-igem PFA fixiert und in FACS-Röhrchen überführt. Die Auswertung erfolgte mit der Software CELLQuest™ im Durchflusszytometer der Firma Becton Dickinson.

3.10.1.2 ICAM-1-Färbung

Mit Ausnahme des ICAM-1 spezifischen Antikörpers (anti-CD54) wurde das gleiche Färbeprotokoll wie für die CD36-Färbung verwendet. Beide primären Antikörper (Isotyp-Kontrolle und ICAM-1) wurden 1:100 mit HHMC-Lösung (3.3.2) verdünnt. Der sekundäre Antikörper ist der gleiche wie bei 3.10.1.1.

3.10.2 Intrazelluläre Proteine

Möchte man intrazelluläre Proteine im Durchflusszytometer messen, müssen die Zellen vor der Färbung permeabilisiert werden. Es gibt dazu verschiedene Möglichkeiten. In dieser Arbeit wurden die Zellen mit eiskaltem 100 %-igem Methanol für 45 sek permeabilisiert. Es ist wichtig, die optimale Permeabilisierungsdauer auszutesten, da zu kurze Zeiten die Zellmembran nicht ausreichend fenestrieren und zu lange Permeabilisierung die Zellmembran so zerstören können, dass dadurch intrazelluläre Proteine ausgeschwemmt werden.

3.10.2.1 PPAR γ -Färbung

PPAR γ ist ein wichtiger nukleärer Transkriptionsfaktor (1.5.2) für zahlreiche Gene des Lipidstoffwechsels und der Adipogenese. THP-1 Zellen wurden nach den experimentellen Inkubationen in 15 ml Falcon-Röhrchen gesammelt und abzentrifugiert (1000 U/min, 5 min, RT). Die Zellen wurden in HHMC-Lösung (3.3.2) aufgenommen und auf eine 96-Lochrundbodenplatte verteilt. Nach dem Zentrifugieren (1000 U/min, 5 min, 10°C) wurde der Überstand vorsichtig entfernt und das Zellpellet mit 100 μ l eiskaltem Methanol für 45 sek permeabilisiert. Sofort wurde 100 μ l HHMC-Lösung (3.3.2) zum Neutralisieren in die Vertiefungen gegeben und abzentrifugiert

(1000 U/min, 5 min, 10°C). Die 96-Lochrundbodenplatte wurde nochmals mit HHMC-Lösung (3.3.2) gewaschen, um das Methanol vollständig zu entfernen. Durch Vorinkubation mit 5 % Humanserum für 45 min auf Eis wurden die unspezifischen Bindungsstellen gesättigt. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen entweder mit Isotyp- oder PPAR γ -Antikörper (beide 1:100 verdünnt) für 45 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mit HHMC-Lösung (3.3.2) zweimal gewaschen und abzentrifugiert (1000 U/min, 5 min, 10°C). Der sekundäre FITC-gekoppelte Antikörper wurde für 45 min inkubiert und war der gleiche wie unter 3.10.1.1.

3.11 Western Blot

Die Größentrennung zur Untersuchung der Proteinfractionen fand im SDS-Polyacrylamid-Gel statt. Bei dieser Trennung wird das Protein durch das Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert, gleichzeitig erhält der Komplex aus Protein und SDS eine stark negative Ladung. Diese Ladung ist proportional zur Größe des Proteins, wobei die Proteineigenladung vernachlässigt werden kann. Die Wanderungsgeschwindigkeit eines so geladenen Proteins in einem elektrischen Feld wird nur durch das Molekulargewicht der Proteine beeinflusst.

3.11.1 Gesamtproteinextraktion aus PMA-differenzierten THP-1 Zellen

Vor dem Arbeiten mit Proteinen ist es wichtig, Handschuhe zu tragen, um keine Degradierung durch ubiquitär vorhandene Proteasen zu verursachen. Außerdem sollte stets mit sterilen Pipettenspitzen, Eppendorf-Cups und Reagenzien/Lösungen gearbeitet werden. Alle Zentrifugationsschritte sollten bei 4°C durchgeführt werden.

Die Petrischalen mit PMA-differenzierten THP-1 Zellen (2×10^6 /ml) wurden auf eine mit Eis gefüllte Metallplatte gelegt, um sofort Proteasen und andere Enzyme zu inaktivieren. Das Medium wurde mit einer 10 ml Pipette abgesaugt und verworfen. Die Petrischalen wurden mit 5 ml kaltem PBS (+ Mg²⁺/Ca²⁺) abgespült. Die adhärennten Zellen wurden mit einem Zellschaber abgekratzt und in ein vorgekühltes 15 ml Falcon-Röhrchen überführt. Nach dem Abzentrifugieren (5 min, 1000 U/min, 4°C) wurde der Überstand verworfen. 300-400 μ l Lysepuffer (3.3.5) mit der entsprechenden Menge an Protease-Inhibitor-Mix (3.3.6.6) und PMSF wurden zum Pellet gegeben und gut

resuspendiert. Das Ganze wurde in ein vorgekühltes 2 ml Eppendorf-Cup überführt und für mindestens 30 min auf Eis inkubiert. Die Proben wurden abzentrifugiert (10 min, 14000U/min, 4°C) und der Überstand in ein neues 0.2 ml Eppendorf-Cup überführt. Die Proteinmenge wurde mit dem D_C Protein Assay der Firma Biorad nach dem Herstellerprotokoll bestimmt. Die Proben wurden bis zum Gebrauch bei -80°C aufbewahrt. Die Gesamtproteinextraktion erfolgte nach DiDonato et al. (DiDonato et al. 1997).

3.11.2 Cytosol-Kern-Extraktion aus PMA-differenzierten THP-1 Zellen

PMA-differenzierte THP-1 Zellen (2×10^6 /ml) wurden in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und zentrifugiert (1000 U/min, 5 min, RT). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml eiskaltem PBS resuspendiert, in ein 2 ml Eppendorf-Cup überführt und nochmals zentrifugiert (2000 g, 1 min, 4°C). Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurde den Zellen 100 µl hypotonischer Puffer (3.3.6.1) zugegeben, um die Zellmembranen zu destabilisieren. Nach dem Zentrifugieren (5000 g, 1 min, 4°C) wurde der Überstand verworfen und 300 µl Lysepuffer (3.3.6.2) zum Pellet gegeben und resuspendiert, indem man das Eppendorf-Cup über ein "Rack" zweimal entlang zog und für 10 min auf Eis inkubierte. Danach wurden die Zellen zentrifugiert (8000 g, 1 min, 4°C) und der Überstand in ein 0.2 ml Eppendorf-Cup überführt; dies entsprach der Cytosolfraction. Dem Pellet wurde 1 ml 0,02 M KCl-Puffer mit 22 % Glycerol (3.3.6.3) zugegeben und für 15-30 min auf Eis inkubiert, damit das Glycerol in das Pellet gelangen konnte. Wieder erfolgte ein Zentrifugationsschritt (8000 g, 1 min, 4°C). Der Überstand wurde komplett verworfen. Zuerst wurden 41 µl 0,02 M KCl-Puffer (3.3.6.3) zugegeben, wobei sich das Pellet vom Boden des Eppendorf-Cups lösen sollte und danach 39 µl 0,6 M KCl-Puffer (3.3.6.4) zugesetzt und sofort gevortext. Nach der Inkubationszeit (30 min-1 h) auf Eis wurden die Zellen zentrifugiert (8000 g, 15 min, 4°C) und der Überstand, der nun der Kernfraction entsprach, wurde in ein neues 0,2 ml Eppendorf-Cup überführt. Die Proteinmenge wurde mit dem D_C Protein Assay von der Firma Biorad nach dem Herstellerprotokoll bestimmt. Die Proben wurden bis zum Gebrauch bei -80°C aufbewahrt. Die Cytosol-Kern-Extraktion erfolgte nach Alksnis et al. (Alksnis et al. 1991).

3.11.3 Proteinbestimmung nach Lowry

Proteine bilden mit Cu^{2+} -Ionen in alkalischer Lösung einen Komplex (Biuret-Reaktion) und die Cu^{2+} -Ionen aus der Biuret-Reaktion bilden mit dem Folin-Ciocalteau Reagenz einen instabilen blauen Komplex, der als Maß der Proteinkonzentration dient (Lowry et al. 1951).

Die Proteinbestimmung der Proben wurde mit dem unten stehenden Protokoll durchgeführt:

Lösung A: 2 % Na_2CO_3 , 0,16 % Na-Tartrat, 1 % SDS, ad 500 ml NaOH (0.1 N)

Lösung B: 4 % CuSO_4 (in Reinstwasser (ddH₂O))

Lösung C: 1 ml Lösung B + 100 ml Lösung A
(3 ml pro Probe)

Lösung D: Reinstwasser (ddH₂O) + Folin Ciocalteau Reagenz (1:1)
(300 μl pro Probe)

1000 μl Reinstwasser (ddH₂O) diene als Nullabgleich. Die Proben wurden verdünnt, indem man 10 μl bzw. 20 μl mit 990 μl bzw. 980 μl Reinstwasser (ddH₂O) mischte. 3 ml Lösung C (Lösung A + Lösung B) und 300 μl Lösung D wurden zu den Proben gegeben, gevortext und entweder bei RT für 30 min oder bei 60°C für 10 min inkubiert, im Photometer bei 560 nm gemessen und an einer BSA-Eichgerade quantifiziert.

3.11.4 Polyacrylamidgele für Western Blot

Für kleine Proteine (30-60 kDa) wurde ein 10 % Polyacrylamidgel und für große Proteine (> 200 kDa) ein 6 % Polyacrylamidgel verwendet. Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen im Verhältnis 5:1 mit Probenpuffer (3.3.8.6) gemischt und im Falle der kleinen Proteine für 5-10 min bei 95°C erhitzt, um eventuell vorliegende Multimere zu denaturieren. Bei den großen Proteinen wurden die Proben nicht gekocht, da es zu Aggregationen der Proteine kommen kann. Dies führt dazu, dass die Proteine nicht in das Laufgel eintreten können. Um die Proteingröße zu bestimmen, wurde immer ein Größenmarker parallel aufgetragen. Die Gele liefen für 45-60 min bei einer konstanten Spannung von 200 V im Laufpuffer (3.3.8.2).

3.11.5 Transfer der Proteine auf Nitrocellulosemembran

Mittels SDS-PAGE aufgetrennte Proteine können elektrophoretisch auf eine Nitrocellulosemembran, die hohe Proteinbindungskapazität besitzt, übertragen werden. Um die Proteinbindungsstellen zu aktivieren, versetzt man den Transferpuffer (3.3.8.3) mit 20 % Methanol. Das SDS-Gel wird auf eine Nitrocellulosemembran und diese zwischen mehrere Schichten Whatmanpapier gelegt, welche zuvor in Transferpuffer (3.3.8.3) getränkt wurden. Es ist wichtig darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen zwischen Membran und Gel befinden. Der Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran erfolgte in einer Blotkammer (Halbtrockenzelle) von Biorad bei 100 V und 0,14-0,20 mA für eine Stunde.

3.11.6 Inkubation mit Antikörpern und Immundetektion

Die Nitrocellulosemembran kann nun mit verschiedenen Antikörpern inkubiert werden, wodurch spezifische Proteine auf der Membran markiert werden und später auf einem Negativfilm sichtbar gemacht werden können. Zuvor wurde die Membran jedoch mit 5 % Magermilch geblockt, um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu sättigen. Dies geschieht durch eine 1-stündige Inkubation im Blockierungspuffer (3.3.8.5). In der vorliegenden Arbeit wurden folgende primäre Antikörperlösungen verwendet:

PPAR γ :	55 kDa	rabbit, 5 % BSA, 1:1000, über Nacht, 4°C
ABCA1:	220 kDa	rabbit, 3 % Magermilch, 1:1000, 1 h RT
LXR α :	64 kDa	rabbit, 5 % Magermilch, 1:500, über Nacht, 4°C
I κ B- α (C-21):	41 kDa	rabbit, 5 % Magermilch, 1:1000, 1 h RT
phospho-I κ B- α (Ser32/36):	40 kDa	mouse, 5 % BSA, 1:1000, über Nacht, 4°C
p65 (C-20):	65 kDa	rabbit, 5 % Magermilch, 1:1000, 1 h RT
p50 (NLS-G):	50 kDa	goat, 5 % Magermilch, 1:1000, 1 h RT
β -Aktin (AC-74):	47 kDa	mouse, 5 % Magermilch, 1:5000, 1 h RT

Mit den sekundären Antikörpern (HRP-markiert) wurden die primären Antikörper detektiert. Dies wurde für 1 h bei RT durchgeführt. Die Membranen wurden mit TBS/Tween-Puffer (3.3.8.4) dreimal für 5 min unter leichtem Schütteln gewaschen und für 1 min in einer ECL-Lösung (Chemilumineszenz) der Firma Pierce inkubiert. Anschließend wurden die Membranen auf einem Film exponiert, entwickelt und zum Trocknen aufgehängt.

Folgende sekundäre Antikörper wurden verwendet:

anti-mouse: 5 % Magermilch, 1:2000, 1 h bei RT

anti-rabbit: 5 % Magermilch, 1:2000, 1 h bei RT

anti-goat: 5 % Magermilch, 1:2000, 1 h bei RT

3.12 Arbeiten mit Lipoproteinen

3.12.1 Isolierung von Lipoproteinen aus Plasma

LDL wurde aus Vollblut von gesunden und nüchternen Spendern gewonnen, indem man 3 ml EDTA (4 % in 0,9 % NaCl) in eine 50 ml Spitze vorlegte. Das Blut wurde auf zwei 50 ml Falcon-Röhrchen aufgeteilt und bei 4000 U/min, 20 min, 10°C abzentrifugiert, um das Plasma zu gewinnen. Je 6 ml vom Überstand wurden in sechs Ultrazentrifugen-Röhrchen, die zuvor mit Aceton und Reinstwasser (ddH₂O) ausgespült wurden, überführt, an der Waage austariert und in der Ultrazentrifuge (L7 UZ, Beckmann; SW 40 Rotor), die auf 10°C vorgekühlt wurde, zentrifugiert (13000 U/min, 15 min, 10°C). In der Zwischenzeit wog man 11,07 g KBr ab, zerrieb es mit einem Mörser und gab es in ein 50 ml Falcon-Röhrchen. Aus dem zentrifugierten Plasma wurden aus jedem Röhrchen 4,5 ml entnommen, in das KBr-Röhrchen gegeben und leicht geschwenkt. Die Lösung darf nicht schäumen. Danach wurden 4 ml von diesem Gemisch in sechs Ultrazentrifugen-Röhrchen, die zuvor mit Aceton und Reinstwasser (ddH₂O) ausgespült wurden, gegeben. Dabei dürfen die Wände der Röhrchen nicht berührt werden. Um VLDL, LDL und HDL zu trennen, wurden drei Dichtegradientenlösungen (D 1, D 2 und D 3; 3.3.9.1) vorsichtig am Röhrchenrand übereinander geschichtet. Zuerst D 1 (3 ml), dann D 2 (3 ml) und zuletzt D 3 (2 ml). Man tarierte die Röhrchen mit D 3 an der Waage aus und zentrifugierte sie bei

36000 U/min, 10°C, für 20 bis 24 h. Danach wurde die LDL- und HDL- Schicht abpipettiert, über Kartuschen (3.12.2) entsalzt, die Proteinmenge nach Lowry (3.11.3) bestimmt und weiterverarbeitet. Die LDL-Präparation erfolgte nach Schulz et al. (Schulz et al. 1995).

3.12.2 Entsalzung von nativem LDL (natLDL)

Wurde natives LDL zur Herstellung von oxidiertem LDL verwendet, musste es zuvor entsalzt werden. Die vorhandenen Salze sind zum einen toxisch für die Zellen und zum anderen muss das EDTA für die Oxidation entfernt werden.

Dazu wurden Econo-Pac 10 DG Säulchen verwendet. Die Säulchen wurden mit 20 ml PBS-Puffer (3.3.9.2) gespült. Nach dem Spülvorgang wurden 2 ml natives LDL auf die Säulchen gegeben und mit 5-10 ml PBS-Puffer nachgespült. Aufgefangenes LDL wurde in speziellen Papierhütchen (Centriflo cones) durch Zentrifugation aufkonzentriert, indem man mehrere Male für 20 min bei 2200 U/min bei 4°C zentrifugierte. Am Ende wurde zusätzlich einmal mit 5 ml PBS-Puffer nachgespült, zentrifugiert und das LDL in ein 15 ml Cup überführt. Nachdem die Proteinkonzentration (3.11.3) bestimmt wurde, wurde natives LDL lichtgeschützt im Kühlschrank aufbewahrt und war für 2 Wochen haltbar.

3.12.3 Herstellung von oxidiertem LDL (oxLDL)

Die Herstellung von oxidiertem LDL erfolgte nach Schulz et al. (Schulz et al. 1995). Die Oxidation von LDL wurde mit CuCl_2 oder CuSO_4 durchgeführt, wobei vorher eine Entsalzung über Kartuschen erfolgen musste (3.12.2), um das EDTA, das die Cu^{2+} -Ionen abfangen würde, zu entfernen. Das LDL wurde mit einer Proteinkonzentration von 200 $\mu\text{g/ml}$ für 20 bis 24 h bei 37°C mit 5 μM CuSO_4 bzw. 10 μM CuCl_2 oxidiert und die Reaktion am nächsten Tag mit EDTA (0,24 mM) gestoppt. Das oxidierte LDL wurde anschließend mit PBS-Puffer (3.3.9.2) gewaschen und in speziellen Papierhütchen (Centriflo Cones) aufkonzentriert. Mittels Lowry wurde die Probenkonzentration berechnet und das oxidierte LDL in einer Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ für Experimente eingesetzt.

3.12.4 Delipidierung von HDL (dHDL)

Die Delipidierung von HDL erfolgte nach Osborne (Osborne 1986). 250 µl HDL wurden langsam und tröpfchenweise in 3 ml kaltes, vortexendes Methanol (100 %-ig), das in ein 50 ml Falcon-Röhrchen vorgelegt wurde, gegeben. Es ist wichtig, darauf zu achten, dass die Tropfen das Methanol treffen und nicht den Röhrchenrand. Danach wurden 7 ml kalter Diethyl-Ether in die vortexende Lösung gegeben und für 10 min auf Eis stehen gelassen. Die Röhrchen wurden zentrifugiert (1000 U/min, 5 min, 4°C) und der Überstand verworfen. Erneut versetzte man das Pellet mit kaltem Diethyl-Ether (10 ml), während das Falcon-Röhrchen gevortext wurde. Nach einer 10-minütigen Inkubationszeit auf Eis wurden die Röhrchen bei 1000 U/min für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und mit Stickstoff getrocknet. Danach wurde das Pellet mit 250 µl Resolubilisierungs-Lösung (3.3.9.3) gelöst, steril filtriert und bei 4°C lichtgeschützt aufbewahrt.

3.12.5 Zelluläre Lipidextraktion und Cholesterin-Messung

Die Zellen wurden in ein 15 ml Falcon-Röhrchen gesammelt und bei 1000 U/min, 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde zweimal mit PBS gewaschen, zentrifugiert und der Überstand vollständig verworfen, um das FCS, das im Medium vorhanden ist, zu entfernen. Dreimal wurde 200 µl kaltes Methanol zugegeben und nach jeder Zugabe gevortext, bis sich alles gut vermischt hatte. Danach gab man 1,2 ml kaltes Chloroform hinzu und vortexte nochmals. Zuletzt versetzte man das resuspendierte Pellet mit 450 µl 0,88 %-igen kaltem KCl, vortexte und zentrifugierte es bei 3000 U/min für 3 min, um eine bessere Phasentrennung zu erhalten. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen, 163 µl Methanol und 163 µl 0,88 %-ige KCl hinzugefügt, gevortext und abzentrifugiert (3000 U/min, 3 min, RT). Mit einer Pipettenspitze entnahm man die untere Phase, in der die Fette gelöst waren, und überführte sie in ein 2 ml Eppendorf-Cup. Mit einer Vakuumzentrifuge wurden die Lösungsmittel verdampft. Nach dem Trocknen wurde peroxidfreies Dioxan hergestellt, was mit Katecholamin-Säulchen der Firma Chromsystems, die aktiviertes Aluminiumpulver enthielten, bewerkstelligt wurde. Nun stellte man sich eine 1:1 (2-Propanol/Dioxan) Lösung her (Cho 1983) und gab 25 µl von diesem Gemisch auf das getrocknete Pellet. Um den Cholesteringehalt der Proben zu messen, wurde 1 ml

Cholesterin-Assay-Lösung der Firma Rolf Greiner in eine Plastikkuvette vorgelegt und mit 10 µl gelöstem Pellet versetzt. Nach einer 10- bis 15-minütigen Inkubationszeit wurde der Cholesteringehalt photometrisch bei 546 nm gemessen. Die Extraktion wurde nach dem Protokoll von Folch und Kollegen modifiziert (Folch et al. 1957).

3.12.6 Zellulärer Lipid-Aufnahme-Efflux-Assay

THP-1 Zellen und PMA-differenzierte THP-1 Zellen wurden mit IL-10 (10 ng/ml) oder PBS für 24 h vorinkubiert. Bis zum Ende des Versuches wurde den Zellen alle 24 h IL-10 oder PBS zugegeben. Nach der 24-stündigen Vorinkubation wurden die Zellen mit 100 µg/ml oxLDL (3.12.3) oder PBS-Puffer (3.3.9.2) für 48 h versetzt. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, um das oxLDL, das von den Zellen nicht aufgenommen wurde, zu entfernen. Für weitere 24 h wurden die Zellen mit 20 µg/ml dHDL (als Cholesterinakzeptor; 3.12.4) oder Resolubilisierungslösung (3.3.9.3) inkubiert (Abbildung 3-2). Nach dem Versuchsende wurden die zellulären Lipide mittels Methanol-Chloroform extrahiert und der zelluläre Cholesteringehalt photometrisch gemessen (3.12.5).

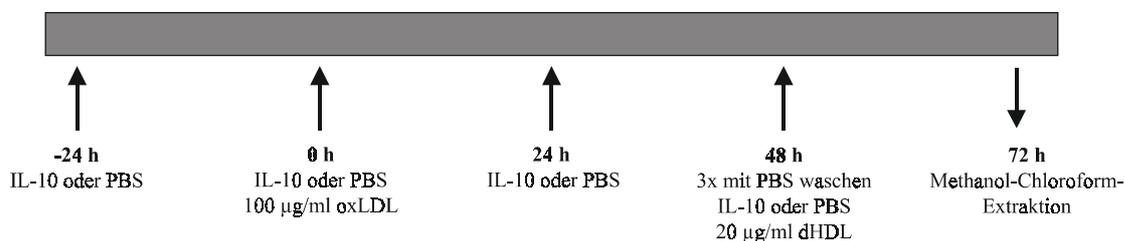


Abbildung 3-2: Schematischer Pipettierplan für den Lipid-Aufnahme-Efflux-Assay bei THP-1 Zellen und PMA-differenzierten THP-1 Zellen.

3.13 Fettfärbung mittels Oil Red O

Das Färbeprotokoll wurde nach Moore et al. modifiziert (Moore et al. 1998). THP-1 Zellen wurden mit 160 nM PMA entweder in 6-Lochrundbodenplatte oder Petrischalen, die einen Durchmesser von 10 cm hatten, für 72 h ausdifferenziert. Danach wurden die Zellen \pm 10 ng/ml IL-10, \pm 100 µg/ml oxLDL (3.12.3) und \pm 20 µg/ml dHDL (3.12.4) inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und für 30 min mit einer 3,7 %-igen PFA-Lösung fixiert. Danach wurde die PFA-Lösung

entfernt, indem die Platten dreimal mit Reinstwasser (ddH₂O) abgespült wurden. Bei einer 6-Lochrundbodenplatte wurden 1 ml pro Vertiefung und bei einer Petrischalen 3 ml 0,3 %-ige Oil Red O Färbelösung (3.3.10) verwendet und für 30 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Reinstwasser (ddH₂O) wurden die Schalen auf einem Zellstofftuch abgetropft und fotografiert.

3.14 Messung von zyklischem AMP (cAMP)

cAMP wurde mit dem Enzym-Immunoassay-Kit der Firma Assay Designs gemessen. Es war wichtig das komplette RPMI-Medium (3.5.1) zu entfernen, da das Medium selbst schon einen hohen cAMP Wert (> 350 pmol/ml) hatte. Dazu wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und abzentrifugiert (1000 U/min, 5 min). Für die Experimente wurden die Zellen in PBS gehalten und entweder mit 10 ng/ml IL-10, 100 nM Iloprost als Positivkontrolle oder PBS für 30 min und 3 h inkubiert. Nach der Inkubationszeit zentrifugierte man die Zellen ab (1000 U/min, 5 min) und lysierte sie mit 500 µl bzw. 1 ml 0,1 M HCl-Lösung. Nach 15-minütiger Lyse der Zellen wurden diese abzentrifugiert (2000 U/min, 5 min) und der Überstand in ein neues Eppendorf-Cup überführt. Die Proben wurden bis zum Gebrauch bei -20°C aufbewahrt. Die Durchführung erfolgte nach dem Herstellerprotokoll und wurde bei 405 nm im TECAN-Reader der Firma GENios gemessen.

3.15 TransAM™ Assay für die NFκB Untereinheiten p50 und p65

Um den Einfluss von IL-10 auf die beiden NFκB Untereinheiten p65 und p50 zu untersuchen, wurde außer Western Blot (3.11) ein spezifischer Assay (TransAM™ NFκB für p50 und p65) der Firma Active Motif verwendet. Dieser Kit enthielt immobilisierte Oligonukleotide des NFκB-Bindemotivs, an deren DNA-Sequenz die aktive Form von NFκB, die in den Kernextrakten enthalten war, binden konnte. PMA-differenzierte THP-1 Zellen wurden mit 10 ng/ml IL-10 oder PBS für 1, 2 und 4 h inkubiert und einer Cytosol-Kern-Extraktion (3.11.2) unterzogen. Die Kernextrakte wurden in einer Konzentration von 2 µg/ml für p50 bzw. 5 µg/ml für p65 verwendet. Die Durchführung erfolgte nach dem Herstellerprotokoll und wurde bei 450 nm und 690 nm im TECAN-Reader der Firma GENios gemessen.

4 Ergebnisse

4.1 Etablierung der Real-time RT-PCR

Optimale Bedingungen für die Real-time RT-PCR sind eine obligate Voraussetzung, um verschiedene Rezeptoren parallel quantifizieren und vergleichen zu können. Die Etablierung wurde für jeden einzelnen Rezeptor und jeden einzelnen Zelltyp (THP-1 Zellen, PMA-differenzierte THP-1 Zellen und PBMCs) ausgetestet. Dazu wurde aus einer Zellpassage die Gesamt-RNA isoliert (3.7.1) und als RNA-Pool für die Etablierung verwendet. Man benutzte immer 3 bis 4 verschiedene RNA-Pools, um die Bedingungen zu testen und zu verifizieren. Nach der Isolierung wurde die Gesamt-RNA einer DNase Behandlung (3.7.2) unterzogen, die RNA-Konzentration (3.7.3) bestimmt und die verschiedenen Rezeptoren mittels Real-time RT-PCR amplifiziert und quantifiziert. Dazu wurde die Gesamt-RNA in 10-er Verdünnungsschritten verdünnt (1000 ng, 100 ng, 10 ng und 1 ng) und in die Real-time RT-PCR eingesetzt. Zu etablierende Parameter waren: Konzentrationen für $MgCl_2$ und Primer; Temperaturen und Zeiten für Annealing und Extension. Der verwendete Fluoreszenzfarbstoff war SybrGreen I, der in doppelsträngige DNA interkaliert. Die optimierten PCR-Parameter für die unterschiedlichen Rezeptoren und Zellarten sind in den Tabellen 6-8 angegeben (THP-1 Zellen Tabelle 6, PMA-differenzierte THP-1 Zellen Tabelle 7 und PBMCs Tabelle 8).

Tabelle 6: Real-time RT-PCR Bedingungen für THP-1 Zellen.

THP-1 Zellen	Annealing-Temperatur	$[MgCl_2]_{End.}$	$[Primer]_{End.}$
GAPDH	58°C oder 60°C	3,5 mM	100 nM
CD36	58°C oder 60°C	3,5 mM	100 nM
ABCA1	58°C oder 60°C	4,0 mM	150 nM
LDL-R	58°C oder 60°C	4,0 mM	150 nM

Tabelle 7: Real-time RT-PCR Bedingungen für PMA-differenzierte THP-1 Zellen.

PMA-differenzierte THP-1 Zellen	Annealing-Temperatur	[MgCl ₂] _{End.}	[Primer] _{End.}
GAPDH	60°C	3,5 mM	100 nM
CD36	60°C	3,5 mM	100 nM
ABCA1	60°C	4,0 mM	150 nM
LXR α	60°C	1,5 mM	150 nM
LDL-R	60°C	4,0 mM	150 nM
SR-BI	60°C	3,5 mM	100 nM

Tabelle 8: Real-time RT-PCR Bedingungen für PBMCs.

PBMCs	Annealing-Temperatur	[MgCl ₂] _{End.}	[Primer] _{End.}
GAPDH	58°C	3,5 mM	100 nM
CD36	58°C	3,5 mM	100 nM
ABCA1	58°C	3,5 mM	100 nM

4.1.1.1 Standardgerade und Schmelzkurvenanalyse

Die 10-fach Verdünnungsreihen und die Standardgeraden dienen zur Etablierung der Linearität der Real-time RT-PCR. Für das unten angeführte Beispiel wurde Gesamt-RNA aus PMA-differenzierten THP-1 Zellen benutzt und GAPDH als housekeeping gene amplifiziert. 100 % Effizienz wären erreicht, wenn der Korrelationskoeffizient 1,000 und der Anstieg (slope) -3,320 betrüge (Abbildung 4-2).

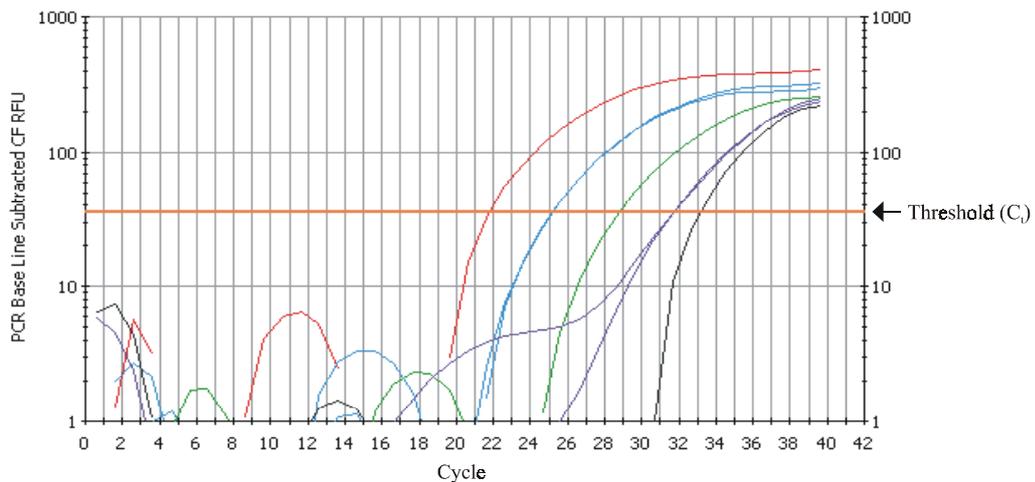


Abbildung 4-1: Amplifikation einer GAPDH-Verdünnungsreihe (Doppelwerte) mittels Real-time RT-PCR unter Verwendung von SybrGreen I. Gesamt-RNA PMA-differenzierter THP-1 Zellen wurde in 10-fach Verdünnungsschritten verwendet: 1000 ng RNA (rot, pur), 100 ng RNA (blau, 1:10), 10 ng RNA (grün, 1:100), 1 ng RNA (lila, 1:1000) und Negativkontrolle (schwarz).

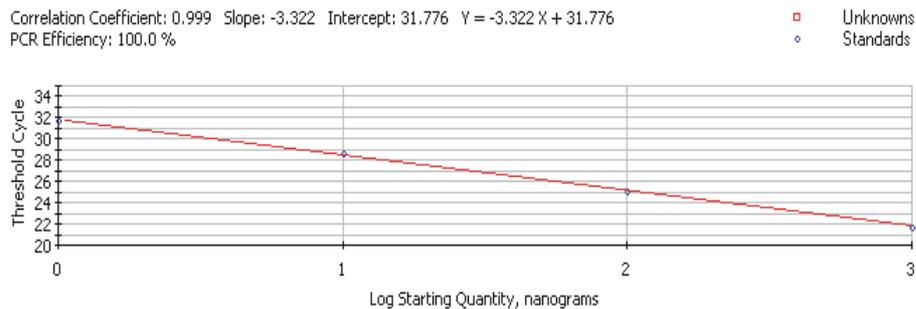


Abbildung 4-2: Standardgerade mit Doppelwerten einer GAPDH-Verdünnungsreihe mittels Real-time RT-PCR unter Verwendung von SybrGreen I. Gesamt-RNA PMA-differenzierter THP-1 Zellen wurde in 10-er Verdünnungsschritten eingesetzt: 1000 ng RNA (pur; 10^3), 100 ng RNA (1:10; 10^2), 10 ng RNA (1:100; 10^1) und 1 ng RNA (1:1000; $10^0=1$).

Parallel zur Etablierung der Bedingungen wurden stets auch die entstandenen Produkte untersucht. Da SybrGreen I ein unspezifischer Fluoreszenzfarbstoff ist, der in jede doppelsträngige DNA interkaliert, wurde nach jedem PCR-Lauf eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Damit konnten die verschiedenen Produkte unterschieden und charakterisiert werden. In Abbildung 4-3 sind zwei Beispiele für PMA-differenzierte THP-1 Zellen, die zum einen Primerdimere, CD36- und GAPDH-Amplifikate (linke

Abbildung), und zum anderen Primerdimere, ABCA1- und GAPDH-Amplifikate (rechte Abbildung) zeigen.

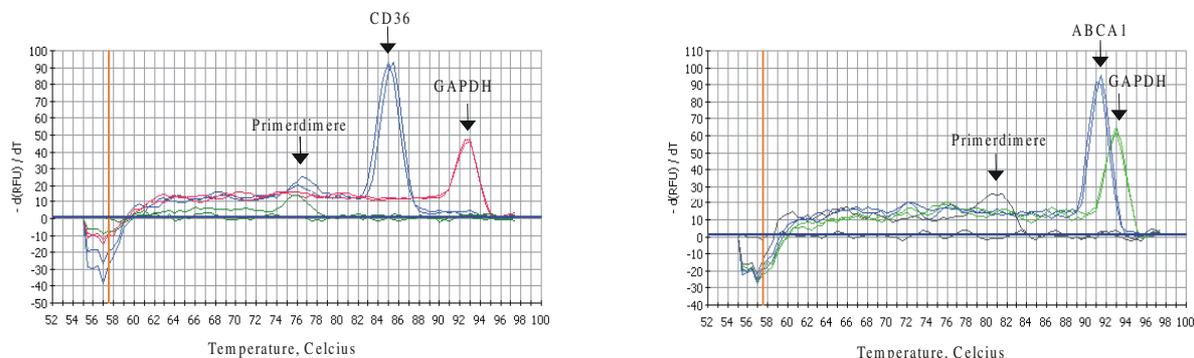


Abbildung 4-3: Schmelzkurvenanalyse von spezifischen Amplifikaten PMA-differenzierter THP-1 Zellen mittels Real-time RT-PCR unter Verwendung von SybrGreen I. Linke Abbildung zeigt Peaks von Doppelwerten für die Negativkontrollen (grün), CD36- (blau) und GAPDH-Amplifikate (rot). Rechte Abbildung zeigt Peaks von Doppelwerten für die Negativkontrollen (schwarz), ABCA1- (blau) und GAPDH-Amplifikate (grün).

Nach der Etablierung der Bedingungen sollte der für die Experimente am besten brauchbare interne Standard (housekeeping gene) gefunden werden. Ein idealer interner Standard sollte auch unter den untersuchten Manipulationen stets konstant exprimiert werden. Für THP-1 Zellen und PBMCs wurde nach eingehender Testung β -Aktin verwendet. Da die Expression von β -Aktin in PMA-differenzierten THP1 Zellen geringer war als die zu untersuchenden Rezeptoren, wurde GAPDH als interner Standard benutzt.

IL-10 Behandlungen zeigten keinen Einfluss auf die β -Aktin Transkription bei THP-1 Zellen bzw. PBMCs und GAPDH Transkription bei PMA-differenzierten THP-1 Zellen und konnten somit als interne Standards verwendet werden (Abbildung 4-4).

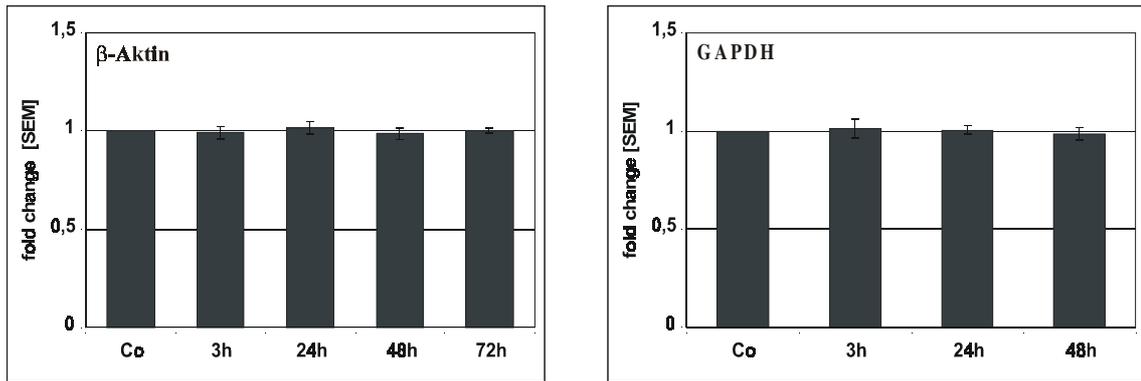


Abbildung 4-4: β -Aktin Transkription von THP-1 Zellen (links) und GAPDH Transkription von PMA-differenzierten THP-1 Zellen (rechts) mittels Real-time RT-PCR nach PBS oder IL-10 Behandlung (10 ng/ml) für 3 bis 72 h; $n = 6 \pm SEM$.

Soweit im Folgenden nichts anderes erwähnt wird, wurde aus den verwendeten Zellen die Gesamt-RNA (3.7.1) mit dem Isolierungskit der Firma Biorad isoliert, ein DNase Verdau (3.7.2) durchgeführt, die RNA-Konzentration (3.7.3) bestimmt und die verschiedenen Amplifikate spezifisch mittels Real-time RT-PCR amplifiziert und quantifiziert.

4.2 IL-10 reduziert die Expression von CD36

4.2.1 Transkription von CD36 nach IL-10 Exposition

4.2.1.1 THP-1 Zellen und PMA-differenzierte THP-1 Zellen

THP-1 Zellen und PMA-differenzierte THP-1 Zellen wurden mit 10 ng/ml IL-10 oder PBS für 3 bis 72 h inkubiert und die CD36 Transkription mittels Real-time RT-PCR bestimmt.

Die CD36 mRNA von THP-1 Zellen nahm nach IL-10 Exposition signifikant bereits nach 3 h und anhaltend bis mindestens 72 h um 60 % ab. Die Abnahme der CD36 mRNA PMA-differenzierter THP-1 Zellen verhielt sich ähnlich. Auch hier war eine signifikante Abnahme nach 3 h bis mindestens 48 h um 40 bis 50 % zu beobachten (Abbildung 4-5).

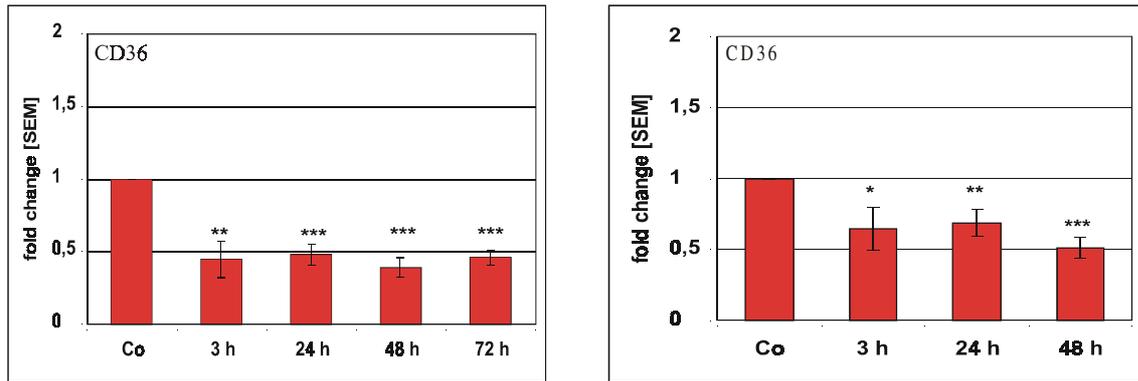


Abbildung 4-5: CD36 Transkription mittels Real-time RT-PCR. THP-1 Zellen (links) und PMA-differenzierte THP-1 Zellen (rechts) wurden mit 10 ng/ml IL-10 oder PBS für 3 bis 72 h behandelt; $n = 4-7 \pm SEM$; * $< 0,05$; ** $< 0,01$; *** $< 0,001$.

4.2.1.2 IL-10 Effekt auf CD36 in PBMCs

Um den Effekt von IL-10 auf die CD36 Transkription auch in primären Zellen zu testen, wurden periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) von gesunden Spendern nach Protokoll (3.5.2) isoliert und mit 10 ng/ml IL-10 oder PBS für 3 h inkubiert (Abbildung 4-6).

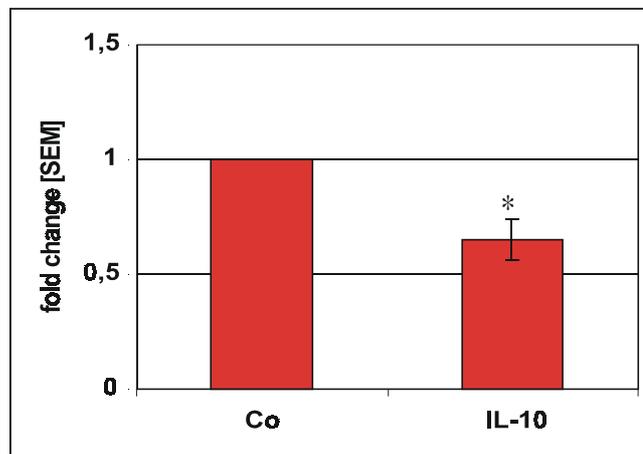


Abbildung 4-6: CD36 Transkription mittels Real-time RT-PCR. PBMCs von gesunden Spendern wurden für 3 h mit 10 ng/ml IL-10 oder PBS inkubiert; $n = 3 \pm SEM$; * $< 0,05$.

Wie bei THP-1 Zellen und PMA-differenzierten THP-1 Zellen schon gezeigt, reduzierte IL-10 auch bei PBMCs der verschiedenen Spender uniform und rasch die CD36 mRNA um 45 % (Abbildung 4-6).

4.2.2 CD36 Proteinexpression mittels Durchflusszytometrie nach IL-10 Behandlung

Um auch auf Proteinebene die CD36 Expression von THP-1 Zellen nach einer IL-10 Behandlung zu untersuchen, wurden die Zellen für 24 bis 72 h mit 10 ng/ml IL-10 oder PBS inkubiert. Nach der Färbung der Zellen mit Isotyp-Kontrolle oder dem CD36 Antikörper FA6 (3.10.1.1), wurde die Oberflächenexpression von CD36 mittels Durchflusszytometrie gemessen.

Wie in Abbildung 4-7 dargestellt, nahm die mittlere Fluoreszenz der CD36 Proteinexpression nach IL-10 Exposition weniger deutlich, aber signifikant um 6 % nach 24 h, um 12 % nach 48 h und um 4 % nach 72 h ab.

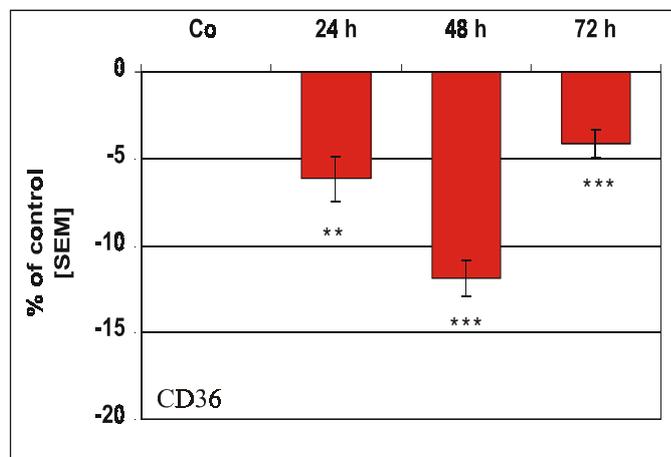


Abbildung 4-7: CD36 Proteinexpression mittels Durchflusszytometrie. THP-1 Zellen wurden für 24 bis 72 h mit 10 ng/ml IL-10 oder PBS inkubiert; $n = 6-7 \pm$ SEM; ** < 0,01; *** < 0,001.

4.2.3 CD36 Expression nach Koinkubationen mit IL-10 und dem PPAR γ -Agonisten 15d-PGJ₂ oder Indomethacin

Es ist bekannt, dass CD36 durch den Transkriptionsfaktor PPAR γ reguliert wird. Mit verschiedenen Koinkubationen sollte untersucht werden, ob IL-10 auch unter diesen Stimulationsbedingungen die CD36 Expression hemmen kann. Dazu wurden PMA-

differenzierte THP-1 Zellen mit $2 \mu\text{M}$ 15d-PGJ_2 , $2 \mu\text{M}$ 15d-PGJ_2 und 10 ng/ml IL-10 zusammen oder mit dem jeweiligen Lösungsmittel für 3 bis 48 h inkubiert, und CD36 mRNA mittels Real-time RT-PCR quantifiziert. Für die CD36 Oberflächenexpression (3.10.1.1) wurden THP-1 Zellen mit 10 ng/ml IL-10, $10 \mu\text{M}$ Indomethacin, beidem zugleich oder dem jeweiligen Lösungsmittel für 24 h und 48 h inkubiert und mittels Durchflusszytometrie gemessen.

PMA-differenzierte THP-1 Zellen, die mit dem PPAR γ Liganden 15d-PGJ_2 ($2 \mu\text{M}$) allein inkubiert wurden, zeigten einen deutlichen Anstieg in der CD36 mRNA nach 3 bis 48 h. Versetzte man sie zusätzlich mit IL-10, konnte der 15d-PGJ_2 -induzierte CD36 Anstieg verifiziert und signifikant reduziert werden (Abbildung 4-8).

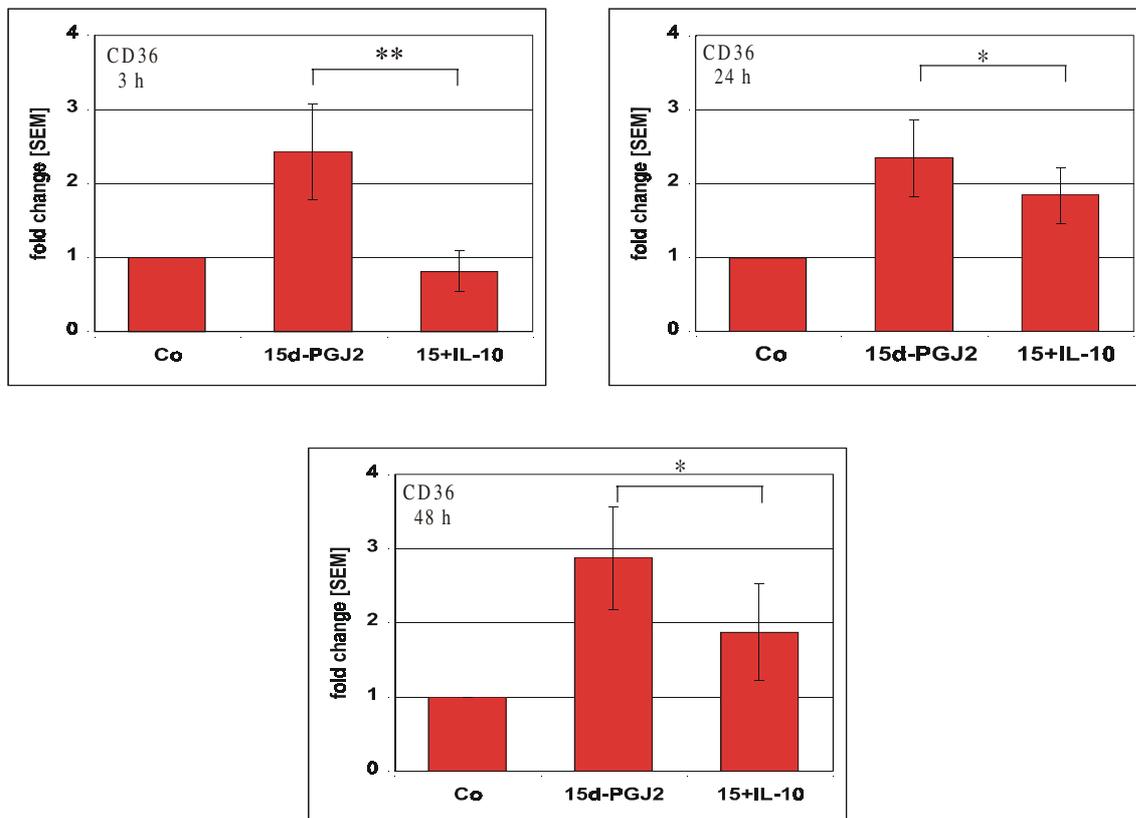


Abbildung 4-8: CD36 Transkription mittels Real-time RT-PCR. PMA-differenzierte THP-1 Zellen wurden mit $2 \mu\text{M}$ 15d-PGJ_2 , $2 \mu\text{M}$ 15d-PGJ_2 und 10 ng/ml IL-10 zusammen oder der jeweiligen Lösungsmittelkontrolle für 3 bis 48 h inkubiert; $n = 4-7 \pm \text{SEM}$; * $< 0,05$; ** $< 0,01$.

Inkubierte man THP-1 Zellen mit 10 μ M Indomethacin allein, stieg die CD36 Proteinexpression um 20 % nach 24 und 48 h an. Wurden die Zellen zusätzlich mit IL-10 inkubiert, konnte dieser Effekt von Indomethacin auf die CD36 Expression vollständig blockiert werden. IL-10 inhibierte also nicht nur die basale, sondern auch die PPAR γ -Agonisten-stimulierte CD36 Expression (Abbildung 4-9).

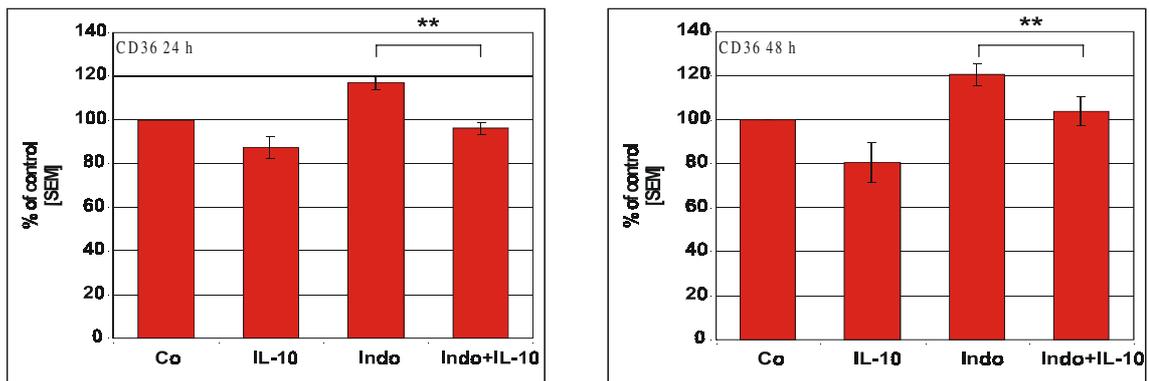


Abbildung 4-9: CD36 Proteinexpression mittels Durchflusszytometrie. THP-1 Zellen wurden mit 10 ng/ml IL-10, 10 μ M Indomethacin, beidem zugleich oder der jeweiligen Lösungsmittelkontrolle für 24 h und 48 h inkubiert; $n = 4-5 \pm$ SEM; ** < 0,01.

4.3 IL-10 reduziert die Expression und Translokation von PPAR γ

4.3.1 IL-10 und die Proteinexpression von PPAR γ mittels Durchflusszytometrie

Zur näheren Charakterisierung der IL-10 Interferenz mit den PPAR γ -vermittelten CD36 Experimenten wurde deshalb die Expression und intrazelluläre Lokalisation von PPAR γ untersucht. Der Transkriptionsfaktor PPAR γ ist ein intrazelluläres Protein. Um PPAR γ mittels Durchflusszytometrie messen zu können, müssen THP-1 Zellen mit eiskaltem Methanol für 40 sek permeabilisiert werden. Die Zellen wurden mit 10 ng/ml IL-10 oder PBS für 24 bis 72 h inkubiert, intrazelluläres PPAR γ Protein nach Protokoll (3.10.2.1) angefärbt und die PPAR γ Proteinexpression mittels Durchflusszytometrie gemessen.

IL-10 reduzierte die totale Proteinexpression von PPAR γ um bis zu 33 % (Abbildung 4-10).

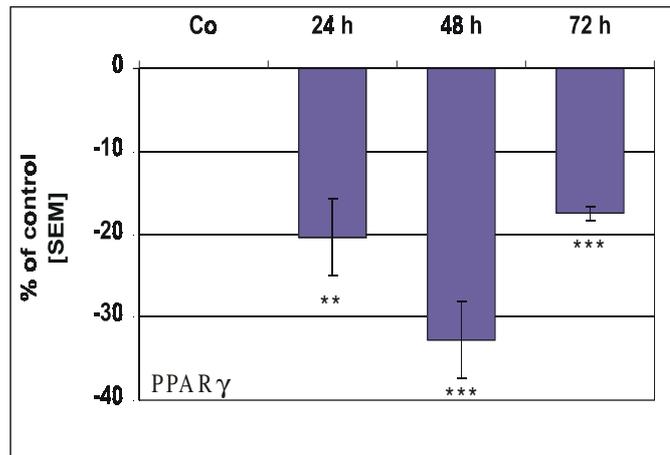


Abbildung 4-10: PPAR γ Proteinexpression mittels Durchflusszytometrie. THP-1 Zellen wurden mit 10 ng/ml IL-10 oder PBS für 24 bis 72 h behandelt; $n=6-7 \pm$ SEM; ** < 0,01; *** < 0,001.

4.3.2 IL-10 und die Proteinexpression von PPAR γ mittels Western Blot

Die Proteinexpression konnte auch mittels Western Blot gezeigt und nach der intrazellulären Lokalisation aufgeschlüsselt werden. Unstimuliert liegt PPAR γ zum größten Teil im Cytosol vor und wird nach Bindung eines Liganden aktiviert, heterodimerisiert mit RXR α und transloziert in den Kern, wo es an passende DNA-Sequenzen (PPREs) bindet. PMA-differenzierte THP-1 Zellen wurden mit 10 ng/ml IL-10 oder PBS für 24 h und 48 h inkubiert und einer Cytosol-Kern-Extraktion (3.11.2) unterzogen.

PPAR γ war sowohl nach PBS Behandlung als auch IL-10 Behandlung zum größeren Teil im Cytosol vorhanden. Im Kern war nach einer IL-10 Behandlung im Vergleich zur Kontrolle eine Verringerung von PPAR γ nach 24 h und noch deutlicher nach 48 h zu sehen. Daraus lässt sich schließen, dass auch die Translokation von PPAR γ in den Kern durch IL-10 reduziert wird (Abbildung 4-11).

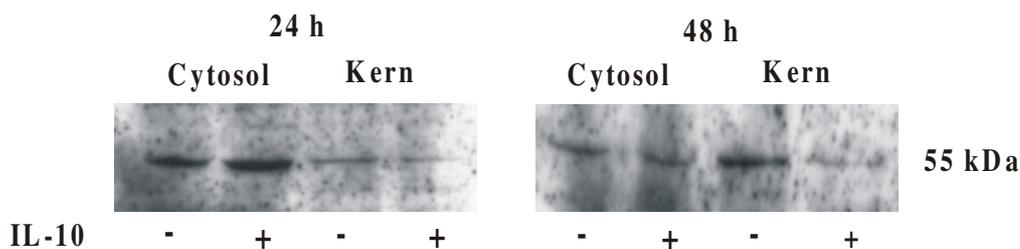


Abbildung 4-11: PPAR γ Proteinexpression mittels Western Blot. PMA-differenzierte THP-1 Zellen wurden mit 10 ng/ml IL-10 oder PBS für 24 h und 48 h inkubiert und anschließend einer Cytosol-Kern-Extraktion unterzogen. 50 μ g Protein wurden aufgetragen.

4.4 IL-10 induziert die Expression von ABCA1

Neben CD36 als quantitativ wichtigsten Scavenger Rezeptor sollte auch ABCA1 als wichtigster zellulärer Cholesterinexporter bezüglich Effekte von IL-10 untersucht werden. Es ist bekannt, dass der Cholesterinexporter ABCA1 durch verschiedene Signalwege induzierbar ist (1.6.2). So wurde für die Transkriptionsfaktoren wie PPAR γ (s. 4.4.3.1), PPAR α (s. 4.4.3.2), LXR α (s. 4.4.3.3) oder RXR α (s. 4.4.3.4), aber auch cAMP (s. 4.4.3.6) eine Stimulation der Expression von ABCA1 beobachtet. Für die verschiedenen Transkriptionsfaktoren wurden dabei unterschiedliche aktivierende Liganden und für cAMP ein Proteinkinase A (PKA) Inhibitor verwendet.

4.4.1 Transkription von ABCA1

4.4.1.1 Effekte von IL-10 auf ABCA1 in THP-1 Zellen und PMA-differenzierten THP-1 Zellen

THP-1 Zellen und PMA-differenzierte THP-1 Zellen wurden mit 10 ng/ml IL-10 oder PBS für 3 bis 72 h inkubiert und ABCA1 mittels Real-time RT-PCR amplifiziert und quantifiziert.

Sowohl bei THP-1 Zellen als auch PMA-differenzierten THP-1 Zellen konnte eine IL-10 Behandlung die ABCA1 mRNA bereits nach 3 h und anhaltend bis mindestens 72 h signifikant induzieren (Abbildung 4-12).

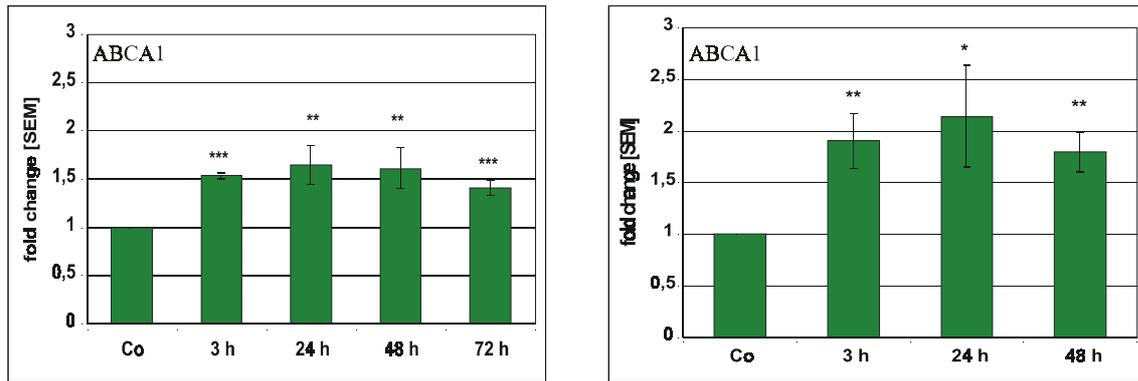


Abbildung 4-12: ABCA1 Transkription mittels Real-time RT-PCR. THP-1 Zellen (links) und PMA-differenzierte THP-1 Zellen (rechts) wurden mit 10 ng/ml IL-10 oder PBS für 3 bis 72 h inkubiert; $n=5-9 \pm SEM$; * $< 0,05$; ** $< 0,01$; *** $< 0,001$.

4.4.1.2 Effekte von IL-10 auf ABCA1 in PBMCs

Die Effekte von IL-10 auf die Transkription von ABCA1 wurde auch in primären Zellen untersucht. Dazu wurden periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) von gesunden Spendern isoliert (3.5.2) und unmittelbar mit 10 ng/ml IL-10 oder PBS für 3 h inkubiert. Danach wurde Gesamt-RNA (3.7.1) extrahiert und ABCA1 mittels Real-time RT-PCR amplifiziert und quantifiziert (Abbildung 4-13).

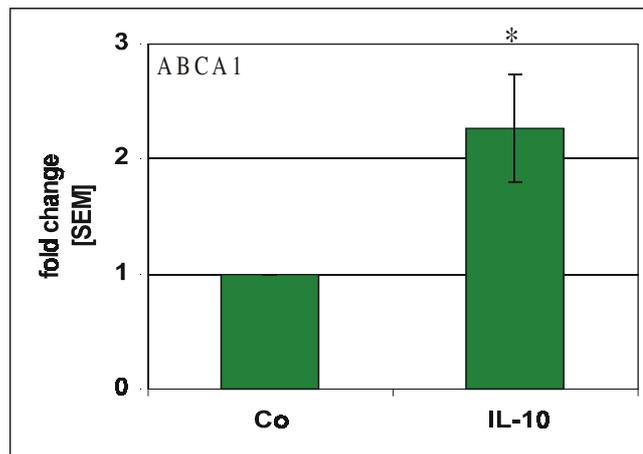


Abbildung 4-13: ABCA1 Transkription mittels Real-time RT-PCR. PBMCs von gesunden Spendern wurden für 3 h mit 10 ng/ml IL-10 oder PBS behandelt; $n=7 \pm SEM$; * $< 0,05$.

Wie bei THP-1 Zellen und PMA-differenzierten THP-1 Zellen gezeigt, induzierte IL-10 auch bei den PBMCs von verschiedenen Spendern uniform und rasch die ABCA1 mRNA auf mehr als das doppelte (Abbildung 4-13).

4.4.2 Proteinexpression von ABCA1 mittels Western Blot

Die Ergebnisse auf RNA-Ebene sollten auf Proteinebene überprüft werden. PMA-differenzierte THP-1 Zellen wurden mit 10 ng/ml IL-10, PBS oder 10 μ M 22-OHC (22-Hydroxycholesterol) als Positivkontrolle (endogener Ligand für den Transkriptionsfaktor LXR α) für 24 h inkubiert und die ABCA1 Proteinexpression unter Verwendung von Gesamtextrakten (3.11.1) mittels Western Blot ermittelt. ABCA1 läuft im Western Blot bei einer Proteingröße von 220 kDa und zeigt 2 bis 3 Teilbanden. Man nimmt an, dass diese Proteinmodifikationen durch unterschiedliche Glykosylierungen entstehen.

Die Inkubation mit 10 μ M 22-OHC zeigte einen deutlichen Anstieg in der ABCA1 Expression. Auch IL-10 stimulierte deutlich die ABCA1 Expression nach 24 h (Abbildung 4-14).

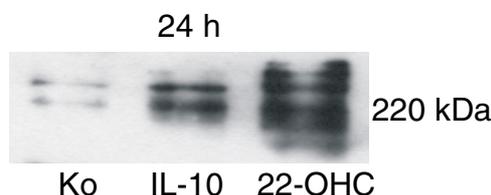


Abbildung 4-14: ABCA1 Proteinexpression mittels Western Blot. PMA-differenzierte THP-1 Zellen wurden für 24 h entweder mit 10 ng/ml IL-10, 10 μ M 22-OHC oder Lösungsmittelkontrolle inkubiert und anschließend einer Gesamtproteinextraktion unterzogen. 50 μ g Protein wurden aufgetragen.

4.4.3 Koinkubationen von IL-10 mit PPAR γ -Agonisten und ABCA1 Expression

4.4.3.1 15d-PGJ₂ als PPAR γ -Agonist

Um zu untersuchen, ob auch die IL-10 Stimulation von ABCA1 durch den Transkriptionsfaktor PPAR γ modifiziert wird, wurden PMA-differenzierte THP-1 Zellen mit 2 μ M 15d-PGJ₂, 2 μ M 15d-PGJ₂ und 10 ng/ml IL-10 gleichzeitig oder mit

dem entsprechenden Lösungsmittel für 3 bis 48 h behandelt. Anschließend wurde ABCA1 mittels Real-time RT-PCR amplifiziert und quantifiziert.

15d-PGJ₂ allein bewirkte eine deutliche Induktion der ABCA1 Transkription nach 3 h und anhaltend bis 48 h. Inkubierte man die Zellen zusätzlich mit IL-10, konnte die 15d-PGJ₂-induzierte ABCA1 Transkription sogar signifikant reduziert werden. Das Ergebnis zeigt, dass PPAR γ offensichtlich nicht der verantwortliche Transkriptionsfaktor für die ABCA1 Induktion durch IL-10 sein dürfte (Abbildung 4-15).

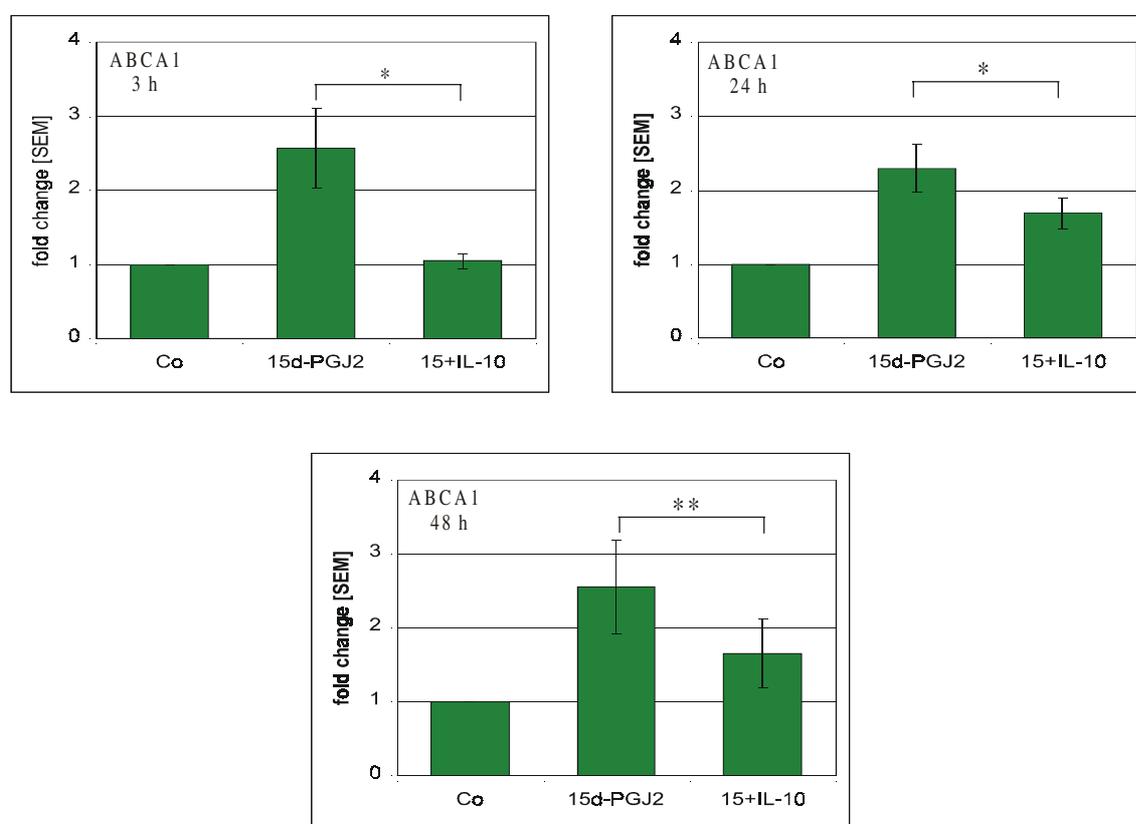


Abbildung 4-15: ABCA1 Transkription mittels Real-time RT-PCR. PMA-differenzierte THP-1 Zellen wurden mit 2 μ M 15d-PGJ₂, 2 μ M 15d-PGJ₂ und 10 ng/ml IL-10 zusammen oder mit der jeweiligen Lösungsmittelkontrolle für 3 bis 48 h inkubiert; n = 8-10 \pm SEM; * < 0,05; ** < 0,01.

4.4.3.2 Koinkubationen mit dem PPAR α Liganden Fenofibrat

Der Transkriptionsfaktor PPAR α kann auch die ABCA1 Expression stimulieren. Um dies im verwendeten Zellmodell zu bestätigen, wurden PMA-differenzierte THP-1 Zellen mit 100 μ M Fenofibrat, 100 μ M Fenofibrat und 10 ng/ml IL-10 zusammen oder

mit dem entsprechenden Lösungsmittel für 3 bis 48 h inkubiert und ABCA1 mRNA mit Real-time RT-PCR gemessen.

Der PPAR α Ligand Fenofibrat stimulierte deutlich die ABCA1 Transkription nach 3 bis 48 h. Nach einer gleichzeitigen IL-10 Inkubation kam es zu einer additiven Erhöhung der ABCA1 Transkription, die bereits nach 3 h und anhaltend bis 48 h zu beobachten war (Abbildung 4-16).

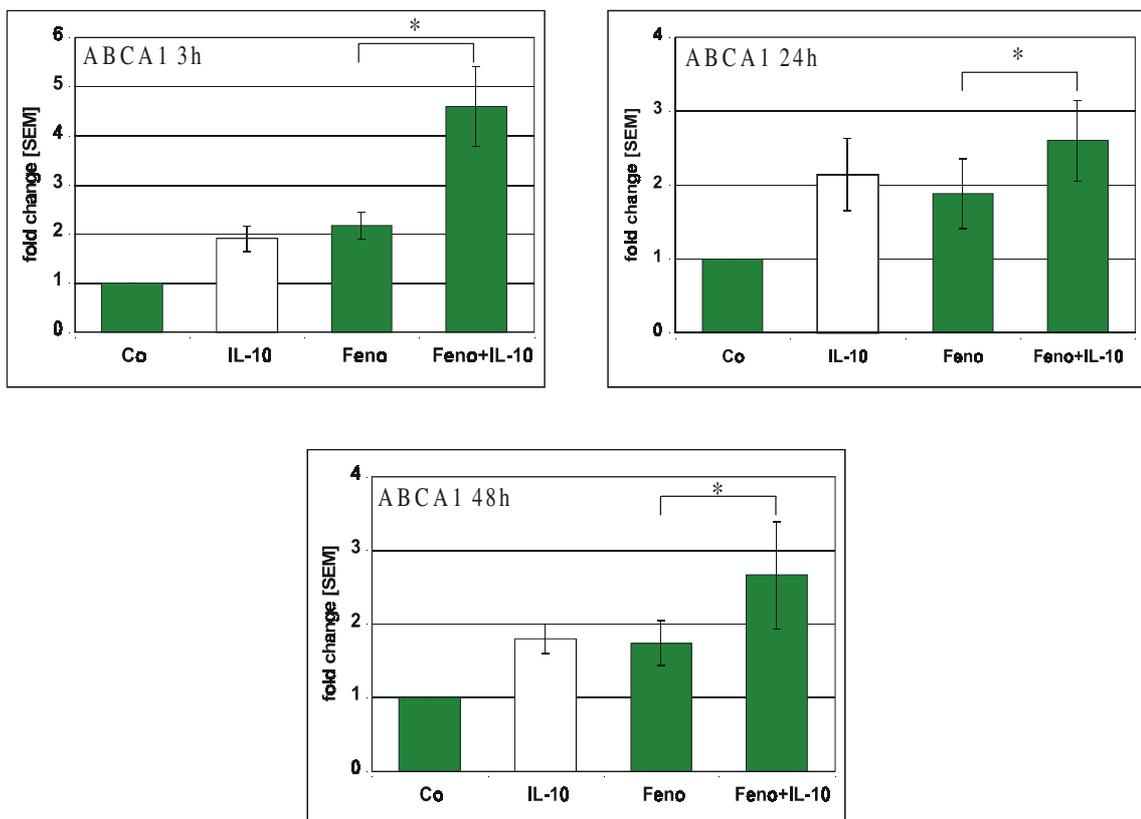


Abbildung 4-16: ABCA1 Transkription mittels Real-time RT-PCR. PMA-differenzierte THP-1 Zellen wurden mit 100 μ M Fenofibrat, 100 μ M Fenofibrat und 10 ng/ml IL-10 zusammen oder mit der jeweiligen Lösungsmittelkontrolle für 3 bis 48 h inkubiert; $n = 4-8 \pm$ SEM; * < 0,05.

4.4.3.3 ABCA1 Induktion über den LXR α -Signaltransduktionsweg

PMA-differenzierte THP-1 Zellen wurden für 3 bis 48 h mit dem LXR α Liganden 22-OHC (10 μ M), 22-OHC und 10 ng/ml IL-10 zusammen oder dem jeweiligen Lösungsmittel inkubiert und ABCA1 mittels Real-time RT-PCR amplifiziert und quantifiziert.

Der LXR α Liganden 22-OHC induzierte wie erwartet die ABCA1 Transkription nach 3 h und anhaltend bis 48 h. Eine zusätzliche IL-10 Behandlung führte zu einer weiter gesteigerten ABCA1 Transkription (Abbildung 4-17).

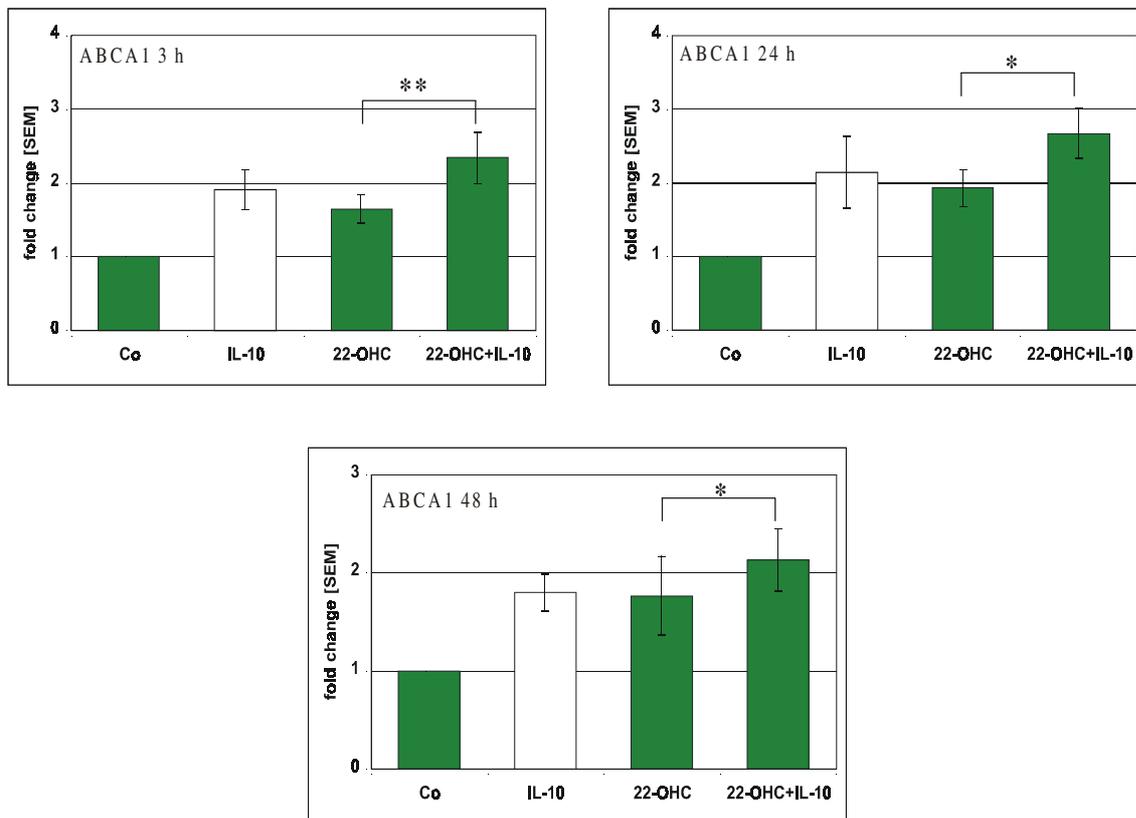


Abbildung 4-17: ABCA1 Transkription mittels Real-time RT-PCR. PMA-differenzierte THP-1 Zellen wurden entweder mit 10 μ M 22-OHC, 10 μ M 22-OHC und 10 ng/ml IL-10 zusammen oder mit der jeweiligen Lösungsmittelkontrolle für 3 bis 48 h behandelt; $n = 3-6 \pm$ SEM; * < 0,05; ** < 0,01.

4.4.3.4 ABCA1 Expression bei Koinkubationen mit dem RXR α Liganden 9-cis retinoic acid (9-cis RA)

Der Transkriptionsfaktor RXR bildet mit PPAR α , PPAR γ oder LXR α jeweils Heterodimere. Diese translozieren anschließend in den Kern. Um den Einfluss des RXR α Liganden 9-cis RA in diesem Zellmodell zu untersuchen, wurden PMA-differenzierte THP-1 Zellen mit 2 μ M 9-cis RA, 2 μ M 9-cis RA und 10 ng/ml IL-10 zusammen oder mit dem entsprechenden Lösungsmittel für 3 bis 48 h inkubiert und eine Real-time RT-PCR für ABCA1 durchgeführt.

9-cis RA induzierte die ABCA1 Transkription bereits nach 3 h und anhaltend bis 48 h. Wurden die Zellen zusätzlich mit IL-10 behandelt, war ein additiver Anstieg in der ABCA1 Transkription zu beobachten (Abbildung 4-18).

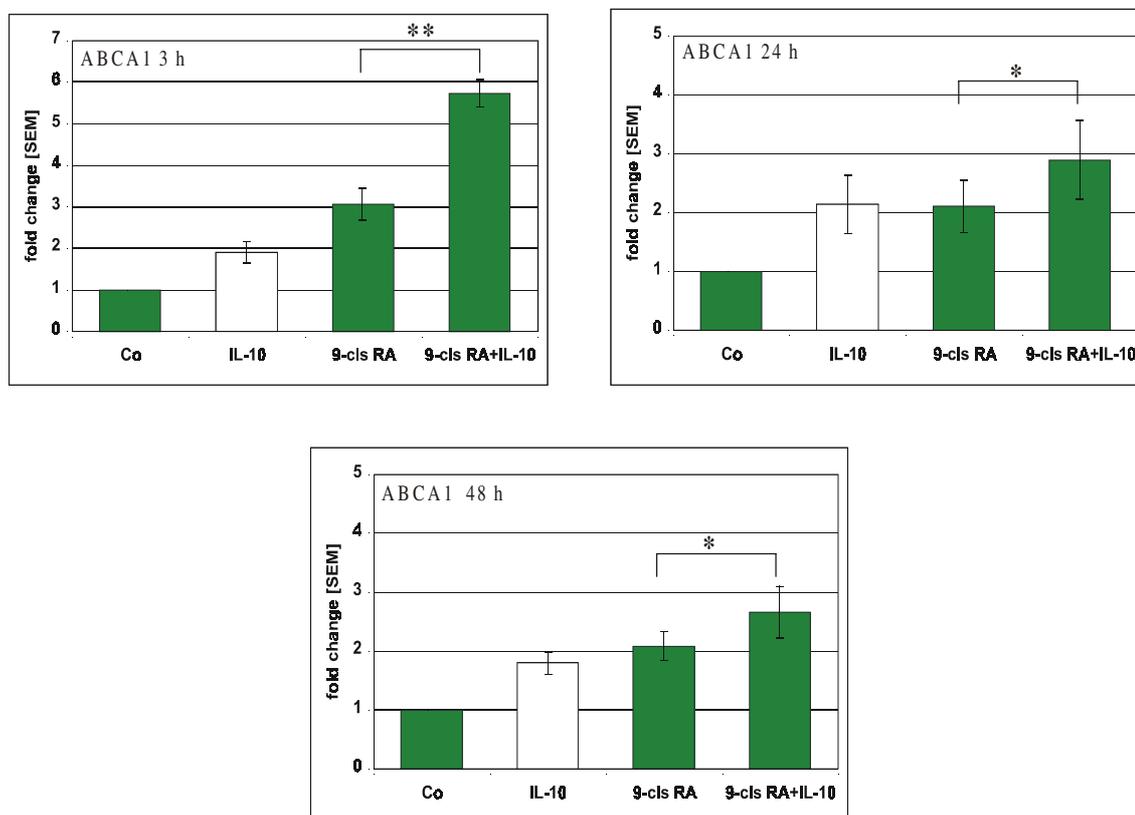


Abbildung 4-18: ABCA1 Transkription mittels Real-time RT-PCR. PMA-differenzierte THP-1 Zellen wurden entweder mit $2 \mu\text{M}$ 9-cis RA, $2 \mu\text{M}$ 9-cis RA und 10 ng/ml IL-10 zusammen oder mit der jeweiligen Lösungsmittelkontrolle für 3 bis 48 h inkubiert; $n = 4-5 \pm \text{SEM}$; * $< 0,05$; ** $< 0,01$.

Die additiven Effekte von IL-10 unter hohen Konzentrationen der Liganden von PPAR γ , LXR α und RXR unterstützen einen zusätzlichen Signalweg der IL-10 Induktion von ABCA1.

4.4.3.5 IL-10 Effekt und STAT3-STAT5-Hemmung

Um die Vermittlung der IL-10 Effekte über den proximalen IL-10-Signaltransduktionsweg zu belegen, wurde Piceatannol, ein spezifischer Inhibitor der Tyrosin-Phosphorylierung von STAT3 und STAT5 (Su and David 2000), benutzt.

PMA-differenzierte THP-1 Zellen wurden mit 10 μ M, 50 μ M und 100 μ M Piceatannol oder Lösungsmittelkontrolle für 30 min vorinkubiert und anschließend mit IL-10 oder PBS für 3 h versetzt.

IL-10 allein induzierte die ABCA1 Transkription um das 1,9-fache nach 3 h. Piceatannol (Pic) allein (10 μ M, 50 μ M und 100 μ M) hatte keinen Effekt auf die ABCA1 Expression. 50 μ M und 100 μ M Piceatannol verhinderten offensichtlich kompetitiv die Stimulation der ABCA1 Transkription durch IL-10 (Abbildung 4-19).

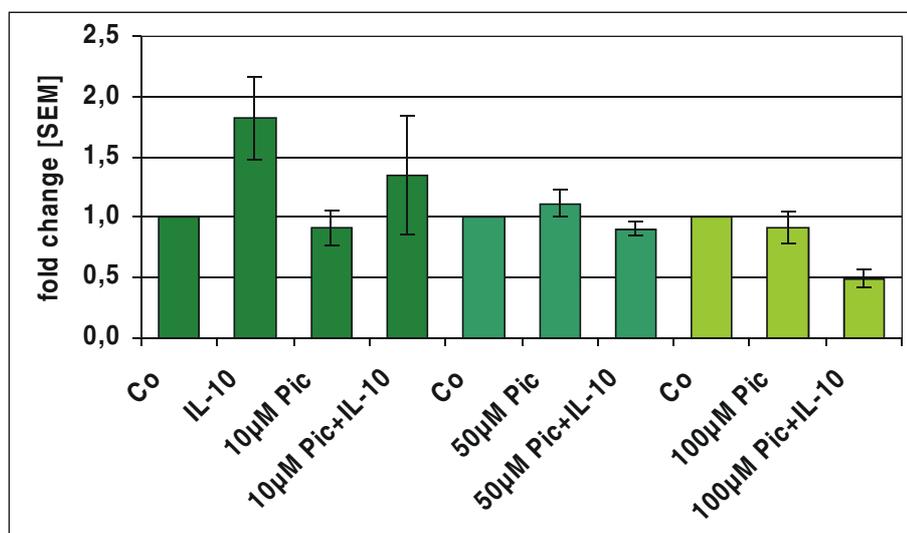


Abbildung 4-19: ABCA1 Transkription mittels Real-time RT-PCR. PMA-differenzierte THP-1 Zellen wurden mit dem STAT3-STAT5-Inhibitor Piceatannol (10 μ M, 50 μ M und 100 μ M) für 30 min vorinkubiert und anschließend für 3 h mit 10 ng/ml IL-10 oder PBS behandelt; $n = 2-4 \pm$ SEM.

4.4.3.6 IL-10 Effekt und Proteinkinase A (PKA)-Hemmung

Es wurde gezeigt, dass cAMP IL-10 Spiegel erhöhen und dass cAMP die ABCA1 Transkription induzieren kann. Es sollte deshalb untersucht werden, ob ein IL-10-bedingter cAMP Anstieg zu einer Induktion von ABCA1 führen könnte. Dazu wurden THP-1 Zellen und PMA-differenzierte THP-1 Zellen mit dem spezifischen PKA Inhibitor Ro 31-8220, dem cAMP nachgeschalteten Glied der Signalkette, in einer Konzentration von 900 nM für 30 Minuten vorinkubiert und anschließend 10 ng/ml IL-10 oder PBS für 3 h zu den Zellen gegeben.

Wie in Abbildung 4-20 dargestellt, induzierte IL-10 die ABCA1 Transkription um 2,88-fach bei THP-1 Zellen und um 2,38-fach bei PMA-differenzierten THP-1 Zellen. Eine alleinige Inkubation mit dem PKA Inhibitor bewirkte sowohl bei THP-1 Zellen (0,5-fach) als auch bei PMA-differenzierten THP-1 Zellen (0,6-fach) eine Reduktion der basalen ABCA1 Expression. Der PKA Inhibitor verhinderte die IL-10-induzierte ABCA1 Transkription vollständig. Die Hemmung betrug bei THP-1 Zellen 0,49-fach und bei PMA-differenzierten THP-1 Zellen 0,64-fach. Diese Daten lassen somit auf eine Beteiligung des cAMP/PKA Weges bei den IL-10 Effekten auf ABCA1 schließen.

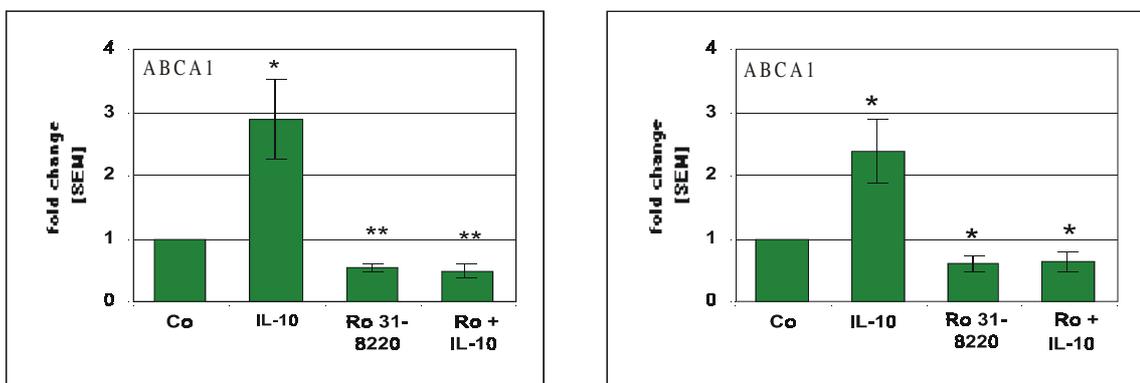


Abbildung 4-20: ABCA1 Transkription mittels Real-time RT-PCR. THP-1 Zellen (links) und PMA-differenzierte THP-1 Zellen (rechts) wurden mit dem PKA Inhibitor Ro 31-8220 für 30 min vorinkubiert und anschließend für 3 h mit 10 ng/ml IL-10 oder PBS behandelt; $n = 4-7 \pm \text{SEM}$; * $< 0,05$; ** $< 0,01$.

4.4.4 IL-10 induziert zelluläres cAMP

Nach den Ergebnissen aus 4.4.3.6 wäre zu vermuten, dass IL-10 zelluläres cAMP in diesen Zellen induzieren kann. Dazu wurden THP-1 Zellen für 30 min und 3 h mit 10 ng/ml IL-10 oder PBS behandelt und zelluläres cAMP mittels kompetitivem ELISA (3.14) gemessen.

IL-10 induzierte cAMP signifikant gegenüber Kontrollzellen nach 30 min und nach 3 h (Abbildung 4-21).

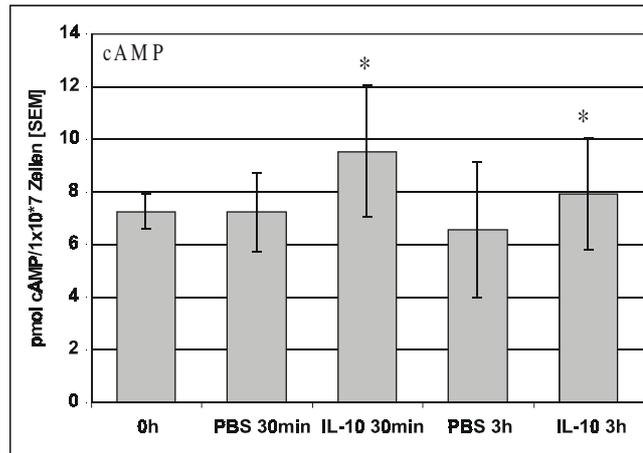


Abbildung 4-21: Zelluläres cAMP. THP-1 Zellen wurden mit 10 ng/ml IL-10 oder PBS für 30 min und 3 h behandelt, $n = 4 \pm \text{SEM}$; * < 0,05.

4.5 IL-10 induziert die Expression von LXR α

4.5.1 IL-10 und Transkription von LXR α

Anhand der Ergebnisse mit 22-OHC (4.4.3.3) kann ein Mitwirken des Transkriptionsfaktors LXR α vermutet werden. Da die basale LXR α Expression in THP-1 Zellen leider sehr gering war, wurden PMA-differenzierte THP-1 Zellen verwendet und mit 10 ng/ml IL-10 oder PBS für 3 bis 48 h behandelt. Anschließend wurde LXR α mittels Real-time RT-PCR amplifiziert und quantifiziert.

IL-10 konnte die LXR α Transkription bereits nach 3 h und anhaltend bis 48 h gegenüber zeitgleichen Kontrollzellen signifikant induzieren (Abbildung 4-22).

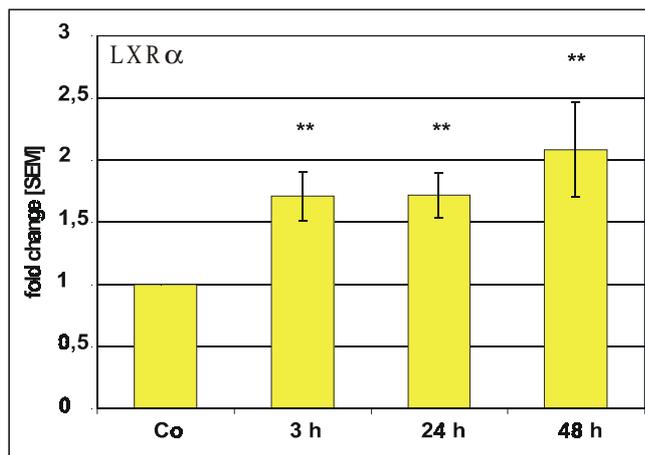


Abbildung 4-22: *LXRα* Transkription mittels Real-time RT-PCR. PMA-differenzierte THP-1 Zellen wurden für 3 bis 48 h mit 10 ng/ml IL-10 oder PBS behandelt; $n = 8-10 \pm$ SEM; ** < 0,01.

4.5.2 IL-10 und Proteinexpression von *LXRα*

Mittels Western Blot konnte der IL-10-bedingte Anstieg von *LXRα* auch auf Proteinebene gezeigt werden. Dazu wurden PMA-differenzierte THP-1 Zellen mit 10 ng/ml IL-10 oder PBS für 24 h inkubiert und Gesamtextrakte (3.11.1) hergestellt.

Es konnte nach 24 h ein Anstieg in der *LXRα* Proteinexpression gezeigt werden (Abbildung 4-23).



Abbildung 4-23: *LXRα* Proteinexpression mittels Western Blot. PMA-differenzierte THP-1 Zellen wurden entweder mit 10 ng/ml IL-10 oder PBS für 24 h inkubiert und anschließend eine Gesamtproteinextraktion durchgeführt. Es wurden 60 μ g Protein aufgetragen.

4.5.3 Koinkubationen mit IL-10 und LXR α Transkription

4.5.3.1 Koinkubationen mit dem LXR α Liganden 22-Hydroxycholesterol (22-OHC)

PMA-differenzierte THP-1 Zellen wurden mit 10 μ M 22-OHC, 10 μ M 22-OHC und 10 ng/ml IL-10 zusammen oder mit dem jeweiligen Lösungsmittel für 3 bis 48 h behandelt und LXR α mittels Real-time RT-PCR amplifiziert und quantifiziert (Abbildung 4-24).

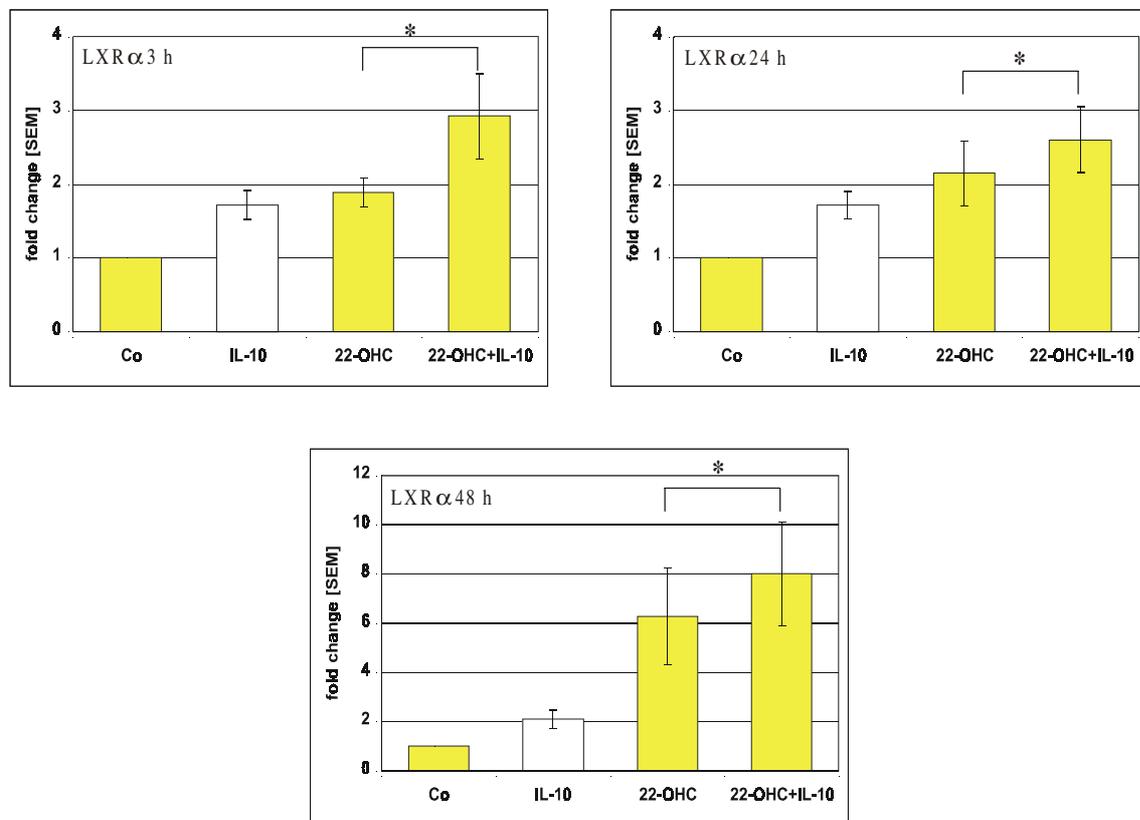


Abbildung 4-24: LXR α Transkription mittels Real-time RT-PCR. PMA-differenzierte THP-1 Zellen wurden mit 10 μ M 22-OHC, 10 μ M 22-OHC und 10 ng/ml IL-10 zusammen oder mit der jeweiligen Lösungsmittelkontrolle für 3 bis 48 h behandelt; $n = 5 \pm$ SEM; * < 0,05.

Der LXR α Ligand 22-OHC induzierte die ABCA1 Transkription bereits nach 3 h und anhaltend bis 48 h. Wurden die Zellen zusätzlich mit IL-10 inkubiert, kam es bei der LXR α Transkription zu einem additiven Anstieg (Abbildung 4-24).

4.5.3.2 Koinkubation mit dem RXR α Ligand 9-cis retinoic acid (9-cis RA)

Um die Rolle des Heterodimerpartners RXR α zu untersuchen, wurden PMA-differenzierte THP-1 Zellen mit 2 μ M 9-cis RA, 2 μ M 9-cis RA und 10 ng/ml IL-10 zusammen oder mit dem jeweiligen Lösungsmittel für 3 bis 48 h behandelt und eine Real-time RT-PCR für LXR α gemacht (Abbildung 4-25).

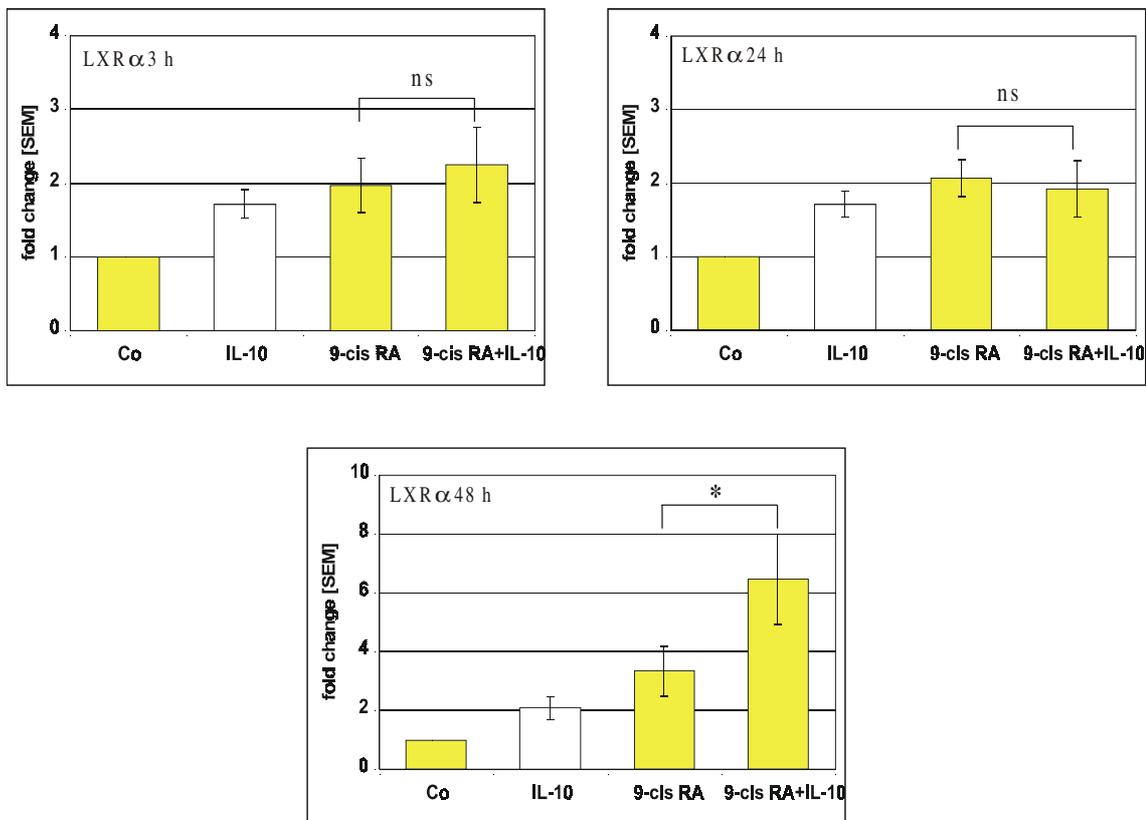


Abbildung 4-25: LXR α Transkription mittels Real-time RT-PCR. PMA-differenzierte THP-1 Zellen wurden mit 2 μ M 9-cis RA, 2 μ M 9-cis RA und 10 ng/ml IL-10 zusammen oder mit der jeweiligen Lösungsmittelkontrolle für 3 bis 48 h behandelt; n= 4-5 \pm SEM; * < 0,05, ns= nicht signifikant.

Der RXR α Ligand induzierte die LXR α Transkription signifikant nach 3 h und anhaltend bis 48 h. Bei einer Koinkubation mit IL-10 und 9-cis RA gab es nach 3 h und 24 h keine Veränderung in der ABCA1 Transkription, erst nach 48 h war eine additive Induktion durch IL-10 und RXR α Ligand zu beobachten (Abbildung 4-25).

4.5.3.3 PPAR α Ligand Fenofibrat

Auch der Transkriptionsfaktor PPAR α bildet mit RXR α einen Heterodimer. PMA-differenzierte THP-1 Zellen wurden für 3 bis 48 h mit 100 μ M Fenofibrat, 100 μ M Fenofibrat und 10 ng/ml IL-10 zusammen oder mit dem jeweiligen Lösungsmittel behandelt und LXR α mittels Real-time RT-PCR amplifiziert und quantifiziert (Abbildung 4-26).

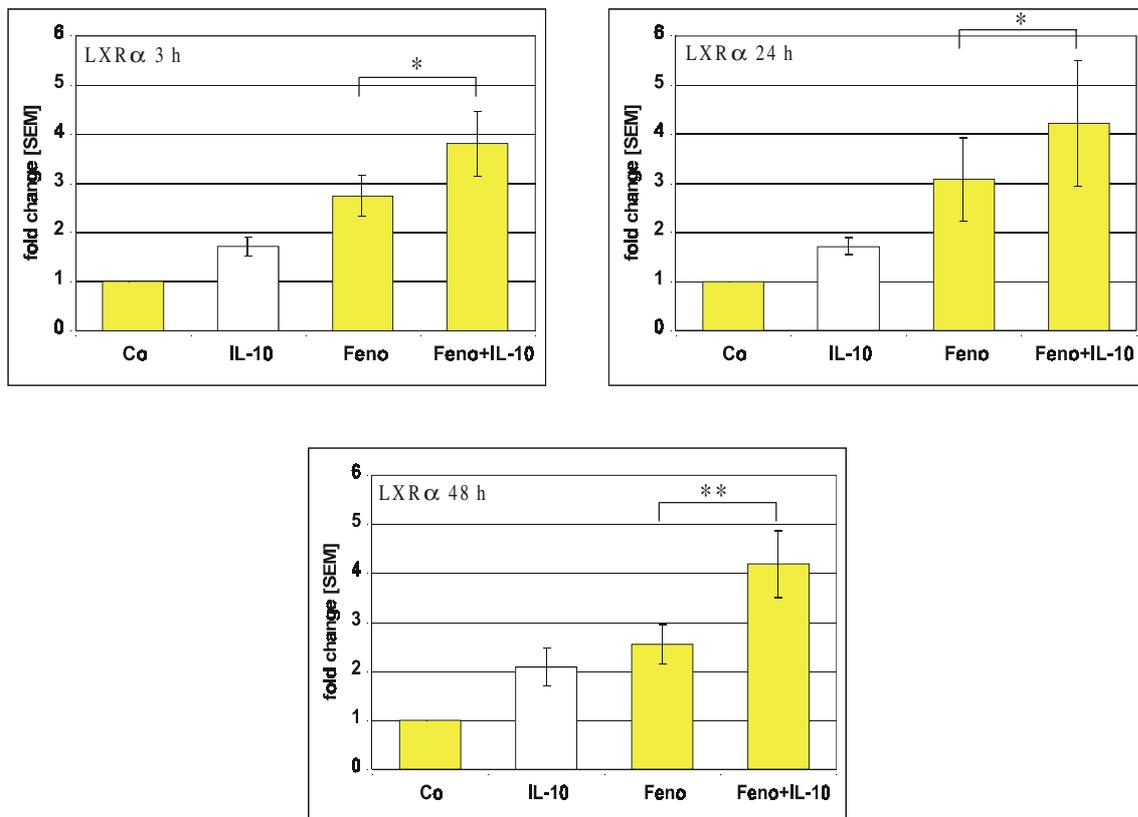


Abbildung 4-26: LXR α Transkription mittels Real-time RT-PCR. PMA-differenzierte THP-1 Zellen wurden mit 100 μ M Fenofibrat, 100 μ M Fenofibrat und 10 ng/ml IL-10 zusammen oder mit der jeweiligen Lösungsmittelkontrolle für 3 bis 48 h behandelt; $n = 5-8 \pm$ SEM; * < 0,05; ** < 0,01.

Fenofibrat stimulierte die LXR α Transkription nach 3 h und anhaltend bis 48 h. Bei einer Koinkubation mit IL-10 und Fenofibrat war ein weiterer signifikanter Effekt zu beobachten (Abbildung 4-26).

4.6 IL-10 hat keinen Effekt auf SR-BI

Der Scavenger Rezeptor B1 (SR-BI) wird von unstimulierten THP-1 Zellen nur sehr gering exprimiert. Deshalb wurden PMA-differenzierte THP-1 Zellen für diese Versuche verwendet. Die Zellen wurden mit 10 ng/ml IL-10 oder PBS für 3 bis 48 h inkubiert und SR-BI mittels Real-time RT-PCR amplifiziert und quantifiziert.

IL-10 hatte einen geringen, nicht signifikanten biphasischen Effekt, wobei die SR-BI Transkription nach 3 h gering abnahm (0,90-fach), nach 24 h minimal zunahm (1,06-fach) und nach 48 h wieder gering abnahm (0,83-fach) (Abbildung 4-27).

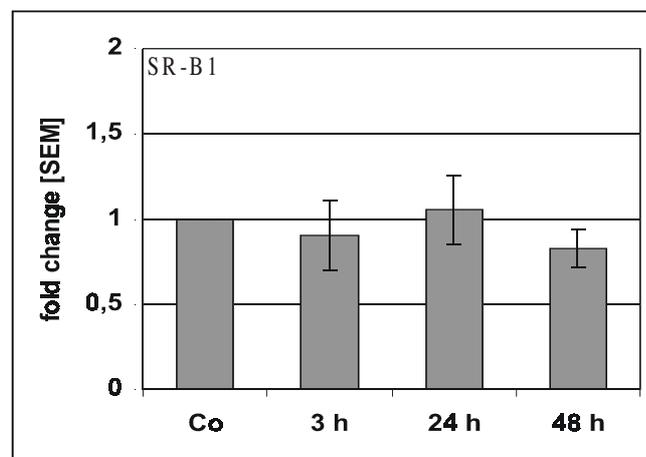


Abbildung 4-27: SR-BI Transkription mittels Real-time RT-PCR. PMA-differenzierte THP-1 Zellen wurden für 3 bis 48 h mit 10 ng/ml IL-10 oder PBS behandelt; $n = 6-9 \pm \text{SEM}$.

4.7 IL-10 induziert die Expression des LDL-Rezeptors in PMA-differenzierten THP-1 Zellen

THP-1 Zellen und PMA-differenzierte THP-1 Zellen wurden mit 10 ng/ml IL-10 oder PBS für 3 bis 72 h inkubiert und eine Real-time RT-PCR für die LDL-Rezeptor mRNA durchgeführt.

Die THP-1 Zellen zeigten nach 3 h und 24 h einen geringen Anstieg der Transkription des LDL-Rezeptors, welcher aber nach 48 h wieder den Basalwert erreichte. Bei PMA-differenzierten THP-1 Zellen nahm die LDL-Rezeptor Transkription bereits nach 3 h um das 1,77-fache zu und blieb anhaltend bis 48 h erhöht (Abbildung 4-28).

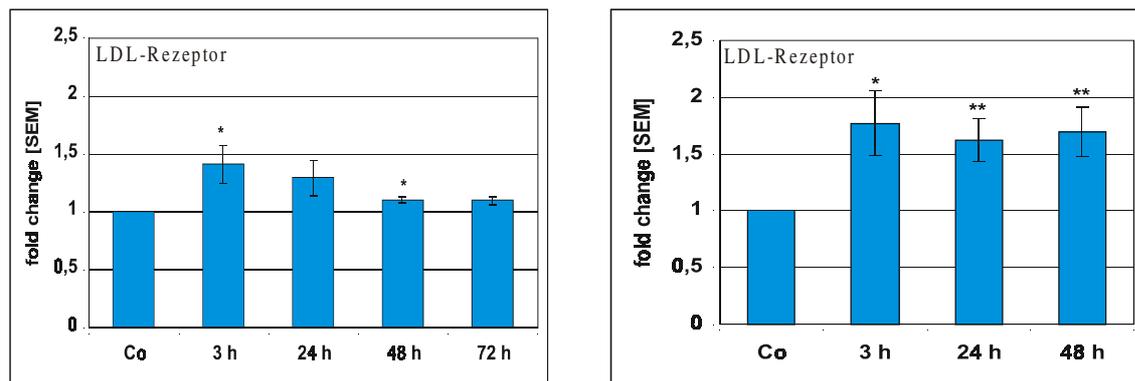


Abbildung 4-28: Transkription des LDL-Rezeptors mittels Real-time RT-PCR. THP-1 Zellen (links) und PMA-differenzierte THP-1 Zellen (rechts) wurden für 3 bis 72 h mit 10 ng/ml IL-10 oder PBS behandelt; $n = 3-10 \pm SEM$; * $< 0,05$; ** $< 0,01$.

4.8 IL-10 Effekte auf die Aufnahme und Efflux von Cholesterin mit oxidiertem LDL (oxLDL) und delipidiertem HDL (dHDL)

Mittels Aufnahme- und Efflux-Versuchen wurde das Cholesterin-Handling der Zellen unter Einfluss von IL-10 untersucht. THP-1 Zellen und PMA-differenzierte THP-1 Zellen wurden für 24 h mit 10 ng/ml IL-10 oder PBS vorinkubiert. Bis zum Versuchsende versetzte man die Zellen alle 24 h mit PBS oder IL-10. Nach den ersten 24 h wurden entweder 100 $\mu\text{g/ml}$ oxLDL (3.12.3) oder PBS-Puffer (3.3.9.2) für weitere 48 h zugegeben. Danach wurde durch zweimaliges Waschen mit PBS das oxLDL, das von den Zellen nicht aufgenommen wurde, entfernt und 20 $\mu\text{g/ml}$ dHDL (3.12.4), welches als Cholesterinakzeptor diente, für weitere 24 h zugegeben. Die Zellen wurden gesammelt, zweimal mit PBS gewaschen und das zelluläre Gesamtcholesterin mittels Methanol-Chloroform-Extraktion (3.12.5) isoliert, eine Proteinbestimmung als Bezugsgröße (3.11.3) durchgeführt und Gesamtcholesterin photometrisch bestimmt.

Eine alleinige Mediuminkubation mit IL-10 ohne zusätzliche Lipoproteine hatte nahezu keine Auswirkung auf den zellulären Cholesteringehalt weder bei THP-1 Zellen noch bei PMA-differenzierten THP-1 Zellen. Nach Zusatz von oxLDL war die Aufnahme von Cholesterin sowohl bei THP-1 Zellen als auch PMA-differenzierten THP-1 Zellen signifikant erhöht. Wurden die Zellen mit IL-10 und oxLDL versetzt, konnte die oxLDL-bedingte Cholesterinaufnahme signifikant reduziert werden. dHDL allein erniedrigte wie erwartet den zellulären Cholesteringehalt. Eine zusätzliche Inkubation

mit IL-10 führte zu einem verstärkten zellulären Cholesterinefflux sowohl bei THP-1 Zellen als auch bei PMA-differenzierten THP-1 Zellen. Die Ergebnisse für THP-1 Zellen sind in Abbildung 4-29 und für PMA-differenzierte THP-1 Zellen in Abbildung 4-30 zusammengefasst.

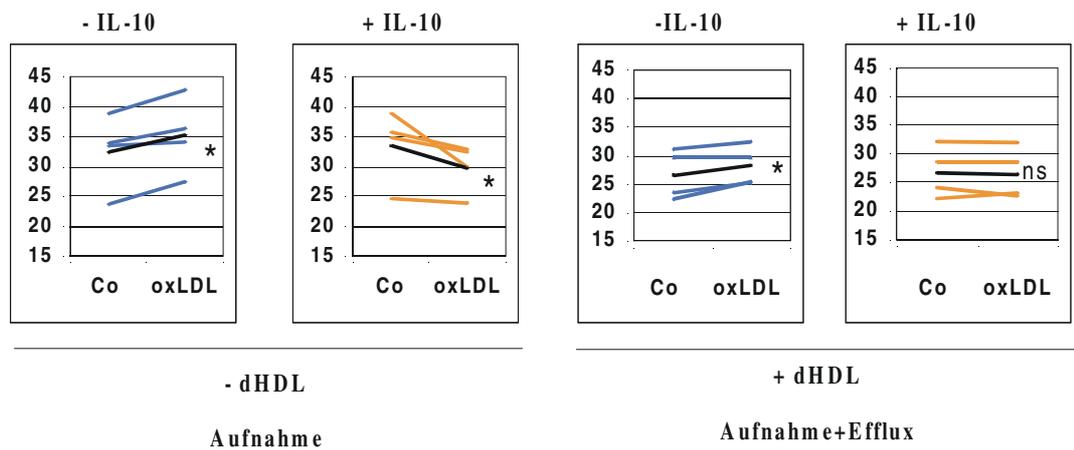


Abbildung 4-29: Zellulärer Cholesteringehalt nach Aufnahme- und Efflux-Versuchen in THP-1 Zellen. Zellen wurden mit 10 ng/ml IL-10 oder PBS für 24 h vorinkubiert, für 48 h mit 100 µg/ml oxLDL oder PBS-Puffer beladen und für 24 h mit 20 µg/ml dHDL oder Resolubilisierungslösung entladen. Die schwarze Linie kennzeichnet den Mittelwert; n= 4; * < 0,05; ns= nicht signifikant.

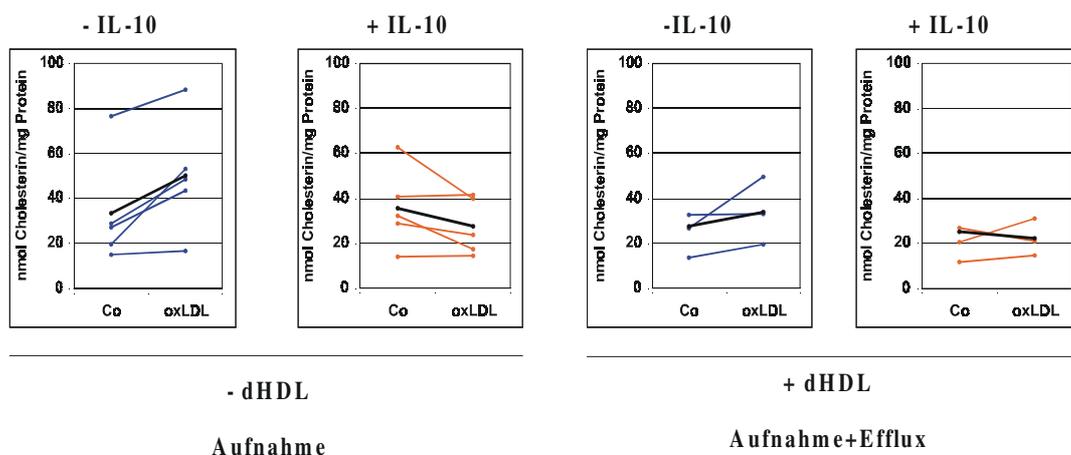


Abbildung 4-30: Zellulärer Cholesteringehalt nach Aufnahme- und Efflux-Versuchen in PMA-differenzierten THP-1 Zellen. Zellen wurden mit 10 ng/ml IL-10 oder PBS für 24 h vorinkubiert, für 48 h mit 100 μ g/ml oxLDL oder PBS-Puffer beladen und für 24 h mit 20 μ g/ml dHDL oder Resolubilisierungslösung entladen. Die schwarze Linie kennzeichnet den Mittelwert; n= 3-7.

4.8.1 Zelluläre Granularitätsbestimmung nach Lipoprotein-Aufnahme mittels Durchflusszytometrie

Nehmen die Zellen massiv oxLDL auf, so entstehen cytoplasmatische Fetttropfchen, was sich vor allem in einer Zunahme der Granularität und der Zellgröße darstellt. Diese Veränderungen der Granularität und Zellgröße konnten im Durchflusszytometer mittels "dot blot" (SSC= sideward scatter; Granularität der Zelle und FCS= forward scatter; Zellgröße) gemessen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde nur die Veränderung der Granularität untersucht, da die Effekte auf Veränderung der Zellgröße sehr gering waren. Für vorläufige Versuche wurden THP-1 Zellen mit 100 μ g/ml oxLDL (3.12.3) oder PBS-Puffer (3.3.9.2) für 48 h behandelt. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, in 200-400 μ l PBS aufgenommen und im Durchflusszytometer gemessen.

Wie man in Abbildung 4-31 sehen kann, nahm die Granularität nach oxLDL Gabe um 35 % zu.

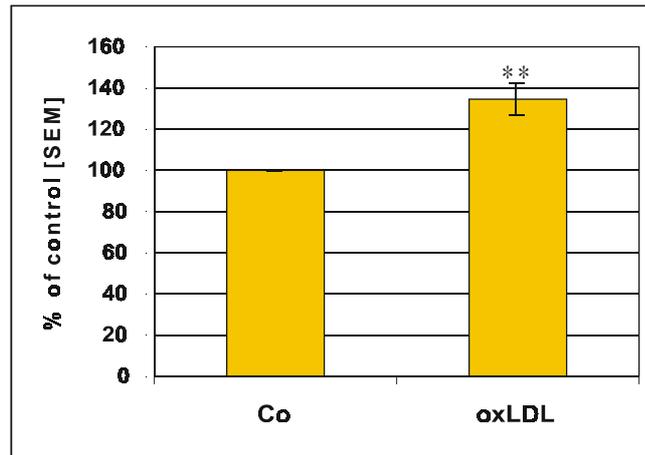


Abbildung 4-31: Bestimmung der Granularität mittels Durchflusszytometrie. THP-1 Zellen wurden mit 100 µg/ml oxLDL oder PBS-Puffer für 48 h behandelt; $n = 5 \pm \text{SEM}$; ** $< 0,01$.

In weiteren Versuchen soll getestet werden, ob diese cytoplasmatischen Lipidtröpfchen nach einer IL-10 Exposition gesenkt werden können.

4.9 Oil Red O Färbung nach Aufnahme- und Efflux-Versuchen

PMA-differenzierte THP-1 Zellen wurden wie in 4.8 erwähnt inkubiert und die Lipide mittels Oil Red O (3.13) angefärbt und photographiert.

Es war ein deutlicher Unterschied zwischen Kontrollzellen, Zellen mit oxLDL Beladung und Zellen mit IL-10 und zusätzlicher oxLDL Beladung zu sehen. Die Kontrollzellen hatten durch ihren geringen Lipidgehalt nur wenig rot gefärbte Zellen. Nach einer oxLDL Beladung kam es zu einer massiven Akkumulation von Lipiden in den Zellen, was sich zum einen durch eine starke Rotfärbung und zum anderen durch vorhandene Lipidtröpfchen zeigte. Diese Akkumulation und Bildung der Lipidtröpfchen konnte durch IL-10 deutlich gesenkt werden. Die alleinige Zugabe von dHDL führte zu einer leicht verringerten Rotfärbung der Zellen. Versetzte man die Zellen zusätzlich mit IL-10 konnte fast keine Rotfärbung mehr gesehen werden. Zellen, die oxLDL und dHDL bekamen, waren deutlicher angefärbt als Zellen, die oxLDL, dHDL und IL-10 bekamen. Zusammenfassend kann man sagen, dass IL-10 die Rotfärbung, d.h. Lipidakkumulation, deutlich reduzieren konnte (Abbildung 4-32).

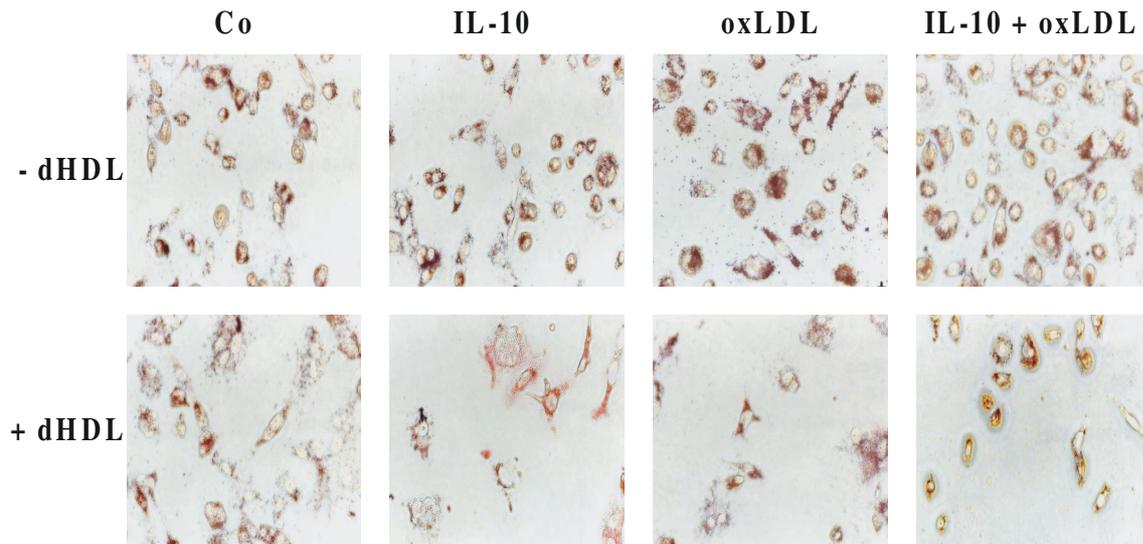


Abbildung 4-32: Oil Red O Färbung PMA-differenzierter THP-1 Zellen nach einem Aufnahme- und Efflux-Versuch (± 10 ng/ml IL-10, ± 100 μ g/ml oxLDL und ± 20 μ g/ml dHDL). Obere Reihe ohne Zugabe von dHDL und untere Reihe mit Zugabe von dHDL.

4.10 IL-10 reduziert die LPS-induzierte ICAM-1 Expression

Die Expression von ICAM-1 wird durch NF κ B reguliert. Die Hochregulation von ICAM-1 kann durch bakterielle Bestandteile, wie z.B. LPS, induziert werden. Mit diesen Versuchen sollte gezeigt werden, ob das anti-inflammatorische Cytokin IL-10 die LPS-induzierte ICAM-1 Expression reduzieren kann. Dazu wurden THP-1 Zellen mit IL-10 (10 ng/ml) oder PBS, mit verschiedenen LPS-Konzentrationen (10 ng/ml, 5 ng/ml und 2,5 ng/ml) oder beidem zusammen für 6 h, 24 h und 48 h inkubiert und die ICAM-1 Oberflächenproteinexpression (3.10.1.2) mittels Durchflusszytometrie ermittelt.

Eine alleinige Inkubation mit IL-10 zeigte einen minimalen Anstieg in der ICAM-1 Expression. Inkubierte man die Zellen mit den jeweiligen LPS-Konzentrationen, konnte eine konzentrationsabhängige Induktion von ICAM-1 beobachtet werden, wobei nach 24 h die Maxima erreicht wurden. Versetzte man die Zellen zusätzlich mit IL-10, konnte eine signifikante Reduktion von LPS-induziertem ICAM-1 durch IL-10 nach 6 bis 48 h beobachtet werden (Abbildung 4-33). Am deutlichsten war die Reduktion nach 24 h.

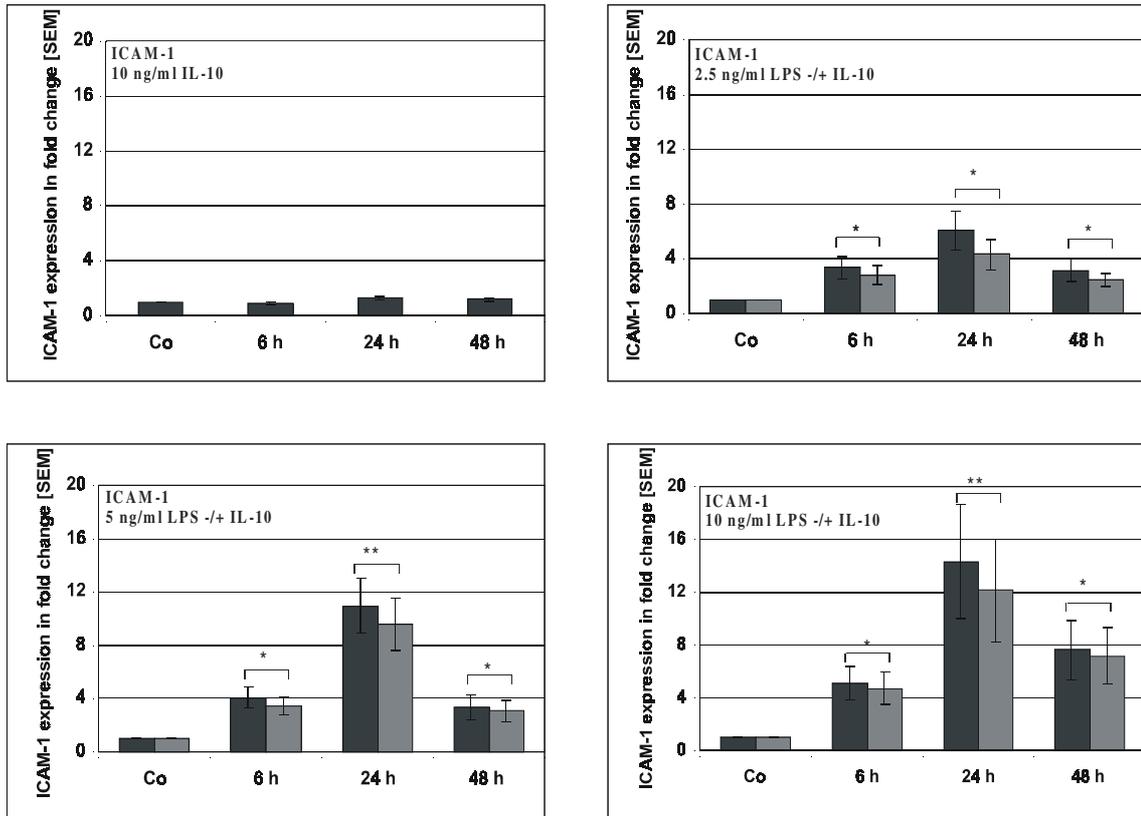


Abbildung 4-33: ICAM-1 Proteinexpression im Durchflusszytometer. THP-1 Zellen wurden entweder mit 10 ng/ml IL-10, PBS, unterschiedlichen LPS-Konzentrationen (10 ng/ml, 5 ng/ml, 2,5 ng/ml) oder zusätzlich mit LPS und IL-10 für 6 bis 48 h inkubiert; $n = 5-8 \pm$ SEM; * $< 0,05$; ** $< 0,01$.

4.11 IL-10 hat keinen Effekt auf die I κ B- α Expression

Der Transkriptionsfaktor NF κ B liegt cytoplasmatisch vor und ist dort mit I κ B- α gebunden, was zu einer Inaktivierung von NF κ B führt. Wird das I κ B- α phosphoryliert, löst es sich von NF κ B ab und dessen beide Untereinheiten p50 und p65 translozieren in den Kern. Mittels Western Blot können die beiden Untereinheiten p50 und p65, aber auch I κ B- α in Cytosolextrakten nachgewiesen werden. PMA-differenzierte THP-1 Zellen wurden mit 10 ng/ml IL-10 oder PBS für 1 h, 2 h und 4 h inkubiert und Cytosol- und Kernfraktionen (3.11.2) isoliert.

IL-10 stimulierte minimal die Expression von I κ B- α (40 kDa), was zu einer Verhinderung der Phosphorylierung von I κ B- α führen könnte. β -Aktin Western Blots

mit den jeweiligen Membranen ergaben, dass die aufgetragenen Proteinmengen gleich waren (Abbildung 4-34).

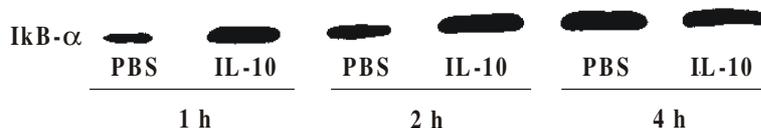


Abbildung 4-34: IκB-α Proteinexpression mittels Western Blot. PMA-differenzierte THP-1 Zellen wurden für 1 h, 2 h und 4 h mit 10 ng/ml IL-10 oder PBS behandelt und anschließend einer Cytosol-Kern-Extraktion unterzogen. Hier wurden nur die Cytosol-Extrakte verwendet. Es wurden 20 µg Protein aufgetragen.

Die nur geringe Konzentration von IκB-α nach IL-10 erklären nicht die Reduktion von ICAM-1 nach IL-10. Es wurde auch versucht, direkt die Reduktion einer Phosphorylierung von IκB-α (p-IκB-α) mit einem phospho-spezifischen Antikörper zu untersuchen. Da p-IκB-α nur nach Aktivierung von NFκB entsteht und basal in Zellen nicht vorliegt, konnte weder basales noch reduziertes p-IκB-α nachgewiesen werden.

4.12 Effekte von IL-10 auf die NFκB Untereinheiten p50 und p65

Der Transkriptionsfaktor NFκB besteht aus den beiden Untereinheiten p50 und p65. Diese werden im Cytoplasma durch IκB-α als Komplex gebunden und können erst nach Phosphorylierung von IκB-α, d.h. dessen Ablösung von dem Komplex, in den Kern translozieren. Die Effekte von IL-10 auf die NFκB Untereinheiten p50 und p65 wurden mittels Western Blot Analyse bzw. TransAM™ Assay untersucht. PMA-differenzierte THP-1 Zellen wurden für 1 h, 2 h und 4 h mit 10 ng/ml IL-10 oder PBS inkubiert und einer Cytosol-Kern-Extraktion (3.11.2) unterzogen. Mit den Cytosolextrakten wurden Western Blots für p50 und p65 und mit den Kernextrakten spezifische TransAM™ Assays für p50 und p65 gemacht. Aus Sensitivitätsgründen wurden zwei unterschiedliche Methoden zur Messung von p50 und p65 verwendet.

4.12.1 IL-10 Effekte auf die cytosolische Fraktion von NF κ B (p50 und p65)

Eine IL-10 Inkubation hatte auf die p50 Konzentration (obere Banden) und p65 Konzentration (untere Banden) im Cytoplasma keinen Einfluss, nachdem die Proteinmengen mittels β -Aktin Western Blot abgeglichen wurden (Abbildung 4-35).

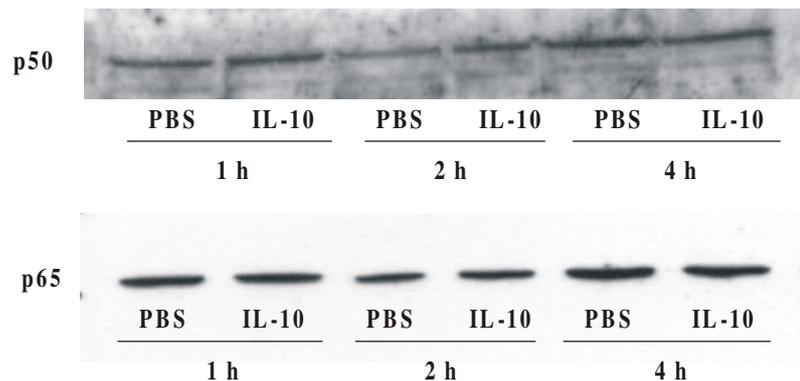


Abbildung 4-35: p50 (obere Banden) und p65 (untere Banden) Proteinexpression mittels Western Blot unter Verwendung von Cytosolextrakten. PMA-differenzierte THP-1 Zellen wurden für 1 h, 2 h und 4 h mit 10 ng/ml IL-10 oder PBS behandelt. Es wurden 20 μ g Protein aufgetragen.

4.12.2 IL-10 Effekte auf die nukleäre Fraktion von NF κ B

Im Gegensatz zum Western Blot aus dem Cytosol (4.12.1), wo man keine Unterschiede bei der p50 und p65 Proteinexpression nach IL-10 Behandlung beobachten konnte, ließ sich mit dem sensitiven TransAMTM Assay in Kernextrakten eine deutliche Reduktion von p50 und p65 nachweisen.

Die Reduktion von p50 im Kern betrug nach 1 h 89 %, nach 2 h 80 % und nach 4 h 77 % im Vergleich zur Kontrolle (100 %). Eine IL-10 Behandlung konnte p65 um 19 % nach 1 h und um 29 % nach 2 h im Vergleich zur Kontrolle (100 %) reduzieren (Abbildung 4-36).

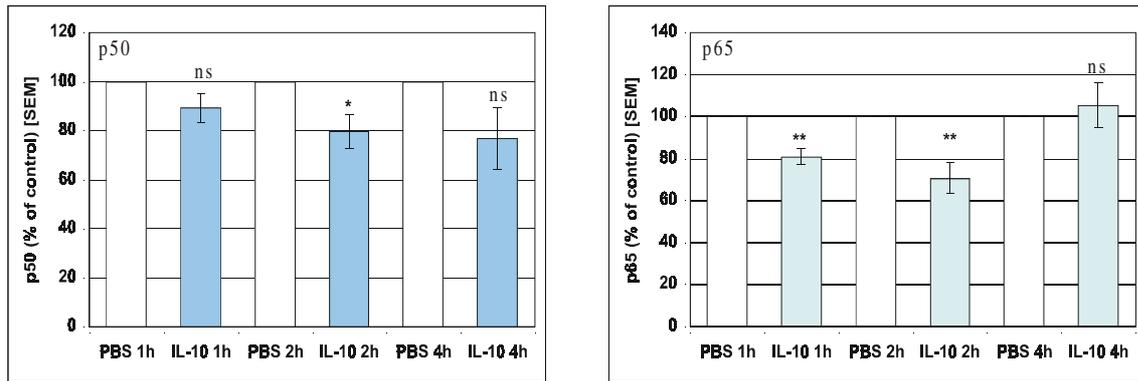


Abbildung 4-36: p50 (links) und p65 (rechts) im Vergleich zur Kontrolle (100 %) gemessen mit dem TransAM™ Assay unter Verwendung von Kernextrakten. PMA-differenzierte THP-1 Zellen wurden für 1 h, 2 h und 4 h mit 10 ng/ml IL-10 oder PBS behandelt; $n = 5 \pm \text{SEM}$; * < 0,05; ** < 0,01; ns= nicht signifikant.

4.13 IL-10 Effekte nach Ausschaltung des LXR α -

Signaltransduktionsweges mittels RNA interference (RNAi)

RNA interference (RNAi) ist eine Technik, mit der die Expression eines definierten Proteins in Zellen unter Verwendung kurzer spezifischer doppelsträngiger RNA-Moleküle selektiv fast vollständig unterdrückt werden kann. Man bezeichnet dies in Anlehnung an die "knock-out"-Methode deshalb auch als "knock down". Das Prinzip wurde unter 3.9 bereits dargestellt. Mit dieser Methode sollte der Beitrag des Signaltransduktionsweges LXR α zu den IL-10 Effekten auf ABCA1 untersucht werden.

Zuerst wurde der pSilencer™ 1.0-U6 Vektor der Firma Ambion mit den Restriktionsenzymen Apa I und Eco RI linearisiert. Nach der Ligation mit dem spezifischen Oligonukleotid-Paar für LXR α , der Transformation von *E.coli* Bakterien, der Klonierung und der Plasmidpräparation wurde zur Überprüfung ein Restriktionsverdau mit den Restriktionsenzymen Bam HI und Xho I für eine Stunde bei 37°C durchgeführt. Die geschnittenen Produkte konnten im 0,8 % Agarosegel wie erwartet in den richtigen Fragmentierungen bestätigt werden (Abbildung 4-38).

Um die Transfektionseffizienzen bei den verwendeten THP-1 Zellen auszutesten, wurden Zellen mit einer Zelldichte von $0.2 \times 10^6/\text{ml}$ für 24 h und 48 h mit 1 μl , 2,5 μl , 5 μl Metafectene und unterschiedlichen pGFP.C I-DNA-Konzentrationen (0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$,

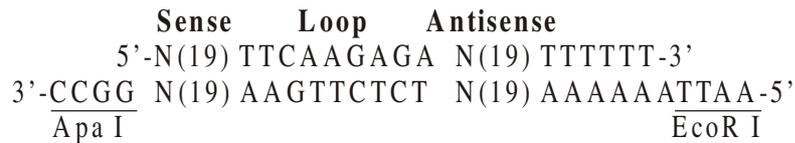
0,5 µg/ml, 1 µg/ml) transfiziert. Mit dem später verwendeten Nucleofector™ Gerät der Firma Amaxa wurden die Transfektionseffizienzen analog getestet. Es wurden 2×10^6 Zellen für 6 h, 24 h und 30 h mit 0,5 µg/ml GFP-DNA (wurde mitgeliefert) und 100 µl Cell Line Nucleofector™ Kit V Lösung nach Protokoll transfiziert. Die Effizienzen für die beiden Methoden wurden mittels Durchflusszytometrie für GFP ermittelt. Die Größen der beiden GFP-Vektoren entsprachen der Größe des verwendeten pSilencer™ 1.0-U6 Vektors und konnten somit als "Test-Vektoren" herangezogen werden (3.9.1.6).

Die maximalen Transfektionseffizienzen mit Metafectene betragen 25 % und wurden mit folgenden Bedingungen erreicht: 48 h Transfektion, 0,5 µg/ml DNA und 5 µl Metafectene. Die maximalen Transfektionseffizienzen mit dem Nucleofector™ Gerät von Amaxa betragen 70 % und wurden mit folgenden Bedingungen erreicht: 24 h Transfektion, 0,5 µg/ml DNA und 100 µl Cell Line Nucleofector™ Kit V Lösung.

Stabil transfizierte THP-1 Zellen [Ambion-Kontrollvektor (Random siRNA) und LXRα siRNA (T10)] konnten durch Kultur im Geneticin-haltigen Medium (3.5.1) selektioniert werden, indem die THP-1 Zellen simultan mit dem G418-Vektor (pcDNA3), der eine Geneticin-Resistenz aufweist, kotransfiziert worden waren. Das DNA-Verhältnis von Konstrukt und G418-Selektionsvektor betrug 10:1 (0,5 µg:0,05 µg), so dass die Kotransfektion mit dem gewünschten spezifischen "knock down" Konstrukt bei Geneticin-resistenten Zellen stets sichergestellt war. Das Selektionsmedium (3.5.1) wurde mit 600 µg/ml Geneticin versetzt.

4.13.1 Verifizierung des LXRα siRNA Konstruktes (Restriktionsverdau)

Für LXRα wurde ein spezifisches siRNA Konstrukt hergestellt und untersucht. Die Spezifität der ausgewählten Oligonukleotide wurde mit der Software BLAST (Altschul et al. 1997) Genom-weit kontrolliert. Nach der Plasmidpräparation wurde das LXRα siRNA Konstrukt (T10) durch Amplifikation und Sequenzierung verifiziert, wobei die Primer P1 und P4 (Tabelle 5), die außerhalb der insertierten siSequenz lagen, zur Amplifikation benutzt wurden. Die Sequenzierung ergab, dass das Konstrukt korrekt in den pSilencer™ 1.0-U6-Vektor eingebaut worden war. Das LXRα siRNA Konstrukt wurde T10 benannt. Die verwendeten Oligonukleotide für T10 sahen wie folgt aus:



T10 forward: 5'- ACT GAA GCG GCA AGA GGA GTT CAA GAG ACT CCT CTT
GCC GCT TCA GTT TTT TT -3

T10 reverse: 5'- AAT TAA AAA AAC TGA AGC GGC AAG AGG AGT CTC TTG
AAC TCC TCT TGC CGC TTC AGT GGC C -3'

Die Struktur des verwendeten pSilencer™ 1.0-U6-Vektors ist zum leichteren Verständnis der Ergebnisse der Restriktionsanalysen hier nochmals schematisch dargestellt (Abbildung 4-37):

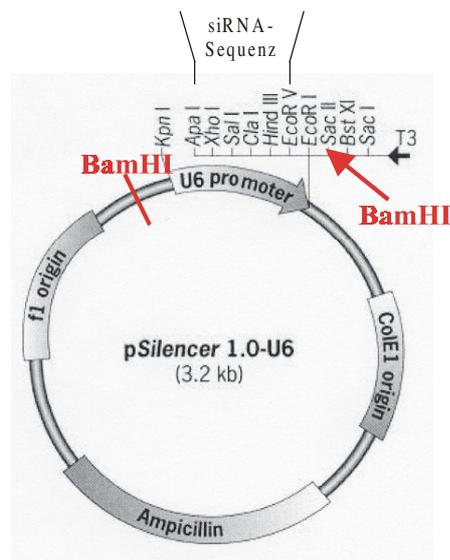


Abbildung 4-37: pSilencer™ 1.0-U6 Vektor der Firma Ambion mit den verwendeten Schnittstellen *Apa* I, *EcoR* I, *Bam* HI und *Xho* I. Außerdem ist die Insertionsstelle der siRNA-Sequenz gezeigt.

Nach dem Verdau mit den Restriktionsenzymen *Bam* HI und *Xho* I wurden die Ansätze auf ein 0,8 %-iges Agarosegel aufgetragen.

Die Restriktionsanalyse des LXR α siRNA Konstruktes T10 ist in Abbildung 4-38 gezeigt. Die Spur, die mit "0" gekennzeichnet ist, entspricht dem Konstrukt T10 ohne Zugabe eines Restriktionsenzym (unverdaut; "relaxed/coiled/supercoiled"). Wurde das Konstrukt T10 mit dem Restriktionsenzym Bam HI geschnitten (B), entstanden jeweils zwei Banden, die zum einen dem linearisierten "Vektorrest" (3.9.1.5) und zum anderen dem ausgeschnittenen DNA-Stück entsprachen. Wurde das Konstrukt T10 mit Xho I geschnitten (X), blieb es intakt, da dieser DNA-Abschnitt zu Beginn der erfolgreichen Insertion aus dem pSilencer™ 1.0-U6-Vektor mit Apa I und EcoR I herausgeschnitten worden war (3.9.1.5; Abbildung 4-37). Da nun die Erkennungssequenz für Xho I nicht mehr vorhanden war, konnte Xho I den Vektor an dieser Stelle nicht mehr schneiden. Wurden beide Enzyme verwendet (B/X), entstanden die gleichen Banden wie bei Bam HI (B) allein. Sowohl die Sequenzierung als auch der Restriktionsverdau zeigten somit, dass das LXR α siRNA Konstrukt (T10) korrekt in den linearisierten pSilencer™ 1.0-U6-Vektor eingebaut worden war.

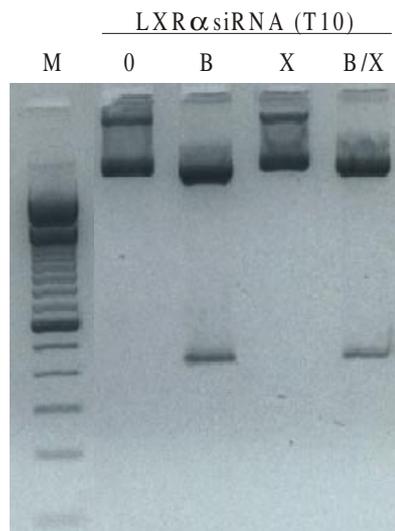


Abbildung 4-38: Restriktionsanalyse des LXR α siRNA Konstrukt (T10) im 0,8 %-igen Agarosegel. M = DNA-Marker, 0 = unverdaut; B = Verdau mit Bam HI, X = Verdau mit Xho I, B/X = Verdau mit Bam HI und Xho I.

4.13.1.1 IL-10 Effekte auf ABCA1 in LXR α "knock down" Zellen

LXR α ist in THP-1 Zellen nur gering exprimiert, deshalb wurde der "knock down" Effekt indirekt über die LXR α -stimulierte ABCA1 Expression untersucht. Es ist

bekannt, dass der Transkriptionsfaktor LXR α wesentlich für die Induktion von ABCA1 verantwortlich ist.

Zuerst wurden stabil transfizierte Random siRNA Zellen und LXR α siRNA Zellen (T10) auf die basale ABCA1 Expression untersucht. Dann wurden diese stabil transfizierten THP-1 Zellen mit dem LXR α Liganden 22-OHC (10 μ M) oder der Lösungsmittelkontrolle für 24 h inkubiert und die ABCA1 Transkription bestimmt.

Stabil transfizierte LXR α siRNA Zellen (T10) zeigten bereits eine reduzierte basale ABCA1 Expression im Vergleich zu Kontrollvektor-Zellen (Random siRNA). Wurden diese mit dem LXR α Liganden 22-OHC behandelt, war ein Anstieg der ABCA1 Transkription bei Kontrollvektor-Zellen (Random siRNA), nicht aber bei LXR α siRNA Zellen (T10) zu beobachten (Abbildung 4-39).

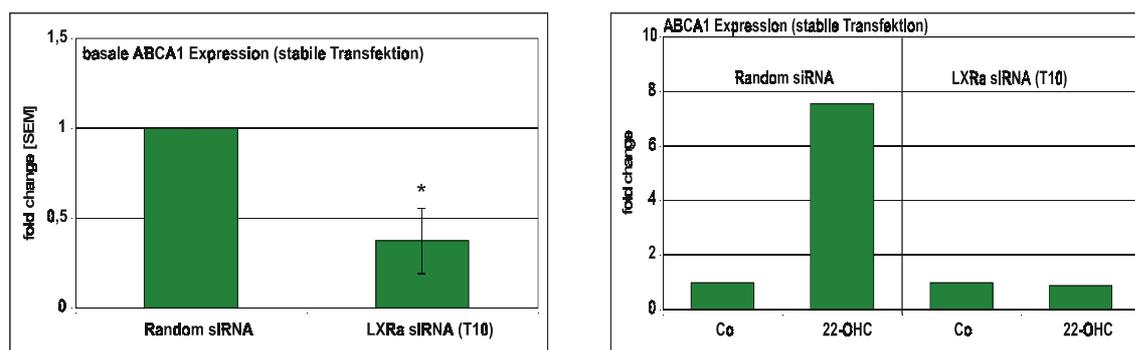


Abbildung 4-39: ABCA1 Transkription stabil transfizierter THP-1 Zellen [Ambion-Kontrollvektor (Random siRNA) und LXR α siRNA (T10)] mittels Real-time RT-PCR. Linker Graph stellt die basale ABCA1 Expression und der rechte Graph die 22-OHC-stimulierte (10 μ M) ABCA1 Expression nach 24 h dar; $n = 2-4 \pm SEM$; * $< 0,05$.

Stabil transfizierte Random siRNA und LXR α siRNA Zellen erwiesen sich nach Kryokonservierung bedauerlicherweise nicht mehr als vital und standen für die weiteren Experimente nicht mehr zur Verfügung. Deshalb wurde auf mit dem NucleofectorTM Gerät von Amaxa transient mit hoher Effizienz transfizierte Zellen zurückgegriffen. Transient transfizierte THP-1 Zellen [Ambion-Kontrollvektor (Random siRNA) und LXR α siRNA (T10)] wurden mit 10 ng/ml IL-10 oder PBS für 24 h inkubiert und

ABCA1-spezifische mRNA mittels Real-time RT-PCR amplifiziert und quantifiziert (Abbildung 4-40).

Auch transient LXR α siRNA transfizierte Zellen wiesen eine reduzierte, basale ABCA1 Expression im Vergleich zu transient transfizierten Kontrollvektor-Zellen (Random siRNA) auf. Während bei Kontrollvektor-Zellen (Random siRNA) durch eine IL-10 Behandlung ABCA1 signifikant induziert wurde, zeigten die LXR α "knock down" Zellen (T10) keine Stimulation von ABCA1 nach IL-10 Exposition (Abbildung 4-40).

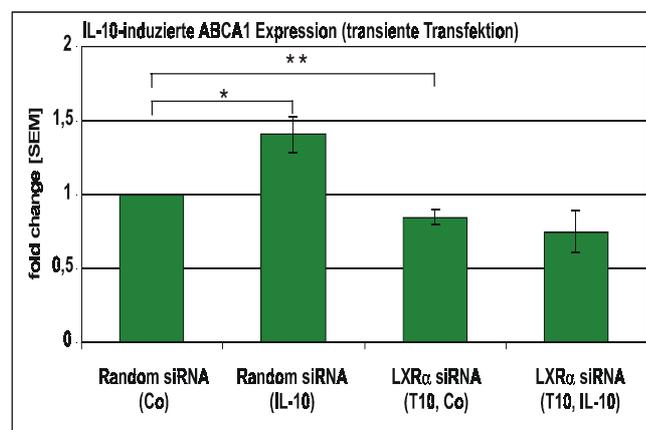


Abbildung 4-40: ABCA1 Transkription transient transfizierter THP-1 Zellen [Ambion-Kontrollvektor (Random siRNA) und LXR α siRNA (T10)] mittels Real-time RT-PCR. Transient transfizierte THP-1 Zellen wurden mit 10 ng/ml IL-10 oder PBS für 24 h inkubiert; $n \geq 4 \pm SEM$; * < 0,05; ** < 0,01.

Die IL-10-stimulierte Expression von ABCA1 in Monocyten ist also abhängig vom intakten LXR α -Signaltransduktionsweg und LXR α ist bereits an der basalen ABCA1 Expression beteiligt.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte des anti-inflammatorischen Cytokins IL-10 auf die Expression und Regulation von PPAR γ , CD36, LXR α , SR-BI, LDL-Rezeptor und ABCA1 an monocytoiden Zellen als Makrophagenmodell untersucht. Diese Transkriptionsfaktoren und Rezeptoren spielen eine besondere Rolle bei der Entwicklung von Makrophagen zu Schaumzellen in atherosklerotischen Plaques und ihrer potentiellen Rückbildung. Die funktionelle Bedeutung der IL-10-induzierten Veränderungen in der Expression der verschiedenen Rezeptoren und Transporter sollte mit Aufnahme-Efflux-Versuchen unter Verwendung von oxidiertem LDL (oxLDL) und delipidiertem HDL (dHDL) überprüft werden. Außerdem wurde der Einfluss von IL-10 auf die Expression von ICAM-1, I κ B- α und die beiden Untereinheiten von NF κ B, p50 und p65, untersucht, wichtige Mechanismen der Makrophagenrekrutierung in Plaques. Schließlich wurden stabil und transient transfizierte LXR α "knock down" Zellen hergestellt, um den beteiligten Signalweg zu untersuchen.

5.1 Etablierung der Real-time RT-PCR

Zuerst wurden die Real-time RT-PCR Bedingungen für die verschiedenen Rezeptoren und Transporter etabliert. Nicht optimierte Temperaturprofile und Konzentrationen der einzelnen Reagenzien würden zu einer nicht exponentiellen Amplifikation und zur Bildung von Fehlprodukten und Primerdimeren führen. Die Austestung und Verwendung des richtigen internen mRNA-Standards ist ebenfalls von entscheidender Bedeutung. Verschiedene Arbeiten zeigten, dass diese sogenannten "housekeeping genes", darunter GAPDH, β -Aktin und rRNA, nicht unter allen Bedingungen konstant exprimiert werden. Bustin berichtete, dass GAPDH Konzentrationen zwischen verschiedenen Individuen variieren können (Bustin et al. 1999). Man stellte aber auch Veränderungen in der Expression während des Zellzyklus (Mansur et al. 1993), nach PMA-Stimulation (Spanakis 1993) oder anderen Manipulationen (Bustin 2000) fest. β -Aktin ist einer der am längsten verwendeten internen Standards. Vor allem zwischen

Zellen verschiedener Malignome konnte eine größere Varianz beobachtet werden (Bustin 2000).

IL-10 und die anderen verwendeten Stimuli zeigten in THP-1 Zellen, PMA-differenzierten THP-1 Zellen und PBMCs in Vorversuchen erfreulicherweise keine Veränderung in der absoluten Expression von β -Aktin und GAPDH. Somit konnten beide unter diesen experimentellen Bedingungen ohne Bedenken als interne Standards verwendet werden (Abbildung 4-4).

5.2 IL-10 reduziert CD36 via Inhibition von PPAR γ

Wird natives LDL (natLDL) durch Enzyme modifiziert (z.B. oxidiert), kann es nicht länger über den LDL-Rezeptor in die Zellen aufgenommen werden. Die Aufnahme erfolgt über sogenannte Scavenger Rezeptoren (1.5.1), die keiner negativen Feedback-Regulation unterliegen, sondern sogar durch positiven Feedback ihrer Liganden induziert werden. Dies führt dazu, dass Makrophagen exzessiv oxLDL aufnehmen können und im subendothelialen Bereich zu Schaumzellen werden. Untersuchungen an CD36 knock out (CD36^{-/-}) Mäusen haben gezeigt, dass CD36 maßgeblich an der Aufnahme von oxLDL und dadurch an der Schaumzellbildung beteiligt ist (Febbraio et al. 2000).

THP-1 Zellen und PMA-differenzierte THP-1 Zellen, die mit IL-10 für 3 bis 72 h inkubiert wurden, zeigten bereits nach 3 h und anhaltend bis 72 h eine deutliche Reduktion von 40-60 % in der CD36 Transkription. Verwendete man frisch isolierte PBMCs von gesunden Spendern und behandelte diese für 3 h mit IL-10, konnte ebenfalls eine signifikante Reduktion beobachtet werden. Die Hemmung der CD36 Expression konnte auch mittels Durchflusszytometrie auf Proteinebene bestätigt werden. Dabei betrug die Reduktion von IL-10 auf die CD36 Proteinoberflächenexpression nur 10-20 %. Dieser Unterschied zur mRNA-Transkription könnte dadurch bedingt sein, dass CD36 intrazellulär in großen Pools präformiert vorhanden ist. Es liegt dort bereits fertig translatiert vor und wird nach Zellaktivierung zur Membran transportiert und kann auch nach oxLDL-Aufnahme wieder rezyklieren (Borst and Elferink 2002, Huh et al. 1996, Bonen et al. 2000).

Eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors PPAR γ führt in Monocyten/Makrophagen zu einer vermehrten Expression von CD36, was eine vermehrte Aufnahme von oxLDL und dadurch die Schaumzellentstehung begünstigt (Nagy et al. 1998, Tontonoz et al. 1998). Aktivatoren für PPAR γ sind natürliche Substanzen, wie der Prostaglandin-D2-Metabolit (15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J₂; 15d-PGJ₂) und weitere Oxidationsprodukte von ungesättigten Fettsäuren, die neuen Antidiabetika, Thiazolidindione und z.B. Indomethacin (Shibata et al. 2002, Kliewer et al. 1995, Lehmann et al. 1995).

Da IL-10 die Expression von CD36 reduziert hatte, sollte der Effekt von IL-10 auf den Transkriptionsfaktor PPAR γ untersucht werden. IL-10 reduzierte nicht nur die PPAR γ Expression, sondern auch die Translokation von PPAR γ in den Kern nach 24 h und 48 h. Doppelinkubationen mit einem PPAR γ -Liganden belegten, dass die verminderte CD36 Expression nach IL-10 durch eine verminderte PPAR γ Expression hervorgerufen wurde: PMA-differenzierte THP-1 Zellen wurden mit IL-10 und dem PPAR γ Liganden 15d-PGJ₂ behandelt. Eine alleinige Inkubation mit 15d-PGJ₂ führte wie erwartet zu einer Steigerung der CD36 Expression. Versetzte man die Zellen zusätzlich mit IL-10, konnte die 15d-PGJ₂-induzierte CD36 Induktion signifikant reduziert werden. Diese Ergebnisse konnten auch mit Indomethacin, einem weiteren PPAR γ Liganden, bestätigt werden. Somit lässt sich folgern, dass die verminderte basale CD36 Transkription und Expression durch IL-10 durch die reduzierte Expression und Translokation von PPAR γ erklärt werden kann und IL-10 auch die Stimulation von CD36 durch aktivierende PPAR γ Liganden attenuiert.

5.3 Auswirkung der reduzierten CD36 Expression auf die Aufnahme von oxLDL

Als nächstes wurde die funktionelle Bedeutung der IL-10-induzierten Veränderungen in der Transkription und Expression von CD36 für die zelluläre Cholesterin-Homöostase untersucht. Dazu wurden THP-1 Zellen und PMA-differenzierte THP-1 Zellen mit IL-10 vorinkubiert, dann mit oxLDL beladen und anschließend mit dHDL als Cholesterinakzeptor behandelt. Wie erwartet, stieg der Cholesteringehalt der Zellen bei Angebot von oxLDL an. Wurden die Zellen gleichzeitig mit IL-10 behandelt, war nach oxLDL Exposition der Cholesteringehalt der Zellen gegenüber Kontrollbehandlung

gesenkt. Die durch IL-10 anhaltend verminderte Transkription und Expression von CD36, dem quantitativ wichtigsten Scavenger Rezeptor für oxLDL (Greenwalt et al. 1992, Abumrad et al. 1993, Han et al. 1997), führte offensichtlich zu einer verminderten oxLDL Akkumulation in den Zellen. Mittels Oil Red O Färbung konnte die massive Akkumulation der Lipide nach oxLDL Exposition und deren deutliche Reduktion durch IL-10 auch mikroskopisch belegt werden. Dies zeigte sich analog am Verhalten der Zellgranularität in der Durchflusszytometrie, die ebenfalls die intrazelluläre Fetttröpfchen erfassen kann.

In verschiedenen Atherosklerose-Tiermodellen konnte eine Reduktion der Schaumzellbildung durch IL-10 bereits *in vivo* gezeigt werden. In zwei Arbeiten (Pinderski Oslund et al. 1999, Mallat et al. 1999a) wurden IL-10 überexprimierende, transgene (IL-10^{+/+}) Mäuse und IL-10 knock out (IL-10^{-/-}) Mäuse nach atherogener Diät miteinander verglichen. Der Plasmagesamtcholesterinspiegel zeigte dabei keine Veränderungen, wobei es bei IL-10^{-/-} Mäusen aber zu einem erhöhten LDL- und einem erniedrigten HDL-Anteil kam. Gleichzeitig waren bei IL-10^{-/-} Mäusen vielfach größere vaskuläre Läsionen und massive Akkumulation von Lipiden in mononukleären Zellen in der Gefäßwand im Vergleich zu Kontrolltieren zu beobachten. Die IL-10^{+/+} Mäuse waren dagegen vor Lipidakkumulationen und folglich vor Schaumzellbildung geschützt.

Die hier gefundene Suppression der monocytären CD36 Expression durch IL-10 liefert einen plausiblen Mechanismus zur Erklärung der Reduktion der Schaumzellbildung, die nicht allein aus der anti-inflammatorischen Wirkung von IL-10 verständlich wäre.

5.4 IL-10 stimuliert den reversen Cholesterintransport

5.4.1 IL-10 induziert den Cholesterinexporter ABCA1 und den Transkriptionsfaktor LXR α

Dem reversen Cholesterintransport, durch den Cholesterin aus der Peripherie zur Leber transportiert und biliär ausgeschieden wird, kommt eine entscheidende Bedeutung für die Prävention und Regression atherosklerotischer Gefäßveränderungen zu. Wesentlicher Schritt des reversen Cholesterintransportes ist die Übertragung von Cholesterin aus den Zellen auf Apo AI mittels ABC-Transportern. Eine Induktion des

Cholesterinexporters ABCA1 führt in der Tat zu einem gesteigerten zellulären Cholesterinefflux. Dysfunktionelle Mutationen im ABCA1 Gen bei der Tangier Krankheit sind durch Cholesterinakkumulationen im retikulo-endothelialen System, akzelerierte Arteriosklerose und reduzierte HDL-Spiegel charakterisiert (Hobbs and Rader 1999). Fibroblasten von diesen Patienten hatten einen verminderten Cholesterinefflux auf Apolipoproteine (Francis et al. 1995), was mit der Expression von ABCA1 korrelierte (Lawn et al. 1999). ABCA1 knock out (ABCA1^{-/-}) Mäuse zeigten ähnliche Veränderungen wie Tangier Patienten und waren durch niedrige HDL-Spiegel und zelluläre Lipidakkumulationen (McNeish et al. 2000), die zu einer signifikanten Erhöhung in der Atherosklerose-Entwicklung führten (Aiello et al. 2002), gekennzeichnet.

Eine IL-10 Inkubation führte bei THP-1 Zellen, PMA-differenzierten THP-1 Zellen und PBMCs von gesunden Spendern zu einer signifikanten ABCA1 Induktion in der Größenordnung wie sie an denselben Zellen mit dem LXR α Agonisten 22-OHC (22-Hydroxycholesterol) beschrieben wurde (Whitney et al. 2001). Die Steigerung der ABCA1 Expression konnte mittels Real-time RT-PCR auf mRNA Ebene und mittels Western Blot auf Proteinebene gezeigt werden. IL-10 induzierte bereits nach 3 h und anhaltend bis 72 h die ABCA1 Transkription und die Proteinexpression bereits minimal nach 6 h und stärker nach 24 h. In PMA-differenzierten THP-1 Zellen erhöhte IL-10 auch die Transkription und Expression des Transkriptionsfaktors LXR α nach 3 bis 48 h. Somit fördert IL-10 den reversen Cholesterintransport und verhindert die Akkumulation von Cholesterin in überladenen Schaumzellen. Dieser neue Mechanismus von IL-10 ist wesentlich für die Regression arteriosklerotischer Läsionen.

5.4.2 Regulationsmechanismen von ABCA1 durch IL-10

Für die Eingrenzung, welche Signalwege den Anstieg von ABCA1 durch das anti-inflammatorische Cytokin IL-10 vermitteln, wurden die verschiedenen Transkriptionsfaktoren (PPAR γ , PPAR α und LXR α) und cAMP (zyklisches AMP) untersucht.

In mehreren Arbeiten war gezeigt worden, dass ABCA1 unter anderem durch den Transkriptionsfaktor PPAR γ positiv reguliert wird (Chinetti et al. 2001, Chawla et al. 2001). Anhand der Ergebnisse in 4.4.3.1 konnte eine entscheidende Bedeutung von

PPAR γ für die Induktion von ABCA1 durch IL-10 aber ausgeschlossen werden, da IL-10 die PPAR γ Expression und Translokation hemmte. Um weiter abzusichern, dass PPAR γ nicht der verantwortliche Transkriptionsfaktor war, wurden PMA-differenzierte THP-1 Zellen mit den PPAR γ Liganden 15d-PGJ₂ und IL-10 für 3 bis 48 h koinkubiert. Wie erwartet, induzierte 15d-PGJ₂ die ABCA1 Transkription. Wurden die Zellen zusätzlich mit IL-10 versetzt, wurde die 15d-PGJ₂-stimulierte ABCA1 Transkription durch IL-10 sogar reduziert, wie durch die in 5.4.1 diskutierte PPAR γ Reduktion zu erwarten war. Offensichtlich wird die IL-10 Stimulation von ABCA1 also nicht über PPAR γ vermittelt.

Neben PPAR γ kann auch der Transkriptionsfaktor PPAR α zu einer Induktion von ABCA1 führen (Chinetti et al. 2001, Chinetti et al. 2003). PMA-differenzierte THP-1 Zellen wurden mit IL-10 und dem PPAR α Liganden Fenofibrat für 3 bis 48 h inkubiert. Fenofibrat allein induzierte die ABCA1 Expression. Eine zusätzliche Behandlung mit IL-10 führte zu einer weiteren Stimulation in der ABCA1 Transkription. Die weitere Steigerung der bereits (sub)-maximalen Stimulation von PPAR γ durch Fenofibrat spricht eher für einen zusätzlichen unabhängigen Signalweg der IL-10 Wirkung auf ABCA1.

Auch der Transkriptionsfaktor LXR α vermittelt wesentlich die Induktion von ABCA1 insbesondere bei Cholesterinbelastung der Zellen (Costet et al. 2000, Repa et al. 2000, Venkateswaran et al. 2000). LXR α ist ein nukleärer Rezeptor, der nach aktivierter Ligandenbindung mit dem Retinsäure-Rezeptor RXR einen Heterodimer bildet (Willy et al. 1995). LXRs werden durch natürlich vorkommende Oxysterole (Oxidationsprodukte des Cholesterins) (Janowski et al. 1996, Costet et al. 2000, Fu et al. 2001, Schwartz et al. 2000) und RXR α durch 9-cis RA (9-cis retinoic acid) (Mangelsdorf and Evans 1995, Kastner et al. 1995, Costet et al. 2000) aktiviert. Das aktivierte Heterodimer transloziert in den Kern, wo es an für LXR α spezifische DNA-Sequenzen (LXREs; LXR α response elements) z.B. im ABCA1 Promotor bindet und dessen Transkription steigert (Singaraja et al. 2001).

Koinkubationen sollten Aufschluss über das Zusammenwirken von IL-10 mit den beiden Transkriptionsfaktoren geben. Für die Aktivierung von LXR α wurde der Ligand

22-OHC und für die Aktivierung von RXR α der Ligand 9-cis RA verwendet. Beide Liganden induzierten auch die LXR α und ABCA1 Transkription. Eine Behandlung der Zellen mit 22-OHC und IL-10 zusammen, führte sowohl bei der LXR α als auch bei der ABCA1 Transkription zu einem additiven Effekt. Zumindest ein Teil des IL-10 Effektes auf ABCA1 erscheinen daher LXR α vermittelt. Wurden die PMA-differenzierten THP-1 Zellen mit dem RXR α Liganden 9-cis RA und IL-10 inkubiert, wurde auch hier eine additive Induktion der ABCA1 Transkription nach 3 bis 48 h gesehen. Bei der LXR α Transkription waren die Effekte anders. So konnte nach 3 h und 24 h keine zusätzliche Induktion durch IL-10 beobachtet werden. Erst nach 48 h nahm die LXR α Transkription additiv zu. Dies passt zur Kinetik der Auto-Induktion von LXR α (Li et al. 2002b).

Die Befunde mit der Koinkubation von IL-10 und RXR α Liganden 9-cis RA für die LXR α Transkription könnte durch einen weiteren Mechanismus beeinflusst sein. RXR α ist der gemeinsame Heterodimerpartner für die Transkriptionsfaktoren PPAR α , PPAR γ und LXR α . Zwei kürzliche Arbeiten zeigten einen "cross-talk" zwischen PPAR α und LXR α durch Konkurrenz um RXR (Ide et al. 2003, Yoshikawa et al. 2003). PPAR α bildet mit RXR α einen Heterodimer und bindet an spezifische DNA-Sequenzen (PPRE; peroxisome proliferator response elements) und das Heterodimer LXR α /RXR α bindet an LXREs (LXR response elements). PPAR α kann mit vergleichbarer Affinität ein Heterodimer mit LXR α oder RXR α bilden. Dadurch kommt es zu einer RXR α Konkurrenz zwischen PPAR α und LXR α . Auch PPAR γ benötigt RXR α als Heterodimerpartner, um in den Kern zu translozieren und PPAR γ -abhängige Gene zu induzieren. Somit kommt es zur Konkurrenz zwischen PPAR α , LXR α und PPAR γ um RXR α . Der Effekt von IL-10 auf PPAR α und PPAR γ könnte also zusätzlich auf der Ebene der RXR-Konkurrenz das LXR α Signal beeinflussen.

Auch cAMP als ubiquitär vorkommendes, sekundäres, intrazelluläres Signalmolekül spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation der ABCA1 Expression. Lawn und Kollegen konnten in Fibroblasten nach cAMP Gabe eine gesteigerte Induktion der ABCA1 mRNA nachweisen (Lawn et al. 1999). Auch murine RAW264 Makrophagen zeigten einen deutlichen Anstieg in der ABCA1 Transkription auf cAMP (Oram et al.

2000). In diesen murinen Makrophagen ist ABCA1 ein konstitutiv phosphoryliertes Protein. Diese Phosphorylierung von ABCA1 wird durch cAMP über die Proteinkinase A (PKA) oder PKA-ähnliche Kinasen vermittelt (See et al. 2002). Mehrfach konnte eine ABCA1 Induktion durch cAMP gezeigt werden, die LXR α unabhängig war (Bortnick et al. 2000, Oram et al. 2000, Schwartz et al. 2000). Umgekehrt wurde auch für cAMP und andere Substanzen, die cAMP erhöhen (z.B. das Prostacyclin-Analogon Cicaprost), eine gesteigerte Induktion, Transkription und Freisetzung des Cytokins IL-10 aus Monocyten gezeigt (Eigler et al. 1998, Kambayashi et al. 1995). Kim und Kollegen berichteten, dass innerhalb des murinen IL-10 Promotors ein cAMP response element (CRE) vorhanden ist, was eine positive Rückkopplungsschleife der IL-10 Produktion darstellen könnte (Kim et al. 1992).

Um die potentielle Signalübertragung von IL-10 über cAMP und PKA auf ABCA1 zu überprüfen, wurden THP-1 Zellen und PMA-differenzierte THP-1 Zellen mit dem PKA Inhibitor Ro 31-8220 für 30 min vorinkubiert, bevor IL-10 für 3 h zugegeben wurde. Die alleinige Inkubation mit dem PKA Inhibitor Ro 31-8220 senkte die basale Expression von ABCA1 in THP-1 Zellen und PMA-differenzierten THP-1 Zellen. Ein toxischer Effekt des PKA Inhibitors konnte dabei ausgeschlossen werden (Rubic et al. 2004). Der PKA Inhibitor Ro 31-8220 konnte zudem die IL-10-induzierte ABCA1 Transkription signifikant reduzieren. Der IL-10 Effekt auf ABCA1 wird somit zumindest teilweise auch über PKA vermittelt, welches seinerseits durch cAMP stimuliert dann zu einer ABCA1 Induktion führen kann. Diese Interpretation wurde durch Messung des intrazellulären cAMP in THP-1 Zellen erhärtet. IL-10 erhöhte in der Tat die intrazelluläre cAMP-Konzentration.

Über die Vermittlung der anti-inflammatorischen Effekte von IL-10 ist bekannt, dass IL-10 nach Bindung an den IL-10-Rezeptor den JAK/STAT3-Signaltransduktionsweg aktiviert und dadurch sekundär SOCS-1 und SOCS-3 (suppressor of cytokine signalling -1 und -3) induziert (s.a. 1.9) (Riley et al. 1999, Niemand et al. 2003, Ding et al. 2003, Donnelly et al. 1999). Direkte Blocker des IL-10 Rezeptors stehen nicht zur Verfügung. Ein spezifischer Inhibitor für den JAK1/TYK2-abhängigen Signalweg über STAT3 und STAT5 ist Piceatannol (Su and David 2000, Alas and Bonavida 2003). Piceatannol hemmte in Lymphoma- und Myeloma-Zellen anhaltend die STAT3 Aktivierung auch in Gegenwart von exogenem IL-10 (Alas and Bonavida 2001). Um die Vermittlung des

IL-10 Effektes auf die ABCA1 Expression über den IL-10-Rezeptor zu erhärten, wurde deshalb Piceatannol als proximaler Inhibitor des IL-10-Signaltransduktionsweges verwendet. PMA-differenzierte THP-1 Zellen wurden mit ansteigenden Piceatannol-Konzentrationen für 30 min vorinkubiert und dann mit IL-10 für weitere 3 h stimuliert. Eine alleinige Inkubation mit Piceatannol hatte keinen Einfluss auf die basale ABCA1 Expression. Piceatannol unterdrückte aber die IL-10-induzierte ABCA1 Stimulation in Dosis-abhängiger Weise schließlich vollständig. Dies unterstützt die proximale Übertragung der IL-10 Effekte auf ABCA1 über den IL-10-Rezeptor.

5.5 Funktionelle Auswirkung der gesteigerten ABCA1 Expression

Die funktionelle Relevanz der gesteigerten ABCA1 Expression wurde mittels des dHDL-geförderten zellulären Cholesterinefflux überprüft. THP-1 Zellen und PMA-differenzierte THP-1 Zellen wurden mit IL-10 vorinkubiert und danach mit oxLDL beladen. Nicht aufgenommenes oxLDL wurde durch Waschen entfernt und dann dHDL als Akzeptor für Cholesterin zugegeben. IL-10 reduzierte die Aufnahme von oxLDL, wie bereits in 5.3 diskutiert wurde. Dies ist durch die Hemmung der CD36 Expression erklärt. dHDL allein reduzierte bereits, wie erwartet, den zellulären Cholesteringehalt, konnte aber den oxLDL-bedingten Anstieg des zellulären Cholesterins nicht vollständig verhindern. Dagegen wurde in Gegenwart von IL-10 nicht nur die oxLDL Beladung reduziert, sondern durch zusätzliche Inkubation mit dHDL der zelluläre Cholesteringehalt maximal reduziert. Die zelluläre Protektion vor Lipidüberladung durch IL-10 konnte auch mikroskopisch bestätigt werden. Die gesteigerte ABCA1 Expression nach IL-10 hat also funktionelle Relevanz für das zelluläre Cholesterin-handling auch unter maximaler Exposition mit oxLDL.

In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Überladung von Makrophagen mit Cholesterin zu einer Steigerung der ABCA1 mRNA und zu einem relativ verstärkten Cholesterinefflux auf Apo A-I führt (van Eck et al. 2002, Oram and Lawn 2001). Durch IL-10 wird aber die ABCA1 Expression auch ohne komplette zelluläre Cholesterinüberladung gesteigert, was die Regression arteriosklerotischer Läsionen begünstigt.

5.6 IL-10 und SR-BI Expression

Der Scavenger Rezeptor BI (SR-BI) vermittelt im Gegensatz zum Cholesterinexporter ABCA1 einen potentiell bidirektionalen Cholesterinflux, d.h. er erleichtert sowohl die zelluläre Cholesterinaufnahme als auch für die Cholesterinabgabe je nach Konzentrationsgradient (de La Llera-Moya et al. 2001). Die Regulation von SR-BI ist komplex (Krieger 2001, Steinbrecher 1999). Es konnte gezeigt werden, dass SR-BI unter anderem durch die Transkriptionsfaktoren PPAR α , PPAR γ und LXR α reguliert wird (Chinetti et al. 2000, Malerod et al. 2003, Malerod et al. 2002). Weitere Veröffentlichungen zeigten, dass SR-BI und ABCA1 sich möglicherweise über den zellulären Cholesteringehalt gegenseitig invers beeinflussen können. Wird die ABCA1 Expression induziert, wird die SR-BI Expression in Makrophagen und *in vivo* supprimiert (Chen et al. 2000, Yancey et al. 2004).

IL-10 hatte allenfalls einen minimalen und biphasischen Effekt auf die SR-BI Transkription, wobei nach 3 h eine tendenzielle Hemmung, nach 24 h eine geringe Steigerung und nach 48 h wieder eine leichte Hemmung zu beobachten war. Da IL-10 die ABCA1 Expression induziert, könnte zumindest die tendenziell reduzierte frühe SR-BI Expression durch PPAR γ oder diese inverse Kopplung erklärt werden.

5.7 IL-10 und LDL-Rezeptor Expression

Die Regulation des LDL-Rezeptors ist über den SREBP-Signaltransduktionsweg invers mit dem zellulären Cholesterinbestand verknüpft. SCAPs (SREBP Cleavage activating protein) (Rawson 2003) und die HMG-CoA-Reduktase (Hydroxymethylglutaryl-CoA-Reduktase) (Brown and Goldstein 1986, Goldstein and Brown 1990, Horton et al. 2002, Rawson 2003) spielen eine wichtige Rolle bei der Regulierung des LDL-Rezeptors. Die Regulierung erfolgt nach einem negativen Feedback-Mechanismus, d.h. bei normalem oder erhöhtem zellulären Cholesterinbestand, wird die HMG-CoA-Reduktase und die LDL-Rezeptor Expression und somit die Cholesterinsynthese und -aufnahme gehemmt. Kommt es zu einem zellulären Fehlbestand des Cholesterins, wird über den SREBP-Signaltransduktionsweg nach HMG-CoA und LDL-Rezeptor Expression, die Cholesterinsynthese stimuliert und die Aufnahme gesteigert. Entsprechend dem

unveränderten zellulären Cholesterinstatus wurde die LDL-Rezeptor Transkription nach IL-10 nicht verändert.

Der Anstieg in der LDL-Rezeptor Transkription in PMA-differenzierten THP-1 Zellen, bei denen nach einer IL-10 Behandlung keine Reduktion des Gesamtcholesteringehalt beobachtet werden konnte, ist jedenfalls nicht über den SREBP-Signaltransduktionsweg erklärbar. Auch bei IL-10^{+/+} und IL-10^{-/-} Mäusen wurden keine Veränderungen des Gesamtcholesterinspiegels berichtet (Pinderski Oslund et al. 1999, Mallat et al. 1999a).

5.8 IL-10 reduziert die LPS-induzierte Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1

Verschiedene Adhäsionsmoleküle ermöglichen zirkulierenden Zellen wie den Monocyten/Leukocyten erst die initiale Adhäsion, die feste Adhäsion auf dem Endothel und Aktivierung und schließlich die Transmigration in das Gewebe (Blankenberg et al. 2003). ICAM-1 ist ubiquitär auf Zellen exprimiert und kann durch LPS und IFN γ stimuliert werden (Simmons et al. 1988, Campbell et al. 1989). Der ICAM-1 Promotor besitzt Bindestellen für AP-1, NF κ B und C/EBP (Wawryk et al. 1991, Voraberger et al. 1991, Look et al. 1994). ICAM-1 ist essentiell für die Rekrutierung von Monocyten/Leukocyten in frühen atherosklerotischen Läsionen.

Um etwaige Effekte von IL-10 auf die LPS-induzierte ICAM-1 Expression zu untersuchen, wurden THP-1 Zellen mit unterschiedlichen LPS-Konzentrationen und IL-10 für 6 bis 48 h behandelt. Eine alleinige IL-10 Behandlung führte zu einer minimalen Induktion von ICAM-1, die auch bereits von Song beobachtet wurde (Song et al. 1997). Aber IL-10 konnte bereits nach 6 h und anhaltend bis 48 h eine deutliche Hemmung in der LPS-induzierten ICAM-1 Expression hervorrufen. Der hemmende Effekt von IL-10 auf die ICAM-1 Expression dürfte über die Hemmung der Monocyten/Leukocyten-Rekrutierung zur anti-atherosklerotischen Wirkung von IL-10 beitragen, da es die Adhäsion von Monocyten/Leukocyten an das Endothel verhindern kann. Die Reduktion der LPS-induzierten ICAM-1 Expression durch IL-10 könnte durch eine Hemmung von NF κ B (Voraberger et al. 1991) und PPAR γ (Chen et al. 1999) vermittelt sein.

5.9 Einfluss von IL-10 auf I κ B- α und die NF κ B Untereinheiten p50 und p65

NF κ B ist ein zentraler Transkriptionsfaktor, der im Cytosol mit I κ B- α assoziiert und dadurch inaktiv vorliegt. Durch geeignete Zellaktivierung kann I κ B- α phosphoryliert und dann durch das Proteasom degradiert werden. Diese Degradierung von I κ B- α erlaubt NF κ B in den Kern zu translozieren, an spezifische DNA-Sequenzen zu binden und die Transkription von verschiedenen Genen zu regulieren und initiieren (Li and Verma 2002a). Zur NF κ B Familie gehören die Proteine p50, p52, p65, c-Rel und RELB (Verma et al. 1995, Ghosh et al. 1998). NF κ B ist auch ein entscheidender Transkriptionsfaktor für ICAM-1.

Um mögliche Effekte von IL-10 auf die beiden NF κ B Untereinheiten p50 bzw. p65 und I κ B- α als Erklärung der ICAM-1 Reduktion zu untersuchen, wurden PMA-differenzierte THP-1 Zellen mit IL-10 oder PBS behandelt und einer Cytosol-Kern-Extraktion unterzogen. Mittels Western Blot Analyse unter Verwendung von Cytosolextrakten zeigte sich, dass IL-10 nur minimale Effekte auf die Proteinexpression von p50 und p65 hatte. Um den Effekt von IL-10 auf die beiden nukleäre Fraktionen von NF κ B p50 und p65 zu untersuchen, wurde der spezifische TransAM™ Assay verwendet. Dieser TransAM™ Kit beruht auf immobilisierten Oligonukleotiden des NF κ B-Bindemotivs, an deren DNA-Sequenz die aktive Form von NF κ B, die in den Kernextrakten enthalten ist, binden kann. Der primäre Antikörper, der dann verwendet wird, um NF κ B zu detektieren, erkennt Epitope von p50 bzw. p65, die nur dann zugänglich sind, wenn NF κ B aktiv ist. Dieser TransAM™ Kit hat eine deutlich höhere Sensitivität als der übliche Western Blot. Nach IL-10 Exposition konnte in den Kernextrakten eine deutliche Reduktion des nukleären NF κ B gezeigt werden. Dass IL-10 NF κ B in Monocyten und Makrophagen hemmt, wurde auch bereits in anderen Arbeiten gezeigt (Raychaudhuri et al. 2000, Wang et al. 1995).

IL-10 hatte nur einen minimalen induzierenden Effekt auf die Expression von I κ B- α . Dieser Befund wurde von Clarke und Kollegen bereits in murinen Makrophagen gezeigt (Clarke et al. 1998). Die Reduktion der LPS-induzierten ICAM-1 Expression durch IL-

10 dürfte also über die Attenuierung des NF κ B-Signaltransduktionsweges und PPAR γ vermittelt worden sein.

5.10 RNA interference (RNAi) mit dem LXR α -Signalweg

RNA interference (RNAi) ist ein zellulärer Mechanismus, mit dem die Expression bestimmter Gene post-transkriptionell durch kurze Doppelstrang-RNA-spezifischen Sequenz unterdrückt wird. Diese small interference (si) RNAs binden sequenzspezifisch an mRNAs im sogenannten Dicer-Komplex und degradieren diese mRNAs durch spezifische Nukleasen (s.a. 3.9). Das Prinzip der RNAi ergab sich aus Beobachtungen in den 80er Jahren, als Forscher mit unerwarteten Ergebnissen der Antisense Methode in *C. elegans* Versuchen konfrontiert waren. (Smith et al. 2001, Fire et al. 1991). Andrew Fire und Craig Mello konnten im Jahre 1998 zeigen, dass man durch die Injektion kleiner doppelsträngiger RNAs spezifische RNAi auslösen konnte (Fire et al. 1998). Die Tatsache, dass RNAi in sehr verschiedenen Organismen funktioniert, legt nahe, dass es sich hier um einen basalen, in der Evolution konservierten Mechanismus handeln muss. RNAi ist vermutlich ein Abwehrmechanismus der Zellen, um der Reproduktion viraler Pathogene (exogen) und integrierter Viren (z.B. Springen mobiler Elemente im Genom; Transposons und Retrotransposons) entgegen zu wirken (Tabara et al. 1999, Mourrain et al. 2000, Ramaswamy and Slack 2002). Dieser Schutzmechanismus kann durch Verwendung spezifischer siRNAs als molekularbiologisches Werkzeug ausgenutzt werden.

In der vorliegenden Arbeit sollte RNAi benutzt werden, um stabil und transient transfizierte LXR α "knock down" Zellen zu generieren und damit gezielt den Signaltransduktionsweg von IL-10 für die Effekte auf ABCA1 zu untersuchen und zusätzlich zu den Agonisten/Antagonisten-Experimenten den Signalweg zu charakterisieren.

Es stellte sich heraus, dass mittels Metafectene (Liposomen) nur Transfektionseffizienzen von 25 % in Monozyten erreichbar waren. Diese geringen Transfektionseffizienzen in Monozyten wurden auch von anderen Arbeitsgruppen berichtet (Gee et al. 2002, Ma et al. 2001). Der Grund liegt wahrscheinlich darin, dass Monozyten phagozytierende Zellen sind und das "eingeschleuste" Konstrukt zum größten Teil bereits in ihren Lysosomen effizient degradieren, bevor es in ihr Genom einbaut werden

kann. Erschwerend kam hinzu, dass THP-1 Zellen nach einer Kotransfektion mit dem G418-Vektor in einem Selektionsmedium kultiviert werden mussten, das 600 $\mu\text{g/ml}$ Geneticin beinhaltete. Diese hohe erforderliche Konzentrationen erschwerten die Proliferation der Zellen, was folglich zu einer sehr langsamen Expansion führte. Die schließlich selektionierten, stabil transfizierten Zellen waren dann in ihrer Vitalität so reduziert, dass sie nicht kryokonserviert werden konnten.

Die Firma Amaxa bietet mittlerweile ein neues Gerät namens Nucleofector™ an, mit dessen Hilfe man auf klassische Weise schlecht transfizierbare Zellen, darunter auch Monocyten und Primärzellen, sehr effizient transfizieren kann. Nucleofector™ benutzt eine kombinierte Technologie aus Elektroporation und Liposom-Transfektion (= Nucleofektion). Dadurch ist es möglich, hohe Transfektionsraten zu erreichen. Der entscheidende Vorteil liegt darin, dass das zu transfizierende Konstrukt direkt in den Kern geschleust wird und dass der Prozess für die Zellen nicht toxisch ist. Für transiente Transfektionen wurde daher der Nucleofector™ von Amaxa verwendet, womit Effizienzen von 70 % nach 24 h erreicht wurden. Diese hohen Effizienzen bei THP-1 Zellen wurden auch von Martinet und Kollegen berichtet (Martinet et al. 2003).

THP-1 Zellen wiesen basal eine geringe LXR α Expression auf. Deshalb war es wegen der größeren Sensitivität einfacher, den "knock down" Effekt über die nachgeschalteten LXR α -abhängigen Transkripte, nämlich über die ABCA1 Expression, zu untersuchen. Es ist gut belegt, dass der Transkriptionsfaktor LXR α wesentlich für die Induktion von ABCA1 verantwortlich ist (Costet et al. 2000, Repa et al. 2000, Venkateswaran et al. 2000).

Mit stabil und transient LXR α siRNA transfizierten THP-1 Zellen konnte die Rolle des LXR α -Signaltransduktionsweges für den IL-10 Effekt auf die ABCA1 Expression belegt werden. LXR α siRNA transfizierte Zellen zeigten bereits eine verminderte basale Expression von ABCA1 im Vergleich zu Random siRNA Zellen. Wurden diese mit dem LXR α Liganden 22-OHC inkubiert, nahm die ABCA1 Transkription bei den Kontrollvektor-Zellen (Random siRNA), aber nicht bei LXR α siRNA Zellen (T10), deutlich zu. Behandelte man die "knock down" Zellen mit IL-10 für 24 h, war die ABCA1 Transkription bei Kontrollvektor-Zellen (Random siRNA) wie bei nicht

transfizierten ("Wildtyp-Zellen") THP-1 Zellen induzierbar, während die LXR α siRNA transfizierten Zellen (T10) keine Induktion zeigten.

Somit lässt sich sagen, dass die IL-10-bedingte ABCA1 Stimulation vom intakten LXR α -Signaltransduktionsweg abhängig war.

5.11 Mögliche medizinische Bedeutung der IL-10 Effekte auf die zelluläre Cholesterin-Homöostase

IL-10 spielt eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie mehrerer häufiger Erkrankungen. Mallat und Kollegen zeigten, dass IL-10 in fortgeschrittenen atherosklerotischen Plaques exprimiert wird und die lokale inflammatorische Reaktion dämpft und die Zellen vor exzessiver Apoptose schützen kann (Mallat et al. 1999b). IL-10 und CRP (C-reaktives Protein) Serumspiegel können als prognostische Parameter für Patienten mit akuten koronaren Symptomen herangezogen werden (Heeschen et al. 2003). Smith und Kollegen fanden bei Patienten mit instabiler Angina einen signifikant erniedrigten IL-10 Spiegel im Vergleich zu Patienten mit chronisch stabiler Angina (Smith et al. 2001).

In Tierexperimenten konnte die anti-atherogene Wirkung von IL-10 bereits bestätigt werden. Knochenmark-depletierte LDL-Rezeptor knock out (LDL-Rezeptor^{-/-}) Mäuse bekamen entweder Transplantatmark von Wildtyptieren oder von transgenen Mäusen (IL-10^{+/+}). Die Werte für Gesamtcholesterin, Triglyceriden und HDL-Cholesterin waren bei beiden Tiergruppen vergleichbar. Diejenigen Mäuse, die das Knochenmark von transgenen Tieren transplantiert bekommen hatten, zeigten nach 20 Wochen eine 47 %-ige Reduktion in der Läsionsgröße und eine 50-80 %-ige Reduktion in der Lipidakkumulation in der Aorta. Diese Studie zeigte, dass die Überexpression von IL-10 die Entstehung lipidreicher atherosklerotischer Läsionen in LDL-Rezeptor^{-/-} Mäusen reduziert (Pinderski et al. 2002). Umgekehrt fanden Caligiuri und Kollegen bei IL-10 Defizienz unter anderem erhöhte Marker für intravasale Koagulation und eine massive Zunahme der Läsionsgröße in Doppel-knock out Mäusen (ApoE^{-/-} x IL-10^{-/-}) (Caligiuri et al. 2003). Eine Reduktion der Atherosklerose durch systemischen und lokalen adenoviralen Transfer von IL-10 in LDL-Rezeptor^{-/-} Mäusen konnte in einer weiteren Arbeit gezeigt werden (Von Der Thusen et al. 2001).

Rekombinantes IL-10 steht in anderer Indikation, wie chronische Hepatitis C, wegen seiner anti-inflammatorischer Effekte in der klinischen Entwicklung (Nelson et al. 2003). In diesen Phase III-Studien zeigte es ein günstiges Risiko-Nutzen-Profil. Ob IL-10 selbst oder Substanzen, die seine endogene Bildung (Durez et al. 1999) stimulieren allerdings jemals Bedeutung für die Regression von arteriosklerotischen Läsionen erlangen werden, ist gegenwärtig nicht abzuschätzen.

6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Effekte von IL-10 auf monocytäre Lipidrezeptoren und -Transporter untersucht, die zusätzlich zu den anti-inflammatorischen Wirkungen von IL-10 für dessen anti-atherosklerotische Wirkung von Bedeutung sein könnten.

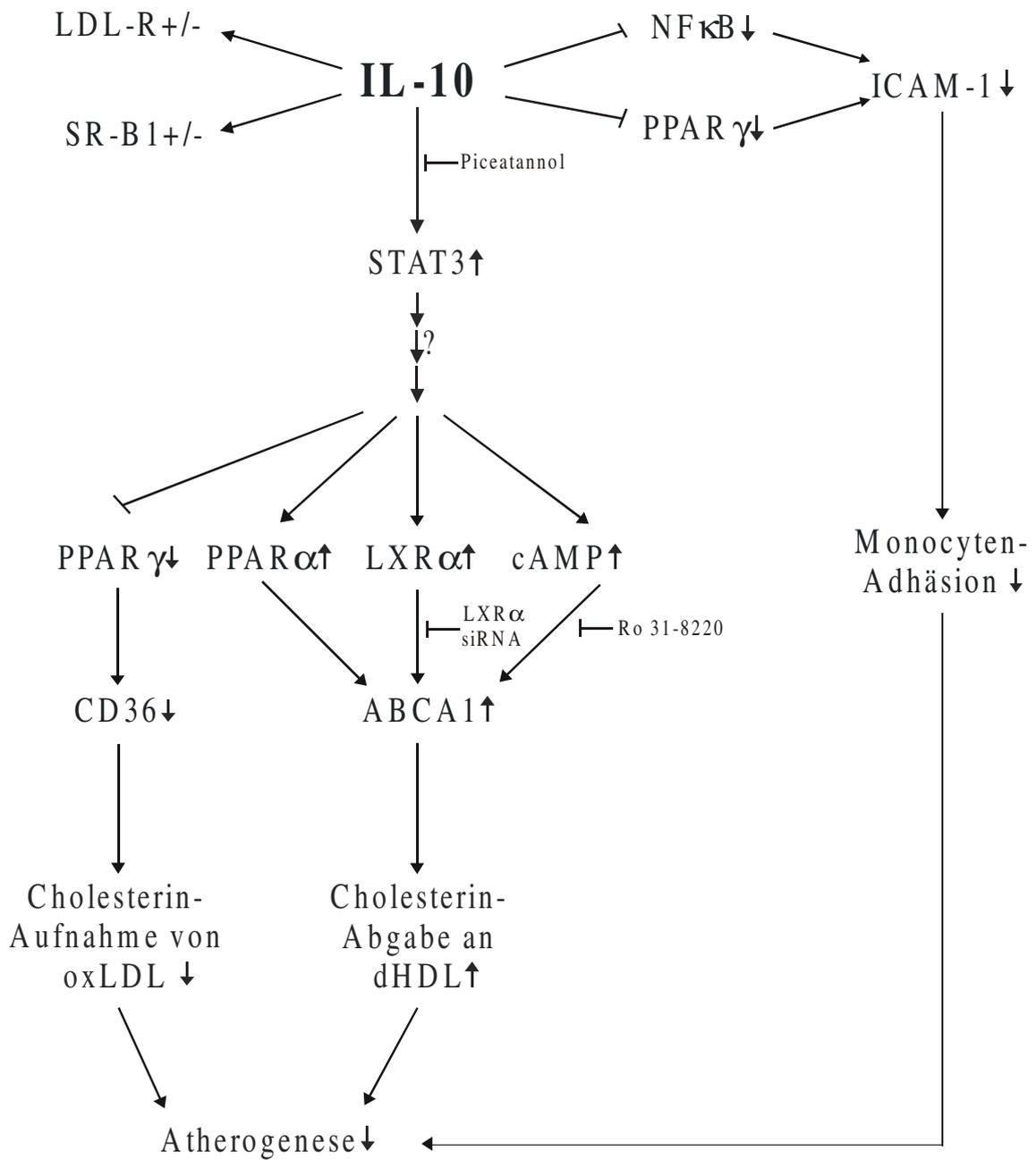
Es konnte gezeigt werden, dass IL-10 die Expression des quantitativ wichtigsten Scavenger Rezeptors, CD36, in Monocyten/Makrophagen sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene hemmt. Diese Hemmung ging einher mit einer verringerten zellulären Aufnahme von oxidiertem LDL. Durch PPAR γ -FACS und -Western Blot in Cytosol-Kern-Fractionen sowie Koinkubationen mit IL-10 und den PPAR γ -Agonisten 15d-PGJ₂ (15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J₂) und Indomethacin konnte gezeigt werden, dass die IL-10 Hemmung von CD36 über die Hemmung des Transkriptionsfaktors PPAR γ vermittelt wird.

Im Gegensatz dazu stimulierte IL-10 den Cholesterinexporter ABCA1 und dessen wichtigsten Transkriptionsfaktor LXR α auf RNA- und Proteinebene. Die Induktion von ABCA1 hatte funktionell einen verstärkten zellulären Cholesterinefflux zur Folge, welcher die Monocyten und Makrophagen vor Lipidakkumulationen schützte und das vermehrte Einschleusen von Cholesterin in den reversen Cholesterintransport ermöglicht. IL-10 stimulierte ABCA1 dabei trotz der Hemmung des Transkriptionsfaktor PPAR γ . Die IL-10 Stimulation von ABCA1 war durch Piceatannol, einem Inhibitor der proximalen, STAT3-vermittelten Signalübertragung des IL-10 Rezeptors, hemmbar. Mittels LXR α "knock down" Zellen konnte weiter gezeigt werden, dass für die IL-10-stimulierte ABCA1 Expression ein intakter LXR α -Signaltransduktionsweg nötig ist. Koinkubationen mit Fenofibrat, 9-cis RA (9-cis retinoic acid) und 22-OHC (22-Hydroxycholesterol) ergaben, dass IL-10 auch die Induktion von ABCA1 durch die beiden Transkriptionsfaktoren, PPAR α und LXR α , verstärkte. Durch Hemmung der Proteinkinase A (PKA) und Messung der zellulären cAMP-Spiegel konnte des Weiteren ein distaler cross-talk des IL-10-Signalweges mit dem cAMP/PKA-Weg für die ABCA1 Stimulation nachgewiesen werden.

Dagegen hatte IL-10 keinen anhaltenden Einfluss auf die Transkription von SR-BI. Der Scavenger Rezeptor BI (SR-BI) kann je nach Konzentrationsgradient sowohl die zelluläre Cholesterinaufnahme wie die Cholesterinabgabe vermitteln.

Des Weiteren reduzierte IL-10 die LPS-induzierte ICAM-1 Expression, was auf die Attenuierung der NF κ B- und PPAR γ -vermittelten ICAM-1 Expression zurückgeführt werden konnte.

Insgesamt befördert IL-10 somit den ABCA1-initiierten peripheren Cholesterinabtransport aus Monocyten/Makrophagen durch HDL. Die gezeigten Effekte von IL-10 erklären tierexperimentelle Befunde eines deutlich reduzierten Lipidgehalts in atherosklerotischen Plaques unter IL-10 Behandlung. Sie erklären auch die niedrigen HDL-Spiegel bei IL-10 knock out (IL-10^{-/-}) Mäusen, die durch exogene IL-10 Substitution korrigiert werden können. Demnach sollte IL-10 nicht nur durch seine anti-inflammatorischen Mechanismen, sondern auch durch seine Effekte auf das Cholesterinhandling von Monocyten/Makrophagen in der Gefäßwand die Entstehung und Progression atherosklerotischer Plaques reduzieren.



7 Literatur

- Abumrad, N. A., et al. (1993). "Cloning of a rat adipocyte membrane protein implicated in binding or transport of long-chain fatty acids that is induced during preadipocyte differentiation. Homology with human CD36." *J Biol Chem* 268(24): 17665-8.
- Acton, S., et al. (1996). "Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor." *Science* 271(5248): 518-20.
- Adachi, H., et al. (1997). "Expression cloning of a novel scavenger receptor from human endothelial cells." *J Biol Chem* 272(50): 31217-20.
- Aiello, R. J., et al. (2002). "Increased atherosclerosis in hyperlipidemic mice with inactivation of ABCA1 in macrophages." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22(4): 630-7.
- Alas, S. and B. Bonavida (2001). "Rituximab inactivates signal transducer and activation of transcription 3 (STAT3) activity in B-non-Hodgkin's lymphoma through inhibition of the interleukin 10 autocrine/paracrine loop and results in down-regulation of Bcl-2 and sensitization to cytotoxic drugs." *Cancer Res* 61(13): 5137-44.
- Alas, S. and B. Bonavida (2003). "Inhibition of constitutive STAT3 activity sensitizes resistant non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma to chemotherapeutic drug-mediated apoptosis." *Clin Cancer Res* 9(1): 316-26.
- Alaupovic, P. (1971). "Apolipoproteins and lipoproteins." *Atherosclerosis* 13(2): 141-6.
- Alksnis, M., et al. (1991). "High level expression of functional full length and truncated glucocorticoid receptor in Chinese hamster ovary cells. Demonstration of ligand-induced down-regulation of expressed receptor mRNA and protein." *J Biol Chem* 266(16): 10078-85.
- Altschul, S. F., et al. (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." *Nucleic Acids Res* 25(17): 3389-402.

- Applied, B. (1997). ABI PRISM 7700 Sequence Detection System User Bulletin #2.
- Arai, T., et al. (1995). "IL-10 is involved in the protective effect of dibutylryl cyclic adenosine monophosphate on endotoxin-induced inflammatory liver injury." *J Immunol* 155(12): 5743-9.
- Auboef, D., et al. (1997). "Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients." *Diabetes* 46(8): 1319-27.
- Berliner, J. A., et al. (1995). "Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics." *Circulation* 91(9): 2488-96.
- Bhakdi, S., et al. (1995). "On the pathogenesis of atherosclerosis: enzymatic transformation of human low density lipoprotein to an atherogenic moiety." *J Exp Med* 182(6): 1959-71.
- Blankenberg, S., et al. (2003). "Adhesion molecules and atherosclerosis." *Atherosclerosis* 170(2): 191-203.
- Bodzioch, M., et al. (1999). "The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease." *Nat Genet* 22(4): 347-51.
- Bonen, A., et al. (2000). "Acute regulation of fatty acid uptake involves the cellular redistribution of fatty acid translocase." *J Biol Chem* 275(19): 14501-8.
- Borst, P. and R. O. Elferink (2002). "Mammalian ABC transporters in health and disease." *Annu Rev Biochem* 71: 537-92.
- Bortnick, A. E., et al. (2000). "The correlation of ATP-binding cassette 1 mRNA levels with cholesterol efflux from various cell lines." *J Biol Chem* 275(37): 28634-40.
- Brooks-Wilson, A., et al. (1999). "Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency." *Nat Genet* 22(4): 336-45.
- Brown, M. S. and J. L. Goldstein (1986). "A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis." *Science* 232(4746): 34-47.
- Bustin, S. A. (2000). "Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays." *J Mol Endocrinol* 25(2): 169-93.

- Bustin, S. A., et al. (1999). "Detection of cytokeratins 19/20 and guanylyl cyclase C in peripheral blood of colorectal cancer patients." *Br J Cancer* 79(11-12): 1813-20.
- Caligiuri, G., et al. (2003). "Interleukin-10 deficiency increases atherosclerosis, thrombosis, and low-density lipoproteins in apolipoprotein E knockout mice." *Mol Med* 9(1-2): 10-7.
- Campbell, I. L., et al. (1989). "Intercellular adhesion molecule 1 is induced on isolated endocrine islet cells by cytokines but not by reovirus infection." *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(11): 4282-6.
- Chawla, A., et al. (2001). "A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis." *Mol Cell* 7(1): 161-71.
- Chen, N. G., et al. (1999). "PPARgamma agonists enhance human vascular endothelial adhesiveness by increasing ICAM-1 expression." *Biochem Biophys Res Commun* 263(3): 718-22.
- Chen, W., et al. (2000). "Scavenger receptor-BI inhibits ATP-binding cassette transporter 1- mediated cholesterol efflux in macrophages." *J Biol Chem* 275(40): 30794-800.
- Chinetti, G., et al. (2000). "CLA-1/SR-BI is expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferator-activated receptors." *Circulation* 101(20): 2411-7.
- Chinetti, G., et al. (2001). "PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway." *Nat Med* 7(1): 53-8.
- Chinetti, G., et al. (2003). "Peroxisome proliferator-activated receptor alpha reduces cholesterol esterification in macrophages." *Circ Res* 92(2): 212-7.
- Chisolm, G. M., 3rd, et al. (1999). "The oxidation of lipoproteins by monocytes-macrophages. Biochemical and biological mechanisms." *J Biol Chem* 274(37): 25959-62.
- Cho, B. H. (1983). "Improved enzymatic determination of total cholesterol in tissues." *Clin Chem* 29(1): 166-8.

- Clarke, C. J., et al. (1998). "IL-10-mediated suppression of TNF-alpha production is independent of its ability to inhibit NF kappa B activity." *Eur J Immunol* 28(5): 1719-26.
- Costet, P., et al. (2000). "Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor." *J Biol Chem* 275(36): 28240-5.
- Davies, M. J., et al. (1993). "The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis." *J Pathol* 171(3): 223-9.
- de La Llera-Moya, M., et al. (2001). "Scavenger receptor class B type I affects cholesterol homeostasis by magnifying cholesterol flux between cells and HDL." *J Lipid Res* 42(12): 1969-78.
- de Waal Malefyt, R. (2001). *IL-10. Cytokine Reference*, Academic Press.
- DiDonato, J. A., et al. (1997). "A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB." *Nature* 388(6642): 548-54.
- Ding, Y., et al. (2003). "Suppressor of cytokine signaling 1 inhibits IL-10-mediated immune responses." *J Immunol* 170(3): 1383-91.
- Donnelly, R. P., et al. (1999). "The interleukin-10 signal transduction pathway and regulation of gene expression in mononuclear phagocytes." *J Interferon Cytokine Res* 19(6): 563-73.
- Durez, P., et al. (1999). "Antiinflammatory properties of mycophenolate mofetil in murine endotoxemia: inhibition of TNF-alpha and upregulation of IL-10 release." *Int J Immunopharmacol* 21(9): 581-7.
- Dyxhoorn, D. M., et al. (2003). "Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression." *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(6): 457-67.
- Eigler, A., et al. (1998). "Anti-inflammatory activities of cAMP-elevating agents: enhancement of IL-10 synthesis and concurrent suppression of TNF production." *J Leukoc Biol* 63(1): 101-7.
- Endemann, G., et al. (1993). "CD36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein." *J Biol Chem* 268(16): 11811-6.

- Febbraio, M., et al. (2000). "Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD36 protects against atherosclerotic lesion development in mice." *J Clin Invest* 105(8): 1049-56.
- Fielding, C. J. and P. E. Fielding (1995). "Molecular physiology of reverse cholesterol transport." *J Lipid Res* 36(2): 211-28.
- Finbloom, D. S. and K. D. Winestock (1995). "IL-10 induces the tyrosine phosphorylation of tyk2 and Jak1 and the differential assembly of STAT1 alpha and STAT3 complexes in human T cells and monocytes." *J Immunol* 155(3): 1079-90.
- Fire, A., et al. (1991). "Production of antisense RNA leads to effective and specific inhibition of gene expression in *C. elegans* muscle." *Development* 113(2): 503-14.
- Fire, A., et al. (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." *Nature* 391(6669): 806-11.
- Folch, J., et al. (1957). "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues." *J Biol Chem* 226(1): 497-509.
- Forman, B. M., et al. (1997). "Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(9): 4312-7.
- Francis, G. A., et al. (1995). "Defective removal of cellular cholesterol and phospholipids by apolipoprotein A-I in Tangier Disease." *J Clin Invest* 96(1): 78-87.
- Fu, X., et al. (2001). "27-hydroxycholesterol is an endogenous ligand for liver X receptor in cholesterol-loaded cells." *J Biol Chem* 276(42): 38378-87.
- Gee, K., et al. (2002). "Differential regulation of CD44 expression by lipopolysaccharide (LPS) and TNF-alpha in human monocytic cells: distinct involvement of c-Jun N-terminal kinase in LPS-induced CD44 expression." *J Immunol* 169(10): 5660-72.
- Ghosh, S., et al. (1998). "NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses." *Annu Rev Immunol* 16: 225-60.

- Glomset, J. A. (1968). "The plasma lecithins:cholesterol acyltransferase reaction." *J Lipid Res* 9(2): 155-67.
- Goldstein, J. L. and M. S. Brown (1990). "Regulation of the mevalonate pathway." *Nature* 343(6257): 425-30.
- Gomez-Munoz, A., et al. (2000). "Stimulation of phospholipase D activity by oxidized LDL in mouse peritoneal macrophages." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(1): 135-43.
- Greenwalt, D. E., et al. (1992). "Membrane glycoprotein CD36: a review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine." *Blood* 80(5): 1105-15.
- Gut, M., et al. (1999). "One-tube fluorogenic reverse transcription-polymerase chain reaction for the quantitation of feline coronaviruses." *J Virol Methods* 77(1): 37-46.
- Haghighpassand, M., et al. (2001). "Monocyte/macrophage expression of ABCA1 has minimal contribution to plasma HDL levels." *J Clin Invest* 108(9): 1315-20.
- Hamilton, J. A., et al. (1999). "Oxidized LDL can induce macrophage survival, DNA synthesis, and enhanced proliferative response to CSF-1 and GM-CSF." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(1): 98-105.
- Hamon, Y., et al. (1997). "Interleukin-1beta secretion is impaired by inhibitors of the Atp binding cassette transporter, ABC1." *Blood* 90(8): 2911-5.
- Han, J., et al. (1997). "Native and modified low density lipoproteins increase the functional expression of the macrophage class B scavenger receptor, CD36." *J Biol Chem* 272(34): 21654-9.
- Harlan, L. a. (1992). Springer Verlag.
- Heeschen, C., et al. (2003). "Serum level of the antiinflammatory cytokine interleukin-10 is an important prognostic determinant in patients with acute coronary syndromes." *Circulation* 107(16): 2109-14.
- Ho, A. S., et al. (1995). "Functional regions of the mouse interleukin-10 receptor cytoplasmic domain." *Mol Cell Biol* 15(9): 5043-53.
- Hobbs, H. H. and D. J. Rader (1999). "ABC1: connecting yellow tonsils, neuropathy, and very low HDL." *J Clin Invest* 104(8): 1015-7.

- Horton, J. D., et al. (2002). "SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver." *J Clin Invest* 109(9): 1125-31.
- Huang, Y., et al. (1999a). "Oxidized LDL-containing immune complexes induce Fc gamma receptor I-mediated mitogen-activated protein kinase activation in THP-1 macrophages." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(7): 1600-7.
- Huang, Y., et al. (1999b). "Oxidized LDL stimulates matrix metalloproteinase-1 expression in human vascular endothelial cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(11): 2640-7.
- Huh, H. Y., et al. (1996). "Regulated expression of CD36 during monocyte-to-macrophage differentiation: potential role of CD36 in foam cell formation." *Blood* 87(5): 2020-8.
- Huo, Y. and K. Ley (2001). "Adhesion molecules and atherogenesis." *Acta Physiologica Scand* 173(1): 35-43.
- Ide, T., et al. (2003). "Cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and liver X receptor (LXR) in nutritional regulation of fatty acid metabolism. II. LXRs suppress lipid degradation gene promoters through inhibition of PPAR signaling." *Mol Endocrinol* 17(7): 1255-67.
- Janeway, C. (2001). *Immunology*, Garland Publisher.
- Janowski, B. A., et al. (1996). "An oxysterol signalling pathway mediated by the nuclear receptor LXR alpha." *Nature* 383(6602): 728-31.
- Jiang, C., et al. (1998). "PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines." *Nature* 391(6662): 82-6.
- Johnson-Tidey, R. R., et al. (1994). "Increase in the adhesion molecule P-selectin in endothelium overlying atherosclerotic plaques. Coexpression with intercellular adhesion molecule-1." *Am J Pathol* 144(5): 952-61.
- Jong, M. C., et al. (2000). "Oxidized VLDL induces less triglyceride accumulation in J774 macrophages than native VLDL due to an impaired extracellular lipolysis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(1): 144-51.
- Kambayashi, T., et al. (1995). "Cyclic nucleotide phosphodiesterase type IV participates in the regulation of IL-10 and in the subsequent inhibition of TNF-alpha and IL-6 release by endotoxin-stimulated macrophages." *J Immunol* 155(10): 4909-16.

- Kansas, G. S. (1996). "Selectins and their ligands: current concepts and controversies." *Blood* 88(9): 3259-87.
- Kasama, T., et al. (1995). "Interleukin-10 expression and chemokine regulation during the evolution of murine type II collagen-induced arthritis." *J Clin Invest* 95(6): 2868-76.
- Kastner, P., et al. (1995). "Nonsteroid nuclear receptors: what are genetic studies telling us about their role in real life?" *Cell* 83(6): 859-69.
- Kielar, D., et al. (2001). "Rapid quantification of human ABCA1 mRNA in various cell types and tissues by real-time reverse transcription-PCR." *Clin Chem* 47(12): 2089-97.
- Kim, J. M., et al. (1992). "Structure of the mouse IL-10 gene and chromosomal localization of the mouse and human genes." *J Immunol* 148(11): 3618-23.
- Kliwer, S. A., et al. (1995). "A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation." *Cell* 83(5): 813-9.
- Kliwer, S. A., et al. (1997). "Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(9): 4318-23.
- Kostner (1976). *Handbuch der Inneren Medizin*, Springer-Verlag.
- Krieger, M. (2001). "Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems." *J Clin Invest* 108(6): 793-7.
- Kronqvist, R., et al. (1999). "The effect of interleukin 1 beta on the biosynthesis of cholesterol, phosphatidylcholine, and sphingomyelin in fibroblasts, and on their efflux from cells to lipid-free apolipoprotein A-I." *Eur J Biochem* 262(3): 939-46.
- Kunjathoor, V. V., et al. (2002). "Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages." *J Biol Chem* 277(51): 49982-8.

- Langmann, T., et al. (1999). "Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter 1 (hABC1): evidence for sterol-dependent regulation in macrophages." *Biochem Biophys Res Commun* 257(1): 29-33.
- Lawn, R. M., et al. (1999). "The Tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway." *J Clin Invest* 104(8): R25-31.
- Lehmann, J. M., et al. (1995). "An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma)." *J Biol Chem* 270(22): 12953-6.
- Leonard, E. J. and T. Yoshimura (1990). "Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)." *Immunol Today* 11(3): 97-101.
- Li, Q. and I. M. Verma (2002a). "NF-kappaB regulation in the immune system." *Nat Rev Immunol* 2(10): 725-34.
- Li, W., et al. (1998). "OxLDL-induced macrophage cytotoxicity is mediated by lysosomal rupture and modified by intralysosomal redox-active iron." *Free Radic Res* 29(5): 389-98.
- Li, Y., et al. (2002b). "Induction of human liver X receptor alpha gene expression via an autoregulatory loop mechanism." *Mol Endocrinol* 16(3): 506-14.
- Liang, H. Q., et al. (1994). "Dissociation of lipid-free apolipoprotein A-I from high density lipoproteins." *J Lipid Res* 35(7): 1187-99.
- Liang, H. Q., et al. (1995). "Cycling of apolipoprotein A-I between lipid-associated and lipid-free pools." *Biochim Biophys Acta* 1257(1): 31-7.
- Libby, P. (2001). "Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes." *Circulation* 104(3): 365-72.
- Livak, K. J., et al. (1995). "Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization." *PCR Methods Appl* 4(6): 357-62.
- Look, D. C., et al. (1994). "Selective interaction of a subset of interferon-gamma response element-binding proteins with the intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) gene promoter controls the pattern of expression on epithelial cells." *J Biol Chem* 269(12): 8952-8.

- Lowry, O. H., et al. (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *J Biol Chem* 193(1): 265-75.
- Luciani, M. F., et al. (1994). "Cloning of two novel ABC transporters mapping on human chromosome 9." *Genomics* 21(1): 150-9.
- Lusis, A. J. (2000). "Atherosclerosis." *Nature* 407(6801): 233-41.
- Ma, W., et al. (2001). "The p38 mitogen-activated kinase pathway regulates the human interleukin-10 promoter via the activation of Sp1 transcription factor in lipopolysaccharide-stimulated human macrophages." *J Biol Chem* 276(17): 13664-74.
- Malerod, L., et al. (2002). "Oxysterol-activated LXRA/alpha/RXR induces hSR-BI-promoter activity in hepatoma cells and preadipocytes." *Biochem Biophys Res Commun* 299(5): 916-23.
- Malerod, L., et al. (2003). "Hepatic scavenger receptor class B, type I is stimulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma and hepatocyte nuclear factor 4alpha." *Biochem Biophys Res Commun* 305(3): 557-65.
- Mallat, Z., et al. (1999a). "Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis." *Circ Res* 85(8): e17-24.
- Mallat, Z., et al. (1999b). "Expression of interleukin-10 in advanced human atherosclerotic plaques: relation to inducible nitric oxide synthase expression and cell death." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(3): 611-6.
- Mangelsdorf, D. J. and R. M. Evans (1995). "The RXR heterodimers and orphan receptors." *Cell* 83(6): 841-50.
- Mansur, N. R., et al. (1993). "Cell cycle regulation of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase/uracil DNA glycosylase gene in normal human cells." *Nucleic Acids Res* 21(4): 993-8.
- Martens, J. S., et al. (1999). "A modification of apolipoprotein B accounts for most of the induction of macrophage growth by oxidized low density lipoprotein." *J Biol Chem* 274(16): 10903-10.
- Martinet, W., et al. (2003). "Nucleofection as an efficient nonviral transfection method for human monocytic cells." *Biotechnol Lett* 25(13): 1025-9.

- Marx, N., et al. (1999). "PPARgamma activation in human endothelial cells increases plasminogen activator inhibitor type-1 expression: PPARgamma as a potential mediator in vascular disease." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(3): 546-51.
- Marx, N., et al. (2000). "Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators inhibit IFN-gamma-induced expression of the T cell-active CXC chemokines IP-10, Mig, and I-TAC in human endothelial cells." *J Immunol* 164(12): 6503-8.
- Marx, N., et al. (2001). "PPARalpha Activators Inhibit Tissue Factor Expression and Activity in Human Monocytes." *Circulation* 103(2): 213-219.
- Marx, N., et al. (1998). "Macrophages in human atheroma contain PPARgamma: differentiation-dependent peroxisomal proliferator-activated receptor gamma(PPARgamma) expression and reduction of MMP-9 activity through PPARgamma activation in mononuclear phagocytes in vitro." *Am J Pathol* 153(1): 17-23.
- Matsumura, T., et al. (1999). "Cis-acting DNA elements of mouse granulocyte/macrophage colony-stimulating factor gene responsive to oxidized low density lipoprotein." *J Biol Chem* 274(53): 37665-72.
- McNeish, J., et al. (2000). "High density lipoprotein deficiency and foam cell accumulation in mice with targeted disruption of ATP-binding cassette transporter-1." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(8): 4245-50.
- Moore, K. J., et al. (1998). "In vitro-differentiated embryonic stem cell macrophages: a model system for studying atherosclerosis-associated macrophage functions." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18(10): 1647-54.
- Moore, K. W., et al. (2001). "Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor." *Annu Rev Immunol* 19: 683-765.
- Morrison, T. B., et al. (1998). "Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification." *Biotechniques* 24(6): 954-8, 960, 962.
- Mourrain, P., et al. (2000). "Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance." *Cell* 101(5): 533-42.

- Murao, K., et al. (1997). "Characterization of CLA-1, a human homologue of rodent scavenger receptor BI, as a receptor for high density lipoprotein and apoptotic thymocytes." *J Biol Chem* 272(28): 17551-7.
- Nagy, L., et al. (1998). "Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma." *Cell* 93(2): 229-40.
- Nakashima, Y., et al. (1998). "Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the ApoE-deficient mouse." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18(5): 842-51.
- Nelson, D. R., et al. (2003). "Long-term interleukin 10 therapy in chronic hepatitis C patients has a proviral and anti-inflammatory effect." *Hepatology* 38(4): 859-68.
- Nicholson, A. C., et al. (1995). "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." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 15(2): 269-75.
- Niemand, C., et al. (2003). "Activation of STAT3 by IL-6 and IL-10 in primary human macrophages is differentially modulated by suppressor of cytokine signaling 3." *J Immunol* 170(6): 3263-72.
- Nozaki, S., et al. (1995). "Reduced uptake of oxidized low density lipoproteins in monocyte-derived macrophages from CD36-deficient subjects." *J Clin Invest* 96(4): 1859-65.
- O'Brien, K. D., et al. (1993). "Vascular cell adhesion molecule-1 is expressed in human coronary atherosclerotic plaques. Implications for the mode of progression of advanced coronary atherosclerosis." *J Clin Invest* 92(2): 945-51.
- Oliver, W. R., Jr., et al. (2001). "A selective peroxisome proliferator-activated receptor delta agonist promotes reverse cholesterol transport." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(9): 5306-11.
- Oram, J. F. and R. M. Lawn (2001). "ABCA1. The gatekeeper for eliminating excess tissue cholesterol." *J Lipid Res* 42(8): 1173-9.
- Oram, J. F., et al. (2000). "ABCA1 is the cAMP-inducible apolipoprotein receptor that mediates cholesterol secretion from macrophages." *J Biol Chem* 275(44): 34508-11.

- Osborne, J. C., Jr. (1986). "Delipidation of plasma lipoproteins." *Methods Enzymol* 128: 213-22.
- Osterud, B. and E. Bjorklid (2003). "Role of monocytes in atherogenesis." *Physiol Rev* 83(4): 1069-112.
- Panousis, C. G., et al. (2001). "TGF-beta increases cholesterol efflux and ABC-1 expression in macrophage-derived foam cells: opposing the effects of IFN-gamma." *J Lipid Res* 42(5): 856-63.
- Panousis, C. G. and S. H. Zuckerman (2000). "Interferon-gamma induces downregulation of Tangier disease gene (ATP-binding-cassette transporter 1) in macrophage-derived foam cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(6): 1565-71.
- Pasceri, V., et al. (2000). "Modulation of vascular inflammation in vitro and in vivo by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators." *Circulation* 101(3): 235-8.
- Petit, L., et al. (1999). "Tissue factor pathway inhibitor is expressed by human monocyte-derived macrophages : relationship to tissue factor induction by cholesterol and oxidized LDL." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(2): 309-15.
- Pietsch, A., et al. (1996). "Lovastatin reduces expression of the combined adhesion and scavenger receptor CD36 in human monocytic cells." *Biochem Pharmacol* 52(3): 433-9.
- Pinderski, L. J., et al. (2002). "Overexpression of interleukin-10 by activated T lymphocytes inhibits atherosclerosis in LDL receptor-deficient Mice by altering lymphocyte and macrophage phenotypes." *Circ Res* 90(10): 1064-71.
- Pinderski Oslund, L. J., et al. (1999). "Interleukin-10 blocks atherosclerotic events in vitro and in vivo." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(12): 2847-53.
- Plat, J. and R. P. Mensink (2002). "Increased intestinal ABCA1 expression contributes to the decrease in cholesterol absorption after plant stanol consumption." *Faseb J* 16(10): 1248-53.
- Poston, R. N., et al. (1992). "Expression of intercellular adhesion molecule-1 in atherosclerotic plaques." *Am J Pathol* 140(3): 665-73.

- Quinn, M. T., et al. (1987). "Oxidatively modified low density lipoproteins: a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(9): 2995-8.
- Rajavashisth, T. B., et al. (1990). "Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins." *Nature* 344(6263): 254-7.
- Ramaswamy, G. and F. J. Slack (2002). "siRNA. A guide for RNA silencing." *Chem Biol* 9(10): 1053-5.
- Rawson, R. B. (2003). "The SREBP pathway--insights from *Insigs* and insects." *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(8): 631-40.
- Raychaudhuri, B., et al. (2000). "Interleukin 10 (IL-10)-mediated inhibition of inflammatory cytokine production by human alveolar macrophages." *Cytokine* 12(9): 1348-55.
- Repa, J. J., et al. (2000). "Regulation of absorption and ABC1-mediated efflux of cholesterol by RXR heterodimers." *Science* 289(5484): 1524-9.
- Ricote, M., et al. (1998a). "Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(13): 7614-9.
- Ricote, M., et al. (1998b). "The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation." *Nature* 391(6662): 79-82.
- Rigotti, A., et al. (1995). "The class B scavenger receptors SR-BI and CD36 are receptors for anionic phospholipids." *J Biol Chem* 270(27): 16221-4.
- Riley, J. K., et al. (1999). "Interleukin-10 receptor signaling through the JAK-STAT pathway. Requirement for two distinct receptor-derived signals for anti-inflammatory action." *J Biol Chem* 274(23): 16513-21.
- Romagnani, S. (2001). *TH1/TH2 Interleukins*. Cytokine Reference, Academic Press.
- Ross, R. (1995). "Cell biology of atherosclerosis." *Annu Rev Physiol* 57: 791-804.
- Ross, R. (1999). "Atherosclerosis--an inflammatory disease." *N Engl J Med* 340(2): 115-26.

- Rubic, T., et al. (2004). "Stimulation of CD36 and the key effector of reverse cholesterol transport ATP-binding cassette A1 in monocytoid cells by niacin." *Biochem Pharmacol* 67(3): 411-9.
- Rust, S., et al. (1999). "Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1." *Nat Genet* 22(4): 352-5.
- Sakai, M., et al. (1999). "Glucocorticoid inhibits oxidized LDL-induced macrophage growth by suppressing the expression of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19(7): 1726-33.
- Sasahara, T., et al. (1998). "Cholesterol transport between cells and high density lipoprotein subfractions from obese and lean subjects." *J Lipid Res* 39(3): 544-54.
- Sawamura, T., et al. (1997). "An endothelial receptor for oxidized low-density lipoprotein." *Nature* 386(6620): 73-7.
- Scheitke, R., et al. (1997). "Acetylated LDL endocytosis by the human monocytic Mono Mac 6sr cells is not mediated by the macrophage type I and II scavenger receptors." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17(6): 1024-31.
- Schoonjans, K. and J. Auwerx (2000). "Thiazolidinediones: an update." *Lancet* 355(9208): 1008-10.
- Schulz, T., et al. (1995). "Preserved antioxidative defense of lipoproteins in renal failure and during hemodialysis." *Am J Kidney Dis* 25(4): 564-71.
- Schwartz, K., et al. (2000). "ABC1 gene expression and ApoA-I-mediated cholesterol efflux are regulated by LXR." *Biochem Biophys Res Commun* 274(3): 794-802.
- See, R. H., et al. (2002). "Protein kinase A site-specific phosphorylation regulates ATP-binding cassette A1 (ABCA1)-mediated phospholipid efflux." *J Biol Chem* 277(44): 41835-42.
- Shibata, T., et al. (2002). "15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2. A prostaglandin D2 metabolite generated during inflammatory processes." *J Biol Chem* 277(12): 10459-66.
- Simmons, D., et al. (1988). "ICAM, an adhesion ligand of LFA-1, is homologous to the neural cell adhesion molecule NCAM." *Nature* 331(6157): 624-7.

- Simons, K. and E. Ikonen (2000). "How cells handle cholesterol." *Science* 290(5497): 1721-6.
- Singaraja, R. R., et al. (2001). "Human ABCA1 BAC transgenic mice show increased high density lipoprotein cholesterol and ApoAI-dependent efflux stimulated by an internal promoter containing liver X receptor response elements in intron 1." *J Biol Chem* 276(36): 33969-79.
- Smith, D. A., et al. (2001). "Serum levels of the antiinflammatory cytokine interleukin-10 are decreased in patients with unstable angina." *Circulation* 104(7): 746-9.
- Song, S., et al. (1997). "Interleukin-10 inhibits interferon-gamma-induced intercellular adhesion molecule-1 gene transcription in human monocytes." *Blood* 89(12): 4461-9.
- Spanakis, E. (1993). "Problems related to the interpretation of autoradiographic data on gene expression using common constitutive transcripts as controls." *Nucleic Acids Res* 21(16): 3809-19.
- Staels, B., et al. (1998). "Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators." *Nature* 393(6687): 790-3.
- Stein, O., et al. (2002). "Is there a genetic basis for resistance to atherosclerosis?" *Atherosclerosis* 160(1): 1-10.
- Steinberg, D. (1997). "Lewis A. Conner Memorial Lecture. Oxidative modification of LDL and atherogenesis." *Circulation* 95(4): 1062-71.
- Steinberg, D., et al. (1989). "Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity." *N Engl J Med* 320(14): 915-24.
- Steinbrecher, U. P. (1999). "Receptors for oxidized low density lipoprotein." *Biochim Biophys Acta* 1436(3): 279-98.
- Stengel, D., et al. (1998). "Inhibition of LPL expression in human monocyte-derived macrophages is dependent on LDL oxidation state: a key role for lysophosphatidylcholine." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18(7): 1172-80.
- Su, L. and M. David (2000). "Distinct mechanisms of STAT phosphorylation via the interferon-alpha/beta receptor. Selective inhibition of STAT3 and STAT5 by piceatannol." *J Biol Chem* 275(17): 12661-6.

- Sviridov, D. and P. Nestel (2002). "Dynamics of reverse cholesterol transport: protection against atherosclerosis." *Atherosclerosis* 161(2): 245-54.
- Tabara, H., et al. (1999). "The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*." *Cell* 99(2): 123-32.
- Takashiba, S., et al. (1999). "Differentiation of monocytes to macrophages primes cells for lipopolysaccharide stimulation via accumulation of cytoplasmic nuclear factor kappaB." *Infect Immun* 67(11): 5573-8.
- Tanaka, Y., et al. (1996). "Effect of IL-10 on collagen-induced arthritis in mice." *Inflamm Res* 45(6): 283-8.
- Tatusova, T. A. and T. L. Madden (1999). "BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences." *FEMS Microbiol Lett* 174(2): 247-50.
- Temel, R. E., et al. (1997). "Scavenger receptor class B, type I (SR-BI) is the major route for the delivery of high density lipoprotein cholesterol to the steroidogenic pathway in cultured mouse adrenocortical cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(25): 13600-5.
- Tontonoz, P., et al. (1994). "Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor." *Cell* 79(7): 1147-56.
- Tontonoz, P., et al. (1998). "PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL." *Cell* 93(2): 241-52.
- Tyagi, S. and F. R. Kramer (1996). "Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization." *Nat Biotechnol* 14(3): 303-8.
- van der Poll, T., et al. (1995). "Endogenous IL-10 protects mice from death during septic peritonitis." *J Immunol* 155(11): 5397-401.
- van Eck, M., et al. (2002). "Leukocyte ABCA1 controls susceptibility to atherosclerosis and macrophage recruitment into tissues." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(9): 6298-303.
- Van Laethem, J. L., et al. (1995). "Interleukin 10 prevents necrosis in murine experimental acute pancreatitis." *Gastroenterology* 108(6): 1917-22.
- Venkateswaran, A., et al. (2000). "Control of cellular cholesterol efflux by the nuclear oxysterol receptor LXR alpha." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(22): 12097-102.

- Verma, I. M., et al. (1995). "Rel/NF-kappa B/I kappa B family: intimate tales of association and dissociation." *Genes Dev* 9(22): 2723-35.
- Von Der Thusen, J. H., et al. (2001). "Attenuation of atherogenesis by systemic and local adenovirus-mediated gene transfer of interleukin-10 in LDLr^{-/-} mice." *Faseb J* 15(14): 2730-2.
- Voraberger, G., et al. (1991). "Cloning of the human gene for intercellular adhesion molecule 1 and analysis of its 5'-regulatory region. Induction by cytokines and phorbol ester." *J Immunol* 147(8): 2777-86.
- Wang, P., et al. (1995). "Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor kappa B (NF kappa B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms." *J Biol Chem* 270(16): 9558-63.
- Wang, X., et al. (1999). "Induced expression of adipophilin mRNA in human macrophages stimulated with oxidized low-density lipoprotein and in atherosclerotic lesions." *FEBS Lett* 462(1-2): 145-50.
- Watson, A. D., et al. (1997). "Structural identification by mass spectrometry of oxidized phospholipids in minimally oxidized low density lipoprotein that induce monocyte/endothelial interactions and evidence for their presence in vivo." *J Biol Chem* 272(21): 13597-607.
- Wawryk, S. O., et al. (1991). "Isolation and characterization of the promoter region of the human intercellular adhesion molecule-1 gene." *Int Immunol* 3(1): 83-93.
- Whitney, K. D., et al. (2001). "Liver X receptor (LXR) regulation of the LXRA gene in human macrophages." *J Biol Chem* 276(47): 43509-15.
- Wilcox, J. N., et al. (1989). "Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque." *Proc Natl Acad Sci U S A* 86(8): 2839-43.
- Willy, P. J., et al. (1995). "LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway." *Genes Dev* 9(9): 1033-45.
- Wittwer, C. T., et al. (1997). "Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification." *Biotechniques* 22(1): 130-1, 134-8.
- Witztum, J. L. and D. Steinberg (1991). "Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis." *J Clin Invest* 88(6): 1785-92.

- Yancey, P. G., et al. (2003). "Importance of different pathways of cellular cholesterol efflux." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(5): 712-9.
- Yancey, P. G., et al. (2004). "In vivo modulation of HDL phospholipid has opposing effects on SR-BI- and ABCA1-mediated cholesterol efflux." *J Lipid Res* 45(2): 337-46.
- Yoshikawa, T., et al. (2003). "Cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and liver X receptor (LXR) in nutritional regulation of fatty acid metabolism. I. PPARs suppress sterol regulatory element binding protein-1c promoter through inhibition of LXR signaling." *Mol Endocrinol* 17(7): 1240-54.
- Zamore, P. D. (2001). "RNA interference: listening to the sound of silence." *Nat Struct Biol* 8(9): 746-50.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den Personen danken, die zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt dabei Herrn Prof. Dr. Reinhard L. Lorenz, der mir das Thema überlassen hat, mir bei der Umsetzung mit hilfreichen und wertvollen Ideen und Diskussionen zur Seite stand und mir viel Freiraum für meine eigenen Ideen gab.

Herrn Prof. Dr. Peter C. Weber danke ich für die Aufnahme in sein Institut, sein Interesse an meiner Arbeit und seine ständige Unterstützung.

Für die Aufnahme in das Graduierten-Kolleg (GRK 438) und die Gewährung eines Promotionsstipendiums über drei Jahre möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Wolfgang Siess bedanken.

Beim Erlernen der RNA interference Methode stand mir Frau Dr. Vera Krump-Konvalinkova mit viel Rat zur Seite. Außerdem möchte ich mich für die Bereitstellung der *E.coli* Bakterien und der verwendeten Vektoren bedanken.

Dorothea Strobach, Christian Johannes und Claudia Vosseler danke ich ganz besonders für die regen Diskussionen, für die vielen lustigen Stunden, die wir innerhalb und außerhalb des Institutes hatten, und ihre Freundschaften.

Bei Brigitte Zimmer und Diana Wagner bedanke ich mich für ihre hervorragende technische Unterstützung und ihre Bereitschaft, mit mir neue Methoden und Versuche auszuprobieren.

Des Weiteren möchte ich mich herzlich bei den "GRK-Mädels" Melanie Antl, Anja Trapp, Simone Blattner und Kathrin Schürzinger für die lustigen, unterhaltsamen und lehrreichen Stunden während und nach dem Graduierten-Kolleg und ihre Freundschaften bedanken.

Ich möchte mich auch bei allen Kollegen aus meiner Arbeitsgruppe und dem ganzen Institut für die nette Arbeitsatmosphäre und ihre Hilfsbereitschaft bedanken.

Meinem Freund Martin Schneider danke ich für seine liebevolle Unterstützung und Geduld während meiner Arbeit (mit allen Höhen und Tiefen), für sein stets offenes Ohr und vieles mehr.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern und meinen beiden Brüdern, die mich stets unterstützt und immer an mich geglaubt haben (Puno vam hvala!).

Publikationsliste

1. Originalarbeiten

Jostarndt K., Gellert N., **Rubic T.**, Weber C., Kuhn H., Johansen B., Hrboticky N., Neuzil J.. Dissociation of apoptosis induction and CD36 upregulation by enzymatically modified low-density lipoprotein in monocytic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002, 290(3):988-993.

T. Rubic, M. Trottmann and R.L. Lorenz. Stimulation of CD36 and the key effector of reverse cholesterol transport ATP-binding cassette A1 in monocytoid cells by niacin. *Biochem Pharmacol* 2004, 67(3):411-419.

Jostarndt K., **Rubic T.**, Kuhn H., Anthosen M.W., Andera L., Gellert N., Trottmann M., Weber C., Johansen B., Hrboticky N. and Neuzil J.. Enzymatically modified low-density lipoprotein upregulates CD36 in low-differentiated monocytic cells in a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-dependent way. *Biochem Pharmacol* 2004, 67(5):841-54.

V. Krump-Konvalinkova, S. Yasuda, **T. Rubic**, N. Makarova, J. Mages, W. Erl, C. Vosseler, C.J. Kirkpatrick, G. Tigyi and W. Siess. Stable knock-down of the sphingosine 1-phosphate receptor S1P₁ influences multiple functions of human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, im Druck 2004.

T. Rubic and R.L. Lorenz. Stimulation of ABCA1 and macrophage cholesterol efflux as a new anti-atherosclerotic mechanism of IL-10. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, eingereicht 2004.

2. Abstracts

a) Poster

T. Rubic, M. Trottmann and R.L. Lorenz. Niacin stimulates the transcription of PPAR γ and of the key effectors of reverse cholesterol transport, CD36 and ABCA1; 9th Annual Scandinavian Atherosclerosis Conference, Kopenhagen, Dänemark 22.-25. Mai 2003.

Tina Rubic, Matthias Trottmann and Reinhard L. Lorenz. Niacin stimulates the transcription of reverse cholesterol transporter ABCA1 in endothelial and monocytoid cells. 4th Symposium on the Biology of Endothelial Cells, München, 18.-20. Juli 2003. *Angiogenesis* 2003, 5(4):275-280; Jan 2002.

Tina Rubic, Matthias Trottmann and Reinhard L. Lorenz. Niacin stimulates CD36 and the key effector of reverse cholesterol transport ABCA1 in monocytoid and endothelial cells. Gesellschaft für Mikrozirkulation und Vaskuläre Biologie e.V., München, 16.-18. Oktober 2003. *J Vas Res* 2004, 41:91-120.

V. Krump-Konvalinkova, **T. Rubic**, C. Vosseler, W. Erl, S. Yasuda, G. Tigyi, J.C. Kirkpatrick and W. Siess. Multiple functions of the sphingosine 1-phosphate receptor S1P₁ in endothelial cells. Annual Meeting of the Gesellschaft für Mikrozirkulation und Vaskuläre Biologie e.V., München, 16.-18. Oktober 2003. *J Vas Res* 2004, 41:91-120.

Vera Krump-Konvalinkova, **Tina Rubic**, Claudia Vosseler, Wolfgang Erl, Satoshi Yasuda, Gabor Tigyi, Charles James Kirkpatrick and Wolfgang Siess. Multiple functions of the sphingosine 1-phosphate receptor S1P₁ in endothelial cells. XIII International Vascular Biology Meeting, Toronto, Canada, 01.-05. Juni 2004. *Cardiovasc Path* 2004, 13:S17-S79.

C. Johannes, **T. Rubic** and R. Lorenz. Preparation and identification of pure and ¹⁸O₂-labeled oxidation products from the phytosterols β-sitosterol and stigmasterol. 27th European Lipoprotein Club Meeting, Tutzing, 06.-09. September 2004. Wird in *Atherosclerosis* publiziert.

b) Vorträge

Tina Rubic and Reinhard L. Lorenz. Effects of the anti-inflammatory cytokine IL-10 on the regulation of cholesterol transporters in monocytes. Status-Seminare des Graduierten-Kollegs „Vaskuläre Biologie in der Medizin“ (GK 438), 05./06. Oktober 2002 und 29. März 2003, München.

Tina Rubic, Matthias Trottmann and Reinhard L. Lorenz. Niacin stimulates the PPAR γ - and cAMP-dependent transcription of the key effectors of reverse cholesterol

transport, CD36 and ABCA1. 26th European Lipoprotein Club Meeting, Tutzing, 08.-11. September 2003. *Atherosclerosis* 2004, 173:125-134.

Curriculum vitae

Name: Tina Rubic

Geburtsdatum/-ort: 22.10.1975 in Split, Kroatien

Staatsangehörigkeit: kroatisch

Familienstand: ledig

Konfession: rk

Beruf: Diplom-Biologin

Eltern: Nediljko Rubic und Ivanka Rubic, geb. Maslov

Geschwister: Denis und Mario

Bildungsgang:

09/1982 - 07/1986	Grundschule Baienfurt
09/1986 - 07/1995	Gymnasium Weingarten
09/1982 - 07/1993	gleichzeitig jugoslawische bzw. kroatische Schule in Weingarten
10/1995 - 06/2000	Biologiestudium an der Universität Konstanz
seit 10/2000	Dissertation am Institut für Epidemiologie und Prophylaxe der Kreislaufkrankheiten, LMU München, bei Prof. Dr. R.L. Lorenz
	06/2004 Abgabe der Dissertation
10/2000 - 10/2003	Kollegiatin im Graduiertenkolleg GRK 438 (Vaskuläre Biologie in der Medizin)
seit 01/2004	Wissenschaftliche Mitarbeiterin bei Prof. Dr. R.L. Lorenz, DFG-Forschungsprojekt "Lipide und Phytosterole in der Ernährung"