

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

Bedeutung von Peroxisome Proliferator-Activated Rezeptor  $\gamma$   
für die Expression atherogener Scavengerrezeptoren auf Makrophagen  
und Interaktionen mit Insulin

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

vorgelegt von

Ralph Kleinhans

aus München

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

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

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. C. Keller  
PD Dr. med. P. Fraunberger

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

Tag der mündlichen Prüfung: 20.01.2005

## A Inhaltsverzeichnis

A Inhaltsverzeichnis.....	3
B Abkürzungen.....	6
1 Einleitung.....	8
2 Grundlagen.....	9
2.1 Mechanismen der Atherogenese.....	9
2.2 Scavenger-Rezeptoren.....	10
2.2.1 Scavenger Rezeptoren Klasse A Typ I und II.....	12
2.2.2 Scavenger Rezeptoren der Klasse B.....	14
2.2.2.1 CD 36.....	14
2.2.2.2 SR-B1.....	15
2.2.3 LOX-1.....	16
2.3 Reverser Cholesteroltransport.....	18
2.3.1 Adenosine Triphosphate-Binding Cassette Transporter 1 (ABCA 1).....	19
2.4 Die monozytäre Zelllinie MM6 sr.....	23
2.5 Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR).....	24
2.5.1 PPAR $\alpha$ .....	25
2.5.2 PPAR $\gamma$ .....	25
2.5.3 PPAR Liganden.....	26
2.5.3.1 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J <sub>2</sub> .....	28
2.5.3.2 Nichtsteriodale Antiphlogistica (NSAR).....	29
2.5.3.3 Thiazolidindione.....	30
2.5.4 RXR- Rezeptor.....	32
2.6 PPAR abhängige Prozesse.....	33
2.6.1 Differenzierung von Adipozyten.....	33
2.6.2 Rolle von PPAR bei der Atherogenese.....	33
3 Fragestellungen.....	37
4 Material und Methoden.....	38
4.1 Material.....	38
4.1.1 Geräte.....	38
4.1.2 Chemikalien.....	39
4.1.3 Antikörper.....	41
4.1.4 Zellkulturmedien.....	41
4.1.5 Puffer und Lösungen für die RNA-Isolierung und PCR.....	41
4.1.6 HPLC-Laufmittel.....	42
4.1.7 Weitere Puffer und Lösungen.....	42
4.2 Methoden.....	43
4.2.1 Kultur monozytärer Zelllinien.....	43
4.2.2 Präparation und Markierung von LDL.....	44
4.2.3 Durchflusszytometrie.....	45
4.2.3.1 Annexin V Assays.....	46

4.2.3.2	Messung der CD 36- Oberflächenexpression.....	48
4.2.3.3	Messung der intrazellulären PPAR $\gamma$ - Expression.....	49
4.2.3.4	Doppelfärbung Annexin V / CD 36 - Oberflächenexpression.....	49
4.2.3.5	Messung der Aufnahme von oxLDL .....	50
4.2.4	Immunfluoreszenzmikroskopie .....	50
4.2.5	mRNA- Isolierung .....	51
4.2.6	Behandlung der RNA mit DNase.....	53
4.2.7	Quantitative RT-PCR.....	53
4.2.7.1	Reverse Transkription .....	53
4.2.7.2	PCR.....	54
4.2.7.3	HPLC der Amplifikate .....	57
4.2.7.4	Qualitative Analyse von PCR-Produkten .....	59
4.2.7.5	Festlegung der optimalen Zyklenzahl für die Messung der Amplifikate ..	59
4.2.8	Statistische Auswertung .....	62
5	Ergebnisse.....	63
5.1	PPAR $\gamma$ - Expression .....	63
5.1.1	Intrazelluläre PPAR $\gamma$ - Expression.....	63
5.1.2	Intrazelluläre Lokalisation von PPAR $\gamma$ .....	66
5.2	Scavengerrezeptorexpression.....	69
5.2.1	Zeit- und Dosisabhängigkeit der CD 36- Oberflächenexpression .....	69
5.2.2	Untersuchungen auf RNA- Ebene .....	72
5.3	Zelluläre Aufnahme von markiertem oxLDL .....	75
5.4	Expression des Cholesterinexporters ABCA 1 .....	77
5.5	Induktion von Apoptose durch PPAR $\gamma$ .....	78
5.6	Regulation von PPAR $\gamma$ – Liganden und Costimulatoren .....	80
5.6.1	Der RXR- Ligand Methoprene .....	80
5.6.2	Vergleich verschiedener NSAR .....	82
5.6.3	Effekte von Rosiglitazon auf MM6 sr Zellen.....	83
5.6.4	Einfluss von Insulin.....	84
5.6.4.1	Insulin und CD 36- Oberflächenexpression .....	85
5.6.4.2	Insulin und PPAR $\gamma$ - Expression in Makrophagen.....	88
5.6.4.3	CD 36- / Annexin- Doppelfärbung.....	92
5.6.4.4	Abhängigkeit der Apoptose und der CD 36- Expression von der Insulinkonzentration.....	95
5.6.4.5	Neuberechnung der Ergebnisse durch die Einführung eines „life-gates“	98
6	Diskussion .....	100
6.1	Nichtsteroidale Antirheumatika sind Liganden von PPAR $\gamma$ .....	100
6.1.1	Nichtsteroidale Antirheumatika beeinflussen die Expression von PPAR $\gamma$ .....	101
6.1.2	Nichtsteroidale Antirheumatika erhöhen die Expression verschiedener Scavengerrezeptoren.....	102
6.1.2.1	CD 36- Expression .....	102
6.1.2.2	Einfluss auf die mRNA-Transkription weiterer Scavengerrezeptoren ..	104
6.1.3	LDL- Rezeptor-Expression .....	105
6.2	Wirkung von PPAR $\gamma$ auf die Cholesterinaufnahme .....	106

6.3	Rolle von RXR.....	108
6.4	Interaktionen von Insulin mit PPAR $\gamma$ .....	109
6.4.1	Einfluss von Insulin auf die CD 36- Expression .....	109
6.4.2	Signaltransduktion von Insulin .....	110
6.4.3	Einfluss von Insulin auf die Expression von PPAR $\gamma$ .....	111
6.4.4	Metabolismus von PPAR $\gamma$ .....	112
6.4.5	Insulin wirkt antiapoptitisch .....	113
6.4.6	Interaktionen von Insulin mit PPAR $\gamma$ .....	114
6.4.7	Pathophysiologische und pharmakologische Bedeutung der Ergebnisse .....	115
6.5	Bedeutung von PPAR $\gamma$ für die Arteriosklerose .....	117
6.5.1	Befunde an in-vitro Modellen .....	117
6.5.2	Tierexperimentelle Befunde zu PPAR $\gamma$ und Arteriosklerose .....	119
6.5.3	Klinische Daten zu PPAR $\gamma$ und Arteriosklerose .....	120
7	Zusammenfassung .....	122
8	Literaturverzeichnis.....	125
C	Anhang.....	140
	Danksagung.....	141
	Lebenslauf .....	142

## B Abkürzungen

' , min	Minuten
" , sec	Sekunden
ABCA 1	ATP-binding Cassette Transporter A1
acLDL	acetyliertes LDL
Ak	Antikörper
AU	Area-units, Flächeneinheiten
BSA	bovines Serum Albumin
bp	Basenpaare
CD	cluster of differentiation; Oberflächenmarker
cDNA	komplementäre DNA
CLA-1	CD 36 and LIMP II Analogous -1
DEAE	Diethylaminoethyl
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dil	1,1`-Dioctadecyl-3,3,3`,3`-Tetramethylindocarbocyanin Perchlorat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintertaacetat
Et-Br	Ethidium Bromid
FACS	Fluorescence activated cell scanner; Durchflusszytometer
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FSC	forward-scatter
HBSS	Hanks´ Balanced Salt Solution
Hepes	N-(2-Hydroxyethyl) Piperazin-N-(2-Ethansulfonsäure)
HDL	high density lipoprotein
HODE	Hydroxyoctadecadienoic acid
HPLC	high performance liquid chromatography
HS	Human Serum
Ig	Immun-Globulin (z.B. IgG: Typ G)
Ko	Kontrolle
l	Liter
LCAT	Lecitin-Cholesterol-Acyl-Transferase
LDL	low density lipoprotein
LDL-R	LDL-Rezeptor
LOX-1	Lectin like receptor for oxLDL

LPS	Lipopolysaccharid
LXR	Liver X-Receptor
M-MLV	reverse Transkriptase aus Mäuse-Leukämie Virus
MM6	Mono Mac 6, monozytoide Zelllinie
mRNA	messenger-RNA
NEAA	non essential amino acids
NSAR	nicht-steroidale Antirheumatika (NSAID)
oxLDL	oxidiertes LDL
p.A.	Reinheitsgrad: zur Analyse
PBS	Phosphatpuffer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
PFA	Paraformaldehyd
PGJ2	15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J2
PPAR $\alpha$	Peroxisome proliferator activated receptor $\alpha$
PPAR $\gamma$	Peroxisome proliferator activated receptor $\gamma$
PPRE	PPAR responsive element
RH	Random Hexamer (pd(N) <sub>6</sub> )
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute Medium 1640
RT	Raumtemperatur, reverse Transkription
RT-PCR	reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion
RXR	Retinol-X-Rezeptor
SR	Scavenger Rezeptor
SR-A I/II	Scavenger Receptor Klasse A Typ I und II
SD	Standardabweichung
SMFI	spezifische mittlere Fluoreszenz-Intensität
SR-B1	Scavenger Receptor Klasse B Typ 1
SREBP	Sterol regulatory element –binding protein
SSC	Sideward-scatter
Taq	Thermophilus aquaticus
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-amino-methane, hydrochloride
TZD	Thiazolodindion
VLDL	Very low density lipoprotein

## 1 Einleitung

Arteriosklerotische Gefäßwandveränderungen sind die Hauptursache von koronarer Herzkrankheit und Schlaganfällen und damit verantwortlich für etwa 50 % der Todesfälle in der westlichen Welt<sup>100</sup>. Zur komplexen Pathogenese der Arteriosklerose tragen eine Vielzahl von Faktoren bei. Arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Adipositas, erhöhte Serumspiegel von LDL und VLDL<sup>6</sup> und ein vermindertes Serum-HDL<sup>60</sup>, erhöhtes Lipoprotein (a)<sup>83</sup>, ein erhöhter Homocysteinspiegel<sup>57</sup>, positive Familienanamnese<sup>99</sup>, chronische Depression<sup>58</sup>, männliches Geschlecht<sup>116</sup>, entzündliche Systemerkrankungen<sup>84</sup> sowie das Metabolische Syndrom<sup>99</sup> sind auch erblich beeinflusste Risikoindikatoren. Fett- und cholesterinreiche Ernährungsweise, Rauchen und mangelnde körperliche Aktivität<sup>6</sup> sind etablierte peristatische, nicht erbliche Risikoindikatoren. Der wichtigste unter den kausal belegten Risikofaktoren scheint eine Erhöhung des LDL-Cholesterins zu sein. Es ist jedoch unmöglich, einen unteren Grenzwert für das Serumcholesterin anzugeben, ab dem die Arteriosklerose praktisch nicht mehr auftritt<sup>153</sup>.

Nach der „Response to injury – Hypothese“ führen diese Risikofaktoren zunächst zu einer endothelialen Dysfunktion, die mit einer veränderten Vasodilatation, veränderten Adhäsionseigenschaften für Entzündungszellen, veränderter Permeabilität, verändertem Gerinnungsverhalten und Produktion von Zytokinen und Wachstumsfaktoren einhergeht<sup>139</sup>. Im Rahmen dieser Reaktion kommt es zu vermehrter Monozyteneinwanderung in die Gefäßwand und durch Cholesterinaufnahme in die aus den Monozyten entstehenden Makrophagen zur Schaumzellbildung.

In dieser Arbeit sollte ein Aspekt in der Entwicklung und Progression atherosklerotischer Läsionen untersucht werden, die Regulation der Expression von Scavengerrezeptoren durch den Transkriptionsfaktor PPAR  $\gamma$  und Insulin.

## 2 Grundlagen

### 2.1 Mechanismen der Atherogenese

Die Arteriosklerose ist eine chronische Erkrankung der Arterien, die morphologisch durch die vermehrte Einlagerung von Lipiden, vermehrte Einwanderung von Entzündungszellen, Proliferation von Zellen und fibrotischen Umbau der Gefäßwand charakterisiert ist. Die atherosklerotischen Gefäßveränderungen entstehen langsam fortschreitend über mehrere Stadien. Erste Veränderungen werden im Bereich der Aorta bereits im ersten Lebensjahrzehnt gefunden. Prädilektionsstellen sind Orte erhöhter strömungsdynamischer mechanischer Belastung.

Besonders hier kommt es bei erhöhten Serum-LDL-Spiegeln durch passive Diffusion zum vermehrten Eindringen von LDL in den Bereich der subendothelialen Matrix der Intima, wo es durch Interaktion seines Apoproteins B mit den Proteoglykanen der Matrix zurückgehalten wird<sup>22</sup>. Hier können mehrere chemische Modifikationen des LDL stattfinden: Lipolyse, Proteolyse, Aggregation und Oxidationsvorgänge. Bedeutend unter den oxidierend wirkenden Metaboliten scheinen Produkte der 12/15-Lipoxygenase (z.B. HPETE) zu sein<sup>37</sup>. Die modifizierten Lipoproteine, besonders minimal oxidized LDL<sup>10</sup>, das noch nicht über Scavengerrezeptoren abgeräumt werden kann, lösen eine Entzündungsreaktion der Gefäßwand aus, die zu einer vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen wie VCAM-1<sup>96</sup> auf den Endothelzellen und zu Sekretion von Wachstumsfaktoren führt. Eine wichtige Rolle spielen dabei die Adhäsionsmoleküle ICAM-1<sup>13</sup>, P- und E-Selectin<sup>42</sup> und das „monocyte chemoattractant protein“, MCP-1<sup>36</sup>. In der Folge adhären zirkulierende Monozyten und T-Lymphozyten an der Gefäßwand und durchwandern sie. Unter dem Einfluss des Cytokins M-CSF proliferieren die Monozyten und exprimieren nach Ausdifferenzierung zu Makrophagen Scavengerrezeptoren<sup>132</sup>, über die sie oxidiertes LDL (oxLDL) aufnehmen. Die funktionell wichtigsten Scavengerrezeptoren sind der Scavengerrezeptor A (SR-A)<sup>80</sup> und CD 36<sup>47</sup>. OxLDL kann aus LDL durch chemische Radikalattacke oder unter dem Einfluss von oxidierend wirkenden Zellprodukten und verschiedenen Enzymen wie Myeloperoxidase<sup>131</sup>, Sphingomyelinase<sup>102</sup> und sekretorischer Phospholipase II (sPLA2)<sup>71</sup> entstehen. Die Expression der Scavengerrezeptoren wird unter anderem durch den Transkriptionsfaktor PPAR  $\gamma$ <sup>161</sup>,

verschiedene Zytokine oder ihr Substrat selbst reguliert. Auch glatte Muskelzellen können Scavengerrezeptoren exprimieren und sich zu Schaumzellen entwickeln<sup>170</sup>. Die so entstehenden frühen arteriosklerotischen Veränderungen werden nach deren makroskopischem Aspekt „fatty streaks“ genannt.

Aus ihnen können komplexere Läsionen, die fibrösen Plaques, durch Einwanderung und Proliferation glatter Muskelzellen aus der Media, vermehrte Bildung extrazellulärer Matrix und weitere Lipidakkumulation entstehen. Zum Teil kommt es zu Verkalkungen und Gefäßeinsprossung.

Die Plaques können durch Einwanderung weiterer Monozyten, Zellproliferation, Lipidakkumulation und Produktion extrazellulärer Matrix wachsen und so das Gefäß langsam verschließen. Durch zunehmende Lipidüberladung und toxische Effekte des oxLDL<sup>133</sup> gehen die Schaumzellen zugrunde, setzen ihre Lipide frei, und es entsteht der nekrotische Kern der Läsion mit extrazellulären Lipiddepots. Schließlich trennt nur noch eine dünne fibröse Kappe den nekrotischen Kern vom Gefäßlumen.

Kommt es zur plötzlichen Ruptur der fibrösen Kappe, kann es zum akuten Verschluss des Gefäßes kommen, da sich durch Freisetzung thrombogener Substanzen aus dem atherosklerotischen Plaque und Aktivierung der Blutgerinnung ein Thrombus bildet. Das Risiko einer Plaqueruptur steigt mit der Anzahl der Entzündungszellen im Plaque, die destabilisierende Enzyme sezernieren.

## 2.2 Scavenger-Rezeptoren

Ein entscheidender Schritt in der Atherogenese ist die Schaumzellbildung, d.h. die exzessive Aufnahme von Lipoproteinen in Makrophagen. Da die LDL-Aufnahme der Zellen über den LDL-Rezeptor einem negativen Feedback durch den sogenannten SREBP (sterol regulatory element-binding protein) –Pathway unterliegt<sup>14</sup>, und so nicht zur Cholesterinüberladung führen kann, müssen hierfür andere Rezeptoren verantwortlich sein. Brown und Goldstein entdeckten 1979 einen Rezeptor, er wurde später Scavenger Receptor A (SR-A) genannt, über den acetyliertes LDL (acLDL) in vitro in großer Menge in Makrophagen aufgenommen werden kann<sup>59</sup>. Die Aufnahme über SR-A unterlag keinem Feedback-Mechanismus.

Scavengerrezeptoren erkennen polyanionische Makromoleküle und ihre physiologische Funktion besteht wahrscheinlich in der Beseitigung potentieller

Pathogene und apoptotischer Zellen.

	Zelle oder Gewebe	Liganden / Substrate
<u>Klasse A Scavengerrezeptoren</u>		
SR-A I	<u>Gewebsmakrophagen, Schaumzellen</u> , Leber (Kupffer Zellen, Sinusoidalzellen), Endothelzellen	acLDL, oxLDL, AGE-modified proteins, M-BSA, LPS,
SR-A II		LTA, Bakterien, polyinosinic acid, polyguanosinic acid
SR- A III		?
MARCO	Makrophagen in Milz und Lymphknoten, Leber (Kupffer Zellen)	acLDL, LPS, Bakterien
<u>Klasse B Scavengerrezeptoren</u>		
<b>SR-B I/CLA-1</b>	<u>Monozyten, Makrophagen</u> , Nebenniere, Hoden, Ovar, Leber (Hepatozyten, Kupffer Zellen)	HDL, LDL, VLDL, modifizierte Lipoproteine, anionic phospholipids, apoptotische Zellen
SR-B II		
<b>CD 36</b>	<u>Monozyten, Makrophagen</u> , Blutplättchen, Fettzellen, Brustdrüsenepithelien, Mikrovaskuläres Endothel	HDL, LDL, VLDL, modifizierte Lipoproteine, anionic phospholipids, Fettsäuren, Thrombospondin (TSP-1), Kollagen Typ I und IV, P. falciparum inf. Erythrozyten, apoptotische Zellen, Segmente des retinalen Pigmentepithels
Croquemort	Makrophagen / Drosophila Hemozyten	Apoptotische Zellen
<u>Klasse C Scavengerrezeptoren</u>		
Drosophila SR-C	Makrophagen / Drosophila Hemozyten	acLDL
<u>Klasse D Scavengerrezeptoren</u>		
CD 68 / Macrosialin	<u>Gewebsmakrophagen</u> , Leber (Kupffer Zellen)	oxLDL, Phosphatidylserine liposomes, Malondialdehyde, BSA
<u>Klasse E Scavengerrezeptoren</u>		
<b>LOX-1</b>	Endothelzellen, <u>Monozyten</u> , Makrophagen, Leber ?	oxLDL, Carrageenan, polyinosinic acid, apoptotische Zellen
<u>Klasse F Scavengerrezeptoren</u>		
SREC	Endothelzellen, Leber ?	acLDL, oxLDL

Tabelle 1. Scavengerrezeptoren nach Terpstra V. et al.<sup>158</sup>. Fettgedruckt sind die in dieser Arbeit untersuchten Rezeptoren.

Ihr Name „Scavengerrezeptoren“ rührt von ihrer Multifunktionalität und der Vielzahl ihrer Liganden her. Tabelle 1 gibt einen Überblick über die derzeit identifizierten Scavengerrezeptoren, deren Gewebeverteilung und Liganden. Die Einteilung in die Gruppen A bis F beruht auf Sequenzhomologien der Rezeptoren.

Rezeptoren für oxLDL sind SR-A I/II, CD 36, SR-B1, Macrosialin/CD 68, LOX-1 und SREC. Unter den Scavengerrezeptoren erkennen SR-B1 und CD 36 neben modifizierten Lipoproteinen auch native Lipoproteine.

Auf den Schaumzellen atherosklerotischer Läsionen wurden neben SR-A weitere Scavengerrezeptoren nachgewiesen: Von diesen soll im Folgenden auf CD 36, SR-B1 und LOX-1 weiter eingegangen werden.

### 2.2.1 Scavenger Rezeptoren Klasse A Typ I und II

Nach der Erstbeschreibung 1979 durch Brown und Goldstein wurde SR-A 1988 von Kodama weiter charakterisiert<sup>80</sup>; Es handelt sich um ein 220 kDa Protein mit einer transmembranären Domäne (siehe Abb. 1). Durch alternatives splicing der mRNA entstehen die beiden Isoformen SR-A I und SR-A II<sup>46</sup>. SR-A II besteht aus fünf verschiedenen Domänen, SR-A I enthält eine weitere Zystein-reiche C-terminale Domäne. Trotz der fehlenden sechsten Domäne weist SR-A II dieselben Bindungseigenschaften gegenüber modifizierten Lipoproteinen auf wie SR-A I<sup>138</sup>. SR-A-I/II bindet neben acLDL, das nur als artifizierlicher in vitro- Ligand dient und in vivo nicht vorkommt, oxLDL, das in der Gefäßwand nachgewiesen wurde. Die Bindung kommt durch elektrostatische Wechselwirkung mit der Domäne V zustande. SR-A I/II ist für ca. 80% der Aufnahme von acLDL aber nur ca. 30 % der Aufnahme von oxLDL durch murine Makrophagen verantwortlich<sup>97</sup>. So wird der größte Teil des oxLDL (70 %) über andere Rezeptoren als SR-A I/II aufgenommen. Weitere Liganden sind verschiedene anionische Proteine, Lipide, Polysaccharide, hierunter LPS, und Polynukleotide. Eine weitere Isoform, SR-A III, kann modifizierte Lipoproteine nicht aufnehmen, da sie selbst nicht auf der Zelloberfläche erscheint<sup>61</sup>. SR-A wird außer von Makrophagen auch auf der Oberfläche von Kupffer Zellen und Endothelzellen exprimiert<sup>40</sup>. Beide Isoformen SR-A I/II konnten im Bereich der fatty streaks und weiter fortgeschrittener Stadien atherosklerotischer Läsionen in vivo nachgewiesen werden<sup>114</sup>. Kreuzungen aus Apo E- defizienten und SR-A I/II -knockout Mäusen

zeigen eine signifikant geringere Progression atherosklerotischer Läsionen als ApoE-defiziente, SR-A I/II -positive Mäuse<sup>156</sup>, obwohl die Aufnahme von oxLDL nur gering vermindert war. Die Expression von SR-A I/II wird durch Proteinkinase-C Aktivierung, M-CSF, PDGF, Hypercholesterinämie und CMV-Viren stimuliert. Interferon  $\gamma$ , TGF  $\beta$ , GM-CSF und LPS, das TNF  $\alpha$  induziert, hemmen die Expression in Makrophagen<sup>154</sup>. Selektive Aktivierung von PPAR  $\gamma$  konnte die Expression von SR-A I/II in THP-1 Zellen<sup>161</sup> und aktivierten Makrophagen<sup>135</sup> hemmen, auch wenn oxLDL, das auch ein PPAR  $\gamma$ -Aktivator ist, dennoch die Expression steigert<sup>113</sup>. In dieser Arbeit wurde als Zellmodell die MM6 sr Zelle gewählt, die SR-A nicht exprimiert<sup>142</sup>, aber dadurch die beinahe selektive Untersuchung von Effekten auf Scavengerrezeptoren der Klasse B erlaubt, die für den Großteil der oxLDL Aufnahme von Makrophagen verantwortlich sind.

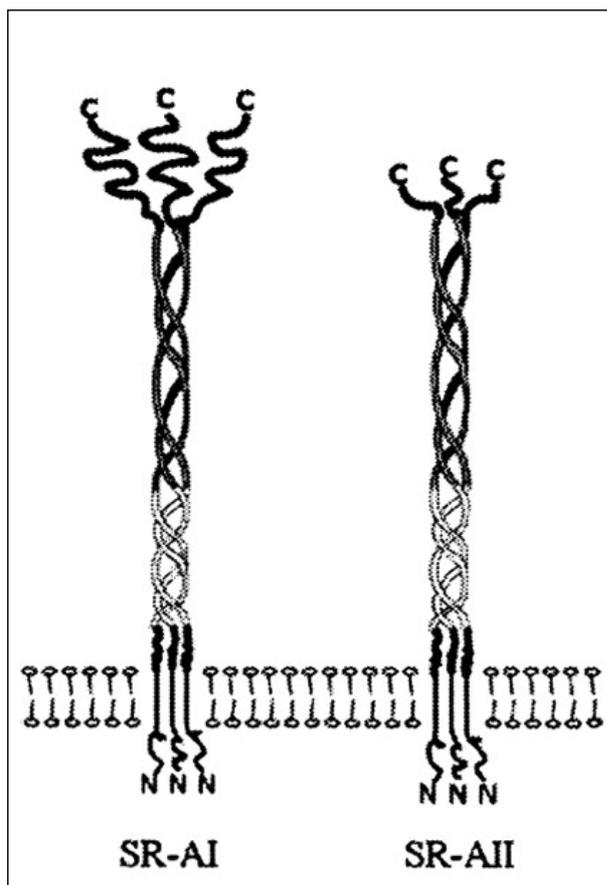


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aufbaus von SR-A I und SR-A II (aus Terpstra et.al.<sup>158</sup>).

### 2.2.2 Scavenger Rezeptoren der Klasse B

Zur Klasse B der Scavengerrezeptoren gehören CD 36 und SR-B1 sowie LIMP-II. Ihre Gene haben sich aus einem gemeinsamen Ursprungsgen entwickelt<sup>18</sup>.

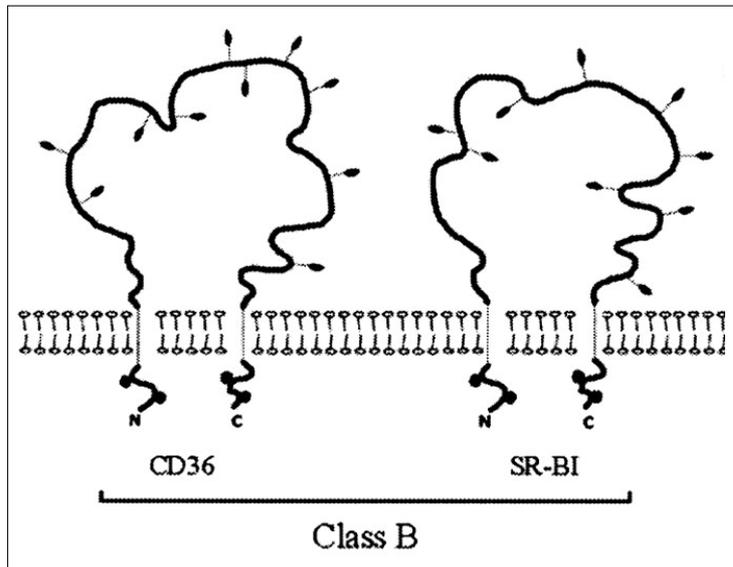


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Aufbaus von CD 36 und SR-B1 (aus Terpstra et.al.<sup>158</sup>).

#### 2.2.2.1 CD 36

CD 36 ist ein 88 kDa großes, membranständiges Glykoprotein, das 1993 von Endemann<sup>47</sup> als Scavengerrezeptor identifiziert wurde. Es bindet oxLDL, unmodifizierte Lipoproteine<sup>20</sup>, langkettige Fettsäuren und viele anderen Liganden (siehe Tabelle 1). Von den Scavengerrezeptoren der Klasse A unterscheidet CD 36 neben der unterschiedlichen Struktur, dass es Polyanionen wie Fucoidin, Polyguanosinsäure und Carrageenan weniger gut binden kann<sup>1</sup>. Neben Monozyten und Makrophagen wird CD 36 von Endothelzellen v.a. der kleinen Gefäße, Thrombozyten, Fettzellen, Zellen des Brustdrüsenepithels, Zellen des retinalen Pigmentepithels und verschiedenen Tumorzellen exprimiert<sup>171</sup>. Der Rezeptor CD 36 ist in bestimmten Mikrodomänen der Plasmamembran, sogenannten Caveolae, konzentriert. Von diesen Caveolae aus werden verschiedene Signalkaskaden aktiviert. Das CD 36-Protein besteht aus einer großen extrazellulären Schleife und zwei transmembranären Domänen<sup>154</sup> (siehe Abb. 2). Die extrazelluläre Schleife ist

stark glykosyliert. Die Expression von CD 36 auf Monozyten steigt während der Ausdifferenzierung zu Makrophagen. So ist auf der in dieser Arbeit verwendeten subklonierten Zellreihe MM6 sr eine höhere CD 36-Oberflächenexpression nachweisbar als auf der ursprünglichen MM6 Zelle. Die Expression wird durch M-CSF, GM-CSF, IL-4, native und modifizierte Lipoproteine stimuliert. Niedrige intrazelluläre Cholesterinspiegel, Corticosteroide, TGF- $\beta$ 1, HDL, IFN- $\gamma$  und LPS regulieren CD 36 herunter<sup>43,53,62,117,173</sup>. Die Expression wird hier unter anderem über den Transkriptionsfaktor PPAR  $\gamma$  reguliert, dessen Liganden auch dem aufgenommenen oxLDL entstammen können<sup>113,161</sup>. So stimuliert oxLDL seine eigene weitere Mehraufnahme, was die Entstehung von Schaumzellen atherosklerotischer Läsionen fördert. Makrophagen von Menschen mit einer Defizienz des CD 36-Rezeptors nehmen ca. 40 % weniger oxLDL auf als die Makrophagen gesunder Probanden<sup>119</sup>. Mausmodelle mit CD 36- Nullmutation zeigen tatsächlich eine signifikant geringere Bildung atherosklerotischer Läsionen<sup>51</sup>.

Neben seiner Beteiligung am Cholesterinmetabolismus hat CD 36 weitere Funktionen<sup>51</sup>: Aufnahme apoptotischer Zellen und von Teilen der Photorezeptoren, Beteiligung bei der Plättchenadhäsion und Adhärenz an Plasmodium falciparum-infizierten Erythrozyten und Regulation der Angiogenese. In Adipozyten, Herz- und Muskelzellen spielt CD 36 eine Rolle beim Transport langkettiger Fettsäuren und ist so an der Lipoprotein- und Lipidhomöostase beteiligt.

#### 2.2.2.2 SR-B1

Der Scavengerrezeptor B-1 wurde 1994 von Acton et al.<sup>1</sup> erstmals beschrieben. Er gehört zur Familie der CD 36- Membranproteine mit denen er eine hohe Sequenzhomologie aufweist. Das 82 kDa Glykoprotein besteht aus einer großen extrazellulären Schleife mit zwei transmembranären Domänen<sup>82</sup> ähnlich CD 36 (Abb. 2). SR-B1 wird in großer Menge in Steroidhormon produzierenden Geweben und Fettgewebe, und in geringeren Mengen in Lunge und Leber exprimiert. Wie CD 36 ist auch SR-B1 in Caveolae lokalisiert<sup>8</sup>. CLA-1 (hSR-B1) ist das humane Homolog des murinen Rezeptors SR-B1<sup>21</sup>. CLA-1 entspricht in seiner Gewebeverteilung und in seinem Bindungsverhalten seinem Homolog SR-B1 in Nagetieren. Es kommt besonders in der Nebenniere aber auch in Monozyten, Leber

und Hoden vor; in reifen Makrophagen ist es in geringerem Ausmaß exprimiert<sup>112</sup>. In einer weiteren Studie zeigte sich jedoch ein vermehrtes Auftreten von CLA-1 bei der Ausdifferenzierung von Monozyten zu Makrophagen. Diese kann durch Aktivierung der Transkriptionsfaktoren PPAR  $\alpha$  und PPAR  $\gamma$  stimuliert werden. Die Ergebnisse von Murao beruhen am ehesten auf spezifischen Eigenschaften der verwendeten THP-1 Monozyten oder des Stimulus PMA<sup>30</sup>. Das Spektrum der Liganden ist ähnlich wie bei CD 36: oxLDL, acLDL, VLDL, auch natives LDL, das nicht an SR-A binden kann, HDL<sup>19</sup>, apoptotische Zellen, besonders apoptotische Thymozyten, und anionische Phospholipide. Hauptfunktion von SR-B1 scheint die Aufnahme von Cholesterinestern des HDL in die Leber und Steroidhormon produzierende Gewebe zu sein<sup>112</sup>. Hier wird die Expression von SR-B1/CLA-1 durch den Steroidhormonbedarf reguliert. Eine weitere Aufgabe von SR-B1/CLA-1 ist der Cholesterinrücktransport vom peripheren Gewebe zur Leber durch HDL, wobei der Cholesterolefflux mit der Höhe der Expression von SR-B1 korreliert. SR-B1, das auch in atheromatösen Plaques nachgewiesen wurde, kann so der Progression der Läsionen entgegenwirken<sup>72</sup>. Überexpression von SR-B1 in der Leber LDL-Rezeptor-defizienter Mäuse führte zu verminderter Ausprägung atherosklerotischer Läsionen<sup>4</sup>. In Apo E defizienten SR-B1 –knockout Mäusen führte das Fehlen von SR-B1 zu einem früheren und stärkeren Einsetzen atherosklerotischer Läsionen<sup>162</sup>. Deshalb darf man insgesamt wohl eine antiatherogene Funktion von SR-B1 annehmen.

### 2.2.3 LOX-1

Die bisher beschriebenen klassischen Scavengerrezeptoren sind auf Endothelzellen nur gering exprimiert. 1997 wurde von Sawamura et. al.<sup>141</sup> der „lectin-like oxidized LDL receptor“ (LOX-1) als endothelialer Rezeptor für oxLDL identifiziert. Es handelt sich um ein 50 kDa Glykoprotein mit einer transmembranären Domäne, das sich in seiner Struktur von den anderen Scavengerrezeptoren deutlich unterscheidet (Abb. 3). LOX-1 konnte in Endothelzellen der Aorta und gefäßreichen Geweben wie Plazenta, Gehirn oder Leber nachgewiesen werden. Er vermittelt die Bindung und Aufnahme von oxLDL in Endothelzellen. AcLDL oder natives LDL wird nicht aufgenommen<sup>111</sup>.

LOX-1 spielt als Rezeptor für oxLDL eine bedeutende Rolle bei der Aktivierung von

Endothelzellen. Die Aktivierung von LOX-1 auf Endothelzellen führt zur vermehrten Expression von Adhäsionsmolekülen, wie P- und E-Selectinen, ICAM-1 und VCAM-1 und zur Sekretion von MCP-1 und damit zu einem der initialen Schritte der Atherogenese. Es kommt vermehrt zu Apoptose der Endothelzellen und zur endothelialen Dysfunktion. Dies wird intrazellulär durch Proteinkinase C und MAPK's und durch Aktivierung von NF- $\kappa$ B vermittelt<sup>107</sup>. Die Expression auf Endothelzellen wird durch oxLDL, TNF- $\alpha$ , Angiotensin II, TGF- $\beta$ , bakterielle Endotoxine, PMA und vermehrte Scherkräfte gesteigert<sup>85</sup>. Auch arterieller Hypertonus und Diabetes mellitus führen zu einer vermehrten Expression<sup>107</sup>. Auch auf Plättchen<sup>27</sup>, glatten Muskelzellen und Makrophagen<sup>174</sup> ist LOX-1 nachgewiesen worden; Die Expression auf Monozyten stieg während der Ausdifferenzierung zu Makrophagen. Katakao et al. konnten LOX-1 neben Endothelzellen auf Makrophagen und glatten Muskelzellen humaner atherosklerotischer Läsionen nachweisen<sup>75</sup>. Auf Makrophagen wird die Expression von LOX-1 durch TNF  $\alpha$ , PMA, bakterielles Endotoxin<sup>86</sup> und TGF- $\beta$ <sup>43</sup> stimuliert. Fenofibrat, ein PPAR  $\alpha$  Ligand, reguliert die Expression von LOX-1 in Makrophagen hoch<sup>17</sup>.

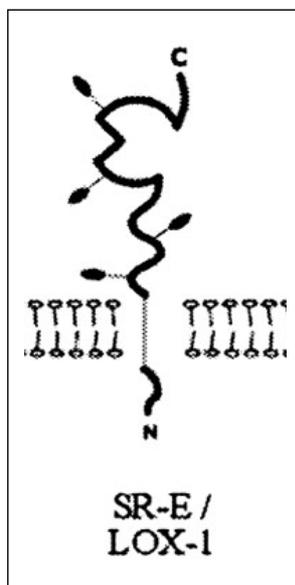


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Aufbaus von LOX-1 (aus Terpstra et.al.<sup>158</sup>).

### 2.3 Reverser Cholesteroltransport

Der Rücktransport überschüssigen Cholesterins von der peripheren Zelle zur Leber wird durch HDL vermittelt. So erhöhen niedrige Serum-HDL-Spiegel das kardiovaskuläre Risiko und hohe Spiegel wirken protektiv.

Es gibt verschiedene Mechanismen des Cholesterineffluxes aus Zellen.

Die Diffusion von freiem Cholesterin über die Zellmembran kommt auf allen Zellen vor, ist jedoch ineffektiv. Ein weiterer Transportweg ist der Scavengerrezeptor SR-B1, der sowohl auf Leberzellen wie auch Monozyten der Gefäßwand exprimiert ist (siehe Kapitel 2.2.2.2). Es handelt sich in diesen beiden Fällen um einen potentiell bidirektionalen Fluss, d.h. die Richtung wird durch das Konzentrationsverhältnis bestimmt. Im Gegensatz dazu ist der Transport über den Adenosine Triphosphate-Binding Casette Transporter 1 (ABCA 1) auf die Plasmamembran und die Übertragung auf das Apolipoprotein- AI nur unidirektional möglich<sup>172</sup>.

Apolipoprotein- AI wird in der Leber und Enterozyten synthetisiert und ins Plasma sezerniert und kann nun vermittelt durch ABCA 1 freies Cholesterin und Phospholipide von Zellen in nascente HDL- Partikel aufnehmen. Im Verlauf reichern die Partikel weiteres freies Cholesterin an, das aus Zellen oder anderen Lipoproteinen diffundiert. Durch die Lysolecithin-cholesterol acetyltransferase (LCAT) wird freies Cholesterin verestert und die Partikel werden zu reifem HDL umgewandelt. Die Cholesterinester des HDL können wieder auf VLDL oder LDL Partikel überführt werden oder durch SR-B1<sup>82</sup> in die Leber aufgenommen werden, um dann über die Galle ausgeschieden zu werden. Das Apolipoprotein-AI der entladenen HDL-Partikel kann hierbei wieder in den Kreislauf eingeschleust werden (Abb. 4).

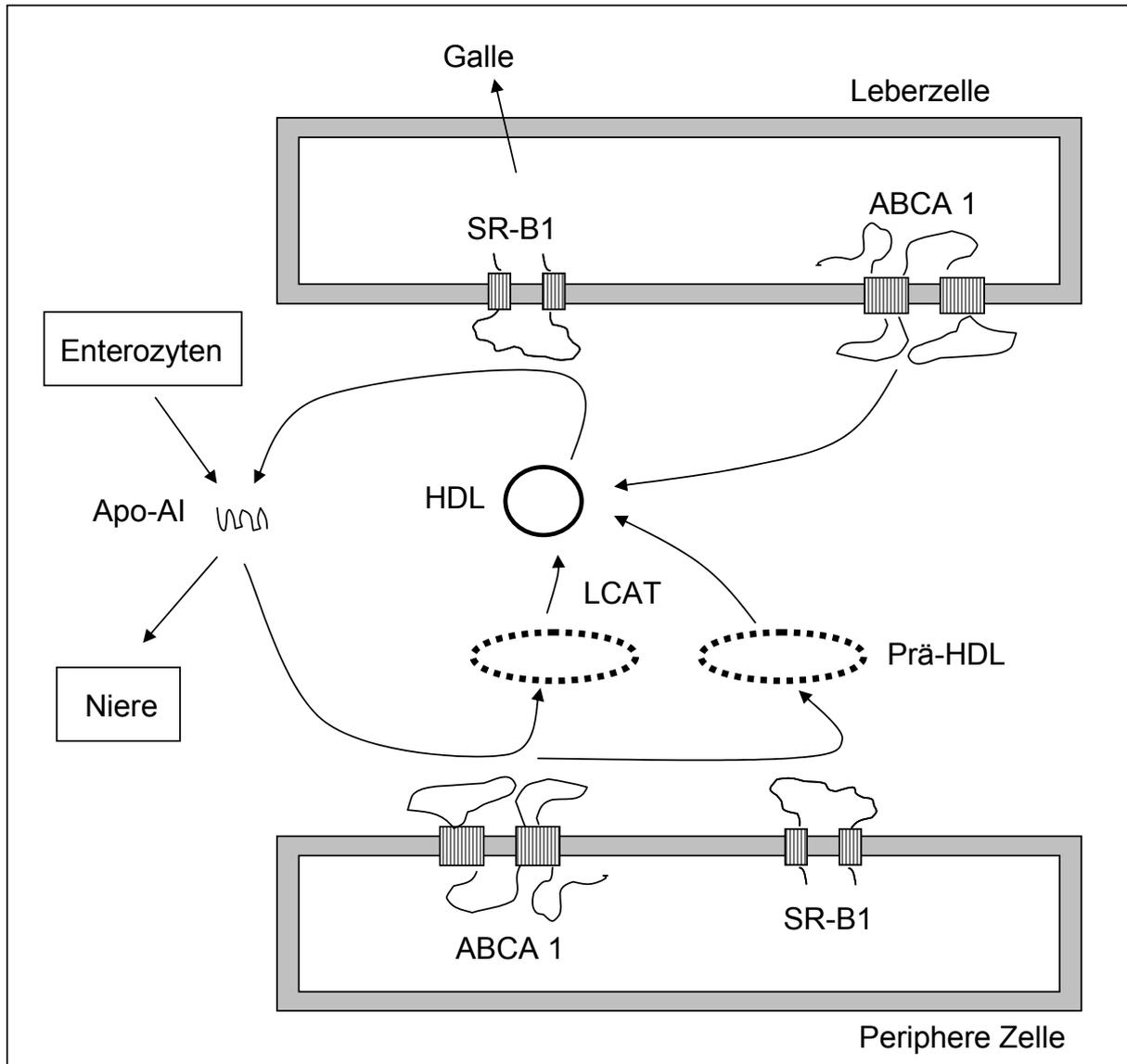


Abbildung 4: Reverser Cholesterintransport. (nach Oram<sup>124</sup>)

### 2.3.1 Adenosine Triphosphate-Binding Cassette Transporter 1 (ABCA 1)

ABCA 1 ist ein integrales Membranprotein mit einer Länge von 2261 Aminosäuren. Es setzt sich aus zwei Teilen mit ähnlicher Struktur zusammen, von denen jeder aus sechs transmembranären Domänen und einer Nukleotid-bindenden Domäne (NBD) zur Bindung von ATP besteht (Abb. 5).



Cholesterinausscheidung verbunden war<sup>163</sup> und auf die atheroprotektiven Eigenschaften von ABCA 1 hinwies.

Im Gegensatz dazu tritt die koronare Herzerkrankung bei Patienten mit einem heterozygoten Defekt von ABCA 1 und dadurch bedingtem defektem reversen Cholesterintransport dreimal häufiger auf<sup>149</sup>.

Die Expression von ABCA1 kann durch acLDL<sup>87</sup>, cAMP<sup>121</sup> oder Cholesterin<sup>35</sup> stimuliert werden. Werden die Zellen nach der Cholesterinaufnahme mit dem Apoprotein Apo-AI inkubiert, was den zellulären Cholesterinbestand reduziert, wird die Expression wieder gesenkt. Also unterliegt die Expression von ABCA1 einer Rückkopplung durch den intrazellulären Cholesteringehalt<sup>92</sup>.

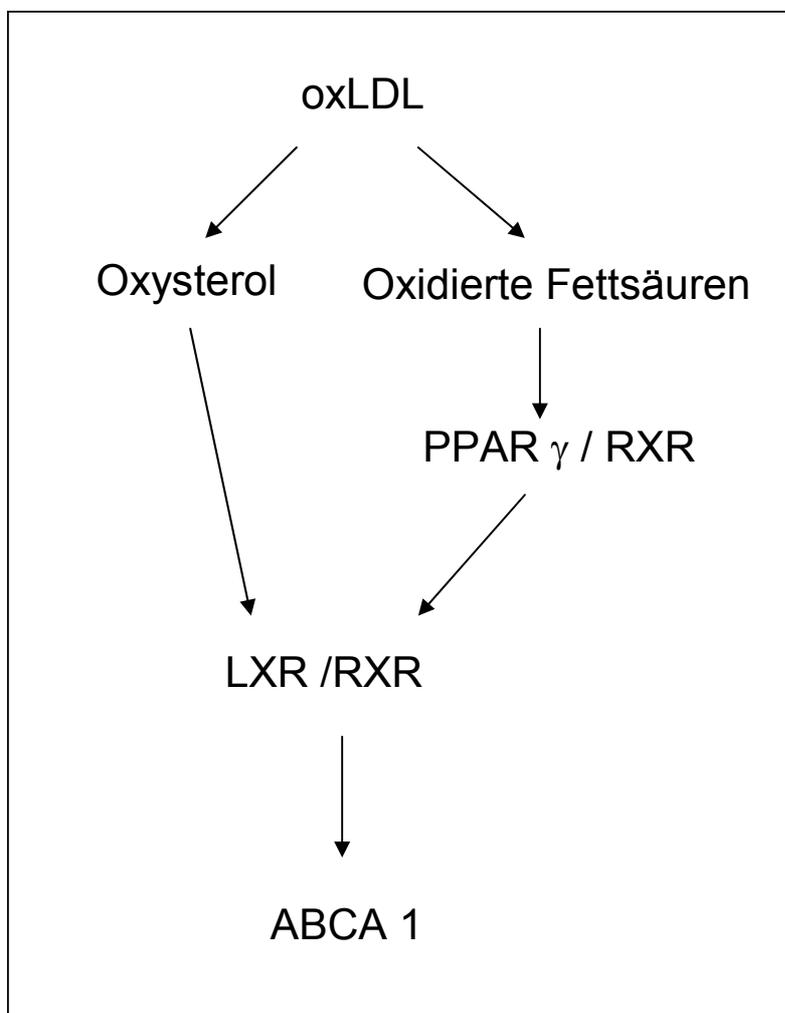


Abbildung 6: Regulation der Expression von ABCA 1

Hierbei wird die Cholesterin-sensible Expression durch die Transkriptionsfaktoren

RXR und Liver X Receptor (LXR)  $\alpha$  und  $\beta$  reguliert. LXR und RXR formen permissive Heterodimere, die nach Aktivierung durch Liganden in der Promotorregion von ABCA1 binden und dessen Transkription aktivieren. So konnten 22(R)-Hydroxycholesterin und 9-cis Retinolsäure die Expression von ABCA 1 stimulieren<sup>145</sup>. In Makrophagen kommen beide Isoformen LXR  $\alpha$  und LXR  $\beta$  vor<sup>164</sup>, und von den aus dem aufgenommenen Cholesterin vermutlich gebildeten Oxysterolen konnte 27-Hydroxycholesterin als bedeutenster Ligand für LXR in Schaumzellen identifiziert werden<sup>56</sup>.

Die Behandlung von THP-1 Zellen mit oxLDL führte zu einer gesteigerten Expression von LXR  $\alpha$ <sup>148</sup> und somit einer gesteigerten Expression von ABCA1. Daran ist möglicherweise auch der Transkriptionsfaktor PPAR  $\gamma$  beteiligt. Dessen Aktivierung steigert die Expression von LXR  $\alpha$  und führt über diesen Zwischenschritt zu einer vermehrten Bildung von ABCA 1<sup>25,32</sup>. Somit existiert in cholesterinüberladenen Schaumzellen neben der Aktivierung von LXR über Hydroxycholesterin ein weiterer Weg den Cholesterinefflux zu erhöhen (Abb. 6). Denn oxLDL führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors PPAR  $\gamma$ <sup>113</sup>. Hinzu kommt, dass es nach Aktivierung von PPAR  $\gamma$  zu einer vermehrten Expression von CD 36 kommt, der zusätzlich modifizierte Lipoproteine als Liganden von LXR  $\alpha$  bereitstellt.

## 2.4 Die monozytäre Zelllinie MM6 sr

Die monozytäre Zelllinie MM6 sr wurde 1994 von Scheithe et. al.<sup>143</sup> identifiziert. Sie ist eine Sublinie der monozytären Zelllinie MM6. Die Mutterzelle MM6 wurde von Ziegler-Heitbrock aus dem Blut eines Patienten, der an einer Monoblastenleukämie erkrankt war, isoliert. Es konnten funktionelle und phänotypische Merkmale reifer Monozyten nachgewiesen werden<sup>177</sup>.

Im Unterschied zu anderen Zellmodellen, wie z.B. THP-1 Zellen, war bei MM6 sr Zellen keine Induktion der Differenzierung zu Makrophagen durch Stoffe wie Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) erforderlich. Die unstimulierte MM6 sr Zelle kann oxLDL und acLDL über Scavengerrezeptoren aufnehmen und degradieren und eignet sich daher als Zellmodell für Makrophagen des atherosklerotischen Plaques<sup>143</sup>. Da die Aufnahme von acLDL nicht durch SR-AI oder SR-AII vermittelt wird, wurde die Existenz weiterer Scavengerrezeptoren auf MM6 sr vermutet<sup>142</sup>. Abbildung 7 zeigt beispielsweise die relativ hohe basale Oberflächenexpression des Scavengerrezeptors CD 36 auf MM6 sr Zellen im Unterschied zur MM6 Zelle.

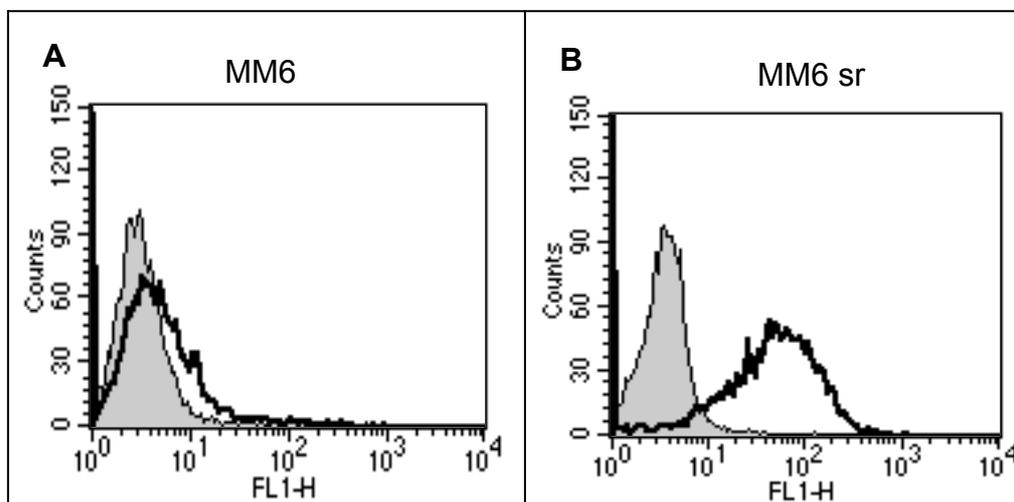


Abbildung 7: CD 36-Basalexpression auf MM6 und MM6 sr Zellen. Die grau gefüllte Kurve stellt die Isotypkontrolle, die fett gedruckte, offene Kurve die CD 36-Expression dar.

## 2.5 Peroxisome Proliferator-Activated Receptor (PPAR)

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) bilden eine Unterfamilie der nukleären Hormonrezeptoren, Gruppe C der Unterfamilie 1 (NR1C). Zu den Kernrezeptoren gehören auch die Rezeptoren für Steroidhormone, Schilddrüsenhormon, Retinoide und Vitamin D. Der Name kommt daher, dass PPARs, die erstmals in der Leber von Nagetieren nachgewiesen wurden, dort zur Proliferation von Peroxisomen führen<sup>88</sup>.

Es gibt verschiedene Unterformen, PPAR  $\alpha$  (NR1C1), PPAR  $\delta$ , der auch PPAR  $\beta$  genannt wird (NR1C2), und PPAR  $\gamma$  (NR1C3). Jede dieser Unterformen wird durch ein eigenes Gen kodiert und hat ein spezifisches Expressionsmuster.

Wird PPAR durch einen Liganden aktiviert, so bildet er ein Heterodimer mit dem Retinoid X Receptor (RXR Receptor) und beeinflusst die Transkriptionsrate zahlreicher Gene durch Bindung an sogenannte Peroxisome proliferator response elements (PPREs) in der Promotorregion der Zielgene (Abb. 8). So werden durch Aktivierung von PPAR zahlreiche Vorgänge in den Bereichen Fettzellendifferenzierung und Insulinsensitivierung, Regulation des Zellzyklus, Karzinogenese und der Arteriosklerose beeinflusst<sup>137</sup>.

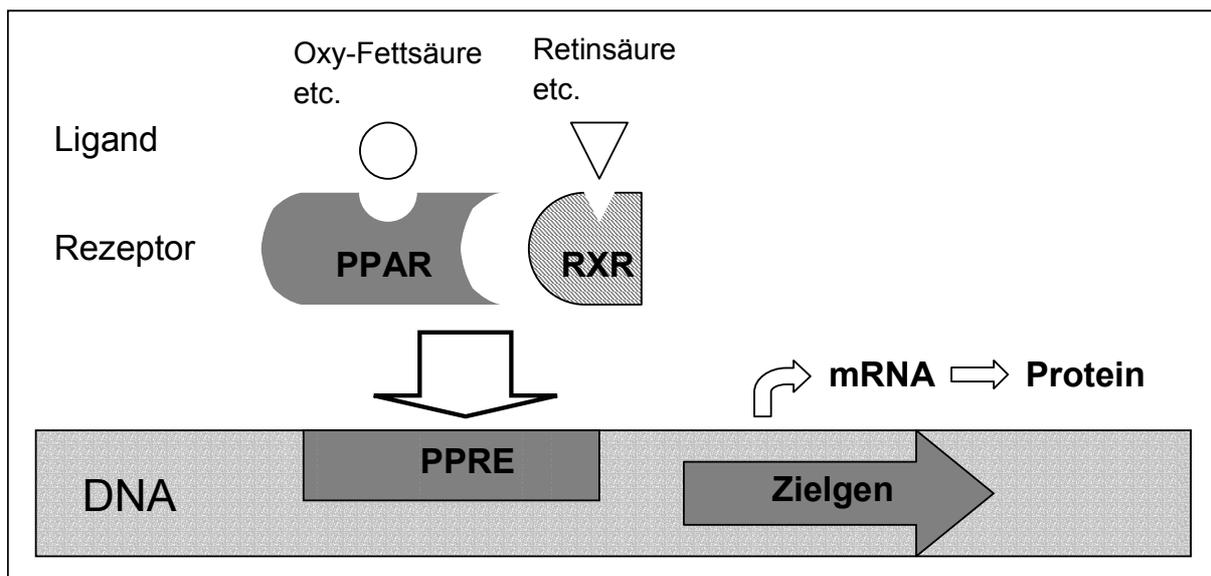


Abbildung 8: Aktivierung von PPAR (PPAR: Peroxisome Proliferator activated Receptor, RXR: Retinoid X Receptor, PPRE: PPAR Response Element)

In dieser Arbeit wurde die Funktion von PPAR  $\gamma$  im Hinblick auf die Regulation der Expression von Scavengerrezeptoren auf monozytären Zellen des atherosklerotischen Plaques untersucht.

### 2.5.1 PPAR $\alpha$

PPAR  $\alpha$  konnte bei Menschen in Leber, Herz, Niere, Skelettmuskel, Darm, Pancreas, Lunge, Plazenta und im Fettgewebe nachgewiesen werden<sup>7</sup>. In Gegensatz zu PPAR  $\gamma$  ist PPAR  $\alpha$  schon in undifferenzierten Monozyten exprimiert und eher im Zytoplasma lokalisiert<sup>31</sup>. Zu den Aufgaben von PPAR  $\alpha$  gehört die Regulation des Fettsäurestoffwechsels in Leber, Muskel und Herz, wobei er vor allem Enzyme der Fettsäureutilisation induziert<sup>48</sup>.

### 2.5.2 PPAR $\gamma$

Beim Menschen gibt es zwei verschiedene Unterformen von PPAR  $\gamma$ , PPAR  $\gamma$ 1 und PPAR  $\gamma$ 2<sup>49,50</sup>. Sie werden durch drei verschiedene mRNA- Isoformen PPAR  $\gamma$ 1, PPAR  $\gamma$ 2 und PPAR  $\gamma$ 3, die von verschiedenen Promotoren induziert werden, kodiert. Dabei generieren PPAR  $\gamma$ 1- mRNA und PPAR  $\gamma$ 3- mRNA eine identisches Proteinprodukt, PPAR  $\gamma$  1.

PPAR  $\gamma$ 2 wird durch PPAR  $\gamma$ 2- mRNA kodiert und ist um 30 N-terminale Aminosäuren länger als PPAR  $\gamma$ 1. PPAR  $\gamma$ 2 findet sich vorwiegend im Fettgewebe und ist in anderen Geweben kaum exprimiert<sup>7</sup>, während PPAR  $\gamma$ 1 weiter verbreitet ist. PPAR  $\gamma$  hat eine modulare Struktur aus verschiedenen Domänen (Abbildung 9): Auf der N-terminalen A/B-Domäne befindet sich eine Liganden-unabhängige Aktivierungsfunktion AF-1. Die daran anschließende C-Domäne ist verantwortlich für die DNA- Bindung. Im Bereich der D-Region binden Cofaktoren. Die C-terminale EF-Domäne beherbergt die Ligandenbindungsstelle und die Liganden-abhängige Aktivierungsdomäne AF-2<sup>144</sup>.

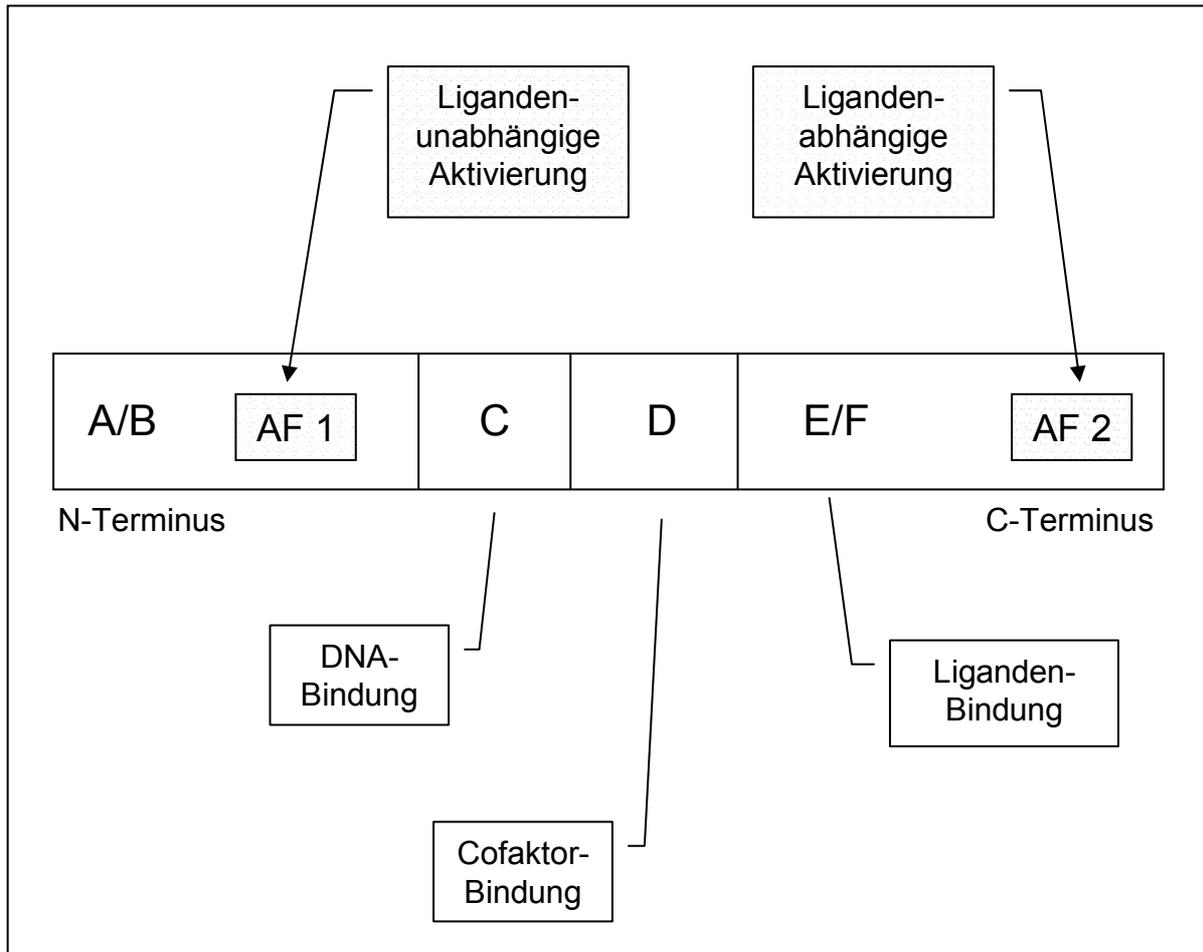


Abbildung 9: Schematischer Aufbau von PPAR  $\gamma$

Besonders stark ist PPAR  $\gamma$  im Fettgewebe, Dickdarm und in hämatopoetischen Zellen exprimiert. Niere, Leber und Dünndarm weisen etwas geringere Mengen auf. Im Muskel kommt PPAR  $\gamma$  kaum vor<sup>7</sup>. In undifferenzierten, ruhenden Monozyten ist PPAR  $\gamma$  nur in einer geringen Menge exprimiert, wohingegen seine Expression bei der Ausreifung zu Makrophagen steigt<sup>31</sup>. Die Expression wird durch Wachstumsfaktoren wie M-CSF und durch oxLDL stimuliert<sup>134</sup>. So konnte PPAR  $\gamma$  in humanen atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen werden<sup>105</sup>.

### 2.5.3 PPAR Liganden

PPAR- Liganden lassen sich in synthetisch erzeugte und natürlich vorkommende Liganden gliedern. Tabelle 2 zeigt eine Auswahl verschiedener Liganden<sup>169</sup>.

Synthetische Liganden	
Fettsäureanaloge	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ETYA</li> </ul>
Fibrate	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Clofibrat</li> <li>• Bezafibrat</li> <li>• Fenofibrat</li> <li>• GW 2331</li> <li>• GW 2433</li> <li>• Wy 14,643</li> </ul>
NSAR (Nicht-steroidale Antirheumatika)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Indomethacin</li> <li>• Ibuprofen</li> <li>• Fenoprofen</li> <li>• Flufenamsäure</li> </ul>
Thiazolidindione	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Rosiglitazon (BRL 49653)</li> <li>• Troglitazon</li> <li>• Pioglitazon</li> </ul>
Natürlich vorkommende Liganden	
Ungesättigte Fettsäuren und deren Metaboliten	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Linolsäure</li> <li>• Linolensäure</li> <li>• Arachidonsäure</li> <li>• Eicosapentaensäure</li> <li>• 9-HODE</li> <li>• 13-HODE</li> <li>• 15-deoxy-<math>\Delta^{12,14}</math>-Prostaglandin J<sub>2</sub></li> <li>• Leukotrien B<sub>4</sub></li> <li>• 8(s)-HETE</li> </ul>

Tabelle 2: PPAR-Liganden

Fibrate haben eine hohe Potenz PPAR  $\alpha$  zu aktivieren, für die Aktivierung von PPAR  $\gamma$  werden höhere Konzentrationen benötigt<sup>151</sup>. Thiazolidindione hingegen haben eine hohe Affinität für PPAR  $\gamma$ <sup>94</sup>.

Unter den natürlichen PPAR  $\gamma$ -Liganden sind Produkte des oxLDL wie 9-HODE und 13-HODE zu nennen<sup>113</sup>. 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub>, ein Stoffwechselprodukt der Arachidonsäure, wurde als spezifischer Ligand von PPAR  $\gamma$  identifiziert<sup>55,77</sup>. Da Fettsäuren und Eicosanoide an vielfältigen Prozessen beteiligt sind und von Zellen weiter umgesetzt werden können, ist zum Teil unklar, ob die Liganden direkt oder nur indirekt über weitere Metaboliten PPAR aktivieren.

### 2.5.3.1 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub>

Aus Arachidonsäure, die durch Phospholipase A2 aus den Zellmembranen freigesetzt wird, entsteht durch die Wirkung der Cyclooxygenase Prostaglandin G<sub>2</sub> und Prostaglandin H<sub>2</sub>. Diese werden durch Reduktasen und Isomerasen weiter zu verschiedenen Prostaglandinen umgewandelt. (Abb. 10)

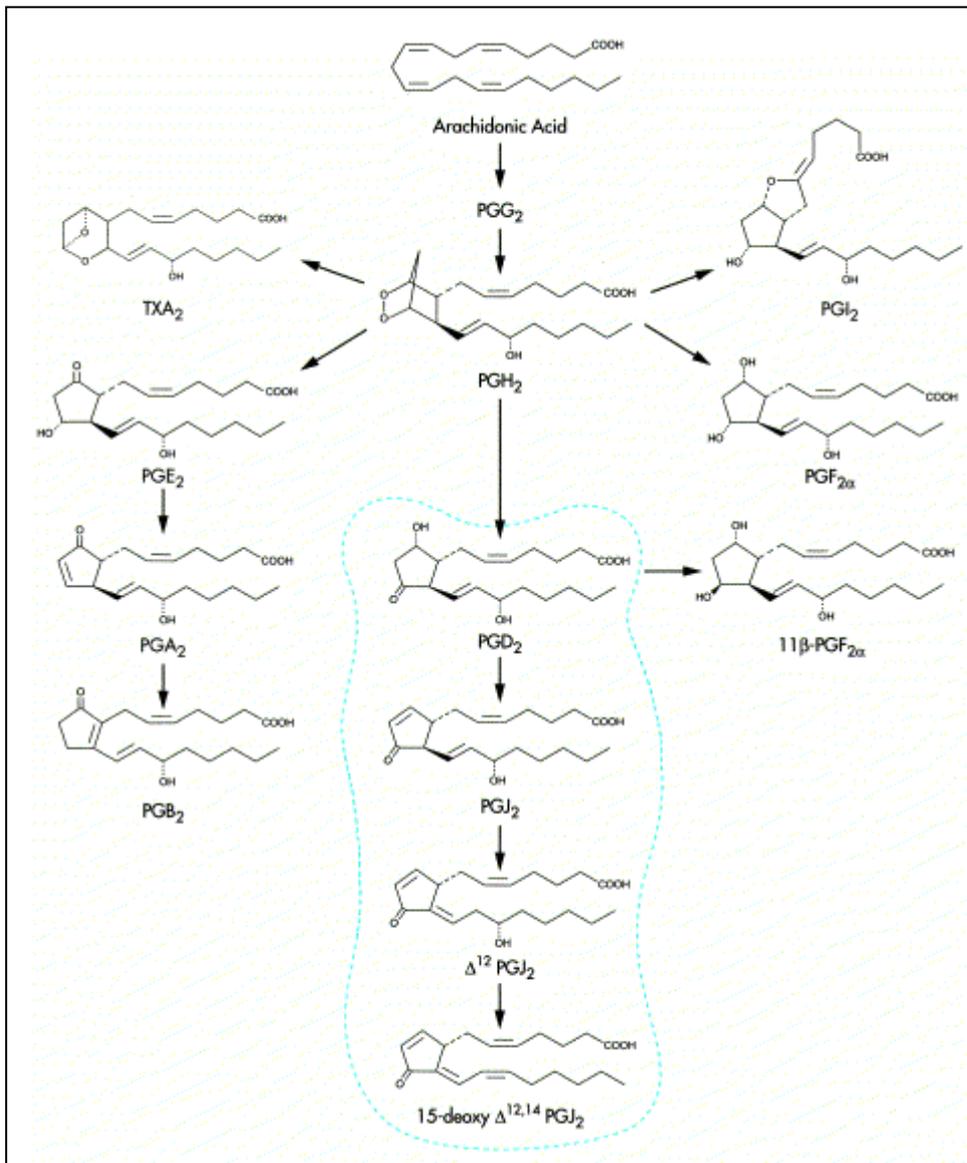


Abbildung 10: Prostaglandinmetabolismus aus Dussault et al.<sup>44</sup>

Es sind oxidierte Fettsäuren mit 20 Kohlenstoffatomen und einem Ring aus 5 Kohlenstoffatomen. Prostaglandine sind lokal wirksame Hormone, die die Aktivität der Zellen, in denen sie gebildet werden, und die der Nachbarzellen verändern. Viele

von ihnen vermitteln ihre Information über Membranrezeptoren und G-Proteingekoppelte second messenger<sup>150</sup>. Prostaglandine bilden mit den Thromboxanen und Leukotrienen die Eicosanoide.

Nach Metabolisation von Prostaglandin H<sub>2</sub> zu Prostaglandin D<sub>2</sub> entsteht durch weitere Umlagerung spontan Prostaglandin J<sub>2</sub>. Da dieser Metabolit aktiv über die Zellmembran in den Zellkern transportiert wird<sup>115</sup>, legt dies eine direkte intrazelluläre Wirkung nahe. Durch Screening einer großen Anzahl von Arachidonsäurederivaten konnte gezeigt werden, dass das aus Prostaglandin J<sub>2</sub> durch Dehydratation entstehende 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub> direkt an PPAR  $\gamma$  bindet und ihn aktiviert (EC 50: 2  $\mu$ M)<sup>55,77</sup>. Damit war ein natürlich vorkommender Ligand von PPAR  $\gamma$ , der bis dahin als „orphan receptor“ bezeichnet wurde, identifiziert. Er unterscheidet sich von den übrigen Prostaglandinen dadurch, dass seine Wirkung nicht über second messenger vermittelt wird, sondern dass er direkt an den nukleären Transkriptionsfaktor bindet.

### 2.5.3.2 Nichtsteroidale Antiphlogistica (NSAR)

Nichtsteroidale Antiphlogistika wirken antientzündlich, da sie durch die Hemmung der Cyclooxygenase den initialen Schritt in der Produktion von Prostaglandinen blockieren. So sind nach Gabe von Indomethacin auch deutlich verringerte Spiegel von  $\Delta^{12}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub> nachweisbar<sup>69</sup>.

Einige Antiphlogistika können direkt an PPAR  $\gamma$  und an PPAR  $\alpha$  binden und diese aktivieren. Besonders potent sind hierunter Indomethacin, Flufenamsäure, Fenoprofen und Ibuprofen, wobei PPAR  $\alpha$  5-10-fach stärker aktiviert wird als PPAR  $\gamma$ . Acetylsalicylsäure hat nur einen sehr geringen aktivierenden Effekt<sup>93</sup>.

Es wird diskutiert, dass über die direkte Aktivierung von PPAR  $\gamma$  ein Teil der antientzündlichen Aktivität nichtsteroidaler Antiphlogistika vermittelt wird. Denn die Aktivierung von PPAR  $\gamma$  führt zur Hemmung der monozytären Entzündungsreaktion<sup>135</sup> und zu einer verminderten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine<sup>73</sup>. Die benötigten Konzentrationen der PPAR  $\gamma$ -Agonisten um die Zytokinausschüttung zu hemmen liegen weit über denen, die zur Hemmung der Cyclooxygenase führen, jedoch im Wirkungsbereich der Stoffe in vivo. Daher ist ein Teil der antientzündlichen Wirkung von NSAR möglicherweise durch

PPAR  $\gamma$  vermittelt<sup>137</sup>.

Indomethacin wird häufig verwendet um die Differenzierung von Adipozyten, die durch PPAR  $\gamma$  vermittelt ist, zu induzieren. Auch hier liegen die benötigten Konzentrationen über denen, die zur Inhibition der Cyclooxygenase nötig sind<sup>79</sup>.

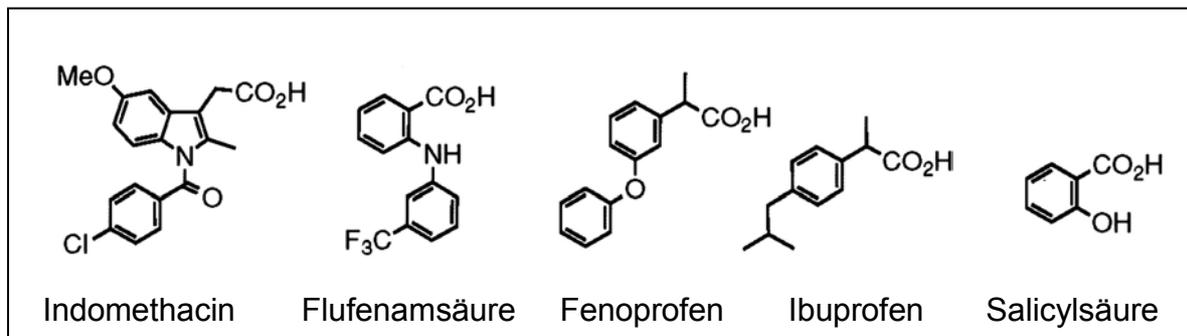


Abbildung 11: In dieser Arbeit verwendete NSAR.

### 2.5.3.3 Thiazolidindione

Thiazolidindione oder Glitazone sind eine Gruppe neuer oraler Antidiabetika, sogenannte Insulinsensitizer. Troglitazon, die erste klinisch eingesetzte Substanz dieser Gruppe, ist mittlerweile wieder vom Markt genommen, da mehrere Fälle fulminanten Leberversagens unter Therapie auftraten. Gegenwärtig sind in Deutschland Rosiglitazon und Pioglitazon im Handel und stehen zur Kombinationstherapie mit Sulfonylharnstoffen und Metformin bei Typ 2 Diabetikern zur Verfügung<sup>106</sup>.

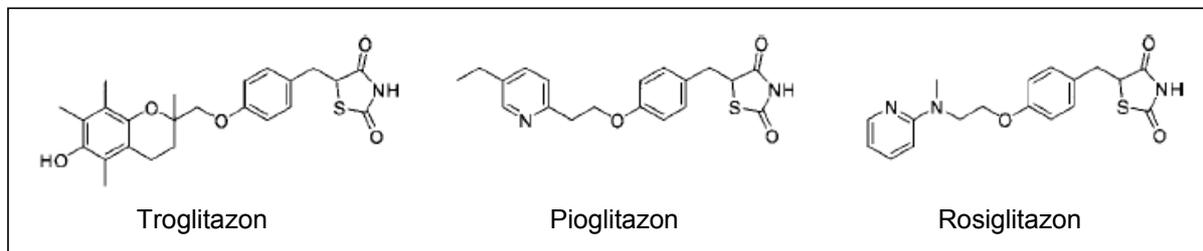


Abbildung 12: Thiazolidindione (aus Jones<sup>74</sup>).

Im Unterschied zu bisher etablierten Therapien mit Sulfonylharnstoffpräparaten, die die Insulinsekretion erhöhen, Metformin, das die endogene Glukoseproduktion

vermindert und muskuläre Verwertung steigert,  $\alpha$ -Glucosidasehemmern, die die intestinale Glukoseabsorbtion hemmen, und exogener Insulinsubstitution erhöhen die Thiazolidindione die bei Diabetes mellitus Typ 2 pathologisch verminderte periphere Insulinsensitivität.

Im Gegensatz zu anderen PPAR-Liganden sind die Thiazolidindione selektiv für PPAR  $\gamma$ <sup>94</sup>.

Sie führen zum einen zu einer verminderten Glukoseproduktion in der Leber, zum anderen zu einer gesteigerten Glukoseaufnahme besonders im Muskel und auch im Fettgewebe. Im Muskel findet ca. 80 % der durch Insulin stimulierten Glukoseaufnahme statt<sup>120</sup>. Hier ist PPAR  $\gamma$  jedoch nur zu einer geringen Menge exprimiert. Man nimmt deshalb an, dass die Wirkung der Thiazolidindione zumindest zum Teil indirekt über das Fettgewebe vermittelt wird. Man spricht hier u.a. von einem „fatty acid steal“, d.h., dass die Insulinsensitivität im Muskel aufgrund einer vermehrten Aufnahme von Fettsäuren in das Fettgewebe erhöht wird<sup>168</sup>. Es konnte jedoch an Mäusen ohne Fettgewebe gezeigt werden, dass Thiazolidindione auch unabhängig von Fettgewebe wirken können<sup>16</sup>. Zu den Effekten der Thiazolidindione gehören neben einer gesteigerten Fettzellendifferenzierung und Fettsäureaufnahme in Fettzellen<sup>76</sup> eine vermehrte Expression der Glukosetransporter GLUT 1 und GLUT 4 in Fettzellen<sup>140</sup> und auch in Muskelzellen<sup>125</sup>. Daneben können Thiazolidindione die hemmende Wirkung von TNF  $\alpha$ <sup>130</sup> und Leptin<sup>39</sup> auf das Insulinsignaling aufheben. Die Therapie mit Thiazolidindionen – alleine oder in Kombination mit Sulfonylharnstoffen oder Metformin – führt zu einer signifikanten Verminderung von Plasmaglukose, des HbA1c, von Insulin- und C-Peptidspiegeln sowie zu einer Verminderung der Serumtriglyceride und Erhöhung von HDL<sup>168</sup>. Neben der insulinsensitivierenden Wirkung und einer Veränderung der Zusammensetzung der Plasmalipide, was eine Verbesserung des Risikoprofils für kardiovaskuläre Erkrankungen bedeutet, haben Thiazolidindione direkte Wirkungen auf die Zellen der Gefäßwand, die potentiell proatherogen wie auch antiatherogen wirken könnten<sup>15</sup> (siehe Kapitel 2.6.2). Potentiell antiatherogen wirkt auch, dass Troglitazon durch seine antioxidativen Eigenschaften die Oxidation von LDL direkt hemmen kann<sup>118</sup>. In dieser Arbeit wurde Rosiglitazon verwendet, das eine deutlich höhere Affinität zu PPAR  $\gamma$  aufweist als Troglitazon oder Pioglitazon<sup>175</sup>.

#### 2.5.4 RXR- Rezeptor

PPARs bilden bei der Bindung an ihre PPRE-Erkennungssequenzen Heterodimere mit RXR. Die Transkription kann nun entweder durch aktivierende Liganden von PPAR oder des RXR unabhängig voneinander stimuliert werden. Eine maximale Stimulation wird durch Bindung beider Liganden erreicht. Man spricht deshalb von einem permissiven Heterodimer<sup>78</sup>. Daneben kann der RXR Rezeptor permissive Heterodimere mit anderen Kernrezeptoren (z.B. LXR etc.), aber auch Homodimere (RXR:RXR) bilden. Im Gegensatz dazu kann z.B. das Dimer RXR:RAR nur beim Vorhandensein beider Liganden aktiviert werden. Man spricht von einem non-permissiven Heterodimer.

Endogener Ligand des RXR-Rezeptors ist die 9-cis-Retinolsäure. Problem ist hier die gleichzeitige Aktivierung des RAR-Pathways, der hemmend wirken kann, je nach dem Verhältnis PPAR/RAR. So kann es zum Wechsel aus dem non-permissiven Zustand, wenn RXR an RAR gebunden ist, in den permissiven Zustand kommen, wenn RXR ein Heterodimer mit PPAR bildet<sup>41</sup>.

Han et al. konnten zeigen, dass in THP-1 Monozyten die Expression von CD 36 durch Stimulation des RXR-Rezeptors gesteigert werden kann. Weiterhin beschrieben sie einen durch RXR/RAR vermittelten und von PPAR unabhängigen Mechanismus der Stimulation der Expression von CD 36<sup>63</sup>.

In dieser Arbeit wurde zur Aktivierung des RXR-Rezeptors Methoprene verwendet. Im Gegensatz zum endogenen Ligand 9-cis-Retinolsäure ist Methoprene ein selektiver Ligand des RXR-Rezeptors<sup>64</sup>.

## 2.6 PPAR abhängige Prozesse

Der Transkriptionsfaktor PPAR  $\gamma$ , der auch als „versatile metabolic regulator“<sup>137</sup> bezeichnet wird, reguliert verschiedene Vorgänge des Lipidmetabolismus und der Fettzellendifferenzierung. Daneben greift er in Vorgänge der Entzündungsregulation, aber auch in die Regulation des Zellzyklus ein. Im Folgenden soll auf die Rolle bei der Fettzellendifferenzierung und den Einfluss auf die Arteriosklerose näher eingegangen werden.

### 2.6.1 Differenzierung von Adipozyten

Bei der Differenzierung von Präadipozyten zu reifen Fettzellen spielen PPAR  $\gamma$ -abhängige Prozesse eine wichtige Rolle. PPAR  $\gamma$ -abhängige Proteine sind hier fatty acid binding protein (aP2), Phosphoenolcarboxykinase (PEPCK), beides Marker der terminalen Differenzierung von Adipozyten, acetylCoA- Synthase, fatty acid Translokase (FAT/CD36), fatty acid transporter protein (FATP-1) und Lipoprotein-Lipase<sup>137</sup>. Durch die Induktion der Expression dieser Proteine verstärkt PPAR  $\gamma$  z.T. auch die Bildung seiner eigenen Liganden. Die Expression von PPAR  $\gamma$  in Fibroblasten führt zur Umdifferenzierung zu Präadipozyten<sup>160</sup>. Dies wurde häufig als Zellmodell zur Testung von PPAR  $\gamma$ - Liganden verwendet.

### 2.6.2 Rolle von PPAR bei der Atherogenese

Seit PPAR  $\gamma$  in atherosklerotischen Plaques nachgewiesen werden konnte<sup>105,134</sup>, wurde seine Rolle bei der Atherogenese untersucht.

Ein entscheidender Schritt in der Atherogenese ist die Bildung von Schaumzellen durch unkontrollierte Aufnahme modifizierter Lipoproteine in Monozyten und Makrophagen in der Gefäßwand. Die Aktivierung von PPAR  $\gamma$  führt zur vermehrten Expression des Scavengerrezeptors CD36<sup>161</sup>, wodurch es zu einer gesteigerten Aufnahme von oxLDL und somit zur Schaumzellbildung kommen kann. Bestimmte Stoffwechselprodukte des oxLDL, 9-HODE und 13-HODE, sind Aktivatoren von PPAR  $\gamma$ . So könnte oxLDL seine eigene Mehraufnahme durch Bildung eines positiven feed-back unkontrolliert steigern<sup>113</sup>.

Abgesehen von den monozytären Zellen wurde PPAR  $\gamma$  in Endothelzellen und glatten Muskelzellen<sup>89</sup>, die an der Bildung des atherosklerotischen Plaques beteiligt sind, nachgewiesen. Einer der ersten Schritte in der Atherogenese ist die Einwanderung von Entzündungszellen in die Gefäßwand durch vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen auf den Endothelzellen. Durch Behandlung mit den PPAR  $\gamma$ -Agonisten 9-HODE und 13-HODE kommt es auf Endothelzellen zu einer vermehrten Expression von ICAM-1<sup>28</sup>. Die Aktivierung von PPAR  $\gamma$  führt zu vermehrter Apoptose im Bereich des atherosklerotischen Plaques, ein Mechanismus, der die Entwicklung des nekrotischen Lipidkerns der Läsion fördert und so die Destabilisierung der Läsion zur Folge haben könnte<sup>31</sup>.

Neben den geschilderten potentiell proatherogenen Effekten kommt es im Rahmen der Aktivierung von PPAR auch zu potentiell antiatherogenen Effekten: Die Aktivierung von PPAR  $\gamma$  führt zur Hemmung der Produktion proinflammatorischer Zytokine in Monozyten/Makrophagen. Hierunter sind TNF  $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 zu nennen. Zusätzlich wird die Expression von iNO- Synthase, Gelatinase B und Scavengerrezeptor A (SR-A) gehemmt und es kommt es zur Hemmung von Transkriptionsfaktoren wie AP-1, STAT und NF- $\kappa$ B<sup>73,135</sup>. Ein Plaque-stabilisierender und somit positiver Effekt kann durch eine durch PPAR  $\gamma$  vermittelte Hemmung der Bildung von Matrix-Metalloproteinasen (MMP-9) in Monozyten entstehen<sup>105</sup>. Die verminderte Bildung von MMP-9 konnte auch in glatten Muskelzellen nach Stimulation von PPAR  $\gamma$  gezeigt werden, wodurch die Mobilität glatter Muskelzellen eingeschränkt wird<sup>104</sup>. Troglitazon konnte die Proliferation und Migration glatter Muskelzellen und so die Intimahyperplasie hemmen<sup>90</sup>.

Dies sind nur einige der durch PPAR  $\gamma$  am atherosklerotischen Plaque ausgelösten Effekte. Tabelle 3 gibt einen Überblick über die bisher beschriebenen Effekte von PPAR  $\gamma$  und auch PPAR  $\alpha$ , der ebenfalls in Zellen des atherosklerotischen Plaques nachgewiesen wurde, auf die Mechanismen der Atherogenese.

PPAR $\alpha$	
Potentiell proatherogene Effekte	Potentiell antiatherogene Effekte
<p>Endothel:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Vermehrte Bildung von MCP-1 und IL-8</li> </ul> <p>Monozyten/ Makrophagen:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Induktion von Apoptose</li> </ul>	<p>Endothel:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Verminderte Bildung von VCAM-1</li> <li>• Verminderte Bildung von Endothelin</li> </ul> <p>Glatte Muskelzelle:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Verminderte Bildung von IL-6, Prostaglandin und COX-2</li> </ul> <p>Monozyt/Makrophage:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Verminderte Bildung von Tissue Factor und TNF <math>\alpha</math></li> </ul>
PPAR $\gamma$	
Potentiell proatherogene Effekte	Potentiell antiatherogene Effekte
<p>Endothel:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Vermehrte Bildung von PAI-1</li> <li>• Vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen</li> </ul> <p>Monozyt/Makrophage:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Vermehrte Expression von CD 36</li> <li>• Schaumzellbildung</li> <li>• Induktion von Apoptose</li> </ul>	<p>Endothel:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Verminderte Bildung von Chemokinen und Endothelin</li> <li>• Verminderte Bildung von PAI-1</li> <li>• Verminderte Expression von Adhäsionsmolekülen</li> </ul> <p>Glatte Muskelzelle:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hemmung der Migration und Proliferation</li> <li>• Verminderte Bildung von MMP-9</li> <li>• Verminderte Expression von Angiotensin II Rezeptoren</li> <li>• Vermehrte NO-Produktion</li> </ul> <p>Monozyt/Makrophage:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Verminderte Bildung von MMP-9</li> <li>• Verminderte Bildung von Zytokinen</li> <li>• Verminderte Expression von SR-A</li> <li>• Verminderte Bildung von i-NOS und Gelatinase B</li> </ul>

Tabelle 3: Einflüsse von PPARs auf die Atherogenese nach Marx et al.<sup>103</sup>

Somit lässt sich kein unimodaler Effekt einer PPAR  $\gamma$ - Aktivierung auf die Arteriosklerose vermuten. Auch eine Zuordnung von pro- oder antiatherogenen Effekten zu einem PPAR- Subtyp ist nicht möglich.

Zum Teil wurden auch widersprüchliche Ergebnisse berichtet. So fanden Pasceri et al. im Gegensatz zu Chen et al. eine Hemmung Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle durch Behandlung mit Troglitazon und 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub><sup>127</sup>. Ähnlich gegensätzliche Ergebnisse finden sich bezüglich der Bildung von PAI-1<sup>103</sup>.

### 3 Fragestellungen

Wie beschrieben ist PPAR  $\gamma$  in mehreren Zellen des atherosklerotischen Plaques hochexprimiert und beeinflusst zahlreiche Mechanismen der Atherogenese. Ziel dieser Arbeit war es, an einem Makrophagenmodell, der MM6 sr Zelle, die Wirkung einer Stimulation des Transkriptionsfaktors PPAR  $\gamma$  auf die Expression atherogener Scavengerrezeptoren und die funktionellen Auswirkungen des veränderten Rezeptorstatus auf die oxLDL- Aufnahme zu untersuchen sowie die daran beteiligten Regulationsmechanismen zu klären. Insbesondere sollte auch die Expression des Cholesterintransporters ABCA 1, der den reversen Cholesterintransport initiiert, untersucht werden.

Dabei wurden verschiedene PPAR  $\gamma$ - Liganden verwendet: An synthetischen Liganden wurde aus der Gruppe der NSAR Indomethacin ausgewählt und als Maßstab wurde 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub>, der präsumtive physiologische Ligand, eingesetzt.

Als pharmakologisch bedeutsamer Ligand wurde Rosiglitazon verwendet. Damit sollte dessen Wirkung auf Mechanismen der Atherogenese abgeschätzt werden.

Weiteres Ziel dieser Arbeit war es, Interaktionen des PPAR  $\gamma$ -Transduktionsweges mit anderen, für die Atherogenese potentiell relevanten Signalwegen zu charakterisieren. Da die Hyperinsulinämie im Rahmen des metabolischen Syndroms eine wichtige Rolle für arteriosklerotische Gefäßwandveränderungen spielt, und Thiazolidindione an peripheren Zellen als Insulinsensitizer wirken, sollte die Interaktion der PPAR  $\gamma$ - und Insulin- Signalwege auf die Expression von Scavengerrezeptoren auf Makrophagen untersucht werden.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Geräte

- Autoklav Schütt Bioclave, Göttingen
  - Automatik-Pipetten Gilson ABIMED, Langenfeld
  - Destilliertes Wasser: Milli Q Plus PF Milli Pore, Schwalbach
  - DNA Thermal Cycler 480 Perkin Elmer, Weiterstadt
  - Durchfluss-Zytometer (FACScan) Becton Dickinson, Heidelberg  
Software: Cellquest
  - FACS-Röhrchen Becton Dickinson, Heidelberg
  - Fluoreszenzmikroskop:  
DMRBE Leica, Wetzlar  
Kamera und Software:  
SPOT Visitron Systems, Puchheim
  - Gelelektrophorese  
Gelkammer: Sub-Cell GT DNA Bio Rad, München  
Stromversorgung: LKB GPS 200/400 Pharmacia, Upsala, Schweden
  - HPLC Gilson ABIMED, Langenfeld  
1 Dynamic Mixer 811C  
1 UV-Detektor 115  
2 Pumpen 307 und 306  
Autoinjektor 234  
System Interface Module 506 C  
Injektionsventil Rheodyne 7125  
Auswertesoftware: 712 HPLC Controller Version 1.20
- Säulen: Toso-Haas, Stuttgart  
Hauptsäule: TSK-GEL DEAE-NPR: 3,5 cm x 4,6 mm,  
2,5 µm Partikeldurchmesser  
Vorsäule: TSK-GEL DEAE-NPR: 0,5 cm x 4,6 mm,  
2,5 µm Partikeldurchmesser
- Kulturflaschen, Kulturschalen:  
96 well Platte Limbro, Titertek, ICN Biomedicals Inc.  
24 well Platte Falcon, Becton Dickinson Labware,  
Franklin Lake, NJ, USA  
75 ml Flasche Nalge Nunc International, Dänemark  
125 ml Flasche Nalge Nunc International, Dänemark
  - Kanülen: 0,4 mm Innendurchmesser Microlance, Frankreich
  - Mikroskop:  
IX 50-S8-F2 Olympus, Japan
  - Laborkleingeräte Ika Labortechnik, Stauffen
  - LPS Filterkartuschen U2000 Gambro, Hechingen
  - Neubauer Zählkammer
  - Pap Pen Daido Sangyo Co, LTD, Japan
  - PCR Tubes (Reaktionsgefäße) BIOCYM, Hessisch Oldendorf

- pH-Meter:  
765 Calimatic mit Messkette SE 103 Krück, Berlin
- Photometer:  
RNA/DNA-Calculator Gene Quant II Amersham Pharmacia Biotech  
Cambridge, England
- Reaktionsgefäße:  
0,5 ml Eppendorf, Hamburg  
1,5 ml, 2,0 ml Sarstedt, Nürnberg  
15 ml, 50 ml Sarstedt, Nürnberg
- Speedvac System UniEquip, Martinsried
- Spritzen: 1, 2, 5, 10, 50 ml Braun, Melsungen
- Steri-Cult 200 Incubator Forma Scientific Labotec GmbH, Göttingen
- Steri-Cap™ Vacuum Drive Disposable Filtration System Millipore Corporation, Bedford, USA
- Sterilbank: GELAIRE BSB 4A Flow Laboratories, Michigan City, USA
- Sterile Auslaufpipetten Sarstedt, Nürnberg
- Sterilfilter Minisart Sartorius, Göttingen
- Stickstoffbehälter L'air liquide, Champigny, Frankreich
- Waagen Sartorius, Göttingen
- Wasserbad Köttermann, Ütze-Hänigsen
- Zentrifugen:  
neoLab 16/18 für PCR Hermle Labortechnik, Wehingen  
Omnifuge 20 RS für Zellkultur Heraeus Instruments GmbH,  
Osterode  
  
MR18 22 für mRNA-Isolierung Jouan GmbH, Unterhaching  
Labofuge Ae für Mikroskopie Heraeus Instruments GmbH,  
Osterode

#### 4.1.2 Chemikalien

- 1,1'-Dioctadecyl-3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanin perchlorat (dil) Molecular Probes, USA
- Aceton Merck, Darmstadt
- NEEO Agarose Rotigrose, Roth, Karlsruhe
- Annexin V-Binding Buffer (10x ) Phar Mingen, Becton Dickinson
- Borsäure Sigma, Deisenhofen
- Bovines Serum Albumin Sigma, Deisenhofen
- Calciumchlorid Sigma, Deisenhofen
- Chloroform p.A. Merck, Darmstadt
- DEPC Sigma, Deisenhofen
- Diethylether Merck, Darmstadt
- Deoxynukleotidtriphosphat-Set (dNTPs) PeqLab, Erlangen
- DMSO Sigma, Deisenhofen
- DNA-Längenstandard 100 bp PeqLab, Erlangen
- EDTA Merck, Darmstadt
- Essigsäure Merck, Darmstadt
- Ethanol Merck, Darmstadt

- Ether Merck, Darmstadt
- Ethidium Bromid Sigma, Deisenhofen
- FACS-Puffer Becton-Dickenson, Heidelberg
- Fenofibrat Sigma, Deisenhofen
- Fenoprofen Sigma, Deisenhofen
- Fetal Calv Serum Sigma, Deisenhofen
- Flufenamsäure Sigma, Deisenhofen
- Guanidin-HCl Sigma, Deisenhofen
- Hanks´ Balanced Salt Solution (10fach) Sigma, Deisenhofen
- Hepes Buffer 1M Sigma, Deisenhofen
- Human Serum Bio Whittaker, Walkerville, Maryland, USA
  
- Ibuprofen Sigma, Deisenhofen
- Indomethacin Sigma, Deisenhofen
- Insulin Sigma, Deisenhofen
- Isopropanol Fluca Chemie, Buchs, Schweiz
- Ladepuffer 6x PeqLab, Erlangen
- Magnesium Chlorid 25mM für PCR Quiagen, Hilden
- Magnesium Chlorid Sigma, Deisenhofen
- Methanol Merck, Darmstadt
- Methoprene acid Biomol, Hamburg
- M-MLV, reverse Transkriptase Life Technologies, Eggenstein
- Moviol
- Natriumacetat Sigma, Deisenhofen
- Natrium-Citrat Di-Hydrat Sigma, Deisenhofen
- Natriumchlorid Sigma, Deisenhofen
- NEAA Sigma, Deisenhofen
- N-Lauroylsacrosine Sigma, Deisenhofen
- Oxalacetat Sigma, Deisenhofen
- Paraformaldehyd Sigma, Deisenhofen
- PBS Sigma, Deisenhofen
- PBS (Phosphatpuffer): Dulbelcos ohne Magnesium und Calcium und Bicarbonat Gibco, Boehringer, Mannheim
- PCR-Puffer 10x Quiagen, Hilden
- Penicillin/Streptomycin Sigma, Deisenhofen
- Phenol Amresco, Solon, Ohio
- Primer-Oligonukleotid-Synthese Metabion, Martinsried
- 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J2 Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
- Pyruvat Fluca Chemie, Buchs, Schweiz
- Random Hexamer Primer (pd(N)<sub>6</sub>) Boehringer, Mannheim
- Rosiglitazon Glaxo-SmithKline
- RPMI-Medium Sigma, Deisenhofen
- RQ1 DNase Buffer 10x Reaction Promega, Madison, WI, USA
- RQ1 RNase-Free DNase Promega, Madison, WI, USA
- RQ1 DNase Stop-solution Promega, Madison, WI, USA
- Salicylsäure Sigma, Deisenhofen
- SDS Sigma, Deisenhofen

- Taq-Polymerase Qiagen, Hilden
- Tris-(hydroxymethyl)-amino-methane, hydrochloride p.A. Serva GmbH, Heidelberg

#### 4.1.3 Antikörper

- Annexin V-FITC Phar Mingen, Becton Dickinson
- Annexin V-PE Phar Mingen, Becton Dickinson
- Goat Anti-mouse FITC-conjugated F(ab')<sub>2</sub> fragment Dako A/S, Glostrup, Dänemark
- Mouse IgG Anti Human CD36 FA6-152 Immunotech, Marseille, Frankreich
- Mouse IgG<sub>1</sub> kappa (MOPC 21) Sigma, Deisenhofen
- PPAR<sub>γ</sub>-IgG<sub>1</sub> mouse monoclonal Ak (E-8) Santa Cruz Biotechnology

#### 4.1.4 Zellkulturmedien

Mono Mac 6 Zell Medium:

RPMI 1640 Medium wird zusätzlich versetzt mit:

Penicillin/Streptomycin	200 U/ml / 200 µg/ml
NEAA 100x	1x
Insulin	9 µg/ml
Oxalacetat	1 mM
Pyruvat	1 mM

Insulinlösung: 100 mg Insulin in 110 ml phosphatfreiem Puffer lösen und sterilfiltrieren

Das komplette Medium wird mit Hilfe einer Pumpe durch eine LPS-retinierende Kartusche gepumpt und anschließend sterilfiltriert. In diesem Zustand ist es bei 4°C für ca. 3 Monate haltbar.

Zur Verwendung in der Zellkultur wird es mit 10 % FCS versetzt. Das FCS wurde für 30 min bei 58 °C dekomplementiert, um mögliche Einflüsse auf die Zellkultur zu vermeiden.

Um insulinfreies Medium zu erhalten, wurde in obiger Rezeptur die Insulinlösung durch Puffer ersetzt.

#### 4.1.5 Puffer und Lösungen für die RNA-Isolierung und PCR

Alle Lösungen wurden mit DEPC (Diethyl Pyrocarbonat) -behandeltem Wasser angesetzt. Dazu werden 2 ml DEPC auf 1 L Milli-Q Wasser gegeben, gut geschüttelt und anschließend autoklaviert, um die enzym-degradative Potenz des DEPC zu zerstören.

- Lysis Puffer (Guanidin HCl-Lysis-Puffer)
 

Guanidin HCl	7,5 M
Tri-Natrimcitrat-Dihydrat	25 mM
N-Lauroylsacrosine	3,5 mM

pH 5,2 mit 1M Essigsäure einstellen

- PK-Puffer zur RNA-Rehydrierung
 

Tris-HCl	50 mM
NaCl	25 mM
EDTA	5 mM
SDS	0,1 %
Natrium-Acetat pH 5,0	0,3 mM
  
- dNTP-Lösung  
Die vier Nukleotid-Lösungen wurden gemischt und 10 mM konzentriert.

#### 4.1.6 HPLC-Laufmittel

- Lösung A: 25 mM Tris-HCl, pH 9
- Lösung B: 25 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 9

#### 4.1.7 Weitere Puffer und Lösungen

- TBE Laufpuffer für Agarose Gel:
 

Tris basisch	0,5 M
Borsäure	0,415 M
EDTA	10 mM
pH 8,0	
  
- Puffer für CD 36 Immuncytochemie (für 250 ml Puffer)
 

HBSS (10x)	25 ml
Hepes 1M	2,5 ml
MgCl <sub>2</sub> 1 M	0,25 ml
CaCl <sub>2</sub> 1 M	0,25 ml

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Kultur monozytärer Zelllinien

Als Zellmodell wurde für diese Arbeit die monozytäre Zelllinie Mono Mac 6 sr (MM6 sr)<sup>143</sup> ausgewählt, eine Subline der monozytären Tumorzelllinie Mono Mac 6<sup>177</sup>.

Diese Zelle weist bereits basal eine Oberflächenexpression an Scavenger-Rezeptoren auf und kann deshalb schon in unstimuliertem Zustand sowohl modifizierte als auch unmodifizierte Lipoproteine aufnehmen und verstoffwechseln. Die Zellen wurden als Suspensionszellkultur in Mono Mac 6 Zell-Medium im Inkubator bei einer Temperatur von 37 °C in mit 5% CO<sub>2</sub> und 90% Luftfeuchtigkeit angereicherter Raumluft gezogen. Die Zellkultur war in Aliquots zu je 2 ml auf 24 well-Platten verteilt. Die routinemässige Zellpassage erfolgte zweimal pro Woche, d.h. alle 3 bzw. 4 Tage; hierzu wurde zunächst die Hälfte des Mediums aus jedem well abgenommen, und die leicht adhärenen Zellen nach Resuspendieren mit dem Pipettenstrahl in einem 50 ml cup gesammelt. Nachdem die Konzentration der Zellsuspension mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer lichtmikroskopisch bestimmt worden war, wurde eine Startkonzentration von 200 000 Zellen/ml durch Zugabe der erforderlichen Menge frischen, auf 37 °C vorgewärmten Mediums eingestellt, und die passagierten Zellen wieder auf Zellkulturplatten verteilt.

Auch für Versuchsansätze wurde diese Startkonzentration gewählt.

Das als Lösungsmittel für verschiedene Substanzen verwendete DMSO überschritt in keinem Experiment eine Endkonzentration von 0,1% und beeinflusste die Zellkultur nicht.

Bei der Behandlung der Zellen wurde stets auf Sterilität geachtet.

Das normale MM6 Zell-Medium enthält Insulin in einer Konzentration von 9 µg/ml. Da in dieser Arbeit auch der Einfluss des Insulins auf die Scavengerrezeptor-Expression untersucht werden sollte, mussten Zellen auch in insulinfreiem Medium gezogen werden. Hierzu wurden Zellen wie zur Zellpassage geerntet, nun jedoch abzentrifugiert (800 U/min, 3 min, 20°C), einmal in insulinfreiem Medium gewaschen und nach Einstellen der Startkonzentration auf Zellkulturplatten verteilt. Um eventuell noch zelladhärent vorhandenes Insulin zu verbrauchen, wurden die Zellen nach dem Umsetzen in insulinfreies Medium für die Dauer einer Zellpassage ohne Insulin

kultiviert, bevor die Experimente gestartet wurden. Um Irritationen durch die Zentrifugation und Waschvorgänge auszuschließen, wurden die Kontrollzellen derselben Prozedur in insulinhaltigem Medium unterzogen.

Die Zellvitalität wurde bei den Insulinversuchen wie auch bei den anderen Experimenten mit Hilfe des Annexin V-FITC Assay's bestimmt (siehe Kapitel 4.2.3.1).

#### 4.2.2 Präparation und Markierung von LDL

LDL wurde aus peripherem Vollblut von gesunden Spendern gewonnen. Die Spender waren frei von Medikamenten, nüchtern, Nichtraucher und mit normalen Plasma-Lipid Spiegeln. Das Blut wurde in EDTA (1mg/ml) gesammelt und anschließend zentrifugiert (1500 x g, 30 min, 4°C). Das Plasma wird mit NaN<sub>3</sub> (0,5‰), Gentamicin (0,08‰), Thimerosal (0,1‰) und Phenylmethylsulfonylfluorid (1mM) stabilisiert.

Das LDL wird durch sequentielle Ultrazentrifugation (150000 x g, 20 h, 20°C) nach dem Prinzip von Havel in dem Intervall von 1,019 bis 1,063 g/ml des Dichtegradienten isoliert<sup>66</sup>. Das von HDL und VLDL gereinigte LDL wird dialysiert, um die Salze zu entfernen. Danach wird das LDL sterilfiltriert und mit N<sub>2</sub> begast, um eine unerwünschte Oxidation zu verhindern, bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt und innerhalb von 4 Wochen verwendet.

Die Oxidation wurde mit Kupfersulfat durchgeführt, wobei vorher ein Dialyseschritt notwendig ist, da der Komplexbildner EDTA entfernt werden muss, der sonst die Kupferionen abfangen würde. LDL mit einer Proteinkonzentration von 200 µg/ml wird 20 Stunden bei 37°C in Gegenwart von 5 µM CuSO<sub>4</sub> oxidiert, und die Reaktion mit EDTA gestoppt.

Oxidiertes LDL (1mg/ml) wurde mit 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanin perchlorat (Dil, 0,225mg/ml) in Gegenwart von 3 Volumen Lipoprotein-defizientem Serum (30 mg Protein/ml) und Ascorbinsäure (100 µM) über Nacht bei 37°C fluoreszenzmarkiert<sup>159</sup>. Die Lipoproteine werden durch sequentielle Ultrazentrifugation (150000 x g, 20 h, 20°C) aufkonzentriert, dialysiert,

sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

Die Konzentrationsbestimmung der nativen, modifizierten und markierten Lioproteine erfolgte nach der Lowry-Methode<sup>98</sup>.

### 4.2.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (FACS= fluorescence activated cell scan) ist eine optische Messmethode zur Beurteilung verschiedener Zelleigenschaften wie Größe, Granularität und Fluoreszenzverhalten. In einem Durchflusszytometer werden Zellen einer Suspension über eine Kapillare an eine Laserlichtquelle, hier ein Argonlaser, und ein Detektorsystem herangeführt. Nach Verlassen der Kapillare wird die Zellsuspension von einem Hüllstrom aus speziellem FACS-Puffer umgeben, so dass die Zellen einzeln, wie an einer Perlenkette aufgereiht, in der optimalen Fokussierungsebene die Detektoreinheit passieren. Dies geschieht mit so hoher Geschwindigkeit, dass in einer Sekunde ca. 1000-2000 Zellen analysiert werden können.

Kreuzt eine Zelle den Laserstrahl, streut sie das Laserlicht. Durch Analyse des Streuverhaltens bekommt man Informationen über die Zellgröße und Struktur. Hierbei korreliert das Vorwärtsstreulicht (FSC= forward scatter) mit der Zellgröße und das Seitwärtsstreulicht (SSC= sidewart scatter) mit der Granularität bzw. dem Gehalt an intrazellulären lichtbrechenden Strukturen. Diese Daten werden in dot plot-Diagrammen dargestellt. Durch Setzen eines gates innerhalb des dot plots hat man die Möglichkeit, nur bestimmte Teilpopulationen zu messen oder Zelldetritus von der Messung auszuschließen. Meist geschieht dies schon während der Messung (live gate).

Über weitere Detektoren wird das Fluoreszenzverhalten der einzelnen Zelle analysiert. Auf diese Weise kann über an spezifische Antikörper gekoppelte Fluorochrome - durch Messung der Intensität des nach Anregung durch den Argonlaser (488 nm) emittierten Fluoreszenzlichts - auf die Expression der markierten Proteine rückgeschlossen werden. Hierbei muss sowohl die Eigenfluoreszenz der Zelle wie auch die Fluoreszenz durch unspezifische Bindung des Antikörpers berücksichtigt werden. Tabelle 4 zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Fluorochrome mit ihren Fluoreszenzeigenschaften.

<b>Fluorochrom</b>	<b>Anregung</b>	<b>Emission</b>	<b>Kanal</b>	<b>Verwendet als:</b>
Fluorescein	495 nm	520 nm	FL-1	FITC labeled goat-anti-mouse Antibody, Annexin V-FITC
Phycoerythrin	495 nm	575 nm	FL-2	Annexin V-PE
Propidiumiodid	495 nm	637 nm	FL-2	Direkter DNA Farbstoff
dil	495 nm	580 nm	FL-2	Markierung von oxLDL

Tabelle 4: Fluorochrome und ihre Verwendung

Durch gleichzeitige Verwendung verschiedener Farbstoffe, deren Fluoreszenz in unterschiedlichen Kanälen detektiert wird, können simultan mehrere Eigenschaften einer Zelle gemessen und korreliert werden. Diese Technik wurde bei den Experimenten der CD36/Annexin-Doppelfärbung angewandt. Da die Auftrennung der Fluoreszenzspektren der einzelnen Fluorochrome nie ganz eindeutig ist, muss durch die sogenannte Fluoreszenzkomensation a.e. auf Softwareebene korrigiert werden, um eine möglichst optimale Trennung der Signale zu erhalten.

Die so gewonnenen Daten werden in Form von Histogrammen visualisiert. Dazu werden die Zellen nach ihrer Fluoreszenzintensität einzelnen Kanälen zugeteilt. Dann wird die Häufigkeit der Zellen mit einer bestimmten Fluoreszenzintensität (lineare Skala) über der Fluoreszenzintensität aufgetragen (logarithmische Skala). Aus diesen Diagrammen können für die weitere statistische Auswertung valide Daten – in unserem Fall der MEAN-Wert - abgelesen werden, da in jeder Messung mehrere tausend Zellen erfasst wurden.

#### **4.2.3.1 Annexin V Assays**

Zur Beurteilung der Zellvitalität wurden Annexin V Assays durchgeführt. Bei dieser Methode nutzt man die Eigenschaft von Annexin V in Gegenwart von Calciumionen mit hoher Affinität und Spezifität an Phosphatidylserin auf dem äußeren Blatt der

Zellmembran zu binden. In frühen Phasen der Apoptose, noch vor anderen apoptotischen Veränderungen wie Aufhebung der Membranintegrität, Zellschwellung und DNA-Fragmentation, kommt es zu Veränderungen an der Zellmembran. Die Asymmetrie der Zellmembran wird aufgehoben und es kommt zur Translokation von Phosphatidylserin an die Zelloberfläche<sup>165</sup>. Dadurch sendet die kurz vor dem Selbstmord stehende Zelle Signale an die Umgebung aus, die unter anderem die Phagozytose der sterbenden Zelle einleiten.

Durch die Kopplung von Annexin V mit Fluorochromen ist die spezifische Markierung präapoptotischer Zellen und somit auch die Detektion mittels Durchflusszytometrie oder Fluoreszenzmikroskopie möglich. Dieser Test ist somit sehr sensibel für frühe Phasen der Apoptose, wenn andere Tests wie Propidiumiodid- oder Trypanblau-Färbung noch negativ sind. Denn diese Tests beruhen bereits auf der Störung der Membranintegrität apoptotischer Zellen.

Hierzu wurden ca. 50 000 Zellen nach einmaligem Waschen (800 U/min, 4°C, 3 min) in PBS mit 2 µl Annexin V-FITC sowie 20 µl Binding Buffer, gelöst in 180 µl PBS, behandelt und im Dunkeln für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Darauf folgte eine durchflusszytometrische Auswertung. Die Menge der präapoptotischen Zellen wurden mit Hilfe eines Gates (M1), das im Histogramm im Bereich der präapoptotischen Zellen gesetzt wird, gemessen und in Prozent der Gesamtzellzahl angegeben.

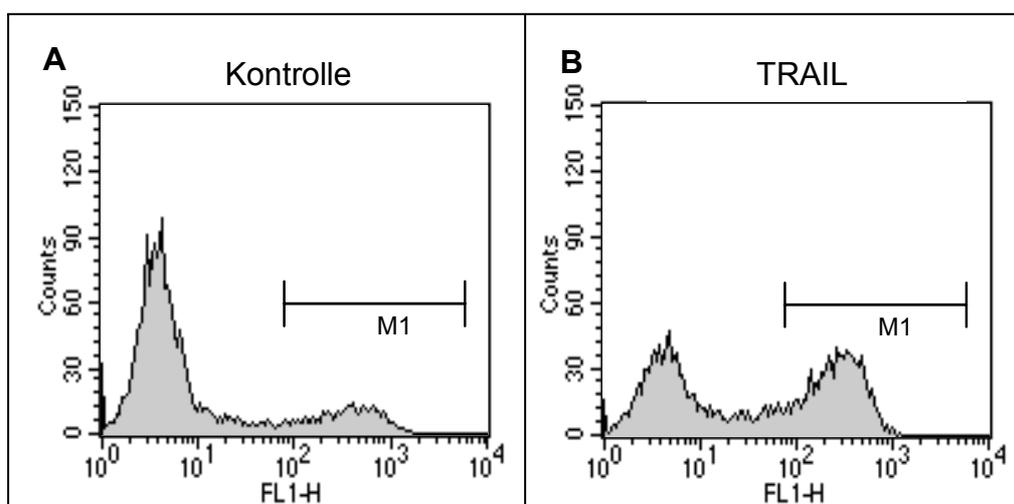


Abbildung 13: Annexin-Assay. Repräsentative Histogramm-Plots einer Messung mit Annexin V-FITC. (A) Kontrollzelle. (B) An MM6 sr Zellen wurde durch TRAIL Apoptose induziert.

In den meisten Fällen wurde FITC-markiertes Annexin V verwendet; wenn nötig, kam jedoch auch Phycoerythrin-markiertes Annexin V zur Anwendung.

#### 4.2.3.2 Messung der CD 36- Oberflächenexpression

Die zu untersuchenden Zellen wurden aus der Kultur entnommen und, nachdem eine Kontamination der Kultur lichtmikroskopisch ausgeschlossen war, mit einer Neubauer-Kammer gezählt. Wenn nötig, wurde eine Apoptosemessung vorgenommen. Aus jeder Behandlung wurden 1000 000 Zellen in den Versuch aufgenommen, das Medium abzentrifugiert (800 U/min, 4°C, 5 min) und die Zellen einmal in Puffer (HBSS mit 10mM HEPES und 1 mM  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ) mit 0,5 % BSA gewaschen und resuspendiert. Der gesamte Versuch wurde auf Eis durchgeführt, um eine aktive Internalisierung gebundener Proteine zu vermeiden. Zur Blockierung unspezifischer Bindung an den  $\text{Fc}$ -Rezeptoren wurden die Zellen für 30 Minuten in Puffer mit 5 % Humanserum inkubiert. Danach wurden die Zellen nach dreimaligem Waschen in Puffer mit 0,5 % BSA auf 96 well Platten mit Rundboden verteilt, die Zellen jeder Behandlung auf je zwei Wells. Nun folgte eine 30-minütige Inkubation mit einer sättigenden Menge (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) des spezifischen Maus-Antikörpers FA6-152 anti- CD 36<sup>45</sup> und des Isotyp-Antikörpers MOPC-21 derselben Antikörperklasse. Diese Isotypkontrolle ist nötig um die spezifische Bindung des Antikörpers zu bestimmen, die sich aus der Differenz der gesamten Bindung des spezifischen Antikörpers und der der unspezifischen Isotypkontrolle ergibt. Denn der Isotyp-Antikörper reagiert mit allen Proteinen, die eine Affinität zur konstanten Region der Antikörperfamilie aufweisen, ohne dass sie mit dem untersuchten Protein funktionell und genetisch übereinstimmen.

Auf die Inkubation folgte ein dreimaliger Waschvorgang um überschüssige, ungebundene Antikörper zu entfernen. Um die gebundenen Antikörper detektieren zu können, wurden die Zellen mit einem sekundären, Fluoreszein-makierten Antikörper (Goat anti-Mouse FITC-conjugated  $\text{F}(\text{ab}')_2$  fragment) ebenfalls in sättigender Konzentration (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) für 30 Minuten inkubiert. Um die Leuchtkraft des Fluoresceins nicht zu schädigen, wurde im abgedunkelten Raum gearbeitet. Nachdem ungebundene Antikörper durch Waschen entfernt wurden, wurden die

Zellen in 2% Paraformaldehyd in PBS fixiert, in FACS-Röhrchen überführt und am Durchflusszytometer analysiert. Um eine Zählrate von ca. 1000 Zelle pro Sekunde zu erreichen, wurde die Zellsuspension nach Bedarf verdünnt.

#### **4.2.3.3 Messung der intrazellulären PPAR $\gamma$ - Expression**

MM6 sr Zellen wurden nach Inkubation aus der Kultur entnommen und, nachdem deren Vitalität beurteilt worden war, abzentrifugiert (800 U/min, 20°C, 5 min), einmal in PBS gewaschen und für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 2 % PFA fixiert. Da bei dieser Färbung die Zellen bereits zu Beginn fixiert werden, kann der gesamte Versuch bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Danach wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit einem Aceton-Methanol-Gemisch (1:1) für 2 Minuten permeabilisiert, und die Zellsuspension im Anschluss daran sofort mit ca. 10 ml PBS verdünnt und zweimal in PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen für 30 Minuten in PBS mit 10% Humanserum inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu blockieren. Die Zellen wurden auf 96 well Platten verteilt und mit verschiedenen Antikörpern inkubiert: Zunächst wurden die Zellen für 30 Minuten mit dem monoclonalen Maus-Antikörper anti-PPAR  $\gamma$  E-8 inkubiert. Als Negativkontrolle wurde wie oben MOPC-21 verwendet. Als weitere Negativkontrolle dienten PPAR  $\gamma$  E-8 Antikörper, deren spezifische Bindungsstellen durch Vorinkubation mit einem blockierenden Peptid blockiert worden waren. Nach zweimaligem Waschen in PBS mit 1,5 % Humanserum folgte eine Inkubation mit sekundären FITC-konjugierten Antikörpern (Goat anti-Mouse FITC-conjugated F(ab')<sub>2</sub> fragment). Nach wiederholtem Waschen wurde die Färbung in 2% PFA fixiert und umgehend am Durchflusszytometer ausgewertet. Da die Zellen durch das Permeabilisieren beschädigt werden, ist bei diesem Experiment die Verwendung eines life-gates zur Eliminierung von Zelldetritus besonders wichtig.

#### **4.2.3.4 Doppelfärbung Annexin V / CD 36 - Oberflächenexpression**

Zur sicheren Unterscheidung vitaler und präapoptotischer Zellen in einer Population und deren Korrelation mit der CD 36- Oberflächenexpression wurden in dieser Arbeit auch Annexin V / CD 36- Doppelfärbungen durchgeführt. Dazu wurde zunächst

CD 36 mit Antikörpern markiert. Hierzu wurde wie unter 4.2.3.2 verfahren. Am Ende wurden die Zellen jedoch nicht fixiert, sondern auf Eis mit PE-markiertem Annexin V inkubiert. Diese Doppelfärbung erlaubte an jeder Zelle die simultane Messung der CD 36- Oberflächenexpression und Bestimmung der Zellvitalität in zwei verschiedenen Fluoreszenzkanälen.

#### **4.2.3.5 Messung der Aufnahme von oxLDL**

Nach Stimulation wurden MM6 sr Zellen auf eventuelle Veränderungen der Aufnahme von oxidiertem LDL untersucht. Die Zellen wurden der Kultur entnommen und in frischem Medium in 24 well Platten ausgesät. Es wurde darauf geachtet, dass möglichst nur eine Zellschicht am Boden der Kulturschale entsteht, um allen Zellen in gleichem Maße Kontakt mit dem zugegebenen oxLDL zu ermöglichen. Je einem Aliquot jeder Behandlungsart wurde zunächst unmarkiertes oxLDL in hoher Konzentration (25-fache Konzentration des dil-oxLDL) zugegeben und die Zellen für 10 Minuten bei 37°C vorinkubiert, um die unspezifische LDL-Bindung zu ermitteln. Dann wurde den vorinkubierten Kontrollansätzen wie auch den anderen Ansätzen Dil- markiertes oxLDL in einer Konzentration von 10µg/ml zugegeben, und die Zellen für 3 Stunden bei 37°C in Brutschrank inkubiert. Nach der Inkubation wurde durch Waschen in PBS mit 0,5% BSA überschüssiges, ungebundenes dil-oxLDL entfernt, die Zellen in 2% PFA in PBS fixiert und am Durchflusszytometer ausgewertet.

#### **4.2.4 Immunfluoreszenzmikroskopie**

Um Effekte von PPAR  $\gamma$ - Liganden auf die Expression und das intrazelluläre Verteilungsmuster von PPAR  $\gamma$  zu untersuchen, wurden die Zellen auf Objektträger aufzentrifugiert und immunzytochemisch behandelt. Die Konzentration der Zellsuspension wurde so eingestellt, dass es zu einem dichten Zellbeslag auf dem Objektträger kommt, jedoch Überlappungen vermieden werden. Um das Austrocknen zu verhindern, sollten die Zellen während des gesamten Versuches mit genügend Flüssigkeit bedeckt sein. Damit die Flüssigkeit nicht verläuft, wurden die Präparate vorher mit einem Pap pen umfahren. Wie bei den durchflusszytometrischen Messungen unter 4.2.3.3 beschrieben, wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und

mit Antikörpern inkubiert. Auch hier wurden Isotypkontrollen durchgeführt. Im Anschluß daran wurden die Präparate mit dem Eindeckmittel Mowiol überschichtet und zum Schutz mit Deckgläschen bedeckt und versiegelt. Mit Hilfe eines mit einer Digitalkamera ausgestatteten Fluoreszenzmikroskopes wurden Aufnahmen angefertigt, die dann mit einer Bildbearbeitungssoftware ausgewertet und archiviert wurden.

#### 4.2.5 mRNA- Isolierung

Zur Isolierung der RNA aus MM6sr Zellen wurde modifiziert nach der „Eppendorf-Methode“ vorgegangen. Diese beruht auf einer Guanidin-HCl- Lyse der Zellen, gefolgt von einer phenolischen Protein-Präzipitation zur Aufreinigung der RNA<sup>38</sup>. Die Herstellung der benötigten Lösungen ist unter 4.1.5 beschrieben. Um Kontaminationen mit Fremd-DNA und mit RNAsen zu verhindern, wurde unter der Sterilbank gearbeitet und ausschließlich autoklavierte Materialien verwendet. Die gesamte Isolierung und Reinigung erfolgte an drei aufeinanderfolgenden Tagen: Nachdem die Zellen bei den in den einzelnen Versuchen angegebenen Bedingungen inkubiert wurden, wurden für jede RNA-Probe ca.  $6 \times 10^6$  Zellen aus der Kultur entnommen, abzentrifugiert (800 U/min, 4°C, 5 min) und einmal in PBS ohne Calcium- und Magnesiumionen gewaschen. Nach dem Waschen wurde die Flüssigkeit vollständig entfernt, um ein trockenes Zellpellet zu erhalten. Dieses wurde in 800 µl Guanidin-HCl Lösung resuspendiert. Nachdem die Proben in 2 ml Reaktionsgefäße überführt worden waren, wurden sie mehrere Male mit hohem Druck durch eine feine Kanüle (0,4 mm) gepresst, um die vorhandene DNA durch Scherkräfte zu fragmentieren. Die Suspension wurde mit 0,5 Vol Ethanol vermischt und bei -20°C über Nacht gefällt.

Am folgenden Tag wurden die Proben in der vorgekühlten Zentrifuge abzentrifugiert (14000 U/min, 4°C, 10 min). Der Überstand wurde mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe und einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt, und das Pellet in 500 µl PK-Lösung resuspendiert und 3 Minuten geschüttelt. Daran schloß sich eine phenolische Fällung zur Entfernung der Proteine an: Die Proben wurden mit 500 µl wassergesättigtem Phenol überschichtet, 3 Minuten geschüttelt und zentrifugiert (14000 U/min, 4°C, 3 min). Nach der Zentrifugation wurde die wässrige Phase, in der die RNA enthalten

ist, vorsichtig mit einer sterilen Pipettenspitze abgezogen und in ein frisches 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Um eventuell zurückbleibende Spuren des Phenols zu extrahieren, wurden die Proben mit 1,5 ml wassergesättigtem Ether überschichtet, 3 Minuten gemischt und zur Phasentrennung zentrifugiert (14000 U/min, 4°C, 3 min). Die Etherphase wurde mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt. Den Proben wurde das 2,5-fache Volumen Ethanol zugegeben und es erfolgte eine erneute Fällung bei -20°C über Nacht.

Am dritten Tag wurden die Proben abzentrifugiert (14000 U/min, 4°C, 10 min), der Überstand vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und verworfen. Das erhaltene RNA-Pellet wurde in einer Vakuumzentrifuge ca. 15 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet und in DEPC-H<sub>2</sub>O resuspendiert. Um unlösliche Bestandteile zu entfernen, wurden die RNA-Proben nochmals zentrifugiert (14000 U/min, 4°C, 10 min) und vor der weiteren Verarbeitung in sterile 0,5 ml PCR-cups überführt. Wenn nicht sofort die RT-PCR durchgeführt wurde, wurden die Proben bei -80°C gelagert, wo sie über Jahre stabil gehalten werden können.

Die Konzentrationsbestimmung der RNA-Proben erfolgte an einem RNA/DNA Photometer mit Mikroküvetten. Es wurden aus jeder Probe 5 µl RNA-Suspension entnommen und mit 95 µl DEPC- H<sub>2</sub>O verdünnt. In einer simultanen Messung wurden die Extinctionen der Probe bei 260 nm und 280 nm gegen den Nullwert (Lösungsmittel) bestimmt. Über das Lambert-Beersche Gesetz kann aus der Extinction bei 260 nm auf die RNA-Konzentration der Lösung geschlossen werden:

$$E=c*d*\epsilon$$

E: Extinction, c: Konzentration, d: Dicke der Küvette in cm,  $\epsilon$ : molarer Extinctionskoeffizient.

Bei einer Küvettendicke von 1cm und einem Extinctionskoeffizienten für RNA  $\epsilon = 1/40$  bei 260 nm folgt für die Konzentration der RNA-Lösung:

$$c [\mu\text{g/ml}] = E * 40 * \text{Verdünnungsfaktor (hier: 20)}.$$

Durch die gleichzeitig erfolgende Messung der Extinction der RNA-Lösung bei 280 nm kann auf die Verunreinigung der RNA-Lösung mit Proteinen geschlossen werden: Ein akzeptabler Reinheitsgrad liegt vor, wenn:

$$E_{260} / E_{280} \geq 1,5.$$

#### 4.2.6 Behandlung der RNA mit DNase

Um eventuell noch vorhandene Kontaminationen der RNA-Proben mit DNA zu beseitigen, wurden sie mit DNase behandelt. Bei der RNase-freien DNase von Promega handelt es sich um eine DNase I, die sowohl doppelsträngige wie auch einzelsträngige DNA zerstört. Zu je 30  $\mu\text{l}$  RNA wurden 10  $\mu\text{l}$  des Reaktionsmixes (siehe Tabelle 5) auf Eis zugegeben.

Reagenz	$\mu\text{l}$
RQ-1 Puffer 10x	4,0
DNase	1,9
DEPC-H <sub>2</sub> O	4,1
Summe	10,0

Tabelle 5: DNase-Mix

Dann wurden die Proben 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen, wurde zu jeder Probe 4,0  $\mu\text{l}$  Stopp-Lösung zugegeben, und daraufhin die DNase durch eine zehnmütige Inkubation bei 65°C inaktiviert. Danach wurde die Konzentration der RNA-Lösung wie oben beschrieben photometrisch gemessen.

#### 4.2.7 Quantitative RT-PCR

Um die spezifische mRNA-Expression der Zellen zu messen, wurde eine quantitative RT-PCR durchgeführt. In einem ersten Schritt musste die gesamte RNA enzymatisch in cDNA umgeschrieben werden (Reverse Transkription), die dann einer spezifischen Vervielfältigung in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unterworfen wurde. Die entstehenden Amplifikate wurden mit Hilfe der Hochdruck-Flüssigchromatographie (HPLC) mit UV-Detektion quantifiziert. Eine qualitative Überprüfung erfolgte durch Agarosegelelektrophorese der Amplifikate.

##### 4.2.7.1 Reverse Transkription

Da in der PCR nur DNA als Matrize für die DNA-Polymerase dienen kann, musste

die in den Proben enthaltene mRNA zunächst in eine komplementäre cDNA umgeschrieben werden. Dies erfolgte mit Hilfe einer reversen Transkriptase aus dem murinen Mäuse Leukämie Virus (M-MLV-RT). Reverse Transkriptasen sind retrovirale Enzyme, die die RNA des Virus, nachdem sie bei der Infektion in die Wirtszelle eingeschleust wurde, in DNA transkribieren und so für die Vermehrung vorbereiten.

Bei der Reaktion wurden 20 µl der auf die Konzentration 100 pg/µl eingestellten RNA-Probe mit einem Mastermix (siehe Tabelle 6) versetzt.

Reagenz	µl
RH	4,0
dNTP-Mix	32,0
PCR-Puffer	8,0
M-MLV RT	2,0
DEPC-H <sub>2</sub> O	14,0
Summe	60,0

Tabelle 6: RT-Mastermix

Als Primer für die reverse Transkriptase dienen Random Hexamers (RH), die zufällig an die RNA binden. Für die Reaktion wurden die Proben im Thermocycler bei folgendem Temperaturprofil inkubiert:

- 10 Minuten bei 25°C
- 15 Minuten bei 42°C, dem Temperaturoptimum der M-MLV-RT
- 5 Minuten bei 95°C zur Inaktivierung des Enzyms.

Nach der Reaktion wurde die cDNA entweder sofort in die PCR eingesetzt oder bei -20°C gelagert.

#### 4.2.7.2 PCR

Die PCR (Polymerase Chain Reaktion) ist eine in vitro-Technik, mit der man gezielt DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten Sequenzen eingerahmt werden, vervielfältigen kann. Im Bereich dieser bekannten Sequenzen binden Oligonukleotidprimer, kurze einzelsträngige DNA-Moleküle, die komplementär zur

gewünschten Sequenz der DNA-Matrize sind. Eine DNA-Polymerase verlängert dann unter Verbrauch von Desoxyribonukleotidtriphosphaten die Primer entlang der DNA-Matrize und synthetisiert so neue doppelsträngige DNA Stränge. Da nun auch diese Kopien als Matrize dienen können, führt die Wiederholung zur exponentiellen Vermehrung und rasch zur Bildung großer Mengen gleicher DNA aus ursprünglich nur wenigen vorhandenen Kopien. Ein solcher Kopiervorgang wird als Zyklus bezeichnet, während dem die Proben ein bestimmtes Temperaturprofil durchlaufen:

- 30 Sekunden bei 95°C: Melting. Die doppelsträngige DNA wird in Einzelstränge aufgeschmolzen, damit sich die Primer anlagern können.
- 30 Sekunden bei 58°C: Annealing. Die Primer lagern sich an die DNA-Einzelstränge an. Die Annealingtemperatur ist von der Primerlänge und vom G/C-Gehalt des Primers abhängig.
- 60 Sekunden bei 72°C: Extension. Beim Temperaturoptimum der Taq-Polymerase kommt es zur Verlängerung der Stränge.

Nachdem dieser Vorgang ca. 30 mal wiederholt wurde, folgt eine einmalige Inkubation für 10 Minuten bei 72°C, um nicht fertiggestellte DNA-Kopien zu komplettieren.

In der PCR werden thermostabile DNA-Polymerasen verwendet wie z.B. die in dieser Arbeit verwendete Taq-Polymerase, die aus dem thermophilen Eubakterium *Thermus aquaticus* gewonnen wird. So wird eine wiederholte Zugabe des Enzyms bei jedem Zyklus vermieden, und eine automatisierte Durchführung im Thermocycler möglich. Um eine für die quantitative PCR notwendige, hohe Genauigkeit zu gewährleisten, mussten die Bedingungen soweit wie möglich standardisiert werden. Um Pipettierfehler bei der quantitativen PCR zu minimieren, wurden 12 µl der cDNA-Proben zu 48 µl eines PCR-Mastermixes (siehe Tabelle 7) gegeben.

Bevor die Proben im Thermocycler amplifiziert wurden, wurden sie mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet, um die Verdunstung des Lösungsmittels und damit verbundene Konzentrationsveränderungen zu verhindern. Das Öl wurde nach der PCR durch Chloroformextraktion wieder entfernt, wenn die Proben durch HPLC weiter analysiert werden sollten.

Reagenz	$\mu\text{l}$
Primer-Mix	5,0
dNTP-Mix	6,0
PCR-Puffer	4,8
Taq-Polymerase	0,3
DEPC-H <sub>2</sub> O	31,9
Summe	48,0

Tabelle 7: PCR-Mastermix

Um Kontaminationen, Missamplifikate und Inhibitoren der Reaktion auszuschließen, wurden bei jeder Reaktion negative Kontrollansätze ohne Template und positive Kontrollansätze mitgeführt.

Folgende Primerpaare wurden in dieser Arbeit verwendet (Tabelle 8):

Name	Primersequenz	Länge des Amplifikats
$\beta$ -Actin	Vorwärts: 5` - AGA GAT GGC CAC GGC TGC TT -3` Rückwärts: 5` - ATT TGC GGT GGA CGA TGG AG -3`	446 bp
CD 36	Vorwärts: 5` - GAG AAC TGT TAT GGG GCT AT -3` Rückwärts: 5` - TTC AAC TGG AGA GGC AAA GG -3`	389 bp
LDL-R	Vorwärts: 5` - CAA TGT CTC ACC AAG CTC TG -3` Rückwärts: 5` - TCT GTC TCG AGG GGT AGC TG -3`	258 bp
SR-B1	Vorwärts: 5` - TTC TGC CCG TGC CTG GAG TC-3` Rückwärts: 5` - GCT GTC TGC TGG GAG AGT C -3`	673 bp
LOX-1	Vorwärts: 5` - TTA CTC TCC ATG GTG GTG CC -3` Rückwärts: 5` - AGC TTC TTC TGC TTG TTG CC -3`	195 bp
PPAR $\gamma$	Vorwärts: 5` - CAT GGC AAT TGA ATG TCG TG -3` Rückwärts: 5` - CGT GGA CTC CAT ATT TGA GG -3`	653 bp
ABCA-1	Vorwärts: 5` - GCA CTG AGG AAG ATG CTG AAA -3` Rückwärts: 5` - ATG TCC TGG AAG GTC TTG TTC AC -3`	205 bp

Tabelle 8: Primersequenzen

Die Primer sind so ausgewählt, dass sie mindestens ein Intron überspannen und so an der Länge des Amplifikats erkannt werden kann, ob cDNA oder eine eventuell noch kontaminierende genomische DNA amplifiziert wurde. Die Konzentration der Primer im Reaktionsansatz betrug 48 pM.

#### 4.2.7.3 HPLC der Amplifikate

Die Quantifizierung der PCR-Produkte erfolgte durch HPLC-Trennung und UV-Detektion. Die HPLC-Anlage besteht aus einem Gradientenpumpensystem mit nachfolgender Mischkammer, einem Autoinjektor zur Probenezuführung, der Ionenaustauschersäule, einem Durchflussphotometer sowie einem Computer mit der Steuerungs- und Auswertungssoftware. 40 µl jeder Probe wurden auf eine Ionenaustauschersäule aus unporösem DEAE- (Diethylaminoethyl) Material mit einer Partikelgröße von 2,5 µm und den Dimensionen 4,6 mm \* 35 mm geladen. Die Amplifikate werden zunächst durch die Ionenwechselwirkung zwischen den negativ geladenen Seitengruppen der Nukleotide und dem Säulenmaterial retiniert. Durch den während der Analyse über 10 Minuten langsam ansteigenden Gradienten einer 1 molaren NaCl-Lösung von 40 % auf 60 % im Laufmittel werden die PCR-Produkte schließlich durch Konkurrenz aus der Bindung verdrängt und ausgewaschen. Dies führt zur Auftrennung der DNA-Fragmente in einem Bereich von 100-700 bp. Die Retentionszeit ist hierbei unter anderem abhängig von der Steilheit des Gradienten, der Länge und Zusammensetzung des Amplifikates und der Temperatur. Zur Detektion wurden die Proben aus der Säule in ein Durchflussphotometer geleitet, und die Absorption bei 260 nm gemessen. Durch Auftragen der Extinctionswerte über der Zeitachse des Gradientenlaufes und Integration der Peakflächen ist eine Quantifizierung möglich. In Abbildung 14 sind repräsentativ einige Chromatogramme dargestellt.

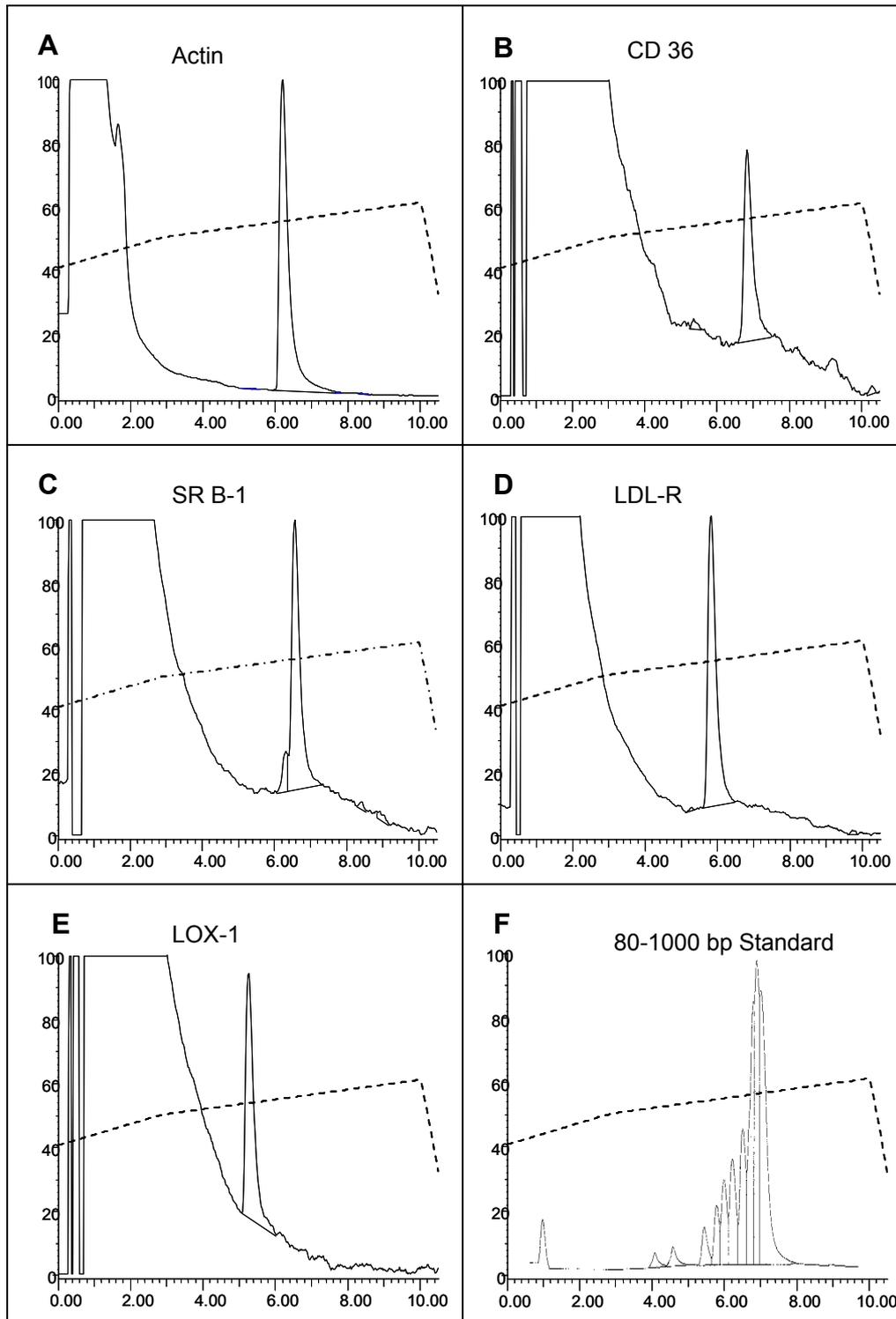


Abbildung 14: Repräsentative HPLC-Diagramme einiger analysierter Amplifikate und eines DNA-Längenstandards. In jedem Diagramm ist als gestrichelte Linie der Laufmittelgradient über die Zeit eingezeichnet.

Zur Quantifizierung wurden die Flächenwerte der verschiedenen Amplifikate auf die Werte des aus jeder Probe mit amplifizierten  $\beta$ -Actins normiert, und somit die

Expression der einzelnen mRNA als Prozent von Actin dargestellt. Dies ist möglich, da man davon ausgehen kann, dass die Actinexpression von den einzelnen Stimulationen nicht beeinflusst wird, also als sogenanntes „House-Keeping Gene“ fungiert. Auch werden so Schwankungen der Konzentration der eingesetzten RNA ausgeglichen.

#### **4.2.7.4 Qualitative Analyse von PCR-Produkten**

Die Beurteilung der PCR-Produkte hinsichtlich der erzielten Fragmentlänge und der Abwesenheit von unspezifischen Produkten erfolgte stets zur Kontrolle auch in der Agarosegelelektrophorese. Bei der Auftrennung der Amplifikate macht man sich die Wanderung der bei pH 8 negativ geladenen Nukleinsäuren im elektrischen Feld zu Nutze. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist abhängig von der angelegten Spannung, der Dichte des Geles, sowie der Größe der Amplifikate; je größer die DNA-Fragmente sind, umso langsamer wandern sie durch das Gel. Detektiert wurden die Amplifikate durch den spezifisch in die DNA interkaliierenden Farbstoff Ethidiumbromid, der im UV-Licht bläulich fluoresziert. Aus der Helligkeit läßt sich die Menge der Amplifikate auch densitometrisch abschätzen. Für die zu trennenden Amplifikate wurde eine 1% Agarosegelplatte hergestellt, diese mit TBE-Puffer überschichtet und mit den mit Ladepuffer versetzten Proben beschickt. Gleichzeitig wurde ein DNA-Fragment- Längenstandard parallel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde die Gelplatte im UV-Licht analysiert und zur Dokumentation Polaroidaufnahmen angefertigt.

#### **4.2.7.5 Festlegung der optimalen Zyklenzahl für die Messung der Amplifikate**

Während einer PCR-Reaktion steigt die Menge des Amplifikates zunächst exponentiell an und erreicht ab einer bestimmten Zyklenzahl ein Plateau. Um bei der quantitativen PCR valide Ergebnisse zu erzielen, sollte sich der untersuchte Reaktionsansatz noch in der exponentiellen Phase der Reaktion befinden, also das Plateau noch nicht erreicht haben. Andererseits sollte die Zyklenzahl hoch genug sein, dass auch bei geringer Expression der zu untersuchenden mRNA das Amplifikat zuverlässig mit den verwendeten Methoden detektiert werden kann.

Um die ideale Zyklenzahl zu finden, wurden in einer Versuchsreihe gleiche Ansätze mit zunehmender Zyklenzahl amplifiziert: Nach mindestens 24 Zyklen wurde je eine Probe eines Satzes der verschiedenen Amplifikate aus dem Thermocycler entnommen und auf Eis gelagert. Im weiteren Verlauf wurden alle zwei weiteren Zyklen wieder Proben entnommen. Nach einer maximalen Zyklenzahl von 36 Zyklen wurden alle Proben in den Thermocycler zurückgesetzt und 10 Minuten bei 72 °C zur terminalen Elongation inkubiert.

Zur Analyse wurde ein Aliquot eines Ansatzes mittels Gelelektrophorese und ein weiteres Aliquot mittels HPLC analysiert und die erhaltenen Werte in einem Diagramm aufgetragen. Mit ansteigender Zyklenzahl zeigt sich, wie erwartet, zunächst eine exponentielle Zunahme der Amplifikate. Im weiteren Verlauf flacht die Kurve dann ab (Abb. 15).

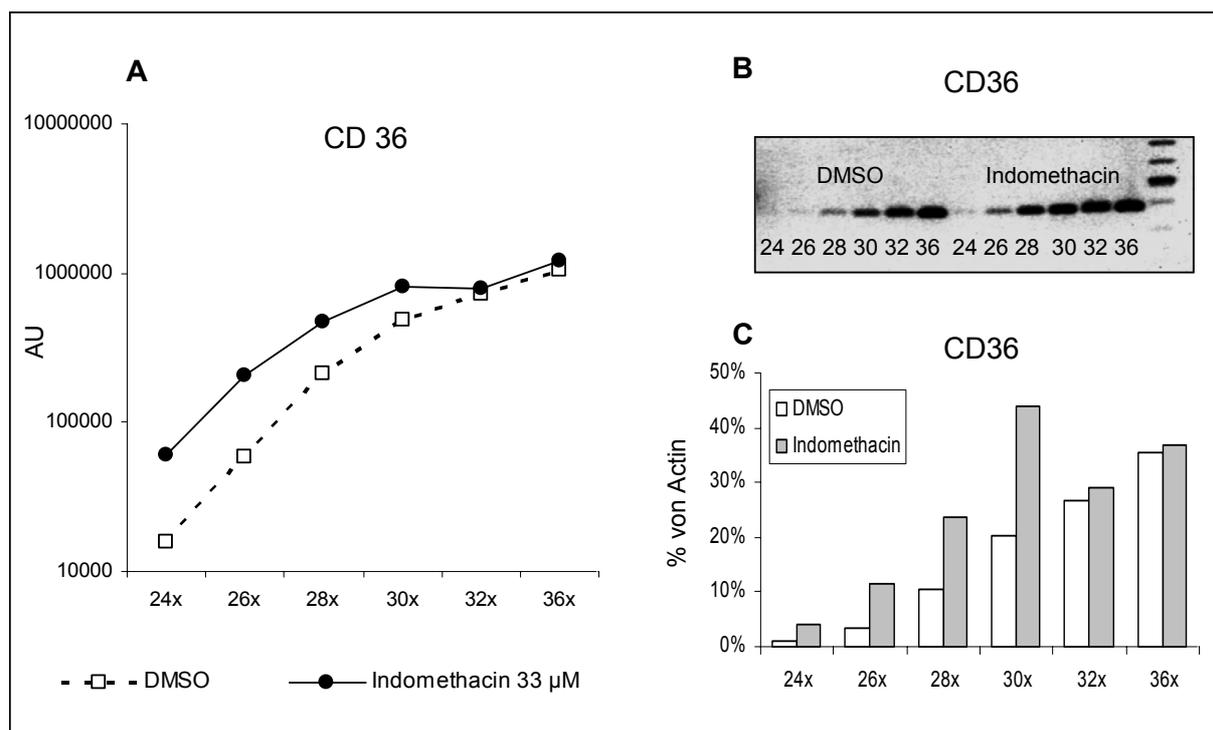


Abbildung 15: Ermittlung der optimalen Zyklenzahl für die CD 36-Amplifikation: MM6 sr Zellen wurden 72 h mit Indomethacin (33µM) behandelt, und die mRNA isoliert. Nach Umschreiben in cDNA wurde in Aliquots eine PCR- Amplifikation mit verschiedener Zyklenzahl durchgeführt. Quantifizierung der Amplifikate mittels HPLC (A) und Agarose Gel (B). Darstellung der CD 36-Amplifikate auf Aktin normiert (C). (Mittelwerte aus 2 Versuchen.)

Bei der Amplifikation von  $\beta$ -Actin zeigten sich keine Unterschiede im Kurvenverlauf von behandelten (Indomethacin 33 µM) und nicht behandelten (DMSO) Zellen. Somit

eignete Actin sich auch unter Indomethacin als innerer Standard.

Wurde CD 36 amplifiziert, lag die Kurve der behandelten Zellen bei niedrigen Zyklenzahlen deutlich über der Kurve der Kontrollzellen; erst ab einer Zyklenzahl von 32 näherten sich die beiden Kurven. Hier endete also der exponentielle Bereich. Um auch bei geringer Expression ein sicheres Signal zu haben, aber noch im exponentiellen Bereich zu liegen, wurde für die Amplifikation von CD 36 eine Zyklenzahl von 28 ausgewählt. Auch für die Amplifikation von SR-B1 und des LDL-Rezeptors wurde eine Zyklenzahl von 28 ausgewählt.

Da bei der Amplifikation von LOX-1 bei 28 Zyklen bei den Zellen der Kontrollbehandlung kein ausreichendes Signal nachweisbar war, wurde auch hier ein Experiment mit verschiedenen Zyklenzahlen durchgeführt, und für die Analyse der Expression von LOX-1 34 Zyklen als günstige Zyklenzahl ausgewählt (Abb. 16).

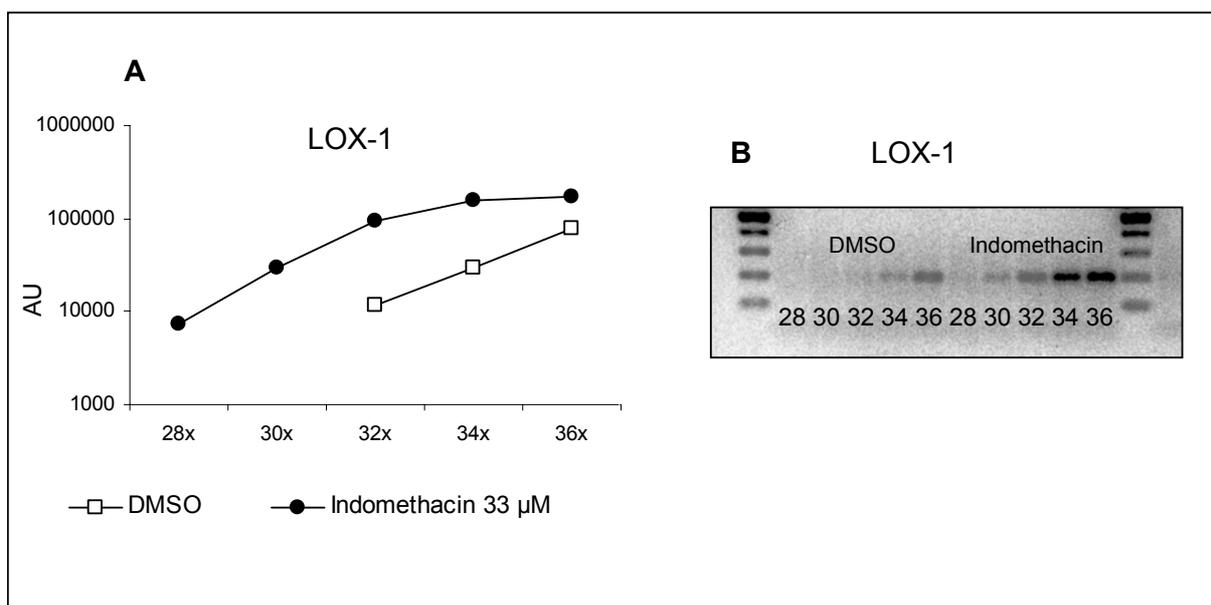


Abbildung 16: Ermittlung der optimalen Zyklenzahl für die LOX-1-Amplifikation: MM6 sr Zellen wurden 72 h mit Indomethacin (33µM) behandelt und die mRNA isoliert. Nach Umschreiben in cDNA wurde in Aliquots eine PCR- Amplifikation mit verschiedener Zyklenzahl durchgeführt. Quantifizierung der Amplifikate mittels HPLC (A) und Agarose Gel (B).

#### 4.2.8 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse sind als Mittelwert +/- Standardabweichung (SD) dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde bei Normalverteilungen mittels des zweiseitigen Student's T-Test für verbundenen Stichproben berechnet. Dosisabhängige Effekte wurden durch Regressionsanalyse auf Signifikanz abgeschätzt.

Die Irrtumswahrscheinlichkeit p ist in den Abbildungen wie folgt angezeigt:

$$p \leq 0,05 \quad = \quad *$$

$$p \leq 0,005 \quad = \quad **$$

$$p \leq 0,0005 \quad = \quad ***$$

## 5 Ergebnisse

### 5.1 PPAR $\gamma$ - Expression

In einer ersten Versuchsreihe sollte der Einfluss des pharmakologischen PPAR  $\gamma$ - Agonisten Indomethacin und des endogenen Stimulus 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub><sup>55,77</sup> auf die intrazelluläre PPAR  $\gamma$ - Proteinexpression, deren Verteilung und eine mögliche Translokation untersucht werden. Die Konzentration der verwendeten Stimulantien wurde aus der Arbeit von Lehmann übernommen: 100  $\mu$ M Indomethacin bzw. 3,0  $\mu$ M 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub> induzieren in C3H10T1/2 Zellen die Ausdifferenzierung zu Adipozyten<sup>93</sup>.

#### 5.1.1 Intrazelluläre PPAR $\gamma$ - Expression

Zunächst wurde der Verlauf der intrazellulären PPAR  $\gamma$ - Expression nach Behandlung mit Indomethacin bzw. 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub> gemessen, um das richtige Zeitfenster für die weiteren Experimente festzulegen.

MM6 sr Zellen wurden aus der Kultur entnommen, passagiert und in Aliquots auf Zellkulturplatten ausgesäht. Zu den ersten Aliquots wurde sofort Indomethacin, 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub> sowie DMSO als Kontrolle zugegeben, zu den weiteren Aliquots erst nach 12 h, 24 h und nach 36 h. 48 h nach der Aussaat wurden alle Zellen aus der Kultur entnommen, und die intrazelluläre PPAR  $\gamma$ - Expression nach Permeabilisierung und immunzytochemischer Färbung durchflusszytometrisch gemessen. Es erwies sich von Vorteil, alle Zellen in einem Experiment zu färben und zu messen und deshalb, um verschiedene Inkubationszeiten zu erreichen, zu verschiedenen Zeitpunkten mit der Stimulation zu beginnen. So war sichergestellt, dass alle Zellen unter gleichen Bedingungen gefärbt wurden, da man besonders aufgrund der zeitkritischen Permeabilisierung gleiche Bedingungen in verschiedenen Experimenten nicht so zuverlässig sicherstellen könnte.

Abbildung 17 zeigt die Zeitkinetik der intrazellulären PPAR  $\gamma$ - Proteinexpression in MM6 sr Zellen.

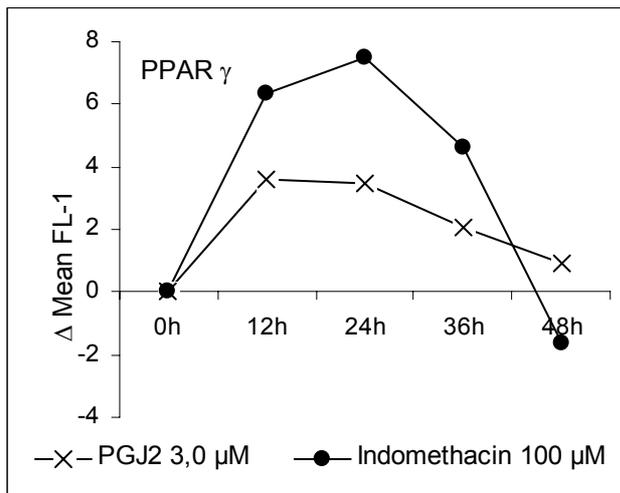


Abbildung 17: Zeitverlauf der intrazellulären Proteinexpression von PPAR  $\gamma$  nach Stimulation mit Indomethacin und 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub>. Gezeigt ist der absolute Anstieg der Expression gegenüber der Kontrollbehandlung (DMSO) über einen Zeitraum von 48h. Dargestellt ist der Mittelwert aus zwei Experimenten.

Gezeigt sind die absoluten Anstiege der PPAR  $\gamma$ - Proteinexpression, die sich aus der Differenz zwischen der Expression in stimulierten Zellen und der Expression in Kontrollzellen (DMSO) zum jeweiligen Zeitpunkt ergaben. In den ersten 12 h steigt die PPAR  $\gamma$ - Expression sehr rasch an, um nach 24 h das Maximum zu erreichen, wobei der durch Indomethacin erreichte absolute Anstieg beinahe doppelt so groß war wie der durch 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub>. Nach 48 h fällt die Expression wieder auf das Basisniveau ab. Dieser Versuch zur Optimierung des Zeitpunktes ergab bei zwei unabhängigen Experimenten gut übereinstimmende Resultate.

Für die weiteren Versuche wurde deshalb 24 h als Inkubationsdauer gewählt, und MM6 sr Zellen mit Indomethacin sowie 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub> behandelt. Es wurde zum einen die PPAR  $\gamma$ - Proteinexpression nach Permeabilisation und immunzytochemischer Färbung durchflusszytometrisch ermittelt, zum anderen die RNA der Zellen isoliert, um die Änderung in der Proteinexpression mit den Veränderungen der Transkription zu vergleichen.

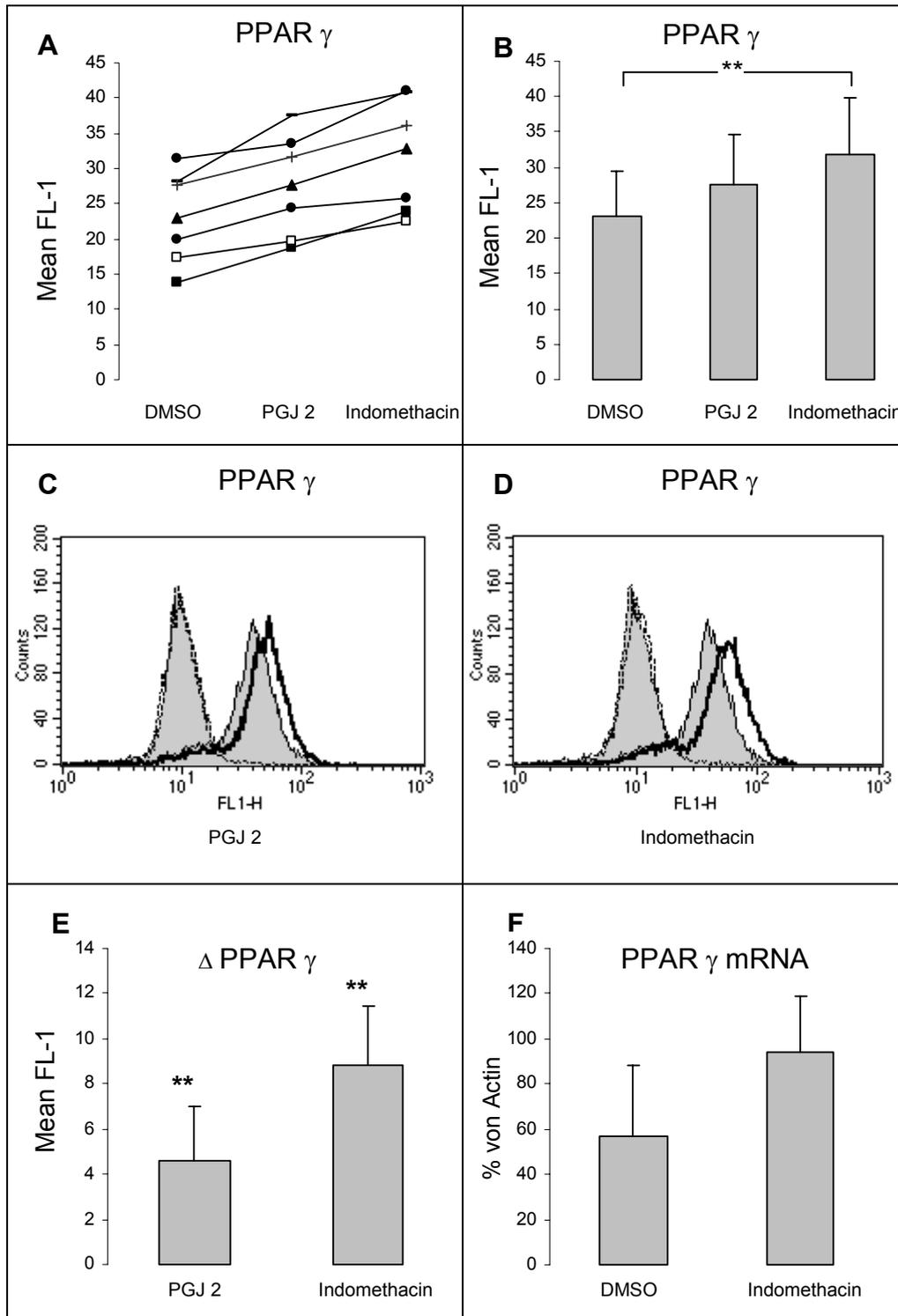


Abbildung 18: Einfluss von 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin  $J_2$  und Indomethacin auf die Expression von PPAR  $\gamma$ . Darstellung der FACS-Einzelexperimente (A) und Mittelwerte  $\pm$  SD (B) der PPAR  $\gamma$ -Proteinexpression nach Stimulation von MM6 sr Zellen für 24 h mit 100  $\mu$ M Indomethacin und 3,0  $\mu$ M 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin  $J_2$  (n=7) [verbundener T-Test]. Repräsentative FACS-Diagramme der PPAR  $\gamma$ -Expression für 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin  $J_2$  (C) und Indomethacin (D): gestrichelte Linie= Isotyp, durchgezogene Linie = spezifischer Antikörper, grau gefüllte Kurve =Kontrolle (DMSO), offene Kurve= PGJ2/Indomethacin. In Diagramm (E) ist der mittlere Anstieg der Expression durch die Stimulation nach 48 Stunden dargestellt. Diagramm (F) zeigt die PPAR  $\gamma$ -mRNA Expression nach Stimulation mit 33  $\mu$ M Indomethacin für 24 Stunden normiert auf die Expression von  $\beta$ -Actin (MW $\pm$  SD, n=3).

In Abbildung 18 sind sieben voneinander unabhängige FACS-Versuche (Diagramm A) gezeigt. In jeder Versuchsreihe kann in etwa der gleiche relative Anstieg der PPAR  $\gamma$ - Proteinexpression auf 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub> und Indomethacin beobachtet werden, unabhängig vom Niveau der basalen PPAR  $\gamma$ - Expression in der jeweiligen Zellpassage. Durch Stimulation mit 100  $\mu$ M Indomethacin wurde ein signifikanter Anstieg erreicht, der etwa doppelt so groß wie der mit 3,0  $\mu$ M 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub> erzielte war (Diagramm B). Dies illustrieren auch zwei repräsentative FACS-Histogramme (Diagramm C und D). Der Mittelwert der absoluten Anstiege ist in Diagramm E dargestellt.

Auch höhere Konzentrationen 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub> (5  $\mu$ M) führten nur zu einer geringen weiteren Steigerung der Expression, die aber immer noch unterhalb des durch Indomethacin hervorgerufenen Effekts lag (Daten nicht gezeigt).

Auch auf der Ebene der Transkription zeigte sich eine gesteigerte PPAR  $\gamma$ - mRNA - Bildung, wenn die Zellen für 24 h mit 33  $\mu$ M Indomethacin behandelt wurden (Diagramm F). Die Anstiege der intrazellulären PPAR  $\gamma$ - Proteinexpression beruhen also zumindest zum Teil auf einer vermehrten de novo Synthese durch erhöhte Transkription von PPAR  $\gamma$ .

### 5.1.2 Intrazelluläre Lokalisation von PPAR $\gamma$

Um die intrazelluläre Lokalisation von PPAR  $\gamma$  zu untersuchen, wurden MM6 sr Zellen wiederum für 24h mit 100  $\mu$ M Indomethacin stimuliert. Als Positivkontrolle diente 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub> in der Konzentration 3  $\mu$ M, DMSO und PBS als Negativkontrollen. Die Zellen wurden nach der Stimulation auf Objektträger aufzentrifugiert, gefärbt und im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Gleichzeitig wurden Phasenkontrastaufnahmen angefertigt, um die Zellmorphologie darzustellen. (Abbildung 19).

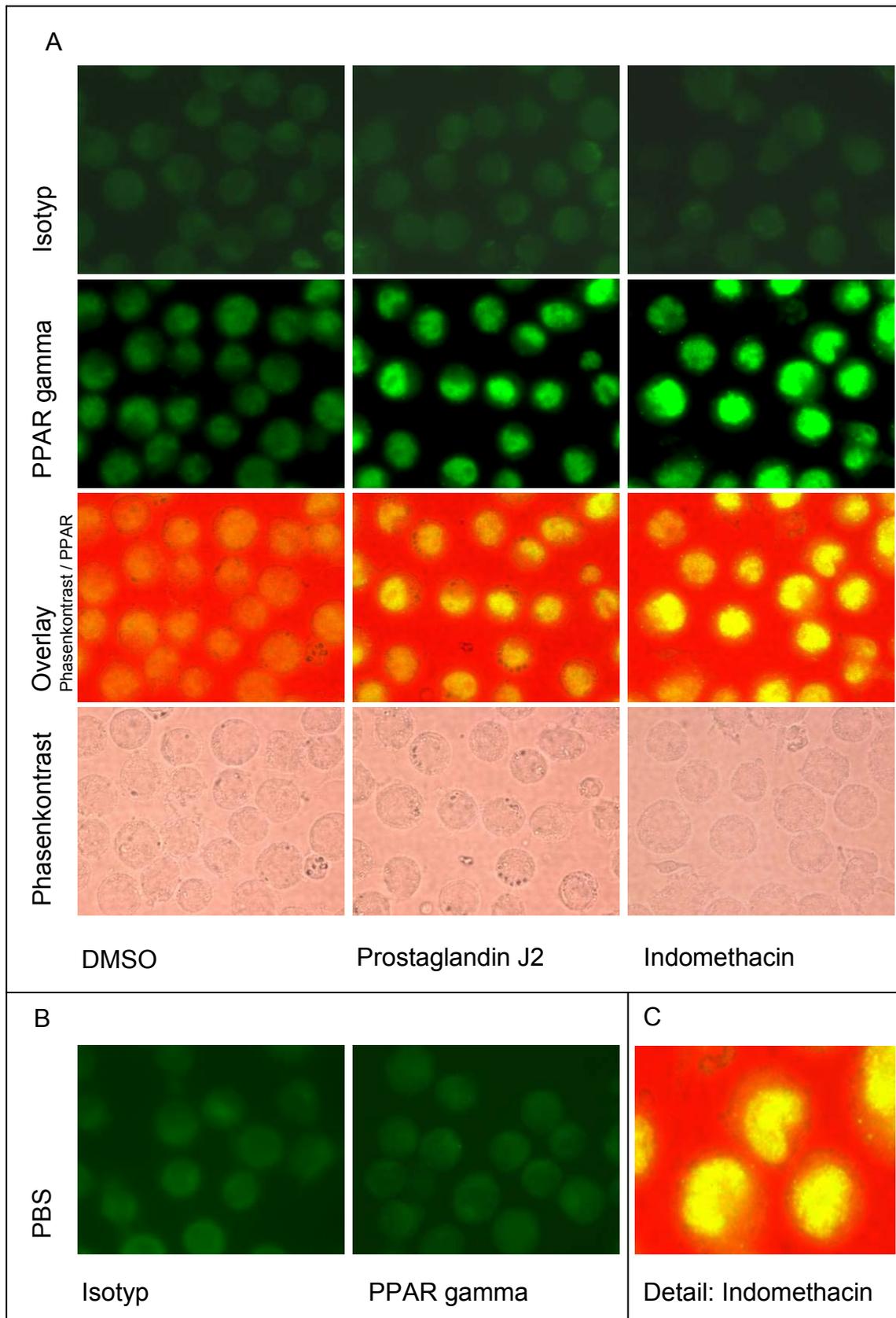


Abbildung 19: Fluoreszenzmikroskopie. MM6 sr Zellen wurden 24h mit 100 $\mu$ M Indomethacin oder 3,0  $\mu$ M 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub> stimuliert und nach Permeabilisierung wurde PPAR  $\gamma$  immunzytologisch markiert. A: DMSO, PGJ 2 und Indomethacin. B: PBS. C: Ausschnitt aus A. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen.

Bereits in den Kontrollzellen war die Fluoreszenzaktivität des markierten PPAR  $\gamma$ -Proteins vorwiegend in Kern lokalisiert. Es zeigte sich jedoch nur eine geringe Fluoreszenzintensität. In den stimulierten Zellen konnte eine deutlich erhöhte Fluoreszenz im Bereich des Kerns beobachtet werden. Entsprechend dem Ergebnis der FACS-Messungen war auch hier der Effekt von Indomethacin deutlicher als der von 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub>. Der Vergleich der beiden Negativkontrollen, DMSO (Lösungsmittel von Indomethacin und 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub>) und PBS zeigte keinen Unterschied. Um die Spezifität der Anfärbung zu zeigen, wurden stets Isotypkontrollen mit sekundärem Antikörper parallel analysiert; diese wiesen kaum Fluoreszenz auf. Somit war von einer spezifischen Markierung durch den primären Antikörper auszugehen.

Die Überlagerung der Fluoreszenzaufnahmen mit den Phasenkontrastaufnahmen zeigte, dass PPAR  $\gamma$  sowohl in Kontrollzellen, wie auch in stimulierten Zellen vorwiegend im Bereich des Zellkerns lokalisiert ist. Eine Translokation mit Verschiebung der Fluoreszenzaktivität vom Zytoplasma in den Kern konnte nicht beobachtet werden. In Übereinstimmung mit neueren Arbeiten zeigte sich stets eine nukleäre Lokalisation<sup>31,161</sup>. Die Stimulation führte lediglich zu einer gesteigerten Fluoreszenzintensität, was mit der Mehrexpression auf RNA-Ebene und der FACS-Experimente gut übereinstimmt.

## 5.2 Scavengerrezeptorexpression

Nachdem im letzten Abschnitt die Auswirkungen von PPAR  $\gamma$ -Liganden auf die intrazelluläre Expression und Verteilung dieses Transkriptionsfaktors überprüft wurden, sollten daraufhin PPAR  $\gamma$ -abhängige Transkripte untersucht werden. Dabei wurde im Wesentlichen auf Scavengerrezeptoren eingegangen. Für CD 36, der ca. 40 % der zellulären Aufnahme modifizierter Lipoproteine vermittelt<sup>119</sup>, ist eine Regulation durch PPAR  $\gamma$  bereits gezeigt worden<sup>161</sup>. Die Expression von SR-B1 wird ebenfalls durch PPAR  $\gamma$  reguliert<sup>30</sup>. Für den Scavenger-Rezeptor LOX-1 ist bis jetzt keine Abhängigkeit von PPAR  $\gamma$  gefunden worden. Hier sollte deshalb der Effekt von Indomethacin auf diesen Rezeptor untersucht werden.

Die CD 36 Oberflächenexpression wurde durchflusszytometrisch gemessen. Des Weiteren wurde die CD 36-Expression zusätzlich auf der Ebene der mRNA untersucht. Mit dieser Methode wurde auch die Transkription von SR-B1- mRNA und LOX-1- mRNA bestimmt. Zur Kontrolle wurde die Expression des LDL- Rezeptors gemessen, dessen Regulation über den SREBP- Signalweg und nicht über PPAR  $\gamma$  beeinflusst wird<sup>14</sup>. Als weitere endogene Kontrolle wurde die Expression von  $\beta$ -Actin aufgezeichnet, deren Messung als Bezugsgröße für die übrigen Transkripte nötig war. So konnte gezeigt werden, dass die Veränderung der Scavengerrezeptorexpression tatsächlich der Effekt einer spezifischen Transkriptionsinduktion war und nicht Auswirkung einer generellen Beeinflussung der zellulären RNA-Synthese.

### 5.2.1 Zeit- und Dosisabhängigkeit der CD 36- Oberflächenexpression

Zunächst wurde die Abhängigkeit der CD 36- Oberflächenexpression von der Inkubationszeit und der Konzentration des Stimulus ermittelt. MM6 sr Zellen wurden mit 33  $\mu$ M und 100  $\mu$ M Indomethacin sowie mit 0,3  $\mu$ M und 3,0  $\mu$ M 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub> inkubiert. Nach 24 h, 48 h und 72 h wurde je ein Aliquot jeder Behandlungsart aus der Kultur entnommen und durchflusszytometrisch die CD 36- Oberflächenexpression gemessen. In Abbildung 20 sind repräsentative FACS-Diagramme für eine Inkubationszeit von 72 h gezeigt.

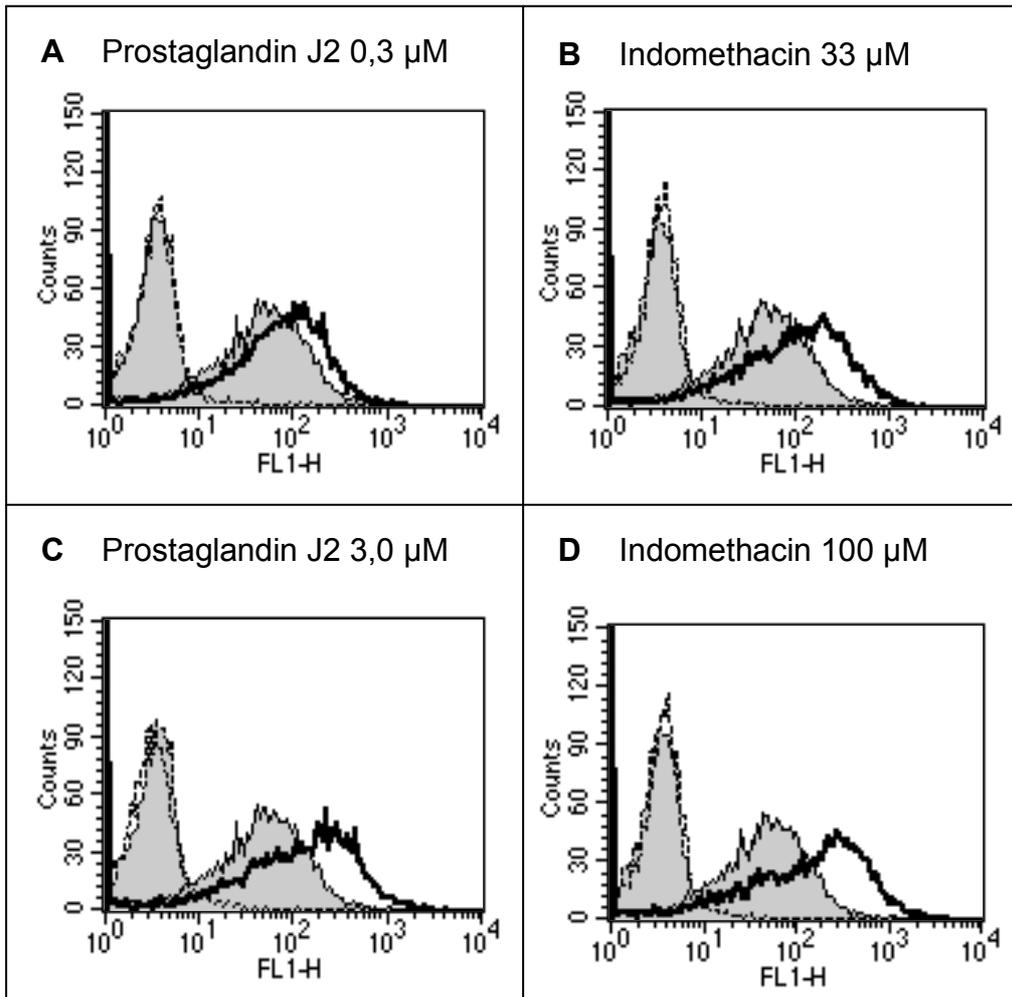


Abbildung 20: CD 36- Oberflächenexpression. Gezeigt sind repräsentative FACS-Diagramme für MM6 sr Zellen, die für 72 h mit 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub> (A und C) und Indomethacin (B und D) in je 2 verschiedenen Konzentrationen behandelt wurden. Grau gefüllte Kurven: DMSO. Offene Kurven: Behandlung. Isotypkontrolle (links, gestrichelte Linie) und CD 36 (rechts, durchgezogene Linie).

In den Kontrollzellen blieb die CD 36- Oberflächenexpression über die Zeit praktisch konstant, so dass die Stimulation der Zelle durch die Zellpassage allein oder durch das Lösungsmittel keinen Einfluss auf die CD 36- Expression hat.

Wurden die Zellen mit 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub> behandelt, zeigte sich eine Zeit- und Dosisabhängigkeit der CD 36- Oberflächenexpression. Der maximale Effekt war nach 48 h erreicht und lag bei etwa der dreifachen Expression der Kontrollzellen, wenn die Zellen mit 3,0  $\mu\text{M}$  15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub> inkubiert wurden.

Wurden die Zellen mit einem Zehntel der Konzentration an 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub> behandelt, so lag die maximale Expression ebenfalls bei einer Inkubationszeit von 48 h und war ca. doppelt so hoch wie die der Kontrollzellen.

Nach 72 h nahm die Expression für beide Konzentrationen etwas ab, lag aber signifikant über der Kontrolle (Abb. 21 A).

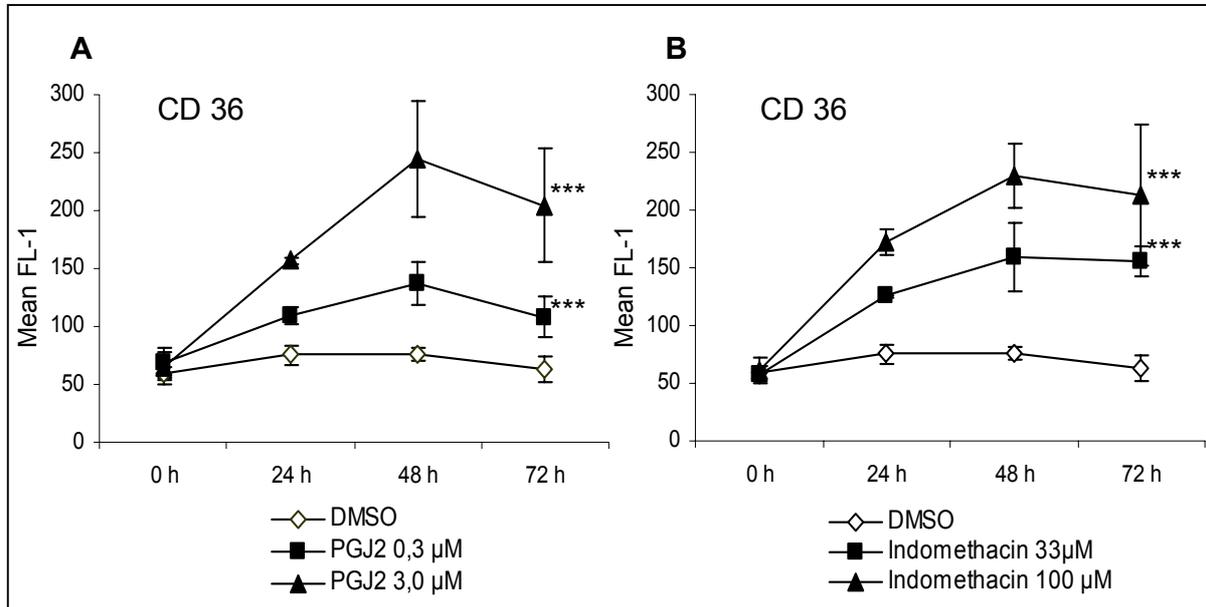


Abbildung 21: Zeit- und Dosisabhängigkeit der CD 36- Oberflächenexpression. MM6 sr Zellen wurden für die angegebene Zeit mit je zwei verschiedenen Konzentrationen 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub> (A) und Indomethacin (B) behandelt. Dargestellt sind Mittelwerte (MW $\pm$  SD) aus 3 Wiederholungen (0 h, 12 h, 24 h, 48 h) bzw. aus 10 Wiederholungen (72 h). [verbundener T-Test]

Die Behandlung mit Indomethacin rief einen anhaltenderen Effekt hervor. Nach 48 h Inkubation erreichte die CD 36- Expression ein Maximum und lag nach 72 h Inkubation noch auf demselben Niveau. Die Inkubation mit 33 µM Indomethacin führte zur 2,5-fachen, die Inkubation mit 100 µM Indomethacin zur mehr als dreifachen CD 36- Oberflächenexpression verglichen mit der Basisexpression (Abb. 21 B).

Bei drei unabhängigen Zeitreihen zeigte sich dabei stets das gleiche Muster. Beim längsten Inkubationszeitraum von 72 h, der mit 10-maliger Wiederholung durchgeführt wurde, war der stimulierende Effekt von Indomethacin und 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub> hochsignifikant. Für die im Folgenden beschriebenen Versuche wurden deshalb 72 h als Inkubationszeit ausgewählt.

### 5.2.2 Untersuchungen auf RNA- Ebene

Als nächstes sollte die Expression weiterer Scavengerrezeptoren auf mRNA- Ebene untersucht werden und geklärt werden, ob die PPAR  $\gamma$ - Stimulation durch Indomethacin ihre Expression beeinflusst.

MM6 sr Zellen wurden für 72 Stunden mit 33  $\mu$ M Indomethacin inkubiert. Dann wurden die Zellen lysiert, die RNA isoliert und durch quantitative RT-PCR der Gehalt spezifischer mRNAs gemessen. Neben der CD 36- mRNA wurde auch die Transkription von SR-B1, LOX-1 und als weitere Kontrolle die mRNA des LDL- Rezeptors, dessen Transkription nicht PPAR  $\gamma$ - abhängig ist, untersucht (Abb. 22).

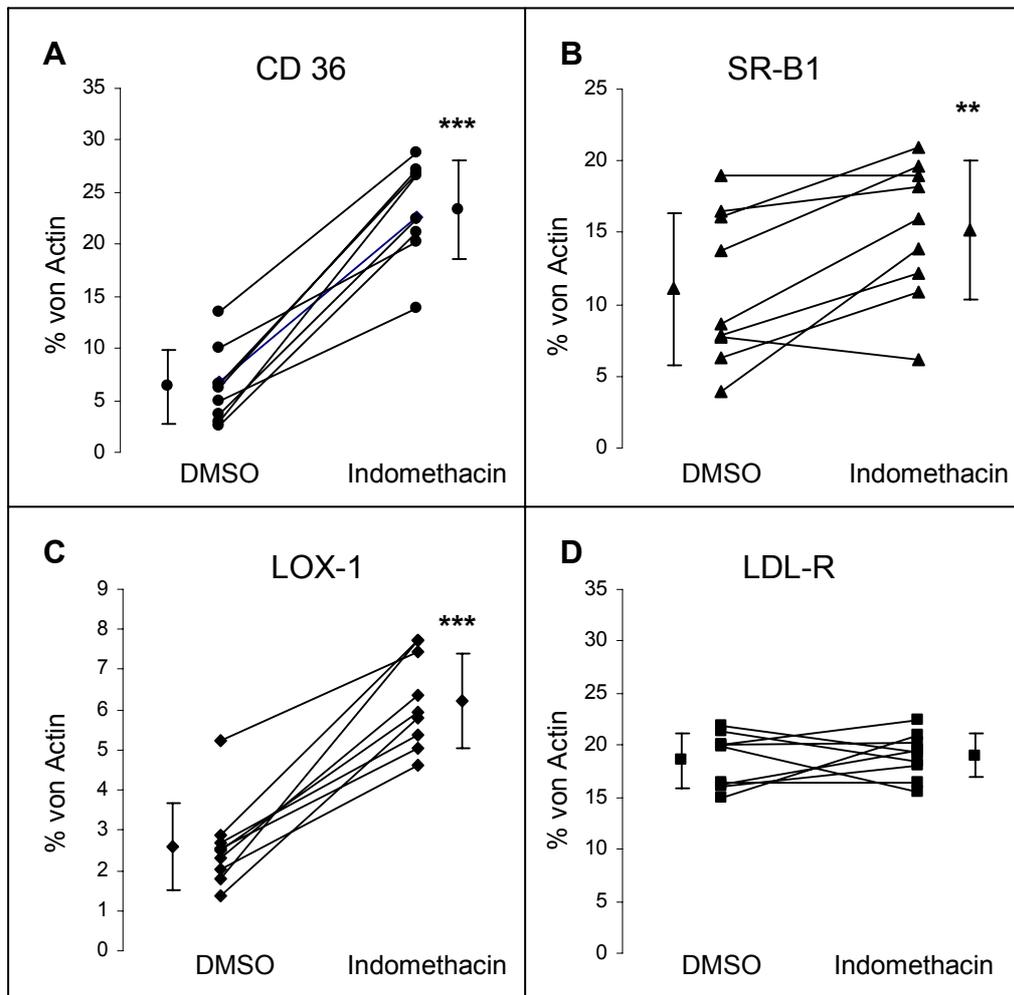


Abbildung 22: mRNA- Expression von CD 36 (A), SR-B1 (B), LOX-1 (C) und LDL-R (D): MM6 sr Zellen wurden 72 h mit 33  $\mu$ M Indomethacin stimuliert. Dargestellt sind Einzel- und Mittelwerte (MW $\pm$  SD) der mRNA- Expression angegeben in Prozent von  $\beta$ -Actin. (n=9) [verbundener T-Test]

In neun unabhängigen Doppelerperimenten zeigte sich stets unter Indomethacin ein signifikanter Anstieg der CD 36- mRNA mit einer im Mittel auf mehr als das dreifache gesteigerten Expression. Auch die mRNA- Expression von SR-B1 stieg im Mittel durch Indomethacin um ca. 50% signifikant an.

Ähnlich zu CD 36 war die Expression von LOX-1 hochsignifikant auf mehr als das Doppelte der Basisexpression gesteigert.

Im Gegensatz dazu wurde der LDL-Rezeptor wie auch die Menge von  $\beta$ -Actin-mRNA (Abb. 23), das als Housekeeping-gene als Bezugsgröße für die untersuchten Transkripte diente, durch Stimulation des Transkriptionsfaktors PPAR  $\gamma$  nicht beeinflusst, so dass ein unspezifischer, genereller Effekt von Indomethacin auf die zelluläre Transkription ausgeschlossen werden konnte.

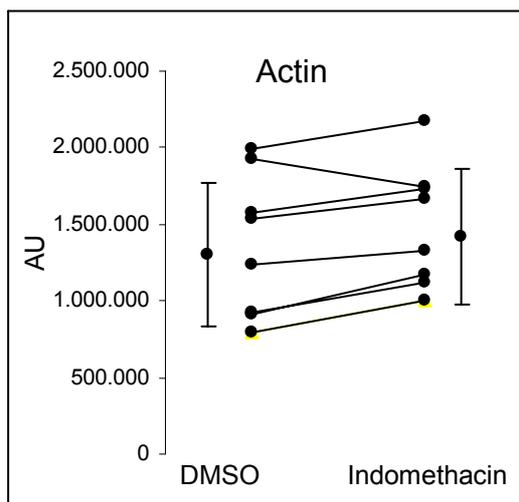


Abbildung 23: Quantifizierung der Actin- mRNA nach Behandlung von MM6 sr Zellen für 72 h mittels RT-PCR und HPLC. Dargestellt sind Absolutwerte der Flächeneinheiten sowie der Mittelwert  $\pm$  SD (n=8).

In drei der gezeigten Experimente wurden die Zellen zusätzlich zu 33  $\mu$ M Indomethacin mit 66  $\mu$ M Indomethacin stimuliert. Dies führte bei CD 36 und SR-B1 noch zu einer weiteren Steigerung der Expression. Jedoch auch bei hohen Indomethacinkonzentrationen wurde die mRNA- Expression des LDL-Rezeptors nicht beeinflusst (Abbildung 24).

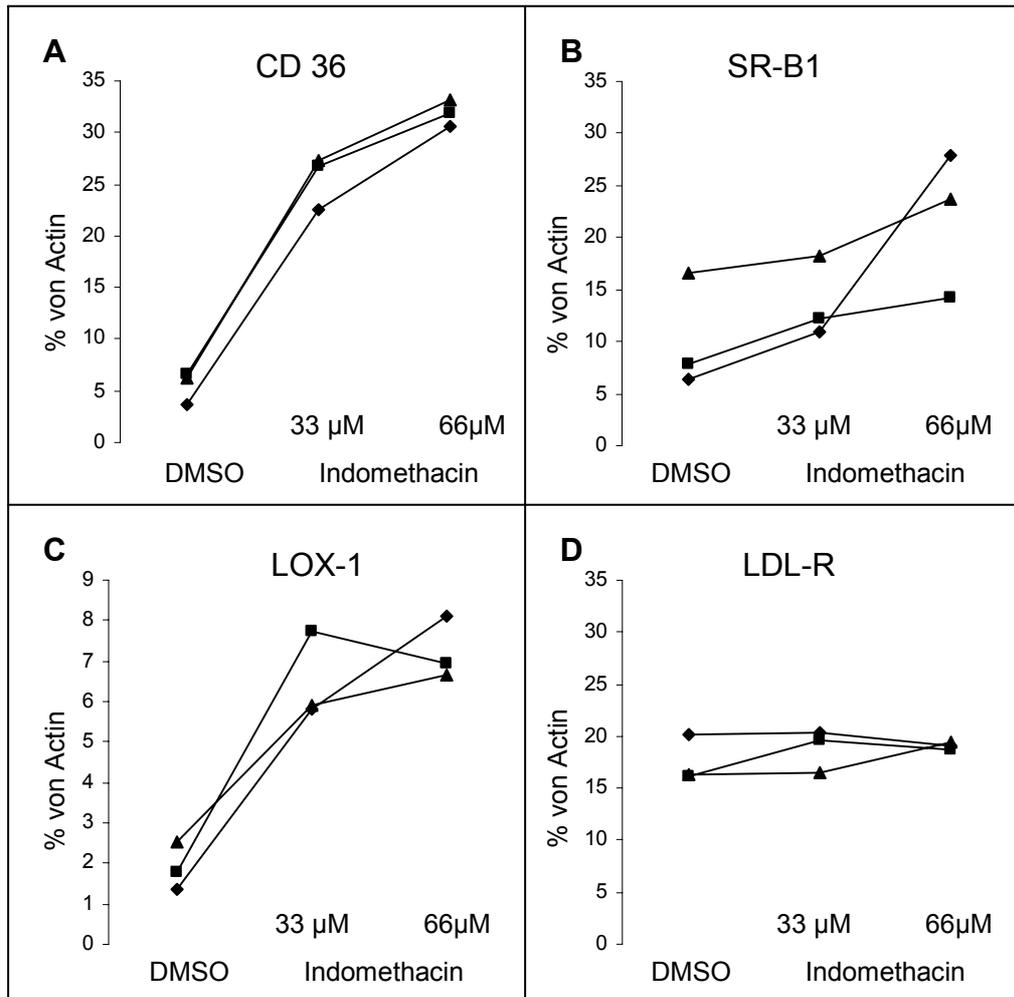


Abbildung 24: Konzentrationsabhängigkeit der mRNA- Expression verschiedener Scavengerrezeptoren CD 36(A), SR-B1 (B), LOX-1 (C) und des LDL-R (D): MM6 sr Zellen wurde 72 h mit 33 µM und 66 µM Indomethacin stimuliert. Dargestellt sind Einzelwerte der mRNA- Expression in Prozent von  $\beta$ -Actin (n=3).

### 5.3 Zelluläre Aufnahme von markiertem oxLDL

Nachdem in den vorangegangenen Versuchen der Einfluss der PPAR  $\gamma$ - Stimulation auf die Expression potentiell zur Schaumzellbildung führender Scavengerrezeptoren untersucht wurde, sollten nun die funktionellen Auswirkungen auf die Aufnahme von oxidiertem LDL untersucht werden. MM6 sr Zellen wurden für 72 Stunden mit 33  $\mu$ M und 100  $\mu$ M Indomethacin inkubiert. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit LPS (10 ng/ml), einem potenten, aber unspezifischen Stimulus der Monozytendifferenzierung, stimuliert. Danach wurden sie für drei Stunden mit markiertem, oxidiertem LDL inkubiert, und so die Nettoaufnahme an oxidiertem LDL durchflusszytometrisch gemessen. Gleichzeitig wurde die CD 36- Expression an einem anderen Aliquot der Zellen bestimmt (Abb. 25).

Trotz einer deutlich gesteigerten Induktion von CD 36 auf den mit Indomethacin behandelten Zellen kam es zu keiner Netto- Mehraufnahme von oxidiertem LDL. Im Gegensatz dazu nahmen die Zellen, die durch LPS stimuliert wurden, im Vergleich zur Kontrolle deutlich mehr oxidiertes LDL auf, obwohl deren Expression von CD 36- Rezeptoren noch etwas unter der der mit Indomethacin stimulierten Zellen lag. Um die Spezifität der Messung zu zeigen, wurde ein Aliquot jeder Behandlung mit unmarkiertem oxidierten LDL in der 50-fachen Konzentration vorinkubiert, um die Scavengerrezeptoren abzusättigen. Die so vorbehandelten Zellen zeigten keine Aufnahme von markiertem, oxidierten LDL mehr.

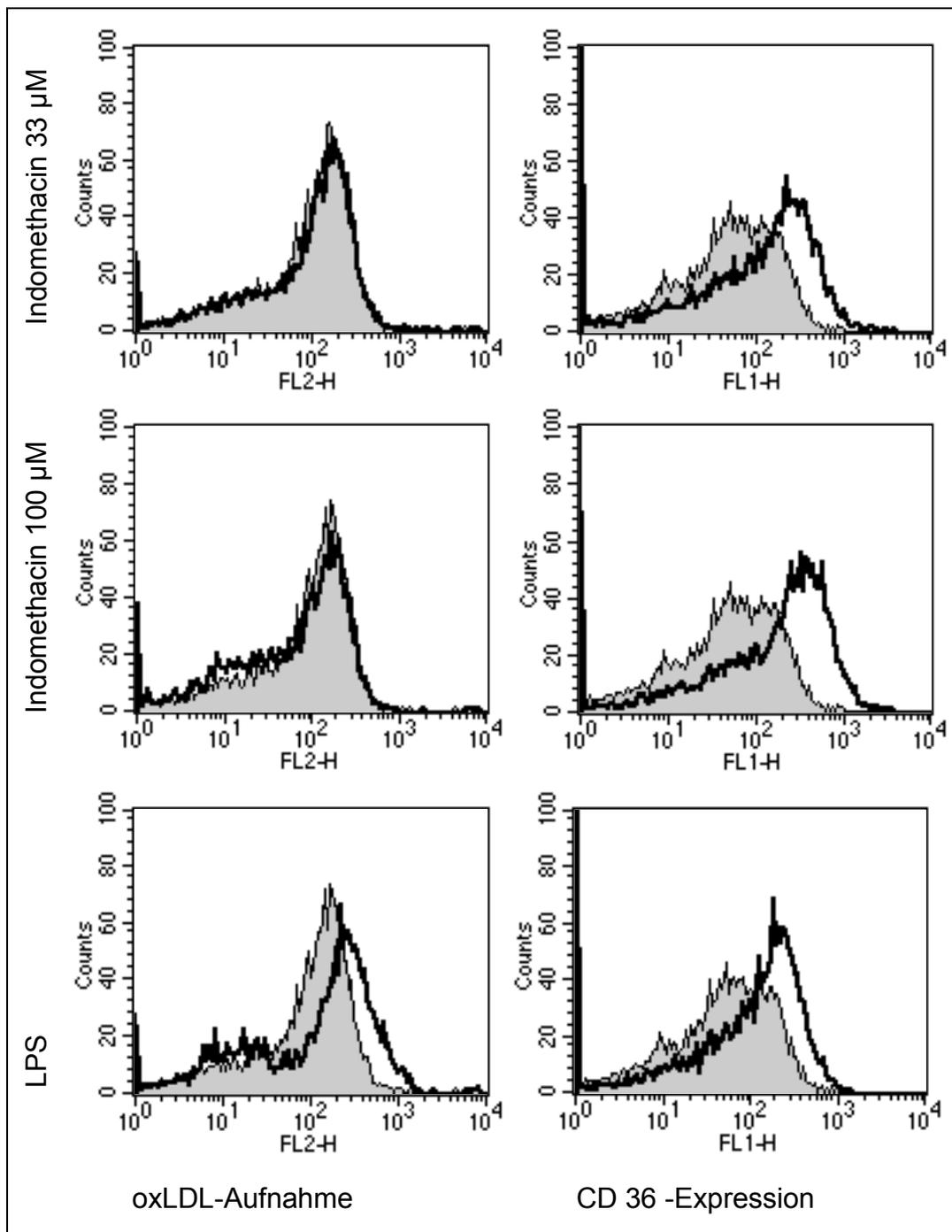


Abbildung 25: Aufnahme von Dil-markiertem oxLDL in MM6 sr Zellen und deren CD 36- Expression nach Stimulation mit Indomethacin oder LPS für 72 Stunden. Repräsentative Histogramme der Fluoreszenzverteilung von 10000 Zellen. Die dünne Linie (grau hinterlegt) stellt die Kontrollbehandlung (DMSO) dar, die dicke Linie entspricht den stimulierten Zellen.

#### 5.4 Expression des Cholesterinexporters ABCA 1

Um eine mögliche Erklärung für die fehlende Mehraufnahme von oxidiertem LDL in die Zellen trotz einer deutlichen Hochregulation atherogener Scavengerrezeptoren zu überprüfen, wurde die Expression von ABCA 1, dem wichtigsten zellulären Cholesterinexporter<sup>122</sup>, der ebenfalls teilweise durch den Transkriptionsfaktor PPAR  $\gamma$  reguliert ist<sup>25,32</sup>, untersucht.

Dazu wurde mit denselben RNA- Proben, an denen zuvor die gesteigerte Scavengerrezeptorexpression gezeigt wurde, nochmals eine RT-PCR für ABCA 1- mRNA durchgeführt. Da mittlerweile eine Real-time PCR- Anlage (i-cycler) im Labor verfügbar war, wurden die Amplifikate nicht mehr mit Hilfe der HPLC quantifiziert, sondern mit Hilfe einer Fluoreszenzdetektion während der Amplifikation gemessen. Daraus ergibt sich eine etwas andere Darstellung der Ergebnisse als Verhältnis der kritischen Zyklenzahl in Kontrollzellen und behandelten Zellen jeweils normiert auf das  $\beta$ -Actin Signal in derselben Probe.

Es konnte eine signifikante Hochregulation von ABCA 1 durch 33  $\mu$ M Indomethacin auf etwa das zweieinhalbfache gezeigt werden (Abb. 26).

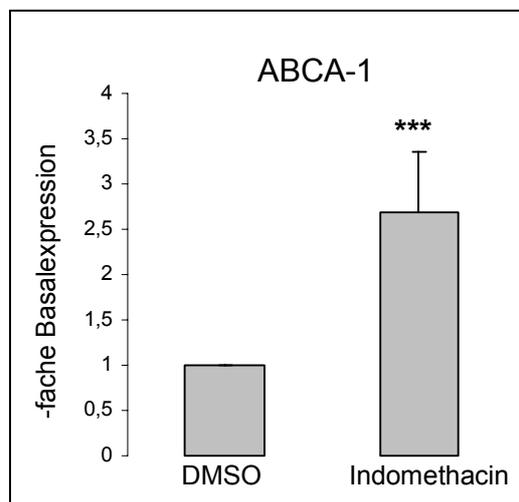


Abbildung 26: ABCA 1 mRNA- Expression. MM6 sr Zellen wurden 72 h mit 33  $\mu$ M Indomethacin stimuliert und nach mRNA- Extraktion durch real-time-PCR ihre ABCA 1- Expression gemessen. Dargestellt ist die mittlere Steigerung der ABCA 1- mRNA- Expression bezogen auf die Basalexpression (n=10) [verbundener T-Test].

Somit wäre eine mögliche Erklärung für die fehlende Mehrakkumulation von oxidiertem LDL in den Zellen, dass dieses durch die gesteigerte Anzahl an

Scavengerrezeptoren zwar aufgenommen wird, aber durch den gleichzeitig durch PPAR  $\gamma$  stimulierten Transporter ABCA 1 die Zelle über den reversen Cholesterintransport wieder verlassen kann.

### 5.5 Induktion von Apoptose durch PPAR $\gamma$

Neben zahlreichen Regulations- und Differenzierungsvorgängen führt die Stimulation des Transkriptionsfaktors PPAR  $\gamma$  auch zur Induktion von Apoptose. An Makrophagen kann schon durch eine geringe Konzentration an PPAR  $\gamma$ - Liganden Apoptose induziert werden<sup>31</sup>.

Bei der Betrachtung der Zellkulturen im Mikroskop fiel auf, dass das Zellwachstum ab einer bestimmten Konzentration der Substanzen vermindert war, und der Anteil an Zellfragmenten und toten Zellen zunahm. Orientierend durchgeführte Trypanblau-Färbungen bestätigten diese Beobachtung.

Zur Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen in einer Inkubation wurden deshalb Annexin-V Färbungen, bei denen die Zellen schon in einem sehr frühen Stadium der Apoptose erkannt werden, durchgeführt. In unbehandelten Zellkulturen betrug der Anteil der Annexin- positiven Zellen ca. 11%. Wurden die Zellen mit 0,3  $\mu\text{M}$  15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin  $\text{J}_2$  behandelt, was etwa zu einer Verdopplung der CD 36 Oberflächenexpression führte, stieg der Anteil präapoptotischer Zellen nur gering auf 13 % an. Eine Behandlung mit 3,0  $\mu\text{M}$  15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin  $\text{J}_2$  führte aber zu ca. 27% präapoptotischer Zellen, wobei aber eine deutliche Steigerung der mittleren CD 36- Oberflächenexpression möglich war.

Wurden die Zellen mit 33  $\mu\text{M}$  Indomethacin inkubiert, lag die Apoptoserate bei ca. 18 %. 100  $\mu\text{M}$  Indomethacin führten zu ca. 33 % Annexin positiver Zellen. Die CD 36- Oberflächenexpression stieg dabei ebenfalls noch an (Abb. 27).

Durch gezielte Apoptoseinduktion mit Substanzen wie TRAIL konnte jedoch keine Mehrexpression des Oberflächenrezeptors CD 36 erzielt werden, was darauf hinweist, dass die Vermehrung der CD 36- Expression und die Apoptoseinduktion zwei unabhängig voneinander durch PPAR  $\gamma$  gesteuerte Prozesse sind (Daten nicht gezeigt).

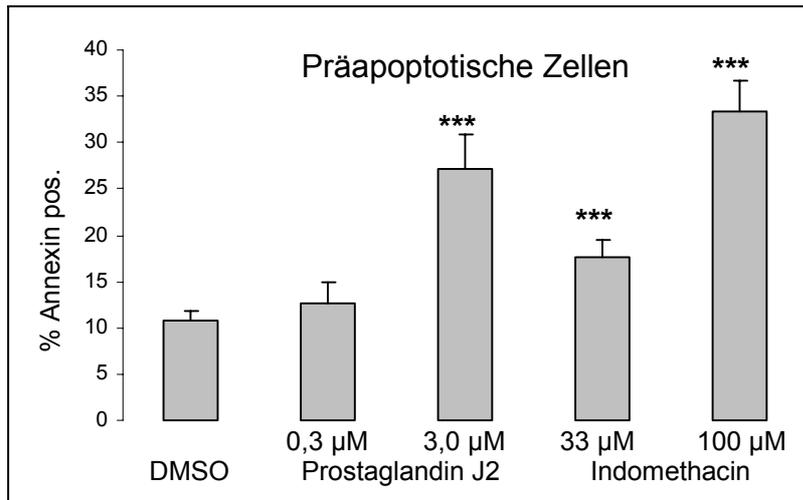


Abbildung 27: PPAR  $\gamma$ - Stimulation führt zu Apoptose. MM6 sr Zellen wurden für 3 Tage mit 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub> und Indomethacin in den angegebenen Konzentrationen stimuliert, und der Anteil präapoptotischer Zellen durch Annexin V markiert (MW  $\pm$  SD, n=5) [verbundener T-Test].

## 5.6 Regulation von PPAR $\gamma$ – Liganden und Costimulatoren

In den vorangegangenen Teilen dieser Arbeit wurden anhand bekannter Stimuli die Induktion des Transkriptionsfaktors PPAR  $\gamma$  und die daraus folgenden Effekte auf die PPAR  $\gamma$ - abhängige Expression atherogener Scavengerrezeptoren auf MM6 sr Zellen untersucht.

Im folgenden Abschnitt sollte auf weitere PPAR  $\gamma$ - Liganden und Interaktionen mit anderen Signalwegen wie dem RXR-Rezeptor eingegangen werden.

Es sollten verschiedene, als PPAR  $\gamma$ - Aktivatoren bekannte, nichtsteroidale Antirheumatika und auch Acetylsalicylsäure, als sehr häufig angewandtes Medikament, untersucht werden. Die erst seit kurzer Zeit als Insulin-Sensitizer zur Behandlung des Diabetes mellitus Typ 2 eingesetzten Thiazolidindione, spezifische PPAR  $\gamma$ - Aktivatoren, wurden ebenfalls verwendet.

Da die Hyperinsulinämie im Rahmen des metabolischen Syndroms ein wichtiger kardiovaskulärer Risikofaktor zu sein scheint, wurden die Interaktionen von Insulin und PPAR  $\gamma$  bei der Regulation von Scavengerrezeptoren auf Makrophagen untersucht.

### 5.6.1 Der RXR- Ligand Methoprene

Wie oben beschrieben interagiert der Transkriptionsfaktor PPAR  $\gamma$  bei seiner Aktivierung mit einem Corezeptor, dem RXR-Rezeptor<sup>41</sup> und bildet ein permissives Heterodimer. Deshalb sollten in dieser Arbeit auch die Effekte einer Stimulation des RXR-Rezeptors auf die Scavengerrezeptorexpression untersucht werden. Als Modellstimulus verwendeten wir Methoprene, von dem die spezifische Bindung und Aktivierung des RXR-Rezeptors gezeigt worden war<sup>64</sup>. In einem Vorversuch führte eine Stimulation der Zellen mit 100  $\mu$ M Methoprene alleine bereits zu einer CD 36-Expression, die in der Größenordnung einer Stimulation mit 100  $\mu$ M Indomethacin lag. Um die Interaktion zu untersuchen, wurden die Zellen deshalb mit geringeren Konzentrationen der PPAR  $\gamma$ - Stimulantien und Methoprene - wie in den anderen Experimenten beschrieben - für 72 h inkubiert und die CD 36-Oberflächenexpression durchflusszytometrisch gemessen. 0,3  $\mu$ M 15-deoxy- $\Delta$ <sup>12,14</sup>-

Prostaglandin J<sub>2</sub> und 10 µM Indomethacin wurden mit 10 µM bzw. 20 µM Methoprene kombiniert.

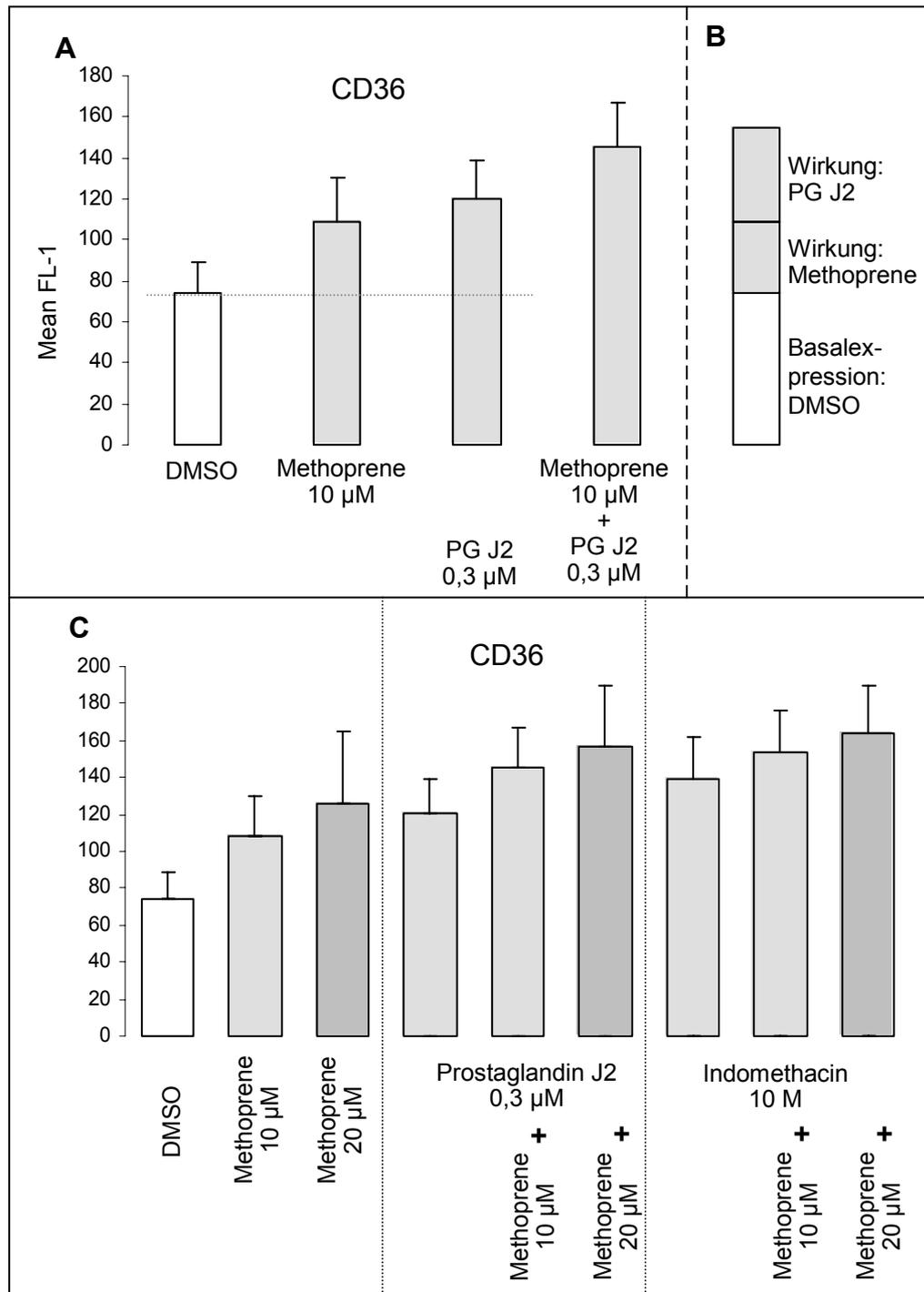


Abbildung 28: Wirkung des RXR-Liganden Methoprene auf die CD36- Oberflächenexpression. MM6 sr Zellen wurden für 72 h mit 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub> bzw. Indomethacin und zusätzlich mit verschiedenen Konzentrationen Methoprene behandelt. A: Additive Wirkungen von 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub> und Methoprene. B: gedankliche Summation der Einzeleffekte. C: CD 36- Oberflächenexpression durch Stimulation von 0,3 µM 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub> und 10 µM Indomethacin allein oder in Kombination mit 10 µM bzw. 20 µM Methoprene (MW  $\pm$  SD, n=3).

Methoprene alleine konnte in beiden Konzentrationen die CD 36-Oberflächenexpression erhöhen. Durch die Kombination der Substanzen Methoprene + 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub> bzw. Methoprene + Indomethacin war eine zusätzliche Steigerung der Expression möglich (Abb. 28, C). Exemplarisch sind für 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub> und 10  $\mu$ M Methoprene die additiven Effekte aufgetragen: Die Größenordnung der Wirkung der Kombination aus PPAR  $\gamma$ - Stimulus und Methoprene liegt im Bereich der Summe der Einzeleffekte. Deshalb ist eher eine additive als eine multiplikative Wirkung der Einzelsubstanzen anzunehmen, was mit dem Prinzip eines permissiven Heterodimers vereinbar ist (Abb. 28 A, B).

### 5.6.2 Vergleich verschiedener NSAR

Nachdem in dieser Arbeit der Einfluss von Indomethacin auf den Transkriptionsfaktor PPAR  $\gamma$  und verschiedene abhängige Transkripte untersucht worden war, sollte die CD 36- Expression auf MM6 sr Zellen nach Behandlung mit weiteren NSAR wie Flufenamsäure, Fenoprofen, Ibuprofen und Acetylsalicylsäure gemessen werden. Indomethacin, Flufenamsäure und Fenoprofen lassen sich nur in DMSO lösen und so der Zellkultur zugeben. Ibuprofen und Salicylsäure wurden in PBS gelöst zugegeben. Das jeweilige Lösungsmittel diente als Negativkontrolle, 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub> als Positivkontrolle. Nach einer Inkubation über 72 Stunden wurde die CD 36- Oberflächenexpression gemessen. Indomethacin, Flufenamsäure, Fenoprofen und Ibuprofen führten bei einer Konzentration von 100  $\mu$ M zu einer Vermehrung von CD 36 auf der Oberfläche der MM6 sr Zelle. Indomethacin hatte den stärksten Effekt, die Wirkung von Flufenamsäure und Fenoprofen war etwas geringer. Ibuprofen zeigte einen deutlich geringeren, aber noch signifikanten Effekt. 100  $\mu$ M Acetylsalicylsäure hatte keinen Einfluss auf die CD 36-Oberflächenexpression. Auch eine Erhöhung der Konzentration auf 300  $\mu$ M zeigte verglichen mit den anderen untersuchten Pharmaka nur einen minimalen Effekt (Abb. 29).

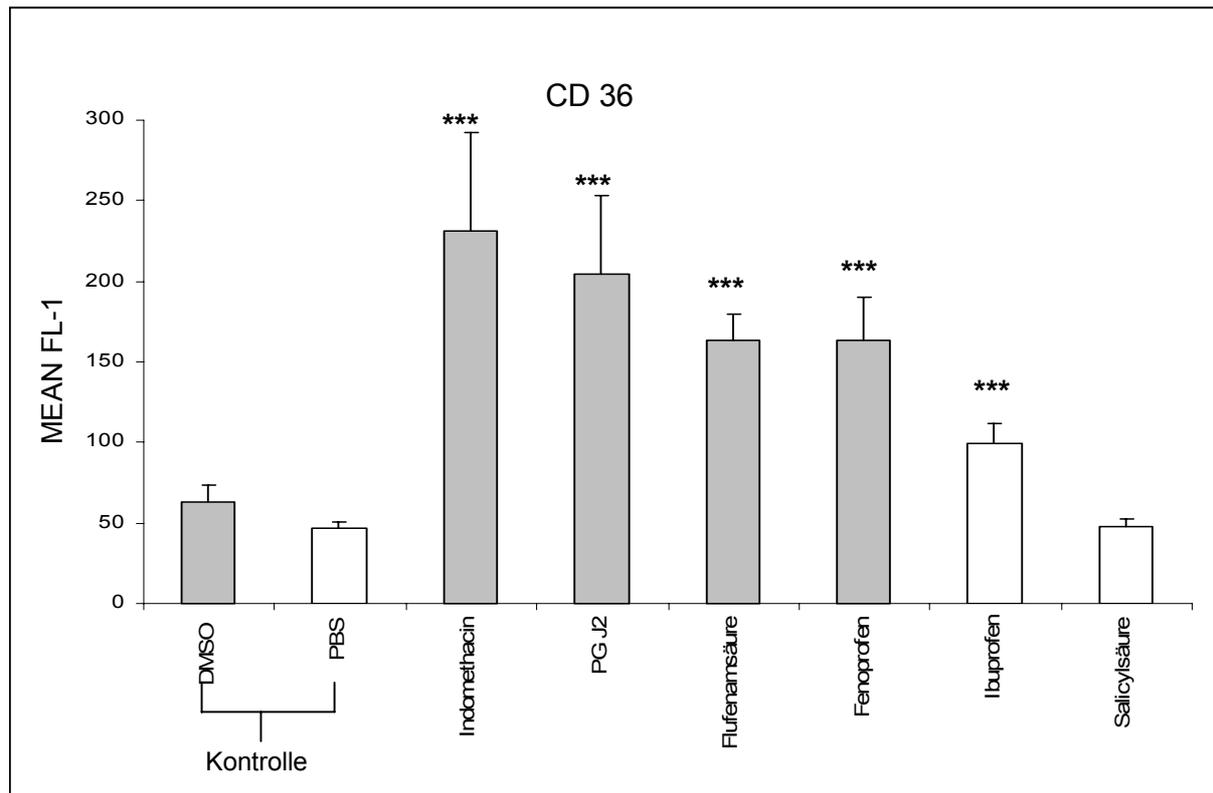


Abbildung 29: Einfluss verschiedener NSAR auf die Expression von CD 36. MM6 sr Zellen wurden 72 h mit verschiedenen NSAR (Konzentration 100  $\mu$ M) inkubiert und ihre CD 36- Oberflächenexpression durchflusszytometrisch gemessen. Als Kontrolle wurden die Zellen mit dem jeweiligen Lösungsmittel behandelt (grau gefüllte Säulen: DMSO, offene Säulen: PBS). Als Positivkontrolle diente 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub>. (MW  $\pm$  SD, n=4: Flufenensäure, Fenoprofen, Ibuprofen, n=7: PGJ<sub>2</sub>, Indomethacin) [verbundener T-Test].

### 5.6.3 Effekte von Rosiglitazon auf MM6 sr Zellen

Rosiglitazon gehört zu den Thiazolidindionen, einer Gruppe neuer oraler Antidiabetika zur Therapie des Diabetes mellitus Typ 2. Ihr Wirkmechanismus beruht auf einer sogenannten Insulinsensitivierung, die durch PPAR  $\gamma$ - Aktivierung vor allem im Fett- und Muskelgewebe vermittelt wird. Rosiglitazon wurde als sehr potenter PPAR  $\gamma$ - Stimulus erkannt<sup>175</sup>.

Da PPAR  $\gamma$  aber nicht nur im Fettgewebe, sondern auch in vielen anderen Geweben vertreten ist, sollte in dieser Arbeit auch die Wirkung von Rosiglitazon auf die Mono Mac 6 sr Zelle untersucht werden, um den Einfluss von Rosiglitazon auf die Expression atherogener Scavengerrezeptoren zu charakterisieren.

Es wurden, wie in den vorangegangenen Versuchen beschrieben, MM6 sr Zellen für 72 Stunden mit Rosiglitazon in Konzentrationen zwischen 0,005  $\mu$ M und 10  $\mu$ M

inkubiert, und deren CD 36- Expression nach immunzytochemischer Markierung mittels FACS gemessen. Zum Vergleich wurden die Zellen mit 100  $\mu\text{M}$  Indomethacin stimuliert. Schon 0,05  $\mu\text{M}$  Rosiglitazon zeigte einen deutlichen Effekt auf die CD 36- Expression. Bei 0,5  $\mu\text{M}$  lag Expression von CD 36 schon in der Größenordnung einer Stimulation mit 100  $\mu\text{M}$  Indomethacin. Dies bestätigt die Potenz von Rosiglitazon als PPAR  $\gamma$ - Stimulus auch an Makrophagen. Insgesamt konnte für Rosiglitazon ein hochsignifikanter, dosisabhängiger Effekt auf die Expression von CD 36 gezeigt werden (Abb. 30).

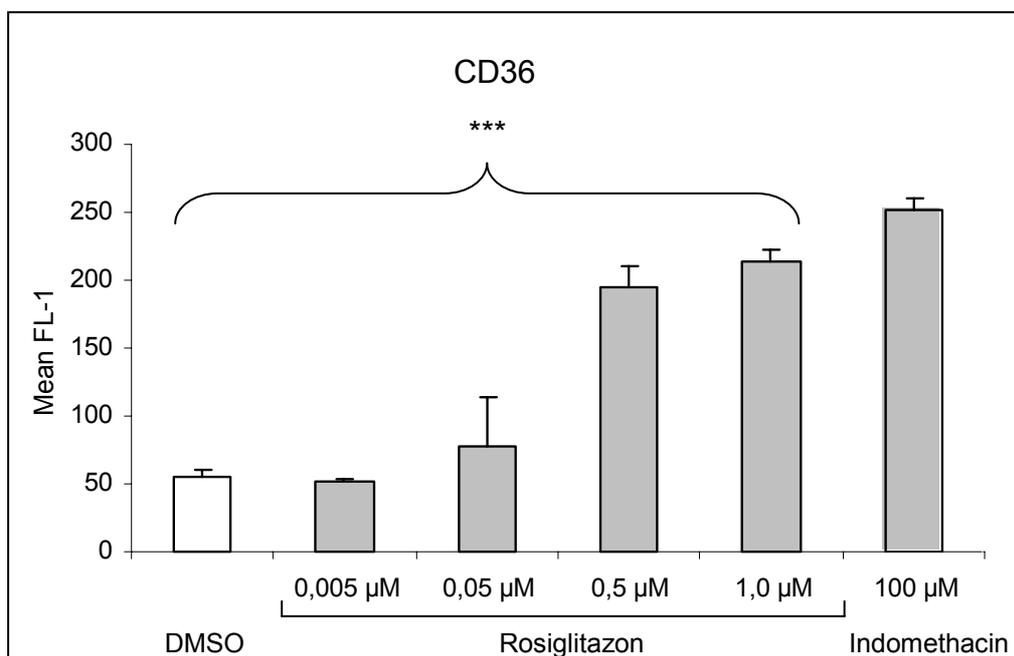


Abbildung 30: Stimulation der CD 36- Expression durch Rosiglitazon. MM6 sr Zellen wurden 72 h mit verschiedenen Konzentrationen Rosiglitazon und zum Vergleich mit 100  $\mu\text{M}$  Indomethacin inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  SD der mittels FACS gemessenen mittleren Fluoreszenz.  $n=3$  [Lineare Regression]  $p<0,0001$ ,  $r=0,9223$ .

#### 5.6.4 Einfluss von Insulin

Neben der durch die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI<sub>3</sub>-Kinase) vermittelten Insertion des Glukosetransporters (GLUT-4) in die Zellmembran werden weitere Signalwege durch den Insulinrezeptor aktiviert<sup>26</sup>, die noch nicht im Einzelnen aufgeklärt sind.

Bei der Entstehung atherosklerotischer Läsionen scheint neben der Hyperglykämie auch die Hyperinsulinämie im Rahmen des Diabetes mellitus Typ 2 eine Rolle zu

spielen. Deshalb sollten in den folgenden Versuchsreihen die Effekte von Insulin auf die CD 36- Expression auf MM6 sr Zellen und seine Interaktion mit dem PPAR  $\gamma$ - Signalweg untersucht werden.

#### 5.6.4.1 Insulin und CD 36- Oberflächenexpression

Da das normale MM6- Zellkulturmedium bereits eine hohe Konzentration an Insulin (9  $\mu\text{g/ml}$ ) enthält, mussten die Zellen zunächst in insulinfreiem Medium gehalten werden. Dafür wurden MM6 sr Zellen in insulinfreiem Medium gewaschen und, um eventuell noch an die Zellen gebundenes Insulin zu entfernen und die Wirkung abklingen zu lassen, für eine Zellpassage in insulinfreiem Medium gehalten. Um eventuelle Irritationen durch die Waschvorgänge auszuschließen, wurden die Kontrollzellen, die in insulinhaltigem Medium gehalten wurden, derselben Prozedur, jedoch mit Resuspension in insulinhaltigem Medium, unterzogen.

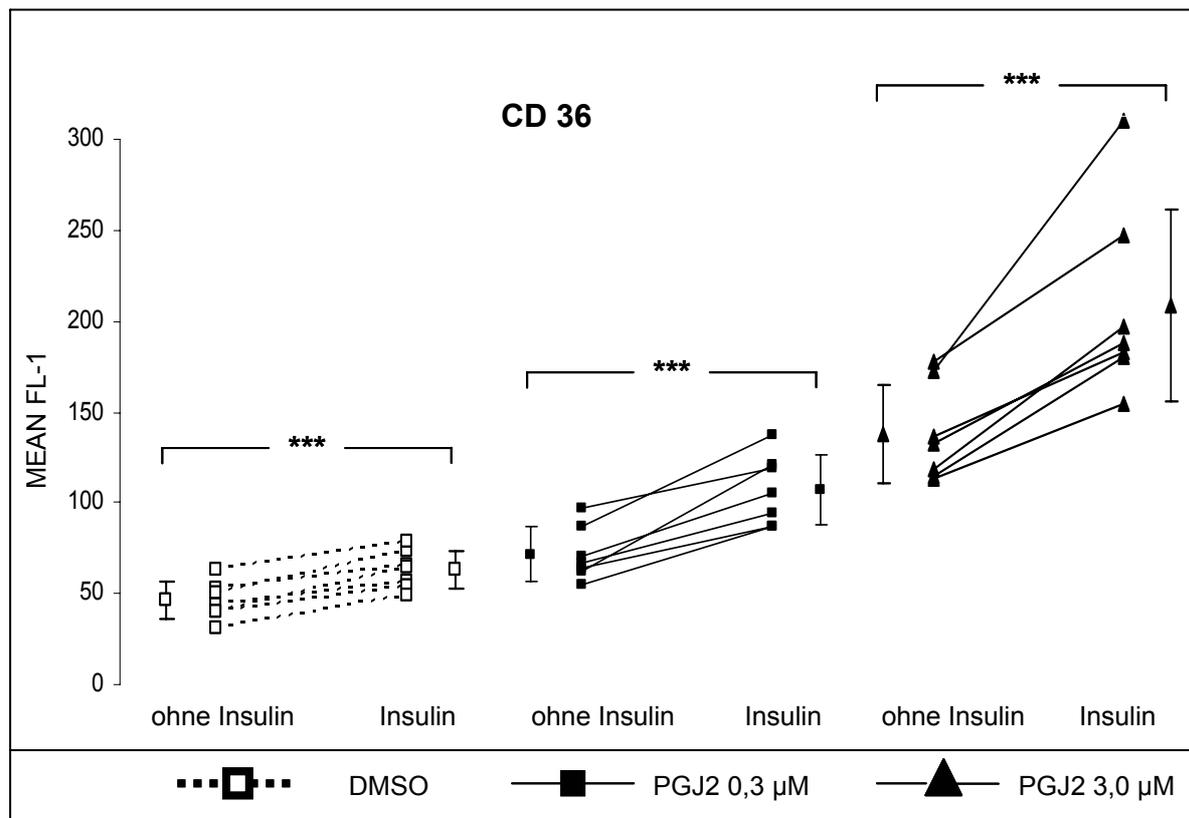


Abbildung 31: Wirkung von Insulin auf die Expression von CD 36. MM6 sr Zellen wurden in Medium ohne Insulin und mit Insulin gehalten und für 72 h mit 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin  $\text{J}_2$  in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Es wurde die CD 36- Oberflächenexpression bestimmt (Einzerversuche,  $n=7$  und  $\text{MW} \pm \text{SD}$ ) [verbundener T-Test].

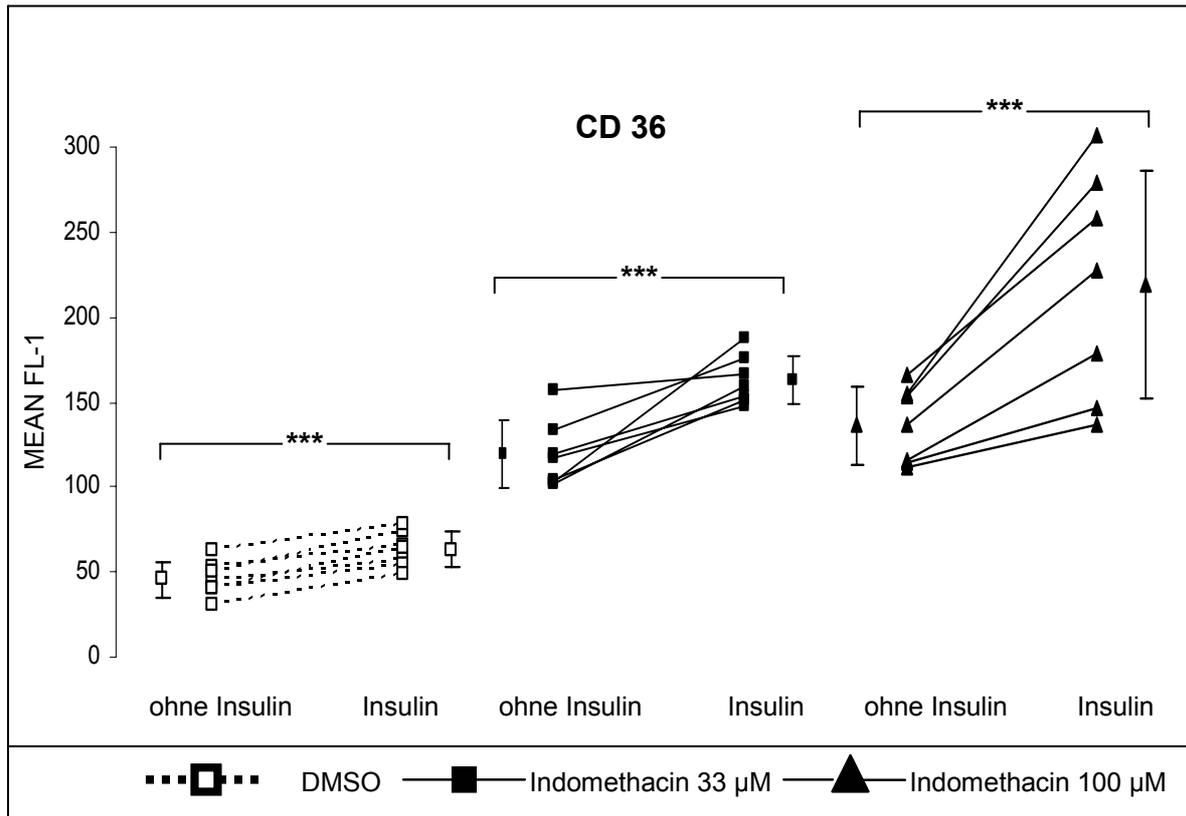


Abbildung 32: Wirkung von Insulin auf die Expression von CD 36. MM6 sr Zellen wurden in Medium ohne Insulin und mit Insulin gehalten und für 72 h mit Indomethacin in den angegebenen Konzentrationen inkubiert. Es wurde die CD 36- Oberflächenexpression bestimmt (Einzelversuche, n=7 und MW ± SD) [verbundener T-Test].

Danach wurden die Zellen wie in den vorangegangenen Versuchen mit 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin  $J_2$  und Indomethacin behandelt, für 72 Stunden inkubiert, und die CD 36- Oberflächenexpression durchflusszytometrisch gemessen.

Die Behandlungen mit 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin  $J_2$  und Indomethacin führten qualitativ zu den schon oben gezeigten signifikanten Effekten auf die CD 36- Oberflächenexpression. Wurden die Zellen in insulinfreiem Medium inkubiert, exprimierten die Zellen signifikant weniger CD 36 auf ihrer Oberfläche sowohl basal wie nach PPAR  $\gamma$ - Stimulation (Abb. 31 und Abb. 32).

Die Behandlung mit Insulin führte zu einer etwa multiplikativen Verstärkung der durch die PPAR  $\gamma$ - Aktivatoren allein verursachten Expression. Der Faktor der Mehrexpression, der durch die Behandlung mit Insulin erreicht wurde, war für die beiden PPAR  $\gamma$ - Aktivatoren 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin  $J_2$  und Indomethacin vergleichbar.

Um definitiv auszuschließen, dass auch in den „insulinverarmten“ Zellen noch

residuelles Insulin vorhanden sein könnte, und um zu klären, ob der maximale Effekt der Insulinverarmung bereits nach einer Zellpassage erreicht war, wurden in drei Experimenten Zellen vor der Behandlung mit 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub> und Indomethacin für drei Zellpassagen, d.h. für insgesamt 11 Tage, in insulinfreiem Medium gehalten (Abb. 33).

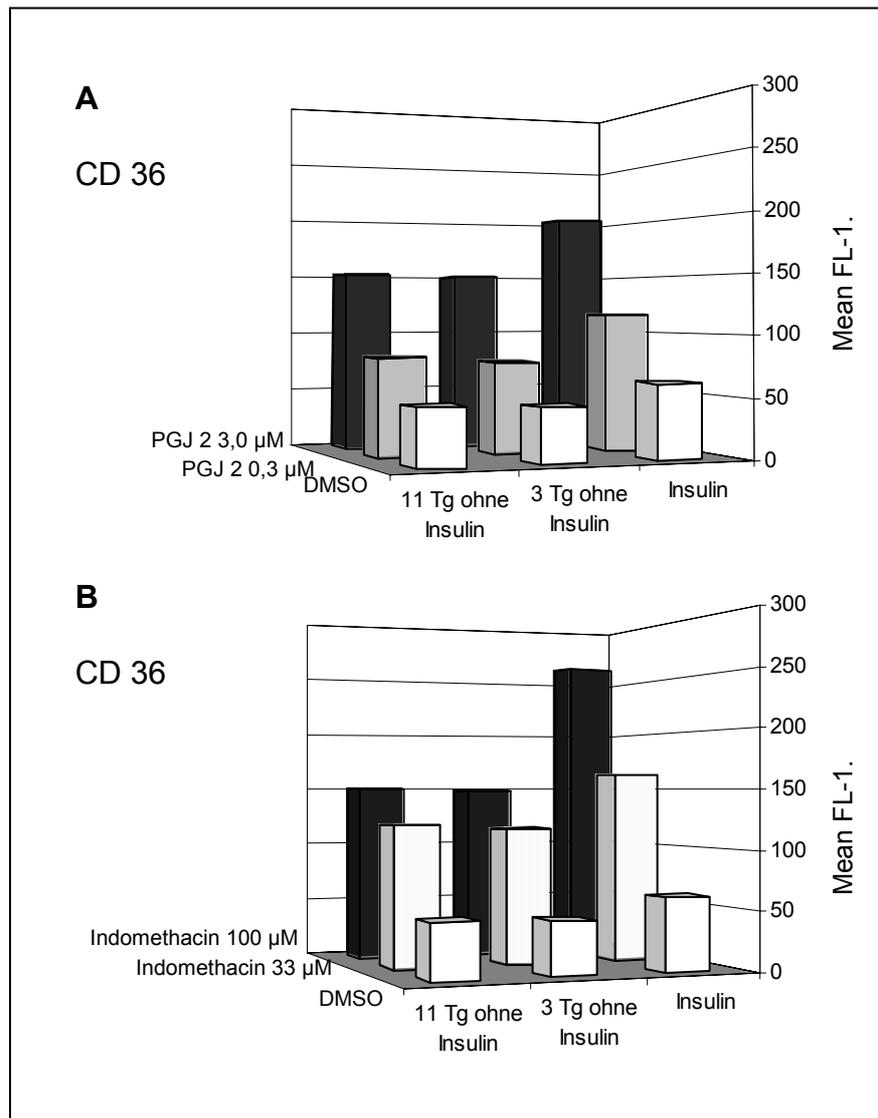


Abbildung 33: Wirkung verschiedener Zeiten der Kultur in Medium ohne Insulin. MM6 sr Zellen wurden für 3 Tage, d.h. für eine Zellpassage, und zusätzlich für 11 Tage, d.h. für 3 Zellpassagen, in Medium ohne Insulin gehalten. Danach wurden sie für 72 h mit 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub> (A) oder Indomethacin (B) stimuliert und ihre CD 36- Oberflächenexpression gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte aus 3 Experimenten (n=3) .

Durch die längere Zellpassage ohne Insulin konnte jedoch kein weiterer Rückgang der basalen und PPAR  $\gamma$ - stimulierten Expression von CD 36 erreicht werden. Bei bis

zu 11 Tagen Kultur in insulinfreiem Medium war morphologisch keine toxische Schädigung oder verminderte Proliferation feststellbar.

Es kann also davon ausgegangen werden, dass bereits nach einer Zellpassage der maximale Effekt der Insulinverarmung erreicht ist. Auch konnte so gezeigt werden, dass MM6 sr Zellen ohne morphologisch erkennbare Schädigung für längere Zeit in insulinfreiem Medium kultivierbar sind, und die verminderte Expression nicht Ausdruck einer durch den Insulinmangel verursachten unspezifischen trophischen Deprivation der Zellen ist.

#### 5.6.4.2 Insulin und PPAR $\gamma$ - Expression in Makrophagen

In der folgenden Versuchsreihe wurde der Effekt von Insulin auf die intrazelluläre PPAR  $\gamma$ - Expression der Zellen untersucht. Die Zellen wurden wie in der letzten Versuchsreihe zunächst für die Dauer einer Zellpassage in insulinfreiem Medium kultiviert und dann mit verschiedenen Konzentrationen 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin  $J_2$  und Indomethacin behandelt.

Wie in Abschnitt 5.1.1 gezeigt, konnte die intrazelluläre PPAR  $\gamma$ - Expression durch 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin  $J_2$  und Indomethacin stimuliert werden. Der Effekt war nach 24 Stunden am größten und klang nach 48 Stunden bereits wieder ab. Auffallend war jedoch, dass sich bei den Zellen in insulinfreiem Medium nach Stimulation mit 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin  $J_2$  und Indomethacin zwei verschiedene Subpopulationen bezüglich der zellulären PPAR  $\gamma$ - Expression gebildet hatten: Die eine zeigte den vorher beschriebenen Anstieg der PPAR  $\gamma$ - Expression, während die zweite eine deutlich geringere Menge an intrazellulärem PPAR  $\gamma$  aufwies. Die Verteilung der Populationen war abhängig von der Konzentration des eingesetzten PPAR  $\gamma$ - Stimulus; bei hohen Konzentrationen stieg der Anteil der Zellen mit geringer intrazellulärer PPAR  $\gamma$ - Expression stark an. Bei den Zellen der Subpopulation mit höherer Expression war aber dennoch weiter ein deutlicher Anstieg nachzuweisen. Auch Zellen in insulinhaltigem Medium zeigten nach Stimulation mit hohen Konzentrationen 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin  $J_2$  (5  $\mu$ M) im Ereignishistogramm eine kleine Subpopulation mit niedriger PPAR  $\gamma$ - Expression neben dem deutlichen Anstieg der Expression bei der Subpopulation mit hoher

Expression angedeutet. Bei Verwendung von insulinfreiem Medium zeigte sich dann fast nur noch die Subpopulation mit niedriger PPAR  $\gamma$ -Expression (Abb. 34).

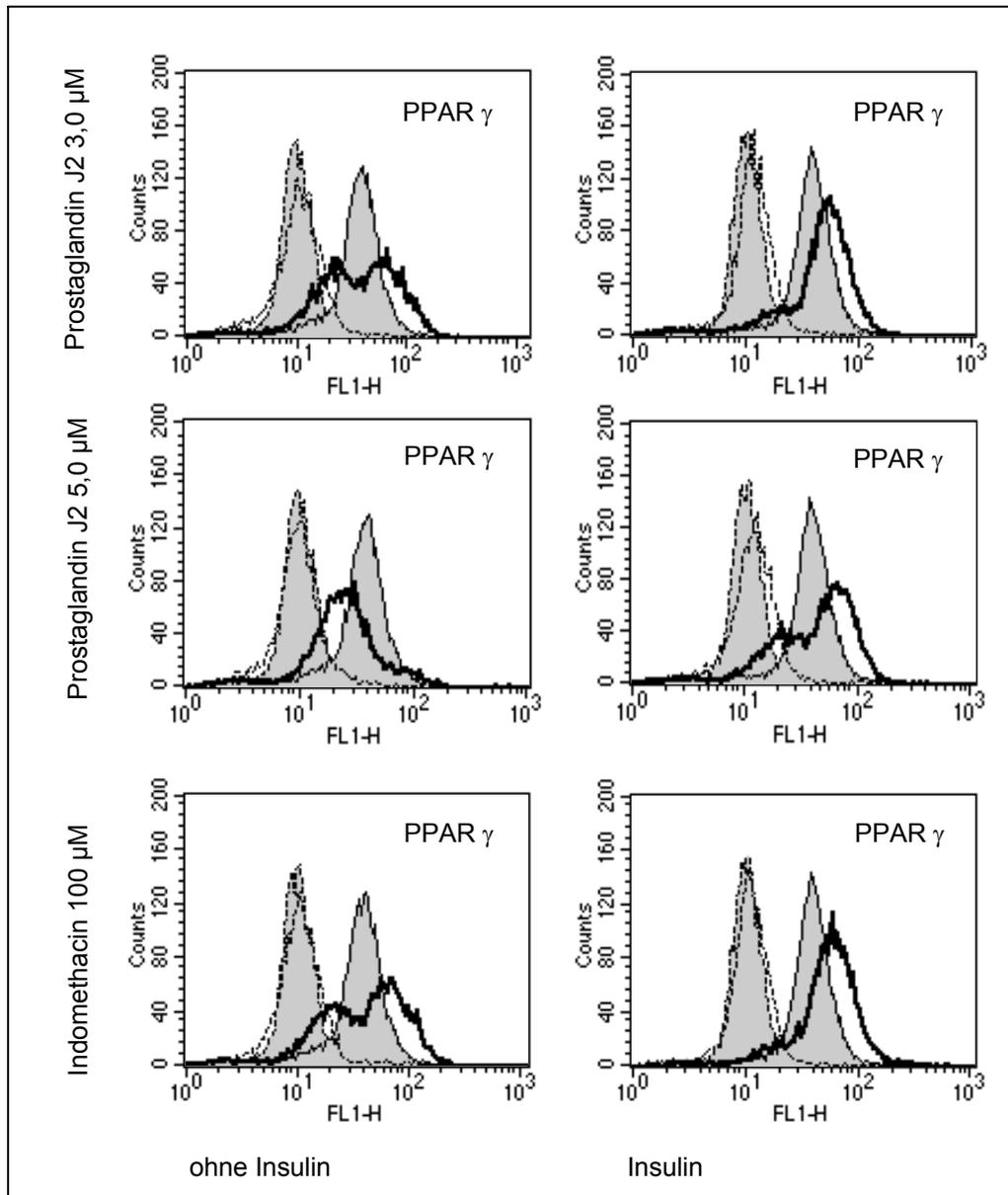


Abbildung 34: **Expression von PPAR  $\gamma$  nach 24 Stunden:** MM6 sr Zellen wurden für 24 h mit Indomethacin oder 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub> stimuliert, und ihre intrazelluläre PPAR  $\gamma$ -Expression durchflusszytometrisch gemessen. Die Zellen wurden vorher für die Dauer einer Zellpassagen in Medium mit oder ohne Insulin gehalten. Dargestellt sind repräsentative FACS-Diagramme. Die grau gefüllten Kurven zeigen die Markierung der Kontrollzellen (DMSO), die offenen Kurven die Behandlung (Indomethacin oder 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub>). Die gestrichelte Linie zeigt die Isotypkontrolle, die durchgezogene Linie die spezifische Antikörpermarkierung.

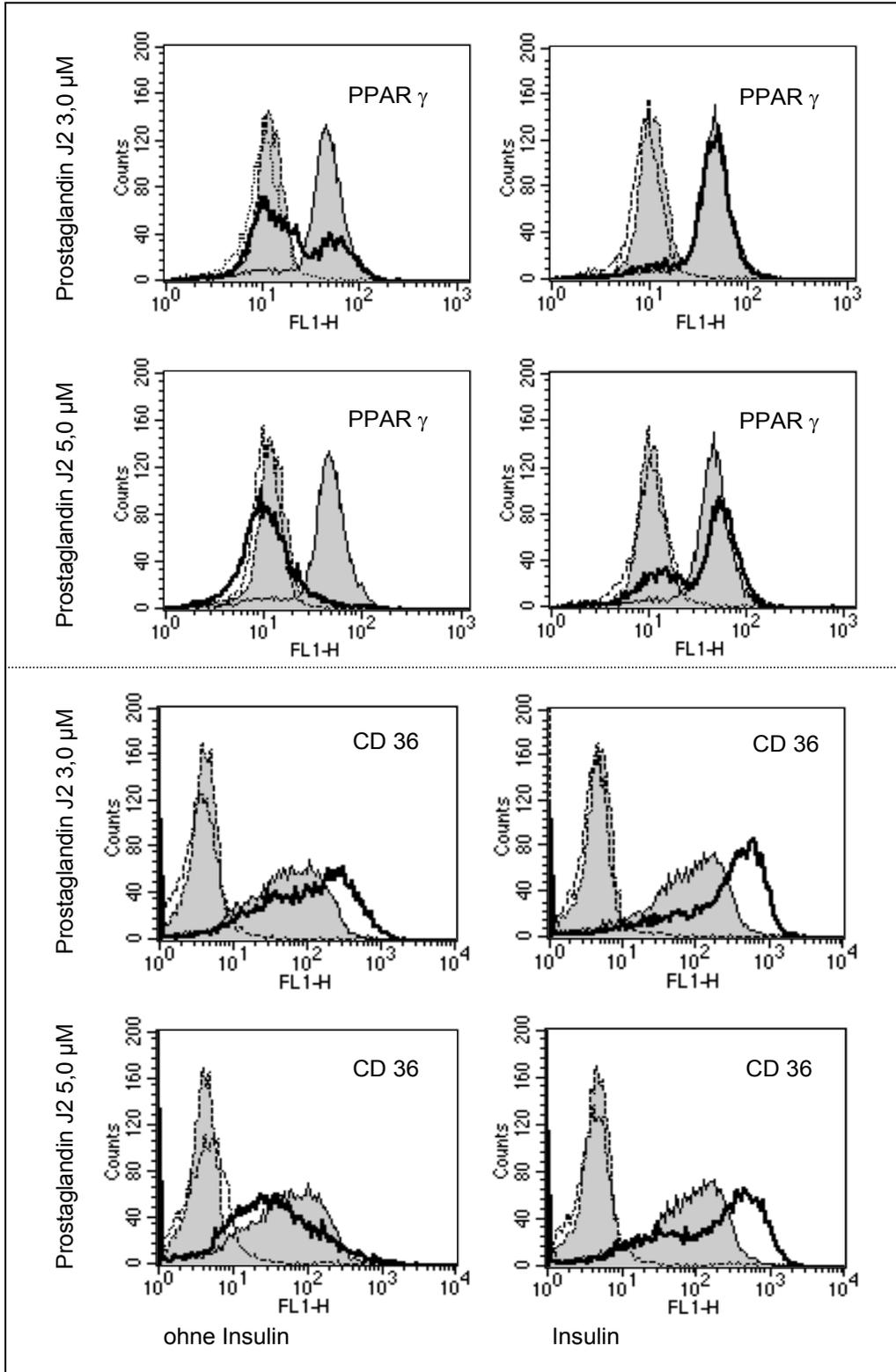


Abbildung 35: **Expression von PPAR  $\gamma$  und CD 36 nach 48 Stunden:** MM6 sr Zellen wurden für 48 h mit 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub> stimuliert und ihre intrazelluläre PPAR  $\gamma$  Expression sowie die CD 36- Oberflächenexpression durchflusszytometrisch gemessen. Die Zellen wurden vorher für die Dauer einer Zellpassagen in Medium mit oder ohne Insulin gehalten. Dargestellt sind repräsentative FACS-Diagramme. Die grau gefüllten Kurven zeigen die Markierung der Kontrollzellen (DMSO), die offenen Kurven die Behandlung (Indomethacin oder 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub>). Die gestrichelte Linie zeigt die Isotypkontrolle, die durchgezogene Linie die spezifische Antikörpermarkierung.

Im Zeitverlauf war bei der Subpopulation mit hohem PPAR  $\gamma$ - Gehalt der Anstieg der PPAR  $\gamma$ - Expression nach 24 Stunden am ausgeprägtesten und nach 48 Stunden deutlich geringer nachweisbar, unabhängig vom Insulingehalt des Mediums. In insulinfreiem Medium wuchs die Subpopulation mit niedriger PPAR  $\gamma$ - Expression nach Stimulation im Zeitverlauf auf Kosten der Zellen mit hoher Expression an (Abb. 35).

Um die Beziehung zwischen der PPAR  $\gamma$ - Expression und der CD 36 - Oberflächenexpression der Zellen direkt zu untersuchen, wurde nach 48 Stunden die CD 36- Expression an einem Aliquot aus der Zellkultur gemessen und die erhaltenen Histogramme mit den PPAR  $\gamma$ - Messungen verglichen (Abb. 35). Hier zeigte sich zum einen der in Abschnitt 5.6.4.1 beschriebene Effekt von Insulin auf die CD 36- Expression. Zum anderen bildete sich wie bei PPAR  $\gamma$ , in den Ereignishistogrammen zum Teil nur als angedeutete linksseitige Schulter sichtbar, eine zweite Subpopulation mit deutlich geringerer CD 36- Oberflächenexpression aus, wenn die Zellen in insulinfreiem Medium gehalten wurden. Die Größe dieser Subpopulation war wiederum abhängig von der Konzentration des PPAR  $\gamma$ - Stimulus. In insulinfreiem Medium bildeten sich also nach Stimulation von PPAR  $\gamma$  zwei Subpopulationen aus: Die eine hatte eine hohe Expression an intrazellulärem PPAR  $\gamma$  und dem abhängigen Transkriptionsprodukt CD 36. Die zweite Population enthielt sehr viel geringere Mengen an PPAR  $\gamma$  und CD 36.

Betrachtet man nur die Subpopulation mit hoher PPAR  $\gamma$ - bzw. CD 36- Expression auf Zellen abhängig davon, ob die Zellen in Medium mit oder ohne Insulin gehalten wurden, so zeigte sich auch hier ein Effekt des Insulins.

Somit beruht der in Abschnitt 5.6.4.1 beschriebene Effekt von Insulin auf die CD 36- Oberflächenexpression der gesamten Population nur zum Teil auf der Bildung einer zweiten Subpopulation mit niedriger Expression in insulinfreiem Medium. Denn an der Teilpopulation mit hoher PPAR  $\gamma$ - bzw. CD 36- Expression lässt sich ebenfalls noch eine Stimulation durch Insulin erkennen.

#### 5.6.4.3 CD 36- / Annexin- Doppelfärbung

Zur weiteren Charakterisierung der einzelnen Zellpopulationen wurden Doppelfärbungen mit FITC- markierten CD 36- Antikörpern und Annexin V-PE durchgeführt, da die Vermutung einer gesteigerten Präapoptose bei der Subpopulation mit niedriger PPAR  $\gamma$ - und niedriger CD 36- Expression nahe lag. Tatsächlich bestand diese Subpopulation überwiegend aus Annexin- positiven Zellen, also Zellen in einem frühen Stadium der Apoptose. Diese Zellen bildeten in den CD 36- Histogrammen die linksseitige Schulter aus. Sie war in Versuchsansätzen mit Insulin nur sehr gering ausgeprägt. Bei Verwendung von insulinfreiem Medium bildete sich diese Subpopulation umso stärker aus, je höher die Konzentration des PPAR  $\gamma$ - Stimulus war.

In den Kontrollzellen (DMSO) waren die Annexin- positiven Zellen in der Gesamtzellpopulation ohne Zusammenhang mit der CD 36- Expression gleichmäßig verteilt (Abb. 36).

Die hier durchgeführte Markierung präapoptotischer Zellen erlaubte durch Subtraktion die Identifizierung der Annexin- negativen, lebenden Zellen und deren alleinige Auswertung. Diese wiesen in den CD 36- Histogrammen eine hohe Expression auf und waren rechtsseitig randbildend. Betrachtet man nur die Annexin- negative Population und vergleicht die CD 36- Oberflächenexpression von Zellen in insulinfreiem Medium mit der von Zellen in insulinhaltigem Medium, so erkennt man, dass der Rückgang der CD 36- Oberflächenexpression der gesamten Zellpopulation nicht nur auf einer gesteigerten Apoptoseinduktion nach PPAR  $\gamma$ - Stimulation, sondern auch auf einer verminderten Stimulation der CD 36- Expression beruht (Abb. 37).

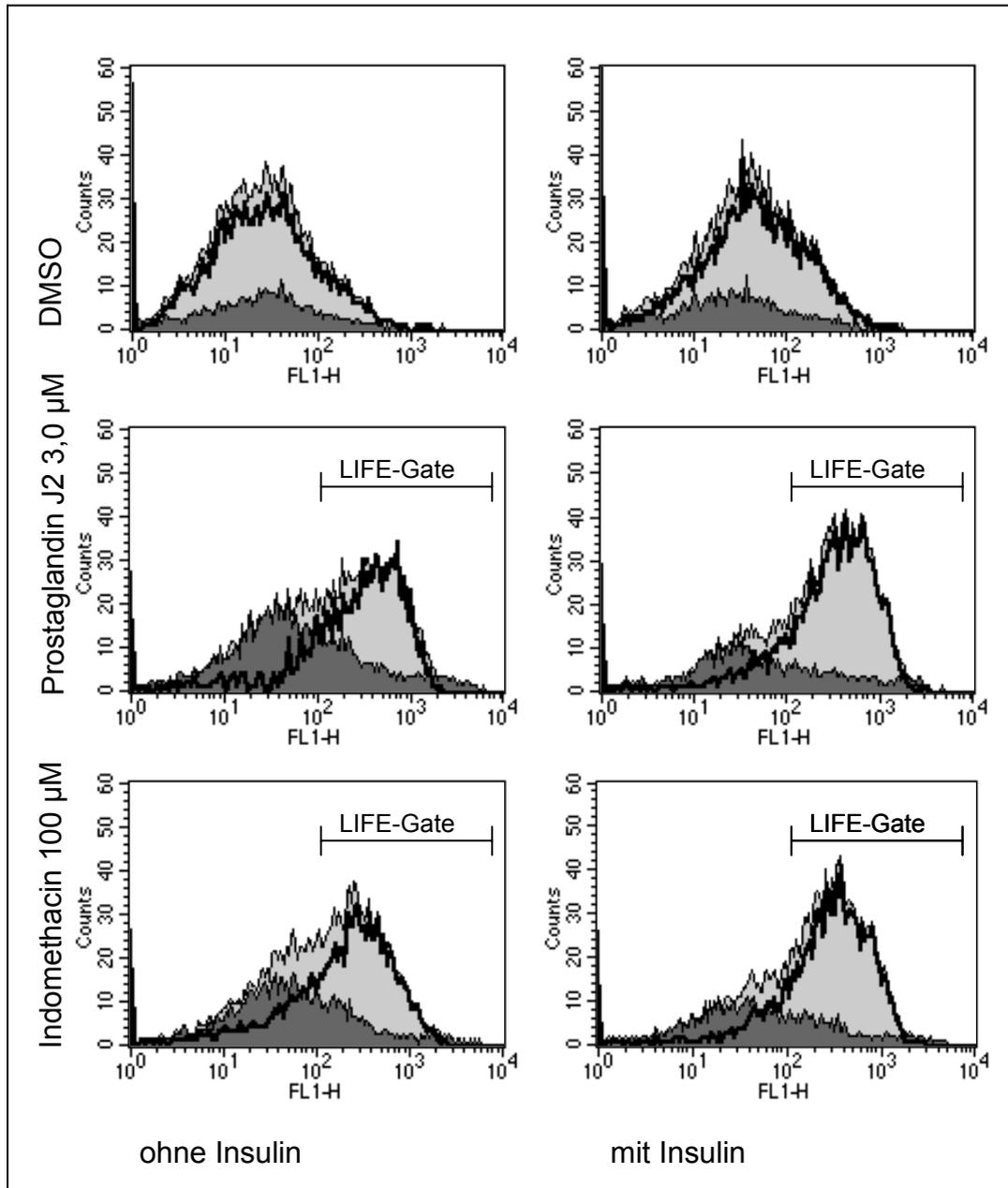


Abbildung 36: Doppelfärbung CD36- Expression / Annexin. MM6 sr Zellen wurden zunächst für eine Zellpassage in Medium ohne bzw. mit Insulin gehalten und daraufhin für 3 Tage mit Indomethacin oder 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin  $J_2$  stimuliert. CD 36 wurde wie bisher FITC markiert. Gleichzeitig wurden die präapoptotischen Zellen mit Annexin V-PE markiert und simultan gemessen. Die hellgrau gefüllte Kurve zeigt die CD 36- Expression der gesamten Zellpopulation. Die dunkelgrau gefüllte Kurve stellt die Annexin-positiven, also präapoptotischen Zellen dar. Durch Subtraktion dieser beiden Diagramme ergibt sich jeweils ein Histogramm der CD 36- Expression Annexin-negativer, d.h. nicht apoptotischer Zellen (offene, fett gezeichnete Kurve). Die Isotypkontrolle ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt.

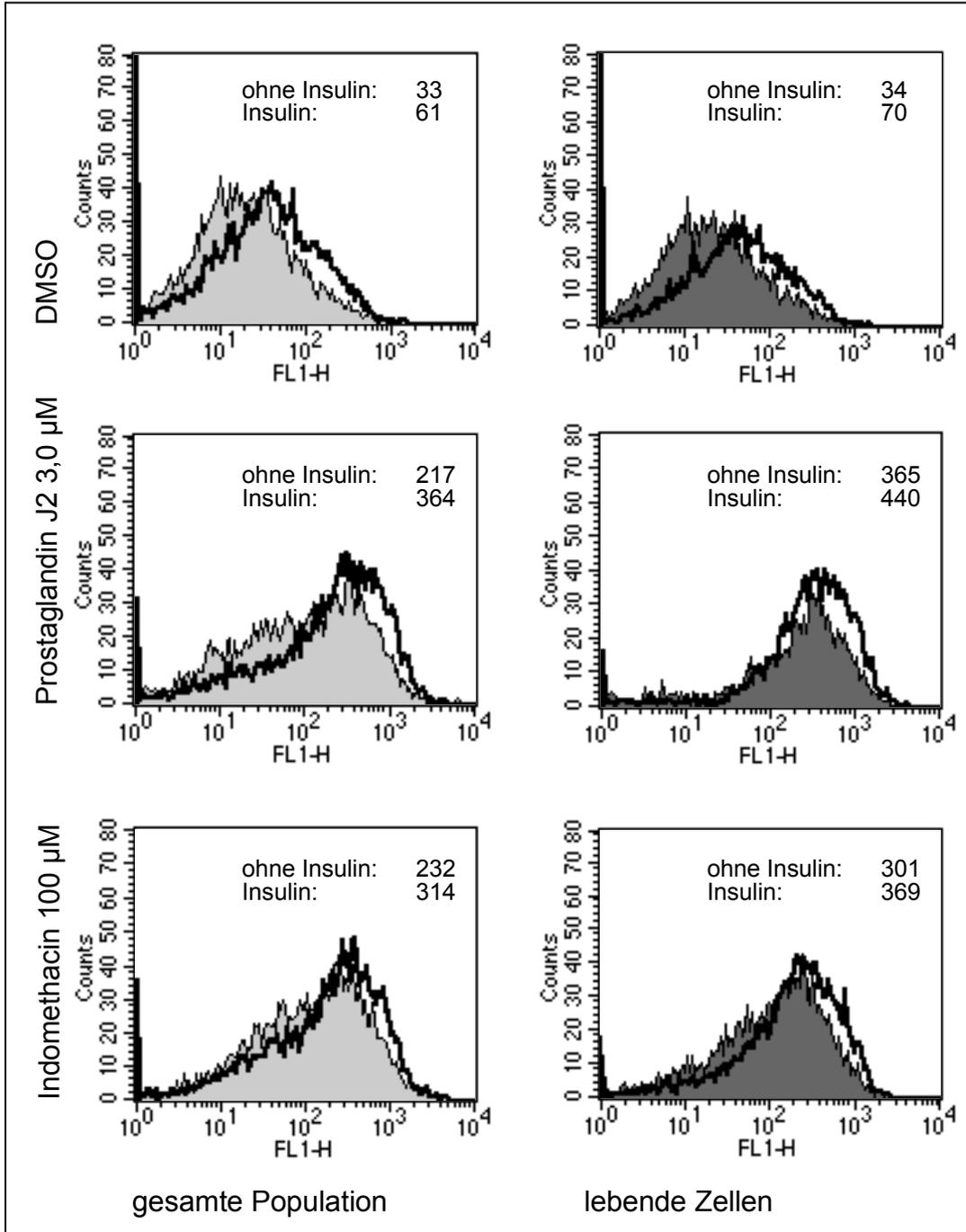


Abbildung 37: CD 36- Expression mit und ohne Insulin. MM6 sr Zellen wurden für eine Zellpassage in Medium mit oder ohne Insulin gehalten und daraufhin für 72 h mit Indomethacin oder 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub> behandelt und die CD 36- Oberflächenexpression gemessen. Dargestellt sind repräsentative FACS-Histogramme. In den linken Diagrammen ist die CD 36- Oberflächenexpression der gesamten Zellpopulation dargestellt. Die rechten Diagramme zeigen die CD 36- Oberflächenexpression der Annexin-negativen (lebenden) Subpopulation. Gefüllte Kurven: ohne Insulin. Offene, fette Kurven: mit Insulin. In jedem Diagramm ist zusätzlich die gemessene mittlere Fluoreszenz als Zahlenwert angegeben. Die Isotypkontrolle ist aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt.

Insulin hat also zwei Effekte auf die MM6 sr Zellen: Es steigert synergistisch die durch PPAR  $\gamma$ - Stimulatoren hervorgerufene vermehrte Expression von CD 36 und es verhindert die gleichzeitig durch PPAR  $\gamma$ - Stimulation induzierte Apoptose.

Da durch die Doppelfärbung die Verteilung der präapoptotischen Zellen innerhalb eines Histogramms sichtbar gemacht werden konnte, wurde ein sogenanntes „life-gate“ zur weiteren Auswertung eingeführt, in dem sich praktisch nur lebende Zellen befinden (siehe Abb. 36). Ein Vergleich der durch dieses Modell erhaltenen Werte mit den tatsächlichen mean-fluorescence Werten der „lebenden“, Annexin-negativen Zellen erbrachte eine recht gute Übereinstimmung.

Eine Doppelfärbung von PPAR  $\gamma$  und Annexin ist wegen der erforderlichen Permeabilisierung aus methodischen Gründen nicht möglich.

#### **5.6.4.4 Abhängigkeit der Apoptose und der CD 36- Expression von der Insulinkonzentration**

In einer weiteren Versuchsreihe wurde versucht, die beiden Effekte von Insulin, d.h. Schutz vor Apoptose und Verstärkung der PPAR  $\gamma$ - aktivierten CD 36- Oberflächenexpression zu trennen. Dazu wurde dem insulinfreien Medium Insulin in abnehmender Konzentration zugegeben: 100% der normal im MM6- Zell Medium enthaltenen Menge (9  $\mu\text{g/ml}$ ), 10 %, 1,0 %, 0,1 % und 0%. Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin  $J_2$  (und Indomethacin) für 72 Stunden stimuliert. An Aliquots wurde die CD 36- Oberflächenexpression und die Apoptose gemessen. Es zeigte sich eine signifikante, log-lineare Abhängigkeit der CD 36- Expression und der Apoptose von der Insulinkonzentration im Medium (Abb. 38).

Trägt man in je einem Diagramm für einen PPAR  $\gamma$ - Stimulus (DMSO-Kontrolle, 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin  $J_2$  in den Konzentrationen 0,3  $\mu\text{M}$  und 3,0  $\mu\text{M}$ ) die CD 36- Expression und die Apoptose, ausgedrückt durch den Anteil der Annexin- positiven Zellen, über den verschiedenen Insulinkonzentrationen auf, so erkennt man, dass das Maximum der Apoptose bei einem Insulinanteil im Medium von 0% liegt und bis ca. 1% Insulin im Medium auf ein dann gleichbleibendes Niveau abfällt. Die CD 36- Oberflächenexpression beginnt erst ab einem Anteil von 1% der maximalen

Insulinmenge im Medium deutlich zu steigen um bei 100 % ihr Maximum zu erreichen. Vorher kommt es nur zu einem geringen Anstieg der CD 36-Oberflächenexpression. So gelingt es bereits durch Zugabe einer geringen Insulinmenge (1% der maximalen Konzentration) die Apoptose zu verhindern. Erhöht man die Konzentration weiter, tritt die Stimulation der CD 36- Oberflächenexpression durch Insulin in den Vordergrund (Abb. 39).

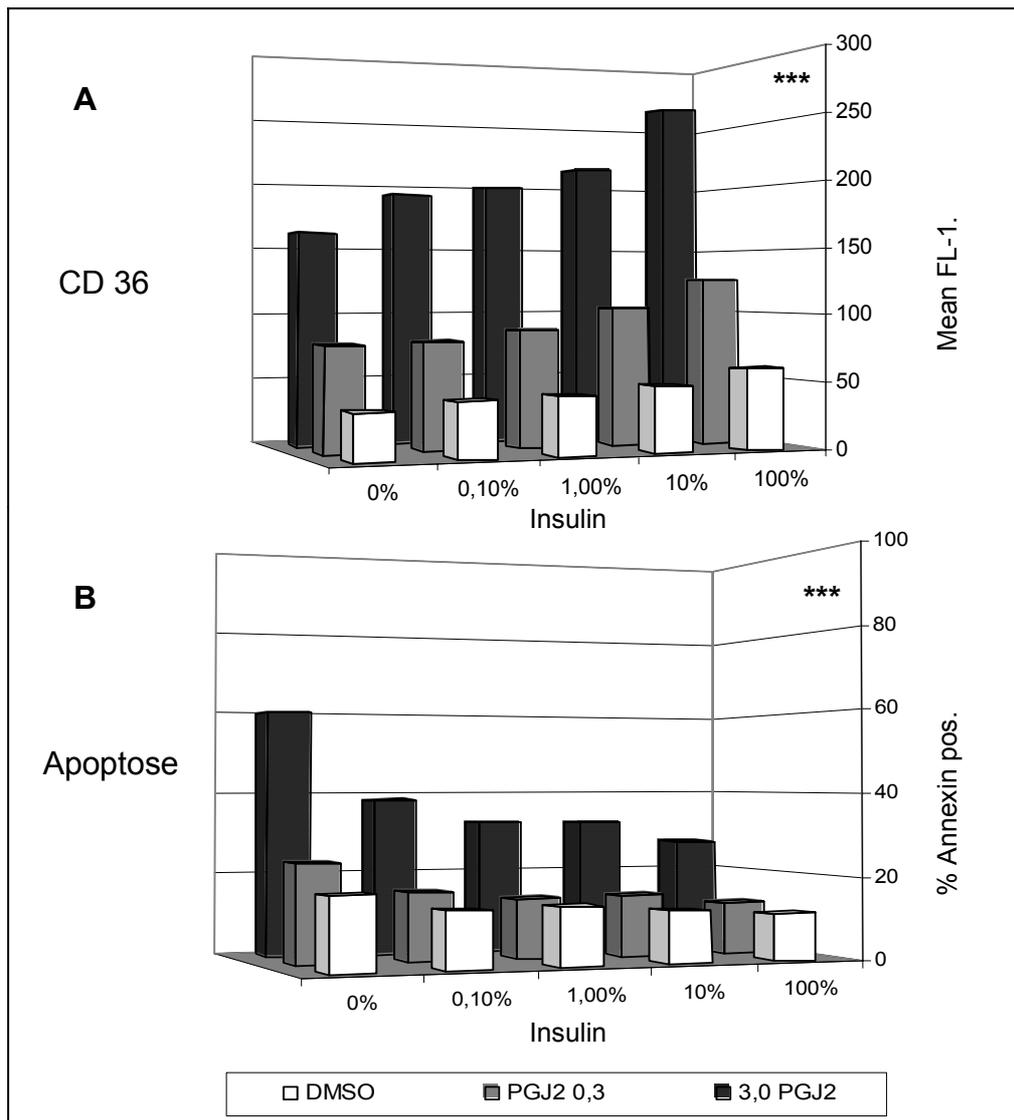


Abbildung 38: Abhängigkeit der CD 36- Expression und der Apoptose von der Insulindosis. MM6 sr Zellen wurden in Medium mit verschiedenen Insulinkonzentrationen gehalten und durch 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin  $J_2$  stimuliert. Dargestellt ist die CD 36 Expression- (A) und die Apoptose (B) [lineare Regression] (A: CD 36  $p < 10^{-5}$ ,  $r = 0,90929$ , B: Apoptose  $p < 10^{-5}$ ,  $r = 0,8447$ ) ( $n = 5$ ).

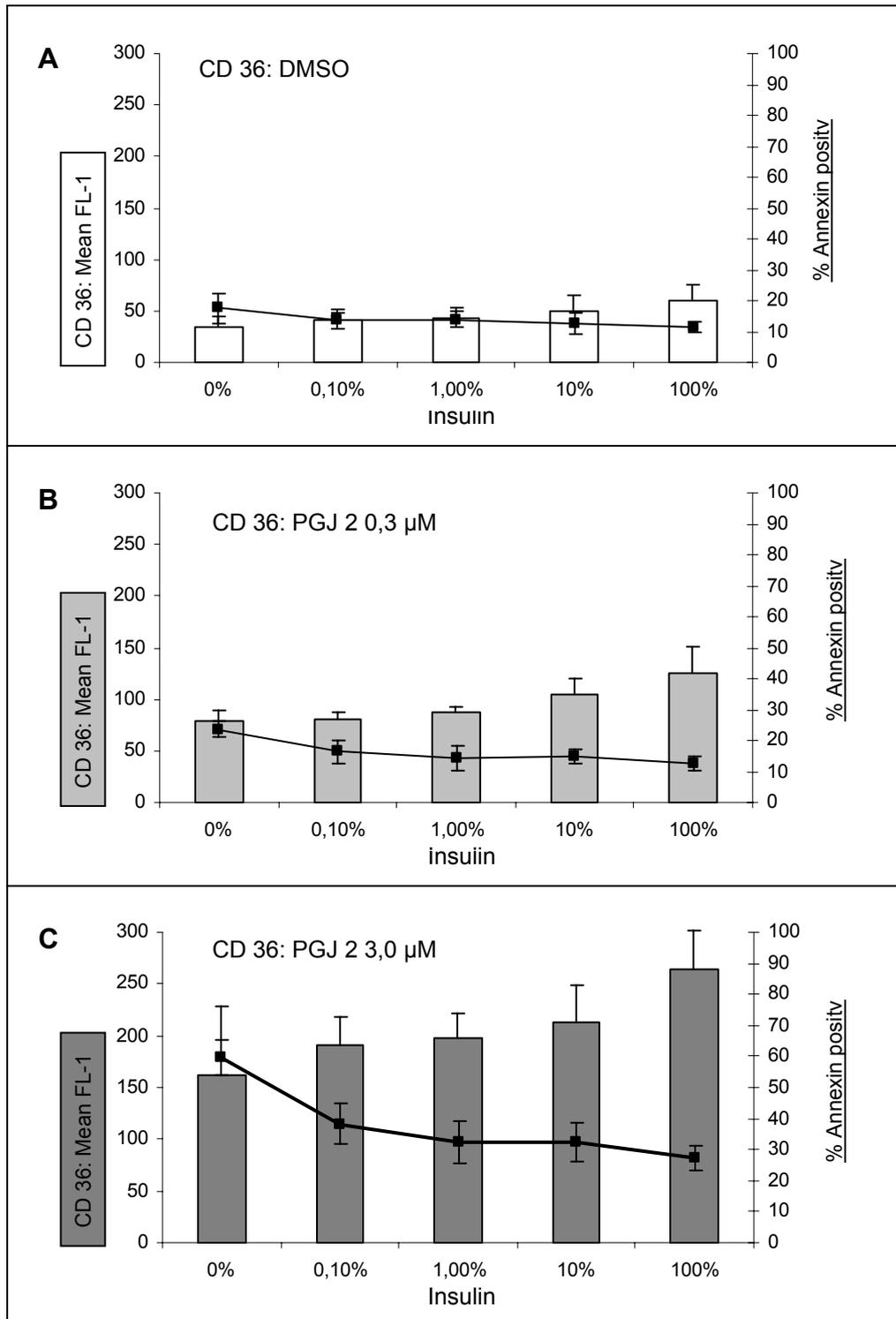


Abbildung 39: Wirkung von Insulin auf die CD 36-Expression und die Apoptose. MM6 sr Zellen wurden in Medium mit verschiedenen Insulinkonzentrationen gehalten und durch 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin  $J_2$  stimuliert. Als Balkendiagramm ist die CD 36-Expression aufgetragen (linke Skala). Der Anteil der präapoptotischen Zellen ist als Liniendiagramm dargestellt (rechte Skala) [lineare Regression] (MW $\pm$ SD, n=5).

#### 5.6.4.5 Neuberechnung der Ergebnisse durch die Einführung eines „life-gates“

Im Abschnitt 5.6.4.3 wurde die Identifizierung der einzelnen Zellpopulationen durch CD 36 / Annexin– Doppelfärbungen beschrieben. Es zeigte sich, dass die Annexin – positiven, präapoptotischen Zellen in den Ereignishistogrammen linksseitig gelegen und die intakten, Annexin –negativen Zellen rechts randbildend sind. Durch die Einführung eines sog. „life-gates“ gelang es annäherungsweise den mean fluorescence-Wert der lebenden und nicht präapoptotischen Zellen zu bestimmen. So konnten auf relativ einfache Weise in den Versuchen von Abschnitt 5.6.4.1 nur die intakten Zellen ausgewertet werden und nochmals gezeigt werden, dass der Anstieg der CD 36- Oberflächenexpression nicht nur auf einem Rückgang der Apoptose, sondern tatsächlich auch auf einer direkten Stimulation der Expression durch Insulin beruht (Abb. 40).

Da dies für die DMSO-Kontrolle nicht möglich ist, ist in Diagramm B DMSO nur zum Vergleich aus Diagramm A übernommen worden.

Insgesamt konnte somit auch am Makrophagenmodell die Interaktion von Insulin und PPAR  $\gamma$ - Agonisten bei der Scavengerrezeptorexpression unabhängig vom trophischen Effekt von Insulin nachgewiesen werden.

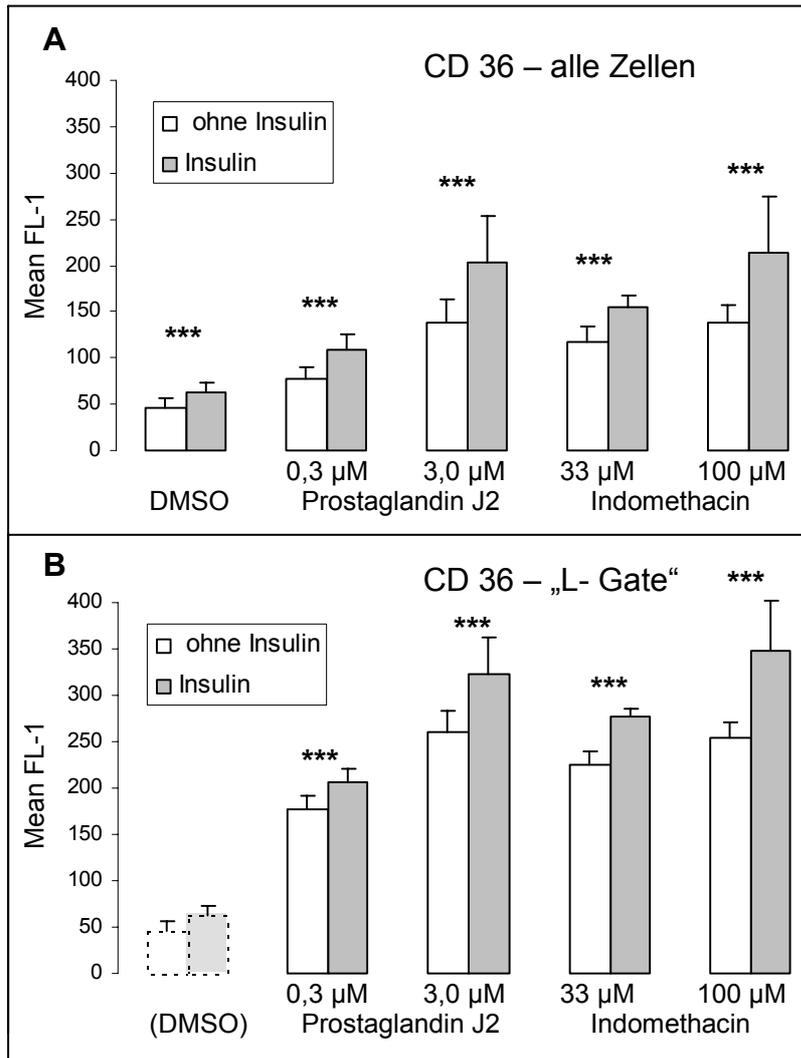


Abbildung 40: Wirkung von Insulin auf die CD 36- Expression. Die in Abschnitt 5.6.4.1 gezeigten Daten (A) wurden nach Einführung eines „Life-Gates“ erneut ausgewertet, um den Einfluss der vermehrten Apoptose auf Zellen, die in Medium ohne Insulin gehalten wurden, von der Stimulation der durch PPAR  $\gamma$ - vermittelten CD 36-Expression zu trennen (B). Da bei den mit DMSO behandelten Kontrollzellen die apoptotische Population gleichmässig unter gesamten Zellpopulation verteilt ist, konnte das „L-Gate“ hier nicht angewendet werden. Deshalb ist in Diagramm (B) DMSO nur zur Orientierung aus (A) übernommen (n=7, MW $\pm$ SD) [verbundener T-Test].

## 6 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollten einige Aspekte der Expression, Regulation, pharmakologischer Beeinflussung und Funktion von Scavengerrezeptoren untersucht werden. Im Mittelpunkt stand hierbei der Signalweg über den Transkriptionsfaktor PPAR  $\gamma$ . Er hat seit einigen Jahren auch klinisches Interesse erlangt, da eine neue Gruppe oraler Antidiabetika, die Thiazolidindione über die Aktivierung von PPAR  $\gamma$  wirken. Da der Transkriptionsfaktor PPAR  $\gamma$  jedoch nicht nur im Fett- und Muskelgewebe, seinem vermuteten Wirkort bei der Insulinsensitivierung, exprimiert wird, sondern eine breite Verteilung in verschiedensten Zelltypen aufweist<sup>7</sup>, sind die Wirkungen dieser neuen Stoffgruppe vermutlich nicht auf die Insulinsensitivierung der Muskulatur beschränkt. So konnte PPAR  $\gamma$  insbesondere in den verschiedenen Zellarten des atherosklerotischen Plaques, darunter auch Makrophagen, nachgewiesen werden<sup>103</sup>. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit versucht werden, die Wirkung und Interaktionen dieser PPAR  $\gamma$ - beeinflussenden Pharmaka auf die Expression atherogener Scavengerrezeptoren von Makrophagen zu charakterisieren.

### 6.1 Nichtsteroidale Antirheumatika sind Liganden von PPAR $\gamma$

Zunächst wurden verschiedene nichtsteroidale Antiphlogistika, die als Liganden des Transkriptionsfaktors PPAR  $\gamma$  identifiziert wurden, auf ihre Wirkung auf die Scavengerrezeptorexpression der Makrophagen Modell-Zelle MM6 sr untersucht. Das ist vor dem Hintergrund von besonderem Interesse, dass die Arteriosklerose zunehmend als eine chronisch-entzündliche Erkrankung der Gefäßwand angesehen wird<sup>139</sup>. Dies zeigt sich nicht nur in der Infiltration der Gefäßwand mit Entzündungszellen, sondern auch an systemischen Entzündungsmarkern wie hsCrP und IL-6, die zur Aktivitätsbeurteilung des arteriosklerotischen Prozesses herangezogen werden können und prognostische Bedeutung besitzen<sup>129</sup>. Ein Teil der antientzündlichen Wirkung der NSAR wird, wie oben beschrieben (siehe Abschnitt 2.5.3.2), möglicherweise durch die Wirkung von PPAR  $\gamma$  vermittelt. Deshalb sollten die Wirkungen nichtsteroidaler Antirheumatika in Monozyten/Makrophagen auf den Transkriptionsfaktor PPAR  $\gamma$  und auf die

Scavengerrezeptoren als Effektoren der Schaumzellbildung untersucht werden.

### 6.1.1 Nichtsteroidale Antirheumatika beeinflussen die Expression von PPAR $\gamma$

In einer ersten Versuchsreihe wurde die intrazelluläre Expression und auch die Lokalisation von PPAR  $\gamma$  nach Stimulation von Monozyten/Makrophagen untersucht. Die Zellen wurden mit Indomethacin als NSAR, das bereits einen guten Stimulationseffekt auf PPAR  $\gamma$  in Adipozyten gezeigt hatte<sup>93</sup>, inkubiert. Als Positivkontrolle wurde der wahrscheinliche natürliche Ligand für PPAR  $\gamma$ , 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub><sup>55,77</sup>, verwendet. Die Expression von PPAR  $\gamma$  stieg nach Stimulation mit beiden Stoffen nach 24 Stunden signifikant auf einen Maximalwert an um dann wieder abzufallen.

Trotz Unterschieden in der basalen Expression verschiedener Zellchargen führte die Stimulation in den einzelnen Versuchen zu vergleichbaren maximalen Anstiegen der Expression von PPAR  $\gamma$ . Die Variabilität in der gemessenen Basalexpression könnte durch Unterschiede in der Permeabilisierung, durch eine mechanische Vorstimulation bei der Passage oder etwas verschiedene Differenzierungsgrade im Verlauf der Zellpassage bedingt sein. Denn die Expression von PPAR  $\gamma$  ist in undifferenzierten Monozyten noch kaum nachweisbar und nimmt bei der Ausdifferenzierung zum Makrophagen zu<sup>31</sup>. Dies wird noch dadurch verstärkt, dass die Stimulation des Transkriptionsfaktors PPAR  $\gamma$  in einer positiven Rückkopplung durch vermehrte Aufnahme seiner Liganden zur Steigerung seiner eigenen Proteinexpression führen kann. Da sich auch ein Anstieg der PPAR  $\gamma$ - mRNA-Synthese nachweisen ließ, ist in unseren Versuchen von einer gesteigerten de novo Synthese von PPAR  $\gamma$  auszugehen.

Auch Han et al. konnten nach Stimulation mit 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub> über 24 Stunden eine Zunahme der Expression von PPAR  $\gamma$ - mRNA in der monozytären Zelle THP-1 nachweisen<sup>63</sup>. Watanabe et al. fanden hingegen unter Stimulation mit Troglitazon, einem PPAR  $\gamma$ - Agonist, einen Rückgang in der PPAR  $\gamma$ - mRNA-Expression bereits nach 12 Stunden Inkubation von 3T3-L1 Adipozyten. Der Effekt persistierte für mehr als 48 Stunden<sup>166</sup>. Somit wirken PPAR  $\gamma$ - Agonisten zumindest teilweise Zell- und Substanz- spezifisch auf die Transkription von PPAR  $\gamma$  selbst.

Des Weiteren wurde mit Hilfe immunzytologischer Markierung die subzelluläre Lokalisation von PPAR  $\gamma$  vor und nach Stimulation mit Indomethacin und 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin  $J_2$  untersucht. Bereits in unstimulierten Zellen zeigte sich eine geringe nukleäre Fluoreszenzmarkierung, die sich deutlich von der Hintergrundmarkierung abhob, bei deutlich schwächer ausgeprägter zytoplasmatischer Expression. Somit ist schon in der unstimulierten Zelle eine Expression von PPAR  $\gamma$  nachweisbar, was zeigt, dass die MM6sr Zelle bereits eine relativ hohe mono-/makrozytäre Differenzierung aufweist<sup>143</sup>.

Sowohl in unstimulierten wie auch in den stimulierten Zellen ist PPAR  $\gamma$  vorwiegend im Kern lokalisiert, eine weitere relative Translokation vom Zytoplasma in den Kern nach Stimulation war bei deutlicher absoluter Zunahme der Expression nicht zu erkennen. Damit geht einher, dass 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin  $J_2$  nicht wie andere Prostaglandine über einen Oberflächenrezeptor gekoppelt an G-Proteine wirkt, sondern aktiv über die Zellmembran in die Zelle transportiert wird<sup>115</sup>. Indomethacin kann aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften transmembranös in die Zelle gelangen.

Auch in peripheren Blutmonozyten und Gewebsmakrophagen wurde der Transkriptionsfaktor PPAR  $\gamma$  als nicht im Zytoplasma, sondern im Zellkern lokalisiert berichtet<sup>161</sup>. Chinetti et al. konnten PPAR  $\gamma$  in Monozyten immunzytologisch nicht nachweisen. Jedoch nach Ausdifferenzierung zu Makrophagen konnte PPAR  $\gamma$  wie in unserem Modell im Zellkern lokalisiert werden. PPAR  $\alpha$  hingegen trat bevorzugt im Zytoplasma auf<sup>31</sup>.

## **6.1.2 Nichtsteroidale Antirheumatika erhöhen die Expression verschiedener Scavengerrezeptoren**

### **6.1.2.1 CD 36- Expression**

Durch Aktivierung von PPAR  $\gamma$  konnte die Expression des Scavengerrezeptors CD 36 auf der monozytären Zelle THP-1 gesteigert werden<sup>131,161</sup>. Nachdem Indomethacin und andere NSAR an PPAR  $\gamma$  binden, ihn aktivieren<sup>93</sup> und dessen Expression beeinflussen, lag die Vermutung nahe, dass die Expression von CD 36 durch Indomethacin stimuliert werden könnte, was potentiell therapeutische

Ansatzpunkte bieten würde. Mittels FACS-Messungen wurde die Oberflächenexpression von CD 36 nach Behandlung von MM6 sr Zellen mit Indomethacin und der Positivkontrolle 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub> bestimmt. Es zeigte sich für beide Stimuli tatsächlich eine Zeit- und Dosisabhängigkeit der CD 36-Oberflächenexpression. Der Unterschied zwischen den beiden Stoffen lag in einem sogar länger andauernden Effekt durch Indomethacin, was vermutlich mit der schnelleren Inaktivierung eines natürlichen Metaboliten wie 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub> erklärbar ist. Auch auf der Ebene der CD 36- mRNA-Transkription konnte der signifikante Anstieg der CD 36- Proteinexpression nach Stimulation der Zellen mit Indomethacin bestätigt werden.

In diesen Versuchen konnte somit 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub> als PPAR  $\gamma$ - Agonist in humanen Monozyten/Makrophagen bestätigt werden. Entscheidender Schritt in der endogenen Synthese von 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub> ist die Umsetzung von Arachidonsäure zu Prostaglandin D<sub>2</sub> durch die Cyclooxygenase<sup>150</sup>. Die entzündungshemmende, Fieber senkende Wirkung nichtsteroidaler Antirheumatika beruht zumindest teilweise auf der Hemmung dieses Enzymes. Folglich sollte Indomethacin die Bildung des endogenen PPAR  $\gamma$ -Liganden 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub> hemmen und so zu einer geringeren endogenen Aktivität von PPAR  $\gamma$  führen. Von Lehmann et al. wurde dagegen eine offensichtlich direkte Aktivierung von PPAR  $\gamma$  durch Indomethacin und weitere NSAR gezeigt<sup>93</sup>. Auch in unserem Modell war eine deutliche PPAR  $\gamma$ - Stimulation feststellbar, und somit eine direkte, stimulierende Wirkung von Indomethacin auf PPAR  $\gamma$  anzunehmen (Abb. 41). Dies scheint kein auf Indomethacin beschränkter Effekt zu sein, da weitere NSAR wie Ibuprofen, Fenoprofen und Flufenamsäure ebenfalls PPAR  $\gamma$  stimulierten. Es handelt sich aber dennoch nicht um einen kompletten Gruppeneffekt, da die Salicylsäure keinen PPAR  $\gamma$ - stimulierenden Effekt hatte. Für Diclofenac wurde sogar eine Hemmung der Aktivierung von PPAR  $\gamma$  durch Rosiglitazon beschrieben<sup>2</sup>.

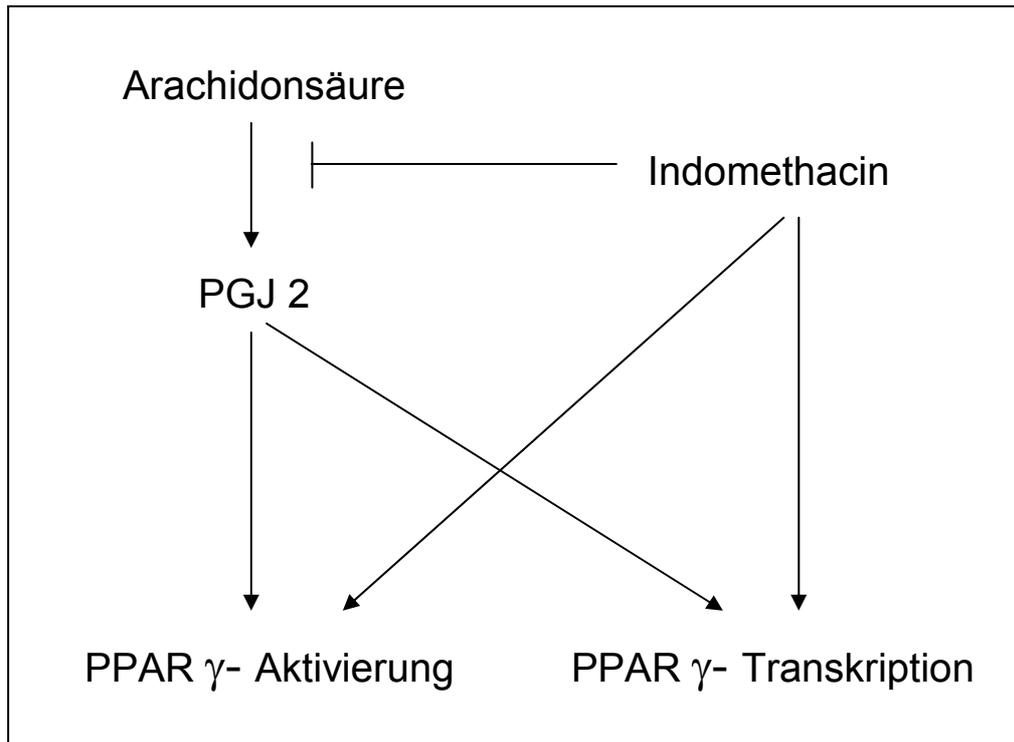


Abbildung 41: Interaktionen von Indomethacin, PGJ 2 und PPAR  $\gamma$

### 6.1.2.2 Einfluss auf die mRNA-Transkription weiterer Scavengerrezeptoren

Nachdem PPAR  $\gamma$  offensichtlich komplex in die Mechanismen der Atherogenese eingreift – so wurde gezeigt, dass die Expression des Scavengerrezeptors SR-A im Gegensatz zur CD 36- Expression durch PPAR  $\gamma$  gehemmt werden kann<sup>135</sup> - wurde der Effekt von Indomethacin auf weitere, auf der mono/makrozytären Zelllinie exprimierte Scavengerrezeptoren auf mRNA-Ebene untersucht.

SR-B1 wurde bereits auf Makrophagen in arteriosklerotischen Läsionen nachgewiesen und es wurde eine Abhängigkeit seiner Expression von PPAR  $\gamma$  gezeigt<sup>30</sup>. Dieser Effekt konnte auch durch Stimulation der MM6 sr Zelle mit Indomethacin bestätigt werden, wobei der relative Anstieg von SR-B1 etwas geringer war als der für CD 36 gefundene. Somit werden neben dem tendenziell die Schaumzellbildung fördernden Effekt einer gesteigerten CD 36- Expression durch die gesteigerte Expression von SR-B1, der als bidirektionaler Transporter die zelluläre Cholesterinabgabe fördern kann, gleichzeitig potentiell antiatherogen wirkende Mechanismen aktiviert.

Auch der Lectin like oxLDL-Rezeptor (LOX-1) ist auf Makrophagen nachgewiesen worden<sup>174</sup>. Seine Expression steigt bei der Ausdifferenzierung zum Makrophagen an. Auf bovinen Endothelzellen konnte seine Expression durch PPAR  $\alpha$  jedoch nicht durch PPAR  $\gamma$ , gesteigert werden<sup>67</sup>. In unseren Versuchen konnte mit Indomethacin ein signifikanter Anstieg der LOX-1 -mRNA beobachtet werden. Dies könnte aufgrund der Fähigkeit von LOX-1 oxLDL zu binden und aufzunehmen ebenfalls zur Schaumzellbildung beitragen. Da Indomethacin kein streng spezifischer PPAR  $\gamma$ -Agonist ist, sondern prinzipiell PPAR  $\alpha$  ebenfalls stimulieren kann<sup>93</sup>, kann nicht sicher ausgeschlossen werden, dass LOX-1 durch Indomethacin über PPAR  $\alpha$  stimuliert wird. Auch mit Fenofibrat, einem Aktivator von PPAR  $\alpha$ , konnte auf Monozyten eine vermehrte Expression von LOX-1 induziert werden. Troglitazon hatte dagegen nur einen geringen Effekt auf die Expression von LOX-1<sup>17</sup>.

### 6.1.3 LDL- Rezeptor-Expression

Im Gegensatz zur Expression der Scavengerrezeptoren war die Bildung des LDL-Rezeptors unbeeinflusst durch Indomethacin. Dessen Expression ist nicht PPAR  $\gamma$ -abhängig, sondern unterliegt über den SREBP-Mechanismus einem negativen Feedback durch den Cholesteringehalt der Zelle<sup>14</sup>. Dies belegt einerseits, dass es sich bei der veränderten Scavengerrezeptorexpression nicht um einen generellen Transkriptions-Effekt durch Differenzierung oder Aktivierung der Zelle, sondern um einen spezifischen Regulationsvorgang handelt. Des Weiteren spricht dies dafür, dass die Zellen im Medium ohne externe Lipidquellen trotz gesteigerter Scavengerrezeptor-Expression nicht mit Cholesterin überladen werden, da auch keine gegenregulatorische Suppression der LDL-Rezeptor- Expression zu beobachten war. Als mögliche Quelle für oxLDL könnte den Zellen nur das dem Medium mit 10% zugesetzte lipidarme Kälberserum dienen.

## 6.2 Wirkung von PPAR $\gamma$ auf die Cholesterinaufnahme

Um die funktionellen Auswirkungen der durch die Stimulation mit Indomethacin veränderten Scavengerrezeptorexpression zu untersuchen, wurde die Aufnahme markierten oxLDL's in die Zellen bestimmt. Überraschend war keine, durch die gesteigerte Scavengerrezeptorexpression vermittelte, zelluläre Akkumulation von oxLDL messbar. Durch die Positivkontrolle der mit LPS stimulierten Zellen, die eine deutliche Aufnahme von oxLDL aufwies, konnte ein methodischer Fehler ausgeschlossen werden. Da der Assay nur die Nettoakkumulation, jedoch nicht den zellulären Durchsatz an oxLDL misst, war die Möglichkeit einer zwar gesteigerten zellulären Aufnahme jedoch kombiniert mit einem gesteigerten zellulären Efflux des oxLDL als Erklärung für die erhaltenen Ergebnisse zu diskutieren.

Deshalb wurde im Weiteren die Expression des zellulären Cholesterinexporters ABCA 1 untersucht. Dieser Transporter, der auf Makrophagen in atherosklerotischen Läsionen nachgewiesen wurde, wird bei Cholesterinüberladung der Zellen hochreguliert<sup>91</sup>. Es konnte in Makrophagen bereits gezeigt werden, dass die Aktivierung von PPAR  $\gamma$  indirekt über eine vermehrte Bildung des Transkriptionsfaktors LXR  $\alpha$  zu einer vermehrten Expression von ABCA 1 führt<sup>25,32</sup>. Auch in unserem Modell konnte nach Stimulation der Zellen mit Indomethacin eine signifikante Mehrexpression mit einer Verdopplung der ABCA 1- Expression nachgewiesen werden. Neben der vermehrten Expression des bidirektionalen Transporters SR-B1 bietet dies eine weitere Möglichkeit für einen raschen gesteigerten Cholesterinefflux und somit die Erklärung für die Protektion der Zellen vor oxLDL-Überladung trotz einer durch Indomethacin gesteigerten Scavengerrezeptorexpression. Auch Cabrero et al. konnten nach Stimulation humaner Makrophagen mit Troglitazon, einem selektiven Stimulus von PPAR  $\gamma$ , eine vermehrte Expression von ABCA 1 nachweisen. Dies führte – im Gegensatz zu einer Stimulation von PPAR  $\alpha$  - zu einem verminderten zellulären Bestand von Cholesterin<sup>17</sup>. Erst nach Ausschalten des Transkriptionsfaktors PPAR  $\gamma$  in einem Mausmodell kam es zu einer reduzierten Expression von LXR  $\alpha$  und ABCA 1 und einem verminderten Cholesterolefflux aus Makrophagen<sup>3</sup>.

Dank der simultanen Stimulation von Scavengerrezeptoren und Cholesterinexportern

führt die Aktivierung des Transkriptionsfaktors PPAR  $\gamma$  nicht zu einer beschleunigten Schaumzellbildung, sondern erlaubt die rasche Mobilisierung extrazellulärer Lipiddepots und ihre Einschleusung in den reversen Cholesterintransport. Möglich ist die Schaumzellbildung nach Stimulation von PPAR  $\gamma$  jedoch, wenn es durch Defekte der Signaltransduktionswege oder Zielgene – wie z.B. bei M. Tangier - zu einer Störung dieser Kompensation kommt.

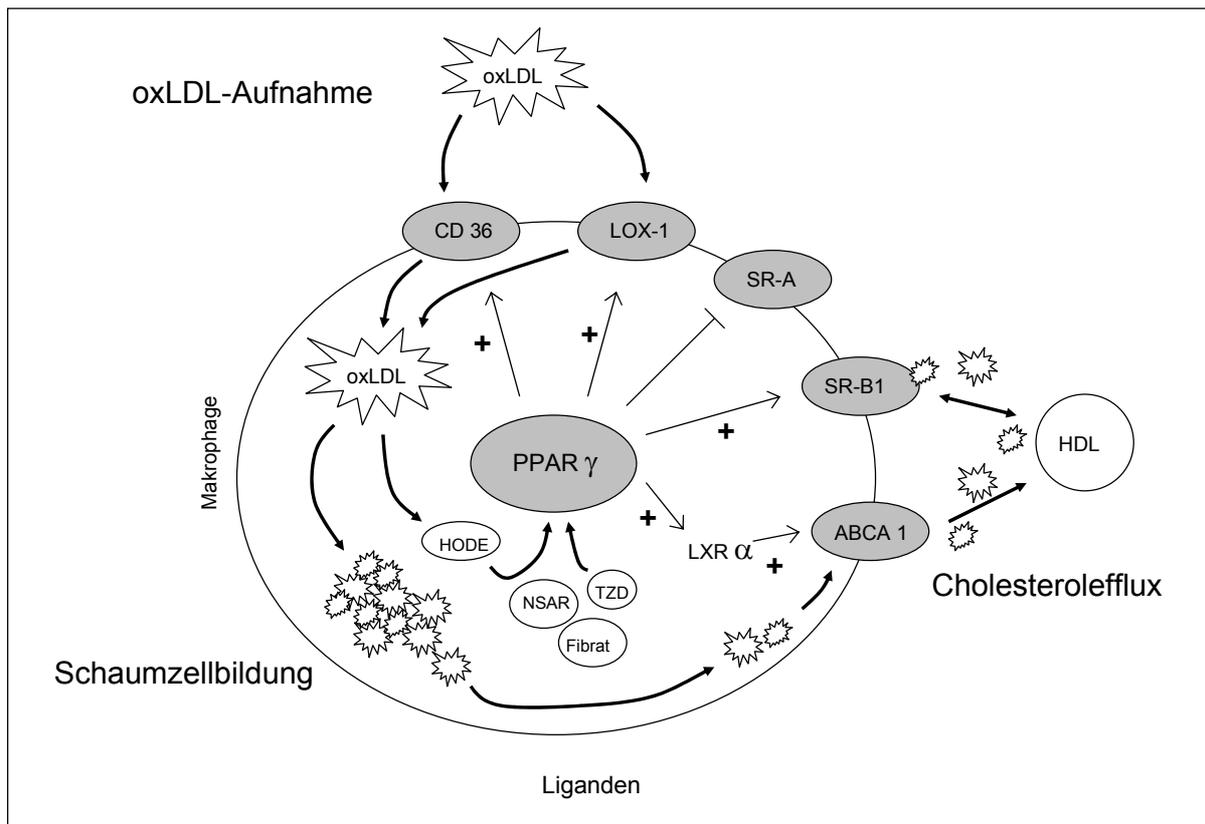


Abbildung 42: Bedeutung von PPAR  $\gamma$  für den Cholesterinmetabolismus in Makrophagen

Da es sich bei CLA-1/SR-B1 im Gegensatz zu ABCA 1 um einen potentiell bidirektionalen Lipidtransporter handelt, dieser also nicht nur für den Cholesterinefflux aus Zellen verantwortlich ist, sondern auch Lipide aus nativem LDL, oxLDL, acLDL und VLDL in die Zelle einschleusen kann, hängt die Flussrichtung der Metaboliten hier wesentlich vom Konzentrationsgradienten über der Membran ab<sup>30</sup>. Deshalb spielt der Serum-LDL Spiegel aber auch der HDL/LDL-Quotient für den Nettoeffekt, ob CLA-1/SR-B1 den Cholesterinrücktransport aus Schaumzellen fördert und so einen atheroprotektiven Effekt hat, oder aber zur Progression der Arteriosklerose führt, eine wichtige Rolle.

### 6.3 Rolle von RXR

PPAR  $\gamma$  bildet nach Aktivierung durch seinen Liganden ein Heterodimer mit dem RXR- Rezeptor um dann an das entsprechende PPRE im Zellkern zu binden<sup>137</sup>. Es handelt sich hierbei um ein permissives Heterodimer, d.h. dass sowohl die Liganden von PPAR  $\gamma$  wie auch die Liganden des RXR- Rezeptors bereits unabhängig voneinander die Transkription stimulieren können. Der größte Effekt wird jedoch erreicht, wenn beide Liganden an ihren Rezeptor gebunden sind. In dieser Arbeit wurde hierfür Methoprene, ein selektiver RXR-Ligand<sup>64</sup>, verwendet. Dieser konnte sowohl alleine, wie auch in Kombination mit den PPAR  $\gamma$ - Liganden Indomethacin und 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub> die Expression von CD 36 stimulieren. Bei der Kombination von PPAR  $\gamma$ - und RXR- Liganden wurden additive Effekte erzielt. Somit konnten in diesem System die Eigenschaften eines permissiven Heterodimers bestätigt werden. Die Existenz noch unbekannter endogener Liganden sowohl für PPAR  $\gamma$  als auch für RXR kann dabei nicht ausgeschlossen werden.

Da der RXR-Rezeptor Dimere mit weiteren anderen Partnern bilden kann, kommt es potentiell zu Interaktionen mit anderen Signalwegen. Han et al. konnten die Expression von CD 36 in monozytären Zellen durch Retinolsäure, den Liganden des RAR, durch Bildung eines RAR/RXR- Heterodimers stimulieren und klärten so einen PPAR  $\gamma$  -unabhängigen Aktivierungsweg auf. Maximale Effekte erreichten sie aber durch die Kombination von Retinolsäure mit einem PPAR  $\gamma$ - Liganden<sup>63</sup>. Auch Patel et.al. forderten neben PPAR  $\gamma$  weitere Wege der Induktion von CD 36 und auch ABCA 1<sup>128</sup>.

Die Aktivierung des RXR führte über die Bildung eines RXR/LXR  $\alpha$  Heterodimers zu einer vermehrten Expression von ABCA 1 und aufgrund eines vermehrten Cholesteroleffluxes zu verminderter Ausbildung atherosklerotischer Läsionen bei Apo E -knockout Mäusen<sup>33</sup>. Somit ist eher eine antiatherogene Wirkung von RXR allein anzunehmen.

## 6.4 Interaktionen von Insulin mit PPAR $\gamma$

Das Metabolische Syndrom stellt einen Hauptrisikofaktor der Arteriosklerose dar. Bei der Entstehung arteriosklerotischer Läsionen scheinen hierbei neben der Hyperglycämie auch die passagere Hyperinsulinämie selbst und direkte Insulineffekte eine Rolle zu spielen. An Patienten mit angiographisch nachgewiesener, jedoch klinisch stummer Arteriosklerose ließen sich erhöhte Insulinspiegel messen, und im Tierexperiment ließen sich durch Langzeitbehandlung mit Insulin lipidhaltige Gefäßwandveränderungen erzeugen<sup>155</sup>. In mehreren Studien zeigte sich ein Zusammenhang zwischen der Hyperinsulinämie und der Ausprägung der Arteriosklerose. Standl beschrieb einen signifikanten Anstieg von Gefäßerkrankungen wie PAVK, koronarer Herzerkrankung und Veränderungen der Karotiden bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und konnte eine Korrelation zum Grad der Hyperinsulinämie im Blut der Patienten herstellen<sup>152</sup>. Folsom et.al. zeigten eine Abhängigkeit der Intima-Media Dicke der Karotiden vom Nüchterninsulinspiegel bereits bei Nicht-Diabetikern<sup>54</sup>. Bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 konnte Minamikawa et. al. eine positive Abhängigkeit der Intima-Media Dicke der Karotiden vom C-Peptid im Urin und der verabreichten Insulindosis herstellen<sup>109</sup>.

### 6.4.1 Einfluss von Insulin auf die CD 36- Expression

Aus diesem Grund wurde am mono/makrozytären Zellmodell der Einfluss von Insulin auf die Expression des Scavengerrezeptors CD 36 und den an seiner Regulation beteiligten Transkriptionsfaktor PPAR  $\gamma$  untersucht. Da im Standardzellkulturmedium für die MM6sr Zelle eine relativ hohe Insulinkonzentration enthalten ist, mussten die Zellen vorher in Insulin-freies Medium umgesetzt werden. Die Zellen konnten hier ohne Probleme über mehrere Zellpassagen gehalten werden. Wurde die CD 36-Oberflächenexpression gemessen, so führte Insulin alleine bereits an den Kontrollzellen, d.h. ohne PPAR  $\gamma$ - Agonisten, zu einer signifikant vermehrten Oberflächenexpression von CD 36. Wurden die Zellen mit 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J2 oder Indomethacin stimuliert, so zeigten die Zellen, die in insulinfreiem Medium gehalten wurden, eine signifikant geringere CD 36- Expression. Koinkubation mit Insulin führte zu einer etwa multiplikativen Verstärkung der durch

die PPAR  $\gamma$ - Liganden in Insulin-freiem Medium erzielten Expression von CD 36.

#### 6.4.2 Signaltransduktion von Insulin

Nach Bindung von Insulin an den Insulinrezeptor kommt es durch IRS 1 und 2 (IRS = Insulin-Rezeptor-Substrat) vermittelt zur Aktivierung mehrerer Signalkaskaden.

Neben der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI<sub>3</sub>-Kinase) wird die RAS-Kaskade, eine Kaskade von Serin-Kinasen, aktiviert. Zu ihren Wirkungen gehört unter anderem die Aktivierung der MAP-Kinase. Sie kann durch Phosphorylierung verschiedener zellulärer und nukleärer Proteine Einfluss auf die Gentranskription nehmen<sup>26</sup>.

Shalev et al. identifizierten PPAR  $\gamma$  als Phosphoprotein und konnten zeigen, dass Insulin zu seiner Phosphorylierung führt und so die Aktivität steigert<sup>146</sup>. Auch

Werman et al. beschrieben, dass Insulin die Aktivität von PPAR  $\gamma$  als

Transkriptionsfaktor steigert. Diese Eigenschaft ist bei PPAR  $\gamma$ 2 ausgeprägter als bei PPAR  $\gamma$ 1. Ursächlich hierfür ist die Liganden-unabhängige Aktivierungsfunktion (AF-1) im Bereich der N-terminalen A/B-Domäne von PPAR  $\gamma$ , die PPAR zusätzlich zur C-terminalen Liganden-Bindungsdomäne im Bereich der E/F-Domäne aktiviert. Insulin verursacht entweder eine Phosphorylierung oder eine andere Modifikation im Bereich der A/B-Domäne, wodurch Liganden-unabhängig die Aktivität des

Transkriptionsfaktors gesteigert wird<sup>167</sup>. Auch Zhang et al. fanden eine gesteigerte Aktivität von PPAR  $\gamma$  nach Behandlung mit Insulin und zeigten synergistische, vom klassischen Liganden unabhängige Effekte zwischen Insulin und PPAR- Liganden. Sie postulierten, dass PPAR  $\gamma$  in vivo entweder direkt durch Insulin oder nach Aktivierung von MAP-Kinasen phosphoryliert wird<sup>176</sup>, offenbar nicht an Serin 82 bzw. Serin 112, was die Aktivität reduziert. Watanabe et al. fanden synergistische Effekte von Insulin mit Pioglitazon auf die PPAR  $\gamma$ - Aktivierung<sup>166</sup>.

Neben diesen Effekten wurden auch hemmende Einflüsse von

Phosphorylierungsvorgängen auf die Transkriptionsaktivität von PPAR  $\gamma$

beschrieben. Hu et al. beschrieben eine reduzierte Differenzierung von Adipozyten

nach MAP-Kinase- vermittelter Phosphorylierung von PPAR  $\gamma$  unter dem Einfluss

verschiedener Wachstumsfaktoren. PPAR  $\gamma$ 2 wurde hier an Serin 112

phosphoryliert<sup>70</sup>. EGF und PDGF aktivieren die MAP-Kinase und führen zur

Phosphorylierung von PPAR  $\gamma$ 1 an Serin 82 im Bereich der A/B-Domäne. Die Folge ist eine Hemmung der Aktivität von PPAR  $\gamma$  und so eine verminderte Fettzellendifferenzierung. Eine Mutation von Serin 82 zu Alanin verhinderte die Phosphorylierung und führte so zu einer erhaltenen Aktivität<sup>23</sup>. Die Hemmung der Transkription wird dabei durch eine reduzierte Affinität der Ligandenbindungsdomäne vermittelt<sup>147</sup>.

Es konnte jedoch mehrfach gezeigt werden, dass Insulin die Fettzellendifferenzierung unterhält. Daher darf man folgern, dass die Phosphorylierung und damit Aktivierung von PPAR  $\gamma$  durch Insulin möglicherweise nicht generell über MAP-Kinasen, sondern über andere Wege erfolgen muss, denn eine Aktivierung der MAP-Kinasen sollte zu einer verminderten Funktion von PPAR  $\gamma$  führen und so die Adipogenese hemmen<sup>23</sup>. Somit kommen als Mechanismen für die in dieser Arbeit beschriebene, durch Insulin vermittelte Änderung der Expression des Scavengerrezeptors CD 36 aktivitätssteigernde Phosphorylierungen in Frage.

### 6.4.3 Einfluss von Insulin auf die Expression von PPAR $\gamma$

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Wirkung von Insulin auf die Expression von PPAR  $\gamma$  selbst untersucht. Wurden die Zellen in insulinfreiem Medium gehalten, bildeten sich nach Stimulation zwei distinkte, mittels PPAR  $\gamma$ - Fluoreszenzfärbung unterscheidbare Zellpopulationen. Die eine wies eine hohe, die andere eine niedrige PPAR  $\gamma$ - Expression auf. Die Population mit niedriger Expression war umso größer, je höher die Konzentration der PPAR  $\gamma$ - Liganden 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J2 oder Indomethacin war. An der zweiten Population, die eine hohe Expression von PPAR  $\gamma$  aufwies, konnte aber eine weiter vermehrte PPAR  $\gamma$ - Expression nach Stimulation mit PPAR  $\gamma$ - Liganden gezeigt werden.

Auch bei Zellen, die in Medium mit Insulin gehalten wurden, bildete sich bei sehr hohen Konzentrationen des Liganden eine zweite Population mit einer geringeren PPAR  $\gamma$ - Expression.

Wurde die CD 36- Oberflächenexpression dieser Zellen gemessen, so war in den Histogrammen ebenfalls, jedoch deutlich schwächer ausgeprägt, neben der

Population mit hoher CD 36- Expression eine zweite Population mit niedriger CD 36- Expression erkennbar. Die CD 36- Expression konnte also mit der PPAR  $\gamma$ - Expression korreliert werden.

Also kommt es in Medium ohne Insulin nach Stimulation von PPAR  $\gamma$  zur Ausbildung von zwei Zellpopulationen. Die erste weist eine hohe Expression von PPAR  $\gamma$  und dem abhängigen Transkriptionsprodukt CD 36 auf. Die andere hat eine deutlich geringere Expression beider Proteine. Die Koinzidenz des PPAR  $\gamma$ - und des CD 36- Expressionsniveaus unterstützt die kausale Verknüpfung beider Phänomene.

#### 6.4.4 Metabolismus von PPAR $\gamma$

Eine mögliche Erklärung für die Aufspaltung in zwei Zellpopulationen unter Insulinzug liegt im Metabolismus des Transkriptionsfaktors PPAR  $\gamma$ . Er wird nach seiner Aktivierung und Wirkung degradiert und steht so für eine erneute Stimulation nicht mehr zur Verfügung. Hauser et. al. konnten in Fettzellen und Fibroblasten eine Abnahme der PPAR  $\gamma$  - Proteinmenge nach Stimulation mit Thiazolidindionen nachweisen. Sie wurde durch den Abbau des Transkriptionsfaktors in Proteasomen verursacht<sup>65</sup>. Auch an diesem Modell konnte die Erschöpfung des PPAR- Systems an Zellen, die in Medium mit Insulin gehalten wurden, bei Stimulation mit sehr hohen Konzentrationen der Liganden beobachtet werden. Es zeigte sich eine Population mit niedriger PPAR  $\gamma$ - Expression.

Führen schon geringere Konzentrationen der Liganden zur Bildung einer Zellpopulation mit einer niedrigen Menge nachweisbaren Transkriptionsfaktors – wie dies bei Zellen in insulinfreiem Medium der Fall ist -, ist von einer niedrigeren basalen Expression, die folglich zu einem früheren Aufbrauchen durch den Liganden führen kann, auszugehen.

Daher ist anzunehmen, dass Insulin an der basalen Expression von PPAR  $\gamma$  beteiligt ist, oder eine vermehrte Neubildung des Transkriptionsfaktors PPAR  $\gamma$  nach Verbrauch ermöglicht. Rieusset et. al. konnten die Expression von PPAR  $\gamma$ 1 und PPAR  $\gamma$ 2 in Adipozyten durch Gabe von Insulin in vitro und in vivo steigern<sup>136</sup>. Auch in der Skelettmuskulatur von an Diabetes mellitus Typ 2 erkrankten Patienten waren verglichen mit schlanken, gesunden Probanden erhöhte Mengen von PPAR  $\gamma$

nachweisbar. Die Expression ließ sich durch Insulin in vitro wie auch in vivo steigern<sup>126</sup>.

#### 6.4.5 Insulin wirkt antiapoptitisch

Bei Betrachtung der Zellkulturen im Lichtmikroskop fiel auf, dass der Anteil avitaler Zellen zunahm, wenn die Zellen in Medium ohne Insulin stimuliert wurden. Daher wurden zur weiteren Charakterisierung Doppelfärbungen für Annexin, zur Detektion präapoptotischer Zellen, und CD 36 durchgeführt. In den Kontrollzellen ohne Behandlung mit PPAR  $\gamma$ - Liganden zeigte sich ein gleichmäßig niedriger Anteil präapoptotischer Zellen innerhalb der gesamten Zellpopulation unabhängig vom Insulingehalt des Mediums. Wurden die Zellen mit einem PPAR  $\gamma$ - Liganden stimuliert bildeten sich zwei Populationen. Die eine bestand aus Annexin- negativen, also voll vitalen Zellen und zeigte eine hohe CD 36- Oberflächenexpression. Die andere Population bestand aus präapoptotischen Zellen und zeigte nur eine geringe CD 36- Expression. Es ist anzunehmen, dass diese Population auch wenig PPAR  $\gamma$  exprimiert. Der Anteil dieser Zellen nahm mit der Konzentration des PPAR  $\gamma$  - Stimulus zu, besonders wenn die Zellen in Medium ohne Insulin kultiviert wurden.

Somit ist eine weitere Erklärungsmöglichkeit für das Auftauchen einer Population mit geringerer Expression von PPAR  $\gamma$  und CD 36 die Induktion von Apoptose durch aktiviertes PPAR  $\gamma$  selbst. Die Ursache der vermehrten Anfälligkeit für Apoptose der Zellen in Insulin-freiem Medium kann wegen multipler Wirkungen von Insulin sicher mehrere Ursachen haben. Möglich ist, wie oben beschrieben, ein Verbrauch des Transkriptionsfaktors PPAR  $\gamma$ .

In der Literatur finden sich verschiedene Befunde zu Apoptose und PPAR  $\gamma$ : Stimulation von PPAR  $\gamma$  in Makrophagen führte zur vermehrten Apoptose. Als Ursache vermuteten Chinetti et.al. eine Inhibition des NF $\kappa$ B-Pathways, was zu einer verminderten Expression von Überlebensfaktoren führt<sup>31</sup>. Auch in Endothelzellen konnte durch 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J2 Apoptose induziert werden<sup>11</sup>.

Daneben kann in vielen anderen Zellen durch Stimulation von PPAR  $\gamma$  Apoptose induziert werden, was möglicherweise sogar in der Behandlung maligner Tumoren

genutzt werden könnte. Hier sind z.B. Leukämien, Lungen-, Chorion- und Magencarcinome zu nennen<sup>9</sup>.

Insulin kann dies inhibieren. An humanen Endothelzellen konnte gezeigt werden, dass Insulin die durch TNF  $\alpha$  induzierte Apoptose durch Inhibition der Caspase-9 hemmt<sup>68</sup>. An der monozytären Zelllinie THP-1 konnte Insulin die Apoptose durch Aktivierung des PI-3 Kinase-Weges hemmen<sup>157</sup>.

Deshalb wurde in weiteren Versuchen an diesem mono/makrozytären Modell versucht, durch sehr geringe Insulinkonzentrationen die Apoptose eben zu hemmen und in diesem Konzentrationsbereich die Interaktion mit PPAR  $\gamma$  zu untersuchen. Bereits 1% der in normalem MM6-Medium verwendeten Insulinmenge reichten aus, die durch 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J2 induzierte Apoptose signifikant zu hemmen. Durch weitere Erhöhung der Insulinkonzentration konnte die Expression von CD 36 noch signifikant stimuliert werden. So war es möglich, die wirksamen Konzentrationen von Insulin auf die Apoptose und die Stimulation der Transkriptionsaktivität von PPAR  $\gamma$  zu trennen.

#### **6.4.6 Interaktionen von Insulin mit PPAR $\gamma$**

In den Doppelfärbungsexperimenten auf Annexin und CD 36 hatte sich gezeigt, dass die Entstehung einer zweiten, präapoptotischen Population nur teilweise den gezeigten Gesamteffekt von Insulin auf die Expression von CD 36 erklärt. Denn auch an der voll vitalen, Annexin-negativen Population mit hoher Expression an CD 36 und PPAR  $\gamma$  ist eine Wirkung von Insulin auf CD 36 erkennbar. Diese könnte durch die oben beschriebenen, direkten oder durch Phosphorylierung vermittelten Effekte auf die Aktivität des Transkriptionsfaktors vermittelt werden.

Folglich konnten drei Wirkungen von Insulin auf die durch PPAR  $\gamma$  stimulierte Expression von CD 36 beobachten werden. Erstens die direkte Veränderung der Aktivität des Transkriptionsfaktors PPAR  $\gamma$  – möglicherweise durch Phosphorylierung. Zusätzlich kann eine vermehrte Expression des Transkriptionsfaktors angenommen werden. Der dritte Effekt ist, dass Insulin die durch PPAR  $\gamma$ -Liganden induzierte Apoptose hemmen kann (Abb. 43).

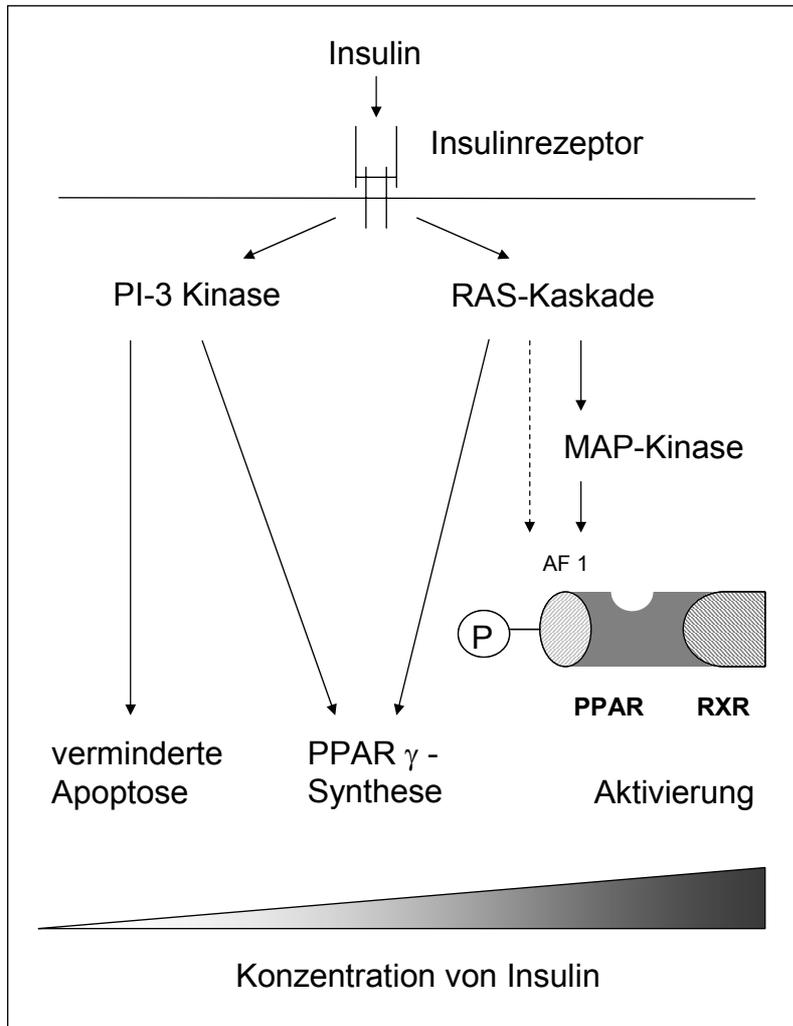


Abbildung 43: Insulin hatte im mono/makrozytären Zellmodell drei verschiedene Wirkungen, die abhängig von der Insulinkonzentration verschieden zu tragen kommen. Niedrige Insulinkonzentrationen haben einen tonisch-trophische Effekt auf die Zellen, höhere Konzentrationen auf die PPAR  $\gamma$ -Synthese und hohe Konzentrationen beeinflussen die Aktivität von PPAR  $\gamma$ .

#### 6.4.7 Pathophysiologische und pharmakologische Bedeutung der Ergebnisse

Aus den diskutierten Effekten ist zu vermuten, dass an der proatherogenen Wirkung des Insulins die vermehrte Scavengerrezeptorexpression und die damit verbundene erhöhte Schaumzellbildung beteiligt sein könnte. Daraus ergibt sich für die Therapie des Diabetes mellitus Typ 2 neben der Normalisierung der Blutglukosespiegel als Therapieziel die Reduktion der Hyperinsulinämie, wobei die Thiazolidindione als PPAR  $\gamma$ - Agonisten einen neuen Therapieansatz bieten. Daraus, dass diese Pharmaka über den Transkriptionsfaktor PPAR  $\gamma$  wirken, dessen Expression und Aktivität durch Insulin erhöht werden kann, ergibt sich ein weiter zu beachtender

positiver Aspekt in ihrem Wirkmechanismus. Denn so wird ihre Effektivität bei Hyperinsulinämie besonders gesteigert. Umgekehrt konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass diese Substanzen eine verminderte Wirkung bei Insulinmangel haben<sup>176</sup>.

Daneben stellen die Thiazolidindione einen pharmakologischen Therapieansatz dar, die pathologische Hyperinsulinämie beim Diabetes mellitus Typ 2 zu vermindern.

## 6.5 Bedeutung von PPAR $\gamma$ für die Arteriosklerose

Der Transkriptionsfaktor PPAR  $\gamma$  konnte in Makrophagen arteriosklerotischer Läsionen vermehrt aktiviert nachgewiesen werden<sup>134</sup>. In der Einleitung (Kapitel 2.6.2) wurde bereits dargelegt, dass aber der Aktivierung von PPARs in verschiedenen Zellen des arteriosklerotischen Plaques keine unimodal pro- oder antiatherogene Wirkung zugeschrieben werden kann. In dieser Arbeit wurden die Wirkungen von Aktivatoren des Transkriptionsfaktors PPAR  $\gamma$  und Insulin auf die Expression von Scavengerrezeptoren auf monozytären Zellen und die damit verbundene mögliche Cholesterinaufnahme, die zur Bildung von Schaumzellen führen könnte, untersucht. Im in-vitro Modell der MM6sr Zelle führte die Aktivierung von PPAR  $\gamma$  nicht zu einer gesteigerten Cholesterinakkumulation nach Inkubation der stimulierten Zellen mit oxLDL, obwohl eine gesteigerte Expression verschiedener Scavengerrezeptoren durch PPAR  $\gamma$ - Liganden eindeutig gezeigt werden konnte.

### 6.5.1 Befunde an in-vitro Modellen

Für den Scavengerrezeptor CD 36 wurde gezeigt, dass eine gesteigerte Expression zu einer vermehrten Aufnahme von oxLDL<sup>119</sup> und Bildung atherosklerotischer Läsionen führt<sup>52</sup>. An PPAR  $\gamma$ - defizienten Stammzellen (s.u. Chawla et.al.) konnte bewiesen werden, dass die Expression von CD36 durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors PPAR  $\gamma$  induzierbar ist. Also sollte eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors PPAR  $\gamma$  prinzipiell zu einer vermehrten Aufnahme von oxLDL führen.

An THP-1 Zellen, einem weiteren monozytären Zellmodell, führte eine Behandlung mit Ciglitazon oder Troglitazon jedoch zu einer reduzierten Nettoakkumulation von Cholesterinestern in mit oxidierten Lipoproteinen stimulierten Zellen, obwohl eine vermehrte Expression von CD 36 nachgewiesen wurde. Die dadurch verursachte Mehraufnahme von Cholesterinestern konnte durch eine verminderte Expression von SR-AI/II und eine gesteigerte Expression des Cholesterinexporters ABCA 1 kompensiert werden<sup>5</sup>.

Moore et. al konnten an PPAR  $\gamma$ - knockout-Makrophagen zeigen, dass PPAR  $\gamma$  für

die basale Expression von CD 36 in Makrophagen erforderlich ist, und Troglitazon die Expression weiter stimulieren kann. In der knockout-Mutation kam es verglichen mit dem Wildtyp zu einer signifikant geringeren Aufnahme von oxLDL. Jedoch konnte auch in dieser Arbeit in der Wildtyp Zelle durch den PPAR  $\gamma$ - Stimulus Troglitazon keine Schaumzell-typische, exzessive Cholesterinaufnahme erzielt werden. Als Erklärung führten die Autoren eine Hemmung der Expression von SR-A an, die simultan zur Stimulation der Expression von CD 36 durch Troglitazon hervorgerufen wurde<sup>110</sup>. Chawla et.al. zeigten an einem PPAR  $\gamma$ - defizienten Stammzellmodell, dass die Expression des Scavengerrezeptors CD 36 durch PPAR  $\gamma$  induziert wird. Retrovirale Expression von PPAR  $\gamma$  in Fibroblasten führte isoliert zu einer vermehrten Expression von CD 36, was zu einer vermehrten Aufnahme von oxLDL führte. Auf Makrophagen konnte zwar eine vermehrte Expression von CD 36 nachgewiesen werden, diese war aber nicht von einer gesteigerten Nettoaufnahme von oxLDL begleitet. Die Autoren vermuteten als Ursache ebenfalls eine kompensatorische Downregulation anderer Scavengerrezeptoren oder die gleichzeitige Induktion eines gesteigerten Cholesteroleffluxes<sup>24</sup>.

Wir konnten in unserem Zellmodell nach Stimulation von PPAR  $\gamma$  die gleichzeitige Induktion von Scavengerrezeptoren mit zellulären Cholesterinexportern wie SR-B1 und ABCA 1 direkt zeigen. Somit ist, wie bereits oben diskutiert, ein simultaner Anstieg des Cholesterolefflux eine wahrscheinliche Erklärung für die fehlende oxLDL-Akkumulation in unseren Experimenten.

PPAR  $\gamma$  ist neben dem Lipidmetabolismus - auf zellulärer Ebene und den gesamten Organismus betreffend – aber an weiteren Vorgängen wie Glukosestoffwechsel, Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Apoptose und Regulation von Entzündungsreaktionen, die alle Einfluss auf die Atherogenese haben, beteiligt. Da in dieser wie auch in den oben zitierten Arbeiten isoliert die Effekte eines veränderten Rezeptorstatus auf die zelluläre Cholesterinaufnahme in vitro untersucht wurden, lässt sich noch keine generelle Vorhersage über die Beeinflussung der Atherogenese im Gesamtorganismus durch Aktivierung des Transkriptionsfaktors PPAR  $\gamma$  treffen.

### 6.5.2 Tierexperimentelle Befunde zu PPAR $\gamma$ und Arteriosklerose

Untersuchungen an Tiermodellen der Atherogenese geben hier erste Hinweise. Chen et. al. konnten an Apo-E knockout-Mäusen unter cholesterinreicher Ernährung zeigen, dass Troglitazon signifikant die Bildung von „fatty streaks“ hemmt<sup>29</sup>. Auch an LDL-Rezeptor defizienten Mäusen, einem anderen Standardmodell der Arterioskleroseforschung, konnte Troglitazon die Entstehung früher arteriosklerotischer Läsionen hemmen. Als Erklärung nahmen die Autoren neben der Veränderung metabolischer Parameter v.a. direkte Wirkungen von Troglitazon auf die Gefäßwand - wie Hemmung der Migration von Monozyten und glatten Muskelzellen - an<sup>34</sup>. Rosiglitazon, das in MM6 sr Zellen einen signifikanten Effekt auf die Expression von CD 36 hatte, konnte an LDL-Rezeptor- defizienten Mäusen die Entstehung arteriosklerotischer Läsionen trotz der vermehrten Expression des Scavengerrezeptors CD 36 hemmen. Auffällig war jedoch, dass der Effekt nur bei männlichen LDL-Rezeptor- defizienten Tieren beobachtet werden konnte<sup>95</sup>. Auch an Apo-E- defizienten Mäusen konnte Rosiglitazon die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen hemmen, obwohl es durch die Behandlung zu einem Anstieg des Cholesterinspiegels und der Triglyceride kam. Dies spricht für einen lokalen protektiven Effekt von Rosiglitazon in der Gefäßwand etwa durch Stimulation der ersten Schritte des reversen Cholesterintransports. Zusätzlich wurde der Effekt einer Stimulation von RXR untersucht. Dabei wurde tatsächlich die Bildung des LXR/RXR-Heterodimers und die Stimulation des ABCA 1- vermittelten Cholesteroleffluxes gefunden<sup>33</sup>.

Neben direkten Effekten von PPAR  $\gamma$  an den Zellen der Gefäßwand spielen systemische Wirkungen wie die Reduzierung der Hyperinsulinämie durch den Insulin-sensitivierenden Effekt und die veränderten Serumlipide mit Erhöhung der HDL- Spiegel, die allerdings auch durch die vermehrte ABCA 1- Expression in der Peripherie bedingt sein könnte, eine Rolle.

Beim Vergleich der genannten Studien zeigten sich z.T. uneinheitliche Ergebnisse und deutliche Unterschiede in der Wirkung der Thiazolidindione auf die einzelnen metabolischen Parameter, was die Interpretation erschwert. Zuckerman et. al. konnten zeigen, dass die Aktivierung von PPAR  $\alpha$  und PPAR  $\gamma$  unabhängig von Veränderungen der Serumlipide zu einer reduzierten Arteriosklerose in Apo E-

defizienten Mäusen führt<sup>178</sup>, was wiederum die Bedeutung lokaler Wirkungen in der Gefäßwand hervorhebt. Einige dieser lokalen Effekte wurden bereits im Kapitel 2.6.2 dieser Arbeit beschrieben.

Eine weitere eher antiatherogene Wirkung einer vermehrten Scavengerrezeptorexpression auf Makrophagen des atherosklerotischen Plaques ist die Beseitigung denaturierter Lipoproteine aus dem Extrazellularraum, da dies den Entzündungsreiz und die weitere zelluläre Infiltration der Gefäßwand vermindern kann<sup>29</sup>.

Diskutiert werden sollte auch, ob der veränderte Rezeptorstatus durch die Aktivierung von PPAR  $\gamma$  neben Makrophagen noch weitere Zellen betrifft, was eine Cholesterinaufnahme auch in andere Gewebe zur Folge hätte und möglicherweise so durch Aufnahme der Lipoproteine antiatherogen wirkt. Eine vermehrte CD 36-Expression wurde im Fettgewebe, Skelettmuskel und Herzmuskel nach Behandlung mit PPAR  $\gamma$ -Liganden beschrieben. Da CD 36 und sein nahes Analogon FATS in diesen Geweben als Fettsäuretransporter wirkt, könnte es so zu einer Veränderung der Plasmalipide kommen<sup>24</sup>. Für den bidirektionalen Cholesteroltransporter SR-B1 konnte gezeigt werden, dass Überexpression von SR-B1 in der Leber LDL-Rezeptor-defizienter Mäuse zu einer Abnahme des Ausmaßes arteriosklerotischer Läsionen führte. Als Ursache wurde eine vermehrte hepatische Aufnahme von LDL und VLDL aus dem Kreislauf angenommen<sup>4</sup>. Auch die Aktivierung von PPAR  $\gamma$  durch Thiazolidindione führte zu einer vermehrten Expression von SR-B1 in Hepatozyten, Sinusoidalzellen und Kupffer Zellen in der Leber<sup>101</sup>. Die Folge ist eine vermehrte Lipoproteinaufnahme und Verstoffwechslung in der Leber.

### 6.5.3 Klinische Daten zu PPAR $\gamma$ und Arteriosklerose

Zellbiologische und tierexperimentelle Untersuchungen sind von Bedeutung, da Thiazolidindione eine neue chronische Therapiemöglichkeit des Diabetes mellitus Typ 2 darstellen, und die Förderung arteriosklerotischer Gefäßwandveränderungen eine schwerwiegende unerwünschte Nebenwirkung dieser neuen Medikamentengruppe bedeuten würde. Bei dieser Patientengruppe besteht ohnehin bereits ein deutlich erhöhtes kardiovaskuläres Risiko. Am Menschen sind zwei Therapiestudien mit Thiazolidindionen durchgeführt worden,

bei denen als Surrogatparameter für die arteriosklerotische Gefäßwandschädigung die Intima-Media Dicke gemessen wurde. 1998 zeigten Minamikawa et. al., dass es bereits nach drei Monaten einer Therapie mit Troglitazon (400 mg/Tag) bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 zu einer signifikanten Abnahme der Intima-Media-Dicke der Karotiden kam. Ebenso kam es zu einem signifikanten Rückgang des HbA1c und der postprandialen Triglyceride. Gesamtcholesterin, HDL und der Blutdruck blieben unbeeinflusst<sup>108</sup>. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass Pioglitazon am Menschen ebenfalls antiatherogene Eigenschaften aufweist. Hier wurden 53 an Diabetes mellitus Typ 2 erkrankte Patienten über 6 Monate mit Pioglitazon behandelt. Bereits nach 3 Monaten zeigte sich ein signifikanter Rückgang der Intima-Media-Dicke der Patienten der Pioglitazon-Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe. Wie in der oben zitierten Studie kam es zu einem Rückgang des HbA1c; es gab jedoch keinen Effekt auf Gesamtcholesterin, HDL, Triglyceride oder den Blutdruck<sup>81</sup>. Aufgrund der relativ kurzen Beobachtungszeit in beiden Studien müssen die Hinweise auf eine Progressionsverzögerung oder sogar Regression arteriosklerotischer Gefäßwandveränderungen aber noch vorsichtig interpretiert werden.

Als wichtigster Mechanismus der Thiazolidindione wurde sowohl im Tiermodell wie auch beim Menschen die Reduktion der Hyperglykämie und die Verbesserung der Insulinresistenz vermutet. An weiteren Ursachen werden die Hemmung der Proliferation und Migration glatter Muskelzellen und die Hemmung der Entzündung angegeben.

Aufgrund der in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse mit PPAR  $\gamma$  ist auch eine Bedeutung der Effekte von PPAR  $\gamma$ - Agonisten auf den Lipidstoffwechsel von Makrophagen in der Gefäßwand zu vermuten. Diese könnten durch die Interaktion mit Insulin besonders bei Diabetes mellitus Typ 2 von Bedeutung sein.

## 7 Zusammenfassung

Ein entscheidender Schritt der Atherogenese ist die Einwanderung von Monozyten in die Gefäßwand und deren exzessive Akkumulation in der Gefäßwand veränderter Lipoproteine über Scavengerrezeptoren, was zur Bildung von Schaumzellen führt. Der Transkriptionsfaktor PPAR  $\gamma$  konnte in verschiedenen Zelltypen der Gefäßwand und des atherosklerotischen Plaques vermehrt exprimiert nachgewiesen werden. Ziel dieser Arbeit war es, an einem Makrophagenmodell, der MM6 sr- Zelle, die Rolle von PPAR  $\gamma$  bei der durch Scavengerrezeptoren vermittelten Schaumzellbildung zu erhellen und die Beeinflussung durch verschiedene PPAR-Liganden – 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub>, Indomethacin und weitere NSAR sowie Rosiglitazon als Vertreter der Thiazolidindione – und deren Interaktion mit Insulin zu untersuchen.

Zunächst wurde sowohl auf Protein- wie auch auf mRNA- Ebene gezeigt, dass die Expression von PPAR  $\gamma$  durch Stimulation mit seinen eigenen Liganden Indomethacin und 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub> induzierbar ist, wobei es nach 24 Stunden Inkubation zu einem Maximum kommt. Immunzytologische Färbungen zeigten, dass PPAR  $\gamma$ - Protein bereits in unstimulierten wie auch in stimulierten Zellen bevorzugt nukleär lokalisiert ist, und dass es bei insgesamt höherer Expression nach Stimulation nicht zu einer weiteren relativen Translokation des Transkriptionsfaktors vom Zytoplasma in den Zellkern kommt.

Durchflusszytometrische Untersuchungen zeigten, dass die Oberflächenexpression des Scavengerrezeptors CD 36, der einen großen Teil der Aufnahme oxidierten LDL's durch Makrophagen vermittelt, Zeit- und Dosis- abhängig durch Liganden von PPAR  $\gamma$  stimulierbar ist. Hier wurde zunächst Indomethacin als Vertreter der synthetischen Liganden und der endogene Ligand 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J<sub>2</sub> als Kontrollstimulus verwendet.

Auch auf der Ebene der Transkription konnte durch quantitative RT-PCR nach Behandlung der Zellen mit Indomethacin eine vermehrte mRNA-Expression von CD 36 gemessen werden. Es kann somit von einer vermehrten de novo Synthese als Ursache der Stimulation von CD 36 ausgegangen werden. Durch quantitative RT-PCR wurde die Expression weiterer Scavengerrezeptoren untersucht. Es konnte

gezeigt werden, dass die Expression des „lectin-like oxidized LDL Rezeptors“ (LOX-1) auf monozytären Zellen durch Liganden von PPAR  $\gamma$  stimulierbar ist. Ebenso führte Indomethacin zu einer gesteigerten Expression des bidirektionalen, zellulären Cholesterintransporters SR-B1. Dagegen wurde die Expression des LDL-Rezeptors, dessen Regulation über den SREBP-Mechanismus einer negativen Rückkopplung mit dem intrazellulären Cholesteringehalt unterliegt, durch Stimulation von PPAR  $\gamma$  nicht beeinflusst. Auch dies erhärtet die Interpretation, dass es sich bei der vermehrten Scavengerrezeptorexpression um einen spezifischen, durch den Transkriptionsfaktor PPAR  $\gamma$  vermittelten Prozeß handelt.

Da die Arteriosklerose zunehmend als chronisch-entzündliche Erkrankung der Gefäßwand angesehen wird, wurden neben Indomethacin weitere nichtsteroidale Antirheumatika untersucht. Lediglich Salicylsäure, die als Metabolit der Acetylsalicylsäure auch bei der Standardtherapie von Gefäßerkrankungen vorliegt, hatte keinen Effekt auf die Expression von CD 36. Thiazolidindione, eine neue Gruppe oraler Antidiabetika, die durch Aktivierung von PPAR  $\gamma$  zu einer erhöhten peripheren Insulinsensitivität führen, können die Oberflächenexpression von CD 36 stimulieren.

Aus diesem Grund wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht, ob der veränderte Rezeptorstatus nach Aktivierung von PPAR  $\gamma$  zu einer vermehrten Aufnahme fluoreszenzmarkierten, oxidierten LDL's führt. Trotz einer signifikant gesteigerten Expression atherogener Scavengerrezeptoren konnte keine vermehrte Nettoakkumulation von oxLDL nachgewiesen werden. Dies konnte einerseits durch die gleichzeitig vermehrte Expression des bidirektionalen Cholesterintransporters SR-B1 erklärt werden. Andererseits wurde auch eine vermehrte Expression des Cholesterinexporters ABCA 1, der für einen initialen Schritt des reversen Cholesterintransportes verantwortlich ist, gemessen.

Somit konnte an unserem Zellmodell zwar eine vermehrte Expression zur Schaumzellbildung führender Scavengerrezeptoren wie CD 36 und LOX-1 nach Stimulation des Transkriptionsfaktors PPAR  $\gamma$  gezeigt werden. Diese wurde jedoch durch eine gleichzeitig vermehrte Induktion von am reversen Cholesterintransport beteiligten Transportern wie SR-B1 und ABCA 1 kompensiert.

Mechanistisch konnten durch Koinkubation mit dem synthetischen RXR-Liganden Methoprene in diesem Zellmodell die Eigenschaften eines permissiven Heterodimers

aus PPAR  $\gamma$  und RXR nachgewiesen werden.

Aufgrund der wichtigen Rolle der Hyperinsulinämie im Rahmen des metabolischen Syndroms als Risikofaktor für Gefäßerkrankungen wurde auch die Wirkung von Insulin auf die CD 36- Expression der Modellzelle untersucht. Es zeigte sich, dass Insulin alleine und überadditiv zu den Effekten von PPAR  $\gamma$ - Agonisten die Expression von CD 36 in Monozyten/Makrophagen steigern kann. Als Erklärung können mehrere Wirkungen von Insulin angeführt werden. Insulin kann durch Phosphorylierung die Aktivität von Phosphoproteinen wie dem Transkriptionsfaktor PPAR  $\gamma$  beeinflussen. Des Weiteren war zu beobachten, dass sich Zellen, die in Medium ohne Insulin gehalten wurden, nach Stimulation von PPAR  $\gamma$  in zwei Populationen aufspalten. Die eine zeigte eine hohe Expression von PPAR  $\gamma$  und dem abhängigen Transkriptionsprodukt CD 36, die andere wies eine niedrige Expression beider Proteine auf und konnte durch in Doppelfärbungen gleichzeitig durchgeführte Annexin Assays als präapoptotisch identifiziert werden. Unabhängig von dieser antiapoptotischen Wirkung von Insulin wurde aber auch in der voll vitalen Subpopulation die CD 36- Expression durch Insulin bei Koinkubation mit PPAR  $\gamma$ - Agonisten überadditiv stimuliert. Dies könnte einen neuen atherogenen Pathomechanismus der Hyperinsulinämie beim Diabetes mellitus Typ 2 darstellen.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Acton SL, Scherer PE, Lodish HF, Krieger M. Expression cloning of SR-B1, a CD 36-related class B scavenger receptor. *J Biol Chem.* 1994; 269:21003-21009.
2. Adamson DJA, Frew D, Tatoud R, Wolf CR, Palmer CNA. Diclofenac antagonizes peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  signaling. *Mol Pharm.* 2002; 61:7-12.
3. Akiyama TE, Sakai S, Lambert G, Nicol CJ, Matsusue K, Pimprale S, Lee Y-H, Ricote M, Glass CK, Brewer HB, Gonzalez FJ. Conditional disruption of the peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  gene in mice results in lowered expression of ABCG 1 and apoE in macrophages and reduced cholesterol efflux. *Mol Cell Biol.* 2002; 22:2607-2619.
4. Arai T, Wang N, Bezouevski M, Welch C, Tall AR. Decreased atherosclerosis in heterozygous low density lipoprotein receptor-deficient mice expressing the scavenger receptor BI transgene. *J Biol Chem.* 1999; 274: 2366-2371.
5. Argmann CA, Sawyez CG, McNeil CJ, Hegele RA, Huff MW. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoid X receptor results in net depletion of cellular cholesteryl esters in macrophages exposed to oxidized lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23:475-482.
6. Assmann G, Cullen P, Jossa F, Lewis B, Mancini M. Coronary heart disease: reducing the risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;129:1819–1824.
7. Auboeuf D, Rieusset J, Fajas L, Vallier P, Frering V, Riou JP, Staels B, Auwerx J, Laville M, Vidal H. Tissue Distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor - alpha in humans. *Diabetes.* 1997; 46:1319-1327.
8. Babitt J, Trigatti B, Rigotti A, Smart EJ, Anderson RG, Xu S, Krieger M. Murine SR-B1, a high density lipoprotein receptor that mediates selective lipid uptake, is n-glycosylated and fatty acetylated and colocalizes with plasma membrane caveolae. *J Biol Chem.* 1997; 272:13242-13249.
9. Bar-Tana J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) activation and its consequences in humans. *Toxicol Lett.* 2001; 120(1-3): 9-19.
10. Berliner JA, Territo MC, Sevanian A, Ramin S, Kim JA, Bamshad B, Esterson M, Fogelman AM. Minimally modified low density lipoprotein stimulates monocyte endothelial interactions. *J Clin Invest.* 1990; 85:1260-1266.
11. Bishop-Bailley D, Hla TJ. Endothelial cell apoptosis induced by the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) ligand 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J2. *J Biol Chem.* 1999; 274:17042-17048.

12. Bodzioch M, Orsó E, Klucken J, Langmann T, Böttcher A, Diederich W, Drobnik W, Barlage S, Büchler C, Porsch-Özcürümez M, Kaminski WE, Hahmann HW, Oette K, Rothe K, Aslanidis C, Lackner KJ, Schmitz G. The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease. *Nature Genetics*. 1999; 22: 347-351.
13. Bourdillon, M.C. et al. ICAM-1 deficiency reduces atherosclerotic lesions in double- knockout mice (ApoE<sup>-/-</sup>/ICAM-1<sup>-/-</sup>) fed a fat or a chow diet. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20:2630–2635.
14. Brown MS, Goldstein JL. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci*. 1999; 96:11041–11048.
15. Buchan KW, Hassall DG. PPAR agonists as direct modulators of the vessel wall in cardiovascular disease. *Mes Res Rev*. 2000; 20(5):350-366.
16. Burant CF, Sreenan S, Hirano KI, Tai TA, Lohmiller J, Lukens J, Davidson NO, Ross S, Graves RA. Troglitazon action is independent of adipose tissue. *J Clin Invest*. 1997; 100:2900-2908.
17. Cabrero A, Cubero M, Llaverias G, Jove M, Planavila A, Alegret M, Sanchez R, Laguna JC, Carrera MV. Differential effects of peroxisome proliferator-activated receptor activators on the mRNA levels of genes involved in lipid metabolism in primary human monocyte-derived macrophages. *Metabolism*. 2003; 52(5):652-657.
18. Calvo D, Dopazo J, Vega MA. The CD 36, CLA-1 (CD36L1), and LIMPP II (CD 36L2) gene family: cellular distribution, chromosomal location, and genetic evolution. *Genomics*. 1995; 25(1):100-106.
19. Calvo D, Gomez-Coronado D, Lasuncion MA, Vega MA. CLA-1 is an 85-kD plasma membrane glycoprotein that acts as a high-affinity receptor for both native (HDL, LDL, and VLDL) and modified (OxLDL and AcLDL) lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997; 17(11):2341-2349.
20. Calvo D, Gomez-Coronado D, Suarez Y, Lasuncion MA, Vega MA. Human CD 36 is a high affinity receptor for the native lipoproteins HDL, LDL, and VLDL. *Lipid Res*. 1998; 39: 777-788.
21. Calvo D, Vega MA. Identification, primary structure, and distribution of CLA-1, a novel member of the CD 36/LIMPII gene family. *J Biol Chem*. 1993; 268: 18929-18935.
22. Camejo G, Hurt-Camejo E, Wiklund O, Bondjers G. Association of apo B lipoproteins with arterial proteoglycans: Pathological significance and molecular basis. *Atherosclerosis*. 1999; 139:205–222.
23. Camp HS, Tafuri SR. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 1997; 272(16):10811-10816.

24. Chawla A, Barak Y, Nagy L, Liao D, Tontonoz P, Evans RM. PPAR gamma dependent and independent effects on macrophage gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nature Medicine*. 2001;7(1): 48-52.
25. Chawla A, Boisvert WA, Lee CH, Lafitte BA, Barak Y, Joseph SB, Liao D, Nagy L, Edwards PA, Curtiss LK, Evans RM, Tontonoz P. A PPAR gamma-LXR-ABCA pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol Cell*. 2001; 7(1):161-171.
26. Cheatham B, Kahn CR. Insulin action and the insulin signaling network. *Endocrine Rev*. 1995; 16:117-142.
27. Chen M, Kakutani M, Naruko T, Ueda M, Narumiya S, Masaki T, Sawamura T. Activation-dependent surface expression of LOX-1 in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 282(1):153-158.
28. Chen NG, Sarabia SF, Malloy PJ, Zhao XY, Feldman D, Reaven GM. PPAR  $\gamma$  agonists enhance vascular endothelial adhesiveness by increasing ICAM-1 expression. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 263:718-722.
29. Chen Z, Ishibashi S, Perrey S, Osuga J, Gotoda T, Katamine T, Tamura Y, Okazaki H, Yahagi N, Iizuka Y, Shionoiri F, Ohashi K, Harada K, Shimano H, Nagai R, Yamada N. Troglitazone inhibits atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice – Pleiotropic effects on CD 36 expression and HDL. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:372-377.
30. Chinetti G, Gbaguidi FG, Griglio S, Mallat Z, Antonucci M, Poulain P, Chapman J, Fruchart JC, Tedgui A, Najib-Fruchart J, Staels B. CLA-1/SR-B1 is expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferator-activated receptors. *Circulation*. 2000; 101: 2411-2417.
31. Chinetti G, Griglio S, Antonucci M, Pineda Torra I, Delerive P, Majd Z, Fruchart JC, Chapman J, Najib J, Staels B. Activation of peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem*. 1998; 273(40):25573-25580.
32. Chinetti G, Lestavel S, Bocher V, Remaley AT, Neve B, Torra IP, Teissier E, Minnich A, Jaye M, Duverger N, Brewer HB, Fruchart JC, Clavey V, Staels B. PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nature Medicine*. 2001; 7(1):53-58.
33. Claudel T, Leibowitz MD, Fievet C, Tailleux A, Wagner B, Repa JJ, Torpier G, Lobaccaro J-M, Paterniti JR, Mangelsdorf DJ, Heyman RA, Auwerx J. Reduction of atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice by activation of the retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci*. 2001; 98:2610-2615.
34. Collins AR, Meehan WP, Kintscher U, Jackson S, Wakino S, Noh G, Palinski W, Hsueh WA, Law RE. Troglitazone inhibits formation of early atherosclerotic

- lesions in diabetic and nondiabetic low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21: 365-371.
35. Costet P, Luo Y, Wang N, Tall AR. Sterol-dependent transactivation of the ABC1 promoter by the liver X receptor/retinoid X receptor. *J Biol Chem.* 2000; 275:28240-28245.
  36. Cushing, S.D. et al. Minimally modified low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci.* 1990; 87:5134–5138.
  37. Cyrus T. Disruption of 12/15-lipoxygenase diminishes atherosclerosis in apoE-deficient mice. *J Clin Invest.* 1999; 103:1597–1604.
  38. Danesch U, Weber PC, Sellmayer A. Arachidonic acid increases c-fos and Egr-1 mRNA in 3T3 fibroblasts by formation of prostaglandin E2 and activation of protein kinase C. *J Biol Chem.* 1994; 269:27258-27263.
  39. De Vos P, Lefebvre AM, Miller SG et al. Thiazolidindiones repress ob gene expression in rodents via activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Clin Invest.* 1996; 98:1004-1009.
  40. Dhaliwal BS, Steinbrecher UP. Scavenger receptors and oxidized low density lipoproteins. *Clinica chimica Acta.* 1999; 286: 191-205.
  41. DiRenzo J, Söderström M, Kurokawa R, Ogliastro MH, Ricote M, Ingrey S, Hörlein A, Rosenfeld MG, Glass CK. Peroxisome proliferator-activated receptors and retinoic acid receptors differentially control the interactions of retinoid X receptor heterodimers with ligands, coactivators and corepressors. *Mol Cell Biol.* 1997; 17(4): 2166-2176.
  42. Dong, Z.M. et al. The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest.* 1998; 102:145–152 .
  43. Draude G, Lorenz RL. TGF-beta1 downregulates CD36 and scavenger receptor A but upregulates LOX-1 in human macrophages. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000; 278: H1042-H1048.
  44. Dussault I, Forman BM. Prostaglandins and fatty acids regulate transcriptional signaling via the peroxisome proliferator activated receptor nuclear receptors. *Prostaglandins & other Lipid Mediators.* 2000; 62: 1-13.
  45. Edelman P, Vinci G, Villeval JL, Vainchenker W, Henri A, Miglierina R, Rouger P, Reviron J, Breton-Gorius J, Sureau C. A monoclonal antibody against erythrocyte ontogenic antigen identifies fetal and erythroid progenitors. *Blood.* 1986; 67:56-63.
  46. Emi M, Asaoka H, Matsumoto A, Itakura H, Kurihara Y, Wada Y, Kanamori H, Yazaki Y, Takahashi E, Lepert M, Lalouel JM, Kodama T, Mukai T. Structure, Organisation and chromosomal mapping of the human macrophage scavenger receptor gene. *J Biol Chem.* 1993; 268(3):2120-2125.

47. Endemann G, Stanton LW, Madden KS, Bryant C, White RT, Protter AA. CD 36 is a receptor for oxidized low density lipoprotein. *J Biol Chem.* 1993; 268(16): 11811-11816.
48. Escher P, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions. *Mutat Res.* 2000; 448:121-138.
49. Fajas L, Auboeuf D, Raspé E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart JC, Deeb S, Vidal-Puig A, Flier J, Briggs MR, Staels B, Vidal H, Auwerx J. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR  $\gamma$  gene. *J Biol Chem.* 1997; 272(36):18779-18789.
50. Fajas L, Fruchart JC, Auwerx J. PPAR  $\gamma$ 3 mRNA: a distinct PPAR $\gamma$  mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Lett.* 1998; 438: 55-60.
51. Febbraio M, Hajjar DP, Silverstein RL. CD 36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J Clin Invest.* 2001; 108: 785-791.
52. Febbraio M, Podrez EA, Smith JD, Hajjar DP, Hazen SL, Hoff HF, Sharma K, Silverstein RL. Targeted disruption of the class B scavenger receptor CD 36 protects against atherosclerotic lesion development in mice. *J Clin Invest.* 2000; 105: 1049-1056.
53. Feng J, Han J, Pearce SF, Silverstein RL, Gotto AM, Hajjar DP, Nicholson AC. Induction of CD 36 expression by oxidized LDL and IL-4 by a common signaling pathway on protein kinase C and PPAR gamma. *J Lipid Res.* 2000; 41(5): 688-696.
54. Folsom AR, Eckfeldt JH, Weitzmann S, et.al. Relation of carotid artery wall thickness to diabetes mellitus, fasting glucose, and insulin, body size, and physical activity. *Stroke.* 1994; 25:66-73.
55. Forman BM, Tontonoz P, Chen J, Brun RP, Spiegelman BM, Evans RM. 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin  $J_2$  is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell.* 1995; 83(5):803-812.
56. Fu X, Menke JG, Chen Y, Zhou G, MacNaul KL, Wright SD, Sparrow CP, Lund EG. 27-Hydroxycholesterol is an endogenous ligand for liver X receptor in cholesterol-loaded foam cells. *J Biol Chem.* 2001; 276:38378-38387.
57. Gerhard GT, Duell PB. Homocysteine and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 1999; 10:417-429.
58. Glassman AH, Shapiro PA. Depression and the course of coronary artery disease. *Am J Psychiatry.* 1998;155: 4-11.
59. Goldstein JL, Ho YK, Basu SK, Brown MS. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein,

- producing massive cholesterol deposition. *Proc Natl Acad Sci.* 1979; 76:333–337.
60. Gordon DJ, Rifkind BM. High-density lipoprotein—the clinical implications of recent studies. *N Engl J Med.* 1989; 321:1311–1316.
  61. Gough PJ, Greaves DR, Gordon S. A naturally occurring isoform of the human macrophage scavenger receptor (SR-A) gene generated by alternative splicing blocks modified LDL uptake. *J Lipid Res.* 1998; 39(3): 531-543.
  62. Han J, Hajjar DP, Tauras JM, Feng J, Gotto AM, Nicholson AC. Transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) and TGF-beta 2 decreases expression of CD 36, the type B scavenger receptor, through mitogen-activated protein kinase phosphorylation of peroxisome-proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem.* 2000; 275:1241-1246.
  63. Han S, Sidell N. Peroxisome-proliferator-activated-receptor gamma (PPAR gamma) independent induction of CD 36 in THP-1 monocytes by retinoic acid. *Immunology.* 2002; 106: 53-59
  64. Harmon MA, Boehm MF, Heyman RA, Mangelsdorf DJ. Activation of mammalian retinoid X receptors by the insect growth regulator methoprene. *Biochemistry.* 1995; 92: 6157-6160.
  65. Hauser S, Adelmant G, Sarraf P, Wright HM, Mueller E, Spiegelman BM. Degradation of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma is linked to ligand-dependent activation. *J Biol Chem.* 2000 Mar. Manuscript M001297200
  66. Havel RJ, Eder H, Bradgon J. The distribution and chemical preparation of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest.* 1955; 13:1345-1353.
  67. Hayashida K, Kume N, Minami M, Kataoka H, Morimoto M, Kita T. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha ligands increase lectin-like oxidized low density lipoprotein receptor –1 expression in vascular endothelial cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 947:370-372.
  68. Herrmann C, Assmuss B, Urbrich C, Zeiher AM, Dimmeler S. Insulin-mediated stimulation of protein kinase Akt – a potent survival signaling cascade for endothel cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000; 20:402-409.
  69. Hirata Y, Hayashi H, Ito S, Kikawa Y, Ishibashi M, Sudo M, Miyazaki H, Fukushima M, Narumya S, Hayaishi O. Occurrence of 9-deoxy- $\Delta^9, \Delta^{12-13}, 14$ -dihydroprostaglandin D2 in human urine. *J Biol Chem.* 1988; 263: 16619-16625.
  70. Hu E, Kim JB, Sarraf P, Spiegelman BM. Inhibition of adipogenesis through MAP kinase-mediated phosphorylation of PPAR gamma. *Science.* 1996; 274(5295): 2100-2103.

71. Ivandic B. et al. Role of group II secretory phospholipase A2 in atherosclerosis I. Increased atherogenesis and altered lipoproteins in transgenic mice expressing group IIa phospholipase A2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19:1284–1290.
72. Ji Y, Jian B, Wang N, Sun Y, Moya ML, Phillips MC, Rothblat GH, Swaney JB, Tall AR. Scavenger receptor BI promotes high density lipoprotein-mediated cellular cholesterol efflux. *J Biol Chem.* 1997; 272(34):20982-5.
73. Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature.* 1998; 391:82-86.
74. Jones AB. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) modulators: Diabetes and beyond. *Med Res Rev.* 2001; 21(6):540-552.
75. Kataoka H, Kume N, Miyamoto S, et al. Expression of lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in human atherosclerotic lesions. *Circulation.* 1999; 99:3110-3117.
76. Kletzien RF, Foellmi LA, Harris PK, Wyse BM, Clarke SD. Adipocyte fatty acid-binding protein: regulation of gene expression in vivo and in vitro by an insulin-sensitizing agent. *Mol Pharmacol.* 1992; 42:558-562.
77. Kliewer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM. A prostaglandin J<sub>2</sub> metabolite binds peroxisome proliferator – activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell.* 1995; 83:813 – 819.
78. Kliewer SA, Umesono K, Noonan DJ, Heyman RA, Evans RM. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature.* 1992; 358:771-774.
79. Knight DM, Chapman AB, Navre M, Drinkwater L, Bruno JJ, Rinold GM. Requirements for triggering of adipocyte differentiation by glucocorticoids and indomethacin. *Mol Endocrinol.* 1987; 1:36-43.
80. Kodama T, Reddy P, Kishimoto C, Krieger M. Purification and characterisation of a bovine acetyl low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci.* 1988; 85:9238–9242.
81. Koshiyama H, Shimono D, Kuwamura N, Minamikawa J, Nakamura Y. Inhibitory effect of pioglitazone on carotid wall thickness in type 2 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001; 86: 3452-3456.
82. Krieger M. Charting the fate of the „good cholesterol“: identification and characterisation of the high-density lipoprotein receptor SR-B1. *Annu Rev Biochem.* 1999; 68:523-558.
83. Kronenberg F. Role of lipoprotein(a) and apolipoprotein(a) phenotype in atherogenesis. *Circulation.* 1999; 100:1154–1160.

84. Kugiyama K. Circulating levels of secretory type II phospholipase A<sub>2</sub> predict coronary events in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 1999; 100:1280–1284.
85. Kume N, Kita T. Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1) in atherogenesis. *Trends Cardiovasc Med*. 2001; 11:22-25.
86. Kume N, Moriwaki H, Kataoka H, Minami M, Murase T, Sawamura T, Masaki T, Kita T. Inducible expression of LOX-1, a novel receptor for oxidized LDL, in macrophages and vascular smooth muscle cells. *Ann N Y Acad Sci*. 2000; 902: 323-327.
87. Langman T, Klucken J, Reil M, Liebisch G, Luciani M-F, Chimini G, Kaminski WE, Schmitz G. Molecular cloning of the human ATP-binding cassette transporter 1 (hABC1): evidence for sterol-dependent regulation in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999; 257: 29-33.
88. Latruffe N, Vamecq. Peroxisome proliferators and peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) as regulators of lipid metabolism. *Biochimie*. 1997; 79: 81-94.
89. Law RE, Goetze S, Xi XP, Jackson S, Kawano Y, Demer L, Fishbein MC, Meehan WP, Hsueh WA. Expression and function of PPAR gamma in rat and human vascular smooth muscle cells. *Circulation*. 2000; 101:1311-1318.
90. Law RE, Meehan WP, Xi XP, Graf K, Wuthrich DA, Coats W, Faxon D, Hsueh WA. Troglitazone inhibits vascular smooth muscle cell growth and intimal hyperplasia. *J Clin Invest*. 1996; 98:1897-1905.
91. Lawn RM, Wade DP, Couse TL, Wilcox JN. Localisation of human ATP-binding cassette transporter 1 (ABC1) in normal and atherosclerotic tissues. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001; 21: 378-385.
92. Lawn RM, Wade DP, Garvin MR, Wang X, Schwartz K, Porter JG, Seilhamer JJ, Vaughan AM, Oram JF. The tangier disease gene product ABC1 controls the cellular apolipoprotein-mediated lipid removal pathway. *J Clin Invest*. 1999; 104: R25-R31.
93. Lehmann JM, Lenhard JM, Oliver BB, Ringold GM, Kliewer SA. Peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem*. 1997; 272: 3406-3410.
94. Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidindione is a high affinity ligand for peroxisome-proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR  $\gamma$ ). *J Biol Chem*. 1995; 270:12953-12956.

95. Li AC, Brown KK, Silvestre MJ, Willson TM, Palinski W, Glass CK. Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest.* 2000; 106:523-531.
96. Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA, Libby P. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1993; 13:197–204.
97. Lougheed M, Ming Lum C, Ling W, Suzuki H, Kodama T, Steinbrecher UP. High-affinity saturable uptake of oxidized low density lipoprotein by macrophages from mice lacking the scavenger receptor class A type I/II. *J Biol Chem.* 1997; 272: 12938-12944.
98. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr LR, Randall RJ. *J Biol Chem.* 1951; 193: 265-275.
99. Lusis AJ, Weinreb A, Drake TA. in *Textbook of Cardiovascular Medicine* (ed. Topol, E. J.) 2389–2413 (Lippincott-Raven, Philadelphia, 1998).
100. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature.* 2000; 407:233-241.
101. Malerod L, Sporstol M, Juvet JK, Mousavi A, Gjoen T, Berg T. Hepatic scavenger receptor class B, type I is stimulated by peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  and hepatocyte nuclear factor  $4\alpha$ . *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 305:557-565.
102. Marathe S, Kuriakose G, Williams KJ, Tabas I. Sphingomyelinase, an enzyme implicated in atherogenesis, is present in atherosclerotic lesions and binds to specific components of the subendothelial extracellular matrix. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19:2648–2658.
103. Marx N, Hombach V. Peroxisome proliferator-activated receptors in der Gefäßwand – neue Regulatoren der Genexpression in vaskulären Zellen. *Z Kardiol.* 2001; 90: 470-477.
104. Marx N, Schönbeck U, Lazar MA, Libby P, Plutzky J. Peroxisome proliferator activated receptor gamma activators inhibit gene expression and migration in human vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1998; 83:1097-1103.
105. Marx N, Sukhova G, Murphy C, Libby P, Plutzky J. Macrophages in human atheroma contain PPAR  $\gamma$ : Differentiation-dependent peroxisomal proliferator-activated receptor gamma expression and reduktion of MMP-9 activity through PPAR gamma activation in mononuclear phagocytes in vitro. *Am J Pathol.* 1998; 153:17-23.
106. Matthaehi S, Stumvoll M, Häring HU. Thiazolidindione (Insulinsensitizer) Neue Aspekte in der Therapie des Diabetes mellitus Typ 2. *Dt Ärztebl* 2001 April 6; 98: A912-918[Heft 14].

107. Mehta JL, Li D. Identification, regulation and funktion of a novel lectin-like oxidized low density-lipoprotein receptor. *J Am Coll Cardiol.* 2002; 39: 1429-1435.
108. Minamikawa J, Tanaka S, Yamauchi M, Inoue D, Koshiyama H. Potent inhibitory effekt of troglitazone on carotid arterial wall thickness in type II diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83:1818-1820.
109. Minamikawa J, Yamauchi M, Inoue D, Koshiyama H. Another potential use of troglitazone in non- insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83:1041-1042.
110. Moore KJ, Rosen ED, Fitzgerald ML, Randow F, Andersson LP, Altshuler D, Milstone DS, Mortensen RM, Spiegelman BM, Freeman MW. The role of PPAR-gamma in macrophage differentiation and cholesterol uptake. *Nature Medicine.* 2001; 7(1):41-47.
111. Moriwaki H, Kume N, Sawamura T et al. Ligand specificity of LOX-1 a novel endothelial receptor for oxidized low density lipoprotein. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998; 18:1541-1547.
112. Murao K, Terpstra V, Green SR, Kondratenko N, Steinberg D, Quehenberger O. Characterisation of CLA-1, a human homologue of rodent scavenger receptor B1, as a receptor for high density lipoprotein and apoptotic thymocytes. *J Biol Chem.* 1997; 272:17551-17557.
113. Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JGA, Chen H, Evans RM. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPAR gamma. *Cell.* 1998; 93: 229-240.
114. Naito M, Suzuki H, Matsumoto A, Kodama T, Takahshi K. Coexpression of type I and type II macrophage scavenger receptors in macrophages of various organs and foam cells in atherosclerotic lesions. *Am J Pathol.* 1992; 141(3): 591-599.
115. Narumiya S, Ohno K, Fukushima M, Fujiwara M. Site and mechanism of growth inhibition by prostaglandins. III. Distribution and binding of Prostaglandin A2 and  $\Delta$ -12 Prostaglandin J2 in nuclei. *J Pharmacol Exp Therap.* 1987; 242: 306-311.
116. Nathan L, Chaudhuri G. Estrogens and atherosclerosis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1997; 37:477–515.
117. Nicholson AC, Han J, Febbraio M, Silversterin RL, Hajjar DP. Role of CD 36 , the macrophage class B scavenger receptor, in atherosclerosis. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 967: 224-228.
118. Noguchi N, Sakai H, Kato Y, Tsuchiya J, Yamamoto Y, Niki E, Horikoshi H, Kodama T. Inhibition of oxidation of low density lipoprotein by toglitazone. *Atherosclerosis.* 1996; 123:227-234.

119. Nozaki S, Kashiwagi H, Yamashita S. Reduced uptake of oxidized low density lipoproteins in monocyte-derived macrophages from CD 36-deficient subjects. *J Clin Invest.* 1995; 96:1859-1865.
120. Olefsky J. *Curr Opin Endocrinol Diabetes.* 1995. 2:290-299.
121. Oram JF, Lawn RM, Garvin MR, Wade DP. ABCA1 is the cAMP-inducible apolipoprotein receptor that mediates cholesterol secretion from macrophages. *J Biol Chem.* 2000; 275:34508-34511.
122. Oram JF, Lawn RM. ABCA1: The gatekeeper for eliminating excess tissue cholesterol. *J Lipid Res.* 2001; 42:1137-1179.
123. Oram JF. HDL Apolipoproteins and ABCA 1. Partners in the removal of excess cellular cholesterol. *Arteriosler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23:720-727.
124. Oram JF. The cholesterol mobilizing transporter ABCA1 as a new therapeutic target for cardiovascular disease. *Trends Cardiovasc Med.* 2002; 12:170-175.
125. Park KS, Ciaraldi TP, Abrams-Carter L, Mudaliar S, Nikoulina SE, Henry RR. Troglitazone regulation of glucose metabolism in human skeletal muscle cultures from obese type II diabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998; 83:1636-1643.
126. Parks KS, Ciaraldi TP, Abrams-Carter L, Mudaliar S, Nikoulina SE, Henry RR. PPAR-gamma gene expression is elevated in skeletal muscle of obese and type II diabetic subjects. *Diabetes.* 1997 Jul; 46(7): 1230-1234.
127. Pasceri V, Wu HD, Willerson JT, Yeh ETH. Modulation of vascular inflammation in vitro and in vivo by peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  activators. *Circulation.* 2000; 101:235-238.
128. Patel L, Charlton SJ, Marshall IC, Moore GBT, Coxon P, Moores K, Clapham JC, Newman SJ, Smith SA, Macphee CH. PPAR  $\gamma$  is not a critical mediator of primary monocyte differentiation or foam cell formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002; 290:707-712.
129. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO, Criqui M, Fadl YY, Fortmann SP, Hong Y, Myers GL, Rifai N, Smith SC, Taubert K, Tracy RP, Vinicor F. Markers of inflammation in cardiovascular disease. Application to clinical and public health practice. A statement for healthcare professionals from the centers for disease control and prevention and the american heart association. *Circulation.* 2003; 107:499-511.
130. Peraldi P, Xu M, Spiegelman BM. Thiazolidindiones block tumor necrosis factor-alpha-induced inhibition of insulin signaling. *J Clin Invest.* 1997; 100: 1863-1869.

131. Podrez EA .Macrophage scavenger receptor CD36 is the major receptor for LDL modified monocyte-generated reactive nitrogen species. *J Clin Invest.* 2000; 105:1095–1108.
132. Rajavashisth TB, Andalibi A, Territo MC, Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ. Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low density lipoproteins. *Nature.* 1990; 344:254-257.
133. Reid VC, Mitchinson MJ. Toxicity of oxidized low density lipoprotein towards mouse peritoneal macrophages in vitro. *Atherosclerosis.* 1993; 98:17-24.
134. Ricote M, Huang J, Fajas L, Li A, Welch J, Najib J, Witztum JL, Auwerx J, Palinski W, Glass CK. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Medical Sciences.*1998; 95:7614-7619.
135. Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator activated receptor gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature.*1998; 391:79-82.
136. Rieusset J, Andreelli F, Auboeuf D, Roques M, Vallier P, Riou JP, Auwerx J, Laville M, Vidal H. Insulin acutely regulates the expression of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in human adipocytes. *Diabetes.* 1999; 48(4):699-705.
137. Rocchi S, Auwerx J. Peroxisome proliferator-activated receptor – gamma: a versatile metabolic regulator. *Ann Med.* 1999; 31:342-351.
138. Rohrer L, Freeman M, Kodama T, Penman M, Krieger M. Coiled-coil fibrous domains mediate ligand binding by macrophage scavenger receptor type II. *Nature.* 1990; 343(6258):570-572.
139. Ross R. Atherosclerosis – An inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999; 340(2): 115-126.
140. Sandouk T, Reda D, Hofmann C. The antidiabetic agent pioglitazone increases expression of glucose transporters in 3T3-F442A cells by increasing messenger ribonucleic acid transcript stability. *Endocrinology.* 1993; 133: 352-359.
141. Sawamura T, Kume N, Aoyama T, Moriwaki H, Hoshikawa H, Aiba Y, Tanaka T, Miwa S, Katsura Y, Kita T, Masaki T. An endothelial receptor for oxidiced low-density lipoprotein. *Nature.* 1997; 386: 73-77.
142. Scheithe R, Heidenthal AK, Danesch U, Mauthner E, Hapfelmeier G, Becker A, Pietsch A, Weber PC, Hrboticky N. Acetylated LDL endocytosis by the human monocytic mono mac 6sr cells is not mediated by the macrophage type I and II scavenger receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17: 1024-1031.

143. Scheithe R, Hrboticky N, Ziegler-Heitbrock HW, Weber PC. Receptor-specific uptake and degradation of acetylated, oxidized and native LDL in the human monocytic Mono Mac 6sr cell line. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994; 202(1):334-339.
144. Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. Role of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) in mediating the effects of fibrates and fatty acids on gene expression. *J Lipid Res.* 1996; 37(5):907-25.
145. Schwartz K, Lawn RM, Wade DP. ABC 1 gene expression and ApoA-I-mediated cholesterol efflux are mediated by LXR. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 274:794-802.
146. Shalev A, Sigrist-Kaiser CA, Yen PM, Wahli W, Burger AG, Chin WW, Meier CA. The peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  is a phosphoprotein: Regulation by insulin. *Endocrinology.* 1996; 137:4499-4502.
147. Shao D, Rangwala SM, Bailey ST, Krakow SL, Reginato MJ, Lazar MA. Interdomain communication regulating ligand binding by PPAR-gamma. *Nature.* 1998; 396(6709):377-380.
148. Shiffman D, Mikita T, Tai JTN, Wade DP, Porter JG, Seilhamer JJ, Somogyi R, Liang S, Lawn RM. Large scale gene expression analysis of cholesterol-loaded macrophages. *J Biol Chem.* 2000; 275: 37324-37332.
149. Singaraja RR, Brunham LR, Visscher H, Kastelein JJP, Hayden MR. Efflux and atherosclerosis – The clinical and biochemical impact of variations in the ABCA1 gene. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23:1322-1332.
150. Smith WL. Prostanoid biosynthesis and mechanisms of action. *Am J Physiol.* 1992; 263: F181-F191.
151. Staels B, Schoonjans K, Fruchart JC, Auwerx J. The effects of fibrates and thiazolidindiones on plasma triglyceride metabolism are mediated by distinct peroxisome proliferator activated receptors (PPARs). *Biochimie.* 1999; 79: 95-99.
152. Standl E. Hyperinsulinemia and atherosclerosis. *Clin Invest Med.* 1995; 18(4):261-266.
153. Steinberg D. Atherosclerosis in perspective: Hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. *Nature Medicine.* 2002; 8(11):1211-1217.
154. Steinbrecher UP. Receptors for oxidized low density lipoprotein. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1999; 1436:279-298.
155. Stout RW. Insulin and atheroma: 20-yr perspective. *Diabetes Care.* 1990; 13:631-654.
156. Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, Kamada N, Kataoka M, Jishage K, Ueda O, Sakaguchi T, Higashi T, Suzuki T, Takashima Y, Kawabe Y, Cynshi O, Wada Y,

- Honda M, Kumhara H, Toi T, Matsomoto A, Azuma A, Noda T, Toyoda Y, Itakura H, Yazaki Y, Horiuchi S, Takahashi K, Kruijt JK, van Berkel TJC, Steinbrecher UP, Ishibashi S, Maeda N, Gordon S, Kodama T. Resistance to atherosclerosis and susceptibility to infection in scavenger receptor knockout mice. *Nature*. 1997; 386:292-294.
157. Tada lida K, Suzuki H, Sone H, Shimano H, Toyoshima H, Yatoh S, Asano T, Okuda Y, Yamada N. Insulin inhibits apoptosis of macrophage cell line, THP-1 cells, via phosphatidylinositol-3-kinase-dependent pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002; 22:380-386.
158. Terpstra V, van Amersfoort ES, van Velzen AG, Kuiper J, van Berkel TJC. Hepatic and extrahepatic scavenger receptors – Function in relation to disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20:1860-1872.
159. Teupser D, Thiery J, Walli AK, Seidel D. Determination of LDL- and scavenger-receptor activity in adherent and non adherent cultured cells with a new single-step fluorimetric assay. *Biochim Biophys Acta*. 1996; 1303:193-198.
160. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma, a lipid activated transcription factor. *Cell*. 1994; 79:1147-1156.
161. Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JGA, Thomazy VA, Evans RM. PPAR gamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell*. 1998; 93: 241-252.
162. Trigatti B, Rayburn H, Vinals M, Braun A, Miettinen H, Penman M, Hertz M, Schrenzel M, Amigo L, Rigotti A, Krieger M. Influence of the high density lipoprotein receptor SR-BI on reproductive and cardiovascular pathophysiology. *Proc Natl Acad Sci*. 1999; 96(16):9322-9327.
163. Vaisman BL, Lambert G, Amar M, et. al. ABCA 1 overexpression leads to hyperalphalipoproteinemia and increased biliary cholesterol excretion in transgenic mice. *J Clin Invest*. 2001; 108:303-309.
164. Venkatesvaran A, Repa JJ, Lobaccaro JM, Bronson A, Mangelsdorf DJ, Edwards PA. Human white/murine ABC8 mRNA levels are highly induced in lipid-loaded macrophages. A transcriptional role for specific oxysterols. *J Biol Chem*. 2000; 275:14700-14707.
165. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis: Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labeled Annexin V. *J Immunol Methods*. 1995;184:39-51.
166. Watanabe M, Inukai K, Katagiri H, Awata T, Oka Y, Katayama S. Regulation of PPAR gamma activity in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003; 300:429-436.

167. Werman A, Hollenberg A, Solanes G, Bjørbæk C, Vidal-Puig AJ, Flier JS. Ligand-independent activation domain in the N Terminus of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR). *J Biol Chem.* 1997; 272(32): 20230-20235.
168. Willson TM, Brown PJ, Sternbach DD, Henke BR. The PPARs: From orphan receptors to drug discovery. *J Med Chem.* 2000; 43(4):527-550.
169. Willson TM, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Curr Opin Chem Biol.* 1997; 1:235-241.
170. Wolfbauer G, Glick JM, Minor LK, Rothblat GH. Development of the smooth muscle foam cell: uptake of macrophage lipid inclusion. *Proc Natl Acad Sci.* 1986; 83:7760-7764.
171. Yamada Y, Doi T, Kodama H, Kodama T. Scavenger receptor family proteins: roles for atherosclerosis, host defence and disorders of the central nervous system. *Cell Mol Life Sci.* 1998; 54:628-640.
172. Yancey PG, Bortnick AE, Kellner-Weibel G, de la Llera-Moya M, Phillips MC, Rothblat GH. Importance of different pathways of cellular cholesterol efflux. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003; 23:712-719.
173. Yesner LM, Huh HY, Pearce SF, Silverstein RL. Regulation of monocyte CD 36 and thrombospondin-1 expression by soluble mediators. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996; 16:1019-1025.
174. Yoshida H, Kondratenko N, Green S, Steinberg D, Quehenberger O. Identification of the lectin-like receptor for oxidized low-density lipoprotein in human macrophages and its potential role as a scavenger receptor. *Biochem J.* 1998; 334:9-13.
175. Young PW, Buckle DR, Cantello BCC, et al. Identification of high-affinity binding sites for the insulin sensitizer rosiglitazone (BRL-49653) in rodent and human adipocytes using a radioiodinated ligand for peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$ . *J Pharmacol Exp Ther.* 1998; 284:751-759.
176. Zhang B, Berger J, Zhou G, Elbrecht A, Biswas S, White-Carrington S, Szalkowski D, Moller DE. Insulin- and mitogen-activated protein kinase-mediated phosphorylation and activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem.* 1996; 271(50): 31771-31774.
177. Ziegler-Heitbrock HW, Thiel E, Futterer A, Herzog V, Wirtz A, Riethmuller G. Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes. *Int J Cancer.* 1988; 41(3):456-461.
178. Zuckerman SH, Kauffman RF, Evans GF. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha, gamma coagonist LY465608 inhibits macrophage activation and atherosclerosis in apolipoprotein E knockout mice. *Lipids.* 2002; 37(5):487-94.

## C Anhang

### **Danksagung**

Zu allererst gilt mein größter Dank Herrn Prof. Dr. med. Reinhard L. Lorenz für die Überlassung des Themas. Danken möchte ich für seine Hilfe und seinen Rat, die weit über die Belange der Doktorarbeit hinausgegangen sind.

Herrn Prof. Dr. med. P. C. Weber danke ich, dass ich die Arbeit an seinem Institut durchführen konnte.

Besonders danken möchte ich Frau PD Dr. Nina Hrboticky und Frau Tina Rubic für die Beratung und Unterstützung bei der praktischen Durchführung.

Frau Brigitte Zimmer und Frau Kathrin von Oheimb danke ich für die professionelle technische Unterstützung im Labor.

**Lebenslauf**

Name: Kleinhans  
 Vorname: Ralph  
 Geburtsdatum /-ort: 04.09.1975, München  
 Eltern: Dr. med. Maria Kleinhans, geb. Schneider  
 Johann Kleinhans, Dipl. Volkswirt

Schulbildung:

1982 – 1986 Grundschole Ismaning  
 1986 – 1995 Werner – Heisenberg – Gymnasium, Garching b. München  
 30.06.1995 Allgemeine Hochschulreife

Studium: Humanmedizin an der LMU München

WS 1995/96 – SS 1997 Vorklinik  
 WS 1997/98 – SS 1998 1. Klinischer Studienabschnitt  
 WS 1998/99 – SS 2000 2. Klinischer Studienabschnitt  
 23.04.2001 bis 24.03.2002 Praktisches Jahr

Examina:

12.09.1997 Ärztliche Vorprüfung  
 27.08.1998 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
 09.04.2001 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
 16.04.2002 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Famulaturen:

09.03.1998 – 09.04.1998 Innere Medizin  
 Rotkreuz-Krankenhaus, München  
 14.09.1998 – 14.10.1998 Radiologie u. Nuklearmedizin  
 Gemeinschaftspraxis Dr. Westenburg et al., München  
 27.09.1999 – 27.10.1999 Dermatologie  
 Dermatologische Klinik der Universität, München  
 11.09.2000 – 11.10.2000 Neurologie  
 Max-Planck-Institut für Psychiatrie, München

Praktisches Jahr:

23.04.2001 – 12.08.2001 Radiologie  
 Institut für Klinische Radiologie – Innenstadt, LMU  
 13.08.2001 – 02.12.2001 Innere Medizin  
 Medizinische Klinik – Innenstadt, LMU  
 03.12.2001 – 24.03.2002 Chirurgie  
 Chirurgische Klinik – Innenstadt, LMU

Arzt im Praktikum:

01.06.2002 – 30.11.2003  
 Klinikum der Universität München  
 Medizinische Poliklinik – Innenstadt,  
 Prof. Dr. med. D. Schlöndorff  
 Kardiologie, Prof. Dr. med. K. Theisen

seit 01.01.2004:

Assistenzarzt  
 Klinikum Dachau  
 Abteilung Innere Medizin I  
 PD Dr. med. M. A. Weber